



Selección de levaduras no tradicionales para la elaboración de cervezas artesanales

María Noel Larroque



2020

Uruguay

Tesis entregada como parte de los requerimientos para la obtención del título

MAGISTER EN QUÍMICA

Facultad de Química, Universidad de la República

Selección de levaduras no tradicionales para la elaboración de cervezas artesanales

María Noel Larroque

Tesis entregada como parte de los requerimientos para la obtención del título

MAGISTER EN QUÍMICA

Director de Tesis: Dr. Francisco Carrau y Dra. Karina Medina

Director Académico: Dr. Francisco Carrau

Tribunal evaluador:

Dra. Silvana Vero

Dra. Paula Rodríguez

Dr. Carlos García

Área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones, CYTAL

Facultad de Química, Universidad de la República

A mis padres Suamy y Darwin, por su amor incondicional siempre.

Agradecimientos:

Durante este trabajo de tesis conté con el apoyo y la colaboración de muchas personas. Todas ellas aportaron su granito de arena de una forma u otra para que pudiera lograr, darle forma y construir este trabajo.

A mis tutores, Dr. Francisco Carrau y Dra. Karina Medina quienes me dieron esta oportunidad y me guiaron durante el desarrollo de esta Tesis. A Karina un agradecimiento especial por su confianza, su accesibilidad, su disposición y su guía constante siempre, respondiendo mis inquietudes y ayudándome en todo lo que le fuera posible.

A todo el equipo del Área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones: Flor, Anita, Ceci, Vale, Nico, Nara, Laura, Gabriel, Boni, los Eduardos Boido y Dellacassa, Yanine y María José. A los coordinadores del curso de especialista en cerveza los Pablos y Matías por su colaboración en las pruebas. Todos formaron parte de todo este proceso y su colaboración fue muy importante.

Gracias al equipo cervecero del laboratorio: Ceci, Nara, Nico y Karina por el intercambio de información, ayuda y por las jornadas muy divertidas elaborando cerveza y probando nuestras levaduras. Gracias a Gabriel por sus enseñanzas y ayuda en mis primeros pasos con el trabajo de levaduras. Gracias al equipo aromático Laura y los Eduardos por su colaboración. Gracias a Flor, Anita, Vale, Ceci por todos los favores, las ayudas y la hermosa y divertida compañía en un día a día.

También quisiera agradecer a Maltería Oriental por las muestras y a las cervecerías: Mastra, Davok, Indica y sus cerveceros que nos permitieron sacar muestras y hacer nuestras pruebas. En especial a Alejandro por su disposición y su intercambio tanto en sus evaluaciones como en sus conocimientos.

A mi familia, a mi familia postiza y a Marta. En especial a mis padres que son y han sido siempre el pilar fundamental en mi vida, con su apoyo constante, amor y fe en mí siempre.

A todas mis amigas y amigos. En especial a Isa, Vir, Mari, Eli, Lu, Flor, Anita, Tefa y Pao. A todos ellos por su amor, su apoyo, su compañía y por formar parte de mi vida.

Este recorrido no solo me permitió tener una experiencia profesional enriquecedora sino que me permitió conocer personas las cuales forman parte de mi vida hoy en día.

Finalmente quisiera agradecer a las distintas instituciones que mediante su financiamiento colaboraron en la realización de esta tesis, PEDECIBA QUÍMICA, ANII, CSIC, AUCI, MEC.

Parte de este trabajo de tesis ha sido publicado en la siguiente revista y en los siguientes congresos:

Revista

-“Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds.” Larroque, M.N.; Fariña, L.; Boido, E.; Dellacassa, E.; Carrau F.; Medina, K.; Enviado para su publicación a la revista International Journal of Food Microbiology.

Congresos

-Medina, K.; Larroque, M.N.; Schinca, C.; Manisse, N.; Giannone, N.; Carrau, F. “Selection of non-conventional yeast for craft beer production with low carbohydrate content and gluten free”. 30° Congreso Brasileiro de Microbiología, Octubre 2019, Maceio Brasil.

-“Craft Beer: increasing flavor diversity using mixed culture fermentation with non-conventional yeasts.” M.N.Larroque, K.Medina, L.Fariña, E. Boido, E. Dellacassa, F.Carrau. Presentación en forma oral en inglés en ISSY34 International Specialized Syposium on Yeasts.1 y 4 de octubre del 2018, S.C Bariloche.

-“Levaduras no tradicionales. La clave para la elaboración de cervezas artesanales diferenciadas” M.N.Larroque, K.Medina, L.Fariña, E. Boido, E. Dellacassa, F.Carrau. Presentación en forma oral en las Jornadas sobre aplicaciones Biotecnológicas de hongos y Levaduras.14 y 15 de noviembre del 2017, Anexo del Palacio Legislativo.

-“Estudio del perfil aromático de levaduras nativas para la elaboración de cervezas artesanales” M.N.Larroque, K.Medina, F.Carrau. Presentación en forma de poster en el 5° Encuentro Nacional de Química 2017. ENAQUI.18 y 2 de octubre del 2017, Torre de las Telecomunicaciones.

-“Estudio de la vida útil de preparados de levaduras nativas No *Saccharomyces* para su aplicación en Bodega”. M.N.Larroque, K.Medina, F.Carrau. Presentación formato poster Jornada de Promoción de Carreras Académicas (Procaad) 11 Octubre 2017, Facultad de Química.

-“Non-conventional native yeast for increase flavor diversity”. Presentación oral en el Seminario Training Course on Beer Brewing Techniques for Developing Countries in 2017” realizado en Taian, China ,del 3 al 27 de Mayo del 2017.Organizado por: Shandong Foreign Trade Vocational College.

-K. Medina, M.N. Larroque y F. Carrau., Selección de levaduras nativas no-*Saccharomyces* para la elaboración de cervezas de alta calidad. Presentación en modalidad oral en el 2° Congreso Iberoamericano de Ingeniería de Alimentos. Noviembre 2016. Punta del Este, Uruguay.

RESUMEN

En el proceso de elaboración y obtención de la cerveza, la fermentación de los azúcares presentes en el mosto por parte de las levaduras y la producción de aromas deseados, según los diferentes estilos, constituye un tema clave en la obtención del producto.

En dicho proceso intervienen una serie de variables, que van desde las diferentes materias primas que forman parte de la elaboración de la cerveza así como las diferentes técnicas para la realización de las etapas de elaboración. Durante la fermentación alcohólica, las levaduras transforman los azúcares del mosto en etanol y anhídrido carbónico como principales compuestos, pero además producen y/o modifican una gran diversidad de compuestos aromáticos presentes en la malta (cereal malteado) y el lúpulo, muchos de los cuales son compuestos que determinan en buena medida la calidad de una cerveza.

Basados en la existencia de una gran biodiversidad de levaduras nativas y específicamente de levaduras no-*Saccharomyces*, en el presente trabajo de tesis, se realizó la selección y caracterización de cepas nativas no tradicionales. Dentro de las cepas seleccionadas se encontraron cepas *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*, *S.cerevisiae*) nativas y cepas no-*Saccharomyces* nativas, provenientes de la industria cervecera y la industria vitivinícola uruguaya.

Como producto de la primera parte del trabajo de caracterización y selecciones continuadas de las mejores cepas, se seleccionaron 4 cepas de levaduras nativas, dos *Saccharomyces* y dos no-*Saccharomyces*. Se estudiaron las capacidades fermentativas y la producción de compuestos aromáticos en un medio similar cervecero. En base a los resultados obtenidos se realizaron micro fermentaciones con cultivos mixtos.

A partir de los resultados obtenidos en la etapa anterior, se seleccionaron dos cepas para realizar ensayos a escala semi piloto en las instalaciones de una cervecería artesanal nacional.

Entre los resultados obtenidos, se destacan los siguientes:

- 1) Las levaduras nativas aisladas en esta tesis fueron 12 y se utilizaron 35 cepas de levaduras nativas aisladas de la industria vitivinícola. Del aislamiento de estas levaduras nativas, se encontraron 26 cepas pertenecientes a diversos géneros y especies, autóctonas del Uruguay y fermentadoras de maltosa.
- 2) Se diseñó un Símil Mosto Cervecerero de forma de estandarizar el estudio de las cepas.
- 3) Se determinó para cepas nativas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* la formación de distintos compuestos aromáticos que pusieron de manifiesto la importancia de trabajar con la diversidad de levaduras nativas y en particular con las no-*Saccharomyces*.
- 4) Se constató la producción en niveles significativos sobre el umbral sensorial de percepción de los siguientes compuestos en al menos una de las cepas estudiadas: 4 vinil guaiacol, 2-feniletanol (alcohol β feniletílico), alcohol isoamílico (3-metil-1-butanol), 3-(metilitio) -1-propanol, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de 2-feniletilo, ácidos butanoico, hexanoico, octanoico y ácido isovalérico y finalmente limoneno. Se destacó la producción de octanoato de etilo con 129 unidades de aromas (UA) para todas las cepas a excepción de la *Zygoascus meyeræ* (T12_135F). El hexanoato de etilo también se destacó en todas las cepas principalmente en la *Pichia anomala* (BCMO15_2) con 25 UA y para esta cepa el compuesto 4 vinilguaiacol se destacó con 6 UA.
- 5) Se demostró el incremento de la capacidad fermentativa de las microfermentaciones cuando se emplearon cultivos mixtos compuestos por cepas nativas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.
- 6) Se constató el aporte aromático en cultivos mixtos con la cepa *Hanseniaspora vineae* T02/05F (cepa no fermentadora de la maltosa).
- 7) Tres cepas pertenecientes a las siguientes especies: *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygoascus meyeræ* (*Zm*, *Z.meyeræ*) y *Pichia anomala* (*Pa*, *P.anomala*), fueron seleccionadas para ensayos a escala piloto para la producción de cerveza artesanal.

En resumen, los resultados obtenidos pusieron de relevancia la contribución de las levaduras nativas seleccionadas, como generadoras de complejidad aromática y sensorial en las cervezas elaboradas.

La formación de compuestos aromáticos identificados en este trabajo, y la contribución sensorial puesta de manifiesto por algunos compuestos cuyas concentraciones fueron mayores al umbral de percepción, constituyen importantes caracteres de selectividad para cepas cerveceras nativas uruguayas.

INDICE

Agradecimientos:	iv
RESUMEN	vi
CAPÍTULO 1	1
INTRODUCCIÓN GENERAL, ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	1
1.1 Introducción general	2
1.1.1 Marco histórico de la cerveza y sus orígenes	2
1.1.2 Levaduras. Evolución de su utilización en la industria cervecera.....	3
1.2 Justificación del trabajo de tesis	6
1.3 Hipótesis	6
1.4 Objetivo general	7
1.5 Objetivos específicos	7
CAPÍTULO 2	8
CERVEZA: MATERIAS PRIMAS Y PROCESO GENERAL DE ELABORACIÓN	8
2.1 Cerveza	9
2.1.1 Agua.....	9
2.1.2 Cebada y otros cereales.....	11
2.1.2.1 Estructura del grano de cebada	12
2.1.2.2 Composición química.....	12
2.1.2.3 Almidón.....	13
2.1.2.4 Malta.....	16
2.1.2.5 Proceso de malteado.....	16
2.1.2.6 Aromas provenientes de la malta	18
2.1.2 Lúpulo.....	19
2.1.2.1 Composición química del lúpulo	20
2.1.2.2 Variedades de lúpulo	24

2.1.3 Adjuntos	25
2.1.4 Cerveza como alimento.....	26
2.1.5 Revolución “Craft Beer”	26
2.1.6 Diferencias entre cerveza artesanal y cerveza industrial	27
2.1.7 Proceso de elaboración de la cerveza	28
CAPÍTULO 3	30
LEVADURAS Saccharomyces y no Saccharomyces. IMPACTO EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA	30
3.1 LEVADURAS Y FERMENTACIÓN	31
3.1.1 Introducción y antecedentes	31
3.1.1.1 Generalidades de las levaduras	31
3.1.1.2 Estructura general de las levaduras	32
3.1.1.3 Estructura de la pared celular en las levaduras	33
3.1.1.4 Ciclo Biológico de las levaduras. Reproducción asexual y sexual	35
3.1.2 Levaduras cerveceras	37
3.1.2.1 Antecedentes de levaduras en cerveza	38
3.1.3 Domesticación	42
3.1.4 Metabolismos de la levadura.....	42
3.1.4.1 Factores a considerar	44
3.1.4.2 Sustratos para la Fermentación Alcohólica	45
3.1.4.3 Fermentación alcohólica.....	45
3.1.4.4 Respiración	46
3.1.5 Aromas provenientes de las levaduras.....	47
3.1.5.2 Unidades de aromas	48
3.1.5.3 Alcoholes Superiores.....	48
3.1.5.4 Esteres.....	50
3.1.5.5 Fenoles.....	52

3.1.5.6 Ácidos orgánicos	53
3.1.5.7 Monoterpenos	54
3.1.5.8 Compuestos Carbonilos	54
3.1.5.9 Compuestos sulfurados.....	55
3.1.6 Compuestos aromáticos deseables o no deseables	55
CAPÍTULO 4	57
MATERIALES Y MÉTODOS	57
4.1 Cepas no tradicionales.....	58
4.2 Medios de cultivo utilizados y símil mosto cervecero desarrollado.....	61
4.2.1 Medio WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient Agar).....	61
4.2.2 Medio Agar Lisina.....	61
4.2.3 Medio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) e YEPM (Yeast Extract Peptone Maltose)	62
4.2.4 Medio Chromo Agar.....	63
4.2.5 Medio AAM (Amilase Activity Medium)	63
4.2.6 Desarrollo de un símil mosto cervecero (SMC): Proceso de diseño del SMC	64
4.3 Mantenimiento de levaduras.....	65
4.4 Aislamiento de levaduras	65
4.5 Screening de maltosa	66
4.6 Detección de actividad de α amilasa	67
4.7 Recuento de células vivas y muertas	68
4.8 Microfermentaciones	69
4.8.1 Microfermentaciones Etapa I	69
4.8.2 Microfermentaciones Etapa II.....	69
4.9 Análisis sensorial.....	70
4.10 Determinaciones analíticas realizadas a los mostos y a las cervezas obtenidas	71
4.10.1 Densimetría	71
4.10.2 Determinación de pH.....	71

4.10.3 Determinación de grados Brix.....	71
4.10.4 Determinación de alcohol	71
4.10.5 Determinación de nitrógeno asimilable	71
4.10.6 Determinación de acidez total	71
4.10.7 Determinación de acidez volátil	72
4.10.8 Determinación de azúcares reductores	72
4.11 Determinaciones analíticas realizadas durante y después de las fermentaciones a escala laboratorio y a escala semi-piloto	72
4.11.1 Compuestos aromáticos volátiles	72
4.11.2 Extracción de compuestos aromáticos volátiles en las microfermentaciones.....	72
4.11.3 Identificación de los compuestos aromáticos.....	75
4.11.4 Análisis estadístico	75
4.12 Elaboración a escala semi-piloto.....	76
CAPÍTULO 5	78
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	78
5.1 Levaduras nativas. Aislamientos y colección.....	79
5.2 Capacidad fermentativa frente a la maltosa	81
5.3 Evaluación de actividad alfa amilasa	82
5.4 Análisis sensorial preliminar para descarte de cepas productoras de defectos aromáticos .82	82
5.5 Evaluación sensorial de las cepas con fermentación de maltosa positiva.	83
5.6 Microfermentaciones Etapa I	84
5.7 Microfermentaciones Etapa II.....	86
5.8 Efecto de las levaduras seleccionadas en la producción de compuestos aromáticos	91
5.8.1 Alcoholes	93
5.8.2 Ésteres etílicos	93
5.8.3 Ésteres de acetatos	93
5.8.4 Ácidos	93

5.8.5 Fenoles	94
5.8.6 Monoterpenos	94
5.9 Estudio estadístico de los grupos de compuestos	94
5.10 Estudio de los valores de unidades de aroma en las microfermentaciones	94
5.11 Análisis sensorial.....	97
5.12 Análisis estadístico	98
5.13 Fermentaciones con cultivos mixtos y análisis sensorial	99
5.14 Aplicación a escala semi-piloto de las levaduras no-Saccharomyces seleccionadas	103
5.15 Conclusiones finales	105
BIBLIOGRAFÍA.....	108

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL, ANTECEDENTES, JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción general

1.1.1 Marco histórico de la cerveza y sus orígenes

La producción de cerveza es una práctica que data de mucho tiempo. La elaboración de la misma no era exactamente como se conoce actualmente y a lo largo del tiempo ha ido sufriendo transformaciones. Este desarrollo nos permite contar con el producto como se conoce actualmente y en sus distintas versiones (estilos). La cerveza no es solamente una bebida fermentada, sino que en ella está implícita la historia del desarrollo, evolución y hábitos de consumo del hombre a lo largo de los siglos.

Existen antecedentes alrededor de todo el mundo de la elaboración de la cerveza. Los indicios más antiguos acerca de esta bebida han sido encontrados en China. En el periodo de tiempo que va desde aproximadamente los años 7000 AC-3000 AC se ha encontrado evidencia histórica de la elaboración de esta bebida por distintos pueblos. El pueblo ubicado en la región de la Mesopotamia, el imperio Egipcio, el imperio Griego y también el imperio Romano. Más avanzado en el tiempo y posterior al 300 DC la elaboración de esta bebida se fue extendiendo por las diferentes zonas que ocupan países que hoy forman parte de Europa (Alemania, Francia, Bélgica, Portugal, entre otros) (Poelmans y Swinnen, 2015).

Los orígenes de la cerveza y del vino están estrechamente relacionados. A lo largo de la historia los antecedentes indican que los pueblos han ido alternando su consumo por costumbres, por facilidad de acceso a la materia prima y por conocimiento de técnicas de elaboración. Louis Pasteur químico francés considerado el padre de la enología por sus importantísimos descubrimientos acerca de la fermentación en la elaboración del vino, tuvo también un rol fundamental a la hora del conocimiento de los fermentos que están implicados en la elaboración de la cerveza (Pasteur, 1876).

En las cervecerías de los monasterios fue donde se realizó el paso de la fabricación casera a la industria cervecera a lo largo del siglo XIV. En el año 1516 se firmó en Alemania la Ley de Pureza Bávara (el “Reinheitsgebot”) por los duques Guillermo IV y Luis X, que establecía que los únicos ingredientes que se debían utilizar para la fabricación de una cerveza genuina eran malta, lúpulo y agua. Esta ley de Pureza Alemana posteriormente fue modificada para incluir a la levadura (Sancho Saurina, 2015). Antes del uso del lúpulo era empleado el denominado “grut” o “gruit”. Se trataba de una mezcla a base de hierbas que aportaba características y atributos sensoriales únicos, realizado según la región, su mezcla era un secreto bien conservado. Esta fue utilizada a lo largo de Europa y en particular muy vinculada a los monasterios (Hornsey, 1999).

Los maestros cerveceros ingleses reconocen a principio del siglo XIX que esas reacciones que se producían durante la elaboración de cerveza, tenían que ver con unas células pequeñas microscópicas que permitían transformar los azúcares en alcohol. Pasteur en sus investigaciones y estudios demuestra que las responsables de esas transformaciones eran levaduras. En su libro “Études sur la Bière” publicado en 1876 Louis Pasteur, realizó estudios en relación a los procesos fermentativos implicados en la elaboración de la cerveza y mostró que estos procesos se debían a la actividad de microorganismos, análogamente como lo hizo para el vino (Pasteur, 1876). En su libro también realiza comparaciones acerca del vino y de la cerveza y resalta sus diferencias en cuanto a características y propiedades de estas bebidas y como esto influye en los procesos fermentativos. En este libro Pasteur presenta incluso estudios de los fermentos que alteran el mosto cervecero e incluso ya menciona los diferentes tipos de fermentación: la fermentación alta y la fermentación baja (Pasteur, 1876).

Unos años más tarde, Emil Christian Hansen desarrollo un método de cultivo de levadura pura en 1883, que fue mejorado 10 años más tarde por Paul Lindner ambos trabajadores del Laboratorio Carlsberg (Monerawela y Bond, 2017). Con este método se consiguió aislar levaduras puras. Entre los años 1840 -1890 se crearon numerosas industrias cerveceras tanto a nivel europeo como mundial. La mayoría de la producción de estas cervecerías fue la producción de cervezas de estilo “Lager” (su definición se tratará más adelante) (Hornsey, 1999; Sancho Saurina, 2015).

El desarrollo de estas industrias cerveceras hizo que surgieran organizaciones como la American Society of Brewing (ASBC) fundada en 1984 y la European Brewery Convention (EBC) fundada en 1946 con sede en Bélgica.

1.1.2 Levaduras. Evolución de su utilización en la industria cervecera

Tradicionalmente las levaduras utilizadas para las fermentaciones cerveceras tipo Lager son mayoritariamente *Saccharomyces pastorianus* (syn. *Saccharomyces carlbergensis*, un híbrido entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*) (Martini y Martini, 1987), representando este tipo de cerveza el 90 % del mercado (Varela, 2016; Da Costa Jardim et al., 2018).

El otro tipo de cerveza importante es la cerveza Ale. Las levaduras utilizadas para este tipo de cerveza son usualmente *Saccharomyces cerevisiae* (Martini y Martini, 1987), y representa un 5% del mercado de cerveza (Varela, 2016). El porcentaje restante lo ocupan cervezas producidas mediante fermentaciones espontáneas o fermentaciones mixtas con levaduras y bacterias.

Tanto para lager como ale, el género *Saccharomyces*, es el tradicional de la industria cervecera. Esto se basa fundamentalmente en la eficiente producción de etanol, el uso de la vía fermentativa como el paso metabólico fundamental, y la alta tolerancia al etanol y factores medioambientales adversos (Baker et al., 2015; Varela, 2016; Petruzzi et al., 2016; Aslankoochi et al., 2016).

Sin embargo, en los últimos años, algunas especies de levaduras no-*Saccharomyces* están siendo evaluadas en fermentaciones para cervezas. Esto es el resultado de un interés global en la búsqueda de diferentes cervezas con un toque innovador. Las levaduras salvajes, no domesticadas pueden ofrecer diferentes aromas y sabores que contribuyen al desarrollo de nuevas variaciones de cervezas y estilos (Michel et al., 2016; Basso et al., 2016; Holt et al., 2018; Burini et al., 2020).

Las levaduras no-*Saccharomyces*, poseen baja eficiencia metabólica primaria, lo que se traduce en una limitada capacidad fermentativa. Sin embargo, y como consecuencia de su metabolismo secundario, pueden impactar en la calidad sensorial de los productos de fermentación finales. Se ha demostrado, para vinos, que esta flora nativa, tiene un aporte importante en la composición aromática del producto final, que está relacionada con la liberación de compuestos aromáticos, producción de ésteres, alcoholes superiores y producción de compuestos aromáticos azufrados (Pérez Giffoni, 2008; Swangkeaw et al., 2014). Estos aportes en composición aromática, pueden enriquecer al producto de fermentación obtenido en concentración y complejidad aromática y gustativa. Algunos investigadores han demostrado que las levaduras no-*Saccharomyces*, a diferencia de las *Saccharomyces*, producen y excretan una gran variedad de enzimas extracelulares como esterasas, glucosidasas, lipasas, proteasas, celulasas, etc. Estas enzimas interactúan con los precursores aromáticos del mosto, volviéndolos “activos aromáticamente”, influyendo así sobre los aromas de las bebidas fermentadas. Por estas razones las aplicaciones de levaduras no convencionales pueden impactar en el fenotipo del sabor (“flavor phenotype”) de una manera impredecible (Holloway et al., 1992; Soden, 1994; Egli et al., 1998; Henick-Kling et al., 1998; Soden et al., 2000; Mateo et al., 2006; Medina et al., 2007; Carrau et al., 2008; Anfang, Brajkovich y Goddard, 2009; Viana et al., 2011; Holloway, Subden y Lachance, 2013; Medina et al., 2013).

Algunas cepas no-*Saccharomyces* han sido reportadas para la fermentación del mosto cervecero, en cultivos puros, las mismas son: *Torulaspora delbrueckii*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida shehatae*, *Candida tropicalis*, *Saccharomyces ludwigii*, *Zygosaccharomyces rouxii*, y *Pichia kluyveri* (Michel et al., 2016).

En los últimos años, se ha comenzado a investigar también el efecto de cultivos mixtos entre cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, adicionadas al mismo tiempo o secuencialmente en el mosto

cerveceros. Se han reportado estudios de cultivos mixtos con levaduras no convencionales: *Pichia kluyveri* y *Brettanomyces* (Holt et al., 2018), *Pichia kluyveri* y *Saccharomyces cerevisiae* (Saerens y Swiegers 2014a, 2014b; Holt et al., 2018), *Zygorhynchus florentina* y *Saccharomyces cerevisiae* (Holt et al., 2018), *Lachancea thermotolerans* y *Saccharomyces cerevisiae* (Holt et al., 2018), *Torulopsis delbrueckii* y *Saccharomyces cerevisiae* (Canónico et al., 2016; Michel et al., 2016b), *Kazachstania servazzi* y *Saccharomyces cerevisiae* (Gibson et al., 2015) y *Naumovia dairenensis* y *Saccharomyces cerevisiae* (Gibson et al., 2015); la producción de aromas como ésteres y fenoles en estos cultivos mixtos sugiere que fortalecen el sabor en las cervezas.

Sin embargo, aún no se ha evaluado globalmente el fenómeno de la competencia entre *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces* a escala industrial, y de hecho existen muy pocas cepas no-*Saccharomyces* disponibles a nivel comercial para cervezas (Roudil et al., 2020; Burini et al., 2020).

Por otro lado, el denominado fenotipo del sabor (“flavor phenotype”), concepto buscado a la hora de seleccionar levaduras se basa en la capacidad de cada cepa de producir compuestos aromáticos secundarios durante la fermentación alcohólica (Carrau et al., 2015b). En cervezas se sabe que hay más de 800 compuestos químicos volátiles pero solamente una porción de ellos son activos en lo que al sabor se refiere (Olaniran et al., 2017). Siendo cientos de ellos responsables por el aroma final y sabor en la cerveza, muchos de ellos son producidos por las levaduras durante la fermentación alcohólica (Pires et al., 2014). Por ejemplo, en el caso de los ésteres se han detectado más de 100 ésteres diferentes los que pueden dividirse en dos grupos principales: ésteres de acetato, tales como acetato de etilo, acetato de isoamilo y acetato de 2-feniletilo, y ésteres de etilo, como hexanoato de etilo y octanoato de etilo (Loviso y Libkind, 2018).

Por otro lado, los alcoholes superiores producidos durante la fermentación alcohólica, también se generan en altas concentraciones respecto a otros compuestos volátiles, siendo su presencia de gran impacto para el aroma y el sabor de las cervezas. En cervezas se pueden encontrar aproximadamente 40 alcoholes superiores (Loviso y Libkind, 2019).

Brettanomyces, ha sido una de las más comunes cepas alternativas, que fermenta espontáneamente en cervezas de los estilos Gueuze y Lambic (Varela, 2016), contribuyendo con el perfil del sabor de estos estilos de cervezas, en donde los altos niveles de 4-Etilfenol (4 EP) y 4-Vinil guaiacol (4 EG) son considerados deseables y típicos compuestos aromáticos (Holt et al., 2018), de los estilos de cerveza antes mencionados.

Otro ejemplo es la cerveza “American Coolship Ale” (ACA), que es una cerveza elaborada mediante fermentación espontánea, utilizando un método de elaboración similar al del estilo Belgian Lambic. Este tipo de fermentación puede estar dividida en varios pasos de elaboración en los que participan diferentes microorganismos *Enterobacteriaceae*, *Saccharomyces* y *Lactobacillales* (Bokulich et al., 2012).

1.2 Justificación del trabajo de tesis

Este trabajo de tesis se enmarca en un área de investigación relevante, en relación al inminente crecimiento del sector cervecero tanto a nivel nacional como internacional. El mercado de cervezas artesanales ha sufrido un boom en los últimos años en el mercado uruguayo. Esto se correlaciona con una tendencia mundial que en caso de países como Estados Unidos data de muchos años, pero que sin embargo su historia es bastante más reciente en Latinoamérica siendo Uruguay uno de los países más rezagados del continente.

El factor clave a la hora de la elaboración de las cervezas son las levaduras, no en vano son llamadas los “socios más importantes del cervecero”.

El enfoque metodológico utilizado, se basó principalmente en la búsqueda, aislamiento y selección de levaduras nativas provenientes de la industria cervecera uruguaya y el aprovechamiento de la biodiversidad de levaduras no-*Saccharomyces*, presentes en la industria vitivinícola. Estas nuevas cepas de levaduras, se piensa impactarán positivamente en la obtención de cervezas diferenciadas y elaboradas a partir de levaduras provenientes de nuestro entorno local. La selección de levaduras nativas provenientes de diversas materias primas permitirá brindarle al sector cervecero local otra herramienta para poder diversificarse en la creación de nuevos productos.

1.3 Hipótesis

La hipótesis del presente trabajo de tesis se basa en la selección de al menos una levadura nativa, preferentemente no-*Saccharomyces*, para la elaboración de cervezas artesanales. La o las levaduras seleccionadas permitirán lograr una fermentación adecuada con un perfil aromático diferencial para la elaboración de cervezas con identidad uruguaya.

1.4 Objetivo general

Estudiar el impacto de la utilización de levaduras nativas en la elaboración de cervezas artesanales y profundizar en las modificaciones producidas sobre el sabor, aroma y complejidad sensorial de las cervezas obtenidas.

1.5 Objetivos específicos

1. Estudiar la viabilidad y la capacidad fermentativa de levaduras no-*Saccharomyces* principalmente para fermentar los azúcares presentes en el mosto cervecero, en particular la maltosa.
2. Caracterizar fisicoquímicamente y aromáticamente las microfermentaciones obtenidas a escala de laboratorio.
3. Seleccionar por lo menos una cepa de levadura nativa *Saccharomyces* y una cepa no-*Saccharomyces* para realizar una fermentación a escala piloto.
4. Evaluar fisicoquímicamente y sensorialmente las cervezas obtenidas en el punto anterior.
5. Evaluar el potencial de las levaduras nativas seleccionadas para poder ser utilizadas comercialmente.

CAPÍTULO 2

CERVEZA: MATERIAS PRIMAS Y PROCESO GENERAL DE ELABORACIÓN

2.1 Cerveza

La cerveza es una bebida alcohólica, no destilada, elaborada a partir de cuatro materias primas esenciales: agua, malta, lúpulo y levadura (Barth, 2013). Para la transformación del mosto cervecero en cerveza, los azúcares contenidos en el cereal malteado deben ser fermentados por la levadura produciendo etanol y dióxido de carbono como productos mayoritarios del metabolismo primario (Kunze, 2006a).

Cada una de las materias primas básicas que componen la cerveza tiene sus características propias y cumplen una función fundamental en el aporte a la composición fisicoquímica, aromática y sensorial del producto final. A continuación, se describe a cada una de ellas, con excepción de la levadura que será tratada específicamente en el Capítulo 3.

2.1.1 Agua

El agua es cuantitativamente la materia prima mayoritaria en la producción de cerveza. Es de crucial importancia para el cervecero conocer las características fisicoquímicas del agua, ya que de su composición depende el estilo de cerveza a elaborar.

Para la fabricación de cerveza es condición necesaria que el agua sea potable. En Uruguay se aplica el Decreto 315/994 del Reglamento Bromatológico Nacional (Capítulo 25, Aguas y bebidas sin alcohol), considerando la Norma UNIT 833:2008 “Agua potable. Requisitos”; y el Decreto 375/011 para la regulación y control del agua potable. El agua potable debe satisfacer los requerimientos microbiológicos, fisicoquímicos y organolépticos exigidos.

Los parámetros principales a considerar son el contenido de calcio (Ca^{+2}), magnesio (Mg^{+2}) y la alcalinidad dada fundamentalmente por el bicarbonato de calcio (HCO_3^{-1}), que influyen en el pH. Por otro lado, los iones de sodio (Na^{+1}), cloro (Cl^{-1}) y sulfato (SO_4^{-2}) influyen más directamente en el sabor y menos sobre el pH del mosto cervecero. Generalmente para un proceso de elaboración óptimo, en cuanto a molienda de la malta (mashing), fermentación, y clarificación posterior, el agua debe contener entre 50 a 200 ppm de calcio.

En cuanto al parámetro óptimo de alcalinidad del agua, este variará en relación a la acidez de la malta y el estilo que se quiera elaborar (Palmer y Kaminski, 2013; Hornsey, 1999). Los efectos de algunos de los diferentes iones mencionados se ven representados esquemáticamente en la Tabla 2.1.

Tabla 2.1- Iones presentes en la cerveza y sus efectos (Barth, 2013). (FA, fermentación alcohólica).

IONES	FÓRMULA	EFEECTO
Bicarbonato	HCO_3^-	Aumento de pH
Calcio	Ca^{2+}	Disminución de pH
Cloro	Cl^-	Dulzor, efecto contrario al sulfato
Hierro(II)	Fe^{2+}	Metálico, astringente
Hidronio	H_3O^+	Disminución pH, potencia al amargor
Magnesio	Mg^{2+}	Cofactor de varias enzimas de la FA
Sodio	Na^{2+}	Dulce, ácido en alta concentración
Sulfato	SO_4^{2-}	Sequedad, astringencia, potencia amargor

Existen varios puntos geográficos en el mundo reconocidos por el perfil químico de su agua y por el o los estilos de cerveza que allí se elaboran. Es así que el alto contenido de sulfato de calcio del agua de la localidad de Burton on Trent en Inglaterra, resulta ideal para elaborar cervezas del estilo pale ale fuertes y muy aromáticas. En contraste con esto, las aguas blandas de Pilsen en Checoslovaquia resultan adecuadas para la producción de cervezas del estilo lager (Suárez, 2013; Palmer y Kaminski, 2013).

Por otro lado, el agua rica en bicarbonato de calcio resulta muy buena para la producción de cervezas más oscuras, como ocurre en las zonas de Múnich, Londres y Dublín cuyos estilos de cerveza han alcanzado gran renombre a lo largo de la historia (Hough, 1990). En la Tabla 2.2 se detallan las concentraciones características de iones de estos perfiles de agua reconocidos mundialmente.

Tabla 2.2- Composición iónica del agua en lugares reconocidos mundialmente expresados en mg/L (Hough, 1990).

Lugar	Na^{2+}	Mg^{2+}	Ca^{2+}	Cl^-	SO_4^{2-}	HCO_3^-
Burton-on-Trent	54	24	352	16	820	320
Pilsen	32	8	7	5	6	37
Múnich	10	19	80	1	6	333
London	24	4	90	18	58	123
Dublín	12	4	119	19	54	319

En aquellas zonas geográficas en las cuales el agua no reúne las condiciones requeridas para la elaboración de un determinado estilo cervecero, se puede recurrir a la realización de correcciones mediante el agregado de diferentes sales de acuerdo con la concentración del ion que se quiera ajustar. Alguno de los ejemplos más comunes son el cloruro de calcio dihidratado, carbonato de calcio, sulfato de calcio dihidratado, etc. Así mismo, para la remoción de distintos iones del agua, se pueden utilizar operaciones tecnológicas de ebullición, osmosis inversa o destilación (Barth, 2013).

Por otro lado, el agua influye aromáticamente en la cerveza. En general su influencia está asociada a los off-flavor (aromas no deseados) de la cerveza, como es el caso del cloro que está asociado a la presencia de residuos de desinfectantes, pero sin embargo otros iones ayudan a resaltar las características de la malta y del lúpulo (ion sulfato) potenciando las características de sequedad en boca (Palmer y Kaminski, 2013).

2.1.2 Cebada y otros cereales

La cebada (*Hordeum vulgare*) constituye el grano de cereal más utilizado en la industria cervecera. Luego le siguen el trigo (*Triticum aestivum*), sorgo (*Sorghum vulgare*), arroz (*Secale cereale*) y avena (*Avena sativa*).

La cebada según su variedad puede ser sembrada en primavera, como ocurre en Uruguay, o en otoño. Según la disposición de los granos en la espiga puede tratarse de cebada de dos hileras (cebada cervecera) o cebada de seis hileras (cebada forrajera) (Figura 2.1) (Briggs et al., 2004).



Figura 2.1-Detalle de las espigas de cebada. A) *Hordeum vulgare*, B) *Hordeum distichon*: espiga de una cebada de dos hileras, cebada cervecera, C) *Hordeum hexastichon* espiga de una cebada de seis hileras, cebada forrajera (Moreno, 2011).

La forma del grano y la cantidad de cáscara tienen gran influencia en el rendimiento de la malta obtenida. A mayor cantidad de cáscara, mayor inestabilidad de la cerveza y mayor solubilización de sustancias no deseadas sensorialmente como es el caso de los taninos (Arias, 1991).

2.1.2.1 Estructura del grano de cebada

En el grano de cebada se puede diferenciar la estructura externa y la interna. Está recubierto en su lado dorsal por la lemma y en el lado ventral por la pálea; la unión de ambas partes conforma la cáscara. En lo que es la base del grano, al comienzo del surco ventral se encuentra la raquilla. La parte interna del grano está formada por la región germinal, el endospermo y la cubierta (Briggs et al., 2004).

El endospermo es el sitio donde se encuentra alojada una gran cantidad de nutrientes (Figura 2.2). Este es separado del embrión por medio del escutelo. Un gran porcentaje de la constitución del endospermo es de granos de almidón grandes y pequeños. Estos granos de almidón están recubiertos de proteína, y ácidos grasos. Las paredes celulares son muy finas y contienen glucanos (hemicelulosa y gomas). La aleurona es una capa muy fina, rica en proteína y no contiene granos de almidón. Esta capa no alcanza el escutelo. La cubierta y la cascarilla son lo que recubren al grano de cebada ejerciendo una función protectora. Permiten la distribución del agua de manera eficiente para que llegue al embrión (Hough, 1990).

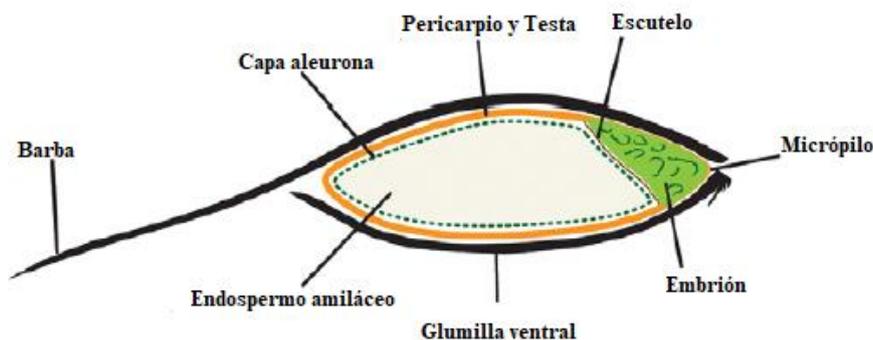


Figura 2.2 –Estructura del grano de cebada (corte longitudinal) (Barth, 2013).

2.1.2.2 Composición química

La cebada contiene los siguientes componentes: hidratos de carbono totales (70,0 - 85,0 %), proteínas (10,5 - 11,5 %), sustancias minerales (2,0 - 4,0 %), grasas (1,5 - 2,0 %) y otras sustancias (1,0 - 2,0 %) (Kunze, 2006b).

En la Tabla 2.3 se detalla la composición química de cada una de las estructuras que conforman el grano de cebada (Hornsey, 1999).

Tabla 2.3 –Composición química del grano de cebada (Hornsey, 1999; Eblinger, 2009).

Tejido	Composición
Cáscaras	Celulosa, pentosanos, polifenoles y ácidos fenólicos, sílice.
Embrión	Lípidos, carbohidratos, proteínas, ácido giberélico, minerales vitamina B.
Capa de aleurona	Lípidos, carbohidratos, proteínas, enzimas degradantes del endospermo, minerales, vitaminas B, pentosanos β -glucanos
Endospermo	Almidón, proteínas, β -glucanos, pentosanos

2.1.2.3 Almidón

El almidón es la sustancia de reserva de energía por excelencia de las plantas, y en el caso de la cebada, constituye el compuesto mayoritario (60 % aproximadamente). Está presente en forma de partículas llamadas gránulos, cuyo tamaño va de 0,5 a 100 μm . Esta variación en el tamaño y en la distribución depende de cada especie y afectan directamente las propiedades funcionales de los gránulos de almidón. La cebada tiene dos tipos de gránulos de almidón, los grandes lenticulares y los esféricos pequeños (Prieto Méndez et al., 2009).

El almidón está conformado por dos polisacáridos muy similares, la amilosa y la amilopectina (Figura 2.3). Estas dos estructuras están formadas por unidades de glucosa pero varían los enlaces que las conforman. La amilosa es principalmente lineal donde las unidades de glucosa están unidas por enlaces α -1,4. La amilopectina es altamente ramificada y muy densa debido a sus enlaces α -1,6.

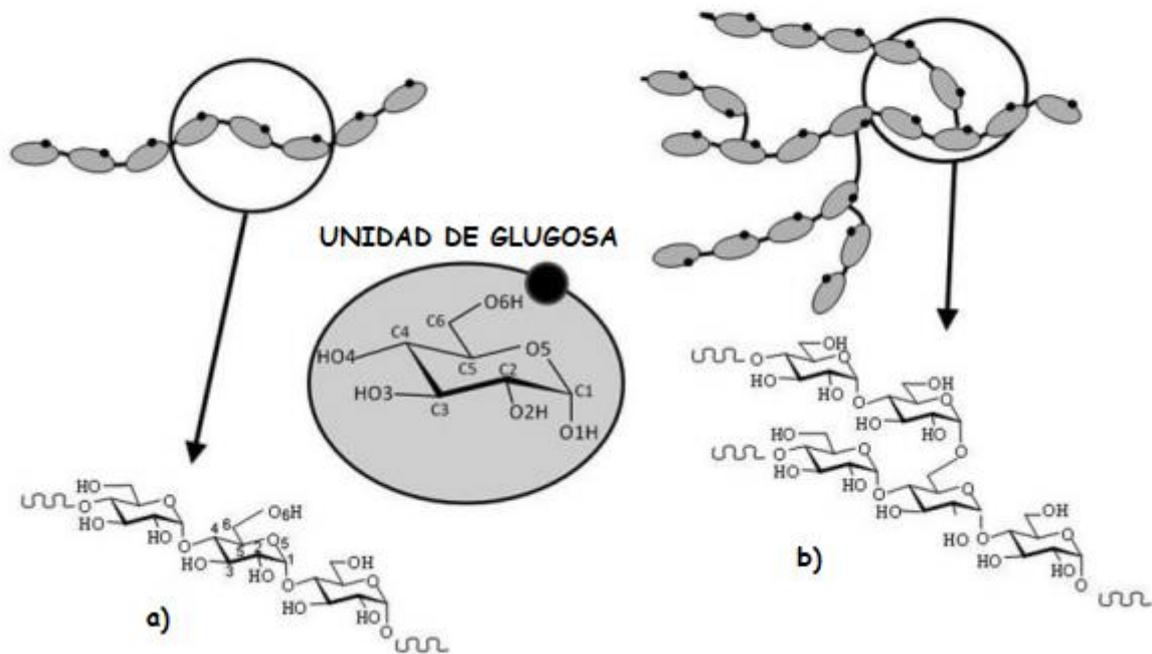


Figura 2.3-(a)amilosa, (b)amilopectina (Cornuéjols y Pérez, 2010; Perez y Bertoft, 2010).

El grano de cebada sin maltear tiene grandes cantidades de β -amilasa en forma soluble e insoluble y durante el malteado la misma se solubiliza totalmente. La α -amilasa se produce durante el proceso de malteado en respuesta a la formación del ácido giberélico. Este ácido es una hormona vegetal que se produce durante la germinación y es transportado a la aleurona donde estimula la producción de enzimas. No solo provoca la activación de la α -amilasa sino que también de las endo β -glucanasas, proteasas y dextrinas límite (Arias, 1991). De las numerosas enzimas y complejos enzimáticos que están contenidos en la cebada y que son denominador común en muchos cereales y plantas, se encuentran enzimas degradadoras de almidón (α -amilasa, β -amilasa, dextrina límite), enzimas citolíticas, enzimas degradadoras de grasas y enzimas disociadoras de éster fosfórico (Bernal y Martínez Barajas, 2006).

Las enzimas más importantes en el malteado y en la elaboración de la cerveza son la α y β -amilasas (Figuras 2.4). La α -amilasa es una endoenzima en tanto que la β -amilasa es una exoenzima. La α -amilasa es una enzima que corta al azar, hidrolizando cualquier enlace α 1,4 excepto aquellos que son próximos a un punto de ramificación y los situados en las proximidades del extremo de la molécula. Por su lado, la β -amilasa ataca a las moléculas de almidón en sus extremos no reductores (Hough, 1990).

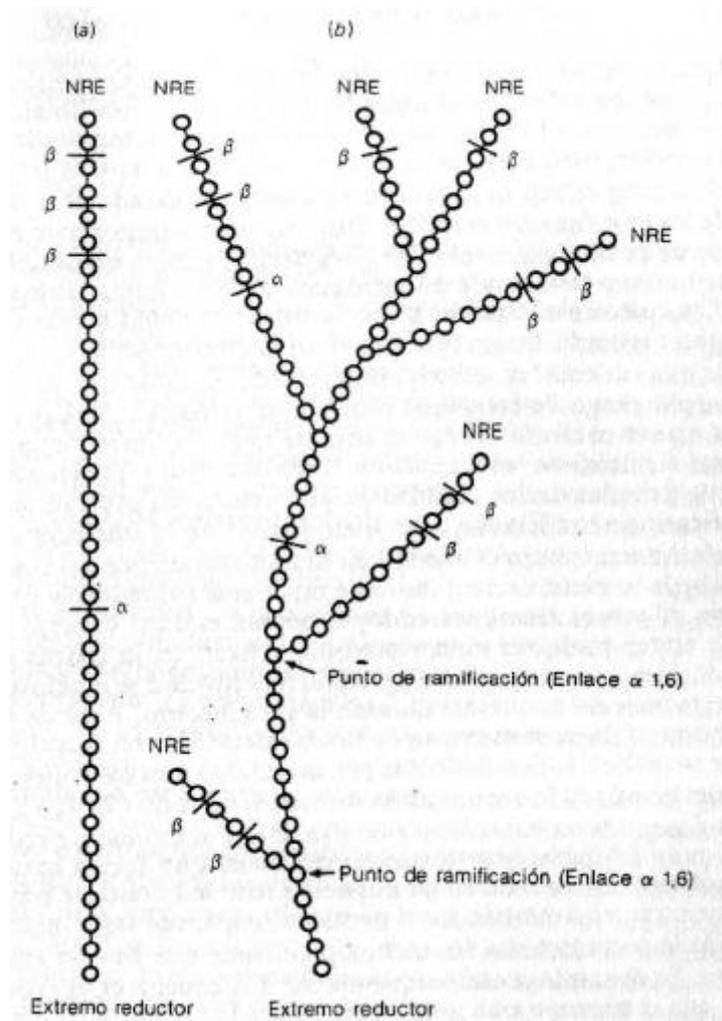


Figura 2.4-(a) Cadena lineal de amilosa, (b) amilopectina ramificada. Cada círculo representa una unidad de glucosa y se muestran los posibles puntos de corte de las enzimas α y β -amilasas (Hough, 1990).

2.1.2.4 Malta

Se denomina malta al producto resultante del proceso de malteado de la cebada (Figura 2.5). La cebada malteada proporciona los sustratos y enzimas necesarios para la obtención del mosto cervicero.

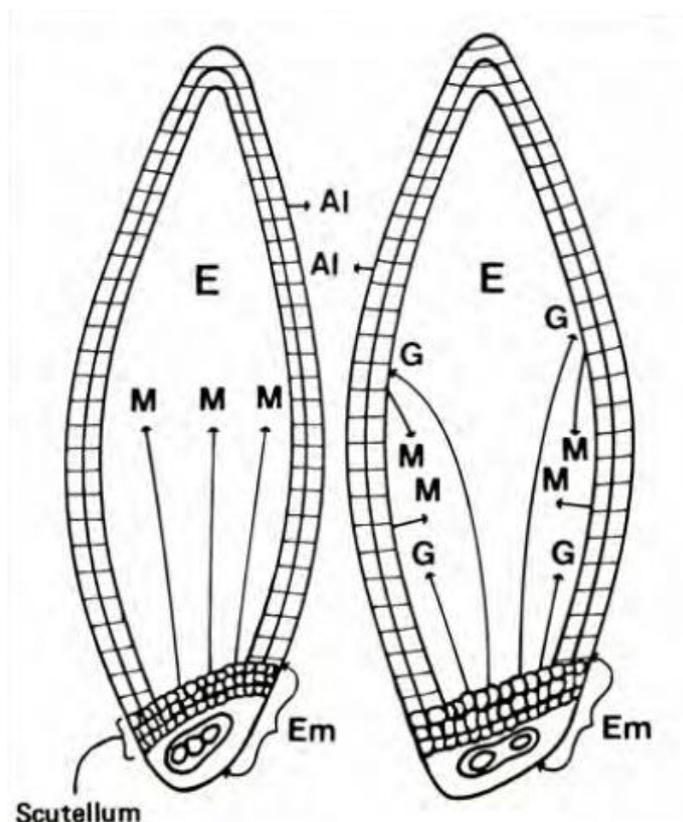


Figura 2.5-Modificación del grano de cebada durante el malteado.

Al-capas aleurona, E-endospermo, Em-embrión, G-ácido giberélico, M-modificación (Arias, 1991).

El objetivo del malteado es liberar compuestos fermentables, fácilmente utilizables por las levaduras para llevar a cabo el proceso de la fermentación alcohólica (Mallett, 2014).

2.1.2.5 Proceso de malteado

El proceso de malteado consiste básicamente en hacer germinar la cebada por absorción de agua, siendo luego interrumpido dicho proceso por el secado y tostado de los granos (Figura 2.6).

En la actualidad el malteado se realiza en grandes malterías donde la cebada llega limpia y clasificada.

La primera etapa del malteado es el remojo, donde el grano absorbe el agua necesaria para su germinación. Es una práctica común remojar los granos de cebada con agua con períodos de exposición al aire. Durante el remojo, el contenido de agua del grano aumenta a 42-45% y se da el inicio de la germinación. La exposición del embrión a la humedad estimula la formación de la

hormona vegetal ácido giberélico. Este es transportado a la aleurona, donde estimula la activación de las enzimas que degradan el endospermo.

Se procura que cada grano este separado para garantizar una germinación uniforme, manteniendo una humedad elevada y una temperatura controlada entre 13 y 16 °C, debido al proceso exotérmico de la germinación.

A medida que avanza la germinación, las endoglucanasas, pentosanasas, endoproteasas y amilasas se liberan de la capa de aleurona y degradan lentamente la estructura celular del endospermo, liberando así los gránulos de almidón (Nelson et al., 2013). En la germinación, el 75% del β -glucano y el 40% de la proteína dentro del endospermo se solubilizan. Sorprendentemente, solo el 10% del almidón se degrada, quedando la mayor parte sin degradarse para su extracción durante la elaboración del mosto.

La germinación se detiene secando la denominada “malta verde” (Boulton y Quain, 2007), mediante pasaje por hornos donde es sometida a aire caliente. Al ingresar al horno el contenido de la humedad es de aproximadamente 45%.

Las fases de secado y tostado pueden durar entre 16 y 60 horas dependiendo de la malta que se quiera obtener. Las temperaturas que se utilizan deben controlarse cuidadosamente para evitar la destrucción de las enzimas. En este sentido, las enzimas son más vulnerables cuando el grano está mojado por lo que las temperaturas al inicio del secado no deben superar los 70°C.

En esta etapa se produce la llamada “obtención de color” del grano como consecuencia de la reacción entre aminoácidos y azúcares (reacción de Maillard) generándose los productos de Maillard (Hübner y Arendt, 2013). Para esta etapa se utilizan rampas de temperatura en función del protocolo de cada maltería y del tipo de malta que se quiera lograr.

Cuando se alcanza una humedad de entre 5 a 8%, se reduce el flujo de aire y se eleva la temperatura a 100°C. En esta etapa se liberan los aromas de la malta verde y se producen los verdaderos “flavors” del malteado (Hornsey, 1999).

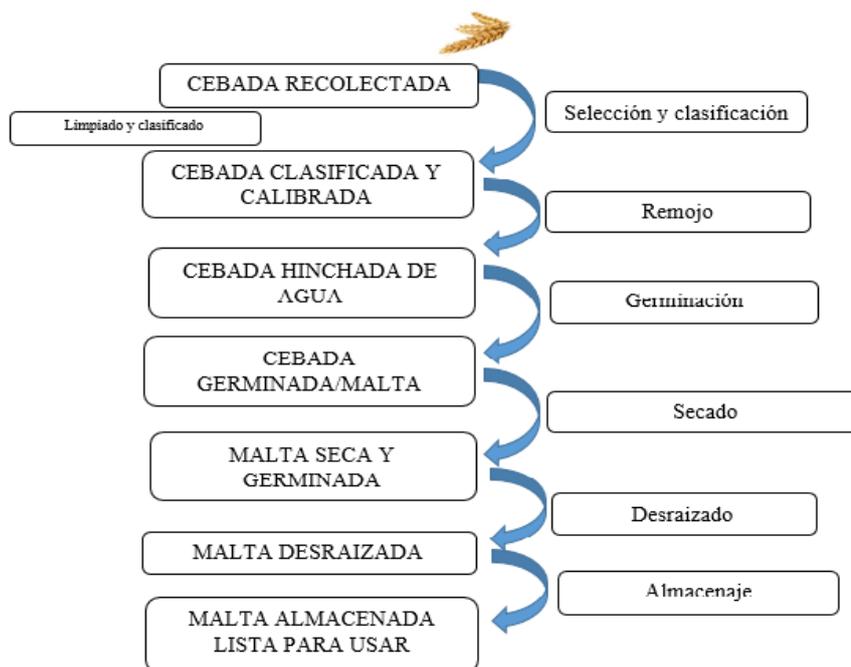


Figura 2.6-Proceso de malteado de la cebada.

2.1.2.6 Aromas provenientes de la malta

Como se observa en la Tabla 2.4, existe una amplia variedad de maltas con diferentes colores y aromas.

Tabla 2.4-Diferentes tipos de malta con sus descriptores aromáticos correspondientes (Bamforth, 2006).

Material partida	Tipo de malta	Descriptor aromático
Malta verde	Blanco	cereal verde (no cocido), sulfuro
	Lager	cereal, sulfuro
	Pale ale	galletita, tostada
	Mild	caramelo, nuez
	Vienna	nuez, toffee
	Munich	nuez, galletita
	Caramalt	caramelo, dulce
	Cristal	dulce frutal, toffee, fruta quemada, caramelo, melaza, galletita
	Brown	galletita, tostada
Peated	fenólico	
Malta blanca	Amber	galletita, pan, nuez, seco
	Chocolate	chocolate amargo, humo, quemado, café, amargo, caramelo
	Oscura	humo, amargo, café, penetrante

La evaluación de la malta como materia prima no solo se realiza de manera fisicoquímica sino que es importante la evaluación sensorial de la misma, mediante degustación para evaluar el impacto de sus sabores (Coghe et al., 2004) y la detección sensorial de defectos que afectan al producto (Bamforth, 2006).

2.1.2 Lúpulo

El lúpulo proviene de una planta trepadora, perenne, dioica, representada por más de 90 variedades, perteneciente a la familia Cannabináceas, género *Humulus* (*H.*), cuyos componentes principales alojados en la flor son los α -ácidos y aceites esenciales, responsables del amargor, aromas y sabores de la cerveza.

El género *Humulus* está compuesto por tres especies, *H. japonicus*, *H. yunnanensis* y *H. lupulus*.

La especie *Humulus lupulus* es una de las dos especies que tiene finalidad comercial y es la que posee valor cervecero (Almaguer et al., 2014; Durello et al., 2019).

A pesar de su parentesco con el cannabis el lúpulo comercial no contiene sustancias psicoactivas. Se utiliza únicamente la inflorescencia de las plantas femeninas (Figura 2.7 y 2.8). Esta planta tiene una fuerte dominancia apical, por lo que hasta que no cesa el crecimiento vertical prácticamente no aparecen las ramas laterales en las cuales se producen las flores (Magadán et al., 2011; Almaguer et al., 2014; Durello et al., 2019).

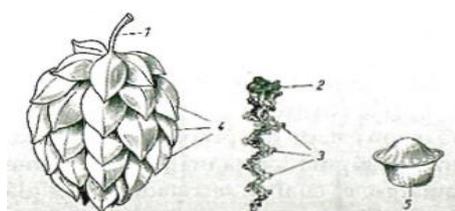


Figura 2.7- Cono del lúpulo-(1) pedúnculo, (2) raquis, (3) florecillas, (4) bráctea, (5) lupulina (Kunze, 2006a).



Figura 2.8- Flor del lúpulo donde se observan las glándulas lupulinas ricas en α -ácidos y aceites esenciales (Durello et al., 2019).

Su cultivo se desarrolla en climas fríos, en las latitudes 35° y 55° del hemisferio norte y hemisferio sur (Figura 2.9). Los países con mayores cultivos son Alemania y Estados Unidos, (representan el 60 % de la producción mundial) (Almaguer et al., 2014; Durello et al., 2019). En América del Sur existen cultivos de lúpulo en el sur de Argentina, y más concretamente en la zona de la Patagonia.

Además de ser muy resistente al frío, requiere alrededor de 15 horas de luz al día, 120 horas sin heladas en la época de crecimiento y entre 6 a 8 semanas de tiempo inactivo con temperaturas por debajo de los 4°C (Hough, 1990; Kunze, 2006a; Hieronymus, 2012; Magadán et al., 2011). Debido a todos estos requerimientos, constituye la materia prima más costosa de la cerveza.

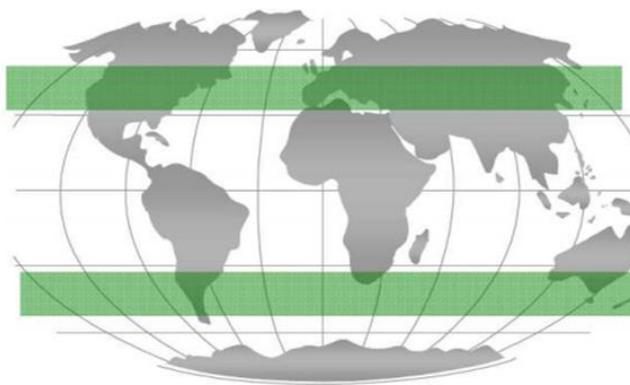


Figura 2.9- Zonas de cultivo del lúpulo (Cameroni, 2013).

2.1.2.1 Composición química del lúpulo

En la Tabla 2.5 se presenta la composición química del lúpulo.

Tabla 2.5-Promedio de la composición química del cono del lúpulo (Almaguer et al., 2014; Verzele, 1986) .

Compuestos	%
Resinas totales	15-30
Aceites esenciales	0,5-3
Proteínas	15
Monosacáridos	2
Polifenoles (taninos)	4
Ceras y esteroides	Trazas-25
Pectinas	2
Aminoácidos	0,1
Cenizas	8
Humedad	10
Sales(cenizas)	10

Los conos del lúpulo contienen una fracción denominada resinas blandas que están formadas por los α -ácidos o humulonas (Figura 2.10 y Tabla 2.6) y los β -ácidos o lupulonas (Figura 2.12) (Kobus-Cisowska et al., 2019). La proporción de α -ácidos y β -ácidos depende estrechamente de la variedad del lúpulo y las condiciones de crecimiento (Van Cleemput et al., 2008).

Durante la etapa denominada cocción del mosto (se verá más adelante en este capítulo), se adiciona el lúpulo, liberando los iso α -ácidos (Figura 2.11) o isohumulonas, que son extremadamente amargos y por ende los principales contribuyentes al amargor, colaboran con la estabilidad de la espuma y debido a su poder antiséptico son inhibidores del crecimiento de bacterias gram positivas (Steenackers et al., 2015). En la Figura 2.13 se representa la reacción de isomerización del α -ácido humulona a isohumulona.

Los β -ácidos son sensibles a la oxidación y en caso que esto ocurra en la cerveza son extremadamente amargos (Van Cleemput et al., 2008).

Tabla 2.6-Detalle de los grupos R de α -ácidos y iso α -ácidos (Hough, 1990).

Rx	Denominación Rx	α ácido	iso α ácido
CO.CH ₂ .CH(CH ₃) ₂	isovaleril	humulona	isohumulona
CO.CH(CH ₃) ₂	Isobutiril	cohumulona	isocohumulona
CO.CH(CH ₃).CH ₂ .CH ₃	2-metil-butiril	adhumulona	isoadhumulona
CO.CH ₂ .CH ₃	propionil	posthumulona	isoposthumulona
CO.CH ₂ .CH ₂ .CH.(CH ₃) ₂	4-metil-pentanoil	prehumulona	isoprehumulona

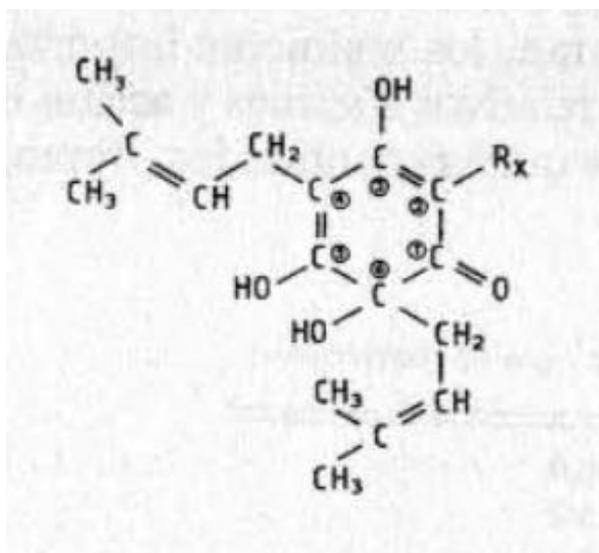


Figura 2.10-Estructura química de α -ácidos (Hough, 1990).

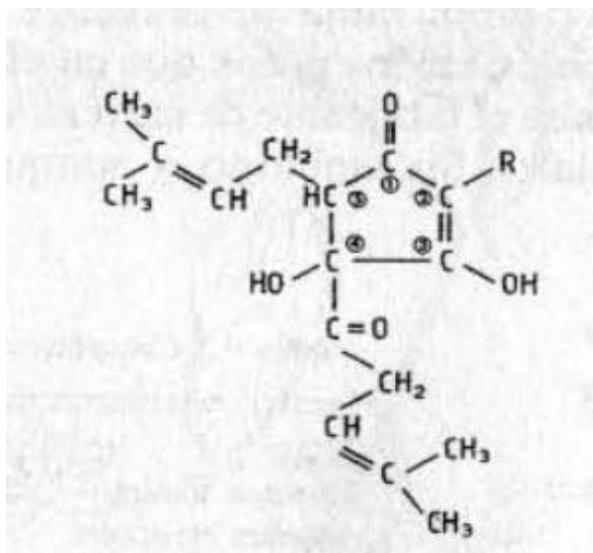


Figura 2.11-Estructura química de iso α -ácidos (Hough, 1990).

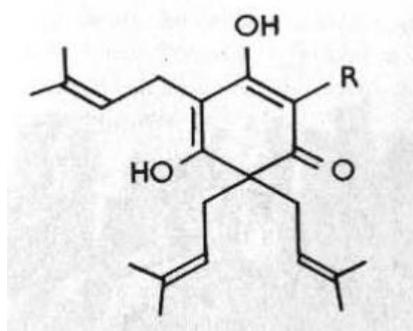


Figura 2.12-Estructura química de β -ácidos (Hough, 1990).

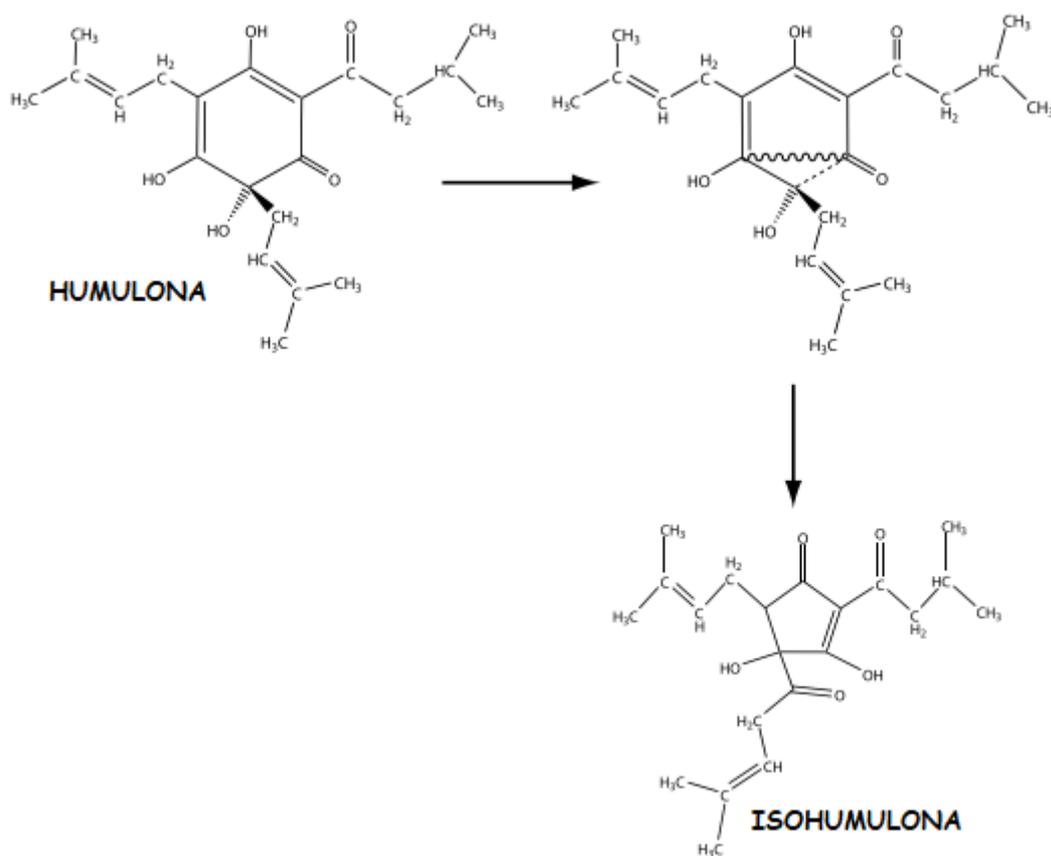


Figura 2.13-Isomerización α -ácido (humulona) a iso α -ácidos (isohumulona) (Barth, 2013).

En la Figura 2.14 se observa la organización de las resinas presentes en el lúpulo, ordenadas según la solubilidad de las mismas.

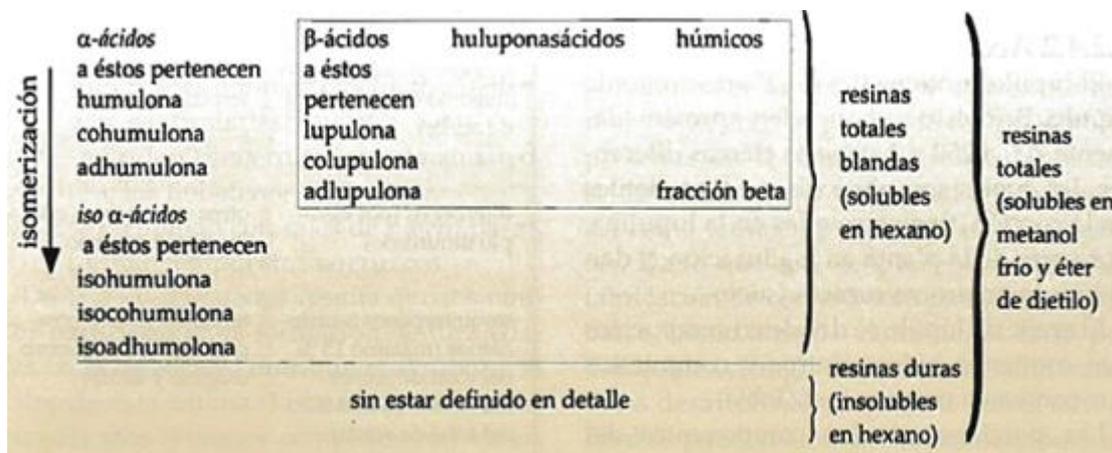


Figura 2.14-División según solubilidad de las diferentes resinas del lúpulo (Kunze, 2006a).

El lúpulo contiene entre 0,5 a 3 % de aceites esenciales. Estos aceites esenciales por lo general son hidrocarburos terpénicos, siendo los más importantes el mirceno, humuleno y cariofileno (Verzele, 1986).

La mayoría de los aceites esenciales del lúpulo (Figura 2.15) contienen hidrocarburos que se pueden clasificar en hidrocarburos alifáticos, monoterpenos y sesquiterpenos. El mirceno es el más importante dentro de los monoterpenos. En relación a los sesquiterpenos los que tienen las concentraciones más altas son cariofileno, humuleno y farneseno (Kobus-Cisowska et al., 2019).

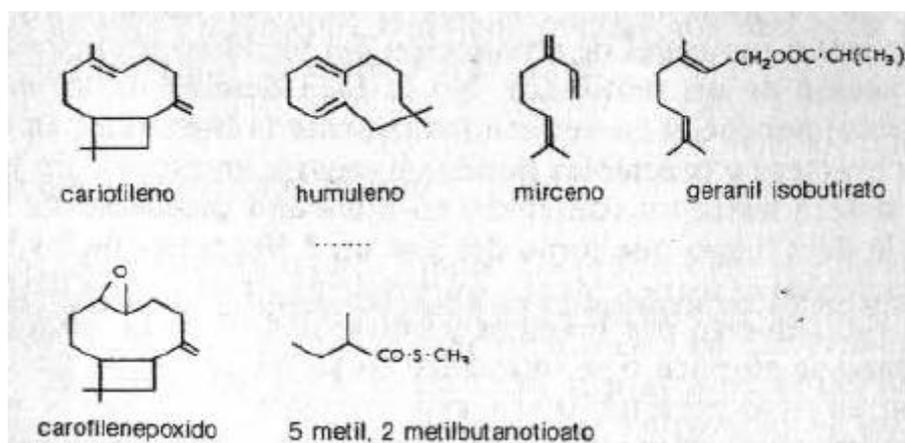


Figura 2.15-Estructura de los aceites esenciales típicos del lúpulo (Hough, 1990).

2.1.2.2 Variedades de lúpulo

Las variedades de lúpulos a nivel mundial son muy amplias. Existen variedades más aromáticas, otras donde prevalece el amargor y otras que reúnen ambos atributos. En la Figura 2.16 se muestra un listado de distintas variedades de lúpulo, su origen, los % de α -ácidos, β -ácidos y aceites esenciales.

		α -ácido	β -ácido	Aceite esencial
(a) Lúpulos aromáticos				
Goldings	Inglaterra	5,5	2,5	0,7
Fuggle	Inglaterra	4,5	3,7	0,6
Progress	Inglaterra	6,0	2,3	0,6
Whitbread Golding Variety	Inglaterra	6,0	2,7	1,0
Hersbrucker	Alemania	4,2	7,0	0,8
Tettnang	Alemania	4,0	6,0	0,8
Spalt	Alemania	4,0	7,0	0,8
Hallenau	Alemania	4,5	6,0	0,8
Willamette	USA	6,0	4,0	1,0-1,5
Cascade	USA	6,0	5,0	1,0
Mount Hood	USA	5,0	4,0	1,0
Strisselspalt	Francia	4,5	2,0	0,7
British Columbian Bramling	Canadá	5,0	2,3	0,7
Styrian Goldings	Eslovenia	5,0	2,6	0,8
Saaz	República Checa	3,0	7,0	1,0
Lublin	Polonia	5,0	1,3	1,0
N.Z, Hallertau	Nueva Zelanda	7,5	6,0	1,0
(b) Lúpulos alfa				
Target	Inglaterra	10,5	5,2	1,3
Yeoman	Inglaterra	10,5	5,1	0,8
Omega	Inglaterra	8,0	3,5	1,0
Northern Brewer	Alemania	8,0	7,0	1,6
Brewers' Gold	Alemania	6,5	6,5	1,4
Rekord	Bélgica	6,0	6,0	1,0
Galena	USA	13,0	8,0	1,2
Nugget	USA	13,0	5,0	2,0
Clusters	USA	7,0	5,0	0,5
Pride of Ringwood	Australia	9,0	1,7	2,0
Super Styrian	Eslovenia	8,5	2,2	1,0
Green Bullet	Nueva Zelanda	10,0	7,8	1,3
Pacific Gem	Nueva Zelanda	12,0	9,2	1,8
(c) Lúpulos de doble finalidad				
Northdown (con semillas)	Inglaterra	8,0	6,0	1,0
Northdown (sin semillas)	Inglaterra	10,0	6,6	2,0
Challenger (con semillas)	Inglaterra	7,0	3,9	0,8
Challenger (sin semillas)	Inglaterra	9,0	4,5	1,3
Perle	Alemania	6,5	8,0	1,0
Hüller	Alemania	5,5	6,0	1,0
Centennial	USA	10,0	5,0	1,5
Chinook	USA	13,0	3,0	2,0

Figura 2.16- Categoría de lúpulos y variedades (Hornsey, 1999).

A continuación, en la Figura 2.17 se observa un bosquejo de los distintos contenidos de compuestos aromáticos para variedades de lúpulos de distintos orígenes. Esta información es muy útil fundamentalmente para la producción de cervezas artesanales.

VARIEDAD	ORIGEN	DESCRIPTOR AROMÁTICO	ALFA ACIDOS (%)	BETA ACIDOS (%)	ALFA/BETA RADIO	COHUMULO NA (%)	PRINCIPAL ACEITE ESENCIAL (%)
HALLERTAU	Alemania	ESPECIAS	3.5%	3.5-4.5%	1	20-26%	MIRCENO 35-44%
SAAZ	Chequia	ESPECIAS	4-5%	4-5%	1	23-56%	MIRCENO 24-50%
SPALT	Alemania	ESPECIAS, TIERRA	4-5%	4-5%	1	20-35%	HUMULENO 23%
TETTNANGER	Alemania	HIERBA, FLORAL	3-5.8%	2.8-5.3%	1.1	24%	MIRCENO 40%
EAST KENT	Reino Unido	LAVANDDA, TOMILLO	5-6%	2-3%	2.2	29%	MIRCENO 42%
FUGGLE	Reino Unido	HERBACEO SUAVE, FRUTAL Y A MADERA	3.6-5.6%	1.7-2.9%	2.0	25.0-32.0	MIRCENO 35.0-45.0 %
GOLDING	Reino Unido	SUAVE, DELICADO Y TIPO INGLES	3.2-5.2%	1.4-2.5%	2.1	24.0-27.0	HUMULENO 35.0-45.0 %
CHALLENGER	Reino Unido	AHUMADO	6.5-9%	3.2-1.5%	3.3	20-25%	MIRCENO 30-42%
TARGET	Reino Unido	SUAVE	8-12.5%	5-5.55%	1.9	29.35%	MIRCENO 17.22%
AMARILLO	EEUU	CITRICO	8.1-10.5%	5.5-7.3%	1.5	20.0-22.0	MIRCENO 40.0-40.0 %
CASCADE	EEUU	CITRICO TIPO POMELO	5.6-8.8	6.4-7.3%	1.1	31.0-34.0	MIRCENO 45.0-60.0 %
CENTENNIAL	EEUU	FLORAL Y CITRICO	8.2-10.9%	3.5-4.4%	2.4	25.0-27.0	MIRCENO 52.0-60.0 %
CHINOOK	EEUU	PICANTE Y PINACEO	12.2-15.3%	3.4-3.7%	3.9	28.0-30.0	MIRCENO 20.0-30.0 %
WILLAMETTE	EEUU	SUAVE PICANTE Y CITRICO	4.6-6.0%	3.6-4.2%	1.4	29.0-32.0	HUMULENO 31.0-35.0 %

Figura 2.17-Varietades de lúpulo según su origen (Gonzalez-Minero, 2018).

2.1.3 Adjuntos

Los adjuntos, también llamados sucedáneos, son materias primas consideradas como agentes cerveceros secundarios, que no son derivados de la cebada malteada, pero constituyen otra fuente fermentable de azúcares que muchas veces permite una disminución de costos. En general son utilizados mundialmente (con excepción de aquellas cervezas elaboradas según la ley de pureza de “Reinheitsgebot” que no podrán tener adjuntos) y aportan una diferenciación al producto, contribuyendo al color, aroma y en algunos casos a la mejora de la espuma (Hough, 1990; Kunze, 2006a; Boulton, 2007).

Los adjuntos utilizados pueden ser líquidos o sólidos. Los adjuntos líquidos se agregan luego de la primera fermentación para ser utilizados como promotores de la fermentación secundaria que se realiza en algunas cervezas. Los adjuntos sólidos más comúnmente usados son el trigo, maíz, y arroz y constituyen las denominadas “malts especiales” que se adicionan en pequeña cantidad a la malta base. Estas se utilizan con el objetivo de aumentar el color, el sabor y los aromas (Boulton y Quain, 2007).

Estos tipos de maltas son obtenidas aplicando calor extra en el proceso de horneado de la malta (secado) o mediante equipos especializados (Mallett, 2014). Algunos tipos de maltas especiales son: tipo Múnich (malta oscura), cristal (malta caramelo), malta tostada, malta de trigo y maltas de otros cereales, maltas ahumadas, malta diastática, maltas acidas y maltas chit (Eblinger, 2009).

También existe la tendencia de agregar diferentes frutas y/o miel en función del estilo que se desee elaborar. En nuestro país por ejemplo, algunas cervecerías agregan frutos nativos típicos (arazá, butiá, etc.) a determinados estilos de cervezas.

2.1.4 Cerveza como alimento

La cerveza en la antigüedad era considerada un alimento debido a la presencia de proteínas, almidón y levaduras. En la actualidad no se puede considerar que sea un alimento, pero se sabe que aporta además de los nutrientes mencionados, niacina, ácido fólico y carece de grasas. Cabe destacar que el consumo moderado de esta bebida aporta nutrientes deseables, pero su consumo en exceso no es saludable (Barth, 2013).

2.1.5 Revolución “Craft Beer”

El fenómeno del crecimiento de las cervecerías artesanales “craft breweries” se da a lo largo de todos los continentes. Países como Bélgica, Holanda, y Reino Unido cuentan con una extensa tradición y cultura por la cerveza, que hace que tengan pequeñas cervecerías que datan de hace unos 200 años. Estados Unidos es el país que muestra una extensa trayectoria y un crecimiento muy importante en cervecerías artesanales en los últimos años, las cuales han logrado alcanzar una presencia en el mercado del 14 al 17 % (Appel et al., 2019).

América del Sur no escapa a esta tendencia, pero a un ritmo más lento. El país que se destaca en su avance y producción de cerveza artesanal es Brasil, y luego le sigue Argentina.

En lo que respecta a Uruguay, entre los años 2007-2008 se comenzó a formar el mapa nacional de cervecerías artesanales del Uruguay. Existen en la actualidad tres agrupaciones cerveceras: la Asociación de Micro Cervecerías Artesanales del Uruguay (AMAU), Cámara de Cervecerías Artesanales del Uruguay (CCuy) y el Club de Cerveceros Caseros de Uruguay. Si bien el mercado nacional está dominado por cervezas industriales de larga tradición, en el 2018 el 4% de la participación pertenecía a marcas jóvenes dentro de la clasificación habitual de microcervecerías (Mujica, 2018). En el año 2018 se vendieron en Uruguay 108 millones de litros de cervezas totales, lo cual fue record histórico, siendo el consumo promedio 31 litros per cápita por año (Comunicación personal curso de Especialista en Cerveza, Facultad de Química, 2019). En el año 2019, el consumo

de la cerveza artesanal creció un 24% con relación al año anterior (Portal Montevideo, 2020), y según datos recientes, se espera que aumente la competencia dada por las cervezas más sofisticadas y de mayor precio a expensas de las industriales (Euromonitor International, 2019).

Según el relevamiento de variedades más recurrentes que pueden encontrarse en el mercado uruguayo, existen en el sector artesanal 16 estilos de cervezas (Blond Ale, Pale Lager, Golden Ale, Witbier, IPA, English Pale Ale, Scottish, Amber Ale, Red, Dubbel, Porter, Coffee Stout, Oatmeal stout, Dry Stout, Brown Porter, Belgian Dark Strong Ale), mientras que el sector industrial cuenta con 8 estilos (Amber, Lager, Sin alcohol, Weisse, Porter, Lager con limón, Negra, IPA) (Appel et al., 2019).

Según un estudio sobre percepción del consumidor uruguayo de cerveza artesanal realizado en Uruguay (Schinca et al., 2019), los tres estilos de cerveza artesanal más consumidos son Indian Pale Ale (IPA), Blonde Ale y las cervezas negras tipo ale (como las Porter y Stout).

2.1.6 Diferencias entre cerveza artesanal y cerveza industrial

La cerveza industrial y la cerveza artesanal tienen diferencias que radican en la forma de elaboración del producto, la calidad de las materias primas y los volúmenes de producción.

La elaboración de la cerveza artesanal es por lo general más manual y a pequeña escala; mientras que el proceso industrial conlleva a una automatización productiva y mayor escala de producción. Está establecido para producciones artesanales de acuerdo al decreto 37.391 de la Junta Departamental de Montevideo que el volumen máximo para la producción de cerveza artesanal es 7.500 litros por lote (Junta Departamental de Montevideo, 2019).

A diferencia de las cervezas industriales, las cervezas artesanales se basan en protocolos de elaboración variados, que permiten la experimentación en la búsqueda de productos innovadores, de mayor diversidad y complejidad sensorial, lo que implica muchas veces un desafío mayor para el logro de partidas uniformes. Su producción se basa en un proceso de mínima intervención en el que se intenta minimizar el agregado de conservantes y colorantes (Jaramillo et al., 2016).

La gran variedad de estilos proporcionados por la producción artesanal contrasta con la menos variada producción industrial, la cual por razones de volúmenes de producción es mayoritaria pero en cuestiones de estilo es más acotada, siendo el 90 % del mercado cervecero ocupado por las cervezas de estilo Lager (Varela, 2016).

2.1.7 Proceso de elaboración de la cerveza

Finalmente, mencionar en este capítulo, que existen 8 etapas fundamentales para la elaboración de cerveza (Figura 2.18). Pueden existir modificaciones en alguna de las etapas, pero en líneas generales, los procesos tradicionales de elaboración cumplen con la secuencia de pasos descritos en la Figura 2.18. Las etapas descritas en la Figura 2.18 son: 1-Malta: los cereales malteados aportan los azúcares que posteriormente la levadura fermentará. 2-Molienda: el proceso de molido destruye el grano y deja expuesto el endospermo del mismo, dejando la cáscara intacta. La cáscara de la malta es muy importante en el proceso de separado y lavado del grano ya que actúa como un filtro natural para retener la cama de granos en su sitio y ayuda a separar el mosto de los granos. 3-Maceración: los granos de malta molidos se mezclan con agua para obtener el mosto por la acción de las propias enzimas del grano. El mosto es el líquido obtenido luego del proceso de remojo y maceración del grano. El lúpulo se agrega de tal forma que confiere sabor amargo y algunos aromas característicos de la cerveza. 4-Hervido del mosto: es así que una vez que el mosto llega al punto de ebullición se realiza la primera y más grande adición de lúpulo, destinado a proporcionar amargor. A partir de ahí se calculan 60 minutos de hervido, faltando 15 minutos se hace un segundo agregado de lúpulo para aportar sabor y faltando 5 minutos la última adición para aromas. Finalizado el hervido, se apaga el fuego y se revuelve enérgicamente (Whirlpool) para que los residuos precipiten y se acumulen en el centro de la olla. 5-Enfriamiento del mosto: se debe bajar la temperatura del mosto hervido a una temperatura que no dañe las levaduras de fermentación. Esto se puede hacer con la ayuda de un enfriador contracorriente. 6-Levadura: el mosto enfriado se trasiega a un recipiente limpio y sanitizado y se agrega la levadura. En este paso se deben extremar los cuidados por limpieza y sanitización. 7-Fermentación: a partir del mosto se obtiene cerveza, por la acción de las levaduras que se alimentan de los azúcares del mosto produciendo alcohol y dióxido de carbono. 8-La maduración y el embotellado. Una vez terminada la fermentación alcohólica, se realiza la maduración y posterior trasiego de la cerveza a botellas con algo de levadura. Con el agregado de azúcar se genera una segunda fermentación en botella con la levadura que queda en suspensión y se obtiene gas carbónico natural. También existen otras modalidades de embotellado y carbonatación.

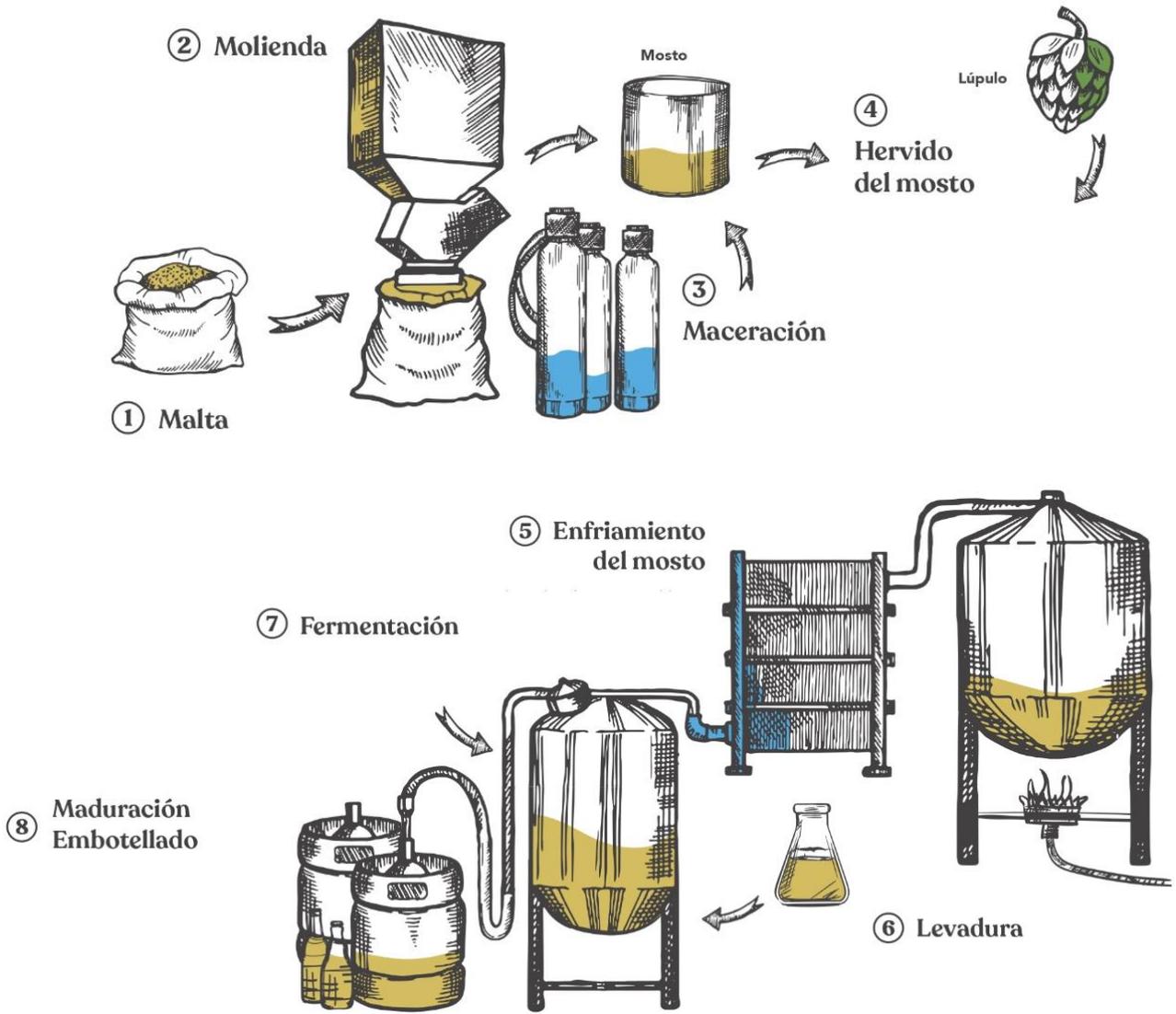


Figura 2.18- Proceso simplificado de elaboración de cerveza.

CAPÍTULO 3

LEVADURAS *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*. IMPACTO EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA

3.1 LEVADURAS Y FERMENTACIÓN

3.1.1 Introducción y antecedentes

3.1.1.1 Generalidades de las levaduras

Las levaduras son microorganismos eucariotas, hongos unicelulares, la mayoría pertenece al grupo de los Ascomycetos y al reino Fungi. Por lo general las levaduras tienen forma oval, esféricas o casi cilíndricas y su división celular se realiza casi siempre por gemación (Madigan et al., 2004).

El phylum Ascomycota cuenta con aproximadamente 64.000 especies conocidas, este es el phylum del reino Fungi más extenso y diverso. La presencia de estos microorganismos se da en variedad de nichos mayoritariamente naturales, industriales y en ambientes agrícolas así como también en ambientes extremos en la Tierra (Schoch et al., 2009).

En base a morfología celular, tipo de reproducción sexual, características fisiológicas, características bioquímicas y homología genómica, se recopilaron cerca de 1500 especies de levaduras pertenecientes a 149 géneros (Kurtzman et al., 2011a).

Las levaduras constituyen el grupo más simple de los organismos eucariotas. Carecen de tejidos verdaderos, son quimio heterótrofos y no móviles. Su célula se encuentra formada por envolturas celulares, pared celular y membrana plasmática, un citoplasma conteniendo organelos y un núcleo verdadero recubierto por una membrana nuclear que encierra los cromosomas (Figura 3.2). El promedio de tamaño de estos microorganismos es de 10 μm . Pero el tamaño celular promedio de una cepa de levadura particular no es constante, sino que varía de acuerdo con a la etapa en el ciclo de crecimiento, las condiciones de crecimiento y la edad (Boulton y Quain, 2007).

Las levaduras más conocidas y comúnmente usadas son como se mencionó anteriormente las pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Estas han servido de modelo a la hora de estudiar los organismos eucariotas (Madigan et al., 2004).

Se puede visualizar la jerarquía taxonómica de la *Saccharomyces cerevisiae* en la Figura 3.1.

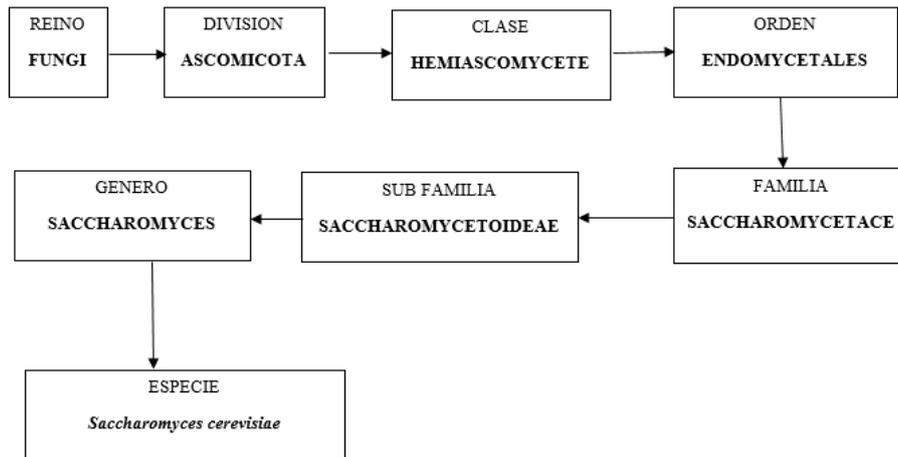


Figura 3.1-Taxonomía jerárquica de *Saccharomyces cerevisiae* (Boulton y Quain, 2007).

Las levaduras del género *Saccharomyces* son las levaduras tradicionales de la mayoría de los procesos biotecnológicos de la elaboración de cerveza, vino y pan. La publicación de la secuencia del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* en 1996 fue un hito en biología (Dujon, 1996).

3.1.1.2 Estructura general de las levaduras

En la Figura 3.2 se observan la estructura general de una célula eucariota.

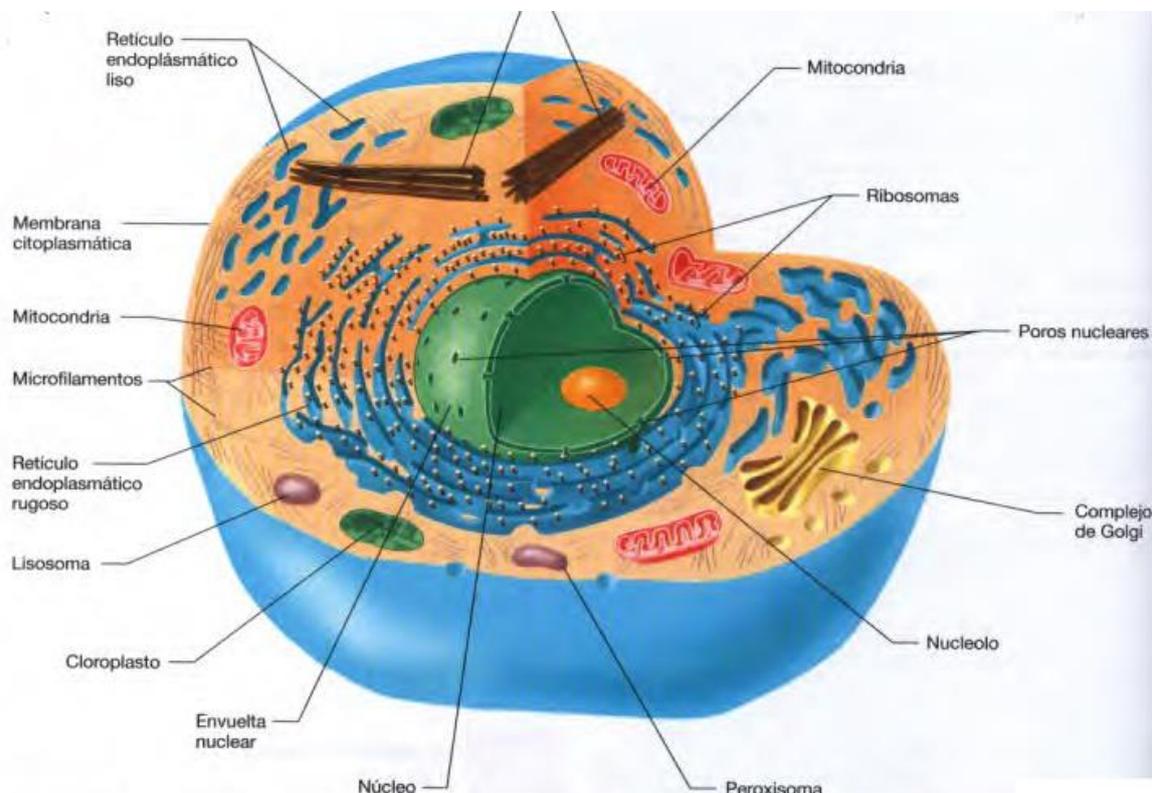


Figura 3.2-Visión tridimensional de una célula eucariota. No todas las estructuras y organelos representados pertenecen a todos los tipos de células eucariotas (Madigan et al., 2004).

La levadura *Saccharomyces* posee unos 6000 genes, los genes son parte de los cromosomas y se encuentran en 16 cromosomas diferentes. Las levaduras salvajes de esta especie usualmente son diploides y contienen 32 cromosomas (Dujon, 1996; Madigan et al., 2004). Las mismas mediante una evolución adaptativa han permitido una diversidad de cepas *Saccharomyces* en diferentes sustratos como pan, vino o cerveza (White and Zainasheff, 2010).

Las especies del grupo de no-*Saccharomyces* pueden ser muy diversas en número de genes y cantidad de cromosomas, y su conocimiento aún dista mucho de lo que se sabe de *S. cerevisiae*.

Poseen sistemas membranosos intra-citoplasmáticos así como núcleo. Este núcleo está rodeado por membranas y se encuentra cerca de la vacuola principal. La membrana nuclear consiste en dos unidades de membrana que dejan un espacio de grosor variable. La membrana interna es un simple saco pero la externa suele tener continuidad con el retículo endoplásmico. La membrana nuclear de las levaduras no se dispersa durante la mitosis. Los organelos citoplasmáticos presentes en las levaduras son mitocondria, retículo endoplásmico, aparato de Golgi y una vacuola importante. El citosol es una mezcla compleja de sustancias disueltas en el agua, allí se encuentran las enzimas que están involucradas en la fermentación anaeróbica. Por lo que el citosol es una solución que contiene enzimas solubles, glucógeno y ribosomas. El pH intracelular debe permanecer cerca de la neutralidad para evitar la destrucción de las macromoléculas (Madigan et al., 2004; White y Zainasheff, 2010).

La respiración aeróbica se da en las mitocondrias. Las mitocondrias contienen una pequeña cantidad de ADN que codifica nuevas proteínas estructurales de las mitocondrias, algunos transportadores electrónicos y esteroides.

3.1.1.3 Estructura de la pared celular en las levaduras

La pared celular es una pared fina compuesta principalmente por carbohidratos, que recubre la célula y que cumple la función de protección y contención. . La pared celular representa el 30 % de la composición de la célula seca y está compuesta por polisacáridos, proteínas y lípidos. El 10 % de las proteínas está anclado en la pared celular. La pared está compuesta por tres capas, la capa interior es una capa de quitina compuesta mayoritariamente por glucanos y la capa exterior está formada en su mayoría por mano-proteínas y finalmente la capa intermedia es una mezcla de los dos (Hough, 1990). La membrana plasmática y la estructura básica de la pared celular se encuentran en las Figuras 3.3 y 3.4 (Kunze, 2006a).

La estructura de la pared es muy dinámica tiene varias funciones y su composición evoluciona a lo largo de la vida de la levadura según los factores del medio ambiente. Cuando la levadura genera una

célula hija se crea una cicatriz permanente que se llama “bud scar”. Esta cicatriz está compuesta por quitina (Figura 3.5) (Deacon, 2006; White and Zainasheff, 2010). En relación a las enzimas asociadas a la pared celular o alojadas en el espacio periplásmico se encuentran enzimas invertasas, β -glucosidasas y α -galactosidasas. Estas enzimas están comprendidas en las modificaciones de la pared durante el transcurso del crecimiento y desarrollo de las células. La actividad de las mismas es máxima durante la fase exponencial del crecimiento de las levaduras, pero aún después de la muerte celular se observa actividad de las β -glucanasas. Estas enzimas intervienen en el proceso de autodisolución de la pared de las levaduras durante el proceso de autólisis celular (Leroy, 1986).

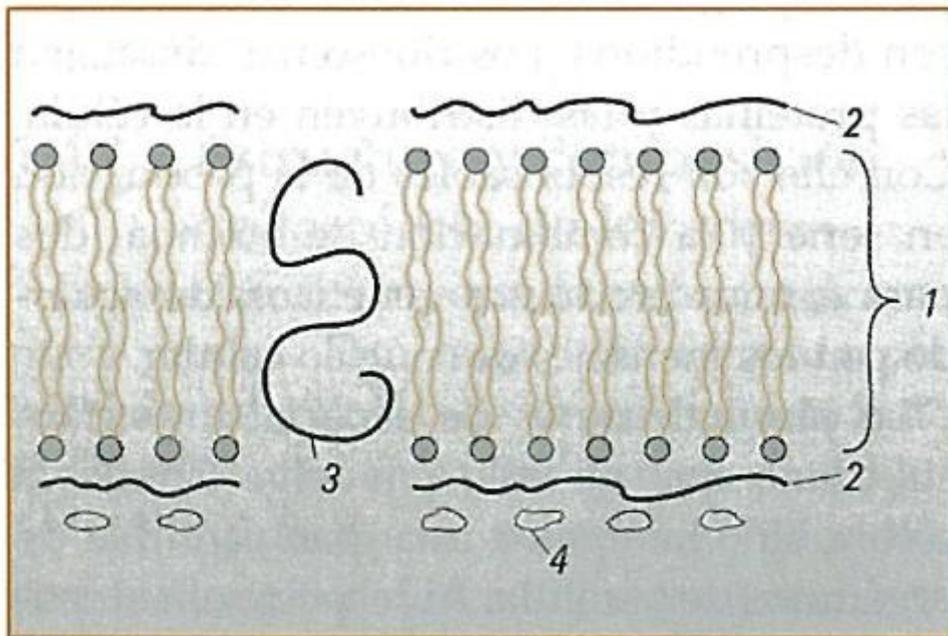


Fig. 3.3-Estructura de la membrana celular (Kunze, 2006a).

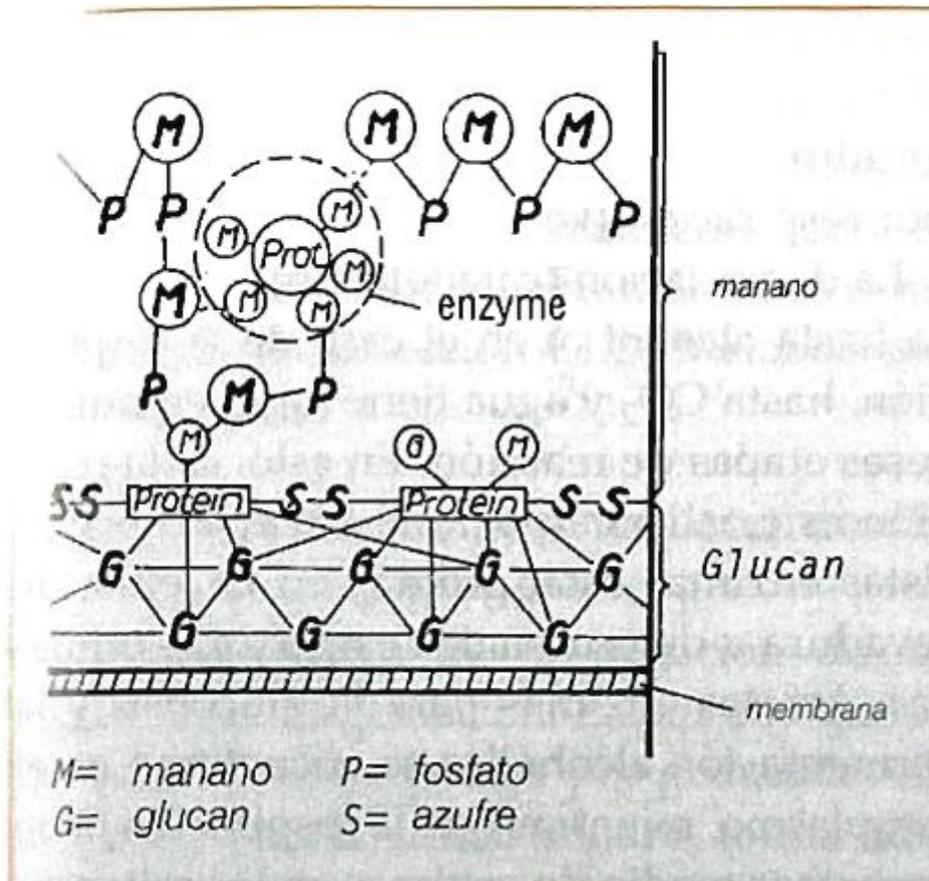


Fig. 3.4-Estructura de la Pared celular. 1-fosfolípidos, 2-proteínas acumuladas, 3- proteínas de transporte, 4-trehalosa acumulada (Kunze, 2006a).

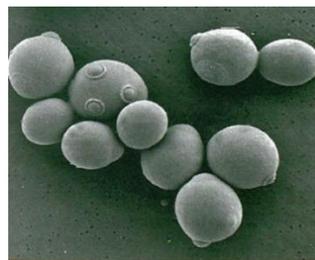


Fig. 3.5-Celulas de levadura en gemación (Kunze, 2006a).

3.1.1.4 Ciclo Biológico de las levaduras. Reproducción asexual y sexual

Las levaduras tienen dos tipos de reproducción: reproducción asexual (mitosis) o la reproducción sexual (meiosis). Algunas levaduras no esporulan fácilmente y la habilidad para formar ascosporas puede desaparecer durante tiempos prolongados, tornando la clasificación de las mismas más compleja (Kurtzman et al., 2011b).

La mitosis es el proceso que sigue a la replicación del DNA, donde los cromosomas se condensan, se dividen y se separan en dos juegos idénticos para cada célula. Este es el ciclo seguido cuando hay una abundancia de nutrientes carbonados y nitrogenados que es la fermentación. La meiosis o división reduccional es el proceso por el que se produce la transición de estado diploide a haploide, implica dos divisiones y al final del proceso se originan un total de cuatro gametos haploides que son las ascosporas. Esta situación ocurre cuando hay una carencia de nutrientes y las células aseguran su supervivencia mediante la esporulación. En la Figura 3.6. se representan las etapas a grandes rasgos de la mitosis y meiosis (Madigan et al., 2004). En relación a estos dos tipos de reproducción es que las levaduras pueden tener dos tipos de denominaciones válidas. Una de ellas hace referencia al tipo de reproducción sexual con formación de ascosporas y la otra hace referencia a la reproducción asexual en la cual no existe la formación de ascosporas (Kurtzman et al., 2011b).

Las levaduras tienen dos tipos diferentes de células haploides denominados tipos sexuales. Al conjugarse dos células de tipo sexual opuesto se origina una célula diploide. De una única célula diploide, se forma una estructura que contiene cuatro gametos dos de cada tipo sexual opuesto. La célula en la que se forman se denomina asca y las células formadas en el interior del asca se denominan ascosporas (Madigan et al., 2004).

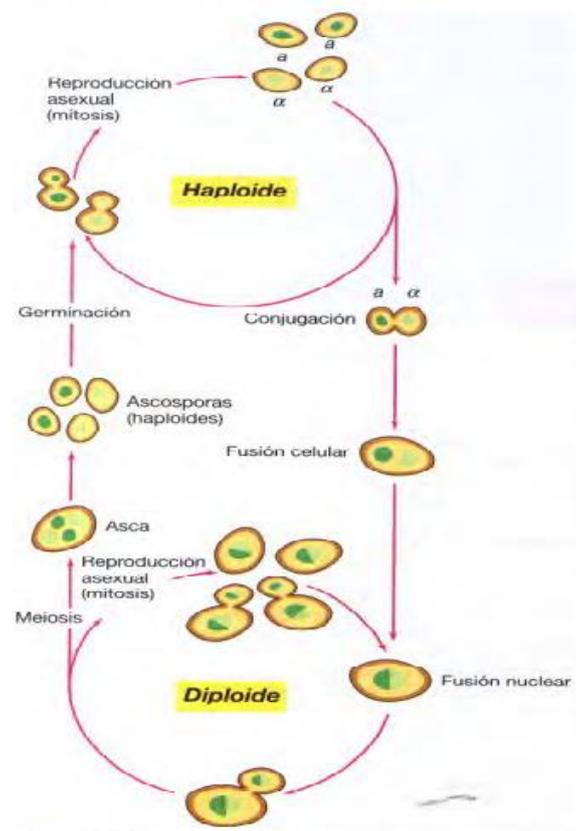


Figura 3.6-Ciclo biológico de una levadura típica *Saccharomyces cerevisiae* (Madigan et al., 2004).

3.1.2 Levaduras cerveceras

Como ya se mencionó anteriormente el género tradicional de levaduras utilizadas son las *Saccharomyces*. Esta palabra proviene del latín y significa “hongo del azúcar”.

Para la elaboración de cervezas, se habla de dos categorías de levaduras, las levaduras Ale y las levaduras Lager (Kunze, 2006a).

Antiguamente las levaduras ale y lager eran clasificadas por las propiedades de floculación que tenían. Las levaduras ale tienden a flotar en la superficie del fermentador mientras que las levaduras lager sedimentan en el fondo del fermentador (Bond, 2009).

Actualmente se conoce que estos dos grandes grupos de levaduras se diferencian por sus características morfológicas, fisiológicas y tecnológicas (Tabla 3.1) (Kunze, 2006a).

En las técnicas de clasificación de taxonomía y genética moderna las levaduras ale y lager pertenecen al género *Saccharomyces sensu stricto*. Este género incluye muchas especies que son importantes industrialmente *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, y *S. pastorianus* entre otras (Rainieri et al., 2003; Rainieri et al., 2006; Bond, 2009; Eblinger, 2009).

Tabla 3.1 –Cuadro comparativo de las levaduras ale y las levaduras lager (Kunze, 2006a; Eblinger, 2009).

CARACTERÍSTICA	LEVADURAS ALE	LEVADURAS LAGER
GEMACIÓN	Células madre e hija unidas por mayor tiempo, ramificación	Células madre e hija separación inmediata
RAFINOSA	Baja posibilidad de utilización	Alta posibilidad de utilización (α galactosidasa)
MALTOTRIOSAS	Uso restringido a algunas cepas	Mayor y mejor uso
T. FERMENTACIÓN	18-25°C	7-15°C
LUGAR FERMENTACIÓN	Superficie del tanque	Fondo del tanque
FLOCULACIÓN	Baja tendencia	Tendencia alta la floculación
RESPIRACIÓN	Marcada preferencia	Preferencia
PERFIL VOLÁTILES	Frutales, ésteres	Parcialmente sulfuroso

Las levaduras utilizadas en la producción de cervezas lager pertenecen generalmente a la especie *Saccharomyces pastorianus*. Esta especie surge de una hibridación natural entre las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces bayanus* (Martini y Martini, 1987).

La levadura *Saccharomyces pastorianus* (*syn. Saccharomyces carlsbergensis*) es una especie domesticada que surgió de la fusión de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* con una levadura criotolerante desconocida de la especie *Saccharomyces*. Se reportó en la Patagonia el aislamiento de

esta especie la cual se denominó *Saccharomyces eubayanus*, debido a que mostró una similitud a la *Saccharomyces bayanus* (un complejo híbrido de *Saccharomyces eubayanus*, *Saccharomyces uvarum* y *Saccharomyces cerevisiae*) (Libkind et al., 2011).

Las fermentaciones que ocurren sin inocular ningún microorganismo, en particular levaduras, son conocidas como fermentaciones naturales o espontáneas. Este proceso involucra la participación de diferentes levaduras no-*Saccharomyces* y una diversidad de levaduras *Saccharomyces* nativas. Este tipo de levaduras generalmente son mencionadas como nativas, indígenas o salvajes, principalmente en procesos que no son estériles como ocurre en la producción de cerveza, vino o sidra (Varela, 2016; Varela et al., 2009). Antiguamente eran consideradas por los cerveceros como levaduras “no deseadas” (Hough, 1990; Kunze, 2006a), concepto que ha ido cambiando con el tiempo y fundamentalmente en los últimos 5 años.

Existe abundante literatura respecto a los cambios positivos que se han obtenido en la utilización de levaduras nativas en la elaboración de vinos y en los últimos tiempos han aumentado las investigaciones relacionadas a la utilización de levaduras nativas en cervezas (Pires et al., 2014; Michel et al., 2016; Basso et al., 2016; Varela, 2016).

Cabe mencionar que existen estilos particulares de cerveza que utilizan levaduras nativas para la fermentación a través de lo que se llama fermentaciones espontáneas, tal es el caso de las cervezas Lambic. Las cervezas Lambic Sour son el producto de fermentaciones espontáneas que duran de uno a tres años, y cuya microbiota involucrada incluye la presencia de más de 2000 bacterias y levaduras. Estas fermentaciones comienzan con el dominio de *Enterobacteriaceae* en el primer mes, a los dos meses son remplazadas por *Pediococcus damnosus* y *Saccharomyces spp.* y luego remplazadas por *Dekkera bruxellensis* (Spitaels et al., 2014).

3.1.2.1 Antecedentes de levaduras en cerveza

La utilización de levaduras comerciales permite la obtención de productos uniformes y bien conocidos, así como la simplificación de los procesos por el conocimiento de la evolución de los diferentes parámetros.

Existen varios reportes científicos que se han centrado en la búsqueda de otras especies de levaduras. De tal forma de evitar la uniformidad del producto y explorar su utilización para la elaboración de varios estilos de cerveza. Estas levaduras nativas, se han aislado de diferentes entornos alrededor del mundo, de especies *Saccharomyces* y también de otras especies (Cubillos et al., 2019).

Las levaduras *Saccharomyces* son conocidas por su resistencia al etanol y también por el desarrollo adecuado para lograr diferentes bebidas fermentadas. Sin embargo también hay otra gran variedad de cepas como las no *Saccharomyces* que pueden realizar un aporte significativo al flavor del producto deseado (Varela, 2016).

En los últimos años se han incrementado las investigaciones que refieren a tipos de levaduras no tradicionales. En el área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones de la Facultad de Química de la Universidad de la República, se cuenta con una gran cantidad de las levaduras estudiadas que son no-*Saccharomyces* y generalmente son aisladas de fermentaciones espontáneas en la producción de cervezas de algunos estilos en particular como, Lambic Sour (Spitaels et al., 2014; Basso et al., 2016; Michel et al., 2016, Holt et al., 2018; Cubillos et al., 2019).

En cuanto a levaduras no *Saccharomyces* se ha reportado que en general tienen bajo desempeño para la producción de etanol comparado con cepas *Saccharomyces cerevisiae*, y por esta razón raramente pueden ser usadas en cultivo puro y se debe recurrir al uso de cultivos mixtos (Holt et al., 2018).

A continuación se describen las especies de levaduras no-*Saccharomyces* más conocidas en la industria cervecera.

Dekkera/Brettanomyces

La mayoría de estas especies en el ambiente cervecero han sido aisladas de fermentaciones espontáneas en el proceso de elaboración de cervezas del estilo Lambic o Sour. Se ha visto que este tipo de cepas denotan un perfil bien marcado en las cervezas para las cuales se utilizan, contribuyendo al perfil sensorial aportando notas frutales y florales por la gran producción de esteres (Basso et al., 2016).

Brettanomyces anomalus

Es una cepa utilizada en cervezas del tipo Gueuze y Lambic siendo conocida por ser una levadura contaminante en el vino. Estas levaduras son capaces de fermentar los principales azúcares presentes en el mosto (Steensels et al., 2015; Michel et al., 2016). Presentan actividad β -glucosidasa que puede hidrolizar los enlaces glucosídicos permitiendo la liberación de monoterpenos, que en el caso de la cerveza provienen del lúpulo (Daenen et al., 2007). Se caracterizan por metabolizar ciertos ácidos como el ácido p-cumárico y el ácido ferúlico que están presentes en el mosto formando los compuestos 4-vinilguaiacol y 4-vinilfenol (Michel et al., 2016).

Brettanomyces bruxellensis

Esta cepa ha sido aislada de varias bebidas fermentadas y tiene una relevancia industrial importante (Avramova et al., 2018). Tiene una extensa tradición cervecera por ser usada para fabricar cervezas como Lambic y Gueuze. Hay registro de que ha sido utilizada para algunas Weisbier y algunas Sour English Ales (Steensels et al., 2015). Se encontró su presencia en cervezas del estilo American Coolship Ale (ACA), la cual es un tipo de cerveza elaborada espontáneamente muy similar a las tradicionales Belgian Lambic. La cepa *Brettanomyces bruxellensis* fue dominante en la población de levaduras después de un año de fermentación (Bokulich et al., 2012). Puede fermentar algunos de los azúcares importantes presentes en el mosto y también carbohidratos complejos como la maltotriosa y maltopentosa (Michel et al., 2016). Se reportó que muchas de las cepas estudiadas son productoras de compuestos como etil caproato (notas dulce, frutal, ananá) y etil caprilato (ceroso, rancio, dulce) (Michel et al., 2016).

Candida shehatae

Esta cepa ha mostrado potencial para la reducción de monoterpenos que están presentes en el mosto y que son provenientes del lúpulo, transformándolos en compuestos aromáticos deseados (Michel et al., 2016; Goretti et al., 2013). Puede fermentar la mayoría de los azúcares (Michel et al., 2016).

Candida tropicalis

Se ha encontrado a diferencia de las otras cepas, en bebidas y comidas fermentadas indígenas, en fermentaciones espontáneas y con bacterias lácticas. Es capaz de fermentar azúcares como glucosa, sacarosa y maltosa. Es considerada un patógeno, razón por la cual su uso en la producción de cerveza es limitado (N'Guessan et al., 2010).

Saccharomyces ludwigii

Esta cepa considerada como una cepa contaminante en vinos, tiene alta tolerancia al etanol y al SO₂. Sin embargo ha sido utilizada para la producción de cervezas con bajo contenido de alcohol en Alemania e Italia. Genera bajas concentraciones de alcohol cuando fermenta la glucosa, fructosa y sacarosa. No es una especie que utilice usualmente la maltosa o la maltotriosa (Michel et al., 2016). Esta cepa se caracteriza por la alta producción de isoamil acetato, 2 feniletanol y polisacáridos, así como también la actividad β -glucosidasa que aumenta la diversidad de aromas en vinos. Esto abre nuevas posibilidades de investigación para la aplicación en la industria cervecera (Vejarano, 2018).

Pichia kluyverii

Esta cepa tiene una capacidad limitada para fermentar la glucosa, por lo que ha sido reportada para la producción de cervezas con bajo contenido de alcohol (Saerens y Swiegers, 2014; Burini et al., 2020). Es capaz de realizar cambios positivos en los compuestos aromáticos provenientes del lúpulo (Michel et al., 2016). Se ha destacado como productora de niveles notorios de acetato de isoamilo y acetato de etilo, dos compuestos deseados en la industria cervecera para algunos estilos particulares. La producción de estos ésteres es notoria cuando la cepa está en cultivo puro, sin embargo cuando se realizaba una inoculación secuencial con una cepa *Saccharomyces cerevisiae* esta tendencia desaparece y se observaban niveles parecidos a los producidos por una cepa *Saccharomyces cerevisiae* (Holt et al., 2018).

Wickerhamomyces anomalus (Pichia anomala)

Muestra un gran espectro de utilización de diferentes hexosas (glucosa, galactosa, fructosa), pentosas (arabinosa, xilosa), disacáridos (sacarosa, lactosa) y polisacáridos así como también alcoholes, ácidos orgánicos, ácidos grasos e hidrocarburos aromáticos (Walker, 2011).

Si bien hay alguna evidencia que esta especie no es capaz de metabolizar la maltosa, otros estudios muestran que cepas salvajes de *Pichia anomala* son capaces de utilizar la maltosa y crecen incluso mejor en este sustrato que *Saccharomyces cerevisiae* comerciales (Walker, 2011). Esta especie es buena productora de compuestos tales como etil propanoato, fenietanol, acetato de 2 feniletíl y acetato de etilo. Estos compuestos aumentan la complejidad aromática de la cerveza. En particular el etil acetato, dependiendo de su concentración puede contribuir al flavor de la cerveza aportando notas frutales o notas a solvente (Walker, 2011; Lee et al., 2011; Basso et al., 2016).

Torulaspota delbrueckii

Es una de las especies no-*Saccharomyces* más prometedoras en cuanto a la producción de cerveza (Basso et al., 2016). Fue domesticada para la elaboración de vinos y de bioprocesos (Albertin et al., 2014).y es bien conocida por su aporte aromático frutal en la elaboración de cervezas y vinos (Van Breda et al., 2013; Albertin et al., 2014). Algunos autores creen que es una de las responsables de la fermentación de las cervezas bávaras de trigo (Michel et al., 2016). Es capaz de consumir maltosa y se sabe que puede tolerar concentraciones de iso α -ácidos correspondientes a estilos altamente lupulados (Basso et al., 2016; Michel et al., 2016).

Zygosaccharomyces rouxii

Esta especie es utilizada para la elaboración de cervezas de bajo contenido alcohólico debido a su escasa capacidad de fermentar maltosa. Tiene altas velocidades de fermentación cuando utiliza glucosa y puede consumir alcohol. No tiene una gran producción de esteroides, pero sin embargo presentan características interesantes para la elaboración de cerveza en cuanto a la producción de etanol, y compuestos aromáticos (De Francesco et al., 2015 ; Michel et al., 2016).

Lachancea thermotolerans

Dentro de la búsqueda de levaduras nativas que aporten características diferenciales se encuentra *Lachancea thermotolerans* (Cubillos et al., 2019). Estudios indican que esta levadura puede ser una buena opción para la producción de cervezas del estilo Sour sin la utilización de bacterias (Domizio et al., 2016).

3.1.3 Domesticación

La domesticación de las distintas cepas conlleva variaciones a lo largo del tiempo como la alta variación genética y fenotípica de las levaduras y variaciones en sus capacidades reproductivas (Carlos A. Driscolla et al., 2009; Gallone et al., 2016).

Existe un estudio que permitió apoyar la hipótesis de la domesticación ya que se encontró vinculación entre cepas industriales y un grupo limitado de cepas ancestrales y que son genotípica y fenotípicamente distintas a las salvajes (Gallone et al., 2016). Este es uno de los primeros trabajos donde se incorporó el concepto de domesticación de las levaduras realizando estudios en base a herramientas genéticas.

3.1.4 Metabolismos de la levadura

Las levaduras al igual que cualquier otro organismo vivo requieren de energía para la realización de distintos procesos metabólicos vitales y para la producción de sustancias. Estos pequeños organismos requieren energía para la síntesis de nutrientes, para el transporte de los mismos, para su crecimiento y para su reproducción (Kunze, 2006a).

Los dos metabolismos más importantes para estos microorganismos son: la respiración aeróbica (Figura 3.9) y la fermentación alcohólica (Figuras 3.8), son metabolismos por los cuales la célula obtiene energía para poder realizar su actividad metabólica. Estos microorganismos también tienen complejos metabolismos de hidratos de carbono, sustancias minerales, sustancias albuminoides y de materia grasa ((Hornsey, 1999; Kunze, 2006a).

Cada uno de estos metabolismos tiene una razón de ser, el metabolismo de hidratos de carbono sirve para la obtención de energía para poder realizar la respiración y la fermentación alcohólica, mientras que los metabolismos de sustancias albuminoides, minerales y materia grasa sirven para la síntesis de sustancias celulares. Estos metabolismos tienen un impacto importante en lo que es la calidad de la cerveza (Hornsey, 1999; Kunze, 2006a).

Las levaduras deberían preferir siempre la respiración ya que les otorga más energía, la cual viene principalmente en forma de ATP, para poder utilizarla en sus requerimientos. Estos microorganismos son capaces de emplear también la fermentación que si bien les da energía, la cantidad brindada será menor (Madigan et al., 2004; Kunze, 2006a). Sin embargo *S. cerevisiae* en condiciones de alto contenido de azúcares y aerobiosis, opta por utilizar la fermentación (Crabtree positivo), ya que es una forma de competencia que excluye a otras especies ya sea por la anaerobiosis por producción de CO₂, alta temperatura o por la producción de alcohol como antiséptico (Goddard and Greig, 2015).

En función de la exposición al oxígeno y la concentración de azúcares del mosto a fermentar que puedan tener las levaduras estas optaran por realizar la respiración o la fermentación. Pudiendo degradar los azúcares por estas dos vías metabólicas. Cualquiera de las dos vías metabólicas comienza con un mismo proceso que es la glucólisis (Madigan et al., 2004; Kunze, 2006a).

La glucólisis es la ruta metabólica central que permite la transformación de la glucosa a piruvato para posteriormente según las condiciones del medio se den las reacciones ya sea de fermentación alcohólica o de respiración. La glucólisis consta de dos grandes etapas, la etapa I de reacciones preparatorias y la etapa II de oxidación (Figura 3.7).

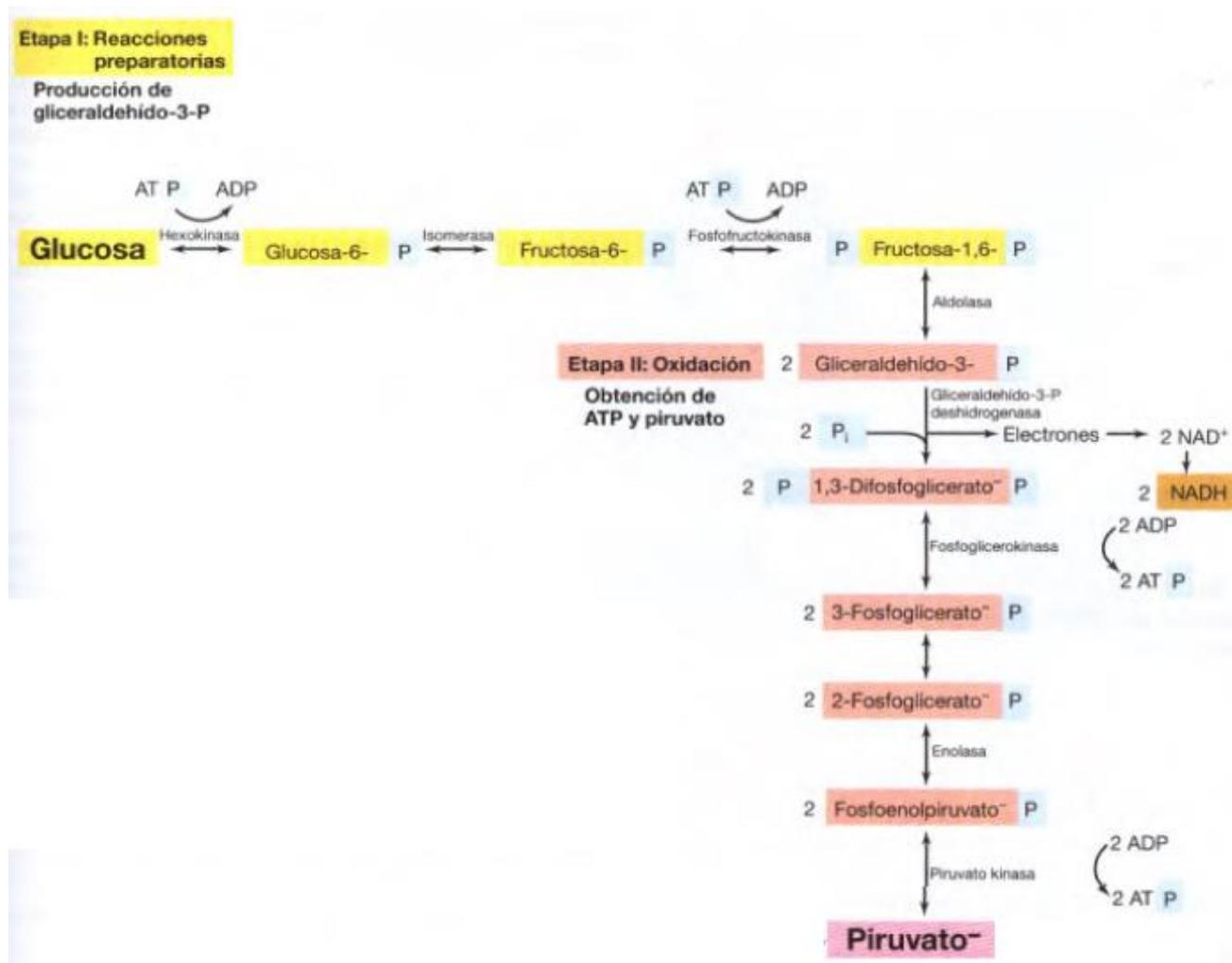


Figura 3.7- Ruta glucolítica esbozo de etapa I: reacciones preparatorias, etapa II: oxidación (Madigan et al., 2004).

3.1.4.1 Factores a considerar

Las levaduras utilizarán más fácilmente los azúcares más simples, como son la glucosa y fructosa, y luego seguirán con la maltosa y maltotriosa. El azúcar mayoritario del mosto cervecero es la maltosa con cantidades menores de glucosa y maltotriosa (White y Zainasheff, 2010; Hill y Stewart, 2019). La composición típica de azúcares en un mosto cervecero que se consideró fue la reportada por Kunze ,2006.

Con referencia al nitrógeno es importante mencionar al nitrógeno asimilable (Free Amino Nitrogen, FAN), el cual es una medida del nitrógeno que será metabolizado por las levaduras durante la fermentación. Las levaduras utilizarán el nitrógeno disponible para la síntesis de proteínas y otros componentes celulares. La fuente principal de nitrógeno para la síntesis de proteínas, ácidos nucleico y otros componentes celulares nitrogenados, son los aminoácidos, péptidos y proteínas ácidos nucleicos y los productos de degradación formados en la proteólisis de las proteínas de la cebada.

En cuanto a los niveles óptimos de FAN esto depende del tipo de fermentación, de la cepa utilizada, del tipo de mosto y de los niveles de azúcar presentes en él.

Los niveles óptimos de FAN para densidades estándares para la elaboración de cerveza se encuentran dentro de 200-250 mg FAN/L. Cabe destacar que el valor óptimo varía para las levaduras del tipo ale y del tipo lager. Para cualquier tipo de levadura igualmente se mantiene la relación de a mayor crecimiento mayor necesidad de FAN. Para fermentaciones de alta densidad donde se busca lograr una atenuación rápida, se buscan valores más altos de FAN (Hill y Stewart, 2019).

En cuanto al contenido de etanol en el medio, este produce una combinación de inhibición del crecimiento y disminución de la viabilidad, lo que termina impactando en una inhibición de la fermentación alcohólica a partir de un 8 % (Suárez-Machín et al., 2016).

3.1.4.2 Sustratos para la Fermentación Alcohólica

Las levaduras pueden asimilar un amplio grupo de carbohidratos. Cada cepa tendrá la posibilidad de usar preferentemente uno o algunos. Las fuentes de carbono más comúnmente usadas son carbohidratos, incluyendo mono, di y trisacáridos además de dextrinas y almidones (Briggs et al., 2004).

Durante la maceración, a medida que las partículas del endospermo se van hidratando las enzimas retoman su acción y realizan su ataque a las reservas nutritivas de la malta (almidón). Las α y β amilasas actúan coordinadamente degradando la amilosa y la amilopectina (estructuras del almidón) para liberar los azúcares fermentescibles (Hough, 1990), obteniendo así la llave de entrada a la glicolisis y dando paso entonces a la fermentación alcohólica (Madigan et al., 2004).

3.14.3 Fermentación alcohólica

La fermentación es una forma de catabolismo anaerobio en el que un compuesto orgánico es donador y aceptor de electrones (Figura 3.8). En casi todas las fermentaciones el ATP generado se obtiene a través de fosforilación a nivel de sustrato. Realizando una evaluación en términos de eficiencia energética obtenida por esta vía sabemos que a través de la fermentación el balance neto es de dos moléculas de ATP por cada mol de glucosa fermentada.

El poder reductor del NADH debe ser transferido a un receptor de electrones para regenerar el NAD⁺, dado que este no es un aceptor final de electrones y permite que las reacciones de la ruta continúen. Siendo el producto de la descarboxilación del piruvato, el acetaldehído, el que será receptor final de los electrones regenerando el NAD⁺. En primer lugar ocurre la descarboxilación del ácido pirúvico catalizada por la enzima piruvato descarboxilasa, cuyo cofactor es el pirofosfato de

tiamina (TTP). En segundo lugar se desarrolla la reducción del acetaldehído en etanol mediante la enzima alcohol deshidrogenasa cuyo sitio activo contiene un ion Zn^{+} , obteniendo el NAD^{+} que queda a disposición nuevamente como transportador de electrones (Madigan et al., 2004; Medina, 2014).

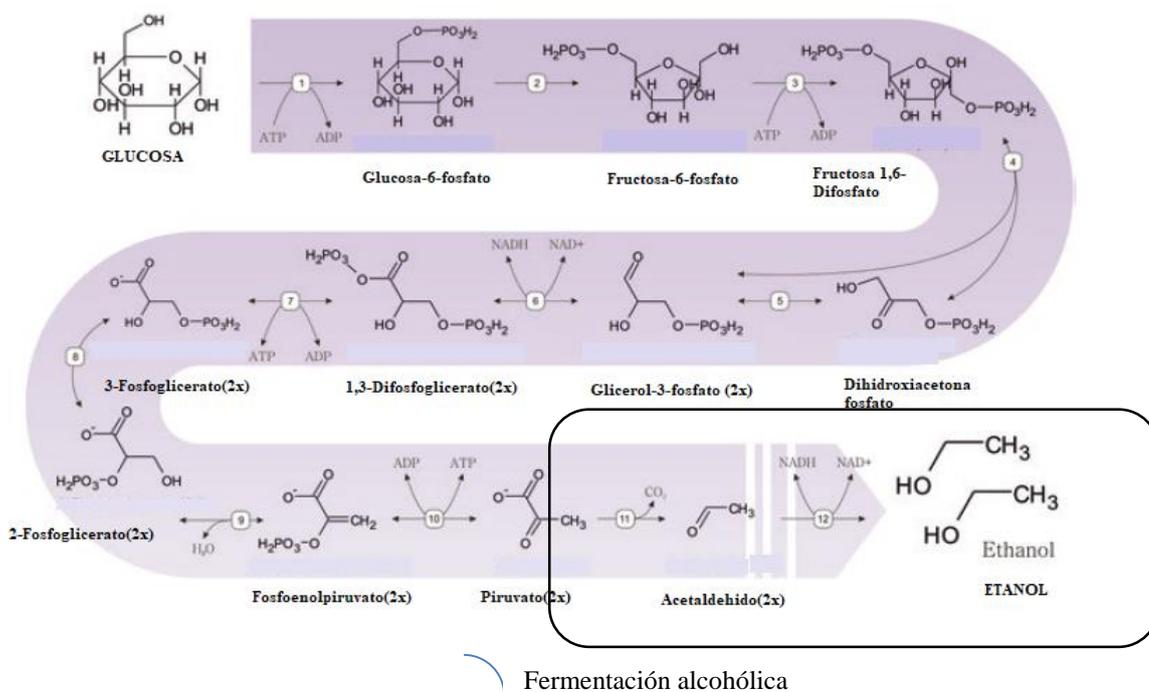


Figura 3.8-Diagrama de la fermentación alcohólica a través de la ruta Embden Meyerhof-parnas (tipo más común de la glucólisis) (Pires y Brányik, 2015).

3.1.4.4 Respiración

La respiración se dará mediante el ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs (Figura 3.9). En primer lugar es la descarboxilación del piruvato en donde se producen CO_2 , $NADH$ y el compuesto de alta energía acetil-CoA. Este último ingresa al ciclo donde se desarrollan diferentes reacciones y transformaciones generándose: 2 moléculas de CO_2 , 3 de $NADH$ y 1 de $FADH$. La finalización de este ciclo se da con la regeneración del oxalacetato como aceptor de acetilos, completando el mismo. El balance energético de la respiración de una molécula de glucosa es de 38 ATP. Realizando la comparación entre el ATP obtenido en la fermentación y en la respiración, vemos que la respiración pone a disposición de la levadura 19 veces más energía biológicamente utilizable que la fermentación (Madigan et al., 2004).

La respiración es utilizada para la producción industrial de levaduras. Es necesario diferenciar el fenómeno de respiración de la aireación del mosto. El beneficio de esta práctica facilita la fermentación alcohólica por la síntesis de ácidos grasos y esteroides, estos actúan como cofactores en

lo que implica la tolerancia al etanol por parte de las levaduras (García et al., 2010; Roldan Crespo, 2018).

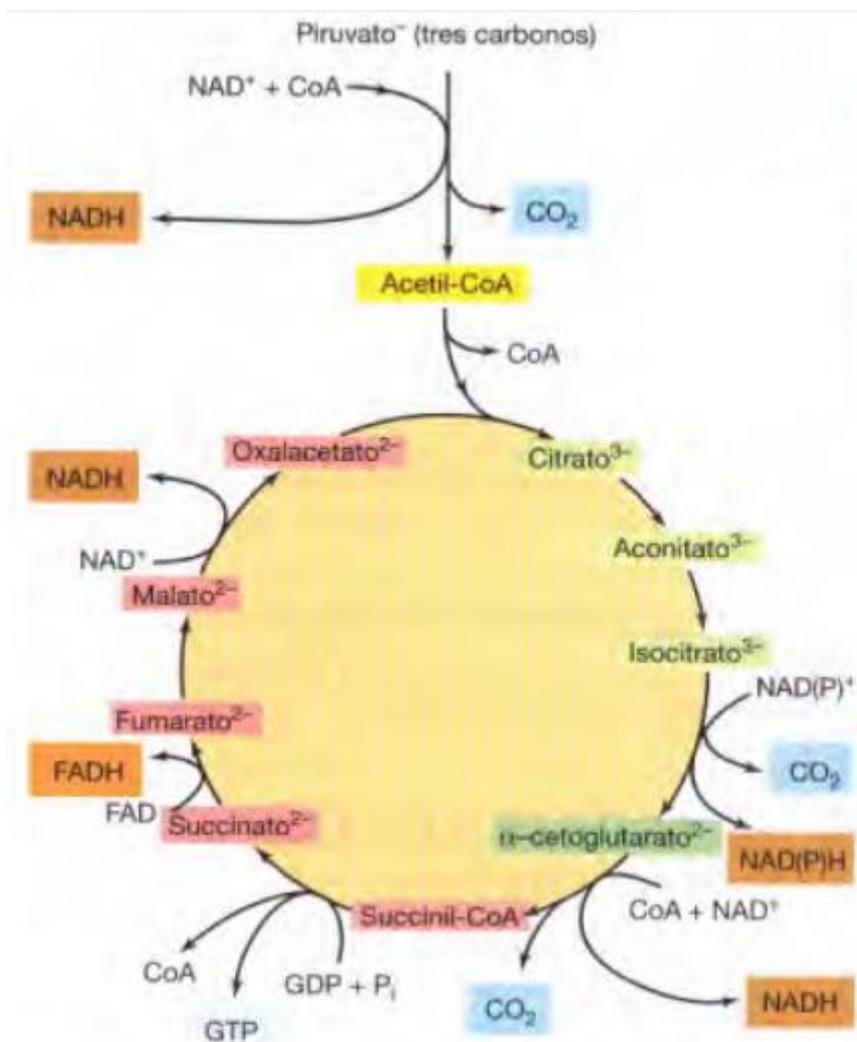


Figura 3.9-Respiración aeróbica: representación gráfica de la oxidación del piruvato mediante la piruvato deshidrogenasa y del ciclo del ácido cítrico o ciclo de Krebs (Madigan et al., 2004).

3.1.5 Aromas provenientes de las levaduras

La obtención de compuestos aromáticos puede ser por síntesis química, por extracción y también por biosíntesis como son los “aromas de fermentación” de origen microbiológico.

La ventaja de los productos fermentados es el aporte de estos aromas por las levaduras y/o bacterias que participan en el proceso, enriqueciendo el sabor y aroma final de la cerveza (Vandamme y Soetaert, 2002).

Para las bebidas fermentadas la selección de levaduras que incrementen o complejicen el “fenotipo del sabor”, es una característica que debe ser considerada fundamental (Carrau et al., 2015b).

3.1.5.1 Umbrales de percepción y de detección

La interacción de los diferentes compuestos y la matriz en la que están presentes definirán también qué impacto tendrá en el producto. El umbral de percepción es la concentración a la cual el compuesto puede ser detectado sensorialmente. Todos los compuestos aromáticos poseen un valor umbral denominado límite de detección sensorial (usualmente se expresa en concentración) por debajo del cual no pueden ser identificados sensorialmente. La detección sensorial para los compuestos aromáticos se relaciona con su presión de vapor, la cual depende de la temperatura y el medio en que se encuentra. No todos los componentes volátiles presentes en un alimento contribuyen de forma decisiva en el aroma sensorial del mismo. Para tener cierta relevancia, una molécula volátil debe hallarse en una concentración más alta que su valor límite de detección sensorial (Cordero-Bueso, 2013).

3.1.5.2 Unidades de aromas

El aroma de las cervezas está constituido por una gran variedad de compuestos volátiles presentes en diferentes concentraciones que varían desde algunos $\mu\text{g}/\text{L}$ pudiendo llegar a mg/L en algunos casos. El umbral de percepción es muy variado lo que determina que el impacto en el aroma de los distintos compuestos sea definido por lo que se denomina: unidades de aroma. Las unidades de aromas se definen como la relación entre la concentración de la sustancia y el umbral de percepción (ambos deberán estar expresados en la misma unidad) (Barth, 2013).

$$\text{unidades de aroma} = \frac{\text{concentración}}{\text{umbral de percepción}}$$

3.1.5.3 Alcoholes Superiores

Los alcoholes superiores que también son conocidos como aceites de fusel, son los compuestos más abundantes en la cerveza. Estos compuestos son formados mediante el metabolismo de aminoácidos. A partir de aminoácidos ya sea por catabolismo o por anabolismo mediante la vía de Erlich son generados los diferentes alcoholes superiores (Pires et al., 2014).

En la Figura 3.10 se puede visualizar la dinámica del metabolismo implicado en la producción de estos compuestos.

La producción y el tipo de alcoholes superiores se ven influenciados por las fuentes de carbono y de nitrógeno disponible en el medio, en este caso el mosto. El tipo de levadura utilizada y la temperatura de fermentación así como otros factores inciden en la producción de los alcoholes superiores (Dzialo et al., 2017).

Estos compuestos son de 3 carbonos o más y tienen puntos de ebullición mayores a los del etanol. Los alcoholes superiores que más inciden en el flavor de la cerveza son el propanol, el isobutanol, el 2-feniletanol, el alcohol amílico y el alcohol isoamílico. Incluyendo a los mencionados anteriormente podemos encontrar más de 40 alcoholes superiores diferentes siendo el alcohol isoamílico el alcohol superior que más incidirá en el sabor de la cerveza. En el caso de los alcoholes superiores, concentraciones por encima de los 300 mg/L en la cerveza generan un aroma fuerte a solvente y pungente (Meilgaard, 1975; Loviso y Libkind, 2019).

En la Tabla 3.2 se puede observar los valores de los umbrales de percepción y los descriptores sensoriales característicos de estos compuestos. Los descriptores surgen de comparación con aromas conocidos de nuestra memoria sensorial, y sirven para comunicar las sensaciones entre un grupo de catadores.

Tabla 3. 2-Alcoholes superiores más relevantes en el flavor de la cerveza (Meilgaard, 1975, Loviso y Libkind, 2019).

Alcoholes Superiores	Umbral de percepción (mg/L)	Descripción aromática
Propanol	306	Rancio, solvente, dulce, alcohol
Isobutanol	40	Goma, solvente, alcohol
Alcohol Isoamílico	30	Frutado, banana, alcohol
Alcohol Amílico	80	Alcohólico, solvente
2-Feniletanol	14	Floral, rosas

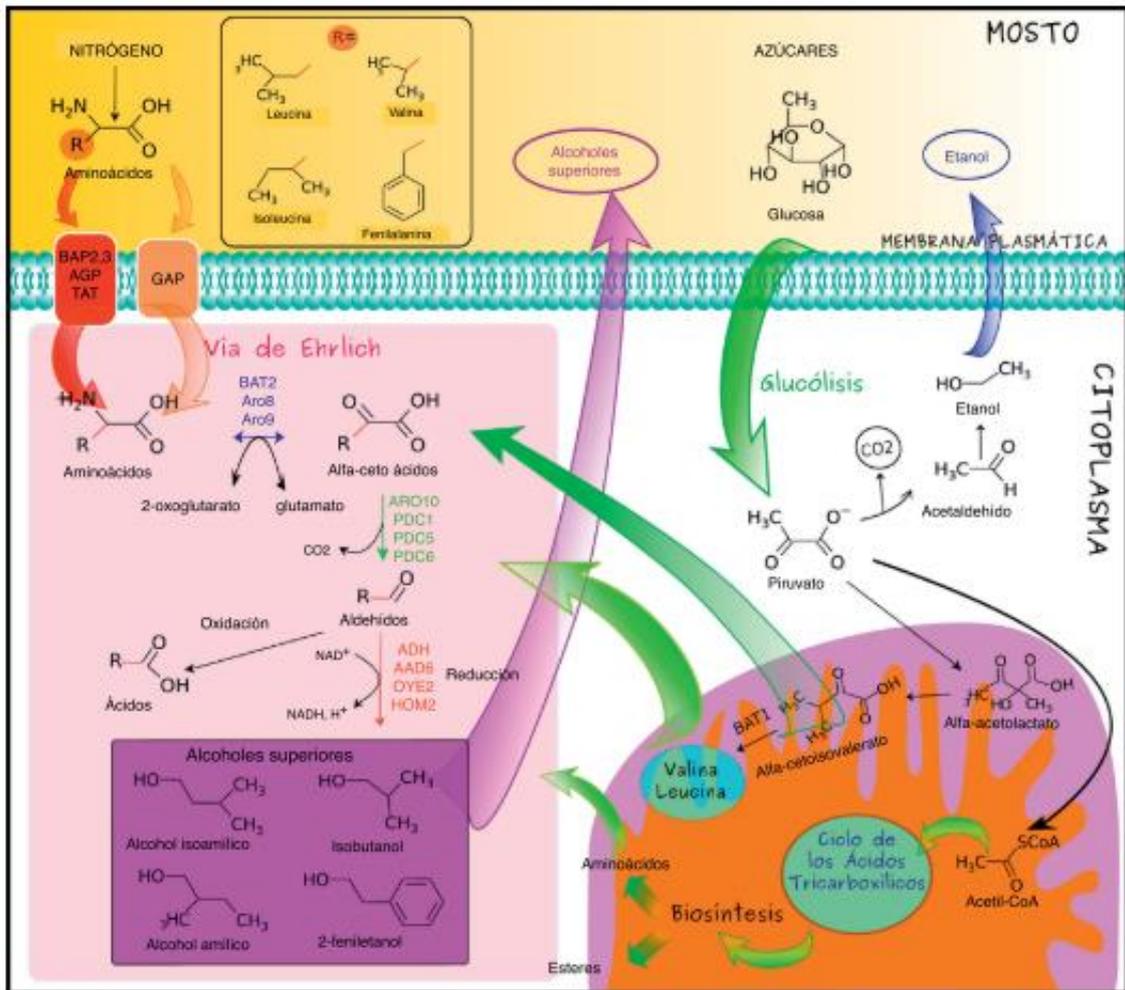


Figura 3.10- Rutas metabólicas que participan en la formación de alcoholes superiores (Loviso y Libkind, 2019).

3.1.5.4 Esteres

Los esteres son uno de los compuestos más relevantes en la cerveza (Pires et al., 2014). En general, este tipo de compuestos son deseados para cervezas del estilo ale dado los aportes frutados y florales que aportan (Verstrepen et al., 2003).

Estos tipos de compuestos se pueden dividir en: esteres de acetato y los esteres de etilo. Dentro de los esteres de acetato podemos encontrar el etil acetato de etilo, acetato de isoamilo y acetato de 2-feniletil, y dentro de los esteres de etilo, encontramos los esteres derivados de ácidos grasos de cadena media como, el hexanoato u octanoato de etilo. En general los esteres se encuentran en concentraciones que son muy próximas a los valores de los umbrales de percepción, por lo que pequeñas variaciones en su producción pueden tener impacto en la cerveza. Existen algunos esteres como por ejemplo el acetato de etilo que en concentraciones muy altas aporta aromas indeseados, como por ejemplo a solvente. Los seis esteres más importantes de la cerveza son el acetato de etilo,

acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de 2-feniletilo y hexanoato de etilo. En la Tabla 3.3 se pueden observar los valores de los umbrales de percepción y sus descriptores característicos.

Tabla 3.3-Descripción de los esteres más relevantes en la cerveza (Meilgaard, 1975; Loviso y Libkind, 2018).

Esteres	Umbral de percepción (mg/L)	Descripción aromática
Acetato de etilo	30	Solvente, frutado
Acetato de isoamilo	0,030	Banana
Acetato de isobutilo	0,5	Frutado
Acetato de 2-feniletilo	0,250	Rosas, miel, manzana
Hexanoato de etilo	0,005	Afrutado, manzana, anisado
Octanoato de etilo	0,002	Manzana, pera, banana, ananá, floral, frutado
Lactato de etilo	155	Frutal, queso

Los esteres son producidos mayoritariamente en la primera etapa de la fermentación alcohólica Y se encuentran altamente asociadas al metabolismo de lípidos y al crecimiento celular. Una vez que los esteres son sintetizados dentro de la célula, por su carácter lipofílico difunden rápidamente por la membrana plasmática y son liberados al medio (Figura 3.11). Los esteres de acetato son rápidamente excretados al medio extracelular, mientras que para los esteres etílicos la liberación por la membrana plasmática va disminuyendo proporcionalmente en función del tamaño de la molécula (Pires et al., 2014). Se sabe que en condiciones reductivas o anaeróbicas su producción es mayor que con aireación (Fariña et al. 2012), y esto puede explicar su alta concentración en fermentaciones como la cerveza.

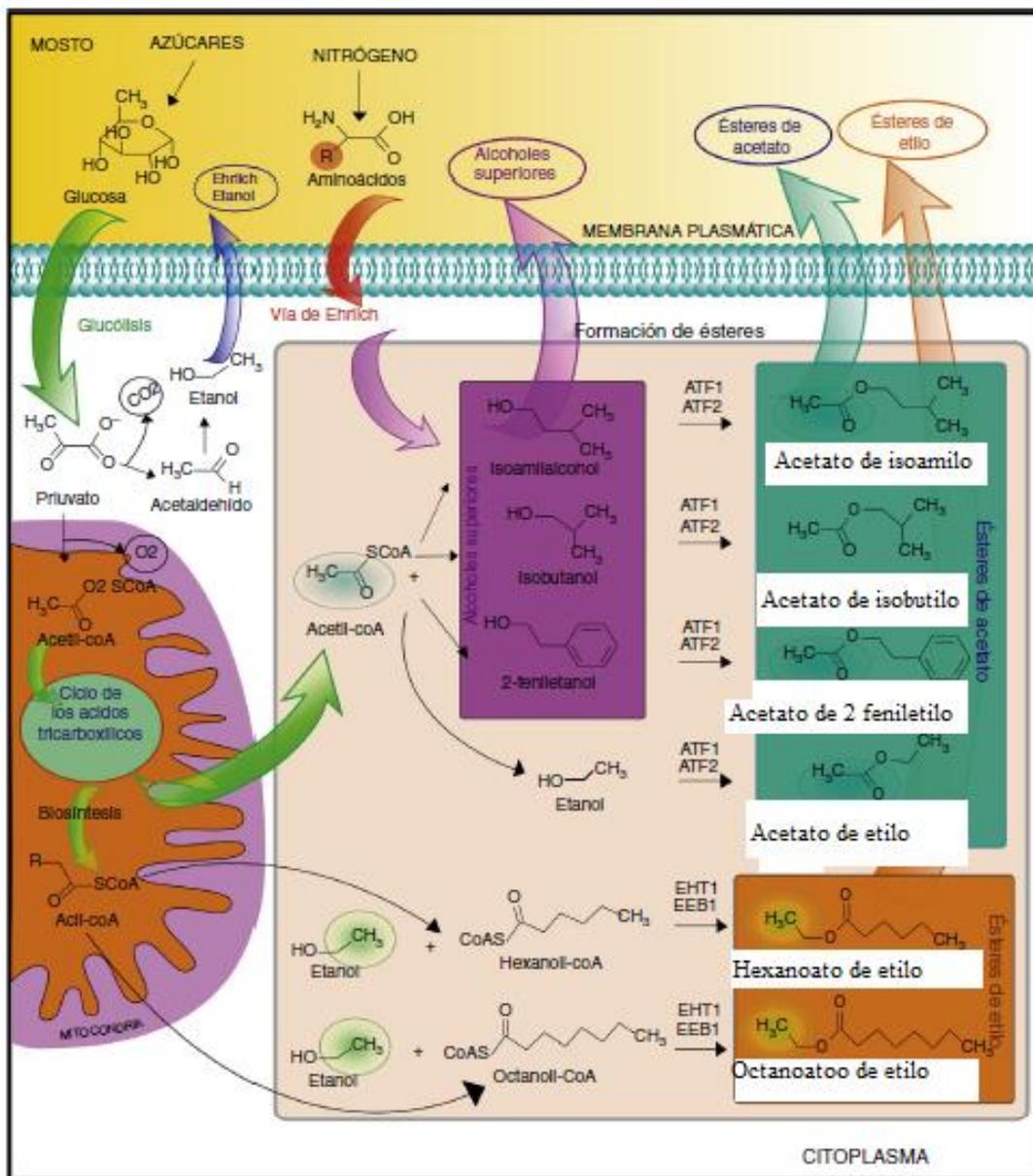


Figura 3.11- Rutas metabólicas presentes en la levadura para la síntesis de ésteres (Loviso y Libkind, 2018).

3.1.5.5 Fenoles

Estos compuestos tienen como precursores a los ácidos fenólicos provenientes de la malta, siendo ellos el ácido ferúlico, ácido cumárico y ácido cinámico. Los compuestos fenólicos son considerados en general como aromas no deseables (POF, phenol off flavor), pero en algunos estilos de cerveza son compuestos deseados ya que producen descriptores aromáticos específicos. Los compuestos más comunes de este grupo son el 4-vinilguaiacol, 4-vinilfenol, 4-etilguaiacol, 4-etilfenol, 4-vinilsiringol, estireno, eugenol y vainillina, los cuales tienen umbrales de percepción bajos, del orden de 0,1 y 0,9 mg/L (Michel et al., 2016) como se observa en la Tabla 3.4.

Tabla 3.4-Descripción de los fenoles volátiles más relevantes en la cerveza (Meilgaard, 1975; Michel et al., 2016).

Fenoles	Umbral de percepción (mg/L)	Descripción aromática
4-Etilfenol	0,9	Aroma fenólico, astringente
4-Etilguaiacol	0,13	Aroma fenólico, dulce
4-Vinilguaiacol	0,3	Aroma fenólico, clavo de olor, amargo
4-Vinilfenol	0,2	Aroma fenólico, ahumado

3.1.5.6 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos presentes en la cerveza pueden ser volátiles y no volátiles, y los mismos contribuyen al sabor y la acidez total final. La producción de los ácidos orgánicos depende en gran parte de la cepa de levadura siendo muchos de estos ácidos productos de la glicolisis, del ciclo del ácido cítrico y del metabolismo de los aminoácidos y de los ácidos grasos.

En la Tabla 3.5, se muestran los ácidos orgánicos más relevantes, sus umbrales de percepción y descriptores aromáticos.

Tabla 3.5-Descripción de los ácido orgánicos más relevantes en la cerveza (Meilgaard, 1975; Rychlik et al., 1998; Michel et al., 2016).

Ácidos orgánicos volátiles	Umbral de percepción (mg/L)	Descripción aromática
Ácido acético	175	Vinagre
Ácido butírico	0,14	Ceroso, rancio
Ácido caprílico	0,5	Queso, aroma a animal
Ácido caproico	3	Dulce
Ácido caprico	15	Aroma a cabra, polvo
Ácido laurico	6,1	Aroma jabonoso
Ácidos orgánicos no volátiles	Umbral de percepción (mg/L)	Descripción aromática
Ácido oxálico	500	Salado, oxidado
Ácido cítrico	400	Ácido
Ácido málico	700	Manzana
Ácido fumárico	400	Agrio, ácido
Ácido succínico	220	Ácido
Ácido láctico	400	Agrio, ácido
Ácido pirúvico	300	Salado, forraje

3.1.5.7 Monoterpenos

Este tipo de compuestos derivan de las plantas y aportan aromas florales a la cerveza. Proviene del lúpulo, siendo los 5 compuestos químicos mayoritarios, el linalol, α -terpinol, β -citronelol, geraniol y nerol, como se puede visualizar con sus umbrales de percepción y sus descriptores aromáticos en la Tabla 3.6.

Las levaduras tienen la posibilidad de variar las proporciones de estos compuestos. Esta variación está directamente relacionada con la capacidad de metabolización de estos compuestos por parte de las diferentes levaduras. Estos compuestos pueden aparecer en el mosto glicosilados y por lo tanto inactivos aromáticamente pero existen ciertas cepas de levaduras que permiten la liberación de estos monoterpenos mediante enzimas glucosidasas (Pérez et al., 2011; Michel et al., 2016). Sin embargo algunas levaduras pueden sintetizar linalol y geraniol a partir de los azúcares de la fermentación, dependiendo de la especie en concentraciones que contribuirían sensorialmente al producto final (Carrau et al., 2015)

Tabla 3.6- Descripción de los monoterpenos más relevantes encontrados en la cerveza (Meilgaard, 1975; Rychlik et al., 1998; Michel et al., 2016)

Monoterpenos	Umbral de percepción (mg/L)	Descripción aromática
Linalol	0,005	Lavanda
α -Terpinol	0,002	Lila
β -Citronelol	0,008	Limón, lima
Geraniol	0,006	Rosa
Nerol	0,5	Rosa, cítrico
β -Mirceno	1,9	Picante, balsámico
Limoneno	0,2	Limón, naranja

3.1.5.8 Compuestos Carbonilos

Dentro de los compuestos carbonílicos no deseados tenemos el acetaldehído y las diacetonas. El acetaldehído es formado en las primeras etapas de la fermentación del mosto y generalmente disminuye en el final de la fermentación alcohólica. Es uno de los metabolitos intermediarios que está en mayor cantidad en la fermentación, debido a que es el último precursor, antes de la formación del etanol. Es el aldehído más importante producido por las levaduras, en concentraciones bajas presenta aromas frutales, pero en concentraciones altas otorga descriptores pungentes e irritantes.

Excesos de este compuesto en la cerveza puede producir descriptores tales como manzana verde y herbáceo, ambos considerados no agradables para cerveza. El umbral de percepción de este compuesto es de 10- 15 mg/L (Michel et al., 2016; Swiegers et al., 2009). Dentro de las diacetonas, los más relevantes son 2,3 butanodiona (diacetilo) y 2,3-pentanodiona. Estos compuestos son formados a través de la biosíntesis de aminoácidos de valina e isoleucina. El diacetilo o 2,3-butanodiona tiene un umbral de percepción diez veces más bajo que el 2,3-pentanodiona por lo que sensorialmente es más importante el primero. El diacetilo o 2,3 butanodiona es un compuesto común en la elaboración de cerveza pero generalmente es considerado como no deseado. Produce aromas a manteca o a butterscotch, es considerado deseado en algunas pocas cervezas tipo ale y no deseado en lagers y stout (Swiegers et al., 2009; Michel et al., 2016; Pires y Brányik, 2015).

3.1.5.9 Compuestos sulfurados

Las levaduras producen varios compuestos aromáticos derivados del azufre, que pueden contribuir positivamente con el aroma de los vinos como son algunos tioles (Roland et al., 2013). Existen dos compuestos más comúnmente formados por las levaduras en la cerveza que son el sulfuro de hidrógeno o sulfhídrico y el dióxido de azufre. El dióxido de azufre es bastante conocido para los cerveceros por jugar un rol fundamental en la estabilidad y actuar como antioxidante. El dióxido de sulfuro es deseado en algunas cervezas de fermentación baja (tipo lager). Por otro lado, el sulfuro de hidrogeno, tiene la propiedad de enmascarar a otros compuestos volátiles presentes en la cerveza que aportan notas deseables. Su umbral de percepción es muy bajo percibiéndose como huevo podrido (Michel et al., 2016).

3.1.6 Compuestos aromáticos deseables o no deseables

Existe un mundo vasto de estilos y clasificaciones a la hora de elaborar cervezas. A su vez, existen dos guías de estilos de cervezas, la Beer Judge Certification Program (BJCP) y la Brewers Association. En estas guías hay una exhaustiva descripción de lo que implica cada variedad de cerveza, desde sus propiedades fisicoquímicas más importantes hasta los descriptores aromáticos deseados y no deseados. En esta guía podemos encontrar indicaciones y comentarios respecto al aroma, aspecto, sabor, sensación en boca, impresión general del estilo de cerveza, y los ingredientes. También se detalla la densidad inicial y final, el índice de amargor (IBUs), color (SRM) y la graduación alcohólica que debe tener cada estilo de cerveza.

Respecto al aroma existe una guía que resume las características más relevantes y comunes en la cerveza, denominada rueda del sabor de Meilgard “Beer flavor Wheel” (Meilgaard, 1979) (Figura 3.12).

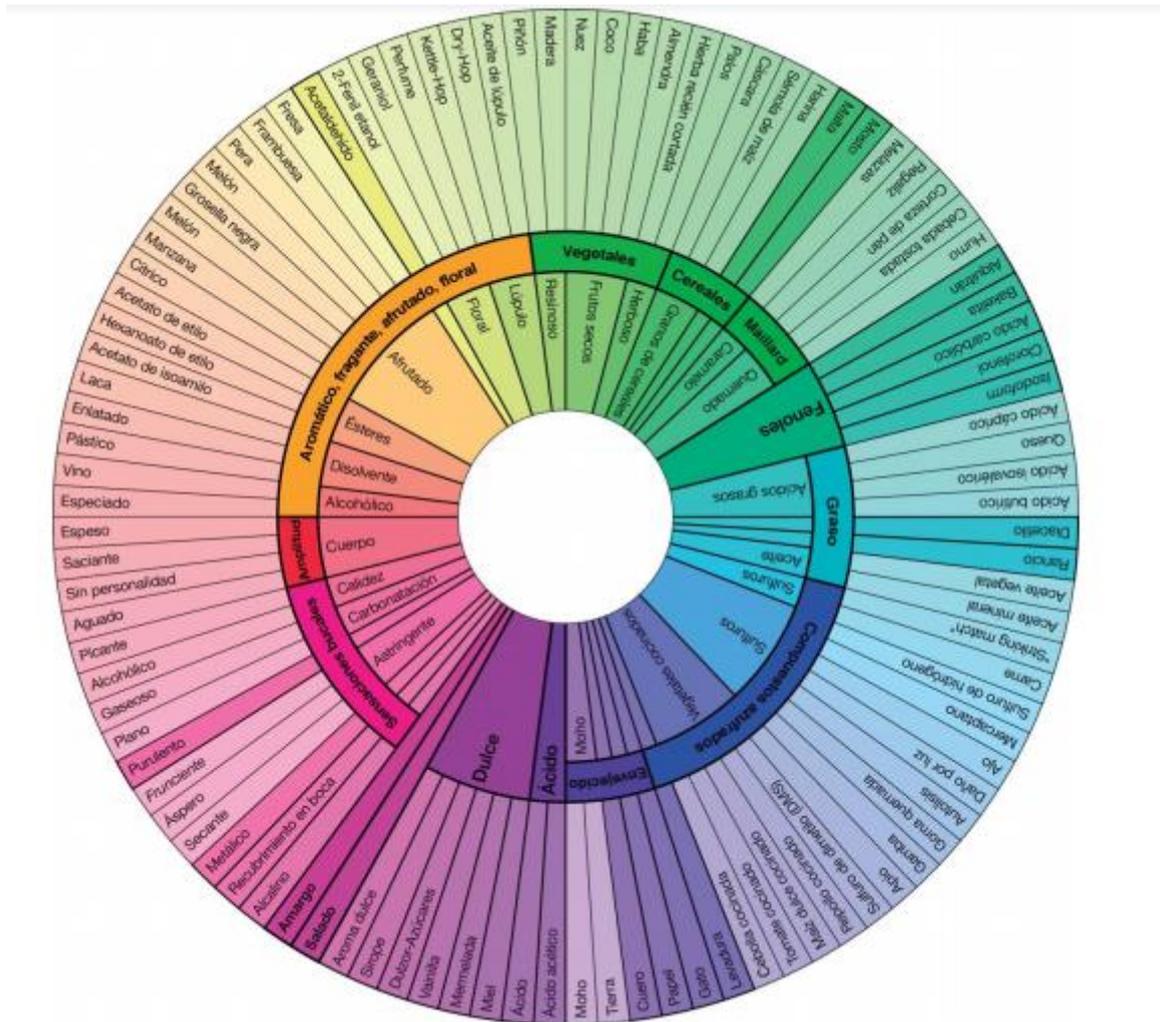


Figura 3.12- Rueda del sabor de Meilgard “Beer flavor wheel” (Meilgaard, 1979).

Es importante en primer lugar saber que estilo se quiere lograr y cuáles son las características deseadas para este estilo. Es factible encontrar compuestos que generalmente están considerados como descriptores no deseados (off flavors), pero es necesario saber que hay excepciones y que para algún estilo de cerveza en particular y en determinadas concentraciones estos compuestos a priori no deseados, pueden ser buscados.

Los compuestos descriptos como no deseables en las cervezas generalmente son: acetaldehído, sulfuro de dimetilo (DMS), lactato de etilo, diacetilo, ácido acético, trans 2-nonanal y algunos derivados de fenoles. Estos compuestos no provienen únicamente de la fermentación sino también pueden originarse durante el proceso, transporte o almacenamiento.

CAPÍTULO 4

MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Cepas no tradicionales

Origen y antecedentes de las cepas utilizadas

Algunas de las cepas utilizadas en este trabajo de tesis forman parte de la colección de cepas del área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones. La mayoría de ellas provienen de aislamientos previos de la industria vitivinícola (uvas, mostos en fermentación) aisladas de vendimias comprendidas entre los años 2000-2016. La nomenclatura de estas cepas, sigue el siguiente formato: la primera letra corresponde a la variedad de la uva de procedencia (Tabla 4.1), luego le siguen los dos últimos números del año de la cosecha, seguido del número secuencial del aislamiento de cada año y finalmente la letra G, si corresponde a un aislamiento a partir de uva (grape), o F si es a partir de mosto en fermentación. Existen algunas de las cepas aisladas de la industria vitivinícola que tienen una nomenclatura que no es acorde a la presentada (Tabla 4.1), esto se debió a que aún no estaba implementada la misma al momento de la aislación.

Tabla 4.1 Nomenclatura utilizada solamente para cepas aisladas de la industria vitivinícola.

VARIEDAD	LETRA
Merlot	M
Tannat	T
Cabernet Sauvignon	C
Tempranillo	TE
Cabernet Franc	CF
Pinot Noir	PN
Petit Verdot	PV
Arirarnoa	A
Sauvignon Blanc	SB
Chardonnay	CH
Chavanasco	CHV
Moscatel Miel	MM

También se realizaron aislamientos de levaduras, a partir de materias primas de la industria cervecera, tales como granos de cebada malta base uruguaya, cebada tostada, cebada caramelizada con trigo base, trigo caramelizado y lúpulos de diversas variedades (Uggle, Fuerte y Cascade). Paralelamente también se realizaron aislamientos de levaduras durante el proceso de elaboración.

La nomenclatura de estas cepas sigue el siguiente formato: la primera letra es la B que corresponde a Beer, la segunda letra indica la procedencia de la levadura aislada, según la materia prima o de que etapa del proceso proviene luego le siguen los últimos dos dígitos del año del aislamiento y finalmente el número secuencial del aislamiento (Tabla 4.2).

Tabla 4.2 Nomenclatura para cepas aisladas de la industria cervecera.

MATERIA PRIMA	LETRA
Lúpulo	L
Cebada	C
Malta	M
Trigo	T
Sedimentación	S
Inicio Maceración	IM

Para la realización de este trabajo de tesis se emplearon un total de 47 cepas de levaduras nativas de las cuales 17 eran *Saccharomyces* (Tabla 4.3), 30 no-*Saccharomyces* (Tabla 4.4); siendo 35 de estas levaduras provenientes de la industria (ind.) enológica y las 12 restantes de la industria cervecera.

La distribución de las diferentes cepas según los dos grandes grupos fue la siguiente: 17 cepas *Saccharomyces cerevisiae* y 40 cepas no-*Saccharomyces*. Dentro de las no *Saccharomyces* se utilizaron las siguientes especies: *Pichia anomala*, *Zygoascus meyeriae*, *Candida azyma*, *Kluyveromyces marxianus*, *Candida californica*, *Candida silvae*, *Candida akabanensis*, *Schizosaccharomyces pombe*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Aureobasidium proteae*, *Aureobasidium pullulans*, *Meyerozyma guilliermondii* y *Brettanomyces (Dekkera spp)* (Tablas 4.3 y 4.4).

Como levaduras control se utilizaron las levaduras comerciales *Saccharomyces cerevisiae* S 33 (Fermentis), y *Saccharomyces cerevisiae* Nothingam (Lallemand).

También se incluyó la cepa *Hanseniaspora vineae* (T02/5AF), debido a su aporte a la complejidad sensorial en vinos reportado por el grupo de trabajo de Enología y Biotecnología de las fermentaciones (Medina et al., 2013; Medina, 2014; Martin et al., 2018; Del Fresno et al., 2020).

Tabla 4.3-Cepas *Saccharomyces* utilizadas

CEPA	CÓDIGO
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KUI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	882
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/137F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/145F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/146F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PV 11/154F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CHV 11/172F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A 11/181F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/17
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/12
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BM15_2
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BS15_3
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BL15_5

Tabla 4.4-Cepas no *Saccharomyces* utilizadas

CEPA	CÓDIGO
<i>Zygoascus meyeri</i>	T12_135F
<i>Zygoascus meyeri</i>	T12_129F
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_19
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_17
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_01
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_07
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_23
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_11
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_09
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_08
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_12
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_24
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_15
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	S/código
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Ang 5
<i>Candida azyma strain</i>	M12_04'G
<i>Candida californica</i>	C12_207G
<i>Candida californica</i>	C12-207'G
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	T12_171G
<i>Meyerozyma</i>	Ang 3
<i>Meyerozyma</i>	Ang 6
<i>Dekkera spp</i>	1791
<i>Brettanomyces</i>	24/04A
<i>Brettanomyces</i>	24/04B
<i>Dekkera anomala</i>	1653
<i>Brettanomyces</i>	24/04 C
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	BCMO15_1
<i>Pichia anomala</i>	BCMO15_2
<i>Candida silvae</i>	BT15_4
<i>Candida akabanensis</i>	BM15_1

4.2 Medios de cultivo utilizados y símil mosto cervecero desarrollado

4.2.1 Medio WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient Agar)

El medio WLN (Wallerstein Laboratory Nutrient Agar) (Pallmann et al., 2001) constituye un medio de cultivo diferencial desarrollado para ser utilizado en la industria. Este medio de cultivo permite diferenciar las especies por morfología, color, textura, brillo y consistencia. El principio diferencial de este medio está basado en el reactivo verde de bromocresol el cual actúa como colorante diferencial (Figura 4.1).

Este medio de cultivo es útil para el relevamiento de cepas *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*. Durante el transcurso de esta tesis este medio de cultivo fue utilizado en diferentes instancias tales como en la realización de los aislamientos y durante el transcurso de las microfermentaciones, para los controles de pureza, recuentos de población y repiques de las distintas cepas.

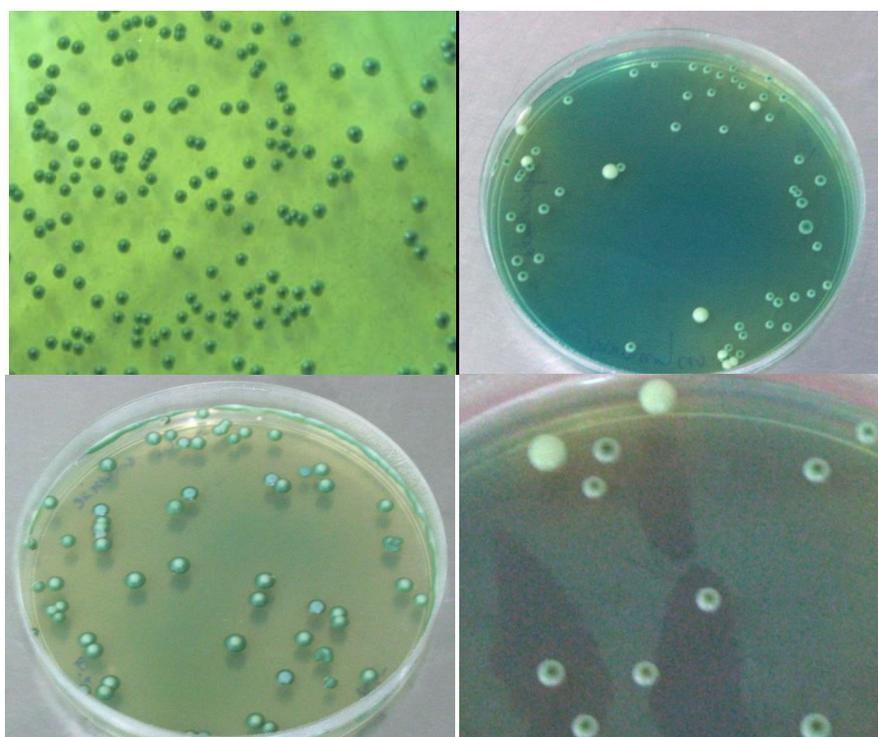


Figura 4.1- Placas de WLN conteniendo cultivos simples de levaduras no-*Saccharomyces* (fotos de la izquierda) y cultivos mixtos con levaduras *Saccharomyces* (fotos de la derecha). La levadura *Saccharomyces* de esta fotografía, se diferencia de la no-Sac, por su mayor tamaño, color blanco mate (sin brillo) y textura espesa.

4.2.2 Medio Agar Lisina

El medio Agar lisina, es un medio selectivo y de conservación (Fowell, 1965). Ha sido utilizado tradicionalmente como medio sintético para el aislamiento y recuento de levaduras salvajes de las industrias cervecera y enológica. Este medio es selectivo, ya que permite el crecimiento de levaduras

no *Saccharomyces* quienes pueden utilizar la lisina como fuente de nitrógeno (Morris y Eddy, 1957). En la Figura 4.2 se puede apreciar una placa realizada con este medio.



Figura 4.2-Medio Agar lisina

4.2.3 Medio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose) e YEPM (Yeast Extract Peptone Maltose)

El medio YEPD (10 g/L extracto de levadura, 10g/L peptona, 20 g/L dextrosa y 20g/L agar) y el medio YEPM (10 g/L extracto de levadura, 10g/L peptona, 20 g/L maltosa y 20g/L agar) son medios de cultivo de conservación.

El medio YEPM se utilizó además de medio de cultivo de conservación, como medio de cultivo para evaluar de la capacidad de fermentar maltosa, por parte de las diferentes cepas de levaduras estudiadas (se verá más adelante en este mismo capítulo). En la Figura 4.3 se observa el medio YEPD.



Figura 4.3-Medio YEPD (Yeast Extract Peptone Dextrose)

4.2.4 Medio Chromo Agar

Este medio de cultivo cromogénico es un medio diferencial y selectivo, cuya composición es la siguiente: chromopeptona 10,2 g/L, glucosa 20,0 g/L, chromogen mix 2,0 g/L, chloramphenicol 0,5 g/L, agar 15,0 g/L. Este tipo de medio y sus variantes fue desarrollado para levaduras del género *Candida* pero ha sido utilizado para la diferenciación e identificación de otras levaduras (Giusiano y Mangiaterra, 1998; Morata et al., 2018).

Este medio al igual que el Agar Lisina fue muy útil a la hora de diferenciar las colonias de cepas no *Saccharomyces* y las de cepas *Saccharomyces*. Generalmente las cepas no *Saccharomyces* muestran un halo rojo amarronado mientras que las *Saccharomyces* se presentan como colonias más purpuras ayudando a la distinción de estos tipos de levaduras (Figura 4.4) (Morata et al., 2018).

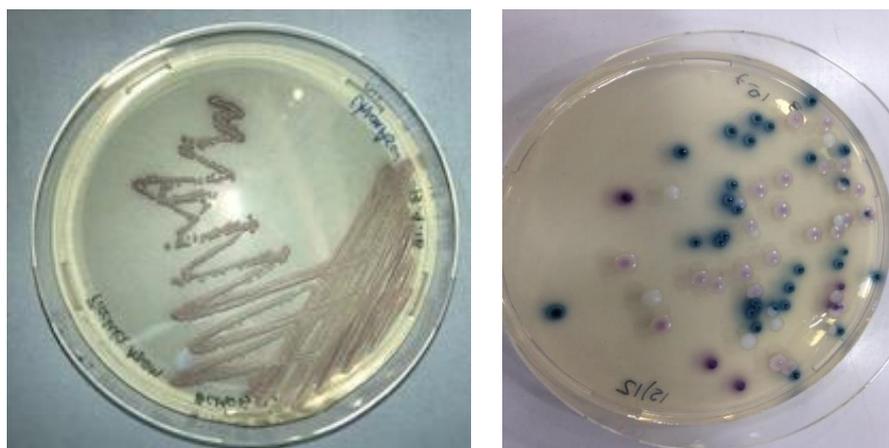


Figura 4.4-Medio Chromoagar.

4.2.5 Medio AAM (Amilase Activity Medium)

El medio AAM es un medio que permite la detección de actividad α -amilasa (Yalcin y Corbaci, 2013).

Su composición es la siguiente: 5 g/L almidón soluble; 5 g/L peptona; 5 g/L extracto de levadura; 0,5 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 g/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$; 0,01 g/L NaCl y 15 g/L agar. En la Figura 4.5 se aprecia el revelado de la placa donde se observa el control positivo para la actividad α -amilasa.

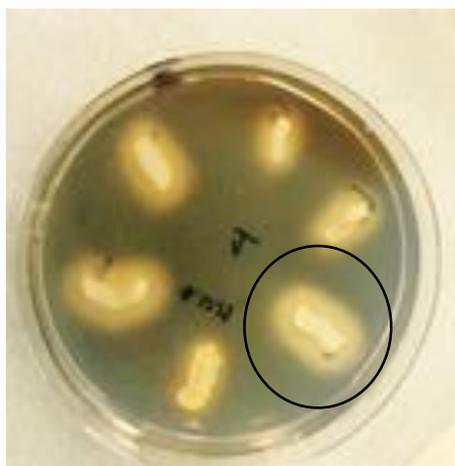


Figura 4.5-Medio AAM con el revelado realizado con lugol puro, para determinar la detección de actividad α -amilasa. (El control positivo está marcado en la figura con un círculo negro).

4.2.6 Desarrollo de un símil mosto cervecero (SMC): Proceso de diseño del SMC

La elaboración de un medio con características similares a un mosto cervecero estándar permitió partir de una materia prima constante para todos los ensayos realizados durante este trabajo de tesis. Además, permitió una rápida y fácil disponibilidad de los mostos, evitando los tiempos requeridos para la molienda de los granos de cebada, maceración, cocción y enfriado implicados en la primera parte del proceso de elaboración de la cerveza y que fue mostrado en el flujograma de la Figura 2.18.

Para la elaboración del SMC se tuvo en cuenta la composición típica de un mosto cervecero de cebada de acuerdo a Kunze, 2006.

Durante el desarrollo de este medio, se realizaron varios ajustes de nutrientes para lograr el mejor desempeño fermentativo de las cepas estudiadas, sin perder de vista la composición química de un mosto cervecero estándar. En este sentido la composición química del SMC fue la siguiente: extracto de malta 70 g/L, glucosa 30 g/L, peptona 1.5 g/L, K_2HPO_4 1.14 g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 1.23 g/L, $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ 0.44 g/L, solución de microelementos ($MnCl_2 \cdot 4H_2O$ 200 $\mu g/L$, $ZnCl_2$ 135 $\mu g/L$, $FeCl_2$ 230 $\mu g/L$, $CuCl_2$ 15 $\mu g/L$, H_3BO_3 5 $\mu g/L$, $Co(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ 30 $\mu g/L$, $NaMoO_4 \cdot 2H_2O$ 25 $\mu g/L$, KIO_3 10 $\mu g/L$) (Carrau et al. 2005) y tiamina HCL 0.5mg/L. El contenido final de nitrógeno asimilable (FAN) fue 213 mg/L, y el pH fue ajustado en 5,3, luego de la esterilización se le agregó HCl (0.1%) de tal forma de lograr el pH deseado (Kunze, 2006b).

En cuanto a la esterilización del medio, inicialmente se realizó mediante el uso de autoclave a 121°C durante 15 minutos. El medio así obtenido luego del autoclavado, tenía un precipitado que complicaba la homogenización del mismo, la operativa tecnológica de la distribución del mosto para las diferentes fermentaciones, e impedía una correcta visualización del precipitado microbiológico

dado por el crecimiento celular de las levaduras en estudio. Por esta razón se decidió la remoción del precipitado mediante una filtración posterior a la esterilización con autoclave, con papel Whatman estéril, en cámara de flujo laminar (Figura 4.6).



Figura 4.6 Filtración posterior del SMC en cámara de flujo laminar

Sin embargo esta modalidad de autoclavado y filtración posterior generó dudas en cuanto a que tipo de compuestos se podían estar perdiendo al remover ese precipitado y por esa razón se decidió modificar la modalidad de esterilización. En este sentido, la alternativa implementada fue la realización de 3 ciclos de pasteurización a 80°C, durante 5 minutos. De esta forma se redujo considerablemente la cantidad de precipitado obtenido.

4.3 Mantenimiento de levaduras

Las levaduras fueron mantenidas en medio YEPD como se mencionó anteriormente, y conservadas en un freezer a -75°C, con una solución de glicerol al 20%.

4.4 Aislamiento de levaduras

Los aislamientos realizados en esta tesis provienen de la industria cervecera, de la cual se obtuvieron diferentes muestras. Se realizaron aislamientos de cepas de levaduras a partir de: granos molidos y sin moler de cebada malta base, cebada tostada y cebada caramelizada, trigo base y trigo caramelizado. A partir de pellets de lúpulos molidos y sin moler, y finalmente a partir de muestras de distintas etapas del proceso de elaboración de la cerveza: tanque de sedimentación e inicio de la fermentación. Las diferentes muestras molidas y sin moler se dejaron en suero fisiológico (NaCl

0,9% en agua destilada) durante 20 minutos y en medio YEPM durante 48 horas. Transcurrido ese tiempo, se realizó una siembra directa de 0,1 mL en placa de Petri conteniendo medio WLN, y posterior incubación a 25° C por 48 horas (Figura 4.7).

Para confirmar si se trataba de levaduras *Saccharomyces* o no-*Saccharomyces*, se realizó una siembra en medio selectivo Agar Lisina.

La identificación genética para la diferenciación de especies se realizó mediante el análisis de secuencias del dominio variable D1/D2 en el extremo 5' del gen de la subunidad 26S del ARNr. Se consideró que en cepas de levaduras de una misma especie, las diferencias nucleotídicas en la región D1/D2 fueron $\leq 1\%$ (Kurtzman y Robnett, 1998).



Figura 4.7. Esquema de los aislamientos realizados a partir de las muestras provenientes de la industria cervecera (t, tiempo)

4.5 Screening de maltosa

Todas las cepas fueron evaluadas para conocer su capacidad fermentativa frente a maltosa, que como se mencionó en el Capítulo 3 constituye el azúcar mayoritario de la cebada.

Para esto se preparó una solución concentrada (respecto a los controles respectivos) 10 veces (solución 10 x) en tres diferentes versiones, que se determinaron según el azúcar agregado, siendo maltosa (10 x m), glucosa (10 x g) y sin el agregado de azúcar (10x n) que constituye el llamado control negativo del screening. De esta manera se evaluó la fermentación de maltosa, teniendo un

control positivo (tubos con glucosa) y un control negativo que fueron los tubos sin azúcar. La composición de los diferentes controles del screening se muestra en la Tabla 4.4.

Tabla 4.4. Composición de los diferentes controles para el screening de maltosa. Solución de maltosa (10 x m), solución glucosa control positivo (10 x g) y solución control negativo (10 x n).

COMPOSICIÓN	10 x m	10 x g	10 x n
YNB (Yeast Nitrogen Base)	0,67 g	0,67 g	0,67 g
MALTOSA	0,5 g	-	-
GLUCOSA	-	0,5 g	-
AGUA DESTILADA	10 mL	10 mL	10 mL

Las soluciones mencionadas anteriormente fueron esterilizadas mediante filtración con membrana de 0,22 micras.

Luego se procedió a la preparación de los tubos conteniendo 1 mL de la solución correspondiente (10x m, 10x g, 10x n), agua destilada esterilizada fría (9mL) y finalmente se inocularon 500 µL de una suspensión de levaduras equivalente a la escala Mc Farland 1, 3×10^6 cel/mL (para levaduras).

Como se observa en la Figura 4.8 el control maltosa (10 x m) se realizó por triplicado, el control positivo (10 x g) por duplicado y un control negativo (10 x n). Finalmente se colocaron las campanas de Durham estériles en cada uno de los tubos, los que fueron incubados en estufa a 25°C, observando su evolución a lo largo 4 semanas (Kurtzman et al., 2011a).

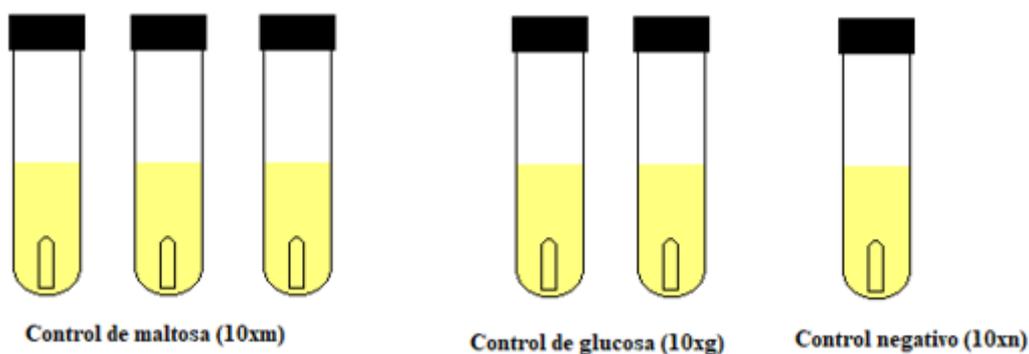


Figura 4.8- Esquema del screening de maltosa

4.6 Detección de actividad de α amilasa

La determinación de la actividad α amilasa fue realizada para aquellas cepas maltosa positivas.

El procedimiento comenzó repicando las cepas en el medio WLN, e incubando en estufa a 25°C durante 48 hs.

El control positivo fue la bacteria *Bacillus* 009/11, el cual fue suministrado por el Laboratorio de Microbiología de Facultad de Química. Este se sembró en medio AAM, con incubación a 30°C durante 48 horas. En la Figura 4.5 se muestra la disposición de cómo fueron sembradas las diferentes cepas en las placas con el medio AAM. Cabe destacar que el *Bacillus* 009/11 tiene una temperatura ideal de crecimiento de 35-37°C, pero dado que las levaduras tienen una temperatura ideal de crecimiento de entre 25-28 °C, el ensayo fue realizado a una temperatura intermedia de 30°C, de manera de contemplar los rangos de temperatura a las cuales crecen ambos tipos de microorganismos.

El diseño de la placa sembrada consistió en la realización de estrías de las cepas involucradas en el estudio incluyendo el control (Figura 4.8).

La placa fue incubada en estufa a 30° C por 48 horas. Transcurrido este tiempo se reveló la placa con solución de lugol (Figura 4.5).

Se consideraron positivas a la actividad α -amilasa a aquellas cepas que presentaron un halo amarillento.

4.7 Recuento de células vivas y muertas

El recuento microscópico directo con Cámara de Neubauer, permite determinar el número de células vivas y muertas. Para el recuento de células muertas se utilizó solución de azul metileno 1 % (azul de metileno 0.01%, citrato de sodio 2% en solución acuosa). Este colorante presenta dos coloraciones dependiendo el estado redox del medio en el cual se encuentre. Se presenta la coloración azul cuando el medio está oxidado y se presenta incoloro cuando el medio está reducido. Lo que ocurre cuando el colorante ingresa a la célula viva es reducirse por lo cual permanece incoloro mientras que cuando la célula está muerta el colorante se encuentra oxidado y se presenta la coloración azul (Fugelsang, 2007).

Estos recuentos fueron realizados al inicio y al final de la fermentación alcohólica. También se realizó recuentos en placas de WLN y controles de pureza. Los controles de pureza fueron realizados de la siguiente manera: se realizaron tomas de muestra al final de la fermentación (día 8) y se sembraron en placas WLN. Estas fueron incubadas en estufa a 25 °C por 24-48 hs. Posteriormente se observaron las colonias desarrolladas observando su morfología y evaluando si existía contaminación.

4.8 Microfermentaciones

4.8.1 Microfermentaciones Etapa I

Durante la primera parte del trabajo se realizó la evaluación de la capacidad fermentativa de todas las cepas que fueron caracterizadas como maltosa positiva. Para estas evaluaciones se realizaron microfermentaciones en duplicado, en matraces erlenmeyers de 150 mL, conteniendo 50 mL de Símil Mosto Cervecerero (SMC) diseñado para tal fin y cuya composición se vió en el Capítulo 4 (sección 4.2.6).

Los matraces erlenmeyers se taparon con válvulas de Mülller conteniendo ácido sulfúrico que actúa como agente desecante, reteniendo el agua desprendida por evaporación, permitiendo de esta manera el seguimiento de la fermentación alcohólica mediante pérdida de peso debida a la eliminación de anhídrido carbónico.

Las fermentaciones se llevaron a cabo partiendo de un cultivo overnight a 20 °C realizado en SMC, con agitación a 100 RPM durante 24 hs, para alcanzar un inóculo inicial de 1×10^6 cel/mL.

Las muestras fueron incubadas a 20°C con una agitación diaria (movimiento circular suave). El seguimiento de la capacidad fermentativa mediante pérdida de peso se expresó en gramos cada 100 mL de mosto (Carrau et al., 2008).

El recuento celular se realizó mediante cámara de Neubauer de población viable y no viable y control de pureza mediante siembra de placa en WLN (Pallmann et al., 2001).

4.8.2 Microfermentaciones Etapa II

En esta etapa se trabajó con las cepas seleccionadas en la instancia anterior.

Se realizaron fermentaciones por triplicado en erlenmeyers de 250 mL, conteniendo 150 mL de Símil Mosto Cervecerero (SMC) y tapadas con válvulas de Mülller.

Las fermentaciones se llevaron a cabo partiendo de un cultivo overnight a 20 °C en SMC, con agitación a 100 RPM durante 24 hs, para alcanzar un inóculo inicial de que en esta oportunidad fue de 1×10^6 cel/mL.

Las muestras fueron incubadas a 20°C con una agitación diaria (movimiento circular suave). Al igual que en la etapa anterior, la actividad fermentativa fue medida por la pérdida de peso expresada en gramos cada 100 mL (Carrau et al., 2008).

El recuento de células vivas y muertas se realizó mediante Cámara de Neubauer y el control de pureza mediante siembra de placa en WLN (Pallmann et al., 2001).

En esta etapa se evaluaron diferentes cultivos mixtos de cepas mediante la modalidad de inoculación secuencial, inoculando primero la cepa no-*Saccharomyces* y posteriormente a las 24 horas la cepa *Saccharomyces*. En todos los casos se realizaron controles simultáneos de pureza mediante siembra en placa en medio WLN (ver Figura 4.9). Se tomaron muestras de las fermentaciones a las 24hs, 48 hs y al final de la fermentación (día 8); se realizaron siembras en placa en WLN con las muestras indicadas y se incubaron en estufa a 25°C por 24-48 hs. Se observó posteriormente la pureza de las distintas muestras observando la morfología de las colonias que crecían en la placa.

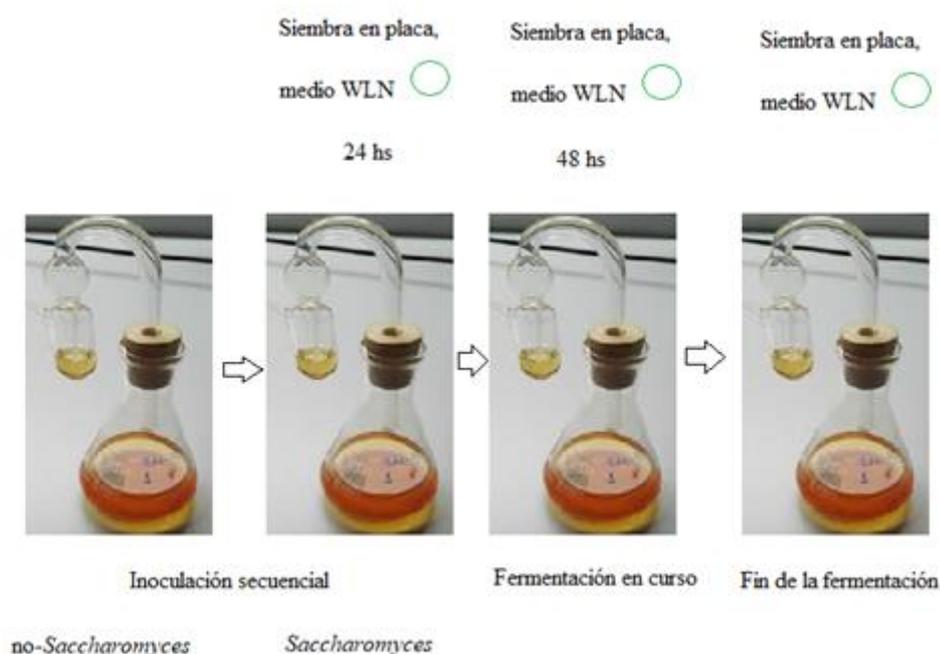


Figura 4.9- Esquema de la realización de las microfermentaciones de la etapa II con cultivos mixtos

4.9 Análisis sensorial

Una vez finalizada la fermentación alcohólica se realizó una evaluación sensorial de aromas con un panel interno de técnicos y consumidores del laboratorio de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones.

Para esto se dispensaron 30 mL de cada una de las muestras, que fueron previamente filtradas de forma estéril, con filtro de 0,2 micras), en “tulip-shaped glasses” (ISO 3591,1977) de 250 ml, a 16 ± 1 °C, y fueron identificadas con código de tres dígitos al azar.

Se solicitó a los panelistas mencionar los descriptores aromáticos que pudieron percibir en las distintas muestras.

El análisis sensorial fue realizado para todas las cepas estudiadas que dieron positivo a la fermentación de maltosa.

Luego de realizar estas evaluaciones se procesó la información obtenida por parte de los evaluadores con el fin de descartar aquellas muestras que presentaron defectos sensoriales.

4.10 Determinaciones analíticas realizadas a los mostos y a las cervezas obtenidas

4.10.1 Densimetría

Para poder estimar el contenido inicial de carbohidratos presentes en los mostos se realizó la determinación inicial de densidad, y a su vez esta medida se realizó diariamente para evaluar el transcurso de la fermentación. Por intermedio de un densímetro se obtuvo la lectura, se midió la temperatura y por medio de una tabla de corrección de la densidad real del mosto se pudo obtener los valores de alcohol potencial y contenido de azúcar (g/L) (Barth, 2013).

4.10.2 Determinación de pH

Para estas determinaciones se utilizó un pH-metro Laboratory micro –processor pH meter Hanna HI 8521, siguiendo la técnica oficial de la American Society of Brewing Chemists (ASBC) Beer-9 Hydrogen Ion Concentration (Technical Committee, 2011a). Estas determinaciones fueron realizadas para la preparación del símil mosto cervecero, para el mosto y para la cerveza terminada.

4.10.3 Determinación de grados Brix

Mediante la utilización de un Refractómetro se determinaron los grados Brix del mosto y de las cervezas producidas por las cepas seleccionadas (Barth, 2013).

4.10.4 Determinación de alcohol

Las determinaciones de alcohol se realizaron mediante la técnica recomendada por ASBC método para la determinación de alcohol en cerveza Beer-4, A- Beer and Distillate Measured Volumetrically (Technical Committee, 2011b).

4.10.5 Determinación de nitrógeno asimilable

La determinación de nitrógeno asimilable fue realizada para todos los mostos utilizados. Esta determinación fue realizada según el método de Sorensen (Spencer et al., 2003; Muñoz y Tobeña, 2009).

4.10.6 Determinación de acidez total

Se realizó mediante la técnica recomendada de ASBC método para la determinación de la acidez total Beer 8 Total Acidity A-Potentiometric Titration (Technical Committee, 2011c). Las determinaciones de acidez total se realizaron para todas las cervezas obtenidas.

4.10.7 Determinación de acidez volátil

Se realizaron mediante la técnica recomendada para la determinación de acidez volátil para vinos (Compendium et al., 2019). Las determinaciones de acidez volátil se realizaron para todas las cervezas obtenidas.

4.10.8 Determinación de azúcares reductores

Al finalizar la fermentación alcohólica se realizó la determinación de los azúcares reductores presentes en las cervezas elaboradas, utilizando el Método de Hagedorn-Jensen (Compendium et al., 2019).

4.11 Determinaciones analíticas realizadas durante y después de las fermentaciones a escala laboratorio y a escala semi-piloto

4.11.1 Compuestos aromáticos volátiles

Con aquellas cepas que fueron seleccionadas en la etapa II, se realizó mediante cromatografía gaseosa acoplada a espectrofotometría de masa (GC-MS), una extracción aromática de compuestos y una subsecuente elución y separación con una columna Isolute (IST Ltd., Mid Glamorgan, U.K.) ENV + Cartucho ENV + empaquetado con 1 g de polímero de alto contenido reticulado, estireno-divinilbenceno (SDVB). La preparación de la muestra y el análisis GC fue descrito previamente (Boido et al., 2003; Medina, 2014). Los compuestos aromáticos de la cerveza fueron identificados con los índices de retención lineal y con estándares o datos reportados en la literatura. Las comparaciones fueron hechas también con patrones de fragmentación-MS obtenidos con información previa. Los cromatogramas obtenidos fueron analizados mediante el programa LabSolutions GCMS solution. Los métodos GC-FID y GC-MS fueron usados con un patrón interno (1-heptanol, 2-octanol) para propósitos cuantitativos (Boido et al., 2003 ; Medina, 2014).

4.11.2 Extracción de compuestos aromáticos volátiles en las microfermentaciones

El mecanismo de retención de los distintos compuestos volátiles se encuentran mediado por la acción de las Fuerzas Van der Waals, puentes de hidrogeno y formación de dipolos mediante interacciones hidrofóbicas entre la molécula retenida y la superficie de la resina. Durante el proceso de elución, el solvente interrumpe estas interacciones hidrofóbicas con la superficie y permite la elución del analito Figuras 4.10, 4.11 y 4.12. la extracción de los compuestos volátiles utilizando cartuchos tipo ISOLUTE® ENV+ según el método puesto apunto por Carlin (1998) permite fraccionar los aromas libres y glicosilados o ligados (Boido et al., 2003; Medina, 2014).

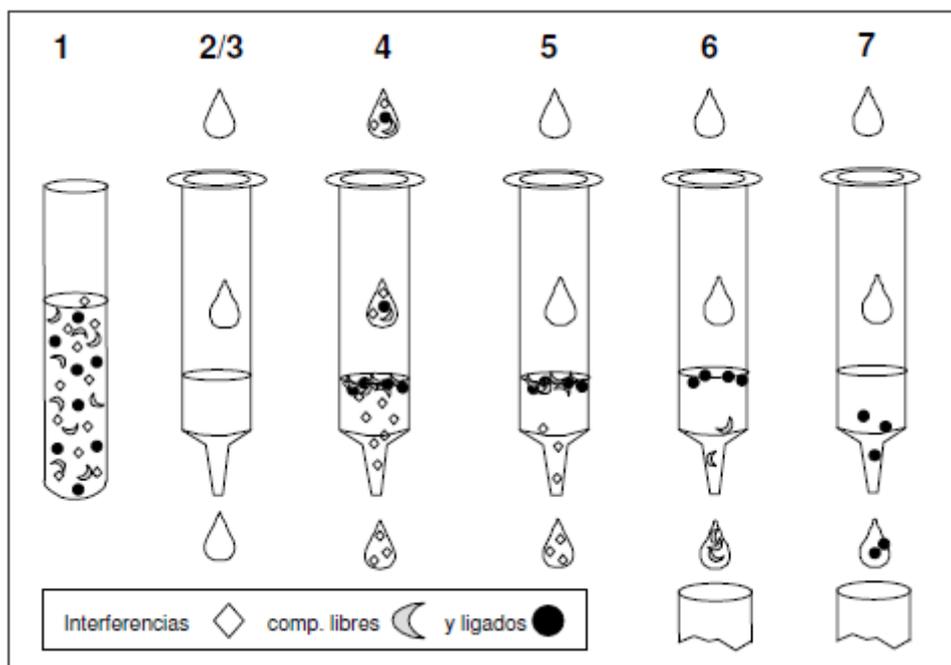


Figura 4.10 -Esquema del procedimiento de retención y elución de los distintos compuestos aromáticos de la muestra para el caso del cartucho ISOLUTE® ENV+ (Boido et al., 2003).

1-Pretratamiento de la muestra. Las muestras fueron previamente filtradas de manera estéril con filtro de 0,2 micras. En el caso de la cerveza (al igual que en el vino) no es necesario, se utiliza la muestra diluida al medio.

2/3-La fase ENV+ puede ser usada para el vino sin realizar la etapa de solvatación y equilibrio, sin embargo es recomendable realizar un lavado de la fase con solventes miscibles en agua como metanol, con lo cual se logra la eliminación de interferencias, debiendo realizar un posterior lavado con agua.

4-Pasaje de la muestra, 4.5 mL/min.

5-Elución de interferencias con agua.

6-Elución de los compuestos volátiles libres con diclorometano, recuperándose para su análisis.

7-Elución de los compuestos glicosilados con metanol, recuperándose para su análisis.

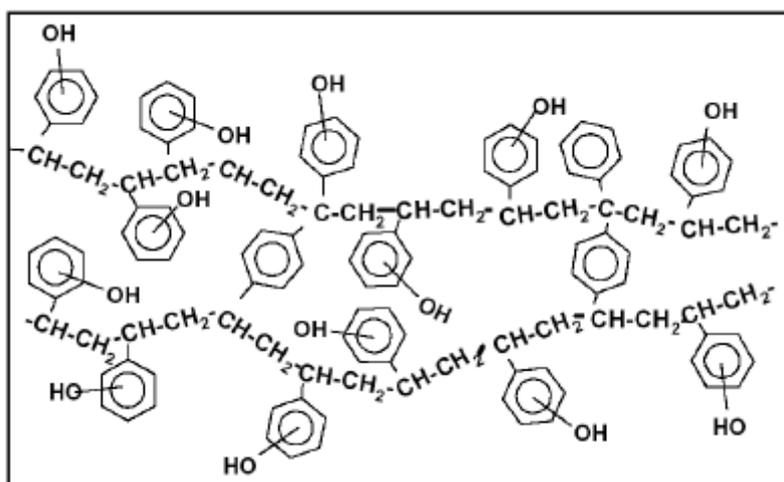


Figura 4.11 Estructura de la fase utilizada en el cartucho ISOLUTE® ENV+ formado por una estructura básica de poliestireno derivatizado (Boido et al., 2003).

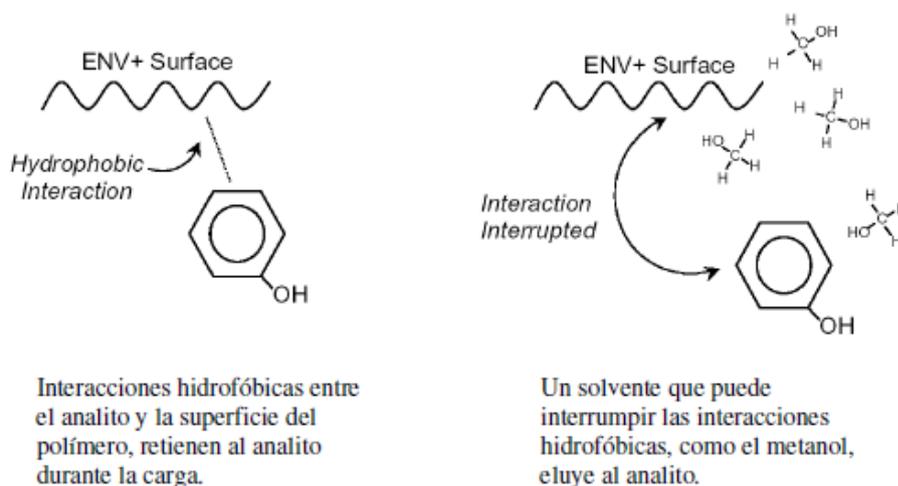


Figura 4.12 .Esquema de los mecanismos de retención y elución en el cartucho ISOLUTE® ENV+. Adaptado de international sorbent Technology (2001) por (Boido et al., 2003).

Se fraccionaron los aromas libres y ligados de 50 mL de cerveza, diluidos a 100 mL y adicionando un estándar interno constituido por n-heptanol 3,4 μL y 3,4 μL de octanol en 10 mL de muestra. Previo al pasaje de muestra por el cartucho se realizó la preparación del cartucho eluyendo 15mL de metanol, y a continuación 20 mL de agua.

La fracción libre de cada una de las muestras se eluyó con 30 ml de diclorometano, adaptando un sistema de presión controlada utilizando un manifold y una bomba de vacío, para tener un flujo de 4-5 L/min. Se recolectó el solvente orgánico que contenía la fracción libre este se seca con Na_2SO_4 , se concentra hasta aproximadamente 0.5 mL en corriente de N_2 . Para la extracción de los compuestos libre o glicosilados se eluyen 30 mL de metanol. Se recogió el solvente eluido y se secó con Na_2SO_4 , luego se llevó a sequedad en el rotavapor. El residuo se procesó con 3 mL de buffer citrato (pH 5) y

se adicionó con una gota de enzima Rapidase (poligalaturonasa y beta- glicosidasa). Se dejó reaccionar por 14 horas a 40°C, se agregó 0,1 mL de estándar interno (n-heptanol y n-octanol) y se extrajo con 3 volúmenes de 2 mL de pentano-diclorometano 2:1 v/v, centrifugando cada vez para facilitar la separación de las fases. El extracto se anhidrificó y se concentró con corriente de N₂ hasta 0,5 mL esto se realizó antes de realizar el análisis cromatográfico. Se utilizaron los mismos cartuchos para la extracción de los compuestos libres y ligados de todas las muestras procesadas.

4.11.3 Identificación de los compuestos aromáticos

La identificación se realizó mediante GC-MS Cromatógrafo de gases Shimadzu GC 2010 Plus acoplado a un espectrómetro de masa Shimadzu QP 2020. Las condiciones de trabajo fueron; columna capilar de sílica fundida (30 m x 0.25 mm d.i.), fase estacionaria DB-WAX (film de 0,25 um de espesor) (Agilent J&W GC Columns); programa de temperatura 40°C (6 min), 40-180 °C a 3°C/min, 180-220 °C a 10 °C/min, 220°C (20 min); temperatura del inyector, 250 °C; modo de inyección Split, relación de Split 1:40, volumen de inyección, 1.0 µL. Gas portador He, 92,6 kPa (55.9 cm/seg); temperatura de interface 250 °C; rango de masas 40-40 uma.

La identificación de los diferentes compuestos se realizó utilizando bibliotecas de referencia. Las bibliotecas de compuestos empleadas para realizar dicha identificación fueron: Adams, 2007; McLafferty & Stauffer, 1991; NIST08, versión 2.0, National Institute of Standards and Technology, Gaithersburg, MD, USA, FFNSC MS library. La identificación de los compuestos se confirmó por medio de la determinación de índices de retención de Kovats para los diferentes compuestos.

4.11.4 Análisis estadístico

Análisis de varianza (ANOVA) fue desarrollado para determinar si existía diferencia significativa para las distintas cepas inoculadas en cuanto a su capacidad fermentativa y su producción de aromas. El software estadístico 7.1 fue usado para este análisis. En particular para los compuestos aromáticos volátiles se evaluó la diferencia significativa entre las distintas cepas, para la producción de grupos de compuestos significativos en las microfermentaciones y para la producción de compuestos aromáticos característicos de la cerveza.

También se realizó un análisis multivariado de componentes principales (PCA) para discriminar entre aquellas variables (compuestos volátiles y descriptores sensoriales), que permitieron diferenciar a las cepas estudiadas.

4.12 Elaboración a escala semi-piloto

La elaboración a escala semi-piloto fue realizada en una cervecería artesanal. La idea en esta etapa fue probar las levaduras elegidas en la producción de una cerveza. Se prepararon los inóculos de las levaduras: *Pichia anomala* BCMO15_2 y *Zygoascus meyeri* T12_135F. Estas levaduras se utilizaron en cultivos mixtos con una cepa *Saccharomyces cerevisiae* comercial presente en la cervecería. Se trasladaron los inóculos de manera estéril a la cervecería y la manipulación y elaboración fue a cargo del maestro cervecero en base al estilo seleccionado para la elaboración y en base a su experiencia y técnicas utilizadas por la cervecería. Para ampliar más de esto dirigirse a la sección 5.8.12

RESUMEN. En la Figura 4.13 se representa de manera resumida la secuencia de las distintas actividades desarrolladas durante el transcurso del trabajo de tesis.



Evaluación de la capacidad para fermentar maltosa. Con las cepas maltosa positiva se realizó un screening de la actividad α -amilasa.



Se partió de un total de 47 cepas aisladas de la industria cervecera y vitivinícola.



Microfermentaciones con las cepas seleccionadas en la etapa anterior. Se realizaron cultivos puros y mixtos, donde se evaluó la capacidad fermentativa, evaluación sensorial, e identificación y cuantificación de compuestos volátiles deseados.

Con las cepas seleccionadas en la etapa anterior, en cultivo mixto entre las *S.cerevisiae* y las no-Sac, se elaboraron cervezas a escala semipiloto.

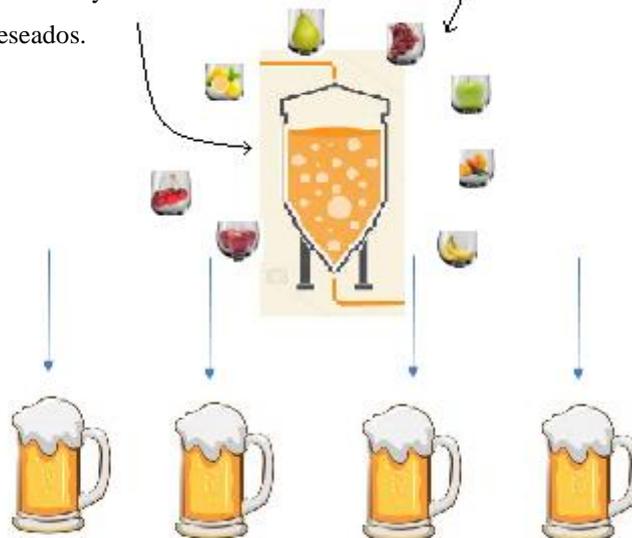


Figura 4.13-Representación de las principales etapas del trabajo de tesis.

CAPÍTULO 5

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Levaduras nativas. Aislamientos y colección

Como se mencionó anteriormente en Materiales y Métodos, en este trabajo de tesis se utilizaron un total de 47 cepas de levaduras nativas de las cuales 17 eran *Saccharomyces*, 30 no-*Saccharomyces*; siendo 35 de estas levaduras provenientes de la industria enológica y las 12 restantes de la industria cervecera, estas cepas fueron aisladas en el presente trabajo de tesis.

A continuación se desglosan las cepas y su correspondiente identificación y codificación: *Saccharomyces cerevisiae* (KUI, 882, T11/137F, T11/145F, T11/146F, PV 11/154F, CHV 11/172F, A 11/181F, 00/12, 00/13, 00/15, 00/17, 00/30, 00/35, BM15_2, BS15_3, BL15_5), *Pichia anomala* (BCMO15_2), *Zygoascus meyeri* (T12_135F, T12_129F), *Candida azyma* (M12_04G), *Kluyveromyces marxianus* (T12_171G), *Candida californica* (C12_207, C12-207'G), *Candida silvae* (BT15_4), *Candida akabanensis* (BM15_1), *Schizosaccharomyces pombe* (s/cod.), *Wickerhamomyces anomalus* (Ang 5, BCMO15_1), *Aureobasidium proteae* (T13EN_19, T13EN_17, T13EN_01, T13EN_07, T13EN_23, T13EN_11), *Aureobasidium pullulans* (T13EN_09, T13EN_08, T13EN_12, T13EN_24, T13EN_15), *Meyerozyma guilliermondii* (Ang 3, Ang 6), *Dekkera* (1653, 1791) y *Brettanomyces* sp. (24/04A, 24/04B, 24/04 C).

En la Tabla 5.1 se presentan los datos correspondientes a las diferentes materias primas de las cuales fueron aisladas cada una de las levaduras que formaron parte del estudio.

Tabla 5.1 Lugar de procedencia de cada una de las diferentes cepas (FA, fermentación alcohólica).

CEPAS	CÓDIGO	ORIGEN
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KUI	Uvas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	882	Inicio de FA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/137F	Inicio de FA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/145F	Inicio de FA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/146F	Inicio de FA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PV 11/154F	Inicio de FA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CHV 11/172F	Inicio de FA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A 11/181F	Inicio de FA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/17	Uvas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/13	Uvas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/35	Uvas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/30	Uvas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/15	Uvas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/12	Uvas
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BM15_2	Granos de cebada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BS15_3	Fondos de pileta FA
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BL15_5	Lúpulo
<i>Pichia anomala</i>	BCMO15_2	Granos de cebada caramelizada
<i>Zygoascus meyeræ</i>	T12_129F	Inicio de FA
<i>Zygoascus meyeræ</i>	T12_135F	Inicio de FA
<i>Candida azyma</i>	M12_04G	Uvas
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	T12_171G	Uvas
<i>Candida californica</i>	C12_207	Uvas
<i>Candida californica</i>	C12_207G	Uvas
<i>Candida silvae</i>	BT15_4	Granos de trigo
<i>Candida akabanensis</i>	BM15_1	Granos de cebada
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	S/código	Granos de trigo caramelizado
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Ang 5	Granos de cebada
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	BCMO15_1	Granos de cebada
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_01	Uvas
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_07	Uvas
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_11	Uvas
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_17	Uvas
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_19	Uvas
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_23	Uvas
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_08	Uvas
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_09	Uvas
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_12	Uvas
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_15	Uvas
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_24	Uvas
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ang 3	Uvas
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ang 6	Uvas
<i>Dekkera</i>	1653	Granos de trigo
<i>Dekkera</i>	1791	Granos de trigo
<i>Brettanomyces</i> sp.	24/04A	Uvas
<i>Brettanomyces</i> sp.	24/04B	Uvas
<i>Brettanomyces</i> sp.	24/04C	Granos de cebada

5.2 Capacidad fermentativa frente a la maltosa

Se obtuvieron un total de 26 cepas con fermentación de maltosa positiva (Tabla 5.2) y 21 cepas que no fermentan maltosa (Tabla 5.3). Dentro de las cepas con capacidad de fermentar maltosa, 17 cepas fueron *Saccharomyces cerevisiae*, y 9 no-*Saccharomyces*. Los resultados obtenidos en relación a la fermentación de la maltosa coincidieron con los reportados por Kurtzman et al. (2011).

Tabla 5.2 Cepas con fermentación de maltosa positiva. Las cepas que tienen *, fueron aisladas en el presente trabajo de tesis.

CEPA	CÓDIGO
<i>Zygoascus meyeriae</i>	T12_135F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KUI
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	882
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/137F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/145F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/146F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PV 11/154F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CHV 11/172F
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A 11/181F
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	S/código
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/17
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/13
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/30
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/15
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/12
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Ang 5
<i>Dekkera</i>	1791
<i>Brettanomyces</i>	24/04A
<i>Brettanomyces</i>	24/04B
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BM15_2
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BS15_3
* <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BL15_5
* <i>Wickerhamomyces anomalus</i>	BCMO15_1(MY5)
* <i>Pichia anomala</i>	BCMO15_2(MYB)
* <i>Candida akabanensis</i>	BM15_1

Tabla 5.3 Cepas con fermentación de maltosa negativa

CEPA	CÓDIGO
<i>Candida azyma</i>	M12_04'G
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	T12_171G
<i>Candida californica</i>	C12_207G
<i>Candida californica</i>	C12-207'G
<i>Zygoascus meyeræ</i>	T12_129F
<i>Dekkera anomala</i>	1653
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ang 3
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Ang 6
<i>Brettanomyces</i>	24/04 C
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_19
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_17
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_01
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_07
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_23
<i>Aureobasidium proteae</i>	T13EN_11
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_09
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_08
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_12
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_24
<i>Aureobasidium pullulans</i>	T13EN_15
<i>Candida silvæ</i>	BT15_4

5.3 Evaluación de actividad alfa amilasa

Como se mencionó en Materiales y Métodos, para aquellas levaduras aisladas que dieron maltosa positiva se evaluó la actividad α -amilasa. Ninguna de las cepas evaluadas dio actividad α -amilasa positiva.

5.4 Análisis sensorial preliminar para descarte de cepas productoras de defectos aromáticos

A partir de las 26 cepas maltosa positivas obtenidas en el screening anterior (parte de las microfermentaciones etapa 1), se realizó un análisis sensorial preliminar, que permitió descartar aquellas cepas que, a pesar de tener capacidad de fermentar maltosa, presentaban defectos sensoriales notorios que imposibilitaron su utilización posterior como cepas seleccionadas para la elaboración de cerveza.

Este análisis “rápido” realizado luego de finalizada la fermentación alcohólica en el medio SMC, mostró una preferencia sensorial del panel para tres cepas nativas de *Saccharomyces cerevisiae* (Sc 00/30, Sc 00/35, Sc 882) y cuatro cepas no-*Saccharomyces* *Candida akabanensis* (BM15_1), *Pichia anomala* (BCMO15_2), *Wickerhamomyces anomalus* (BCMO15_1) y *Zygoascus meyeræ* (T12_135F).

Estas cepas fueron caracterizadas según su dinámica de fermentación y crecimiento microbiano.

5.5 Evaluación sensorial de las cepas con fermentación de maltosa positiva.

La evaluación sensorial de las cepas que dieron positivo a la fermentación de maltosa, fue realizada según se indicó previamente en el capítulo 4.

Con los descriptores aromáticos obtenidos de cada panelista interno, se realizó un resumen de las características aromáticas con mayor frecuencia de mención para cada cepa (Tabla 5.4 y Tabla 5.5).

Tabla 5.4 Descriptores aromáticos de las cepas no *Saccharomyces* maltosa positiva.

CEPA	CÓDIGO	DESCRIPTORES AROMÁTICOS
<i>Zygoascus meyeriae</i>	T12_135F	Malta, cebada, miel, frutal, compota manzana y pera, rico agradable, reducido y un poco de caucho
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	S/código	Malta, rico, suave, agradable, chato
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Ang 5	Herbáceo y floral, algo acético, solvente, pera, compota manzana, almibar
<i>Dekkera spp</i>	1791	Fruta pasada, establo, olora a pata, poco agradable, no muy rico
<i>Brettanomyces</i>	24/04A	Malta, algo de queso, frutal, fenólico, agrio intenso, rancio, lácteo
<i>Brettanomyces</i>	24/04B	Pata, rancio, queso, agrio, fenólico, acético
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	BCMO15_1	Acetato etilo, acetona, vinagre
<i>Pichia anomala</i>	BCMO15_2	Malta, frutal, clavo olor/dentista, algo acetato, acetona leve
<i>Candida akabananensis</i>	BM15_1	Malta, rico, suave, agradable, chato

Tabla 5.5 Descriptores aromáticos de las cepas *Saccharomyces* maltosa positiva.

CEPA	CÓDIGO	DESCRIPTORES AROMÁTICOS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	KUI	Frutal, clavo de olor, rico, cerveza, malta, pasto, ahumado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	882	Frutal, reducido, punta sulfídrico, goma
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/137F	Frutal, manzana, algo acético, agradable, rico, fresco, pasto seco, herbáceo, algo a acetato etilo, algo a goma
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/145F	Rico, suave, agradable, fresco, frutado, acético, algo a goma, malta
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	T11/146F	Aldehído, sulfídrico, fruta, flor, miel, rico, buena intensidad
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	PV 11/154F	Fresco, frutal, manzana, banana, algo a acético, acetato, solvente, acetaldéhidico, dentista, goma, algo oxidado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CHV 11/172F	Manzana madura/cocida, fruta madura, rico, agradable, malta, cerveza, remedio, dentista, pasto, herbáceo, fresco, especiado
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	A 11/181F	Punta de reducción, pesado, lácteo, queso, goma, suve se limpia, no muy rico, ciruelas, peras
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/12	Frutado, fenólico, dulce, agradable, herbáceo, floral, pasto cortado, pimienta verde
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/13	Manzana verde y cocida, pasto seco, frutado, acético, dulce, olor a cerveza, agradable
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/15	Malta, rico, suave, agradable, chato
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/17	Grano fermentado, algo acético, reducción SH ₂ , frutal, mineral, hierro, algo alcohólico
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/30	Clavo de olor, malta, cebada, frutado, fenólico, suave, fresco, herbáceo, dulce, nota tostada, cebada
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	00/35	Caramelo, frutal, malta, cebada, miel, lúpulo, floral, rico, cerveza, agradable
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BM15_2	Malta, rico, suave, agradable, chato
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BS15_3	Malta, cebada, cereza, ciruela, fruta fresca, vegetal, muy rico
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	BL15_5	Malta, caramelo, miel, levadura, suave, agradable

Para realizar la selección de cepas para continuar con el trabajo de tesis, se seleccionaron aquellas que tenían características aromáticas más interesantes (descriptores más buscados en distintos estilos de cervezas) y los mejores resultados de capacidad fermentativa (Figuras 5.3, 5.4 y 5.5).

En la Figura 5.1 se muestra un resumen de los descriptores más relevantes que caracterizaron a las cepas seleccionadas.

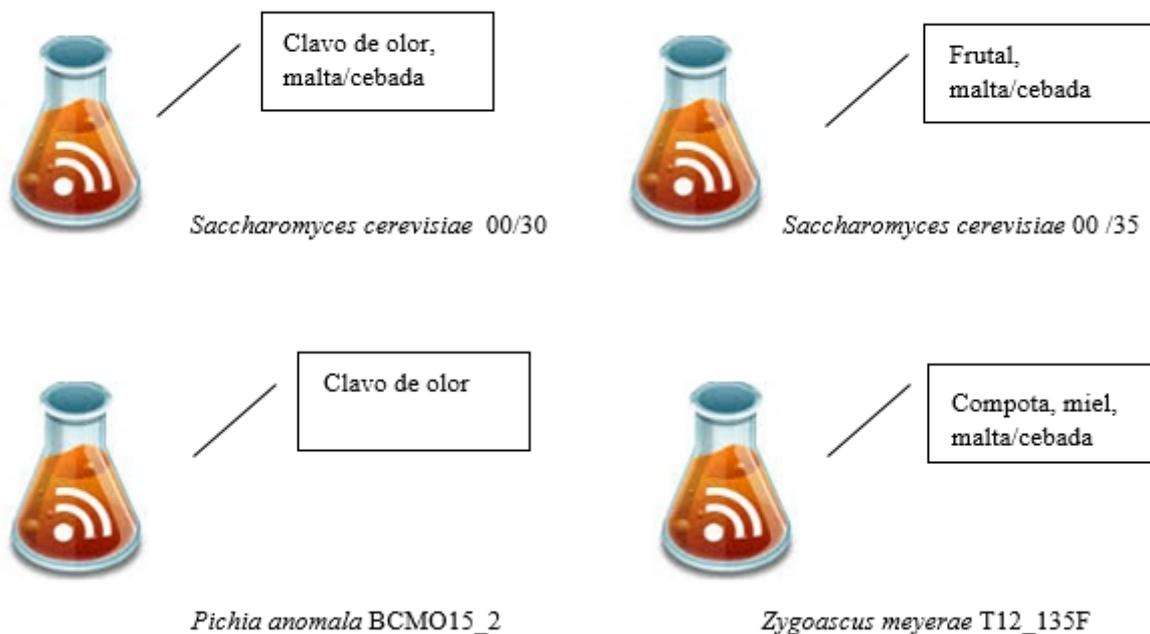


Figura 5.1- Descriptores con mayor frecuencia de mención para las 4 cepas nativas seleccionadas

5.6 Microfermentaciones Etapa I

Para la evaluación de las distintas cepas con fermentación de maltosa positiva se realizaron un total de tres secuencias de microfermentaciones.

Debido al gran número de cepas, fue imposible por razones de disponibilidad de materiales, espacio físico y capacidad de procesamiento de los datos realizar las microfermentaciones con todas las cepas a la vez para garantizar las mismas condiciones.

En las Figuras 5.2, 5.3 y 5.4 se muestran las diferentes gráficas de la capacidad fermentativa mediante pérdida de peso, expresado en gramos de CO₂ liberado cada 100 mL de mosto. En las tres secuencias de microfermentaciones, se incluyó la cepa cervecera comercial de referencia (S-33).

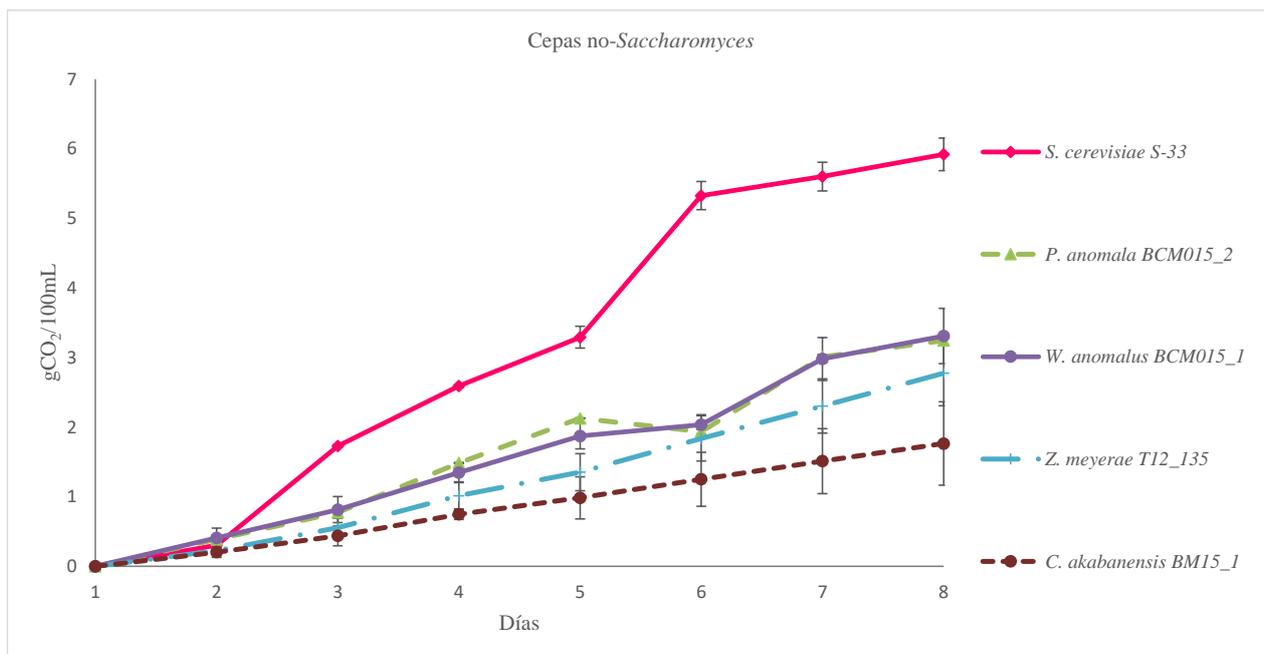


Figura 5.2- Evaluación de la capacidad fermentativa de las cepas nativas no-Saccharomyces seleccionadas con fermentación maltosa positiva.

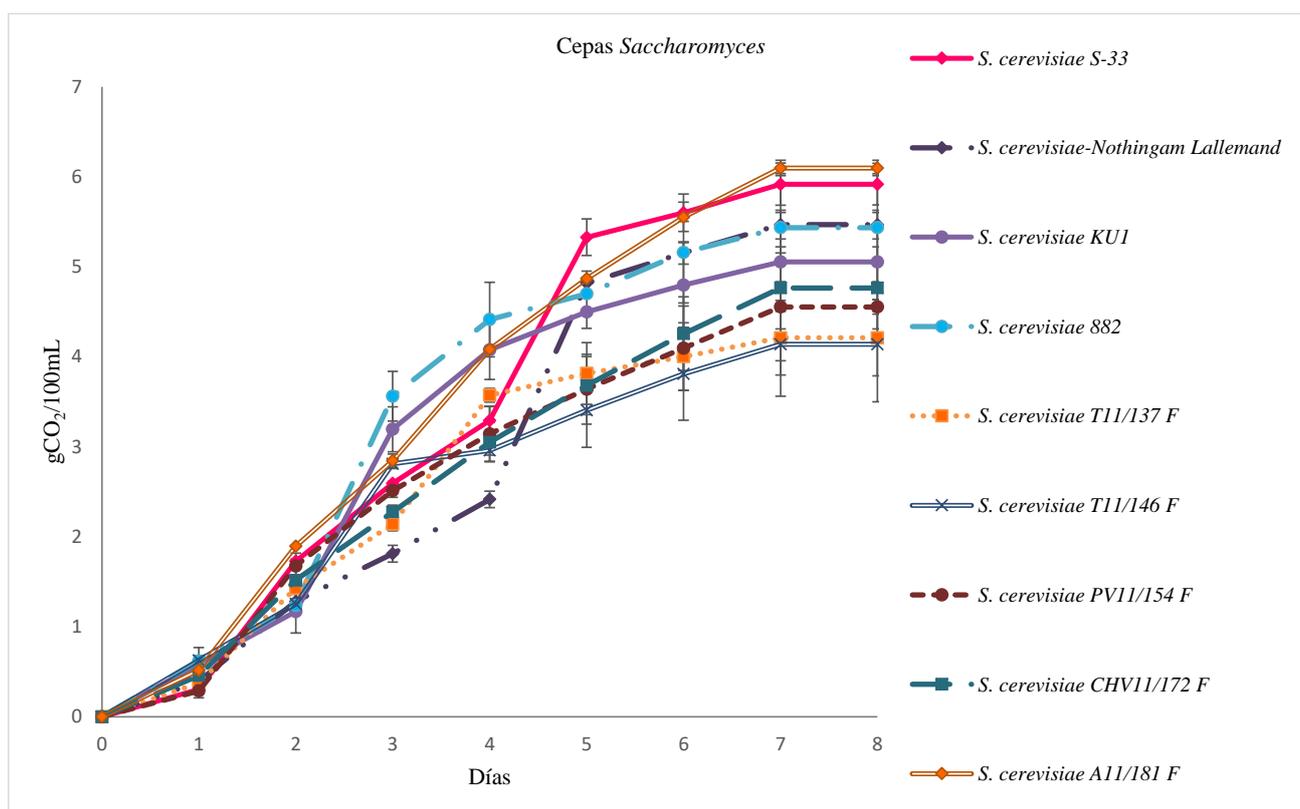


Figura 5.3- Evaluación de la capacidad fermentativa de las cepas nativas con fermentación de maltosa positiva (grupo 1), pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

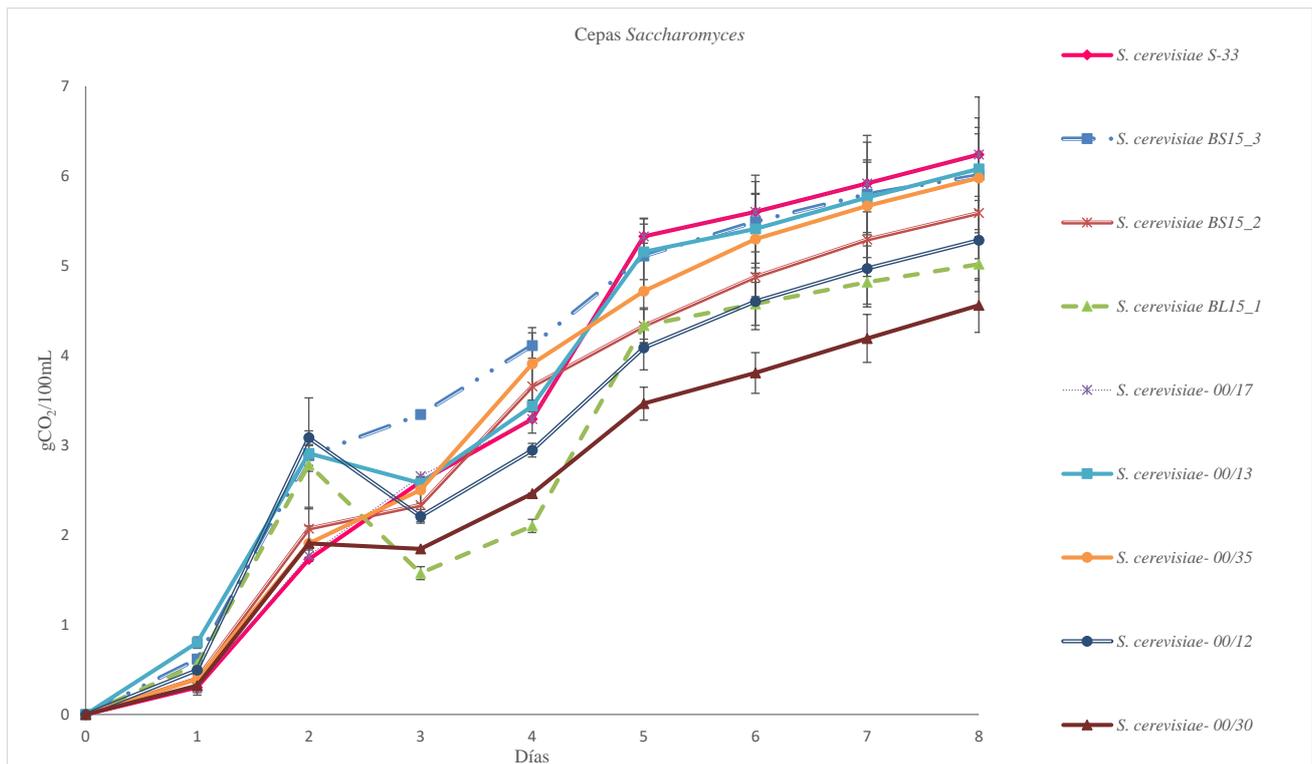


Figura 5.4- Evaluación de la capacidad fermentativa de las cepas nativas con fermentación maltosa positiva (grupo 2), pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*.

Como era de esperar se observó que todas las cepas *Saccharomyces cerevisiae* tuvieron curvas de fermentación con valores por encima de las cepas no-*Saccharomyces*.

Los valores de las cepas *S. cerevisiae* en general se encontraron dentro de los rangos de 4 a 6 g CO₂/100mL en el día 8 de fermentación. En particular cabe destacar que en la figura 5.5 la cepa *S. cerevisiae* 00/35 tiene un comportamiento bastante similar a la cepa comercial.

En general las cepas no *Saccharomyces* presentaron valores de capacidad fermentativa bastante menores a las *Saccharomyces*, con valores que se encontraron dentro de los rangos de 1 a 3 g CO₂/100 mL en el día 8 de fermentación.

5.7 Microfermentaciones Etapa II

La selección de cepas para pasar a la siguiente etapa del trabajo se realizó en base a los resultados de capacidad fermentativa y un nuevo screening de evaluación sensorial realizado con el panel interno de técnicos y consumidores del laboratorio de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones para descarte de cepas defectuosas desde el punto de vista aromático.

A su vez para algunas de estas cepas se contaba con información adicional previa de trabajos realizados en el Área de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones que fueron útiles para

ayudar a definir con cuales cepas nativas *S. cerevisiae* se continuaría el trabajo. En este sentido y de acuerdo a lo reportado por Pérez et al., 2011, se seleccionaron las cepas nativas *Saccharomyces cerevisiae* 00/30 y *Saccharomyces cerevisiae* 00/35 por su alta actividad β -glicosidasa. Esta enzima contribuye a la liberación de compuesto aromáticos glicosilados (también llamados precursores de aromas).

Las cepas no-*Saccharomyces* seleccionadas fueron *Pichia anomala* BCMO15_2 y *Zygoascus meyeri* T12_135F.

Las cepas seleccionadas *Saccharomyces cerevisiae* y no-*Saccharomyces* se visualizan en las Figuras 5.8 y 5.9.

Las cepas *Candida akabanensis* y *Wickerhamomyces anomalus* no fueron incluidas en esta siguiente etapa, debido a la reducida capacidad fermentativa de *Candida akabanensis* BM15_1 (1 g CO₂/100 mL al día 8 de fermentación) y a los descriptores aromáticos no deseados que fueron mencionados para *Wickerhamomyces anomalus* BCMO15_1 y que prevalecieron en esta etapa, determinando de esta forma la exclusión de esta cepa también para etapas posteriores.

A continuación en la Figura 5.5 se presentan los datos de capacidad fermentativa para este nuevo ensayo de microfermentación.

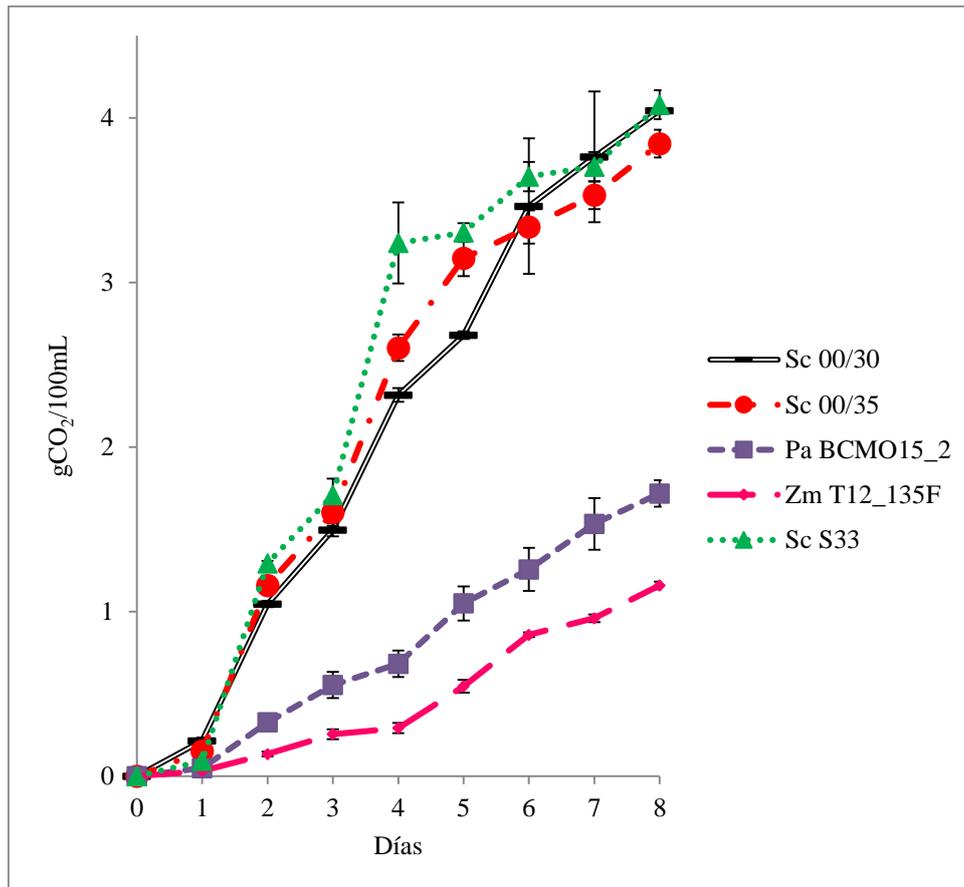


Figura 5.5- Evolución de la capacidad fermentativa de las cepas seleccionadas.

Los mejores perfiles de fermentación correspondieron a *Saccharomyces cerevisiae*, con comportamientos similares para las tres cepas (Figuras 5.4, 5.5 y 5.6).

Pichia anomala BCMO15_2 y *Zygoascus meyeri* T12_135F presentaron valores muy bajos de capacidad fermentativa. En este sentido los resultados obtenidos para *Pichia anomala* (BCMO15_2) coinciden con los reportados previamente por Saninno, 2019 y Basso et al., 2016, quienes reportaron una baja tolerancia al etanol y fue sugerida como una cepa prometedora para la producción de cervezas reducidas en alcohol.

En cuanto al crecimiento celular, se observa en la Figura 5.6, mayores niveles de población celular para las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, destacándose la cepa comercial S 33 con una población celular de 5×10^7 cel/mL, seguida por las cepas Sc 00/35 y Sc 00/30.

Dentro de las no-*Saccharomyces*, *Zygoascus meyeri* T12_135F presentó una población celular mayor, siendo de $3,5 \times 10^7$ cel/mL, mientras que *Pichia anomala* BCMO15_2 presentó una población celular de $1,75 \times 10^7$ cel/mL.

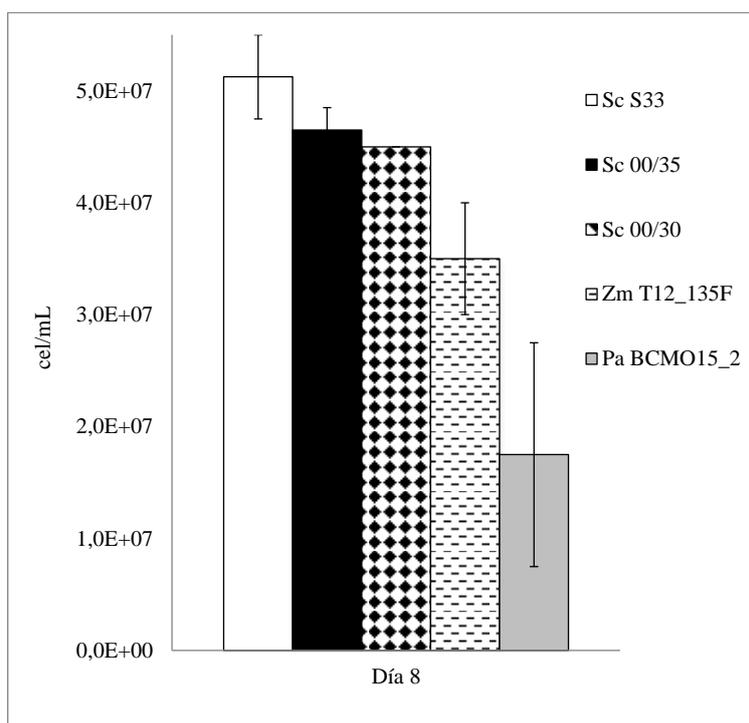


Figura 5.6 – Crecimiento celular de las cepas seleccionadas en SMC a 20 °C.

En las Figuras 5.7, 5.8 y 5.9 se muestra la morfología en el medio de cultivo WLN de las cepas seleccionadas. En la Tabla 5.6 se indica la morfología de cada una.



Figura 5.7 – Izquierda: *Pichia anomala* (BCMO15_2); derecha: *Zygoascus meyeriae* (T12_135F)

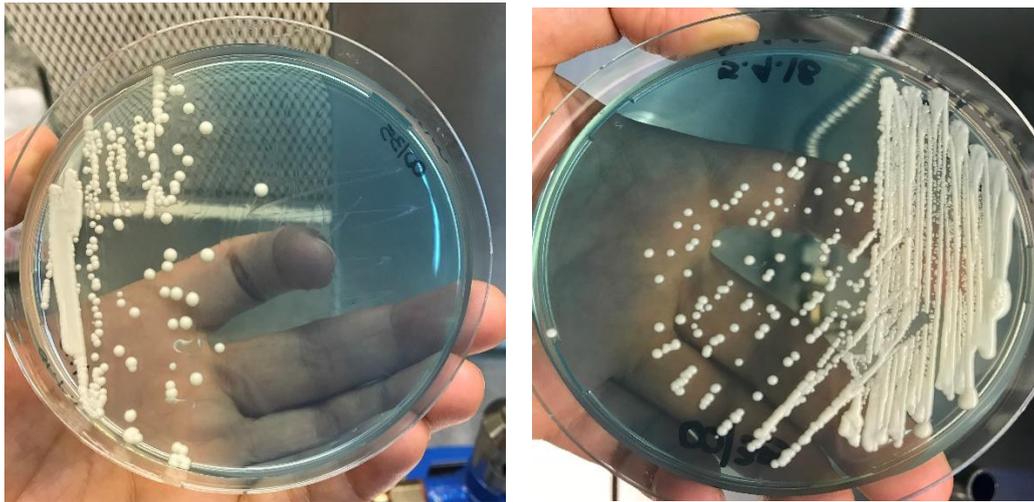


Figura 5.8 – Izquierda: *Saccharomyces cerevisiae* 00/35; derecha: *Saccharomyces cerevisiae* 00/30



Figura 5.9 – Izquierda: *Saccharomyces cerevisiae* S 33; derecha: *Hanseniaspora vineae* (T02/5)

Tabla 5.6 Morfología de las cepas seleccionadas en WLN.

CEPAS	DESCRIPCIÓN	COLOR	CEPAS
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> S 33	colonias medianas,circulares,convexas,con elevación	verde muy claro	<i>S.c.</i> S33
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 00/35	colonias grandes,circulares,convexas,con altura	blanco a crema	<i>S.c.</i> 00/35
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> 00/30	colonias grandes,circulares,convexas,con altura	blanco a crema	<i>S.c.</i> 00/30
<i>Zygoascus meyeri</i> (T12_135F)	colonias medianas,circulares ,chatas,como aterciopeladas	blanco opaco	<i>Z.m.</i>
<i>Pichia anomala</i> (BCMO15_2)	colonia mediana, circular, convexa,chata	blanca,opaco	<i>P.a.</i>
<i>Hanseniaspora vineae</i> (T02/5)	colonia mediana,circular	verde intenso	<i>H.v.</i>

5.8 Efecto de las levaduras seleccionadas en la producción de compuestos aromáticos

La Tabla 5.7 muestra los compuestos aromáticos producidos por las cepas seleccionadas, los que fueron analizados mediante GC-MS al final de la fermentación. Los resultados se comparan con el tratamiento de la cepa control S33.

Tabla 5.7 Compuestos aromáticos producidos por las cuatro cepas seleccionadas y la cepa comercial. Los promedios se obtuvieron de la frecuencia de mención entre tratamientos. Las letras indican la diferencia significativa según el test de Tukey $\alpha = 0.05$. n.d., no disponible; n.c., no cuantificable. Los medios donde fueron determinados los umbrales de percepción son (1) cerveza (Meilgaard, 1975), (2) agua (Rychlik et al., 1998) y (3) whisky (Miller, 2019).

COMPUESTOS AROMÁTICOS(μg/L)	Umbral de percepción (μg/L)	Descriptor	<i>S.cerevisiae</i> 00/30	<i>S.cerevisiae</i> 00/35	<i>P. Anomala</i> BCMO15_2	<i>Z. meyeriae</i> T12_135F	<i>S.cerevisiae</i> S 33
ALCOHOLES SUPERIORES							
1-Propanol	306000(1)	Rancio	430 b	520 b	205 a	173 a	431 b
2-Metil-1-propanol	40000(1)	Goma, alcohol	7791 c,d	9435 d	3997 a,b	6539 c,b	7893 c,d
3-Metil-1-butanol	30000(1)	Balsámico, alcohol	65356 b	62995 b	31479 a	nc	nc
1-Pentanol	80000(1)	Frutal, balsámico	nc	15 a	7 a	nc	nc
4-Penten-1-ol	400(2)	Pungente	73 a	70 a	nc	nc	nc
4-Metil-1-pentanol	50000(1)	Nuez	16 a	nc	nc	nc	nc
1-Hexanol	8000(1)	Pasto verde	39 a	nc	nc	13 a	38 a
3-Etoxy-1-propanol	n.d.	Frutal, irritante	549 c	1504 d	83 a,b	20 a	442 c
2-Ciclohexen-1-ol	n.d.	n.a.	nc	430 a	320 a	443 a	219 a
2-Etil-1-hexanol	8000(1)	Verde suave, alcohol	39 a	nc	10 a	13 a	39 a
Alcohol furfural	>3000000 (3)	Olor a pata,sudoroso	nc	1324 a	nc	nc	nc
3-(Metiltio)-1-propanol	500(1)	Papa	497 a,b	1108 a,b,c	967 a,b,c	194 a	1757 d
2-Feniletanol	14000(1)	Floral	33414 b,c	38040 b,c	25271 a,b,c	6950 a	42450 c
Alcohol 4-hidroxi-3-metoxibencilico	n.d.	Creimoso, matices de vainilla y nuez	nc	85 a	111 a	188 b	nc
Tirosol	200000(3)	Amargo, químico	9260 a	nc	2884 a	1357 a	9395 a
Alcohol coniferilico	n.d.	Inodoro	135 a	nc	nc	194 a	78 a
ESTERES ETÍLICOS							
Hexanoato de etilo	154636(1)	Frutal, queso	199 a	108 a	12 a	21 a	70 a
Lactato de etilo	5(1)	Afrutado, jugoso	80 a	98 a	126 a	74 a	42 a
Octanoato de etilo	2(1)	Dulce, jabonoso, fresco	257 b	189 a,b	189 a,b	nc	91 a,b
3-Hidroxi butanoato de etilo	n.d.	n.a.	54 a	48 a	48 a	nc	66 a
2,2-Dietil-3-oxo butanoato de etilo	n.d.	Frutas verdes, vino	1960 a	nc	nc	nc	nc
ACETATOS							
Acetato de isoamilo	30(1)	Banana	564 a,b	601 a,b	31 a	54 a	255 a,b
Acetato de 2-fenil etilo	250(1)	Miel, manzana	606 a	516 a	nc	nc	2441 a
Diacetato de 1,3-propanediol	n.d.	Frutal, acético	nc	7255 b	361 a	112 a	2583 a,b
ÁCIDOS							
Ácido butanoico (ac. butírico)	135(2)	Sudoroso, rancio	553 a	2724 b	549 a	214 a	nc
Ácido hexanoico (ac. capríco)	3000(1)	Sudoroso	3314 b	5602 c	nc	613 a	3247 b
Ácido octanoico (ac. caprílico)	500(1)	Queso	8031 a	633 a	1370 a	1073 a	6281 a
Ácido decanoico(ac. capríco)	15000(1)	Polvo, tierra	1287 a	1038 a	nc	nc	1294 a
Ácido 9-decenoico	n.d.	Rancio	nc	634 a	nc	nc	nc
ISOÁCIDOS							
Ácido isobutírico	200000(1)	Sudoroso	1014 a	858 a	912 a	724 a	nc
Ácido isovalérico	33(1)	Olor a pata, sudoroso	894 a	954 a	787 a	834 a	529 a
LACTONAS							
γ -Butirolactona	n.d.	Dulce, rancia	70 a	92 a	89 a	107 a	76 a
Pantolactona	n.d.	Caramelo,algodón	105 a	85 a	57 a	49 a	41 a
γ -Nonalactona	148(2)	Dulce, durazno	76 a	84 a	nc	nc	nc
γ -Decalactona	400(2)	Dulce, coco	nc	nc	25 a	29 a	53 a
FENOLES VOLÁTILES							
4-Vinil guaiacol	300(3)	Fenólico,amargo	1632 b	1145 a,b	1686 b	1107 a,b	633 a
COMPUESTOS CARBONÍLICOS (ALDEHIDOS Y CETONAS)							
3-Hexanona	n.d.	Dulce, frutal, ceroso	4 a	nc	nc	nc	nc
Acetoina	150000(1)	Butterscotch	211 a	182 a	274 a	676 a	917 a
2-Ciclohexen-1-one	n.d.	n.d.	259 a	352 a	229 a	340 a	170 a
TERPENOS							
β -mirceno	1860(2)	Balsámico,picante	105 a	41 a	nc	nc	nc
Limoneno	200(1)	Limón, naranja	221 b	275 b	40 a	36 a	nc

5.8.1 Alcoholes

Las cepas *Saccharomyces cerevisiae* (Sc 00/30, Sc 00/35) producen mayoritariamente alcohol isoamílico, alcohol β - fenil etílico y alcohol isobutílico. Para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* comercial S33 el alcohol β - fenil etílico no fue un compuesto mayoritario y no se registró producción de alcohol isoamílico.

Pichia anomala BCMO15_2 mostró valores menores para los alcoholes superiores en comparación a los niveles producidos por las cepas *Saccharomyces cerevisiae* (Sc 00/30, Sc 00/35). Contrariamente *Zygoascus meyeri* T12_135F produce cantidades similares de alcohol isobutílico, alcohol β - fenil etílico y no se registró producción de alcohol isoamílico.

5.8.2 Ésteres etílicos

Los compuestos del tipo ester de etilo que fueron producidos por las cepas seleccionadas fueron: hexanoato de etilo, lactato de etilo y octanoato de etilo. Para las cepas *Saccharomyces cerevisiae* (Sc 00/30, Sc 00/35) y para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* comercial S33 se observó una misma tendencia en la producción de estos compuestos. *Pichia anómala* BCMO15_2 mostró una producción mayor, a la cepa comercial, del compuesto octanoato de etilo mientras que la cepa *Zygoascus meyeri* T12_135F no lo produjo.

5.8.3 Ésteres de acetatos

Los compuestos principales fueron el acetato de isoamilo, acetato de 2 feniletilo y diacetato de 1,3 propanediol. *Saccharomyces cerevisiae* 00/35 presentó los valores más altos para el compuesto diacetato de 1,3 propanediol. Para el compuesto acetato de isoamilo, *Saccharomyces cerevisiae* (Sc 00/30, Sc 00/35) presentaron los valores más altos de producción. *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30, Sc 00/35 y Sc S33 produjeron acetato de 2-feniletilo mientras que las cepas no-*Saccharomyces* no lo produjeron.

5.8.4 Ácidos

Los ácidos producidos en la concentración más alta fueron: ácido decanoico, ácido octanoico, ácido hexanoico y ácido butanoico. *Saccharomyces cerevisiae* 00/35 produce ácido butanoico y ácido hexanoico con una diferencia significativa respecto a la producción de estos compuestos por las cepas *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30 y *Saccharomyces cerevisiae* Sc 33. Solo las cepas *Saccharomyces cerevisiae* producen ácido decanoico. Las cepas no *Saccharomyces* tuvieron una producción de compuestos ácidos volátiles baja. Solamente el ácido octanoico no presentó diferencia significativa entre todas las cepas incluidas la cepa comercial.

5.8.5 Fenoles

El compuesto 4-vinil guaiacol fue producido por las cepas: *Pichia anomala* BCMO15_2 y la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30 en una concentración tal que excedieron el umbral de percepción reportado para cervezas y whisky de este compuesto (Tabla 5.6). Adicionalmente, el descriptor clavo de olor (asociado con 4-vinil guaiacol) fue detectado por distintos evaluadores en el análisis sensorial como se mencionó anteriormente en este capítulo (Figura 5.6).

5.8.6 Monoterpenos

Los compuestos β -mirceno y limoneno fueron producidos por las cepas *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30 y *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35. La cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* Sc 33 no presentó producción de estos dos monoterpenos. Las cepas *Pichia anomala* BCMO15_2 y *Zygoascus meyeri* T12_135F produjeron limoneno también y existió diferencia significativa entre estas y las cepas *Saccharomyces cerevisiae* nativas.

5.9 Estudio estadístico de los grupos de compuestos

Se realizó un análisis estadístico para evaluar la diferencia entre los distintos compuestos aromáticos de los distintos grupos de compuestos para las cepas que fueron testeadas que se indican en la tabla con letras diferentes. Diferencias significativas fueron observadas entre las cepas seleccionadas para los siguientes grupos de compuestos: acetatos, alcoholes superiores, isoácidos, ácidos, ésteres etílicos, fenoles volátiles y terpenos. Para las lactonas y los compuestos carbonílicos no hubo diferencias significativas.

5.10 Estudio de los valores de unidades de aroma en las microfermentaciones

El umbral de percepción de los compuestos volátiles presentes en la cerveza es muy variado, y esto determina que el impacto de los distintos compuestos volátiles en el aroma dependa de las unidades de aroma, que se definen como la relación entre la concentración de una sustancia y el umbral de percepción de la misma (ambos expresados en las mismas unidades).

Es por esta razón, que compuestos que están presentes en una cerveza en concentraciones del orden de ng/L pueden tener un impacto notable en el aroma, mientras que otros con concentraciones de varios cientos de mg/L pueden prácticamente no influir en las características sensoriales de la muestra, dependiendo de sus respectivos umbrales de percepción (Ribéreau-Gayon et al., 1998).

Por otro lado se debe tener en cuenta que bebidas como la cerveza, así como también lo es el vino, constituyen una matriz de composición muy compleja donde existen interacciones entre los distintos

compuestos, que pueden en muchos casos causar modificaciones en los umbrales de percepción de las sustancias volátiles contenidas en la muestra.

Para estudiar la posible contribución de los distintos compuestos volátiles en el perfil sensorial de las cervezas obtenidas con las microfermentaciones se calcularon las unidades de aroma.

Es importante destacar que en muchos casos existe dificultad de obtener los valores de umbral de percepción para un importante número de compuestos volátiles estudiados en una muestra de la misma naturaleza de la que se está trabajando.

Por otro lado, el tema se complejiza aún más, ya que la dificultad es mayor porque el impacto de estos compuestos en forma individual no es el percibido sensorialmente debido a las interacciones que aparecen en mezclas complejas como son las bebidas fermentadas.

En la Tabla 5.8, se presentan los compuestos aromáticos encontrados en las microfermentaciones, para los que la unidad de aroma fue igual o mayor a 1 en algunos de los tratamientos, y su correspondiente descriptor y umbral de percepción.

Tabla 5.8 Calculo de UA (unidades de aroma) para los diferentes compuestos volátiles producidos por las cepas seleccionadas.

COMPUESTOS AROMÁTICOS (UNIDADES DE AROMAS)	<i>S.cerevisiae</i> 00/30	<i>S.cerevisiae</i> 00/35	<i>P. anomala</i> BCMO15_2	<i>Z. meyeriae</i> T12_135F	<i>S.cerevisiae</i> S33
ALCOHOLES SUPERIORES					
3-Metil-1-butanol	2	2	1	<1	<1
3-(Metililo)-1-propanol	1	2	2	<1	4
2-Feniletanol	2	3	2	<1	3
ESTERES ETÍLICOS					
Hexanoato de etilo	16	20	25	15	8
Octanoato de etilo	129	95	95	<1	46
ACETATOS					
Acetato de isoamilo	19	20	1	2	9
Acetato de 2-fenil etilo	2	2	<1	<1	10
ÁCIDOS					
Ácido butanoico	4	20	4	2	<1
Ácido hexanoico	1	2	<1	<1	1
Ácido octanoico	16	1	3	2	13
ISOÁCIDOS					
Ácido isovalerico	27	29	24	25	16
FENOLES VOLÁTILES					
4-Vinil guaiacol	5	4	6	4	2
TERPENOS					
Limoneno	1	1	<1	<1	<1

Los esteres etílicos indicados en la Tabla 5.8 presentaron las UA más altas. Para el octanoato de etilo la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30 presentó 129 UA el valor más alto para este compuesto y para la Tabla 5.7. Mientras que la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 y la *Pichia anomala* BCMO15_2 presentaron 95 UA. Siendo 45 UA para la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 33 y correspondiente al menor valor dentro de las *Saccharomyces cerevisiae*. El hexanoato de etilo se encontró dentro del rango de 8-25 UA presentando el mayor valor para la *Pichia anomala* BCMO15_2. Para el acetato de 2-feniletilo las cepas *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 y Sc 00/30

presentaron 2 UA y la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 33 10 UA. Para el acetato de isoamilo las cepas *Saccharomyces cerevisiae* fueron las que obtuvieron mayores valores de UA siendo la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 20 UA.

Con respecto a los ácidos para el ácido butanoico la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 presentó 20 UA siendo el mayor valor de UA presentado por todas las cepas. Para el ácido octanoico la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30 presentó el mayor valor siendo este de 16 UA y para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Sc 33 13 UA para el resto de las cepas los valores de UA fueron menor presentando un rango de 1-3 UA.

El ácido isovalérico fue mayor a 15 UA para todas las cepas siendo el mayor valor para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 de 29 UA.

El 4-vinilguaiacil obtuvo el mayor valor para la *Pichia anomala* BCMO15_2 siendo este de 6 UA, y de 5 UA para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30 y 4 UA para *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35.

Para el caso del terpeno limoneno las cepas nativas *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 y Sc 00/30 obtuvieron 1UA, esta producción de es debido a la β glucosidasa previamente reportada en estas cepas (Pérez et al., 2011). Los compuestos terpénicos son sensibles a las condiciones ácidas y a los aumentos de temperatura y tiempo de almacenamiento. En estas condiciones se transforman en otros compuestos que pueden tener aromas más o menos intensos. Un ejemplo de este fenómeno es la transposición catalizada en medio ácido de nerol y linalol a un carbocatión que podría estabilizarse transformándose en alfa-terpineol, terpinoleno y limoneno (Whittaker., 1972). Mientras que las restantes su valor fue menor a 1 UA incluyendo la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Sc 33 comercial.

Dentro de los alcoholes superiores para el caso del compuesto 2-Feniletanol la única cepa que presentó un valor menor a 1 UA fue la *Zygoascus meyeri* T12_135F. Las *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35, Sc 00/30 y Sc S33 presentaron valores entre 2 y 3 UA al igual que la *Pichia anomala* BCMO15_2. Para el compuesto 3-Metil-1-butanol la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 y la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30 presentaron 2UA y *Pichia anomala* BCMO15_2 1UA. Las restantes cepas su valor fue menor a 1 UA. El 3-(metiltio)-1-propanol *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 y *Pichia anomala* BCMO15_2 presentaron 2UA y de las restantes la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30.

5.11 Análisis sensorial

El análisis sensorial para las distintas cepas se muestra en la Figura 5.10.

Los descriptores con diferencia significativa fueron compota para *Zygoascus meyerae* T12_135F, clavo de olor para *Pichia anomala* BCMO15_2 y *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30 y ácido acético para *Saccharomyces cerevisiae* S 33. Los descriptores fruta para *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 y caramelo para *Zygoascus meyerae* (T12_135F) son notorios, pero no hubo diferencia significativa entre cepas.

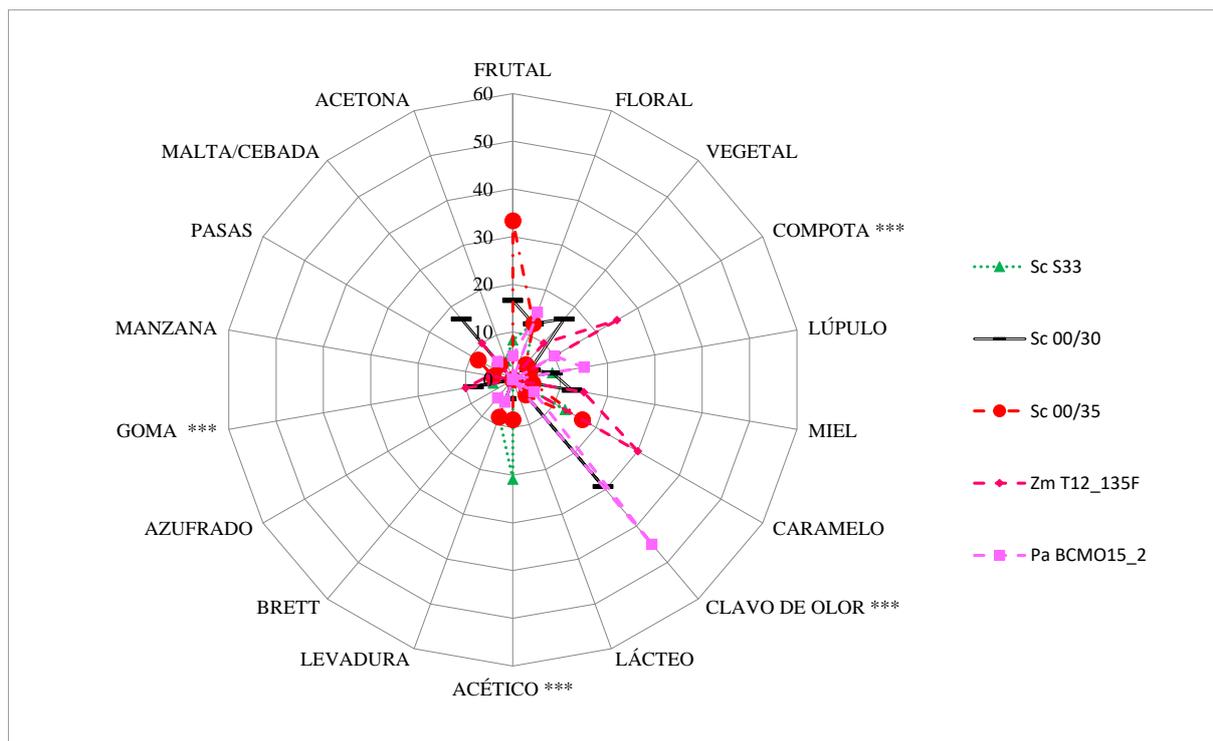


Figura 5.10- Análisis sensorial de las microfermentaciones. Los valores representados, muestran la intensidad de los descriptores principales evaluados para cada cepa. Test de Tukey ($\alpha = 0.05$). Nivel de significación ***, 99,9%.

La Tabla 5.9 muestra para las distintas cepas los descriptores con mayor frecuencia de mención por parte de los evaluadores sensoriales. Esta tabla confirma los resultados obtenidos en la figura 5.10. La Tabla 5.9 muestra que el descriptor clavo de olor fue descriptor mencionado con mayor frecuencia de repetitividad por los evaluadores. Para la cepa *Pichia anomala* BCMO15_2 se obtuvo un valor de repetitividad de 4,5. Este valor fue el mayor junto con el valor de repetitividad de 3,5 para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/30. Sin embargo para las cepas, *Zygoascus meyerae* T12_135F y *Saccharomyces cerevisiae* Sc 33 no fue percibido dicho descriptor y el valor de repetitividad para la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 fue de 0,5, existiendo de esta forma diferencia significativa entre las cepas.

Para el caso del descriptor compota este fue mencionado más veces por los evaluadores para las cepas *Zygoascus meyeræ* T12_135F (2,5) y *Pichia anomala* BCMO15_2 (1), no registrándose mención de este descriptor para la cepa comercial.

Tabla 5.9- Valores de la frecuencia de mención entre evaluadores. Las letras indican la diferencia significativa entre cepas según test de Tukey ($\alpha = 0.05$)

CEPAS	COMPOTA	CLAVO DE OLOR
<i>Sc</i> S33	0 (a)	0 (a)
<i>Sc</i> 00/30	0,5 (a)	3,5 (b)
<i>Sc</i> 00/35	0,5 (a)	0,5 (a)
<i>Zm</i> T12_135F	2,5 (b)	0 (a)
<i>Pa</i> BCM015_2	1 (a, b)	4,5 (b)

5.12 Análisis estadístico

Se realizó un análisis multivariado de los componentes principales (PCA) para discriminar entre las variables de compuestos volátiles y descriptores sensoriales (Figura 5.11).

Los componentes principales (PC) 1 y 2 explican el 63,12% de la varianza del sistema.

Las levaduras no *Saccharomyces*, (*Z. meyeræ* y *P. Anomala*) se agruparon en valores positivos de los componentes 1 y 2, correlacionándose positivamente con los descriptores caramelo y compota y los compuestos aromáticos butirrolactonas y alcohol de vainillina (que pueden explicar estas notas sensoriales).

Por otro lado, la levadura *Saccharomyces* nativa *S. cerevisiae* 00/30 se colocó en valores negativos del componente 1, la levadura *S. cerevisiae* 00/35 en valores positivos de PC2, en ese cuadrante se colocaron los descriptores levadura, fruta, miel y crianza. Esta levadura se correlacionó positivamente con los compuestos volátiles pantolactona, hexanoato de etilo, acetato de isoamilo, γ -nonalactona, 3-etoxi-1-propanol. Estos componentes pueden explicar las notas de frutas y miel presentes en ese cuadrante.

La levadura nativa *S. cerevisiae* 00/30 se colocó en valores negativos del PC 1 y 2 se correlacionó con los descriptores floral, vegetal, malta y clavo de olor. Esta levadura correlacionó positivamente entre otros compuestos con el octanoato de etilo, el lactato de etilo, el 3-hidroxi-butanoato de etilo y el 2-fenil-etanol siendo el último posible responsable de la nota floral. La cepa comercial de levadura *S. cerevisiae* 33 se ubicó en el cuadrante restante donde se colocaron los descriptores acetona y

lúpulo y esta levadura se correlacionó positivamente con compuestos como 1-hexanol, 2-etil-1-hexanol, ácido octanoico y acetato 2-feniletilo.

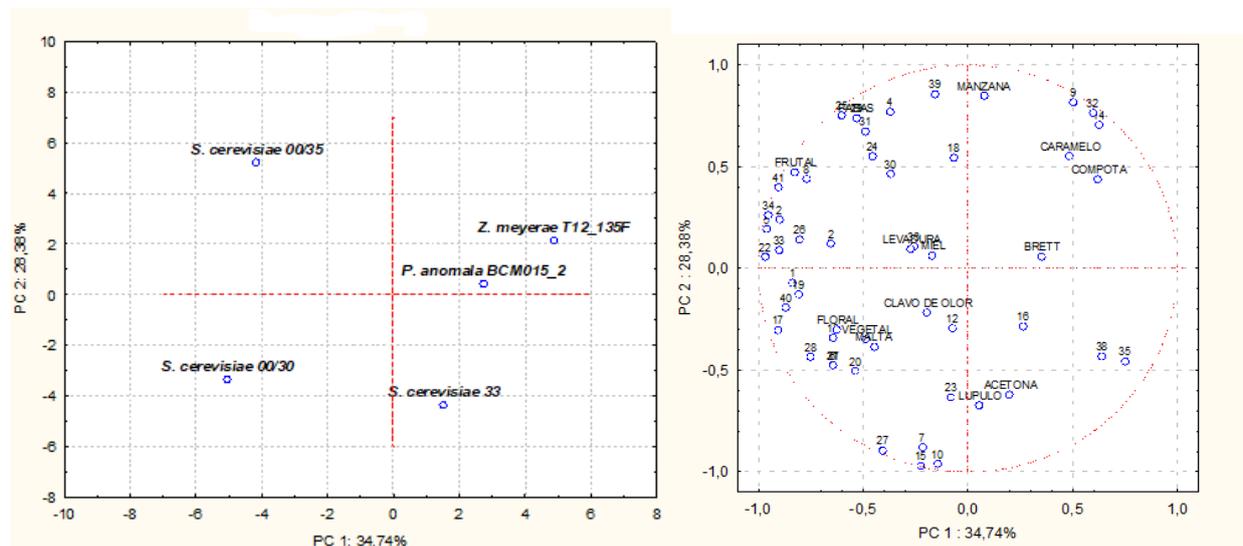


Figura 5.11- Principales Componentes. Análisis usando como variables compuestos volátiles y los descriptores sensoriales. Los compuestos volátiles están representados con números asignados de la siguiente manera: 1: 1-Propanol; 2: 2-Metil-1-propanol; 3: 3-Metil-1-butanol; 4: 1-Pentanol; 5: 4-penten-1-ol; 6: 4-Metil-1-pentanol; 7: 1-Hexanol; 8: 3-Etoxi-1-propanol; 9: 2-Ciclohexen-1-ol; 10: 2-Etil-1-hexanol; 11: Alcohol furfurílico; 12: 3-(Metiltio)-1-propanol; 13: 2-Feniletanol; 14: Alcohol vanilílico; 15: Tirosol; 16: Alcohol de coniferilo; 17: Lactato de etilo; 18: Hexanoato de Etilo; 19: Octanoato de etilo; 20: 3-Hidroxi butanoato de etilo; 21: 2,2-dietil-3-oxobutanoato de etilo; 22: Acetato de isoamilo; 23: 2- Acetato de feniletilo; 24: Diacetato de 1,3-Propanodiol ; 25: Ácido butanoico; 26: Ácido hexanoico; 27: Acido octanoico; 28: Acido decanoico; 29: Acido 9-decenoico; 30: Acido isobutirico; 31: Acido isovalerico; 32: γ -Butyrolactona; 33: Pantolactona; 34: γ -Nonalactona; 35: γ -Decalactona; 36: 4-Vinylguaicol; 37: 3-Hexanona; 38: Acetoína; 39: 2-Ciclohexen-1-ona; 40: β -Myrceno; 41: Limoneno.

5.13 Fermentaciones con cultivos mixtos y análisis sensorial

En relación a los resultados previamente obtenidos para los cultivos puros, en términos de desempeño fermentativo y la limitada capacidad de crecimiento celular en el SMC, la estrategia seleccionada para la siguiente etapa de estudio fue el desarrollo de fermentaciones mixtas con cepas *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*.

Las co-fermentaciones fueron inoculadas inicialmente con una cepa no-*Saccharomyces* y 24 hs después con una cepa *Saccharomyces*. Esta estrategia de una inoculación secuencial arrancando con una cepa no-*Saccharomyces* e inoculando la cepa *Saccharomyces* 24 horas más tarde, garantiza una mejor implantación de la cepa no-*Saccharomyces*, en términos de población celular, capacidad fermentativa y producción de aromas, ya que la misma se encuentra sola en el medio, sin una

competencia inicial por nutrientes, lo que la hace implantarse con ventaja y “dominio” del proceso productivo (Medina et al., 2012).

La cepa *Saccharomyces cerevisiae* seleccionada fue la *Saccharomyces cerevisiae* Sc 00/35 debido a los datos de capacidad fermentativa, composición aromática y análisis sensorial previamente mostrados.

Como se mencionó en Materiales y Métodos, en esta etapa de cultivos mixtos, se incluyó a la cepa *Hanseniaspora vineae* T02/5 por sus antecedentes de investigación en vinos (gran capacidad de producción de acetatos compuestos derivados de la acetilación de alcoholes y ácidos, y otros fenilpropanoides como el alcohol bencílico) (Del Fresno 2020; Martin et al., 2018; Medina 2014; Medina et al., 2013), a pesar de no tener la capacidad de fermentar la maltosa

Los cultivos mixtos seleccionados para su realización fueron los siguientes: Pa BCM015_2 + Sc 00/35; Zm T12_135F + Sc 00/35 y Hv T02/5 + Sc 00/35, y los tamaños de inóculos así como las condiciones de fermentación se detallaron en el Capítulo 4 (sección 4.8.2).

La Figura 5.12 muestra el perfil fermentativo de los cultivos mixtos y de los cultivos puros de las cepas *Saccharomyces*. Estos últimos, presentaron las capacidades fermentativas más altas.

Dentro de las fermentaciones mixtas, el cultivo mixto Hv T02/5 + Sc 00/35 fue el que tuvo la mayor capacidad fermentativa.

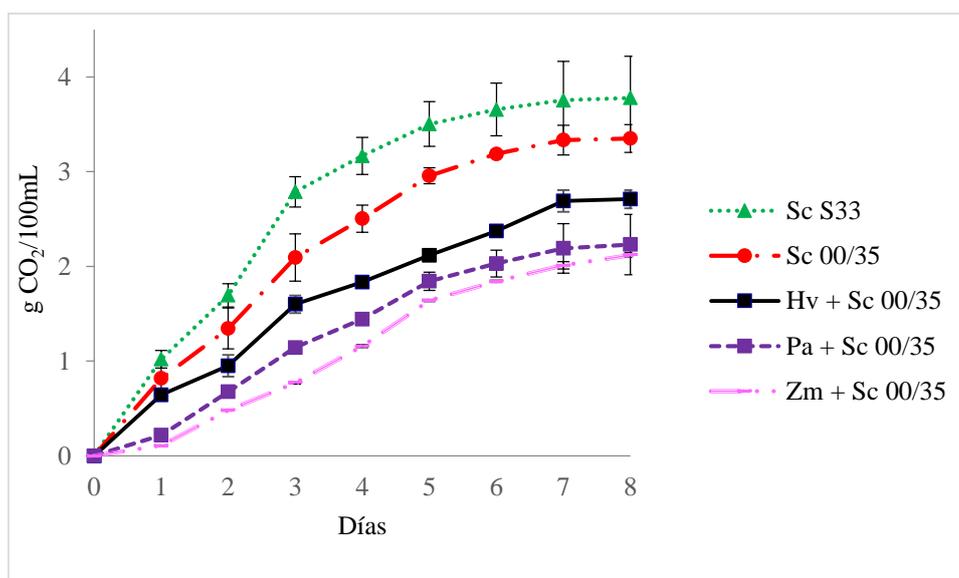


Figura 5.12- Fermentación de cultivos mixtos en SMC

La Figura 5.13 muestra gráficos de arañas donde se representan los descriptores obtenidos en las evaluaciones sensoriales. Los descriptores destacados fueron el clavo de olor para Pa BCM015_2 + Sc 00/35 y el frutal para Hv T02/5 + Sc 00/35, Zm T12_135F + Sc 00/35, Sc 00/35 y Sc S33.

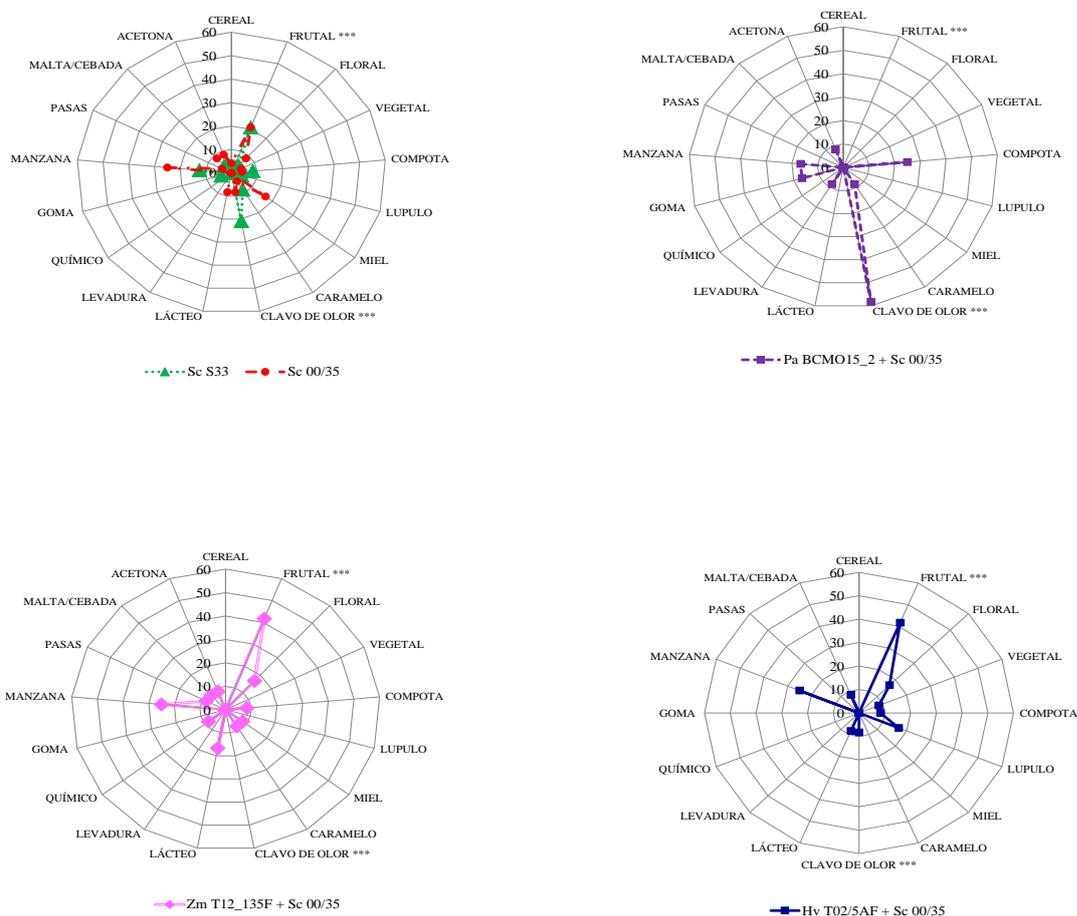


Figura 5.13- Evaluación sensorial para los cultivos puros y mixtos. Test de Tukey ($\alpha = 0.05$). Nivel de significación ***, 99,9%.

Para *Zygoascus meyeriae* T12_135F + Sc 00/35, no se observó el descriptor compota obtenido previamente para el cultivo puro de *Zygoascus meyeriae* y por otro lado el descriptor frutal aumentó de 2,5 a 4,5 (Tabla 5.9). Este resultado confirma el efecto de interacción entre cepas. Estos resultados son los primeros reportados en cerveza, en los cuales el descriptor frutal está presente en el análisis sensorial, especialmente en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae*, y el alcohol isoamílico no es detectado en fermentaciones con cultivos puros con una sola cepa.

Rollero et al. (2018) reportó previamente que las levaduras *Zygoascus meyeriae* están asociadas a producciones elevadas de alcoholes superiores, en particular de alcohol isoamílico y ésteres etílicos en co-inoculaciones con *Saccharomyces cerevisiae* en vinos.

En la fermentación mixta con *Pichia anomala* BCMO15_2, la frecuencia de mención entre los panelistas para el clavo de olor aumentó de 4,5 a 5,5 y el descriptor compota desapareció en comparación con la fermentación de la levadura *Pichia anomala* BCMO15_2 pura (Tabla 5.10). El descriptor clavo de olor se detectó por parte del panel sensorial en todas las fermentaciones con *Pichia anomala* BCMO15_2 ya sea en cultivo puro y cultivo mixto.

La nota de clavo de olor está asociada al compuesto 4-vinylguaiacol; esto está correlacionado con la alta concentración producida por esta cepa, la cual supera el límite de percepción. La producción de este compuesto ha sido reportada previamente para *Pichia anomala* con POF+ (phenolic off-flavour positive) con una producción intermedia de entre 1,89 y 2,89 mg/L (Holt et al., 2018). Este descriptor aromático de clavo de olor es un descriptor esencial en cervezas de trigo (wheat beer) y diferentes estilos de cervezas rubias (blond beer styles).

También esta cepa ha sido reportada como productora de altos niveles de acetato de etilo y bajos niveles de alcohol isoamílico (Holt et al., 2018); al tiempo que también produce propanoato de etilo, fenil etiletanol y acetato de 2-feniletilo (Passoth et al., 2006).

En este estudio sensorial pero no para todos los tratamientos, *Pichia anomala* BCMO15_2 presentó como descriptor esmalte de uñas y descriptores asociados a solventes, que están vinculados al acetato de etilo.

Tabla 5.10- Valores principales de la frecuencia de mención de los diferentes descriptores entre evaluadores. Las letras indican una diferencia significativa entre las muestras, según el Test de Tukey ($\alpha = 0.05$).

CEPAS	FRUTAL	CLAVO DE OLOR
<i>Sc</i> S33	2,5 (a, b)	2,5 (a, b)
<i>Sc</i> 00/35	2,5 (a, b)	1,0 (a)
(<i>Zm+</i> <i>Sc</i> 00/35)	4,5 (b)	0 (a)
(<i>Pm+</i> <i>Sc</i> 00/35)	0 (a)	5,5 (b)
(<i>Hv+</i> <i>Sc</i> 00/35)	4,5 (b)	0,5 (a)

El cultivo mixto de *Hanseniaspora vineae* T02/5 y *Saccharomyces cerevisiae* 00/35 mostró una reducción de la capacidad fermentativa comparado con la fermentación individual de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* 00/35. Sin embargo, desde el punto de vista sensorial, la cepa *Hanseniaspora vineae* T02/5 potenció la percepción del descriptor aromático frutal. Este

comportamiento ya había sido reportado con cepa *Hanseniaspora vineae* T02/5 en vinos (Medina et al., 2013; Medina, 2014; Martin et al., 2018), y estos resultados demuestran un comportamiento similar de la cepa pero en este caso sobre otra matriz fermentativa como lo es el mosto cervecero.

Estos resultados muestran que algunas cepas no-*Saccharomyces* pueden aumentar la complejidad aromática cuando son empleadas en condiciones de cultivos mixtos en cerveza. En este sentido, es necesario realizar más estudios y una mayor exploración en la diversidad de levaduras, de tal manera de poder mejorar los procesos de elaboración de la cerveza.

Muchos estudios indican que para las bebidas fermentadas la percepción de los compuestos aromáticos depende de múltiples factores, y que esto puede determinar interacciones tanto sinérgicas como antagónicas (San-Juan et al., 2011; Lytra et al., 2013; Holt et al., 2018b). Dependiendo el tipo de cerveza que se desee elaborar, estas interacciones pueden ser deseadas o no, y es por esta razón que resulta un factor clave a considerar en la industria de bebidas fermentadas.

5.14 Aplicación a escala semi-piloto de las levaduras no-*Saccharomyces* seleccionadas

Las levaduras *Pichia anomala* BCMO15_2 y *Zygoascus meyeri* T12_135F, fueron utilizadas en cultivo mixto, para la elaboración de cerveza artesanal en una cervecería de pequeño porte y amplia experiencia en Uruguay, ubicada en la zona de Montevideo.

Los cultivos mixtos se realizaron con una cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* SAF 05 de la empresa Fermentis. Esta levadura comercial fue la elegida debido al amplio conocimiento de sus características y manejo por parte de la cervecería. Desde el punto de vista sensorial se caracteriza por un perfil de notas aromáticas neutras.

El estilo de cerveza seleccionado para la utilización de estas levaduras fue el estilo Blond Ale, por tratarse de una variedad relativamente neutra desde el punto de vista aromático, lo que permite una mejor evaluación sensorial de las cervezas obtenidas.

El volumen de producción fue de 50 litros, para cada una de las siguientes elaboraciones: *Pichia anomala* BCMO15_2 + *Saccharomyces cerevisiae* SAF 05 y *Zygoascus meyeri* T12_135F + *Saccharomyces cerevisiae* (SAF 05). El inóculo inicial utilizado fue de 1×10^6 ufc/mL, al igual que para las microfermentaciones de laboratorio y la dinámica de inoculación secuencial también fue similar, inoculando primero las cepas no-*Saccharomyces* y a las 24 hs la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* SAF 05.

Luego de obtenidas las respectivas cervezas se realizó una evaluación sensorial por parte de los maestros cerveceros y del panel interno de técnicos y consumidores del laboratorio de Enología y

Biotecnología de las Fermentaciones, y se realizaron los análisis fisicoquímicos completos, cuyos datos se presentan en la Tabla 5.10.

En la cerveza elaborada con *Pichia anomala* BCMO15_2+ *Saccharomyces cerevisiae* SAF 05, se obtuvo el siguiente perfil aromático: fenólica, clavo de olor, especiado (algunos evaluadores pudieron identificar coriandro), notas de anís, y manzana roja. Para varios evaluadores la cerveza presentaba similitud con cervezas de estilos belga y Hoegarden Blanche.

En cuanto a la cerveza elaborada con *Zygoascus meyeriae* T12_135F + *Saccharomyces cerevisiae* SAF 05, se observó un perfil frutado con leves notas a durazno y en boca notas a pomelo, miel y vainilla.

Tabla 5.11- Análisis fisicoquímicos de las cervezas producidas a escala piloto

	<i>Zygoascus meyeriae</i> T12_135F + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SAF 05	<i>Pichia anomala</i> BCMO15_2 + <i>Saccharomyces cerevisiae</i> SAF 05
pH	3,74	3,72
Azúcar (g/L)	17,5	19,1
Alcohol (% v/v)	4,16	4,57
Acidez Total expresada en ácido acético (% m/m)	0,11	0,12
Acidez Volátil expresada en ácido acético (% m/m)	0,012	0,02

De acuerdo a datos analíticos previos realizados por el Laboratorio de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones para un total de 20 cervezas nacionales de las marcas más representativas del mercado (Giannone et al., 2019), se observa que la mayoría de los datos analíticos presentados en la Tabla 5.11 se encuentran dentro de los rangos esperados para cervezas del estilo rubias Ale.

Giannone et al. 2019, reportaron valores promedio de grado alcohólico de 4 a 6,7 %; azúcares reductores entre 10 y 30 g/L (constituye el parámetro con mayor variabilidad, que demostró ser para las cervezas nacionales un parámetro independiente de estilo y que obedece a características de cada marca); acidez volátil entre 0,015 y 0,049 % ácido acético; y acidez total entre 0,07 y 0,17 % ácido acético.

En cuanto al pH, la cerveza tiene un pH promedio de entre 4.1 a 4.6. Para este parámetro los valores distan bastante de los obtenidos en las elaboraciones realizadas y debería ser un factor importante a controlar en futuras elaboraciones a escala piloto ya que sensorialmente pueden resultar cervezas ácidas. En este sentido los controles microbiológicos realizados a las cervezas terminadas no mostraron contaminación bacteriana e indirectamente los datos de acidez total y acidez volátil también confirman la ausencia de dicha contaminación.

El parámetro que tuvo mayor diferencia entre las elaboraciones mixtas fue el grado alcohólico. La fermentación realizada por *Pichia anomala* BCMO15_2 + *Saccharomyces cerevisiae* SAF 05, dio un valor de 0,4 % mayor que para *Zygoascus meyeriae* T12_135F + *Saccharomyces cerevisiae* SAF 05. Este resultado demostró una mayor eficiencia fermentativa por parte del cultivo mixto con *Pichia anomala* BCMO15_2, en el que a su vez el contenido de azúcar residual es levemente superior al otro cultivo mixto.

El valor de acidez volátil para *Pichia anómala* BCMO15_2 + *Saccharomyces cerevisiae* SAF 05 también fue mayor que para el otro cultivo mixto. Esto puede ser explicado como consecuencia de una mayor producción de etanol, donde como producto del metabolismo secundario de la levadura también se forma algo más de ácido acético.

5.15 Conclusiones finales

La información presentada en este trabajo de tesis permite una mayor comprensión del potencial cervecero fermentativo, aromático y sensorial de cepas nativas, ya sea pertenecientes a la especie tradicional de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* como de levaduras no convencionales pertenecientes al grupo de las no-*Saccharomyces*.

Este estudio puso una vez más de relevancia, que la selección de levaduras constituye una herramienta fundamental para la elaboración de nuevos estilos de bebidas fermentadas, en particular para la producción de diferentes tipos y estilos de cerveza innovadores.

El uso de cepas no-*Saccharomyces* permite la elaboración de productos únicos, que no se encuentran de manera masiva en la oferta cervecera habitual, y que permiten cubrir una demanda insatisfecha de consumidores ávidos por productos cerveceros alternativos cada vez más buscados en el mercado de las bebidas fermentadas.

Los resultados se pueden resumir de la siguiente manera:

- 1- Se diseñó un símil mosto cervecero de composición estandarizada y que permitió su disponibilidad de manera rápida y relativamente sencilla.
- 2- Se seleccionaron tres cepas nativas con potencial para su utilización en la industria cervecera. Las cepas nativas seleccionadas pertenecen a las especies *Saccharomyces cerevisiae* (Sc 00/35), *Zygoascus meyeriae* (Zm T12_135F) y *Pichia anomala* (Pa BCMO15_2).

Las dos primeras cepas fueron aisladas de la industria vitivinícola, mientras que la última fue aislada a partir de muestreos de granos de cebada malteada provenientes de una maltería.

- 3- La cepa *Saccharomyces cerevisiae* 00/35 presentó una capacidad fermentativa similar a la de las levaduras comerciales utilizadas como control. En cuanto a su potencial aromático, produce compuestos tales como el acetato de isoamilo cuyos descriptores son frutales (banana) y acetato-2-feniletilo el cual tiene descriptores de manzana, rosa y miel. También produjo ester de etílico: octanoato de etilo y hexanoato de etilo con descriptores frutales y dulce, jabonoso respectivamente. El octanoato de etilo supero el umbral de percepción de este compuesto ubicándose en un valor de 95 UA. Dentro de su pool aromático la producción de ácido butanoico y ácido isovalérico estuvieron presentes y deben considerarse. Además mostró capacidad de liberar aromas ligados como algunos terpenos gracias a su capacidad glucosidasa.
- 4- La utilización de una cepa *Saccharomyces cerevisiae* nativa, constituye una herramienta interesante de diferenciación productiva y comercial que permitirá la obtención de cervezas con identidad nacional.
- 5- Se demostró que las cepas *Pichia anomala* BCMO15_2 y *Zygoascus meyeri* T12_135F producen compuestos aromáticos como el 4-vinilguaiacol, 2-feniletanol, alcohol isoamílico, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Estos compuestos las vuelven cepas interesantes para la elaboración de cervezas de estilos belgas (Belgian Golden Strong ale), cervezas de trigo (German wheat beer, Weissbier), cervezas ahumadas (Rachbier) y cervezas Kolsch.
- 6- Se observó que debido al bajo poder fermentativo de las cepas no-*Saccharomyces* estudiadas, se debió recurrir al uso de cultivos mixtos con una cepa *Saccharomyces cerevisiae* de manera de garantizar la finalización de la fermentación alcohólica. Esto se constató tanto en el símil mosto cervecero como en el mosto cervecero industrial.
- 7- La cepa *Hanseniaspora vineae* T02/5 no fermenta maltosa, pero sin embargo produjo en cultivos mixtos, cervezas con aromas frutales al igual que como fuera previamente reportado para vinos. Esta característica la vuelve una levadura interesante para la elaboración de cervezas frutales, las cuales son cada vez más buscadas por los consumidores.

- 8- La limitada capacidad fermentativa de las cepas *Hanseniaspora vineae* T02/5, *Pichia anomala* BCMO15_2 y *Zygoascus meyeri* T12_135F, las vuelven cepas interesantes para profundizar en la elaboración de cervezas reducidas en etanol.

Las pruebas a escala semi-piloto reprodujeron los resultados obtenidos a escala de laboratorio. En ese sentido, será necesario profundizar en el escalado industrial que constituye el eslabón fundamental sobre el que hay que seguir profundizando para una posible comercialización de algunas de las levaduras estudiadas.

BIBLIOGRAFÍA

- Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., Bely, M., 2014. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. PLoS One 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0094246>
- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E.K., Becker, T., 2014. *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. J. Inst. Brew. 120, 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- Anfang, N., Brajkovich, M., Goddard, M.R., 2009. Co-fermentation with *Pichia kluyveri* increases varietal thiol concentrations in sauvignon blanc. Aust. J. Grape Wine Res. 15, 1–8. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2008.00031.x>
- Appel, D., Heinzen, A., Bía, F., Secondi, R., 2019. Informe de tendencia cerveza artesanal. Impuls. Ind. 1–12.
- Arias, G., 1991. St 18. Calidad industrial de la cebada cervecera. Unidad de difusión e información tecnológica del INIA, 1-54.
- Aslankoohi, E., Herrera-Malaver, B., Rezaei, M.N., Steensels, J., Courtin, C.M., Verstrepen, K.J., 2016. Non-conventional yeast strains increase the aroma complexity of bread. PLoS One 11, 1–18. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0165126>
- Avramova, M., Cibrario, A., Peltier, E., Coton, M., Coton, E., Schacherer, J., Spano, G., Capozzi, V., Blaiotta, G., Salin, F., Dols-Lafargue, M., Grbin, P., Curtin, C., Albertin, W., Masneuf-Pomarede, I., 2018. *Brettanomyces bruxellensis* population survey reveals a diploid-triploid complex structured according to substrate of isolation and geographical distribution. Sci. Rep. 8, 1–13. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-22580-7>
- Baker, E.C., Wang, B., Bellora, N., Peris, D., Hulfachor, A.B., Koshalek, J.A., Adams, M., Libkind, D., Hittinger, C.T., 2015. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. Mol. Biol. Evol. 32, 2818–2831. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv168>
- Bamforth, C.W., 2006. Brewing new technologies. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC © 2006, Woodhead Publishing Limited.
- Barth, R., 2013. The chemistry of beer, ACS Symposium Series. <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1130.ch004>

- Basso, R.F., Alcarde, A.R., Portugal, C.B., 2016. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Res. Int.* 86, 112–120.
<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Bernal, L., Martínez Barajas, E., 2006. Una nueva visión de la degradación del almidón. *Rev. del Cent. Investig. Univ. La Salle.*
- Boido, E., Lloret, A., Medina, K., Farña, L., Carrau, F., Versini, G., Dellacassa, E., 2003. Aroma composition of *Vitis vinifera* cv. Tannat: The typical red wine from Uruguay. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5408–5413. <https://doi.org/10.1021/jf030087i>
- Bokulich, N.A., Bamforth, C.W., Mills, D.A., 2012. Brewhouse-resident microbiota are responsible for multi-stage fermentation of American coolship ale. *PLoS One* 7, 11.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035507>
- Bond, U., 2009. Chapter 6 The Genomes of Lager Yeasts, 1st ed, *Advances in Applied Microbiology*, Elsevier Inc. Elsevier Inc. [https://doi.org/10.1016/S0065-2164\(09\)69006-7](https://doi.org/10.1016/S0065-2164(09)69006-7)
- Boulton, C., Quain, D., 2001. *Fermentation Systems, Brewing Yeast and Fermentation*. Blackwell Publishing Ltda. <https://doi.org/10.1002/9780470999417.ch5>
- Briggs, D.E., Boulton, C.A., Brookes, P.A., Stevens, R., 2004. *Brewing: Science and Practice*, *Brewing: Science and Practice*. Woodhead. 1-50. <https://doi.org/10.1533/9781855739062>
- Burini, J., Eizaguirre, J.I., Loviso, C., Libkin, D., 2020. Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing. *OSF Preprints*. In print.
<https://doi.org/https://doi.org/10.31219/osf.io/tn3c5>
- Cameroni, G., 2013. Ficha cono del Lúpulo. *Alimentos argentinos*. Subsecretaría de Agregado de Valor y Nuevas Tecnologías, pp. 1–7.
- Carlos A. Driscolla, B., Macdonalda, D.W., O'Brien, S.J., 2009. From wild animals to domestic pets, an evolutionary view of domestication 106, 9971–9978.
- Carrau, F., Boido, E., Dellacassa, E., 2015a. Yeast Diversity and Flavor Compounds. *Fungal Metab.* 569–597. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_32
- Carrau, F., Gaggero, C., Aguilar, P.S., 2015b. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends Biotechnol.* 33, 148–154. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.12.009>

- Carrau, F.M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P.A., Dellacassa, E., 2008. Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Res.* 8, 1196–1207.
<https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>
- Coghe, S., Martens, E., D'Hollander, H., Dirinck, P.J., Delvaux, F.R., 2004. Sensory and instrumental flavour analysis of wort brewed with dark specialty malts. *J. Inst. Brew.* 110, 94–103. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2004.tb00188.x>
- Compendium, Methods, I., Winemust, O.F., 2019. Opendium of international methods of wine and must analysis. OIV.
- Cordero-Bueso, G., 2013. Aplicación Del Análisis Sensorial De Los Alimentos En La Cocina Y En La Industria Alimentaria, Cursos de Verano. Universidad Pablo de Olavode ,Sevilla.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.1.3548.4003>
- Cornuéjols, D., Pérez, S., 2010. Starch : a structural mystery, in: *Science in School*. Science in School, Springer., pp. 22–27.
- Cubillos, F.A., Gibson, B., Grijalva-Vallejos, N., Krogerus, K., Nikulin, J., 2019. Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast* 36, 383–398.
<https://doi.org/10.1002/yea.3380>
- da Costa Jardim, C., de Souza, D., Cristina Kasper Machado, I., Massochin Nunes Pinto, L., de Souza Ramos, R., Garavaglia, J., 2018. Sensory Profile, Consumer Preference and Chemical Composition of Craft Beers from Brazil. *Beverages* 4, 106.
<https://doi.org/10.3390/beverages4040106>
- Daenen, L., Saison, D., Sterckx, F., Delvaux, F.R., Verachtert, H., Derdelinckx, G., 2007. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *J. Appl. Microbiol.* 104, 478–488. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2007.03566.x>
- De Francesco, G., Turchetti, B., Sileoni, V., Marconi, O., Perretti, G., 2015. Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. *J. Inst. Brew.* 121, 113–121. <https://doi.org/10.1002/jib.185>
- Deacon, J.W., 2006. *Fungal Biology*, Annual Review of Entomology. Blacwell Publishing Ltda.

<https://doi.org/10.1146/annurev.en.11.010166.002231>

Del Fresno, J.M., Escott, C., Loira, I., Herbert-Pucheta, J.E., Schneider, R., Carrau, F., Cuerda, R., Morata, A., 2020. Impact of *Hanseniaspora Vineae* in Alcoholic Fermentation and Ageing on Lees of High-Quality White Wine. *Fermentation* 6, 66.

<https://doi.org/10.3390/fermentation6030066>

Domizio, P., House, J.F., Joseph, C.M.L., Bisson, L.F., Bamforth, C.W., 2016. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *J. Inst. Brew.* 122, 599–604.

<https://doi.org/10.1002/jib.362>

Dujon, B., 1996. The yeast genome project: What did we learn? *Trends Genet.* 12, 263–270.

[https://doi.org/10.1016/0168-9525\(96\)10027-5](https://doi.org/10.1016/0168-9525(96)10027-5)

Durello, R., Silva, L., Bogusz Jr., S., 2019. Química Do Lúpulo. *Quim. Nova* 42, 900–919.

<https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>

Dzialo, M.C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., Verstrepen, K.J., 2017. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiol. Rev.*

<https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>

Eblinger, H. michael, 2009. Handbook of brewing. Wiley -VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.1-164, 207-224.

Egli, C.M., Edinger, W.D., Mitrakul, C.M., Henick-Kling, T., 1998. Dynamics of indigenous and inoculated yeast populations and their effect on the sensory character of Riesling and Chardonnay wines. *J. Appl. Microbiol.* 85, 779–789. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00521.x>

Euromonitor International, 2019. Beer in Uruguay [WWW Document]. URL

<https://www.euromonitor.com/beer-in-uruguay/report>

Fowell, R.R., 1965. The Identification of Wild Yeast Colonies on Lysine Agar. *J. Appl. Bacteriol.* 28, 373–383. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1965.tb02167.x>

Fugelsang, K.C.C.G.E., 2007. Wine microbiology-Practical application and procedures, in: Springer (Ed.), .

Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A.,

- Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., Verstrepen, K.J., 2016. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell* 166, 1397-1410.e16.
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
- García, L., Herrero, M., González, Á., 2010. Tecnología de la elaboración de sidra. Equipamiento industrial. *Res. Gate* 197–221.
- Giannone, N., Medina, K., Boido, E., 2019. Caracterización físicoquímica de cervezas artesanales nacionales. ENAQUI, Montevideo, Uruguay.
- Giusiano, G.E., Mangiaterra, M.L., 1998. Rapid differentiation and presumptive identification of yeasts using *Candida* CHROM-agar medium. *Rev. Argent. Microbiol.* 30, 100–103.
- Goddard, M.R., Greig, D., 2015. *Saccharomyces cerevisiae*: A nomadic yeast with no niche? *FEMS Yeast Res.* 15, 1–6. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov009>
- Gonzalez-Minero, F., 2018. Estudio Botánico de la Cerveza Botanical Study of Beer.
<https://doi.org/10.13140/RG.2.2.17865.60003>
- Goretti, M., Turchetti, B., Cramarossa, M.R., Forti, L., Buzzini, P., 2013. Production of flavours and fragrances via bioreduction of (4R)-(-)-carvone and (1R)-(-)-myrtenal by non-conventional yeast whole-cells. *Molecules* 18, 5736–5748. <https://doi.org/10.3390/molecules18055736>
- Henick-Kling, T., Edinger, W., Daniel, P., Monk, P., 1998. Selective effects of sulfur dioxide and yeast starter culture addition on indigenous yeast populations and sensory characteristics of wine. *J. Appl. Microbiol.* 84, 865–876. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.1998.00423.x>
- Hieronimus, S., 2012. For the Love of Hops - The Practical Guide to Aroma, Bitterness and the Culture of Hops. Brwewrs publications. A division of the brewers association.
- Hill, A.E., Stewart, G.G., 2019. Free amino nitrogen in brewing. *Fermentation*.
<https://doi.org/10.3390/fermentation5010022>
- Holloway, P., Subden, R.E., Lachance, M.-A., 2013. The Yeasts in a Riesling Must From the Niagara Grape-Growing Region of Ontario. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 23, 212–216.
[https://doi.org/10.1016/s0315-5463\(90\)70245-3](https://doi.org/10.1016/s0315-5463(90)70245-3)
- Holloway, P., van Twest, R.A., Subden, R.E., Lachance, M.A., 1992. A strain of *Candida stellata* of

special interest to oenologists. *Food Res. Int.* 25, 147–149. [https://doi.org/10.1016/0963-9969\(92\)90157-Z](https://doi.org/10.1016/0963-9969(92)90157-Z)

Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M., 2018. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiol.* 72, 55–66.

<https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>

Hornsey, I.S., 1999. *Elaboración de cerveza. microbiología, bioquímica y tecnología*. The royal society of Chemistry.

Hough, J.S., 1990. *Biotechnología de la cerveza y de la malta*. J.S.Hough. Editorial ACRIBIA, S.A.

Hübner, F., Arendt, E.K., 2013. Germination of Cereal Grains as a Way to Improve the Nutritional Value: A Review. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 53, 853–861.

<https://doi.org/10.1080/10408398.2011.562060>

Junta Departamental de Montevideo, 2019. *Artesanal Decreto departamental aprobado*.

Kobus-Cisowska, J., Szymanowska-Powałowska, D., Szczepaniak, O., Kmiecik, D., Przeor, M., Gramza-Michałowska, A., Cielecka-Piontek, J., Smuga-Kogut, M., Szulc, P., 2019.

Composition and in vitro effects of cultivars of humulus lupulus L. Hops on cholinesterase activity and microbial growth. *Nutrients* 11, 1–14. <https://doi.org/10.3390/nu11061377>

Kunze, W., 2006a. *Tecnología Para Cerveceros y Malteros*. VLB Berlin, pp. 33–175.

Kunze, W., 2006b. *Tecnología para Cerveceros Y Malteros*. VLB Berlin, pp. 362–459.

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V., 2011a. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts, *The Yeasts*. Elsevier B.V.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>

Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., Robert, V., 2011b. Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. *The Yeasts* 1, 87–110.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>

Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, *Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73, 331–371.

<https://doi.org/10.1023/A:1001761008817>

- Lee, Y.J., Choi, Y.R., Lee, S.Y., Park, J.T., Shim, J.H., Park, K.H., Kim, J.W., 2011. Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. *Mycobiology* 39, 33–39. <https://doi.org/10.4489/MYCO.2011.39.1.033>
- Leroy, M., 1986. Incidence de la nature des souches de levure et des conditions de préparation des levains sur les phénomènes d'autolyse dans le Champagne. Thesis., Université de Bourgogne, Bourgogne.
- Libkind, D., Todd, C., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast 108, 14539–14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>
- Loviso, C.L., Libkind, D., 2019. Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores. *Rev. Argent. Microbiol.* <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.006>
- Loviso, C.L., Libkind, D., 2018. Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: Esters. *Rev. Argent. Microbiol.* 50, 436–446. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
- Madigan, M., Martinco, J., Parker, J., 2004. *Brock_Biology_Microorganisms.pdf*. Pearson Prentice Hall, pp. 418–490.
- Magadán, J.A., Fomento, M.-S.A.E., Lúpulo, D., Luís, J., Nadal -Hijos De Rivera, O., Juan, S.A., Andión -Ciam, P., Valladares, J., José, A.-C., García Pedreira-Ramisquido, M., Jaime Fernández Paz -Lafiga, S.L., 2011. *Guía del cultivo del Lúpulo*.
- Mallett, J., 2014. Malt - A Practical Guide from Field to Brewhouse. *Brew. Publ.* 53, 1689–1699. <https://doi.org/10.1017/CBO9781107415324.004>
- Martin, V., Jose Valera, M., Medina, K., Boido, E., Carrau, F., 2018. Oenological impact of the *Hanseniaspora/Kloeckera* yeast genus on wines — A review. *Fermentation* 4. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030076>
- Martini, A., Martini, A., 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie Van Leeuwenhoek* 53, 77–84. <https://doi.org/10.1007/BF00419503>
- Mateo, J., Huerta, T., Jiménez, M., Pastor, A., Gil, J.V., 2006. Aroma Compounds in Wine as Influenced by Apiculate Yeasts. *J. Food Sci.* 61, 1247–1250. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1996.tb10971.x>

- Medina, K., 2014. Biodiversidad de levaduras no saccharomyces: Efecto del metabolismo secundario en el color y el aroma de vinos de calidad. Universidad de la Republica-Uruguay.
- Medina, K., Boido, E., Dellacassa, E., Carrau, F., 2012. Growth of non-Saccharomyces yeasts affects nutrient availability for *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 157, 245–250. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.012>
- Medina, K., Boido, E., Fariña, L., Gioia, O., Gomez, M.E., Barquet, M., Gaggero, C., Dellacassa, E., Carrau, F., 2013. Increased flavour diversity of Chardonnay wines by spontaneous fermentation and co-fermentation with *Hanseniaspora vineae*. *Food Chem.* 141, 2513–2521. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2013.04.056>
- Medina, K., Ferreri, L., Fariña, L., Boido, E., Gaggero, C., Carrau, F.M., 2007. Aplicación de la levadura *Hanseniaspora vineae* en cultivos mixtos con *Saccharomyces cerevisiae* en la vinificación., in: *Revista Enología.* pp. 1–6.
- Meilgaard, 1975. Flavor chemistry of beer: part ii: flavour and threshold of 239 aroma volatiles, in: *Am., T.Q.M.B.A. (Ed.),* . pp. 151-168.
- Meilgaard, M.C., 1979. BEER FLAVOUR TERMINOLOGY¹ Joint Working Groups of the European Brewery Convention , the American Society of Brewing Chemists , and the Master Brewer ' s Association of the Americas have developed a system of flavour terminology to meet the dual needs of. *J. Inst. Brew.*, pp. 38–42.
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.J., Wagner, R.S., Hutzler, M., 2016. Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *J. Inst. Brew.* <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Miller, G.S.N.S.A. 2019., 2019. *Whisky Science.* Springer Nature Switzerland. <https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-030-13732-8>
- Monerawela, C., Bond, U., 2017. Recombination sites on hybrid chromosomes in *Saccharomyces pastorianus* share common sequence motifs and define a complex evolutionary relationship between group I and II lager yeasts. *FEMS Yeast Res.* 17, 1–12. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox047>
- Morata, A., Loira, I., Tesfaye, W., Bañuelos, M.A., González, C., Suárez Lepe, J.A., 2018. *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation* 4.

<https://doi.org/10.3390/fermentation4030053>

- Moreno, F., 2011. Tesis-Determinación del contenido de betaglucanos en líneas avanzadas y en variedades de cebada, procesada y no procesada, por medio de un método enzimático.
- Morris, E.O., Eddy, A.A., 1957. Brewing Industry Foundation Method for the Measurement of Wild Yeast. *J. Inst. Brew.* 63, 34–35.
- Mujica, 2018. Las cervecerías artesanales buscan crecer sin perder su esencia., in: *El Observador*.
- Muñoz, S., Tobeña, A., 2009. Nitrógeno fácilmente asimilable. Sorensen vs. PAN/Amonio. Departamento de Investigación y Desarrollo. División Reactivos. BioSystems S.A. Introducción, pp. 2–5.
- N'Guessan, F.K., N'Dri, D.Y., Camara, F., Djè, M.K., 2010. *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida tropicalis* as starter cultures for the alcoholic fermentation of tchapalo, a traditional sorghum beer. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 26, 693–699. <https://doi.org/10.1007/s11274-009-0224-y>
- Nelson, K., Stojanovska, L., Vasiljevic, T., Mathai, M., 2013. Germinated grains: A superior whole grain functional food? *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 91, 429–441. <https://doi.org/10.1139/cjpp-2012-0351>
- Olaniran, A.O., Hiralal, L., Mokoena, M.P., Pillay, B., 2017. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *J. Inst. Brew.* <https://doi.org/10.1002/jib.389>
- Pallmann, C.L., Brown, J.A., Olineka, T.L., Cocolin, L., Mills, D.A., Bisson, L.F., 2001. Use of WL Medium to Profile Native Flora. *Am. J. Enol. Vitic.* 52, 198–203.
- Palmer, J., Kaminski, C., 2013. *Water a comprehensive Guide for brewers.* Brewers association.
- Passoth, V., Fredlund, E., Druvefors, U.Ä., Schnürer, J., 2006. Biotechnology, physiology and genetics of the yeast *Pichia anomala*. *FEMS Yeast Res.* 6, 3–13. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2005.00004.x>
- Pasteur, L., 1876. *Études sur la Bière.* Gauthier-Villars, Imprimeur-Libraire., p. 432.
- Paula Jaramillo, P., de Alexander Vega, M., Portier David Jara Negrete, A., 2016. *Empresarial (I).* *Rev. Gestión* 50–55.
- Pérez, G., Fariña, L., Barquet, M., Boido, E., Gaggero, C., Dellacassa, E., Carrau, F., 2011. A quick

screening method to identify β -glucosidase activity in native wine yeast strains: Application of Esculin Glycerol Agar (EGA) medium. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 27, 47–55.

<https://doi.org/10.1007/s11274-010-0425-4>

Pérez Giffoni, G., 2008. Selección de levaduras con actividad beta glucosidasa y capacidad de modificar el índice glicosil-glucosa en vinos. *UdelaR*.

Perez, S., Bertoft, E., 2010. The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules : A comprehensive review 389–420.

<https://doi.org/10.1002/star.201000013>

Petruzzi, L., Rosaria Corbo, M., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A., 2016. Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. *Food Rev. Int.* 32, 341–363. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1075211>

Pires, E., Brányik, T., 2015. *Biochemistry of Beer Fermentation*. Springer.

<https://doi.org/https://doi.org/10.1007/978-3-319-15189-2>

Pires, E.J., Teixeira, J.A., Brányik, T., Vicente, A.A., 2014. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>

Poelmans, E., Swinnen, F.M.J., 2015. A brief economic history of beer. 3–28. <https://doi.org/DOI:10.1093/acprof:oso/9780199693801.003.0001> CITA

Portal Montevideo, 2020. *Negocios & Tendencias*. El consumo de cerveza artesanal ha aumentado en Uruguay., in: <https://www.Montevideo.Com.Uy/Negocios-y-Tendencia>.

Prieto Méndez, J., Rubio Hinojosa, C.U., Román Gutiérrez, A., Méndez Marzo, M.A., González Ramirez, C.A., Prieto García, F., 2009. Degradación física del almidón de cebada (*Hordeum sativum* Jess). Correlación entre la gelatinización y el tamaño de gránulos. *Multiciencias* 9, 115–125.

Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y., Ashikari, T., 2006. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 3968–3974.

<https://doi.org/10.1128/AEM.02769-05>

Rainieri, S., Zambonelli, C., Kaneko, Y., 2003. *Saccharomyces sensu stricto*: Systematics, genetic

- diversity and evolution. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 1–9. <https://doi.org/10.1263/jbb.96.1>
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., Dubourdieu, D., 1998. *Traité d’oenologia. 2 - Chimie du vin. Stabilisation et traitements.* Danod, Paris.
- Roland, Aurelie; Cavelier, Florine; Schneider, R., 2013. Los tiales varietales: información actualizada sobre las vías de la biogenesis y el impacto de técnicas vitivinícolas.
- Roldan Crespo, V.M., 2018. *Diseño de una planta industrial cervecera.* Universidad de Sevilla.
- Rollero, S., Bloem, A., Ortiz-Julien, A., Camarasa, C., Divol, B., 2018. Altered fermentation performances, growth, and metabolic footprints reveal competition for nutrients between yeast species inoculated in synthetic grape juice-like medium. *Front. Microbiol.* 9, 1–12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00196>
- Rychlik, M., Schieberle, P., Grosch, W., Al., E., 1998. *Compilation of Odor Thresholds, Odor Qualities and Retention Indices of Key Food Odorants.* Deutsche Forschungsanstalt für Lebensmittelchemie and Institut für Lebensmittelchemie der Technischen Universität München, Germany.
- Saerens, Swiegers, 2014. Production of low-alcohol or alcohol-free beer with *Pichia kluyveri* yeast strains. Patent WO2014135673 A2.
- San-Juan, F., Ferreira, V., Cacho, J., Escudero, A., 2011. Quality and aromatic sensory descriptors (mainly fresh and dry fruit character) of spanish red wines can be predicted from their aroma-active chemical composition. *J. Agric. Food Chem.* 59, 7916–7924. <https://doi.org/10.1021/jf1048657>
- Sancho Saurina, R., 2015. *Diseño de una micro-planta de fabricación de cerveza y estudio de técnicas y procesos de producción.* Tesis Dr. Univ. Politècnica Catalunya 121.
- Saninno, 2019. Non-conventional yeasts for Producing Alternative Beers, in: *Non-Conventional Yeasts: From Basic Research to Application.* pp. 1–568. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3>
- Schinca, Medina, Ares, 2019. “La cerveza en la cabeza”. [WWW Document]. Sect. Ciencia, La Diaria. URL <https://ladiaria.com.uy/ciencia/articulo/2019/3/investigadores-llevan-a-cabo-estudio-para-determinar-como-por-que-y-que-tipos-de-cerveza-artesanal-consumen-los-uruguayos/>

- Schoch, C.L., Sung, G.H., López-Giráldez, F., Townsend, J.P., Miadlikowska, J., Hofstetter, V., Robbertse, B., Matheny, P.B., Kauff, F., Wang, Z., Gueidan, C., Andrie, R.M., Trippe, K., Ciufetti, L.M., Wynns, A., Fraker, E., Hodkinson, B.P., Bonito, G., Groenewald, J.Z., Arzanlou, M., Sybren De Hoog, G., Crous, P.W., Hewitt, D., Pfister, D.H., Peterson, K., Gryzenhout, M., Wingfield, M.J., Aptroot, A., Suh, S.O., Blackwell, M., Hillis, D.M., Griffith, G.W., Castlebury, L.A., Rossman, A.Y., Lumbsch, H.T., Lücking, R., Buedel, B., Rauhut, A., Diederich, P., Ertz, D., Geiser, D.M., Hosaka, K., Inderbitzin, P., Kohlmeyer, J., Volkmann-Kohlmeyer, B., Mostert, L., O'Donnell, K., Sipman, H., Rogers, J.D., Shoemaker, R.A., Sugiyama, J., Summerbell, R.C., Untereiner, W., Johnston, P.R., Stenroos, S., Zuccaro, A., Dyer, P.S., Crittenden, P.D., Cole, M.S., Hansen, K., Trappe, J.M., Yahr, R., Lutzoni, F., Spatafora, J.W., 2009. The ascomycota tree of life: A phylum-wide phylogeny clarifies the origin and evolution of fundamental reproductive and ecological traits. *Syst. Biol.* 58, 224–239.
<https://doi.org/10.1093/sysbio/syp020>
- Soden, A., 1994. The fermentation properties of non-Saccharomyces wine yeasts and their interaction with *Saccharomyces cerevisiae*. *Neurobiology* 91, 7844–7848.
- Soden, A., Francis, I.L., Oakey, H., Henschke, P.A., 2000. Effects of co-fermentation with *Candida stellata* and *Saccharomyces cerevisiae* on the aroma and composition of Chardonnay wine. *Aust. J. Grape Wine Res.* 6, 21–30. <https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2000.tb00158.x>
- Spencer, J.F.T., Ragout de Spencer, A.L., Gump, B.H., Zoecklein, B.W., Fugelsang, K.C., 2003. Prediction of Prefermentation Nutritional Status of Grape Juice: The Formol Method. *Food Microbiol. Protoc.* 14, 283–296. <https://doi.org/10.1385/1-59259-029-2:283>
- Spitaels, F., Wieme, A.D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H.M., Van Landschoot, A., De Vuyst, L., Vandamme, P., 2014. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS One* 9. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384>
- Steenackers, B., De Cooman, L., De Vos, D., 2015. Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chem.* 172, 742–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J., 2015. *Brettanomyces* yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int. J. Food Microbiol.* 206, 24–38.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>

- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N., Antonio, G.-R., Amarilys, C., ., 2016. Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Inst. Cuba. Investig. sobre los Deriv. la Caña Azucar 50, 20–28.
- Suárez, M., 2013. Cerveza: componentes y propiedades. Universidad de Oviedo.
- Swangkeaw, J., Vichitphan, S., Butzke, C.E., Vichitphan, K., 2014. The characterisation of a novel *Pichia anomala* β -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine The characterisation of a novel *Pichia anomala* β -glucosidase with potentially aroma-enhancing capabilities in wine. <https://doi.org/10.1007/BF03178336>
- Swiegers, J.H., Saerens, S.M.G., Pretorius, I.S., 2009. The Development of Yeast Strains as Tools for Adjusting the Flavor of Fermented Beverages to Market Specifications. *Biotechnol. Flavor Prod.* 1–55. <https://doi.org/10.1002/9781444302493.ch1>
- Technical Committe, A., 2011a. Beer-9 pH. *ASBC Methods Anal.* 1990. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Beer-9>
- Technical Committe, A., 2011b. Alcohol, Beer -4 [WWW Document]. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Beer-4>
- Technical Committe, A., 2011c. Total Acidity. *ASBC Methods Anal.* 1–2. <https://doi.org/10.1094/asbcmoa-beer-8>
- van Breda, V., Jolly, N., van Wyk, J., 2013. Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 80–88. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.02.011>
- Van Cleemput, M., Catoor, K., De Bosscher, K., Haegeman, G., Keukeleire, D. De, Heyerick, A., 2008. HOP (*Humulus*). *Westcott's Plant Dis. Handb.* 910–910. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-4585-1_2080
- Vandamme, E.J., Soetaert, W., 2002. Bioflavours and fragrances via fermentation and biocatalysis. *J. Chem. Technol. Biotechnol.* 77, 1323–1332. <https://doi.org/10.1002/jctb.722>
- Varela, C., 2016. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100, 9861–9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>
- Varela, C., Siebert, T., Cozzolino, D., Rose, L., McLean, H., Henschke, P.A., 2009. Discovering a

chemical basis for differentiating wines made by fermentation with “wild” indigenous and inoculated yeasts: Role of yeast volatile compounds. *Aust. J. Grape Wine Res.* 15, 238–248.
<https://doi.org/10.1111/j.1755-0238.2009.00054.x>

Vejarano, R., 2018. *Saccharomyces ludwigii*, control and potential uses in winemaking processes. *Fermentation* 4, 1–19. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030071>

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R., Box, P.O., Osmond, G., Sa, A., 2003. Flavor-active-esters-Adding-fruitiness-to-beer_2003_Journal-of-Bioscience-and-Bioengineering. *J. Biosci. Bioeng.* 96, 110–118.
[https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5)

Verzele, M., 1986. Centenary review 100 years of hop chemistry and its relevance to brewing 92, 32–48.

Viana, F., Belloch, C., Vallés, S., Manzanares, P., 2011. Monitoring a mixed starter of *Hanseniaspora vineae*-*Saccharomyces cerevisiae* in natural must: Impact on 2-phenylethyl acetate production. *Int. J. Food Microbiol.* 151, 235–240.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.09.005>

Walker, G.M., 2011. *Pichia anomala*: Cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 99, 25–34.
<https://doi.org/10.1007/s10482-010-9491-8>

White, C., Zainasheff, J., 2010. *Yeast: The practical guide to beer fermentation*. Brew. Assoc.

Whittaker., D., 1972. *Chemistry of terpenes and terpenoids.*, A.A. Newma. ed. Academic Press, London.

Yalcin, T.H., Corbaci, C., 2013. Isolation and Characterization of Amylase Producing Yeasts and Improvement of Amylase Production. *Turkish J. Biochem.* 38, 101–108.
<https://doi.org/10.5505/tjb.2013.95866>