



Área
**Enología y
Biotecnología**
de Fermentaciones
Facultad de Química



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY

Utilización de levaduras del género *Dekkera/Brettanomyces* para la elaboración de cervezas innovadoras.

Tesis de grado - Licenciatura en Química

Sebastián Moreira Rodríguez

Tutora: Dra. Karina Medina

Área Enología y Biotecnología de Fermentaciones
Facultad de Química – Universidad de la República

Índice

Introducción.....	3
Objetivos.....	5
Objetivo General.....	5
Objetivos Específicos	5
Materiales y métodos.....	5
Recopilación bibliográfica	5
Estudio de mercado.....	5
Análisis de datos resultantes de la encuesta.....	6
Desarrollo de producto.....	7
Proceso de elaboración de cerveza.....	7
Evaluación de estrategia innovadora para elaboración de un nuevo estilo cervecero nacional.....	8
Resultados y Discusión.....	9
Comparación taxonómica entre distintas especies del género.....	9
Capacidad fermentativa.	17
Compuestos aromáticos producidos por <i>Brettanomyces/Dekkera</i>	18
Estudio de mercado.....	21
Demografía.....	21
Análisis cuantitativo.....	22
Análisis cualitativo.....	34
Desarrollo de producto.....	36
Conclusiones.....	46
Anexo	47
Bibliografía.....	50

Introducción

La cerveza es uno de los productos biotecnológicos más antiguos que ha tenido un gran impacto en aspectos nutricionales, sociales, científicos y económicos. La cerveza combina cereales malteados, lúpulo y agua para crear un mosto que es fermentado por levaduras/bacterias autóctonas o, más típicamente, por cultivos puros de *Saccharomyces*. Según datos arqueológicos, la cerveza puede ser rastreada hacia las primeras sociedades agricultoras aproximadamente 10.000 años atrás, coincidiendo con la domesticación de los cereales. En la actualidad, el consumo de cerveza a nivel mundial se ha incrementado y la industria cervecera está mostrando un crecimiento generalizado. Es por esto, que se investiga el uso de levaduras no-*Saccharomyces* para la elaboración de productos nuevos, con perfiles de flavour (combinación de aromas, sabores y sensaciones percibidas en boca) novedosos o propiedades innovadoras y solicitadas por el mercado como ser cervezas con perfiles sensoriales innovadores, cervezas reducidas en calorías, cervezas sin alcohol, cervezas funcionales, etc. (Burini et al., 2021; Menoncin & Bonatto, 2019).

El nombre *Brettanomyces* viene del griego y significa "hongo británico". Niels Hjelte Claussen de la cervecería New Carlsberg fue quien mencionó por primera vez este género en 1904, mientras buscaba una respuesta para las peculiares características encontradas en las English Stock Ales (cervezas inglesas comunes): espuma abundante y duradera, sustancias ácidas y volátiles, entre otras. Su meta fue describir específicamente a la levadura necesaria para producir estas cervezas. Las mismas tenían una segunda fermentación en barril, en el cual había presencia de estas levaduras de forma natural, o se adicionaban al mismo; esto es lo que les daba su toque característico a las cervezas clásicas ales inglesas. Él le asignó el nombre *Brettanomyces* y fue reconocida como género en los 1920s cuando una levadura similar fue aislada de cervezas Lámbicas en Bélgica (Menoncin & Bonatto, 2019; White, C., & Zainasheff, 2010). En los años 1950-1960, las levaduras fueron identificadas como *Brettanomyces spp.* y fueron posteriormente aisladas de vino en Francia, Italia y Sudáfrica. Sin embargo, no fue sino entre los años 1980-1990 que esta levadura fue caracterizada por su habilidad para impartir un aroma característico a los vinos (Menoncin & Bonatto, 2019; Wedral et al., 2010).

Brettanomyces spp puede ser encontrada en productos tradicionales de vino y cerveza, usando cultivos autóctonos, y actualmente ha sido aislada de una gran variedad de productos y lugares como ser: vinos y equipamiento de industria vitivinícola, cerveza (en particular las lámbicas), sidras, fábricas de sidra de manzana, tequila, equipamiento de industria láctea, kombucha, kéfir, té, olivas, cáscara de frutas, barriles de madera, etc. *Brettanomyces* es encontrada en estos productos debido a su habilidad para sobrevivir por largos períodos y comenzar su crecimiento en productos estibados o en maduración (Basso et al., 2016; Wedral et al., 2010).

Brettanomyces es una levadura semi domesticada que es crucial para la elaboración de cervezas lámbicas y está ganando cada vez más la atención de la industria cervecera. Presenta similitudes con *Saccharomyces*, como ser efecto crabtree positivo (la respiración se ve inhibida por la presencia de glucosa, posibilitando la fermentación en condiciones aerobias), síntesis de etanol y tolerancia a ambientes hostiles (Basso et al.,

2016; Recherches, 1966; Steensels & Verstrepen, 2014). Adicionalmente, *Brettanomyces* presenta actividades enzimáticas β -glucosidasa y esterasa, así como la habilidad de fermentar dextrinas y romper la celobiosa de las barricas de madera (Menoncin & Bonatto, 2019; Serra Colomer et al., 2019). Por otra parte, son conocidos sus efectos positivos a los flavours, aromas y atenuación en estilos de cervezas belgas como ser las lámbricas y la gueuze, a las cuales le otorgan su sabor particular. Aplicadas de forma correcta pueden contribuir con flavours exóticos como ser piña, mango, pera, uva por lo que hoy en día son muy utilizadas en la elaboración de cervezas artesanales. Con el crecimiento de la cervecería artesanal, de la mano con descubrimientos científicos, se han ampliado las aplicaciones de *Brettanomyces* para generar nuevos sabores en estilos de cerveza aún no explorados. Las prácticas de producción de cerveza modernas como ser las prácticas higiénicas, sanitización, niveles altos de dióxido de carbono y contenidos bajos de nitrógeno, han hecho que la presencia de *Brettanomyces* como contaminación y no como parte del proceso sea muy poco frecuente, por lo que su uso está más controlado (Basso et al., 2016; Gibson et al., 2017; Menoncin & Bonatto, 2019; Serra Colomer et al., 2019).

En la industria del vino, *Brettanomyces spp.* es una levadura autóctona contaminante que puede crecer durante la fermentación y fundamentalmente durante la crianza, impactando en su sabor y aroma. Las características de flavour son en general descritas como fenólicas/medicinales, especiada, clavo de olor, tierra, establo y caballo. La aceptabilidad de los flavours inducidos por *Brettanomyces* depende de su intensidad, preferencias personales y expectativas del consumidor. Las levaduras han sido aisladas de uvas, barriles y equipamiento de la industria vitivinícola. El impacto de estas levaduras se da en vinos de todas las regiones productoras importantes del mundo, con defectos encontrados mayoritariamente en vinos tintos. La prevención del crecimiento de esta levadura en vinos requiere atención a la calidad del fruto y la sanitización del equipamiento, control de los niveles de sulfito y oxígeno y el uso de barriles no contaminados. Se requiere mayor conocimiento en como los metabolitos aportados por *Brettanomyces* contribuyen al perfil sensorial del vino, para evaluar su impacto en la aceptabilidad del consumidor. En la actualidad, el deterioro por *Brettanomyces* en vinos ocurre principalmente en aquellos vinos fermentados o añejados en barriles de roble, dado que la levadura tiene una velocidad de crecimiento lenta por lo que necesita tiempo para liberar flavours al producto final (Wedral et al., 2010).

Objetivos

Objetivo General

Realizar el desarrollo teórico de un producto innovador utilizando levaduras del género *Dekkera/Brettanomyces*, que puedan tener un impacto en la mejora sensorial de la industria nacional de cerveza artesanal.

Objetivos Específicos

- Recopilación bibliográfica de la utilización de estas levaduras en cultivos puros y mixtos.
- Comparación taxonómica entre distintas especies de levaduras del género *Dekkera/Brettanomyces*.
- Análisis teórico de la capacidad fermentativa de estas levaduras en cervezas.
- Análisis teórico de los compuestos aromáticos producidos por estas levaduras en cervezas y su impacto sensorial.
- Realizar estudio de mercado, mediante encuestas de opinión sobre la incorporación de nuevos estilos cerveceros al portafolio de productos actualmente existentes.
- Desarrollar un producto innovador que aporte al mercado local.
- Realizar la descripción teórica del producto final a obtener, desde el punto de vista de su perfil aromático y sensorial.
- En función del objetivo específico anterior, concluir en la definición de uno o dos estilos cerveceros a diseñar.

Materiales y métodos

A continuación, se describen los materiales y métodos utilizados para el cumplimiento de los objetivos específicos del trabajo de tesis.

Recopilación bibliográfica: Análisis y comparación de información. Se analizó información para realizar una comparación taxonómica entre distintas especies de *Dekkera/Brettanomyces*, realizando la comparación en cuanto a morfología microscópica y macroscópica reportada, forma de reproducción, propiedades bioquímicas reportadas y principalmente por la producción de compuestos volátiles.

Estudio de mercado: Para esta etapa, se tomó como antecedente los trabajos de encuesta online realizados en el marco de una tesis de Maestría en Biotecnología (aún en ejecución), realizada por una estudiante de posgrado de la tutora de la presente propuesta (Schinca et al., 2019).

Para el estudio de mercado se realizó una encuesta de consumo (tabla 1). La misma se creó en la plataforma Formularios de Google y consistió en preguntas de múltiple opción (MO), preguntas dicotómicas (D) y preguntas de respuesta abierta en formato texto libre

(A). Como información demográfica se consideró relevante consultar solamente por la edad, para de esta forma evaluar el rango etario objetivo del desarrollo de producto.

Edad
¿Consumís cervezas artesanales? (D)
¿En qué situaciones consumís cerveza artesanal? (A)
¿Con qué frecuencia consumís cervezas artesanales? (MO)
¿Qué estilos de cerveza son los que más consumís? (Máximo 3 opciones) (MO)
¿Conocés las cervezas lámbicas? (D)
¿Cuál es la característica que más te atrae o atraería al momento de consumir cervezas lámbicas? (MO)
Respecto a sabor y aroma de las cervezas lámbicas ¿qué notas te parecen/parecerían deseables? (Podés elegir más de una opción) (MO)
¿Conocés alguna cerveza lámbica uruguaya? (D)
¿Compraría una cerveza lámbica nacional? (MO)
¿En qué situación/ocasión elegirías consumir este estilo de cerveza? (A)
¿En qué estación del año sentís que preferirías consumir este tipo de cervezas? (MO)

Tabla 1. Lista de preguntas realizadas en la encuesta a consumidores

La encuesta estuvo abierta por un período de 3 semanas y se recabaron 252 respuestas. Luego de la pregunta “¿Conocés las cervezas lámbicas?” se pasaba a la segunda parte del formulario, donde había un breve texto enunciando “*Las cervezas lámbicas son cervezas elaboradas por fermentación con levaduras no tradicionales (Brettanomyces).*” La idea de este breve texto era poner a la persona encuestada en contexto para responder el siguiente set de preguntas, teniendo así información para establecer sus expectativas del producto.

Análisis de datos resultantes de la encuesta

Se procedió al análisis de resultados estudiando primero la pregunta de carácter demográfico (edad) y luego separando entre respuestas de análisis cuantitativo y cualitativo.

Para el análisis de datos cuantitativo se utilizó principalmente porcentajes, segregando por rangos etáreos. A su vez se realizaron cruzamientos entre preguntas para obtener información más exhaustiva.

Para el análisis cualitativo se utilizó el análisis de contenido según Krippendorff, 2004.

Como primer paso se procedió al depurado de los datos. Se ajustaron las respuestas según palabras clave que aparecieran en el texto de la respuesta otorgada por la persona encuestada, para obtener las palabras principales que reflejen el concepto principal de la respuesta y así poder realizar el análisis de datos (por ejemplo, “Casi nunca, pero si tomo es cuando salgo con amigues alguna noche de salida tranqui” quedaría como “Circunstancial, Salidas, Amigxs, Noche”; “Cada tanto” quedaría como “Ocasional”, etc.). Esto también facilita unificar errores de sintaxis, faltas de ortografía y respuestas incoherentes o mal formuladas.

Luego para el análisis de los datos, se procedió a generar clusters o categorías para agrupar según el tipo de respuesta (Sensaciones, Personas, Entorno, etc.)

Desarrollo de producto

Proceso de elaboración de cerveza

Se procede a realizar una breve descripción del proceso de elaboración que se realizaría de acuerdo con Stewart et al., 2018 (figura 1)

Figura 1. Diagrama de proceso de elaboración de cerveza.



1. **Molienda:** Se muele la cebada malteada para romper su cáscara y liberar las enzimas que degradarán al almidón a azúcares fermentables.
2. **Macerado:** El grano ya molido se mezcla con agua previamente calentada en una olla de doble fondo. Este es el momento en el que el almidón es hidrolizado. Para que este proceso se lleve de forma óptima, se debe mantener una temperatura de entre 63°C y 68°C por un tiempo determinado (en general 1h).
3. **Lavado del grano:** Se separa el líquido (mosto) del grano mediante una bomba que recircula el mosto y luego lo pasa a la olla de hervor. A medida que el mosto va saliendo del macerador, se incorpora agua a 73°C - 74°C a fin de terminar de desprender los azúcares, cortar el proceso enzimático y dejar al mosto en la densidad deseada.
4. **Hervido:** Durante 60 o 90 min el mosto debe hervir vigorosamente. Es distintas etapas del hervor se incorpora el lúpulo (una o más variedades) que se encarga de otorgar sabor, olor y amargor a la cerveza.
5. **Whirlpool:** Se genera un torbellino en el centro de la olla a efectos de mezclar bien el lúpulo y generar la decantación de este y otros sólidos que puedan estar en suspensión.
6. **Enfriamiento:** El enfriamiento tiene que ser rápido a efectos de evitar la contaminación del mosto. Se hace con un serpentín por el cual corre agua fría que se coloca en la olla de hervido (o por sistema contracorriente). A nivel industrial se utiliza un intercambiador de calor por el cual pasa un refrigerante. El mosto debe llegar a los 20°C en menos de 1h.
7. **Fermentación:** Una vez enfriado el mosto, se coloca en un fermentador, en el que se incorporará la levadura que será la encargada de metabolizar los azúcares para generar dióxido de carbono y alcohol, además de generar aromas. Se dejará fermentar durante una semana o más entre 15°C y 23°C para levaduras Ale y alrededor de los 12°C para levaduras Lager. La idea es llegar a una concentración de azúcares tal que asegure el nivel alcohólico y cuerpo buscados.
8. **Madurado:** Una vez que la levadura flocula (hacia la superficie en cervezas Ale y hacia el fondo en levaduras Lager), se traspasa el líquido a otro tanque (o

recipiente) para permanecer allí de 10 días a 6 meses (dependiendo del estilo) para madurar, de modo que se unifiquen todos los sabores y ocurra la carbonatación.

9. **Filtrado:** Una vez obtenida la cerveza madurada se puede proceder a su filtrado, a fin de evitar el pasaje de levaduras u otros sólidos en suspensión que puedan haber quedado.
10. **Envasado:** Luego de tener la cerveza filtrada se procede a su envasado en botellas de vidrio.

Utilizando como insumo los puntos anteriores y el proceso de elaboración mencionado previamente, se realizó el diseño de un producto nuevo teniendo como marco de referencia las guía de estilos del Beer Judge Certification Program (Strong, 2021) y de la Brewers Association (Swersey et al., 2012).

Evaluación de estrategia innovadora para elaboración de un nuevo estilo cervecero nacional.

Teniendo en cuenta el estilo a diseñar, se procedió a evaluar procedimientos de elaboración acordes al producto deseado utilizando un enfoque teórico.

Resultados y Discusión

Comparación taxonómica entre distintas especies del género.

Brettanomyces spp. constituye la forma no esporuladas del género *Dekkera*. Actualmente el género *Brettanomyces* incluye seis especies reconocidas dentro de la forma anamorfa (asexual) y dos especies en su forma teleomorfa (sexual).

Las especies anamorfas son *B. bruxellensis* (figura 2) – que incluye *B. intermedia*, *B. lambicus* (figura 3) y *B. custersii*; *B. anomalus* – que incluye *B. clausenii* (figura 4), *B. custerianus* y *B. naardenensis*; *B. nanus* y la novelmente propuesta *B. acidodurans*.

Las especies teleomorfas son *Dekkera bruxellensis* y *Dekkera anómala*.

Brettanomyces y *Dekkera* son usualmente utilizados como sinónimos (Menoncin & Bonatto, 2019; Wedral et al., 2010; White, C., & Zainasheff, 2010).

Figura 2. *Brettanomyces bruxellensis* (WLP650) en agar MYPG (agar con extracto de malta, extracto de levadura, peptona y glucosa). Casi todas las colonias forman un patrón similar al de un dólar de arena o galleta de mar en la parte superior del cultivo con una cúpula redonda en el centro (Yacobson, 2010)

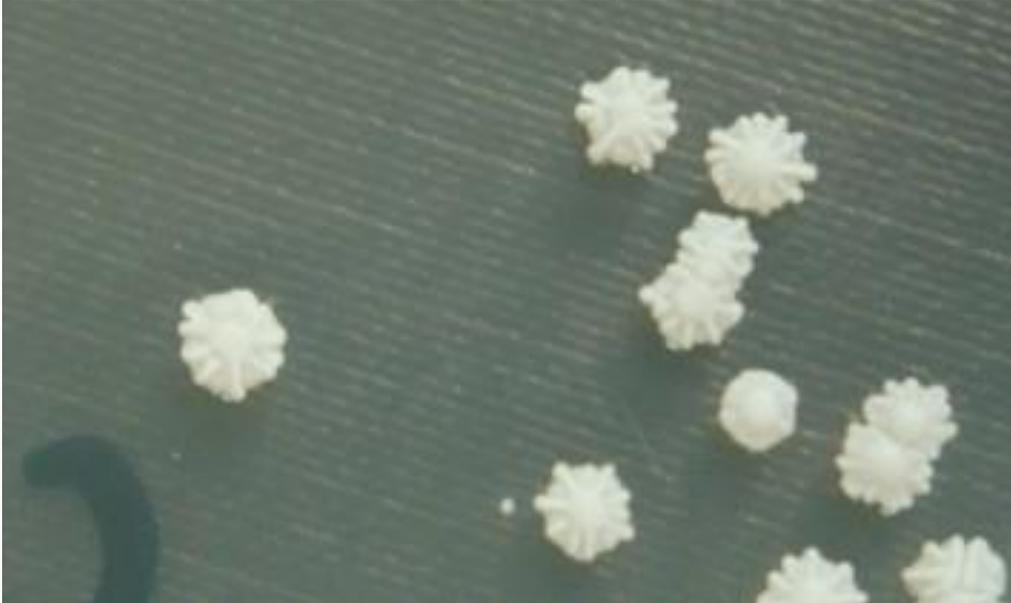


Figura 3. *B. lambicus* (WLP653) colonia única en medio WLN creciendo en cultivo mixto con *Saccharomyces sp.* (Yacobson, 2010).



Figura 4. *Brettanomyces clausenii* (WLP645) cultivado en agar MYPG. Colonias blancas normales y redondas con un aspecto más bien plano (Yacobson, 2010).



Brettanomyces y su forma teleomorfa *Dekkera* son principalmente asociadas con el deterioro del vino. La especie más asociada a este deterioro es *B. bruxellensis*, la cual ha sido aislada de superficies de barriles. Si bien estas especies son utilizadas en algunos procesos de elaboración de cerveza, también pueden tener un efecto negativo produciendo compuestos que son considerados "off-flavours". Este fenómeno de *Dekkera/Brettanomyces* como microorganismo contaminante puede darse durante la fermentación alcohólica, el acondicionamiento y el trasiego de tanques a barriles.

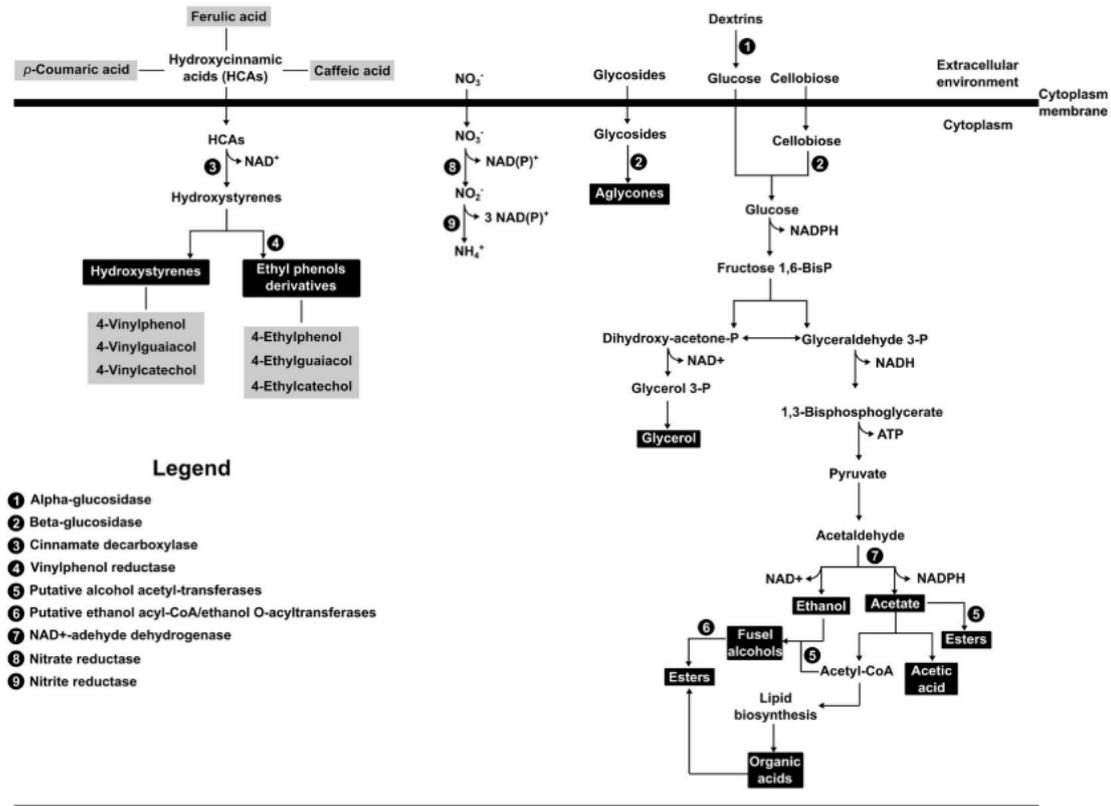
Son características de esta levadura una temperatura óptima de fermentación de entre 21-25°C; floculación baja (capacidad para aglomerarse sobre el fondo de los recipientes) y atenuación alta (buena capacidad fermentativa) (Menoncin & Bonatto, 2019; Steensels et al., 2015; Wedral et al., 2010).

Estas levaduras tienen necesidades metabólicas distintas a las *Saccharomyces*, por lo que pueden ser usadas tanto en cultivo puro como en cultivo mixto con cepas

autóctonas ya conocidas de *Saccharomyces*. *Dekkera/Brettanomyces*, tienen alta tolerancia al etanol y fermentan los azúcares residuales que quedan de la fermentación del almidón por parte de *S. cerevisiae* (dextrinas) además de un amplio espectro de monosacáridos, disacáridos y trisacáridos (Basso et al., 2016; Serra Colomer et al., 2019; Steensels et al., 2015). Yendo más a fondo en la utilización de azúcares como fuente de carbono, los estudios muestran que en general todas las cepas crecen de forma eficiente en presencia de glucosa, confirmando que este es el sustrato favorito de las especies de *Brettanomyces*. Sin embargo, cuando se aplica la maltosa como única fuente de carbono, se observa variabilidad de respuestas. La maltosa es en general utilizada en proporciones más bajas que la glucosa, y varias cepas no son capaces de asimilarla. Estos resultados indican que la actividad α -glucosidasa es muy variable entre especies de *Brettanomyces*, llegando incluso algunas cepas a carecer de esta enzima. Generalmente, hay una fase lag prolongada cuando la maltosa está presente, lo que podría indicar que está involucrado en su metabolismo un mecanismo que requiere adaptación temporal (Colomer et al., 2020).

Respecto al crecimiento en medio con celobiosa como fuente de carbono, esto está altamente correlacionado con la actividad β -glucosidasa en la fracción extracelular. Son dos las β -glucosidasas que pueden ser encontradas en *B. bruxellensis*, algunas cepas pueden tener ambas enzimas, otras solo una o incluso carecer de ella. Las cepas que no poseen ningún ORF (una secuencia de ARN comprendida entre un codón de inicio (AUG) y un codón de terminación, sin tomar en cuenta las secuencias que corresponden a los intrones) o el ORF BbBGL1 simplemente no crecen eficientemente en celobiosa, y en consecuencia no se observa actividad β -glucosidasa. En contraste, las cepas que poseen el ORF BbBGL2 o ambas ORF muestran crecimiento abundante en celobiosa y actividad extracelular de β -glucosidasa. Estos resultados indican claramente que BbBGL2 juega un rol más importante en el kit de β -glucosidasas mientras que el rol de BbBGL1 es mínimo. El resto de las especies de *Brettanomyces* pueden crecer eficientemente en celobiosa y presentan alta actividad β -glucosidasa (Colomer et al., 2020). Las vías metabólicas utilizadas por *Brettanomyces* pueden ser observadas en la figura 5.

Figura 5. Diagrama esquemático de los principales caminos metabólicos en las especies de *Brettanomyces* durante la fermentación de cerveza, con foco en las enzimas clave para la biosíntesis de compuestos con actividad flavour y la regulación del balance redox (NAD/NADH) asociado con el efecto Custer. Los compuestos con actividad flavour están identificados con cuadros negros y grises. Las principales enzimas responsables de la generación de compuestos con actividad flavour están indicadas con números dentro de círculos negros e identificadas debajo a la izquierda (Menoncin & Bonatto, 2019).



El número de genomas secuenciados de diferentes especies de *Brettanomyces* son muy pocos y esto limita la evaluación de la diversidad taxonómica del género. De quien se tiene más información es de *B. bruxellensis* (cepas AWRI1499, CBS 2499, AWRI1608, AWRI1613, YV397, CBS2796, BioProject PRJEB11548 y PRJEB2162). También se han reportado las secuencias para *B. anomalus* (YV396) y *B. naardenensis* (CBS7540) (Menoncin & Bonatto, 2019). A pesar de la falta de datos sobre el genoma, se han realizado algunos estudios iniciales enfocándose en su estructura y organización. *B. Bruxellensis* tiene ~5400 genes con intrones similares a los de *S. cerevisiae* y otros Hemiascomycetes (~4% de los genes). Muchos de estos genes codifican para enzimas y transportadores relacionados al metabolismo de nitrógeno y lípidos, lo que permite a la levadura sobrevivir en ambientes deficientes en nutrientes (Menoncin & Bonatto, 2019). Como *S. cerevisiae*, el género *Brettanomyces* puede formar pequeños mutantes resultantes de mutaciones en el ADNmt que los vuelven deficientes respiratorios. En términos de número de cromosomas, de cuatro a nueve cromosomas han sido identificados en las cepas de *B. bruxellensis*, con largos desde <1 a >6 Mbp. En la comparación de proporción de alelos en sitios heterocigotos de cinco cepas de *B. Bruxellensis* (AWRI1499, CBS2499, AWRI1608, AWRI1613 y YV397), se sugirió un genoma triploide para AWRI1499 y CBS2499 y uno diploide para AWRI1613 y YV397.

Las cepas con genoma triploide tienen dos copias de un cromosoma común y un conjunto inusual de otros cromosomas (Menoncin & Bonatto, 2019). La presencia de la tercera copia del cromosoma está probablemente ligada a la resistencia a sulfitos en vinerías. De forma similar, su ocurrencia aporta ventajas selectivas en ambientes deficientes en nutrientes y estresantes, como ser la cerveza, donde hay cantidades limitadas de carbohidratos y aminoácidos, lo que ejerce una presión positiva para mantener la poliploidía (Colomer et al., 2020; Menoncin & Bonatto, 2019). Un dato interesante es que las cepas de *Brettanomyces* de vino y cerveza tienen diferente estructura de cromosomas, las que están probablemente ligadas a diferencias fenotípicas relacionadas con ventajas adaptativas al ambiente de fermentación de vino y cerveza respectivamente (Colomer et al., 2020). También, *B. bruxellensis* puede ser considerada como un taxón complejo diploide-triploide con coexistencia de subpoblaciones que contienen diferente número de ploidía. Se ha encontrado correlación entre el estado triploide de *Brettanomyces* y la tolerancia al SO₂, incluyendo estudios de genotipado de microsatélites (Colomer et al., 2020; Menoncin & Bonatto, 2019). La biosíntesis de acetato en *B. anomalus* es inducida por IGC 5153 en presencia de una concentración de glucosa 2% (w/v), mientras que la síntesis se ve ausente en medios con bajos niveles de azúcares. En contraste, la acetogénica *B. bruxellensis* muestra actividad NAD⁺-aldehído deshidrogenasa incluso en presencia de bajas concentraciones de glucosa (por ej. 0,3% (w/v)) (Menoncin & Bonatto, 2019). *Brettanomyces* expresa altos niveles de NADH ubiquinona reductasa cuando crece en medio semi anaerobio. Por lo tanto, en medios parcialmente anaerobios, se expresan más enzimas generadoras de NADH que NAD⁺, lo que genera un desbalance NAD⁺/NADH (Burini et al., 2021; Menoncin & Bonatto, 2019).

Se ha reportado que *Brettanomyces* es mejor tolerando el estrés que *S. cerevisiae*. *Brettanomyces* muestra crecimiento luego de una primera fermentación con *S. cerevisiae* tanto en vino como en cerveza, ambos conteniendo altos niveles de etanol y entre poco y nada oxígeno disuelto (Capece et al., 2018; Menoncin & Bonatto, 2019). La capacidad de *Brettanomyces* de sobrevivir a estos ambientes está ligado a la estructura y composición de su pared celular, y a la presencia de proteínas que permiten adhesión, gemación y crecimiento pseudohifal (Menoncin & Bonatto, 2019). *Brettanomyces* puede utilizar las fuentes de nitrógeno de forma más eficiente que *S. cerevisiae* (Serra Colomer et al., 2020). El metabolismo de nitrato puede ser importante para la sobrevivencia de *Brettanomyces* en el ambiente de la cerveza, ya que el lúpulo puede aportar cantidades sustanciales de nitrato al mosto (hasta 87 mg/mL). Sin embargo, no todas las cepas de *Brettanomyces* pueden usar nitrato como única fuente de nitrógeno. La habilidad de utilizar nitrato se da por la expresión de genes que codifican transportadores de nitrato (YNT1), nitrato reductasa (YNR1) y nitrito reductasa (YNR1), junto con dos factores de transcripción importantes para el uso de nitrato (YNA1 y YNA2) (Menoncin & Bonatto, 2019; Serra Colomer et al., 2020). Varios genes que codifican proteínas asociadas a la membrana, que están relacionadas con el metabolismo alternativo del carbono, están presentes en el género, lo que le permite a *Brettanomyces* usar quitina, N-acetil glucosamina, galactosa, manosa y lactosa como fuentes de carbono. Genes importantes relacionados con la tolerancia al estrés del medio, como ser ATP1, ERG6 y VPS34, junto con los reguladores de estrés MSN4, SNF1, HSP82 y NTH1, fueron caracterizados en *B. bruxellensis*. La habilidad de

Brettanomyces de utilizar cantidades traza de nutrientes da cierta explicación de por qué este género es capaz de sobrevivir en situaciones donde *Saccharomyces* es incapaz de sobrevivir. También es importante resaltar que *Brettanomyces* tiene la capacidad de tolerar compuestos derivados del sulfuro, particularmente dióxido de sulfuro, el cuál es utilizado en vinos para el control microbiológico, por lo que la erradicación de *Brettanomyces* por este medio no sería efectiva (Colomer et al., 2020; Menoncin & Bonatto, 2019).

La variación de la cepa asociada a la genética está detrás de gran parte de la variabilidad en las descripciones sensoriales de los sabores inducidos por *Brettanomyces* y variaciones en su capacidad de crecimiento. Se han encontrado alrededor del mundo subtipos genéticos similares de *B. bruxellensis*, probablemente debido al comercio internacional de jugo de uvas, barriles y equipamiento de vitivinicultura. Es también posible que se hayan dado adaptaciones genéticas similares de forma independiente debido a estímulos de estrés similares en el ambiente de producción. Dado lo inherente de la variación de cepas, son importantes los indicadores de la capacidad de estas de producir off-flavours. La habilidad de producir off-flavours en vino está relacionada a la capacidad de la cepa de producir compuestos fenólicos volátiles. Es por eso, que la medición de la producción de etilfenoles puede ser usada como un simple indicador de la capacidad de deterioro de una cepa (Wedral et al., 2010).

Brettanomyces presenta crabtree positivo, utilizándolo como una estrategia de competencia, ya que al aumentar la concentración de etanol inhibe el crecimiento de microorganismos competidores (Recherches, 1966; Serra Colomer et al., 2019; Steensels et al., 2015). Sin embargo, cuando cambia a condiciones anaerobias, ocurre una fase lag debido a un desbalance redox conocido como "Efecto Custer" o "Efecto Pasteur negativo" (el aumento de ácido acético producido en estas condiciones genera un desbalance redox lo que imposibilita a la levadura generar glicerol; el aumento de ácido acético promovido por este efecto compromete la supervivencia de la levadura y contribuye activamente al aumento de la acidez de la cerveza). Todas estas características metabólicas se observan en la tabla 2 junto con la comparación respecto a las especies tradicionales de levaduras cerveceras como son *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* (Serra Colomer et al., 2019; Steensels et al., 2015).

En anaerobiosis y deficiencia de nutrientes, *Brettanomyces* puede usar etanol y ácido acético como únicas fuentes de carbono, lo que causa un gran desbalance redox dentro de la célula. En contraste, estas levaduras se convierten en productoras de etanol muy eficientes en anaerobiosis, mostrando una tolerancia a niveles de etanol de hasta 15%(v/v) y tolerancia a pH bajos, incluso llegando a tolerar pH 3 (Serra Colomer et al., 2019; Steensels et al., 2015).

El rango de aminoácidos que puede usar como fuente de nitrógeno es amplio, siendo la glutamina el aminoácido preferido. Una característica atractiva que posee *Brettanomyces* es su capacidad de asimilar nitrato del medio, esto ayuda a que se evite el "efecto Custer" aumentando su eficiencia de fermentación. Al ser los lúpulos una fuente importante de nitratos en el mosto (tanto en proceso de hervido como en dry hopping), el desempeño de las *Brettanomyces* se ve acelerado en mostos muy lupulados y también en la maduración post-dry hopping (Steensels et al., 2015; Tataridis et al., 2013).

Característica	<i>Brettanomyces</i> spp.	<i>S. cerevisiae</i> (levadura ale)	<i>S. pastorianus</i> (levadura lager)
Genoma poliploide (aneuploide/euploide)	Si	Si	Si
Metabolismo de nitrato	Si	No	No
Formación de pseudohifas (biofilm)	Si	Si	No
Efecto Crabtree	Si	Si	Si
Efecto Custer	Si	No	No
Actividad α-glucosidasa	Si	Si	No
Consumo de sacarosa	Si	Si	Si
Metabolismo de glucosa	Si	Si	Si
Metabolismo de fructosa	Si	Si	Si
Metabolismo de maltosa	Si	Si	Si
Metabolismo de maltotriosa	Si	Si	Si
Metabolismo de dextrinas	Si	Si ^a	Si
Metabolismo de celobiosa	Si	No	No
Metabolismo de galactosa	Si	Si	Si

^a Levaduras cerveceras *S. cerevisiae* diastáticas

Tabla 2. Comparación de características genéticas, fenotípicas y metabólicas de las cepas cerveceras de *Brettanomyces* respecto a *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* (Menoncin & Bonatto, 2019)

Dentro de la industria cervecera, las dos especies de mayor impacto dentro de las *Brettanomyces* son *B. bruxellensis* y *B. anomalus* (también conocida como *B. claussenii*) (Burini et al., 2021; Roach & Borneman, 2020). La especie más estudiada y de la que se posee más información es *B. bruxellensis*. Como se observa en las figuras 6 y 7, esta presenta forma oval a elipsoidal, y se reproduce por gemación. Su forma celular cambia de elíptica a ramificada luego de unos meses de incubación. La fisiología de *B. bruxellensis* se ha estudiado bastante, debido a sus inusuales compuestos aromáticos y porque es un ejemplo del efecto Custer, que es la inhibición de la fermentación alcohólica en condiciones anaerobias, debido a la alta producción de ácido acético y un subsecuente desbalance redox (Wedral et al., 2010; White, C., & Zainasheff, 2010).

Figura 6. Imagen de microscopía WLP650 *B. bruxellensis* (Yacobson, 2010)

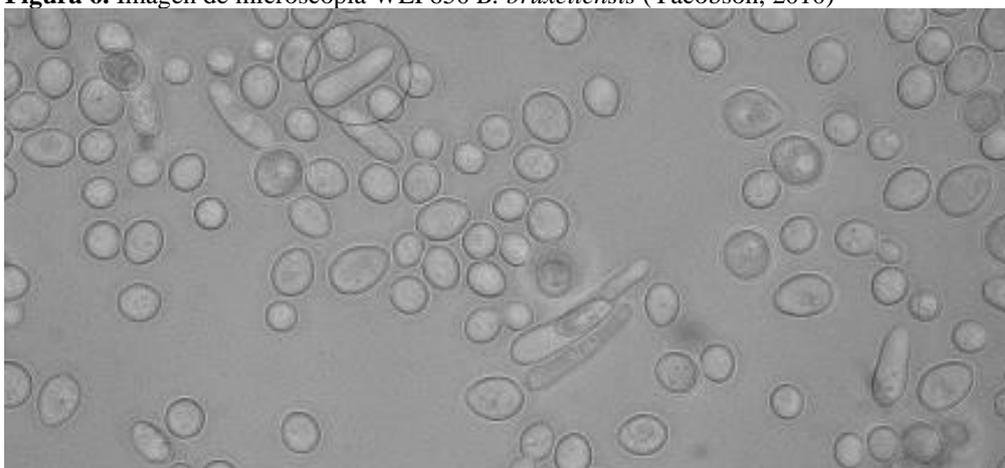
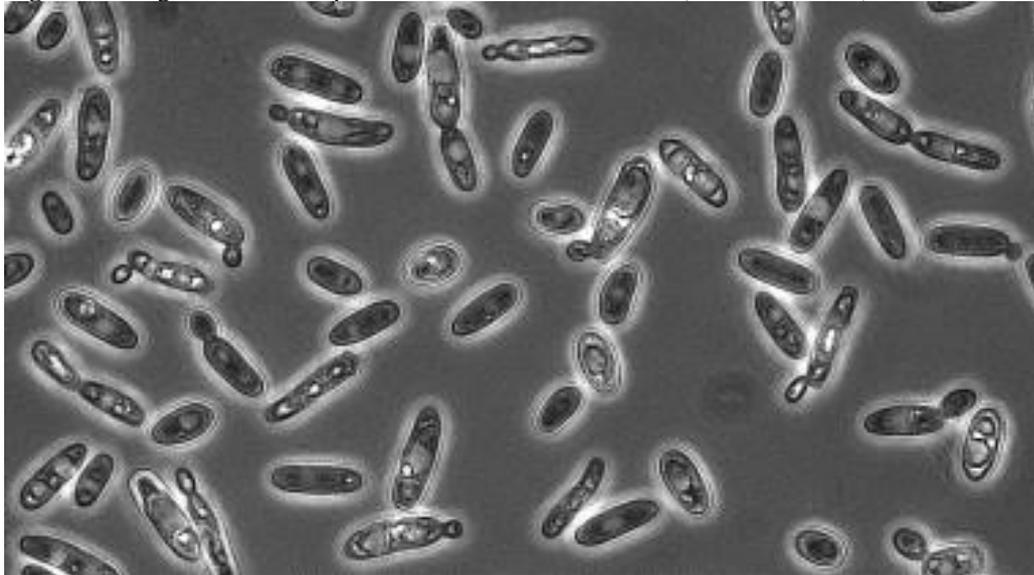


Figura 7. Imagen de microscopía de WY5112 *B. Bruxellensis* (Yacobson, 2010)

En un estudio realizado por Colomer et al., 2020 las muestras de *B. bruxellensis* aisladas de "Lambic" (fermentación espontánea) y "Farmhouse" (cepas cerveceras comerciales) muestran que les falta segmentos subtelméricos del andamio I donde se encuentra el transportador de azúcares encargado de la lactosa (LACP) y otra en el andamio II donde se encuentra la región del gen que expresa una de las β -glucosidasas (BGL2). Todas las cepas del cluster "Lambic" carecen de una región interna correspondiente a una maltasa (MAL12), pero aun así son capaces de procesar la maltosa, por lo que se requieren más estudios para elucidar los procesos metabólicos de este azúcar. Otro punto interesante de este cluster es que la mayoría de las cepas no tienen el grupo de genes de asimilación de nitrógeno en la región subtelmérica del andamio IV, lo que puede apuntar hacia la conclusión de que el consumo de nitratos no es un requerimiento esencial para su supervivencia en cerveza; el mosto cervecero es rico en aminoácidos, por lo que otras fuentes de nitrógeno siempre están disponibles (Colomer et al., 2020).

Respecto a la actividad α y β -glucosidasa, se han observado tendencias claras en las distintas especies. El grupo de las *B. anomalus* presenta una fuerte asimilación de carbono, teniendo alto rendimiento en utilización de celobiosa y maltosa, mientras que las cepas cerveceras de *B. bruxellensis* muestran una utilización eficiente de maltosa, pero poca asimilación de celobiosa. Esto se podría deber a que las cepas de *B. bruxellensis* se apoyan en una de las dos actividades de glucosidasa para sobrevivir, y las características que no son necesarias se van perdiendo a lo largo del tiempo. *B. anomalus* tiene un gran potencial como levadura cervecera, con un metabolismo eficiente de maltosa, alta actividad β -glucosidasa y una excelente producción de flavours (Colomer et al., 2020).

La cercanía genética entre las especies aisladas de cervezas que se ha encontrado en diversos estudios, indica que se han seleccionado cepas con características similares para la cervecería, lo que ha llevado a cepas con un alto grado de atenuación de azúcares y alta producción de ésteres. Esta selección genética puede haber estado dada por presión

selectiva en la cervecería artesanal, o de forma espontánea en la elaboración de cervezas de fermentación espontánea (Colomer et al., 2020).

Capacidad fermentativa.

Aunque el género está filogenéticamente separado de *S. cerevisiae* por 200 millones de años, las especies de *Brettanomyces* comparten numerosos fenotipos con *S. cerevisiae* que son de interés para la industria cervecera, incluyendo aspectos bioquímicos (efecto Crabtree y biosíntesis de compuestos con actividad de flavour) y moleculares (plasticidad de los transcriptomas para enfrentarse de forma eficiente a ambientes estresantes). Ambas especies convergieron en nichos ecológicos similares (cáscara de frutas, barriles de fermentación, tanques, etc.) y usan fuentes de carbono a través de la fermentación. Aunque ambos probablemente utilizan diferentes mecanismos bioquímicos y moleculares, ambas especies caen en el espectro de interés de la industria cervecera, ya que producen grandes cantidades de etanol por fermentación anaerobia (hasta 14% ABV w/v), crecen en ambientes anaerobios y ácidos, toleran altas presiones osmóticas y ambientes con bajos niveles de nutrientes (Basso et al., 2016; Menoncin & Bonatto, 2019). *S. cerevisiae* no presenta efecto Custer, lo que sugiere que las características fermentativas de *Brettanomyces* evolucionaron desde otro lado. El fenotipo de *Brettanomyces* está estrictamente ligado al oxígeno y, por lo tanto, altos niveles de oxígeno disuelto en el mosto deben ser considerados para estimular su crecimiento y metabolismo, sobre todo cuando se usa para fermentación primaria (Menoncin & Bonatto, 2019).

Algunos caminos metabólicos lenta y parcialmente reestablecen el balance NAD⁺/NADH. Estos mecanismos incluyen la re-oxidación del NADH, lo que provee NAD⁺ para el metabolismo de gliceraldehído 3-fosfato a 1,3-bifosfoglicerato durante la glicólisis. Una de estas características es su habilidad de utilizar nitrato como una fuente de nitrógeno, dado que la asimilación de nitratos y su metabolismo requiere de NADH y NADPH como donadores de electrones. Paradójicamente, el metabolismo de nitratos suprime el efecto Custer (efecto Custer o efecto Pasteur negativo: inhabilidad de fermentar azúcares en ausencia de oxígeno), lo que mejora la fermentación en ambientes anaerobios. Otras reacciones que incluyen como paso la re-oxidación de NADH/NADPH son el metabolismo de los ácidos hidroxicinámicos (ácidos p-cumárico y ferúlico) presentes en la cerveza (Basso et al., 2016; Menoncin & Bonatto, 2019; White, C., & Zainasheff, 2010).

Brettanomyces es capaz de sintetizar cantidades considerables de ácido acético, que tiene potencial para ser utilizado como fuente de carbono no fermentativa (Basso et al., 2016). El ácido acético acidifica el medio, lo que inhibe el crecimiento de potenciales competidores (Starmer & Lachance, 2011). *Brettanomyces bruxellensis* puede crecer a pH 2,3 mientras que *S. cerevisiae* está limitada a pH 3,2. La amplia producción de ácido acético por *Brettanomyces* está asociada con el metabolismo fermentativo (Basso et al., 2016; Menoncin & Bonatto, 2019).

El acetaldehído es producido a partir de piruvato y enzimáticamente oxidado a acetato en respuesta a la actividad NAD⁺-aldehído deshidrogenasa. Dado que la actividad acetil-CoA sintetasa se ve altamente reprimida en ambientes ricos en azúcares por su

efecto Crabtree positivo, cantidades excesivas de ácido acético son generadas una vez que el acetaldehído entra en las vías de la biosíntesis de acetato en lugar de acetyl-CoA (Menoncin & Bonatto, 2019).

La producción continua de acetato a partir de acetaldehído promueve la acumulación de NADH, causando un desbalance redox que inhibe la glicólisis y la fermentación. Este desbalance prolonga la fase lag cuando las células cambian de un ambiente aerobio a uno anaerobio, lo que puede ser mejorado por la adición de aceptores de H⁺. En presencia de oxígeno/aceptores de H⁺, NADH y NADPH se oxidan durante el metabolismo aerobio, restaurando el balance redox (Menoncin & Bonatto, 2019).

La anaerobiosis en *Brettanomyces* inhibe la fermentación de la glucosa hacia etanol. La fermentación de glucosa se ve estimulada en presencia de oxígeno o de aceptores de H⁺ (Menoncin & Bonatto, 2019).

Compuestos aromáticos producidos por *Brettanomyces/Dekkera*

Brettanomyces/Dekkera posee alta actividad esterasa, responsable de la biosíntesis de ésteres frutales. A su vez, su alta actividad β -glucosidasa (mucho mayor que la encontrada en algunas cepas de *Saccharomyces*), degrada los glicósidos (compuestos inodoros y no volátiles mientras están unidos a una molécula de azúcar) de lúpulos o frutos a sus agliconas (compuestos volátiles aromáticos), liberando así compuestos que aportan al perfil de flavours de la cerveza, y liberando azúcares para continuar el metabolismo. En la fermentación de la cerveza, estos glucósidos provienen principalmente del lúpulo y puede resultar en un significativo aumento de compuestos volátiles (Colomer et al., 2020; Menoncin & Bonatto, 2019; Serra Colomer et al., 2020). A su vez, algunas cepas pueden transformar los monoterpenos liberados en β -citronelol o α -terpineol, exacerbando las notas florales, cítricas y picantes del producto final. Adicionalmente, la presencia de β -glucosidasa permite a *Brettanomyces* usar celobiosa (presente en los barriles de roble) como fuente de carbono (Menoncin & Bonatto, 2019; Serra Colomer et al., 2019). Un dato para destacar es que la última fase de la fermentación de cervezas lámbicas (13-24 meses después del comienzo de la fermentación) es ampliamente dominada por *B. bruxellensis*, gracias al aporte de celobiosa liberado por los barriles de roble. La capacidad de utilizar celobiosa induce a las especies de *Brettanomyces* a formar biofilms en los barriles, permitiendo a las cervecerías utilizarlo para aportar las características "Brett" a la cerveza (Menoncin & Bonatto, 2019).

Durante la producción de cerveza, se da la producción de distintos ésteres dependiendo de la cepa de levadura utilizada, y su presencia puede o bien tener un impacto positivo (frutal) o negativo (solvente, excesivamente frutal). Las condiciones iniciales en la fermentación de cerveza, como ser la temperatura, la composición del mosto y la oxigenación, afectan de forma directa la concentración de dichos ésteres (Capece et al., 2018; Menoncin & Bonatto, 2019).

La presencia de ácido acético es considerada positiva en algunos tipos de cervezas, particularmente en lámbicas, gueuze, flander y coolship ales. La cantidad de ácido acético producido está directamente relacionada con cómo se manejó el proceso de elaboración de cerveza, particularmente en base a la cepa de levadura seleccionada y la oxigenación

inicial del mosto. Una alta concentración de oxígeno estimula el crecimiento de *Brettanomyces* y la síntesis de ácido acético, por lo tanto, a mayor concentración de oxígeno disuelto en el mosto en el momento inicial, se generará mayor concentración de ácido acético y se formarán más ésteres dependientes de acetato (Burini et al., 2021; Menoncin & Bonatto, 2019).

Dentro de los compuestos volátiles producidos por *Brettanomyces*, los compuestos más deseados son los ésteres, ya que contribuyen con un agradable flavour frutado a la cerveza. Por lo general, en comparación con la levadura cervecera ale, los ésteres de acetato (como el acetato de isoamilo (banana) y el acetato de feniletilo (miel, floral)) no se producen e incluso son degradados por las esterasas presentes en *Brettanomyces*. Sin embargo, los ésteres de etilo (como el acetato, lactato, hexanoato, decanoato y octanoato de etilo) están presentes en altas concentraciones, lo que contribuye a los sabores exóticos frutales y tropicales (ananá, mango, pera, uva) (Burini et al., 2021). Aunque no se tiene mucha información bioquímica sobre la biosíntesis de ésteres por *Brettanomyces*, los datos que hay sugieren que *B. Bruxellensis* es capaz de producir grandes cantidades de acetato y ésteres de ácidos grasos de cadena media. Estos ésteres incluyen etil acetato, etil lactato, isoamilacetato y fenil acetato. Además, *Brettanomyces* acumula ácidos grasos incluyendo desde el ácido octanóico (C8) hasta el dodecanóico (C12) y los convierte en sus respectivos ésteres, lo que sugiere una alta actividad de β -oxidación. Los niveles de ésteres presentes en la cerveza se ven influenciados por la posible presencia de bacterias ácido-lácticas y ácido-acéticas, ya que sus subproductos de fermentación son sustrato para la síntesis de ésteres (Menoncin & Bonatto, 2019).

Los fenoles volátiles comprenden un grupo de moléculas aromáticas presentes en bebidas alcohólicas fermentadas. Su presencia en la cerveza viene del metabolismo de la cebada y de los ácidos hidroxicinámicos provenientes del lúpulo durante la fermentación por bacterias y levaduras. Así como los ésteres, los fenoles volátiles contribuyen al aroma (especiado, clavo de olor y ahumado) y a flavours no deseados (fenólico, medicinal, establo, granja). Parte de lo que permite a *Brettanomyces* tener su diferencial es la habilidad de producir estos fuertes compuestos aromáticos utilizando cinamato descarboxilasa y vinilfenol reductasa (VPR), lo que le aporta su carácter diferencial. La síntesis de fenoles volátiles ocurre en dos pasos enzimáticos secuenciales: primero la descarboxilación a cargo de la cinamato descarboxilasa de los ácidos p-cumárico y ferúlico a sus hidroxiestirenos correspondientes 4-vinilfenol (4-VP) y 4-vinilguayacol (4-VG) y luego la reducción de estas moléculas a 4-etifenol (4-EP) y 4-etilguaiacol (4-EG) por la vinilfenol reductasa. Además, se forman bajas cantidades de 4-etilcatecol a partir de ácido cafeico. Todos estos compuestos poseen umbrales de percepción muy bajos (4-EP: 230–650 $\mu\text{g/L}$, 4-EG: 22–135 $\mu\text{g/L}$, 4-EC: 100–400 $\mu\text{g/L}$) (Basso et al., 2016; Holt et al., 2018; Menoncin & Bonatto, 2019; Serra Colomer et al., 2019; Steensels et al., 2015).

Otras levaduras pueden reducir el ácido p-cumárico a su forma 4-VP, pero *B. bruxellensis* parece ser única en su habilidad para reducir los vinilfenoles a cantidades detectables sensorialmente de 4-EP y 4-EG. El aroma de 4-EP es generalmente descripto como fenólico/medicinal y el 4-EG como clavo de olor/"especies navideñas". El 4-EC se

hace notar por su aroma medicinal. Debido a que debe ser derivatizado para ser detectado por cromatografía gaseosa, el 4-EC no se ha estudiado en tanta profundidad como los otros fenoles volátiles, pero tiene un menor umbral de detección que los otros etilfenoles, por lo que puede ser de cierta importancia. La proporción de 4-EG/4-EP aportada por *Brettanomyces* en cervezas es de 3:1, lo que daría una explicación a por qué el carácter Brett es más deseado en cervezas que en vinos (donde la proporción en general es de 1:1) ya que el 4-EG aporta notas más amenas que el 4-EP (Colomer et al., 2020; Wedral et al., 2010).

La producción de etilfenoles depende fuertemente de la cepa y el ambiente (pH del medio, disponibilidad de nutrientes del mosto, disponibilidad de nitrógeno, etc.). Como mostraron Kosel et al. (2014), en una fermentación con cultivo puro, los ácidos hidroxicinámicos son rápida y completamente convertidos a vinilfenoles. Sin embargo, en cultivos mixtos con *S. cerevisiae* se observó una reducción de 30% en la conversión de etilfenoles. Por esto, los autores concluyeron que *Brettanomyces* tiene preferencia metabólica por los ácidos hidroxicinámicos en vez de tomar directamente los vinilfenoles sintetizados por *S. cerevisiae*. Esta hipótesis fue corroborada demostrando que el gen VPR se expresaba en menores niveles en cultivos mixtos, donde hay menos 4-VP y 4-VG disponibles (Menoncin & Bonatto, 2019; Wedral et al., 2010).

El carácter Brett, dado por el 4-EP, tan rechazado en la industria vitivinícola, es muy buscado en cervezas del estilo de fermentación espontánea, como ser las Gueuze y las Lámbicas (Serra Colomer et al., 2019). Algunas *Brettanomyces* también poseen alta actividad esterasa que destruye los ésteres de acetato que son quienes se encargan de dar las notas frutales a las cervezas. Es por eso por lo que es importante evaluar los niveles producidos tanto de ésteres fenólicos como de ésteres de acetato (Holt et al., 2018).

Brettanomyces produce fenoles volátiles en una conversión de dos pasos (descarboxilación y reducción) de ácido ferúlico y ácido p-cumárico presentes en el mosto. La VPR es quien se encarga de la reducción utilizando NADH como cofactor. Este paso es exclusivo de las *Brettanomyces* y se intuye que es utilizado para mantener el flujo glicolítico de la célula bajo condiciones limitadas de oxígeno. (Kheir et al., 2013; Serra Colomer et al., 2019). Dentro de todos los compuestos volátiles generados por *Brettanomyces*, los ésteres son los más deseados por ser quienes otorgan las notas frutales a las cervezas y vinos. Los ésteres de acetato como el isoamil acetato y el 4-fenilacetato, responsables de notas banana y miel respectivamente, no son producidos por *Brettanomyces* e incluso pueden ser degradados por éstas. En cambio, los etil ésteres como etilacetato, hexanoato y octanoato se encuentran en altas concentraciones otorgando notas tropicales y sabores similares al ananá (Callejo et al., 2019; Serra Colomer et al., 2019). Las *Brettanomyces* son también capaces de esterificar cadenas de ácidos grasos medias y largas (de C9 a C16), que comúnmente se asocian con flavours rancios o de queso, en sus correspondientes ésteres otorgando notas que van hacia lo dulce, uva, manzana (Serra Colomer et al., 2019).

Brettanomyces produce característicamente 4-EP y 4-EG, dos compuestos fácilmente medibles que indican la actividad Brett; así como otra variedad de compuestos producidos por estas levaduras que contribuyen a su complejidad de aroma. Cuanto más altos los niveles de metabolitos, más intensos los flavours que imparten, generando una

experiencia poco placentera. Es por esto por lo que los metabolitos asociados a *Brett* pueden ser negativos o positivos dependiendo de su concentración y las expectativas del consumidor (Wedral et al., 2010).

Estudio de mercado

Demografía:

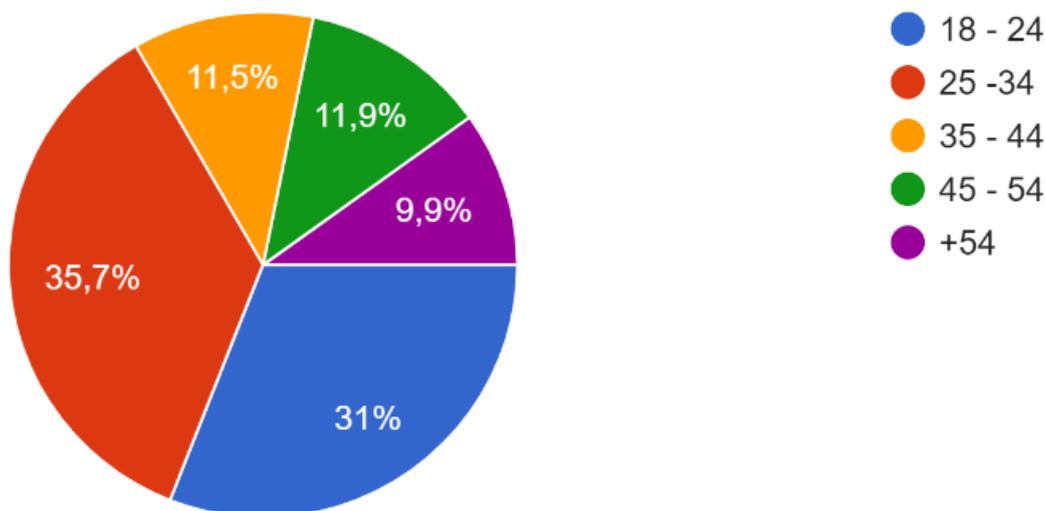
Edad

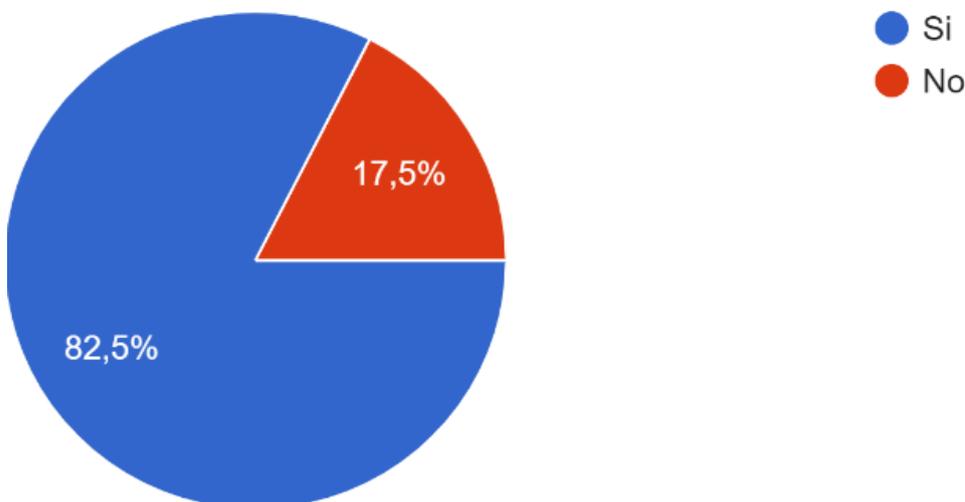
Como se observa en la figura 8, la mayoría de la población encuestada se encuentra entre los 18 y 34 años (66,7%), estando estas dos poblaciones casi igualmente distribuidas (31% para el rango 18 a 24 y 35,7% para el rango 25 a 34).

Del tercio de respuestas restante (33,3%), la distribución etaria es casi igual en los 3 rangos (35 – 44 años con 11,5%; 45 – 54 años con 11,9% y más de 54 años con 9,9%).

En principio entonces, los candidatos a población objetivo para este estudio serían los rangos etarios de 18 a 24 años y 25 a 34, o el rango unificado de 18 a 34, ya que son los que se presentan en mayor porcentaje.

Figura 8. Gráfico de distribución de edades de las personas encuestadas.



Análisis cuantitativo:**¿Consumís cervezas artesanales?****Figura 9.** Gráfico de porcentaje de personas encuestadas que consumen cervezas artesanales.

La distribución etaria para esta respuesta fue la siguiente:

¿Consumís cervezas artesanales?	Cantidad	%
No	44	17,46
18 - 24	7	15,91
25 -34	9	20,45
35 - 44	9	20,45
45 - 54	10	22,73
+54	9	20,45
Si	208	82,54
18 - 24	71	34,13
25 -34	81	38,94
35 - 44	20	9,62
45 - 54	20	9,62
+54	16	7,69
Gran Total	252	

Tabla 3. Resultados de encuesta de consumición de cerveza artesanal, discriminado por consumición y segregando por rango etáreo.

Como se puede ver en la figura 9, del total de personas encuestadas el 82,5% declara consumir cervezas artesanales.

Dentro del 17,5% de personas que seleccionó la respuesta “No”, hay un 20,5% que declara tener un consumo eventual, esporádico o particular de las mismas (“muy cada 2x3”, “en eventos”, “salidas con amigas”, “casi no consumo”).

Podemos inducir entonces que las personas con un consumo eventual de cerveza artesanal se autoperceben como no consumidores de cervezas artesanales.

Dentro de las personas que respondieron “Si”, se observa que la distribución de respuestas se asemeja a la distribución etaria total, sumando algunos puntos de porcentaje los dos primeros rangos.

La distribución por edad para esta respuesta fue la siguiente:

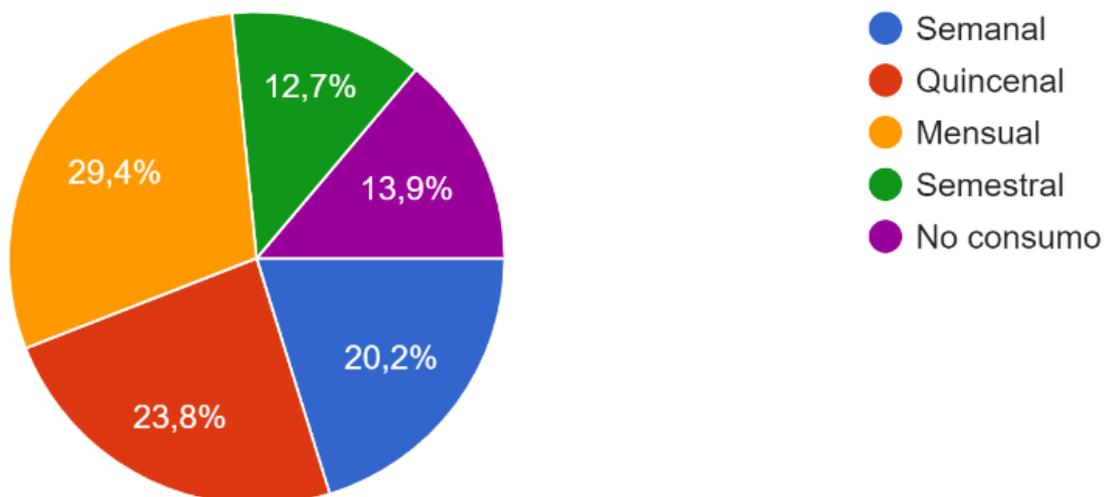
¿Consumís cervezas artesanales?	Cantidad	% por rango
18 - 24	78	
Si	71	91,03
No	7	8,97
25 -34	90	
Si	81	90,00
No	9	10,00
35 - 44	29	
Si	20	68,97
No	9	31,03
45 - 54	30	
Si	20	66,67
No	10	33,33
+54	25	
Si	16	64,00
No	9	36,00
Gran Total	252	

Tabla 4. Resultados de porcentaje de consumición por rango etáreo.

De las tablas 3 y 4 se concluye que la mayor distribución de consumo de cerveza artesanal se da para los rangos de 18 a 24 años y 25 a 34 años, por lo que se confirma la selección de estos dos rangos etarios como población objetivo para el desarrollo de producto.

¿Con qué frecuencia consumís cervezas artesanales?

Figura 10. Gráfico de distribución de frecuencia de consumo semanal.



¿Con qué frecuencia consumís cervezas artesanales?	Cantidad	%
Mensual	74	29,37
Quincenal	60	23,81
Semanal	51	20,24
No consumo	35	13,89
Semestral	32	12,70
Gran Total	252	

Tabla 5. Valores de distribución de frecuencia de consumo.

Comparado con el 17,5% que respondió que no consumía cervezas artesanales (figura 9), vemos en la figura 10 y en la tabla 5 que la cantidad que respondió “No consumo” en esta pregunta disminuye al 13,9% (tabla 6) lo que se correlaciona con la cantidad de respuestas que fueron de absoluto no consumo. Esto corrobora la calidad de los datos obtenidos.

No consumidores	Cantidad	% dentro de respuesta "No"	% en el total
No consumen	35	79,55	13,89
Consumo eventual, esporádico	9	20,45	3,57
Total	44		

Tabla 6. Valores de análisis de no consumidores y consumidores esporádicos.

Dentro de la población objetivo, se observa que en ambos casos la mayor frecuencia de consumo es mensual (tabla 7).

¿Con qué frecuencia consumís cervezas artesanales?	Cantidad	%
18 - 24	78	
Mensual	25	32,05
Quincenal	24	30,77
Semanal	16	20,51
Semestral	8	10,26
No consumo	5	6,41
25 - 34	90	
Mensual	32	35,56
Quincenal	20	22,22
Semanal	19	21,11
Semestral	10	11,11
No consumo	9	10,00

Tabla 7. Análisis de frecuencia de consumo de las edades objetivo.

¿Qué estilos de cerveza son los que más consumís? (Máximo 3 opciones)

Esta pregunta múltiple opción permitía a la persona encuestada seleccionar hasta 3 opciones. Se seleccionó el set de estilos en base a los actualmente más presentes en el mercado nacional.

¿Qué estilos de cerveza son los que más consumís?	Cantidad	%
IPA	147	27,27
Blonde Ale	95	17,63
APA	85	15,77
Weisse	45	8,35
No consumo	34	6,31
Porter	34	6,31
Pilsener	30	5,57
Stout	30	5,57
Golden Ale	21	3,90
Kolsh	12	2,23
EPA	6	1,11
Gran Total	539	

Tabla 8. Distribución de resultados de estilos de cerveza más consumidos.

El top 3 de estilos seleccionados de forma global fueron las IPA, Blonde Ale y APA (tabla 8).

Esta tendencia de los estilos más populares también se condice con la selección de la población objetivo (tabla 9).

¿Qué estilos de cerveza son los que más consumís? (Población objetivo 18 - 34)	Cantidad	%
IPA	113	29,74
Blonde Ale	74	19,47
APA	72	18,95
Weisse	30	7,89
Porter	18	4,74
Pilsener	17	4,47
Golden Ale	16	4,21
Stout	16	4,21
No consumo	13	3,42
Kolsh	6	1,58
EPA	5	1,32
Gran Total	380	

Tabla 9. Distribución de estilos de cerveza más consumidos en la población objetivo.

Al analizar los resultados segregado entre los dos grupos de la población objetivo (tabla 10), vemos que las IPA quedan en primer puesto, mientras que para el rango 18 -24 el segundo puesto está dado para las APA con un 22,65% seguido de Blonde Ale con 17,13%, a diferencia del rango 25 – 34 donde las Blonde Ale quedan segundas con un 21,61% y las APA terceras con un 15,58%.

¿Qué estilos de cerveza son los que más consumís?	Cantidad	%
18 – 24	181	
IPA	59	32,60
APA	41	22,65
Blonde Ale	31	17,13
Weisse	12	6,63
Pilsener	10	5,52
Golden Ale	9	4,97
Porter	6	3,31
No consumo	4	2,21
Stout	4	2,21
EPA	3	1,66
Kolsh	2	1,10
25 -34	199	
IPA	54	27,14
Blonde Ale	43	21,61
APA	31	15,58
Weisse	18	9,05
Porter	12	6,03
Stout	12	6,03
No consumo	9	4,52
Golden Ale	7	3,52
Pilsener	7	3,52
Kolsh	4	2,01
EPA	2	1,01
Gran Total	380	

Tabla 10. Distribución de estilos de cerveza más consumidos segregados por los rangos 18-24 y 25-34

Al ver la distribución de selección de estilos global (figura 11) vs población objetivo (figura 12), vemos que la tendencia general es muy similar, invirtiéndose solo el puesto de las Golden Ale y las Stout.

Figura 11. Estilos más consumidos

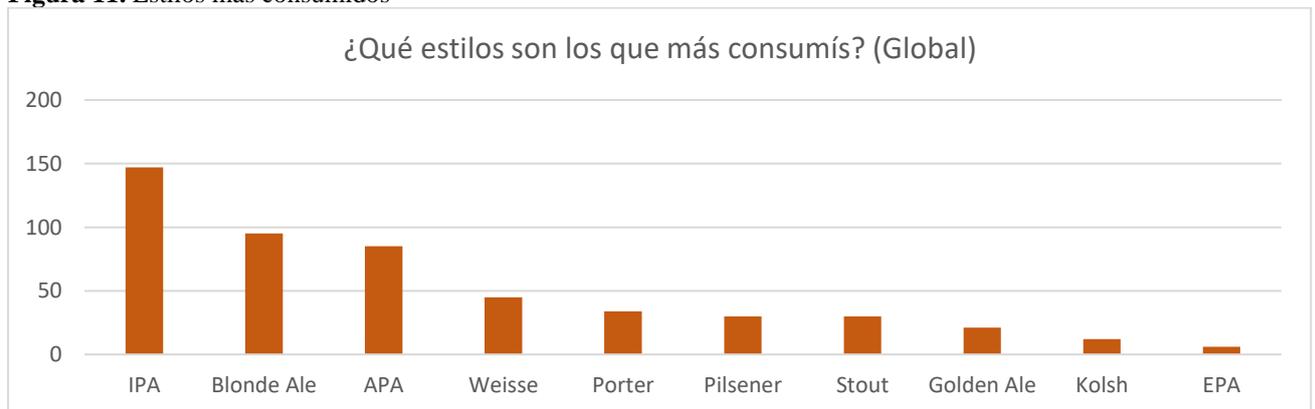
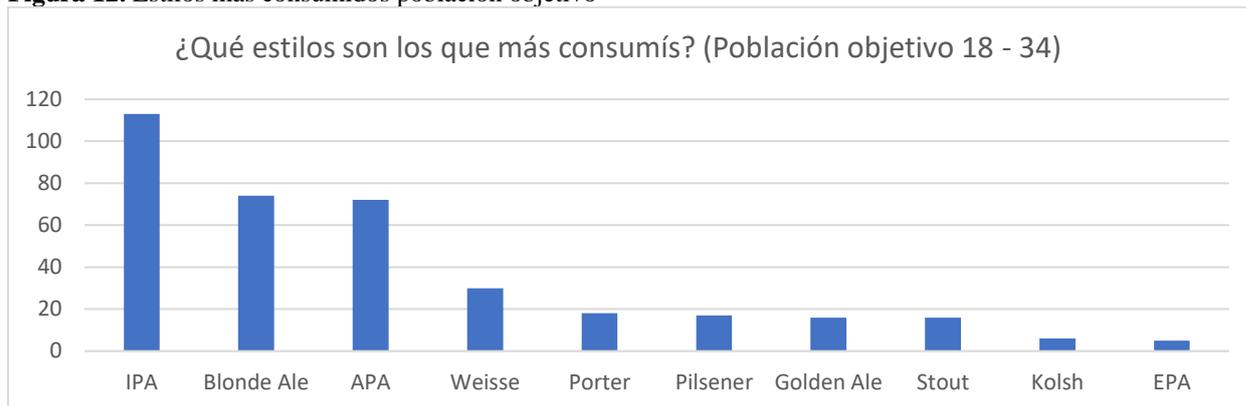


Figura 12. Estilos más consumidos población objetivo

Las cervezas IPA se caracterizan por su amargor, cuerpo y la presencia de ésteres frutales, mientras que las APA además de destacarse por su amargor y cuerpo, presentan notas cítricas y tropicales. Las cervezas Blonde Ale son comunes por ser nobles al paladar, con bajo cuerpo y una presencia agradable de ésteres frutales.

¿Conocés las cervezas lámbicas?

El 94% de las personas encuestadas declaró no conocer las cervezas lámbicas, por lo que la selección como estilo innovador es acertada.

Del total de la población, el rango etario que más conocimiento tiene sobre cervezas lámbicas es el de 25 – 34 con un 7,8% de respuestas “Si” y el de menor conocimiento el de 18 – 24 con un 97,4% de respuestas “No” (tabla 11).

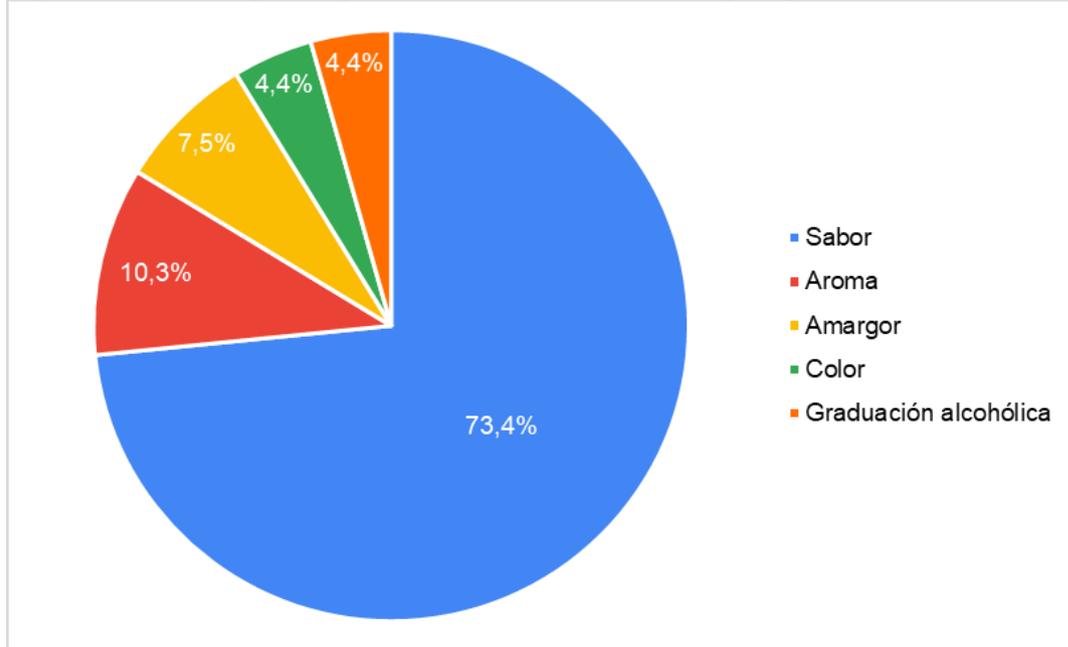
¿Conocés las cervezas lámbicas?	Cantidad	%
18 - 24	78	
No	76	97,44
Si	2	2,56
25 -34	90	
No	83	92,22
Si	7	7,78
35 - 44	29	
No	27	93,10
Si	2	6,90
45 - 54	30	
No	28	93,33
Si	2	6,67
+54	25	
No	24	96,00
Si	1	4,00
Gran Total	252	

Tabla 11. Distribución de respuestas sobre conocimiento de cervezas lámbicas segregado por rango etario.

¿Cuál es la característica que más te atrae o atraería al momento de consumir cervezas lámbicas?

Como se puede observar tanto en la figura 13 como en la tabla 12, la característica que el consumidor entiende más atractiva al momento de consumir una cerveza lámbica es el sabor (73,4%).

Figura 13. Gráfico de porcentaje de características más atractivas que esperaría en una cerveza lámbica.



¿Cuál es la característica que más te atrae o atraería al momento de consumir cervezas lámbicas?	Cantidad	%
Sabor	185	73,41
Aroma	26	10,32
Amargor	19	7,54
Color	11	4,37
Graduación alcohólica	11	4,37
Gran Total	252	

Tabla 12. Distribución de características más atractivas esperadas en cervezas lámbicas

Segregando entre la población que tiene y no tiene conocimiento de las cervezas lámbicas (tabla 13), podemos ver que la población que conoce las cervezas lámbicas sólo eligió como características atractivas el sabor (opción predominante), el aroma y el amargor. La expectativa de consumidores nuevos es mayoritariamente la de conocer sabores nuevos, lo cual podrá ser cubierto mediante la elaboración de este nuevo estilo, ya que su diferencial es su distintivo sabor y aroma.

¿Cuál es la característica que más te atrae o atraería al momento de consumir cervezas lámbicas?	Cantidad	%
No conoce lámbicas	238	
Sabor	176	73,95
Aroma	22	9,24
Amargor	18	7,56
Color	11	4,62
Graduación alcohólica	11	4,62
Si conoce lámbicas	14	
Sabor	9	64,29
Aroma	4	28,57
Amargor	1	7,14
Gran Total	252	

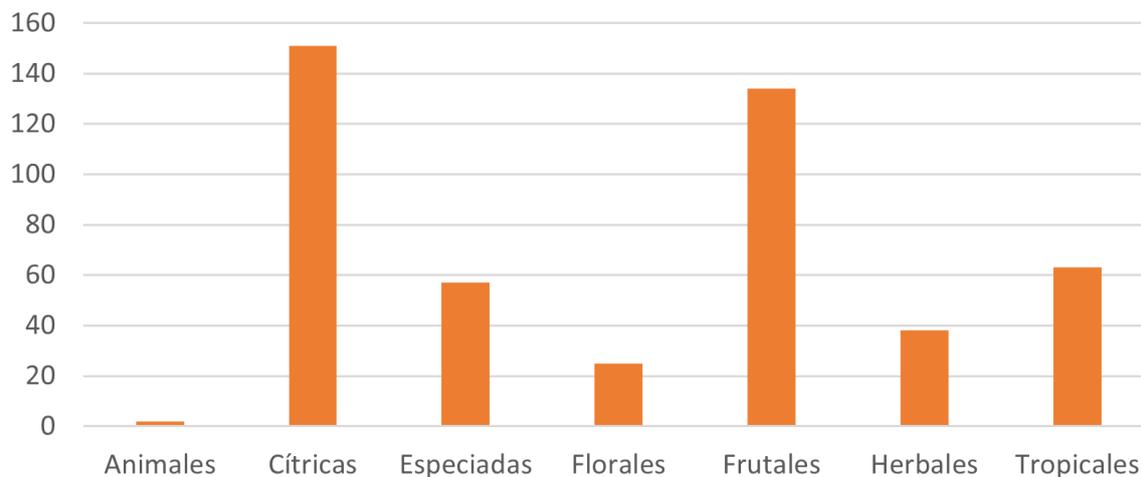
Tabla 13. Distribución de características más atractivas de las cervezas lámbicas según conocimiento/no conocimiento de las cervezas lámbicas.

Respecto a sabor y aroma de las cervezas lámbicas, ¿qué notas te parecen/parecerían deseables?

Las notas cítricas y frutales fueron las seleccionadas por amplia mayoría (tabla 14 y figura 14). Estas notas pueden ser obtenidas por las levaduras *Brettanomyces*, por lo que será posible cumplir con las expectativas del consumidor. Se deberá controlar la fermentación para no llegar a generar compuestos que aporten notas animales (establo, caballo, etc.) que también son propias de la cepa y no están dentro de las más deseadas por los consumidores.

Respecto a sabor y aroma de las cervezas lámbicas ¿qué notas te parecen/parecerían deseables? (Podés elegir más de una opción)	Cantidad	%
Cítricas	151	32,13
Frutales	134	28,51
Tropicales	63	13,40
Especiadas	57	12,13
Herbales	38	8,09
Florales	25	5,32
Animales	2	0,43
Gran Total	470	

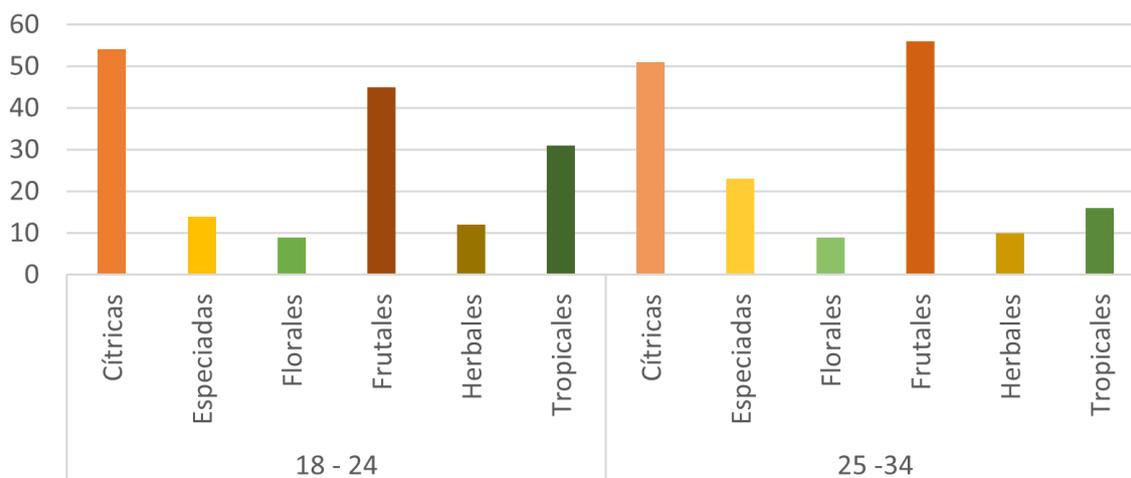
Tabla 14. Distribución de notas de sabor y aroma deseables para el consumidor.

Figura 14. Gráfico de distribución de notas de sabor y aroma deseables para el consumidor.

Para la población objetivo, la tendencia se mantiene. Se nota una marcada preferencia por las notas cítricas y frutales (tabla 15 y figura 15).

Respecto a sabor y aroma de las cervezas lámbicas ¿qué notas te parecen/parecerían deseables? (Podés elegir más de una opción)	Cantidad	%
18 - 24	165	
Cítricas	54	32,73
Frutales	45	27,27
Tropicales	31	18,79
Especiadas	14	8,48
Herbales	12	7,27
Florales	9	5,45
25 -34	165	
Frutales	56	33,94
Cítricas	51	30,91
Especiadas	23	13,94
Tropicales	16	9,70
Herbales	10	6,06
Florales	9	5,45
Gran Total	330	

Tabla 15. Distribución de notas deseables para rangos etáreos 18-24 y 25-34.

Figura 15. Distribución de notas deseables para rangos etéreos 18-24 y 25-34.

¿Conocés alguna cerveza lámbica uruguaya?

El 96% de la población encuestada no conoce cervezas lámbicas uruguayas (tabla 16), por lo que la incorporación de este estilo al mercado nacional tendría un componente innovador.

¿Conocés alguna cerveza lámbica uruguaya?	Cantidad	%
No	241	95,63
Sí	11	4,37
Gran Total	252	

Tabla 16. Distribución respecto al conocimiento del consumidor con relación a cerveza lámbica uruguaya.

Para la población objetivo los porcentajes se mantienen (tabla 17).

¿Conocés alguna cerveza lámbica uruguaya?	Cantidad	%
18 - 24	78	
No	74	94,87
Sí	4	5,13
25 -34	90	
No	86	95,56
Sí	4	4,44
Gran Total	168	

Tabla 17. Distribución respecto al conocimiento de cervezas lámbicas con relación a los rangos etáricos de la población objetivo.

¿Compraría una cerveza lámbica nacional?

La mayoría de la población encuestada contestó que compraría una cerveza lámbica nacional, con un gran porcentaje también de personas que respondieron que “tal vez” la comprarían (tabla 18). Considerando tanto el “Sí” como el “Tal vez” como respuestas positivas, los datos indican que la creación de este estilo sería un aporte novedoso y redituable para la industria nacional.

¿Comprarías una cerveza lámbica nacional?	Cantidad	%
Sí	151	59,92
Tal vez	91	36,11
No	10	3,97
Gran Total	252	

Tabla 18. Distribución de resultados sobre intención de compra de cerveza lámbica nacional.

Para la población objetivo, la tendencia se mantiene (tabla 19).

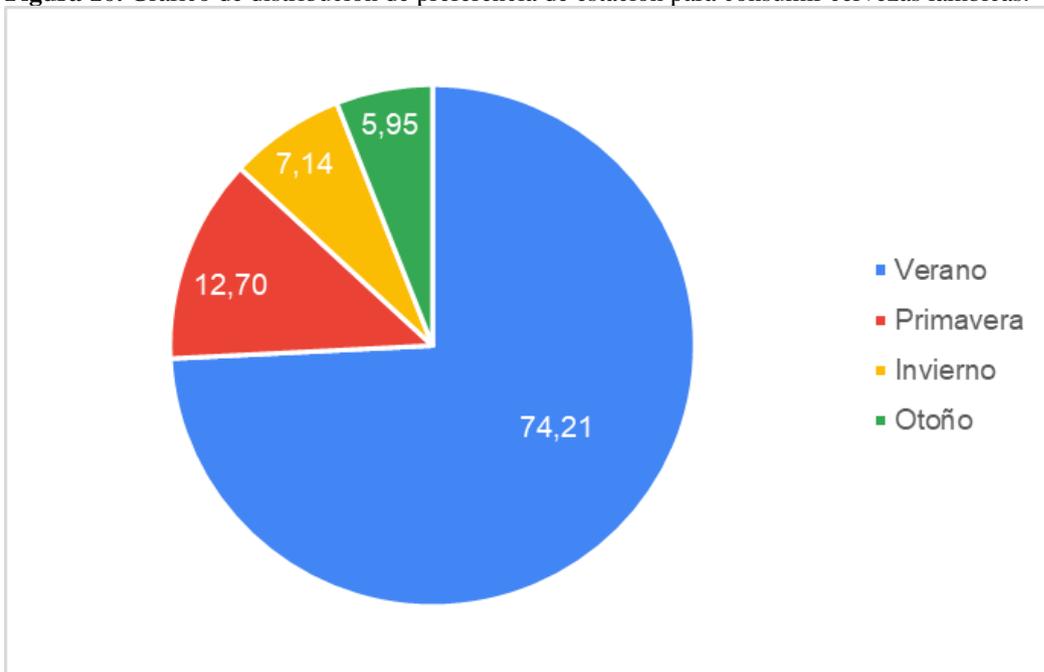
¿Comprarías una cerveza lámbica nacional?	Cantidad	%
18 – 24	78	
Sí	47	60,26
Tal vez	29	37,18
No	2	2,56
25 -34	90	
Sí	59	65,56
Tal vez	28	31,11
No	3	3,33
Gran Total	168	

Tabla 19. Distribución de resultados sobre intención de compra de cerveza lámbica nacional para la población objetivo.

¿En qué estación del año sentís que preferirías consumir este tipo de cervezas?

La mayoría de la población considera que consumiría este tipo de cervezas en estaciones cálidas (verano y primavera), siendo el verano la estación que tuvo amplia mayoría de votos (figura 16 y tabla 20).

Figura 16. Gráfico de distribución de preferencia de estación para consumir cervezas lámbicas.



¿En qué estación del año sentís que preferirías consumir este tipo de cervezas?	Cantidad	%
Verano	187	74,21
Primavera	32	12,70
Invierno	18	7,14
Otoño	15	5,95
Gran Total	252	

Tabla 20. Distribución de preferencia de estación para consumir cervezas lámbicas.

Para la población objetivo, la distribución es aproximadamente la misma (tabla 21).

¿En qué estación del año sentís que preferirías consumir este tipo de cervezas?	Cantidad	%
18 - 24	78	
Verano	57	73,08
Primavera	10	12,82
Otoño	8	10,26
Invierno	3	3,85
25 -34	90	
Verano	64	71,11
Primavera	15	16,67
Invierno	7	7,78
Otoño	4	4,44
Gran Total	168	

Tabla 21. Distribución de preferencia de estación para consumir cervezas lámbicas, considerando la población objetivo.

Análisis cualitativo:

¿En qué situaciones consumís cerveza artesanal?

Figura 17. Diagrama de peso de palabras para situación de consumo de cerveza artesanal. El tamaño de la palabra refleja su repetición.



Como podemos ver en la nube de texto de la figura 17, los conceptos más repetidos fueron: Salidas (35), Amigxs (33), Casa (22), Reuniones (18), Bares (14), Cervecerías (12).

Dentro de la nube de texto, podemos englobar los conceptos en 6 categorías o clusters: *situaciones, personas, lugares, entorno, sensaciones, frecuencias.*

El mayor porcentaje de las personas encuestadas asocia la cerveza artesanal con *situaciones* (38%) seguido de *personas* (27%) y *lugares* (18,5%) (tabla 22).

Cluster	%
Situaciones	38,26
Personas	26,98
Lugares	18,52
Frecuencia	8,47
Entorno	4,23
Sensaciones	3,17

Tabla 22. Porcentaje de palabras por cluster.

Dentro de las *situaciones*, podemos separar en dos cluster que podrían ser interesantes al momento de perfilar el producto: situaciones que involucran consumo de alimentos (reuniones, cenas, cumpleaños, etc.) y situaciones que inherentemente no involucran consumo de alimentos (finde, fiestas, social, etc.). Tomando estos cluster, el 59%

consume este tipo de cervezas en situaciones que involucran alimento mientras que el 41% en situaciones que inherentemente no lo involucran.

¿En qué situación/ocasión elegirías consumir este estilo de cerveza?

Figura 18. Diagrama de peso de palabras para situación de consumo de cervezas lámbicas. El tamaño de la palabra refleja su repetición.



Ante esta pregunta, como se puede ver en la figura 18, los conceptos más repetidos fueron Amigxs (17), Salidas (14), Reuniones (13), Casa (11) y Cena (9).

Separando en los mismos clusters que la pregunta anterior, vemos que sigue dominando el cluster correspondiente a *situaciones* (41%), seguido del cluster *personas* (18%). Lo interesante se ve en el tercer puesto, donde la categoría de *sensaciones* obtiene un 14% de respuestas, y *lugares* pasa a quedar en un cuarto puesto con un 13%. Estos resultados se pueden observar en la tabla 23.

Cluster	%
Situaciones	40,97
Personas	18,06
Sensaciones	13,89
Lugares	13,19
Frecuencia	9,03
Entorno	4,86

Tabla 23. Porcentaje de palabras por cluster.

Haciendo la misma comparación de situaciones que involucran o no alimento, podemos observar que el 53% asocia las lámbicas a situaciones que involucran alimento contra el 47% que asocia con situaciones que no la involucran. Respecto a la pregunta anterior se ve un leve aumento de la asociación con situaciones que no involucran alimento.

Tomando en cuenta el hecho de que el cluster de *sensaciones* aumentó un 10% respecto a la pregunta anterior, y se empareja el porcentaje entre *situaciones* que implican o no alimento, se podría inferir que el consumo de esta cerveza se trataría más bien de la “experiencia sensorial” en sí misma, entendiendo como concepto de experiencia al conjunto de sensaciones y emociones que deviene de la interacción del ser humano con el entorno por medio de sus sentidos. El foco de la población encuestada se basa más en probar sabores nuevos y compartir esta experiencia con su núcleo de personas allegadas más que en un lugar o entorno específico.

Desarrollo de producto

El objetivo de este punto es la obtención de una cerveza lámbica “teórica” con características que recuerden a las IPA, Blonde Ale o APA, con foco en su sabor y que se destaque por sus notas cítricas y frutales.

Como punto de partida, en las tablas 24, 25 y 26 se definen los estilos IPA, Blonde Ale y APA en base a sus características sensoriales y fisicoquímicas, usando como base las descripciones de estilos de Brewers Association (Swersey et al., 2012).

IPA

Características sensoriales

Color	Dorado a cobrizo.
Claridad	Turbidez por frío aceptable a bajas temperaturas.
Aroma y sabor a malta percibidos	Sabor a malta debe estar presente en nivel medio.
Aroma y sabor a lúpulo percibidos	De medio a alto, expresado como floral, herbáceo, terroso, de drupa u otros atributos de las altas tasas de lúpulo.
Amargor percibido	Medio a alto.
Características de la fermentación	Los ésteres afrutados presentes en cantidad media a alta. Las interpretaciones tradicionales se caracterizan por un contenido de alcohol medio a medio-alto. El uso de agua con alto contenido mineral resulta en una cerveza crujiente y seca con un carácter sutil y un equilibrado carácter de compuestos sulfurados. El diacetilo puede estar ausente o puede estar presente en niveles muy bajos.
Cuerpo	Medio.
Notas adicionales	Puede utilizarse una amplia gama de variedades de lúpulo para el amargor. El uso de agua con alto contenido de minerales puede dar lugar a una cerveza crujiente y seca en lugar de una versión acentuada por la malta.

Características fisicoquímicas

Gravedad original (°Plato)	1,046-1,064 (11,4-15,7°Plato)
Extracto aparente/gravedad final (°Plato)	1,012-1,018 (3,1-4,6 °Plato)
Alcohol en peso (Volumen)	3,6%-5,6% (4,5%-7,1%)
Amargor del lúpulo (IBU)	35-63
Color SRM (EBC)	6-14 (12-28 EBC)

Tabla 24. Tabla de estilo IPA (Swersey et al., 2012). Escala de colores SRM (Standard Reference Method) y EBC (European Brewing Convention) en figura 1 del anexo.

APA**Características sensoriales**

Color	Paja a ámbar claro.
Claridad	Turbidez por frío es aceptable a bajas temperaturas. La turbidez del lúpulo es aceptable a cualquier temperatura.
Aroma y sabor a malta percibidos	La maltosidad de baja a media puede incluir un bajo carácter de malta caramelo.
Aroma y sabor a lúpulo percibidos	Altos, mostrando una amplia gama de atributos, incluyendo florales, cítricos, afrutados (bayas, tropicales, drupa y otros), azufre, diésel, ajo-cebolla, pino, resina y muchos otros.
Amargor percibido	Medio a medio-alto.
Características de la fermentación	Los ésteres afrutados pueden estar presentes en cantidad baja a alta. El diacetilo no debería estar presente.
Cuerpo	Medio.

Características fisicoquímicas

Gravedad original (°Plato)	1,044-1,050 (11-12,4 °Plato)
Extracto aparente/gravedad final (°Plato)	1,008-1,014 (2,1-3,6 °Plato)
Alcohol en peso (volumen)	3,5%-4,3% (4,4%-5,4%)
Amargor del lúpulo (IBU)	30-50
Color SRM (EBC)	4-7 (8-14 EBC)

Tabla 25. Tabla de estilo APA (Swersey et al., 2012). Escala de colores SRM (Standard Reference Method) y EBC (European Brewing Convention) en figura 1 del anexo.

Blonde Ale**Características sensoriales**

Color	Pajizo a ámbar claro.
Claridad	La turbidez por frío es aceptable a bajas temperaturas.
Aroma y sabor a malta percibidos	Muy bajo a bajo.
Aroma y sabor a lúpulo percibidos	Muy bajo a medio. Se suelen utilizar lúpulos de tipo noble.
Amargor percibido	Muy bajo a medio-bajo.
Características de la fermentación	Los ésteres afrutados, de bajos a medios, se equilibran con los atributos de la malta de bajo nivel. Puede haber un bajo nivel de picante fenólico derivado de la levadura presente. El diacetilo y el carácter ácido no deberían estar presentes.
Cuerpo	Bajo a medio.

Características fisicoquímicas

Gravedad original (°Plato)	1,054-1,068 (13,3-16,6°Plato)
Extracto aparente/gravedad final (°Plato)	1,010-1,014 (2,6-3,6 °Plato)
Alcohol en peso (Volumen)	5,0%-6,2% (6,3%-7,9%)
Amargor del lúpulo (IBU)	15-40
Color SRM (EBC)	2-7 (4-14 EBC)

Tabla 26. Tabla de estilo Blonde Ale (Swersey et al., 2012). Escala de colores SRM (Standard Reference Method) y EBC (European Brewing Convention) en figura 1 del anexo.

En cuanto a los requerimientos de población celular para la inoculación de *Brettanomyces* en cerveza, se necesita un recuento inicial del orden $10^4 - 10^5$ cel/mL de *Brettanomyces* para que su carácter aparezca. Una población celular excesiva puede resultar sensorialmente perjudicial para las cervezas realizadas con estas levaduras. Una tasa de inoculación de 2×10^5 cel/mL resulta efectiva para obtener las notas sensoriales deseadas. Si se realizara el proceso en barricas de madera nuevas, la recomendación es inocular el doble de esa tasa, de modo que la levadura pueda implantarse (Burini et al., 2021). En este punto la idea es utilizar una cepa de *Brettanomyces* autóctona perteneciente a las especies *B. bruxellensis* y/o *B. anomalus*, de manera de que esta aporte una identidad local que genere un diferencial nacional en el mercado.

El producto final debe presentar un perfil aromático cítrico y frutal, con un carácter fresco para ser consumido en estaciones de calor. El fuerte de esta cerveza tiene que ser su sabor, para aportar una experiencia de consumo que satisfaga las necesidades del consumidor.

En base a los estilos seleccionados, se crea una ficha del perfil sensorial y fisicoquímico que podría presentar la cerveza a ser diseñada (tabla 27):

Características sensoriales

Color	Ámbar – cobrizo.
Claridad	Turbidez por frío aceptable a bajas temperaturas.
Aroma y sabor a malta percibidos	Sabor a malta debe estar presente en nivel bajo a medio.
Aroma y sabor a lúpulo percibidos	De medio a alto, mostrando una amplia gama de atributos, incluyendo florales, cítricos, afrutados (bayas, tropicales, drupa y otros) y aromas inherentes al lúpulo.
Amargor percibido	Medio a alto.
Características de la fermentación	Los ésteres afrutados presentes en cantidad media a alta. El diacetilo puede estar ausente o puede estar presente en niveles muy bajos.
Cuerpo	Medio.

Características fisicoquímicas

Gravedad original (°Plato)	1,044-1,064 (11-15,7°Plato)
Extracto aparente/gravedad final (°Plato)	1,008-1,018 (2,1-4,6 °Plato)
Alcohol en peso (Volumen)	3,5%-5,6% (4,4%-7,1%)
Amargor del lúpulo (IBU)	30-63
Color SRM (EBC)	5-12 (10-24 EBC)

Tabla 27. Caracterización sensorial y fisicoquímica para el nuevo estilo de cerveza a diseñar. Escala de colores SRM (Standard Reference Method) y EBC (European Brewing Convention) en figura 1 del anexo.

El paso clave en nuestro desarrollo es la fermentación, donde se deberá controlar el medio y seleccionar las cepas de inóculo adecuadas para obtener el producto con las características sensoriales deseadas por los consumidores. A continuación, un detalle de algunos metabolitos secundarios producidos por levaduras no *Saccharomyces* y sus descriptores relevantes para la industria cervecera según Michel et al. (2016).

Compuestos carbonílicos (tabla 27): en general, asociados a aromas no deseados.

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Descriptorios aromáticos
Acetaldehído	10	Manzana verde, Pasto
Diacetilo	0,1 – 0,15	Manteca
2,3-pentanodiona	~0,9	Acaramelado

Tabla 27. Compuestos carbonílicos producidos por levaduras no *Saccharomyces* (Michel et al., 2016)

Fenoles (tabla 28): se conocen comúnmente como “off-flavours fenólicos” en general aportan aromas descriptos como clavo de olor, ahumado, picante, medicinal y quemado. Dependiendo el estilo de cerveza, pueden aportar aromas deseados o no deseados.

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Descriptorios aromáticos
4-etilfenol	0,9	Fenólico, astringente
4-etilguaiaicol	0,13	Fenólico, dulce
4-vinilguaiaicol	0,3	Fenólico, amargo, clavo de olor
4-vinilfenol	0,2	Fenólico, ahumado

Tabla 28. Compuestos fenólicos producidos por levaduras no *Saccharomyces* (Michel et al., 2016)

Ácidos orgánicos (tabla 29): si se encuentran presentes en altas concentraciones aportan sabores y aromas salados y agrios y pueden aportar off-flavours tales como queso y sudor. Son subproductos de la glicólisis, el ciclo de ácido cítrico, y del metabolismo de aminoácidos y de ácidos grasos.

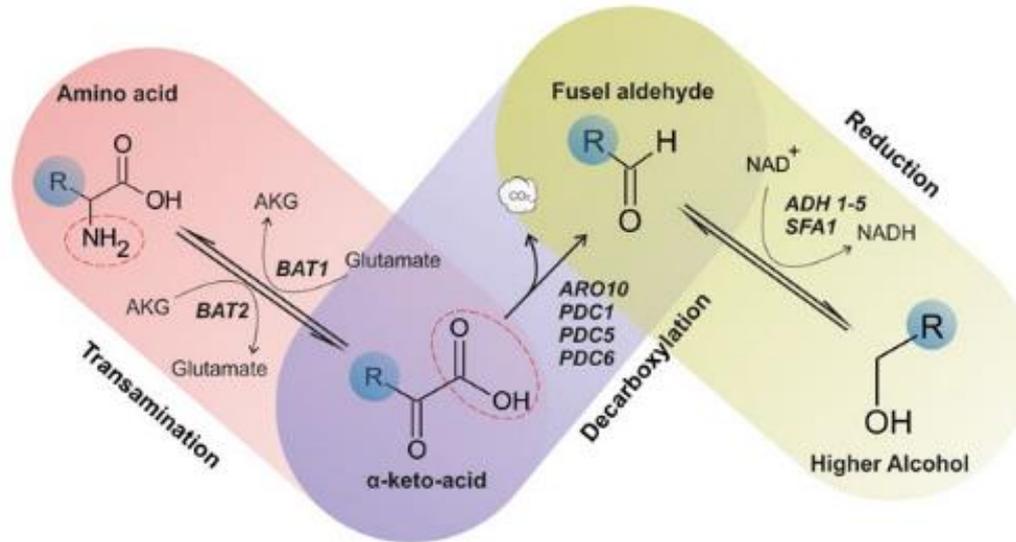
Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Descriptorios aromáticos
Ácido acético	175	Vinagre
Ácido caprílico	15	Cabra
Ácido cáprico	10	Cera
Ácido láurico	6,1	Jabón
Ácido oxálico	500	Salado, oxidado
Ácido cítrico	400	Agrio
Ácido málico	700	Manzana
Ácido succínico	220	Ácido
Ácido láctico	400	Agrio, ácido
Ácido pirúvico	300	Salado, forraje

Tabla 29. Ácidos orgánicos producidos por levaduras no *Saccharomyces* (Michel et al., 2016)

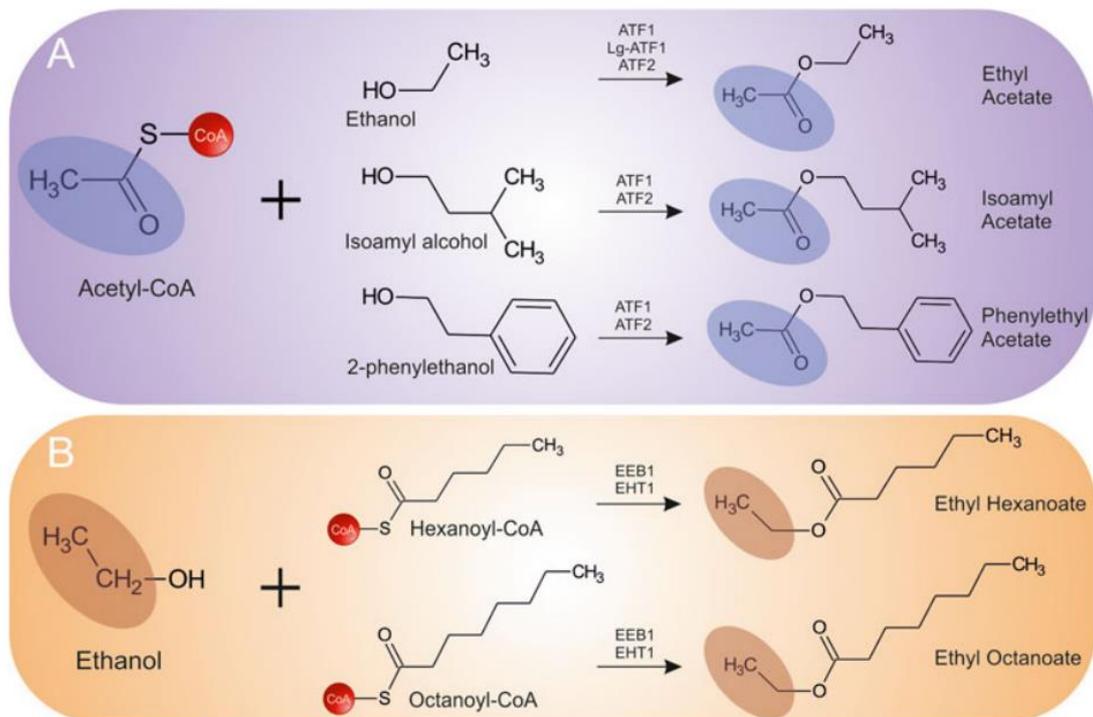
Alcoholes superiores (tabla 30): aportan con aromas florales, frutales y/o herbales dependiendo de su actividad sinérgica con otros compuestos aromáticos. Se producen como subproductos del metabolismo y catabolismo de aminoácidos mediante el camino de Ehrlich (figura 19) (Michel et al., 2016; Pires et al., 2014).

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Descriptorios aromáticos
n-propanol	600	Dulce, alcohólico
Isobutanol	100	Solvente
Pentanol	50-70	Solvente
Alcohol isoamílico	50-65	Banana, alcohólico
Alcohol fenético	40	Osos de gominola, rosa

Tabla 30. Alcoholes superiores producidos por levaduras no *Saccharomyces* (Michel et al., 2016)

Figura 19. Diagrama del camino de Ehrlich (Pires et al., 2014)

Ésteres (tabla 31): contribuyen con un amplio rango de sabores y aromas frutales. Los ésteres de acetato son sintetizados a partir de un alcohol superior o etanol con ácido acético y tienen la mayor concentración de compuestos activos con aporte al flavour en cervezas. Los etil ésteres de ácidos grasos de cadena media son formados por un ácido graso de cadena media y un radical etanol. Ambos procesos están diagramados en la figura 20.

Figura 20. Diagrama de las reacciones químicas involucradas en la biosíntesis de ésteres de acetato (a) y etil ésteres de ácidos grasos de cadena media (b). Los genes principalmente involucrados en cada reacción son presentados sobre las flechas de la reacción (Pires et al., 2014).

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Descriptorios aromáticos
Acetato de etilo	33	Solvente
Acetato de isoamilo	1,6	Banana
Acetato de isobutilo	1,6	Frutal, dulce
Acetato de fenetilo	3,8	Rosa, manzana, miel
Hexanoato de etilo (Caproato de etilo)	0,23	Manzana, anís
Octanoato de etilo (Caprilato de etilo)	0,9	Manzana ácida

Tabla 31. Ésteres producidos por levaduras no *Saccharomyces* (Michel et al., 2016)

Alcoholes monoterpénicos (tabla 32): sustancias derivadas de las plantas que aportan aromas florales. En el caso de la cerveza, provienen del lúpulo.

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L) *(µg/L)	Descriptorios aromáticos
Linalool	5	Lavanda
α -terpineol	2	Lila
β -citronelol	8*	Limón, lima
Geraniol	6*	Rosa
Nerol	0,5	Rosa, cítrico

Tabla 32. Alcoholes monoterpénicos producidos por levaduras no *Saccharomyces* (Michel et al., 2016)

Brettanomyces anomalus

Como consecuencia de su actividad β -glucosidasa, *B. anomalus* puede hidrolizar los monoterpenos ligados a glucósidos que están presentes en varias frutas, así como también del lúpulo. La liberación de estos monoterpenos les otorga actividad aromática. La importancia que tiene esta cepa es que puede metabolizar algunos ácidos como ser el p-cumárico y el ferúlico para formar compuestos fenólicos aromáticos como ser el 4-VG o 4-VP. Hay estudios de dos cepas (WY 5151 y WLP 645) que mostraron baja producción de etil caproato y etil caprilato. La producción de etilacetato fue descrita como muy baja, pero aumentó con la adición de ácido láctico al medio. Con otras tres cepas, se analizaron las cervezas obtenidas con panel entrenado y fueron descritas con descriptorios que incluyeron plástico, solvente y quemado o ahumado. Sin embargo, algunas también fueron descritas como frutales y deseablemente complejas.

Brettanomyces anomalus puede producir flavours frutales tanto como fenólicos en la fermentación de cerveza, lo cual describe un perfil acertado con las características deseadas por parte de las personas encuestadas.

Para un inóculo de 12×10^6 cel/mL y una temperatura de fermentación de 20°C los valores de volátiles reportados según Yacobson, 2010 son los observados en la tabla 32:

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Cantidad producida (mg/L)	Descriptorios aromáticos
Acetaldehído	10	1,16	Manzana verde, pasto
Acetato de etilo	33	2,68	Solvente
Lactato de etilo	-	0,59	Leche agria
Caproato de etilo	0,23	0,04	Manzana, anís
Caprilato de etilo	0,9	0,22	Manzana ácida
n-Propanol	600	1,12	Dulce, alcohólico
Isobutanol	100	1,63	Solvente
2-metilbutanol	0,045 (bajo) 0,83 (alto)	0,6	Tostado, subtonos frutales y alcohólicos
Alcohol isoamílico	50-65	2,14	Banana, alcohólico
4-vinilguaiacol	0,3	0,085	Fenólico, amargo, clavo de olor
4-vinilfenol	0,2	n.d.	Fenólico, ahumado
Diacetilo	000,1 – 0,15	0,038	Manteca
2,3-pentanodiona	~0,9	0,007	Acaramelado

Tabla 32. Compuestos analizados en fermentación hecha con *Brettanomyces anomalus* (Michel et al., 2016)

Brettanomyces bruxellensis

Produce aromas asociados con ratón y caballo, pero también frutales y fenólicos. Algunas veces el flavour es descrito como metálico o amargo. Fue reportado que *B. bruxellensis* es capaz de producir varios ésteres etílicos como ser el acetato de etilo.

Se realizaron estudios con varias cepas de *B. bruxellensis* para los mismos compuestos que los analizados para la anteriormente mencionada *B. anomalus*. En la tabla 33, se muestra el rango de resultados que fue obtenido en los estudios, fermentando los mostos con un inóculo de 12×10^6 cel./mL, a una temperatura de entre $21-22^\circ\text{C}$ (Michel et al., 2016).

Compuesto	Umbral de percepción (mg/L)	Cantidad producida (mg/L)	Descriptor aromáticos
Acetaldehído	10	1,05 – 1,98	Manzana verde, pasto
Acetato de etilo	33	1,88 – 35,8	Solvente
Lactato de etilo	-	0,18 – 1,72	Leche agria
Butirato de etilo	0,45	0 – 0,08	Ananá
Caproato de etilo	0,23	0,11 – 0,39	Manzana, anís
Caprilato de etilo	0,9	0,72 – 4,13	Manzana ácida
n-Propanol	600	0,88 – 6,56	Dulce, alcohólico
Isobutanol	100	2,32 – 8	Solvente
2-metilbutanol	0,045 (bajo) 0,83 (alto)	1,09 – 5,22	Tostado, subtonos frutales y alcohólicos
Alcohol isoamílico	50-65	2,15 – 8,62	Banana, alcohólico
4-vinilguaiacol	0,3	0,02 – 0,051	Fenólico, amargo, clavo de olor
4-vinilfenol	0,2	n.d.	Fenólico, ahumado
Diacetilo	0,1 – 0,15	0,024 – 0,22	Manteca
2,3-pentanodiona	~0,9	0,003 – 0,018	Acaramelado

Tabla 33. Compuestos analizados en fermentación hecha con *Brettanomyces bruxellensis*. n.d = no detectado (Michel et al., 2016)

Evaluando estas dos cepas, qué son de las que hay información documentada sobre su potencial para la elaboración de cervezas, se puede observar que *B. bruxellensis* posee una mayor concentración de ésteres, aportando un mayor carácter frutal. Debería seleccionarse una cepa que tenga baja producción de diacetilo para no elevar su aporte y que no interfiera con los ésteres frutales y que esté en la parte baja del rango de producción de 2-metilbutanol para no saturar con el aroma tostado.

En la producción, también habrá que tener en cuenta el uso de lúpulos que aporten un toque cítrico para sumar la gama aromática deseada por los consumidores, aprovechando la buena actividad β -glucosidasa de *Brettanomyces*, lo que ayuda a liberar los terpenos glicosilados pudiendo enfatizar el aporte de estos compuestos provenientes del lúpulo.

Se podría llegar a utilizar un cultivo mixto para combinar los aspectos beneficiosos para la obtención de un producto sensorialmente adecuado tanto de *Saccharomyces* como de *Brettanomyces*. Ambas levaduras utilizan distintas fuentes de carbohidratos, por lo que podrían ser utilizadas tanto en un coinóculo inicial (se inocula el mosto con ambas levaduras al mismo tiempo) como en un inóculo secuencial (utilizando primero *Saccharomyces* y luego *Brettanomyces*). La ventaja de efectuar un inóculo secuencial es que *Brettanomyces* posee mayor tolerancia al alcohol que *Saccharomyces*, por lo que podría aprovecharse todo el potencial fermentativo y aromático de *Saccharomyces*, esperar a que entre en la fase de muerte, y luego realizar el inóculo con *Brettanomyces* para que utilice los azúcares residuales. Al tener de base el perfil aromático tan conocido por los consumidores otorgado por *Saccharomyces* y luego aportar una nueva gama de aromas por parte de *Brettanomyces*, puede ayudar a que el producto sea mayormente aceptado, ya que contaremos con un set de base de sabores y aromas a los que el

consumidor está acostumbrado, pero con un extra del set de flavours que aportan estas levaduras no convencionales. Se sugeriría como mejor opción el inóculo secuencial para aprovechar las propiedades fermentativas y de liberación de compuestos aromáticos de ambas levaduras.

Entendiendo la demanda de mercado y los avances tecnológicos que ha habido en la industria cervecera, parecería viable la prueba piloto de la elaboración del estilo propuesto, primero evaluando en micro fermentaciones las cepas nacionales encontradas y luego escalando el proceso a planta para efectivamente ver la viabilidad de proceso y realizar ajustes de escala (ya que es sabido que el resultado del escalado en planta puede diferir bastante de las pruebas de laboratorio).

Teniendo en cuenta la variedad de técnicas que se han obtenido en la industria cervecera artesanal, la intención de captar más clientes, la variedad de lúpulos que hay en oferta hoy en día y el conocimiento de los procesos, se sugeriría probar tanto el inóculo simple con levadura *Brettanomyces* como el inóculo secuencial de *Saccharomyces/Brettanomyces*.

Para la definición final del estilo como tal, se realizó un análisis de todos los estilos de la guía Beer Judge Certification Program (BJCP) (Strong, 2021), y se consideraron aquellos con perfil sensorial (aroma, apariencia, sabor) más cercano al perfil de cerveza previamente elaborado en la tabla 27. De dicho análisis se desprende que los estilos American Pale Ale e IPA de Especialidad: Belgian IPA (fichas técnicas en anexo) son los más similares al estilo que se quiere desarrollar.

En base a estos los estilos American Pale Ale e IPA de Especialidad: Belgian IPA y a la información previamente recapitulada, se procede a elaborar una ficha técnica del nuevo estilo propuesto, siguiendo los parámetros de descripción de la BJCP:

Descripción del estilo propuesto

A continuación, se realiza la descripción completa del estilo de cerveza a diseñar, siguiendo la normativa de la guía de estilos de Beer Judge Certification Program.

Impresión general: Cerveza artesanal pálida, de potencia media y con lúpulo, con suficiente malta de apoyo para que la cerveza sea equilibrada y bebible. Lupulada, con sabor afrutado de la levadura *Brettanomyces* y notas cítricas provenientes del lúpulo.

Aroma: Aroma de lúpulo moderado a alto con una amplia gama de posibles características, incluyendo cítricos, frutas tropicales, frutas de hueso, bayas. No se requiere ninguna de estas características específicas, pero el aroma a lúpulo debe ser evidente. Una maltosidad entre neutra y granulada, de baja a moderada, apoya la presentación del lúpulo. Ésteres afrutados, de intensidad moderada. Aroma de lúpulo fresco y seco opcional. Ésteres de moderados a altos, a menudo peras, manzanas, cítricos o plátano. Ligero aroma a alcohol, opcional.

Apariencia: Color dorado pálido a ámbar. Cabeza moderadamente grande de color blanco a blanquecino con buena retención. Generalmente bastante clara.

Sabor: El carácter del lúpulo y la malta es similar al del aroma (se aplican las mismas intensidades y descriptores). Los sabores a caramelo suelen estar ausentes o bastante restringidos, pero son aceptables siempre que no desentonen con el lúpulo. Amargor de moderado a alto. Perfil de fermentación limpio. Los ésteres afrutados de la levadura pueden ser de moderados a nulos, aunque muchas variedades de lúpulo son bastante afrutadas. Acabado de medio a seco. El equilibrio es típicamente hacia el lúpulo tardío y el amargor; la presencia de la malta debe apoyar, no distraer. El sabor y el amargor del lúpulo suelen persistir hasta el final, pero el regusto debe ser generalmente limpio y no áspero. El sabor a lúpulo seco fresco es opcional.

Sabor moderado a frutas y especias, los mismos descriptores que el aroma. Sabor de lúpulo moderado a alto, los mismos descriptores que el aroma. Sabor a malta de grano ligero y relativamente neutro, opcionalmente con poco tostado, caramelo o miel. Amargor de moderado a alto. Final seco a medio seco que a menudo acentúa la percepción del amargor. El retrogusto tiene un amargor persistente pero no es áspero.

Sensación en boca: Cuerpo ligero a medio. Nivel de carbonatación de medio a alto, que puede aligerar la impresión de cuerpo.

Observaciones: El estilo deberá tener presencia de esteres afrutados en cantidad necesaria para que las notas frutales sean perceptibles. Los aportes cítricos del lúpulo deberán estar presentes, así como su amargor.

Ingredientes Característicos: Malta pálida neutra. Lúpulo que aporte notas cítricas (por ejemplo: Amarillo, Cascade, etc.). Levadura *Brettanomyces* nativa, con aporte de notas frutales (manzana, banana, ananá, limón, etc.).

Comparación de estilo: Un cruce entre IPA y APA. Típicamente de color más claro, con un perfil de fermentación más limpio y con menos sabores a caramelo que sus homólogas inglesas. Menos amargor en el equilibrio y grado de alcohol que una American IPA. Más maltosa, más equilibrada y bebible, y menos intensamente centrada en el lúpulo y amarga que las American IPA de intensidad de sesión (también conocidas como Session IPA). Más amarga y lupulada que una Blonde Ale.

Estadísticas vitales:

IBU: 30-63

SRM: 5-12

OG: 1,044-1,064

FG: 1,008-1,018

ABV: 4,4%-7,1%

(**IBU:** International Bitterness Units (unidad de medida de amargor de las cervezas);

SRM: Standard Reference Method (escala de color de cervezas); **OG y FG:** Gravedad Original y Gravedad Final (medida de densidad que permite saber el contenido alcohólico de la cerveza. La gravedad original se mide previo a la fermentación y la final luego de la fermentación); **ABV:** Alcohol by Volume (medida de alcohol en % volumen/volumen).

Conclusiones

- Se logró hacer una descripción taxonómica de las levaduras *Brettanomyces*.
- Se logró analizar la capacidad fermentativa y los perfiles de compuestos aromáticos de las levaduras *Brettanomyces*.
- La población objetivo para el desarrollo de producto son los jóvenes entre 18 y 30 años. El perfil de cerveza esperado por esa población debe tener características que recuerden a las IPA, Blonde Ale o APA, con foco en su sabor, que destaque por sus notas cítricas y frutales.
- Del análisis cualitativo de preguntas de respuesta abierta, se concluye que el consumo de esta cerveza se trataría más bien de la “experiencia sensorial” en sí misma, entendiendo como concepto de experiencia al conjunto de sensaciones y emociones que deviene de la interacción del ser humano con el entorno por medio de sus sentidos. La población encuestada tiene mayor foco en la experiencia que le pueda aportar el producto (probar sabores y aromas nuevos) en situaciones sociales, compartiendo esta experiencia, más que en un lugar o entorno específico.
- Se logró elaborar una descripción completa del estilo propuesto, así como proponer un método de producción para su elaboración.

Anexo

American Pale Ale

Impresión general: Cerveza artesanal pálida, de potencia media y con lúpulo, con suficiente malta de apoyo para que la cerveza sea equilibrada y bebible. La limpia presencia del lúpulo puede reflejar variedades de lúpulo clásicas o modernas de América o del Nuevo Mundo con una amplia gama de características.

Aroma: Aroma de lúpulo moderado a moderadamente alto procedente de variedades de lúpulo americanas o del Nuevo Mundo con una amplia gama de posibles características, incluyendo cítricos, flores, pino, resina, especias, frutas tropicales, frutas de hueso, bayas o melón. No se requiere ninguna de estas características específicas, pero el aroma a lúpulo debe ser evidente. Una maltosidad entre neutra y granulada, de baja a moderada, apoya la presentación del lúpulo, y puede mostrar pequeñas cantidades de carácter de malta especial (por ejemplo, pan, tostado, galleta, caramelo). Ésteres afrutados opcionales, de intensidad moderada. Aroma de lúpulo fresco y seco opcional.

Aspecto: Color dorado pálido a ámbar. Cabeza moderadamente grande de color blanco a blanquecino con buena retención. Generalmente bastante clara.

Sabor: El carácter del lúpulo y la malta es similar al del aroma (se aplican las mismas intensidades y descriptores). Los sabores a caramelo suelen estar ausentes o bastante restringidos, pero son aceptables siempre que no desentonen con el lúpulo. Amargor de moderado a alto. Perfil de fermentación limpio. Los ésteres afrutados de la levadura pueden ser de moderados a nulos, aunque muchas variedades de lúpulo son bastante afrutadas. Acabado de medio a seco. El equilibrio es típicamente hacia el lúpulo tardío y el amargor; la presencia de la malta debe apoyar, no distraer. El sabor y el amargor del lúpulo suelen persistir hasta el final, pero el regusto debe ser generalmente limpio y no áspero. El sabor a lúpulo seco fresco es opcional.

Sensación en boca: Cuerpo medio-ligero a medio. Carbonatación de moderada a alta. Final suave en general, sin astringencia ni aspereza.

Observaciones: Las versiones americanas modernas suelen ser simplemente IPAs de menor gravedad. Tradicionalmente era un estilo que permitía la experimentación con variedades de lúpulo y métodos de uso, que ahora pueden encontrarse a menudo como adaptaciones internacionales en países con un mercado de cerveza artesanal emergente. Los jueces deben tener en cuenta las características de los lúpulos modernos de Estados Unidos o del Nuevo Mundo a medida que se desarrollan y liberan.

Historia: Una adaptación de la era moderna de la cerveza artesanal americana de la pale ale inglesa, que refleja los ingredientes autóctonos. La Sierra Nevada Pale Ale se elaboró por primera vez en 1980 y contribuyó a popularizar el estilo. Antes de la explosión de popularidad de las IPA, este estilo era el más conocido y popular de las cervezas artesanales estadounidenses.

Ingredientes característicos: Malta pálida neutra. Lúpulo americano o del Nuevo Mundo. Levadura ale americana o inglesa, de neutra a ligeramente afrutada. Pequeñas cantidades de diversas maltas especiales.

Comparación de estilos: Típicamente de color más claro, con un perfil de fermentación más limpio y con menos sabores a caramelo que sus homólogas inglesas. Puede haber cierta coincidencia de color entre la American Pale Ale y la American Amber Ale. La American Pale Ale será generalmente más limpia, tendrá un perfil de malta menos acaramelado, menos cuerpo y a menudo más lúpulo de acabado. Menos amargor en el equilibrio y grado de alcohol que una American IPA. Más maltosa, más equilibrada y bebible, y menos intensamente centrada en el lúpulo y amarga que las American IPA de intensidad de sesión (también conocidas como Session IPA). Más amarga y lupulada que una Blonde Ale.

Estadísticas vitales:

IBU: 30 - 50

SRM: 5 - 10

OG: 1.045 - 1.060

FG: 1.010 - 1.015

SRM: 5 - 10

ABV: 4.5 - 6.2%

Ejemplos comerciales: Deschutes Mirror Pond Pale Ale, Half Acre Daisy Cutter Pale Ale, Great Lakes Burning River, La Cumbre Acclimated APA, Sierra Nevada Pale Ale, Stone Pale Ale 2.0

Etiquetas: fuerza-estándar, color-pálido, fermentación-alta, norte-américa, estilo-artesanal, familia-pálida, amarga, lúpulo

IPA de Especialidad: Belgian IPA

Impresión general: Una IPA seca y lupulada, con el sabor afrutado y picante de la levadura belga. A menudo de color más claro y atenuado, similar a una Tripel belga que ha sido elaborada con más lúpulo.

Aroma: Aroma de lúpulo de moderado a alto, que suele reflejar el carácter de los lúpulos americanos o del Nuevo Mundo (tropical, melón, fruta de hueso, cítrico, a pino, etc.) o de los lúpulos continentales (especiado, herbal, floral, etc.), posiblemente con una ligera nota de lúpulo seco. Suave dulzor de la malta, a veces con un carácter azucarado o de miel, pero raramente caramelo. Ésteres de moderados a altos, a menudo peras, manzanas, cítricos o plátano. Ligeras especias, clavo o pimienta, opcional. Ligero aroma a alcohol, opcional.

Aspecto: Color entre dorado claro y ámbar. Cabeza moderada a grande de color blanquecino con buena retención. Claridad entre buena y bastante brumosa.

Sabor: Sabor moderado a frutas y especias, los mismos descriptores que el aroma. Sabor de lúpulo moderado a alto, los mismos descriptores que el aroma. Sabor a malta de grano ligero y relativamente neutro, opcionalmente con poco tostado, caramelo o miel. Amargor de moderado a alto. Final seco a medio seco que a menudo acentúa la percepción del amargor. El retrogusto tiene un amargor persistente pero no es áspero.

Sensación en boca: Cuerpo ligero a medio. Nivel de carbonatación de medio a alto, que puede aligerar la impresión de cuerpo. Ligera calidez opcional.

Observaciones: La elección de la cepa de levadura y de las variedades de lúpulo es fundamental, ya que muchas opciones chocarán horriblemente.

Historia: Un estilo relativamente moderno, que data de mediados de la década de 2000. Los cerveceros caseros y las cervecerías artesanales sustituyeron la levadura belga en sus recetas de IPA americanas. Las cervecerías belgas suelen añadir más lúpulo a sus cervezas pálidas más fuertes.

Ingredientes característicos: Cepas de levadura belga utilizadas en la elaboración de Tripels belgas y Golden Strong Ales. Los ejemplos estadounidenses suelen utilizar lúpulos americanos o del Nuevo Mundo, mientras que las versiones belgas suelen utilizar lúpulos europeos y sólo malta pálida. Son comunes los adjuntos de azúcar.

Comparación de estilos: Un cruce entre una IPA o Double IPA americana con una Golden Strong Ale belga o una Tripel belga. Este estilo puede ser más picante, fuerte, seco y afrutado que una IPA americana.

Estadísticas vitales:

IBU: 50 - 100

SRM: 5 - 8

OG: 1.058 - 1.080

FG: 1.008 - 1.016

ABV: 6,2 - 9,5%

Ejemplos comerciales: Brewery Vivant Triomphe, Green Flash Le Freak, Houblon Chouffe, Urthel Hop It

Etiquetas: alta potencia, color pálido, fermentación alta, norteamérica, estilo artesanal, familia ipa, familia de especialidades, amarga, lupulada

Escala de colores SRM/EBC

Figura 1. Escala de colores SRM y EBC



Bibliografía

- Basso, R. F., Alcarde, R., & Barbosa Portugal, C. (2016). Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, 86(August 2016), 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing. *Revista Argentina de Microbiología*, xxxx. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Callejo, M. J., García Navas, J. J., Alba, R., Escott, C., Loira, I., González, M. C., & Morata, A. (2019). Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers. *European Food Research and Technology*, 245(6), 1229–1238. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03244-w>
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*, 4(2). <https://doi.org/10.3390/fermentation4020038>
- Colomer, M. S., Chailyan, A., Fennessy, R. T., Olsson, K. F., Johnsen, L., Solodovnikova, N., & Forster, J. (2020). Assessing Population Diversity of Brettanomyces Yeast Species and Identification of Strains for Brewing Applications. *Frontiers in Microbiology*, 11(April), 1–21. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00637>
- Gibson, B., Geertman, J.-M. A., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D., Louis, E. J., Magalhães, F., Magalhães, M., & Sampaio, J. P. (2017). New yeasts-new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research*, 17(4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology*, 72, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
- Kheir, J., Salameh, D., Strehaiano, P., Brandam, C., & Lteif, R. (2013). Impact of volatile phenols and their precursors on wine quality and control measures of Brettanomyces/Dekkera yeasts. *European Food Research and Technology*, 237(5), 655–671. <https://doi.org/10.1007/s00217-013-2036-4>
- Kosel, J., Čadež, N., & Raspor, P. (2014). Factors affecting volatile phenol production during fermentations with pure and mixed cultures of Dekkera bruxellensis and Saccharomyces cerevisiae. *Food Technology and Biotechnology*, 52(1), 35–45.
- Krippendorff, K. (2004). *Content Analysis: An Introduction to Its Methodology* (2nd ed.). (M. H. Seawell, J. Meyers, C. A. Hoffman, & J. Selhorst, Eds.; Second Edi). Sage Publications, Inc.
- Menoncin, M., & Bonatto, D. (2019). Molecular and biochemical aspects of Brettanomyces in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 125(4), 402–411. <https://doi.org/10.1002/jib.580>

- 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*. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- 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. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Recherches, I. de. (1966). The Crabtree Effect : A Regulatory System in Yeast. *Microbiology*, 44(2), 149–156.
- Roach, M. J., & Borneman, A. R. (2020). New genome assemblies reveal patterns of domestication and adaptation across *Brettanomyces* (Dekkera) species. *BMC Genomics*, 21, 1–15. <https://doi.org/10.1101/805721>
- Schinca, C., Medina, K., & Ares, G. (2019). *Percepción del consumidor uruguayo de cerveza artesanal*.
- Serra Colomer, M., Funch, B., & Forster, J. (2019). The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current Opinion in Biotechnology*, 56, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009>
- Serra Colomer, M., Funch, B., Solodovnikova, N., Hobbey, T. J., & Förster, J. (2020). Biotransformation of hop derived compounds by *Brettanomyces* yeast strains. *Journal of the Institute of Brewing*, 126(3), 280–288. <https://doi.org/10.1002/jib.610>
- Starmer, W. T., & Lachance, M. A. (2011). Yeast ecology. *The Yeasts*, 1(1987), 65–83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00006-9>
- 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. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). *Taming Wild Yeast : Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations*. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
- Stewart, G. G., Russell, I., & Anstruther, A. (Eds.). (2018). *Handbook of Brewing* (Third). Taylor & Francis Group, LLC.
- Strong, G. (2021). *Beer Judge Certification Program 2021 Style Guidelines*. 86. <https://www.bjcp.org/bjcp-style-guidelines/>
- Swersey, C., American, G., & Festival, B. (2012). *Brewers Association 2012 Beer Style Guidelines*. 1–35.
- Tataridis, P., Kanelis, A., Logotetis, S., & Nerancis, E. (2013). Use of non-saccharomyces *Torulaspora delbrueckii* yeast strains in winemaking and brewing.

Zbornik Matice Srpske Za Prirodne Nauke *Matica Srpska Journal for Natural Sciences*, 124, 415–426. <https://doi.org/10.2298/zmspn1324415t>

Wedral, D., Shewfelt, R., & Frank, J. (2010). The challenge of *Brettanomyces* in wine. *LWT - Food Science and Technology*, 43(10), 1474–1479. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>

White, C., & Zainasheff, J. (2010). Yeast: The practical guide to beer fermentation. In Ph. D. William L. Pengelly & D. Labinsky (Eds.), *Angewandte Chemie International Edition*, 6(11), 951–952. Brewers Publications.

Yacobson, C. (2010). *Pure culture fermentation characteristics of Brettanomyces yeast species and their use in the brewing industry*. <http://brettanomycesproject.com/dissertation/>