



UNIVERSIDAD
DE LA REPÚBLICA
URUGUAY



Insumos para el desarrollo de cerveza artesanal reducida en carbohidratos

Lic. Cecilia Schinca Rodríguez

Presentada como uno de los requisitos para el título de

Magíster

Programa de Posgrado en Biotecnología

de la Facultad de Ciencias de la Universidad de la República

Directores:

Dra. Karina Medina

Dr. Gastón Ares

Octubre 2023

**Insumos para el desarrollo de
cerveza artesanal reducida en carbohidratos**

Tribunal

Dra. Inés Ponce de León

Dra. Lucía Antúnez

Dr. Diego Libkind

Resumen

La cerveza constituye la bebida alcohólica más consumida en Uruguay. En particular, la cerveza artesanal nacional ha experimentado una expansión productiva, observándose en los últimos años un alto registro de nuevas marcas. El foco en la salud, y el aumento de demanda de los consumidores por bebida reducidas en calorías ha generado diversas investigaciones para obtener cervezas artesanales con estas características.

Considerando estos mercados en expansión, se vuelve relevante investigar insumos innovadores que permitan generar productos con identidad propia que impacten en la competitividad de la industria nacional. En este contexto, el presente proyecto de tesis planteó como objetivo la generación de insumos microbiológicos y sensoriales.

Desde el punto de vista microbiológico, el objetivo fue la búsqueda de levaduras nativas para la producción de cervezas reducidas en carbohidratos, centrándose en aquellas con actividad amilásica y/o alta atenuación, de manera de reducir los azúcares remanentes y dextrinas que se encuentran en el mosto de las cervezas convencionales. Se obtuvo así una colección de levaduras con actividad amilásica y otra de levaduras con potencial para la industria cervecera por su capacidad de fermentar maltosa, uno de los azúcares principales del mosto. No se encontraron levaduras con ambas características. Se seleccionaron dos levaduras con características de interés para el objetivo planteado. Una de ellas, perteneciente a la especie *Lachancea thermotolerans* mostró un rendimiento de fermentación, consumo de azúcares y producción de alcohol y glicerol similar a una levadura comercial. Es una potencial candidata a ser usada en cultivo mixto con levaduras con actividad amilásica para producir cerveza reducida en carbohidratos. Por otro lado, la segunda cepa seleccionada constituye la candidata con mayor potencial, pertenece a la especie *Starmerella meliponinorum*, y se destaca por su alta atenuación debido al consumo de maltotriosa y producción de glicerol.

Respecto de los insumos sensoriales, se buscó en primer lugar conocer la percepción del consumidor uruguayo respecto a la cerveza y cerveza artesanal, así como recabar datos sobre hábitos de consumo. Los resultados mostraron que el consumidor percibe a la cerveza artesanal como un producto diferente y sus motivaciones de consumo son distintas que para la cerveza industrial. La cerveza artesanal se relaciona directamente con características del producto, la experiencia de su consumo o su proceso de elaboración. Se destacaron las características de sabor, aspectos hedónicos, la experiencia de la degustación y la innovación. Esta última asociación fortalece la importancia de la búsqueda de insumos que permitan elaborar productos novedosos.

Por otro lado, para la cerveza los consumidores realizan asociaciones mayoritariamente con el contexto y motivación de consumo, así como con características sensoriales del producto, principalmente relacionado a la temperatura de consumo (categoría fresca/fría) y la espuma. Referencias específicas a aspectos vinculados a la salud se mencionaron con muy baja frecuencia en ambos casos, no encontrándose asociaciones específicas a las cervezas reducidas en carbohidratos. Adicionalmente, se investigaron las características sensoriales que definen a nuestras cervezas artesanales rubias e India Pale Ale, así como los atributos de preferencia de los consumidores nacionales para estos estilos de cerveza.

Los principales resultados de esta investigación permitieron conocer la percepción del consumidor uruguayo respecto a la cerveza artesanal, sus preferencias respecto a los estilos más consumidos, así como obtener levaduras nativas para generar insumos microbiológicos innovadores en la producción de cervezas reducidas en carbohidratos.

Agradecimientos

Este proyecto se llevó a cabo gracias al apoyo de muchas personas e instituciones que, aportando desde su lugar, permitieron que pudiera desarrollarme académica y profesionalmente.

Quiero agradecer a mis tutores, Karina y Gastón por darme la oportunidad y espacio para realizar el trabajo, así como su guía en las distintas etapas de la tesis.

A todo el grupo del laboratorio de Enología y Biotecnología de las Fermentaciones Flor, Noe, Anita, Nico, Nara, Vale, Bonini, Yanine, Laura, Gabriel, María José, Dellacassa, Boido, Karina, Francisco. En particular formamos con Noe, Nara y Nico un hermoso grupo cervecero con el que intercambiamos y compartimos divertidas tardes. A Flor, gracias infinitas por su apoyo en los aislamientos e introducción al uso del HPLC. En este aspecto también agradecer a Eloísa por su apoyo en el uso de este equipo y a Iván por permitirnos el acceso. A Laura, Boido y Dellacassa por sus consejos con algunos cromatogramas. Gracias al equipo de sensorial Lucía, Leticia, Florencia y Ana por apoyar en la logística de las evaluaciones sensoriales.

Agradecer también a quienes nos dieron acceso para realizar los muestreos de levaduras: Cervecería Índica, INIA Las Brujas, Bodega Bouzá, Bodega Cerro Chapeú, y a quienes nos dieron el espacio para hacer las evaluaciones sensoriales de cervezas nacionales, Bar El Capitán de Punta del Este, Sinergia y el Mercado Agrícola.

Gracias a quienes apoyaron financieramente el proyecto: CSIC proyecto No. 1506 “Cerveza artesanal reducida en carbohidratos a partir de la utilización de levaduras nativas del Uruguay”, responsable Dra. Karina Medina y a la Agencia Nacional de Investigación en Innovación (ANII) a través de la beca de maestría POS_NAC_2018_1_152098.

Finalmente agradecer a mi familia por el apoyo. A mis amigas de siempre Vivi, Pato, María, Pituz, Vale, y la Negra gracias por el aguante. Especialmente, gracias Vale por el apoyo fuera y dentro del laboratorio. A las nuevas amigas Flor, Anita, Noe y Nara, gracias por los momentos dentro y fuera del laboratorio. A Pablo gracias infinitas por la paciencia y apoyo. A Oreja por su constante y fiel compañía.

A Feli, que llegaste a nuestras vidas trayendo un torbellino de emociones y acompañaste la etapa final de este trabajo, espero que te hayan quedado los abrazos mientras escribía esta tesis.

Divulgación

Parte de este trabajo de tesis ha sido publicado y presentado en las siguientes revistas y congresos.

Revistas

- Schinca C, González MN, Carrau F, Medina K. Biodiversity and brewing attitude of non-*Saccharomyces* strains isolated from Uruguayan vineyards and other ecosystems. Enviado para su publicación en el International Journal of Food Microbiology.

Congresos

- Schinca, C.; Debernardis, F.; Carrau, F.; Medina, K. “Biodiversity and brewing ability of non-*Saccharomyces* strains isolated from Uruguayan vineyards”. 36th International Specialized Symposium on Yeast (ISSY). Julio 2022, Vancouver, Canadá.
- Tourné, F.; Schinca, C.; Medina, K.; Panizza, P. “Desarrollo de un preparado de amilasas producidas por cepas de *Aureobasidium pullulans* nativas y su aplicación a la producción de cerveza”. III Congreso Nacional de Biociencias. Octubre 2022, Montevideo, Uruguay.
- Schinca, C.; Carrau, F.; Medina, K. “Levaduras nativas no tradicionales para la elaboración de cervezas artesanales”. 2nd International Workshop on Brewing Yeasts (IWOBY). 20 – 21 de noviembre 2021, Bariloche, Argentina.
- Schinca, C.; Medina, K.; Debernardis, F.; Carrau, F. “Caracterización de levaduras nativas para la producción de cerveza”. Congreso Nacional de Biociencias. Octubre 2019, Montevideo, Uruguay.
- Medina, K.; Larroque, M.N.; Schinca, C.; Mannise, N.; Giannone, N.; Carrau, F. “Selection of non-conventional native yeasts for craft beer production with low carbohydrate content and gluten free”. 30° Congreso Brasileiro de Microbiología. Octubre 2019, Maceió, Brasil.
- Schinca, C.; Medina, K.; Debernardis, F.; Carrau F. “Selection of native yeasts for low-carb craft beer production”. 34th International Specialized Symposium on Yeast (YSSY). Octubre 2018, Bariloche, Argentina.

Artículos de divulgación

- Medina, K.; Schinca, C.; Ares, G. Nota en el periódico La Diaria, sector Ciencia. “La cerveza en la cabeza”. 16 de marzo 2019.
<https://ciencia.ladiaria.com.uy/articulo/2019/3/investigadores-llevan-a-cabo-estudio-para-determinar-como-por-que-y-que-tipos-de-cerveza-artesanal-consumen-los-uruguayos/>

Contenido

Resumen	ii
Agradecimientos	iv
Divulgación	v
Contenido	vii
1. Introducción	2
Objetivo	5
Objetivos específicos	5
Estructura de la tesis	6
2. Marco teórico	9
2.1. Materias primas y elaboración de cerveza	9
2.1.1. Materias primas	10
2.1.2. Proceso de producción de cerveza	14
2.2. Breve historia de la cerveza	20
2.3. Revolución de la cerveza artesanal	22
2.4. Levaduras no convencionales para la producción de cerveza	22
2.5. El consumidor como herramienta para diseñar productos	24
2.6. Cervezas reducidas en carbohidratos	25
3. Insumos microbiológicos	28
3.1. Materiales y métodos	29
3.1.1. Aislamiento de levaduras nativas	29
3.1.2. Caracterización primaria de levaduras	31
3.1.3. Identificación molecular	33
3.1.4. Evaluación de la capacidad fermentativa	34
3.2. Resultados	37
3.2.1. Aislamiento de levaduras	37
3.2.2. Caracterización primaria de levaduras	39
3.2.3. Evaluación de la capacidad fermentativa	44

3.3.	Discusión	54
4.	Percepción y motivación de los consumidores.....	58
4.1.	Materiales y métodos	59
4.1.1.	Metodología.....	59
4.1.2.	Análisis de datos.....	61
4.2.	Resultados	62
4.2.1.	Hábitos de consumo	62
4.2.2.	Asociación libre cerveza y cerveza artesanal.....	64
4.2.3.	Características sensoriales de los estilos de cerveza artesanal más consumidos en el país	67
4.3.	Discusión	69
5.	Preferencias sensoriales de los consumidores	72
5.1.	Materiales y métodos	73
5.1.1.	Marque todo lo que corresponda	73
5.1.2.	Análisis de datos pregunta CATA	75
5.2.	Resultados	76
5.2.1.	Cervezas rubias.....	76
5.2.2.	Cervezas IPA.....	79
5.3.	Discusión	83
6.	Conclusiones y perspectivas.....	85
7.	Referencias	88
Anexo I	100

1

Introducción

1. Introducción

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida a nivel mundial (Steinbach et al., 2023), con un consumo en el último año de 168.000 millones de litros (Statista, 2023). En los últimos años la cerveza artesanal ha experimentado un renovado interés y crecimiento exponencial a nivel global y local.

En Uruguay, el sector de cervecería artesanal comenzó a crecer hace unos 15 años, experimentando un 'boom' en el periodo 2013-2017. Al 2021 existían unas 90 cervecerías (pequeñas y medianas empresas) registradas, siendo Montevideo, Canelones y Tacuarembó los departamentos que nuclean las cervecerías con mayor capacidad de producción (en litros). Entre el 2005 y 2020 la venta de cerveza artesanal aumentó un 43% (Santa Cruz & Sosa, 2021).

En los últimos años también ha aumentado el interés del público por productos más saludables, apuntando en el caso de las cervezas a que sean reducidas en carbohidratos o alcohol (Blanco et al., 2016). Considerando estos mercados en expansión se abren posibilidades de trabajar en el desarrollo de insumos locales y productos con identidad propia.

El enfoque orientado al mercado basado en el consumidor ha sido reconocido como la mejor manera de desarrollar productos de éxito (Ares et al., 2014). Se vuelve entonces importante conocer la percepción del consumidor y sus motivaciones para el desarrollo de productos innovadores, adaptados a las preferencias del público objetivo. Diversos estudios se han realizado en varios países, como Italia, México y Brasil, con el fin de conocer la percepción, motivación y actitudes frente a la cerveza y particularmente la cerveza artesanal (Aquilani et al., 2015; da Costa Jardim et al., 2018; Gómez-Corona et al., 2016; Steinbach et al., 2023). Esta información otorga una guía para definir áreas de trabajo para investigadores y productores con el fin de conseguir productos innovadores que tengan demanda en el mercado actual.

La producción de cerveza requiere cuatro materias primas básicas: malta (principalmente cebada malteada), lúpulo, agua y levadura. La fabricación de esta bebida está ligada a una sucesión de tres procesos bioquímicos: la formación de enzimas en el grano de cereal germinante, la degradación de almidón a azúcares simples por parte de esas enzimas, y la fermentación alcohólica del azúcar (principalmente glucosa y maltosa) a alcohol y dióxido de carbono (Kunze, 2006). La degradación de almidón es una etapa relevante ya que determina la cantidad de azúcares disponibles a ser fermentados posteriormente. Los restos de almidón no

degradados pueden ocasionar inestabilidad microbiológica, enturbiamiento de la cerveza (Bamforth, 2005), aromas no deseados (Wang et al., 2012), y un producto resultante rico en carbohidratos. Los carbohidratos no degradados en esta etapa podrían hacerlo durante la fermentación alcohólica si se utiliza la levadura apropiada.

Durante la fermentación alcohólica se producen la mayoría de los compuestos que influyen en el sabor y aroma de la cerveza y dependen en gran medida de la levadura seleccionada (Kunze, 2006; Pires et al., 2014). *Saccharomyces cerevisiae* es la especie más utilizada para la producción de cerveza y vinos, pero también se ha reportado el uso de otras especies de *Saccharomyces*, así como de levaduras no *Saccharomyces*. Estas últimas son de especial interés debido a su potencial de nuevas e interesantes características, así como por su metabolismo secundario que aportará compuestos que podrán afectar positivamente el sabor y aroma de la cerveza.

Se han realizado varias investigaciones al respecto de la utilización de levaduras no – *Saccharomyces* para la producción de cerveza. *Torulaspota delbrueckii* es la primera levadura no *Saccharomyces* en ser comercializada para la producción de vino, y se la conoce por aumentar el sabor y aroma frutado (Roudil et al., 2019). A pesar de ser inicialmente considerada un contaminante en cerveza, se encontró que podía tener efectos beneficiosos en su producción. Genera mayores cantidades de linalol al transformar los monoterpenos del lúpulo, afectando el aroma final de la cerveza (King & Dickinson, 2000). También se ha encontrado que beneficia el perfil aromático de las cervezas debido a que tras la fermentación con esta levadura se encuentran altos niveles de compuestos como hexanoato de etilo, α -terpineol, y fenil etanol (aromas de fruta, rosas, chicle, banana) (Michel et al., 2016).

Más recientemente, varias levaduras no-*Saccharomyces* con aptitud cervecera se estudiaron para explorar su potencial bajo presiones selectivas en condiciones de fermentación de cerveza (Burini et al., 2021; Iturrutxa et al., 2023; Larroque et al., 2021). En este sentido, algunos de estos ensayos a nivel de laboratorio y escala de cervecería piloto proporcionaron aromas y sabores únicos que pueden contribuir a aumentar la diversidad sensorial y el desarrollo de nuevos estilos de cerveza (Basso et al., 2016; Larroque et al., 2021; Sannino et al., 2019). Esto se vuelve aún más relevante dada la tendencia actual del interés global creciente en la innovación, buscando crear nuevos sabores de cerveza, opciones de bajo contenido alcohólico y una mayor complejidad sensorial, especialmente teniendo en cuenta que la cerveza se ha percibido tradicionalmente como un producto con una diversidad sensorial limitada (Gibson et al., 2017; Postigo et al., 2022).

La presente tesis se enfoca en la generación de insumos sensoriales y microbiológicos para la producción de cervezas reducidas en carbohidratos, buscando aportar en la innovación del mercado nacional de cerveza artesanal con un producto alineado con la tendencia de consumo de productos más saludables (Chrysochou, 2014).

El uso generalizado de levaduras comerciales en la elaboración de cerveza ha llevado a la estandarización de su aroma y sabor, lo que ha provocado inquietud entre cerveceros y consumidores de cerveza. Fuentes locales para el aislamiento de levaduras, como materias primas, flora nativa y sus frutos, pueden ser un nicho interesante como ha ocurrido en otras bebidas como en el caso de los vinos (Carrau & Boido, 2020; Iturrutxa et al., 2023; Lappa et al., 2020). La aplicación de levaduras nativas no convencionales ha sido promovida con la intención de preservar particularidades del terroir específico, considerando el concepto de levadura local como la mejor adaptada a las condiciones ecológicas de determinadas regiones geográficas (Capece et al., 2010; Francesca et al., 2016).

La utilización de levaduras nativas como insumos microbiológico innovador, presenta varias ventajas. Por un lado, generar un producto con identidad local, así como también aportar al consumidor una cerveza novedosa y al mercado de insumos cerveceros nuevas levaduras. La estrategia incluye la generación de una colección de levaduras nativas y su caracterización para fines cerveceros. Aportará información respecto a la diversidad de levaduras encontradas en diversos materiales y su potencial aplicación en la industria cervecera.

Otro aspecto importante es generar conocimiento de la percepción del consumidor de cerveza nacional, en la búsqueda de entender su hábitos y motivaciones de consumo, así como su percepción de la cerveza artesanal. Asociado a esto se realizaron evaluaciones sensoriales de cervezas artesanales nacionales rubias e IPA, los dos estilos más consumidos localmente. Se recabaron datos del ideal de estos productos, obteniendo información de interés para utilizar como insumo en la selección de levaduras.

Los resultados obtenidos constituyen un aporte al sector cervecero local, acercándose a generar productos novedosos y aportando información respecto a las motivaciones y preferencias de los consumidores.

Objetivo

Generar insumos para la elaboración de cervezas artesanales reducidas en carbohidratos considerando aspectos microbiológicos y sensoriales.

Objetivos específicos

1. Aislar y caracterizar levaduras nativas obtenidas a partir de materias primas cerveceras, uvas, frutos nativos y plantas.
2. Seleccionar levaduras nativas que permitan reducir los azúcares residuales del mosto y así producir cerveza reducidas en carbohidratos.
3. Entender las motivaciones de los consumidores de cerveza artesanal.
4. Explorar las preferencias respecto a los aspectos sensoriales en los estilos más consumidos para su posterior incorporación a la selección de las levaduras.

Estructura de la tesis

En la introducción de la tesis se pone en contexto el tema de estudio, delineándose los objetivos y la forma de trabajo. El siguiente capítulo incluye el marco teórico, donde se brinda información general del proceso de producción y sus materias primas, así como el origen de la cerveza, la revolución de la cerveza artesanal, un resumen de insumos alternativos y relevancia e información de las cervezas reducidas en carbohidratos.

La investigación llevada a cabo, se divide posteriormente en tres capítulos. El primero de ellos, el capítulo tres, se refiere a los insumos microbiológicos trabajados, y los dos siguientes, capítulos cuatro y cinco, a los considerados como insumos sensoriales vinculados a la percepción del consumidor y a las características sensoriales del producto.

En el capítulo tres se describe la metodología de la búsqueda de levaduras nativas para la producción de cervezas reducidas en carbohidratos, así como sus resultados y discusión.

Con el fin de conocer la motivación del consumo de cerveza y cerveza artesanal y así comprender los intereses del consumidor, en el capítulo cuatro se describe la investigación realizada al respecto. El capítulo cinco refiere a otro insumo sensorial, donde se investigan las preferencias del consumidor en los estilos de cerveza nacionales más consumidos.

La tesis finaliza en el capítulo 6, donde se resumen las conclusiones y perspectivas derivadas de este trabajo. En la Figura 1 se observa el esquema general de trabajo.

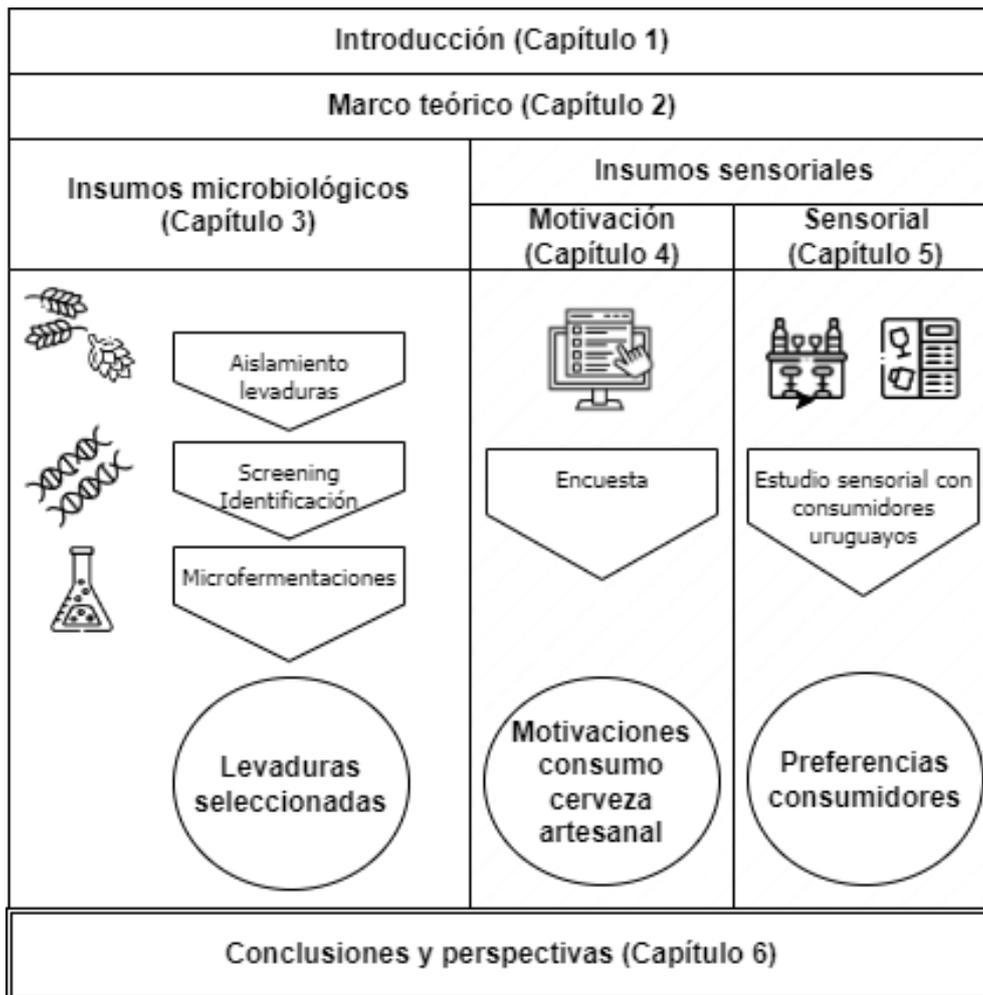


Figura 1. Esquema de la estructura de la tesis

2

Cerveza: producción, historia e insumos innovadores

2. Marco teórico

2.1. Materias primas y elaboración de cerveza

La cerveza es una bebida alcohólica hecha con granos germinados de cebada u otros cereales fermentados en agua, y aromatizada con lúpulo (definición de la Real Academia Española). En Uruguay, de acuerdo al decreto N° 286/009 de 15/06/2009 se entiende exclusivamente por cerveza la bebida resultante de fermentar, mediante levadura cervecera, al mosto de cebada malteada o de extracto de malta, sometido previamente a un proceso de cocción, adicionado de lúpulo. Una parte de la cebada malteada o de extracto de malta podrá ser reemplazada por adjuntos cerveceros.

La definición de cervecería artesanal o cerveza artesanal no tiene consenso. La Asociación Americana de Cerveceros (Brewers Association), define a la cervecería artesanal como pequeña, independiente y tradicional. El término pequeña está asociado a tamaños de producción acordes al mercado, siendo en ese caso una producción anual menor a 6 millones de barriles.

En Uruguay, la Asociación de Microcervecerías Artesanales del Uruguay (AMAU), elaboró una definición de cervecería artesanal guiada por el aprendizaje respecto a las definiciones utilizadas en otros países, principalmente Estados Unidos, Brasil y Argentina; y la adecuación de éstas al mercado uruguayo. De esta manera definió los elementos característicos de una cervecería artesanal según los puntos detallados a continuación (Santa Cruz & Sosa, 2021).

1. Constitución formal de la empresa
2. Alcance: la empresa debe abarcar los procesos de producción, logística y comercialización de sus productos.
3. Tamaño: las ventas anuales no podrán superar el 2,5% de las ventas totales de cerveza de Uruguay
4. Independencia: toma sus decisiones sin depender de grupos corporativos, socios anónimos, inversores externos o capitales de terceros.
5. Elaboración: elaborar sus productos en establecimientos aptos según la autoridad sanitaria competente, utilizando ingredientes nobles (agua, cebada malteada, lúpulo y levadura). Se permite, además, la utilización de ingredientes no tradicionales exclusivamente cuando aporten caracteres distintivos a la cerveza.

6. Comercialización: la empresa no podrá aplicar políticas nocivas de comercialización que perjudiquen a otras cervecerías artesanales. Se entiende por políticas nocivas de comercialización los contratos de exclusividad, imponer o exigir el retiro de otras cervezas por medio de la baja de precios, o exclusividad en cartelería u otro tipo de publicidad en los locales comerciales

2.1.1. Materias primas

Para elaborar cerveza se precisan 4 materias primas básicas: Agua, lúpulo, malta y levadura. Pueden utilizarse además adjuntos cerveceros (Kunze, 2006).

2.1.1.1. Agua

Cuantitativamente el agua es la materia prima mayoritaria de la cerveza. Para la producción de cerveza su calidad debe ser la del agua potable, cumpliendo los requisitos físico-químicos, microbiológicos y sensoriales correspondientes. En Uruguay para el agua potable se aplica el Decreto 315/994 referente al Capítulo 25 Aguas y bebidas sin alcohol del Reglamento Bromatológico Nacional y el Decreto 375/011 que incluye la consideración de la Norma UNIT 833:2008.

La composición de iones y minerales del agua afectará la cerveza final obtenida. Cada cerveza tiene asociada su agua ideal. Esta composición dependerá de la región o fuente de este elemento, así como de los agregados de sales que pueda realizar el cervecero para adecuarla a la cerveza a producir.

Los iones presentes en el agua tendrán distintos efectos. Durante el macerado y la fermentación la interacción de iones de calcio (Ca^{+2}), magnesio (Mg^{+2}) y alcalinidad total como CaCO_3 influirán el pH y otros factores. Los iones de sodio (Na^{+1}), Cloruro (Cl^-) y sulfato (SO_4^{+2}) pueden afectar el sabor del agua y la cerveza, pero no tendrán influencia en el pH o el rendimiento de la fermentación (Palmer & Kaminski, 2013).

El sabor de la cerveza también podrá verse afectado por los iones del agua. Así, por ejemplo, el sulfato o carbonato de calcio puede darle a la cerveza un sabor amargo; el calcio y el magnesio en grandes cantidades producen sabores metálicos y el exceso de sodio puede conferir un sabor salobre (González, 2017).

2.1.1.2. Cebada

La cerveza es un fermentado de cereales malteados. El cereal más comúnmente utilizado es la cebada, pero pueden utilizarse otros como trigo, arroz, avena, etc. La cebada presenta algunas ventajas como su relación almidón / contenido de proteínas y el mantenimiento de su cáscara luego de la cosecha, ya que tiene un importante rol en el macerado (Fox, 2018).

La cebada, *Hordeum vulgare*, es una planta anual de la familia de las gramíneas. Existen muchas variedades de este cereal, siendo las más utilizadas en la producción de cerveza las de dos y las de seis hileras, clasificación de acuerdo a la distribución de los granos sobre el eje de la espiga.

La cebada de dos hileras tiene granos grandes y uniformes, usualmente con la cáscara fina y arrugada. Usualmente tienen un periodo mayor de germinación en el malteado, pero genera mayor extracto (Rani & Bhardwaj, 2021). La de seis hileras tiene mayor poder diastático, mayor cantidad de proteínas solubles.

La materia seca de la cebada se compone en promedio de 70-85% de hidratos de carbono, 10,5-11,5% de proteínas, 1,5-2% de grasas y 1-2% de otras sustancias. Los hidratos de carbono incluyen al almidón, azúcares, celulosa, hemicelulosa y gomas (Kunze, 2006).

El almidón es el componente más importante de la cebada, siendo un 50-65%. Se estructura en forma de granos conocidos como amiloplastos. También contienen hasta 5% de lípidos y 0,5% de sustancias albuminoides. Los granos de almidón están compuestos principalmente de dos polisacáridos con una estructura diferente, amilosa y amilopectina. La amilosa es una molécula lineal de 200 a 400 unidades de glucosa unidas por puentes de hidrógeno en la posición 1,4. La amilopectina es una molécula de mayor tamaño, que presenta diversas ramificaciones, las cadenas glucosídicas unidas por enlace α -(1-4) poseen varias ramificaciones que se unen en enlaces α -(1-6) ((Kunze, 2006).

El contenido de azúcar es bajo siendo de 1,8 a 2%. La celulosa se encuentra en la cáscara y corresponde a un 5-6 %. Se compone de largas cadenas sin ramificaciones de β -glucosa en enlace 1-4. Es insoluble, no es degradada por las enzimas de la malta, no influyendo en la calidad de la cerveza. La hemicelulosa es el componente celular principal en la pared del endospermo y está compuesta por β -glucanos (80-90%) y pentosanós (10-20%), teniendo la degradación del primero influencia en el malteado.

2.1.1.3. Lúpulo

El lúpulo cervecero, *Humulus lupulus L.*, es una de las especies que conforman el género *Humulus* de la familia de las Cannabináceas (Almaguer et al., 2014). Es una especie dioica, trepadora, perenne en su parte subterránea y anual en su parte aérea.

Se estima que el 97% del lúpulo cultivado mundialmente tiene como destino la producción de cerveza, siendo los principales países productores Alemania y Estados Unidos (Almaguer et al., 2014).

Esta materia prima se utiliza principalmente para aportar aromas y amargor a la cerveza, pero también influye en la fermentación por las levaduras, contribuye a la textura de la cerveza (sensación en boca), tiene propiedades bactericidas que evitan el crecimiento de microorganismos contaminantes, reduce el exceso de espuma y ayuda a la coagulación de las proteínas durante la cocción, mejora el rendimiento y adherencia de la espuma en la cerveza (O'Rourke, 2003; Schönberger & Kostelecky, 2011). Aporta también taninos que aumentan el poder reductor de la cerveza y así su resistencia a la oxidación (O'Rourke, 2003).

En su materia seca el lúpulo está compuesto por proteínas 20%, compuestos amargos 18%, sustancias minerales 8%, taninos 3,5%, aceites esenciales 0,5%, siendo el resto celulosa y otras sustancias que no tienen relevancia en la producción de cerveza (Kunze, 2006).

Respecto a su estructura, la parte relevante es la inflorescencia de la planta femenina, que madura para producir lo que se conoce como cono. Los conos contienen pequeños gránulos llamados lupulinas que a su vez contienen resinas duras y blandas y aceites esenciales (O'Rourke, 2003).

Las resinas blandas contienen principalmente α -ácidos y β -ácidos o lupulonas, siendo los primeros lo más importantes para el amargor de la cerveza. La cantidad de α -ácidos y su composición es dependiente de la variedad de lúpulo (Durello et al., 2019).

Durante la cocción los α -ácidos, inicialmente insolubles, son isomerizados a iso- α -ácidos solubles. Algunos de estos compuestos precipitan en la fermentación y enfriamiento y los restantes son los que proporcionan el amargor a la cerveza y al ser tensoactivos también dan estabilidad a la espuma (Kunze, 2006). Los compuestos amargos tienen también efectos bacteriostáticos.

Para expresar el amargor de una cerveza suelen utilizarse las unidades internacionales de amargor o IBU por su sigla en inglés (International Beer Units), donde 1 IBU equivale a 1 mg de iso- α -ácidos L⁻¹ de cerveza (Durello et al., 2019). Su cálculo incluye conocer aspectos que influyen en el amargor de la cerveza como la cantidad de lúpulo y de α -ácidos que contiene, la densidad del mosto, el volumen y el tiempo de cocción.

Los aromas aportados por el lúpulo provienen principalmente del aceite esencial del lúpulo. Este componente abarca 200 a 250 que se caracterizan por su alta volatilidad durante la cocción (Kunze, 2006). La composición del aceite es dependiente de la variedad de lúpulo, por lo que se cultivan variedades específicas para aportar aroma a la cerveza. Estos lúpulos aromáticos tienen cantidades bajas de α -ácidos ($\leq 5\%$). Los lúpulos aromáticos se agregan al final del proceso de cocción, para así evitar pérdida de volátiles por acción del calor (Durello et al., 2019; Kunze, 2006).

El lúpulo contiene además taninos, siendo entre un 2 y 5% de la materia seca, y se encuentran principalmente en las brácteas y raquis. Participan en la formación de turbiedades de la cerveza y contribuyen en su sabor y color (Kunze, 2006).

Las proteínas que se encuentran en el lúpulo llegan en baja proporción a la cerveza, no teniendo entonces un impacto relevante. Otras sustancias presentes en el lúpulo son hidratos de carbono, sustancias minerales y ácidos orgánicos, ninguno de los cuales tiene relevancia para la producción de cerveza.

2.1.1.4. Levadura

Las levaduras son las responsables de realizar la fermentación alcohólica durante la elaboración de cerveza. Son organismos eucariotas, unicelulares, que pertenecen a hongos ascomicetos o basidiomicetos. El género *Saccharomyces*, pertenece a un diverso grupo de ascomicetos e incluye a algunas de las especies de mayor relevancia en la industria de alimentos y bebidas (Lodolo et al., 2008).

Las levaduras cerveceras producen diferentes concentraciones de compuestos que influenciarán el aroma y sabor de la cerveza, que serán dependientes de la composición del mosto, las condiciones de fermentación y principalmente de la cepa de levadura utilizada (Callejo et al., 2019; He et al., 2014).

Las cervezas pueden clasificarse de acuerdo al tipo de fermentación, siendo fermentación alta o fermentación baja de acuerdo a la levadura que utiliza. El primer tipo se caracteriza por realizar la fermentación alcohólica con levaduras domesticadas

Sacharomyces cerevisiae, a una temperatura generalmente de 18-24°C y produce las cervezas conocidas como ale que se destacan por aromas florales, frutales o especiados. En el segundo caso, se producen cervezas de tipo lager, más neutras sensorialmente, donde el proceso es realizado por *Sacharomyces pastorianus* (un híbrido de *S.cerevisiae* x *S. eubayanus*), a una temperatura menor de 8-14°C (Burini et al., 2022; Lodolo et al., 2008; Sannino et al., 2019; Vaughan Martini & Martini, 1987).

2.1.1.5. Adjuntos

En algunos casos se sustituye parte de la malta, entre un 15-20%, por cereales sin maltear que proporcionen almidón, conocidos como adjuntos (Kunze, 2006). Esta práctica se realiza para reducir costos asociados a la malta, por mejor disponibilidad en el mercado local o para obtener modificaciones sensoriales (Poreda et al., 2014). Los más comunes son maíz y arroz, pero también pueden utilizarse otros como el sorgo o la cebada sin maltear.

2.1.2. Proceso de producción de cerveza

La elaboración de cerveza implica romper los carbohidratos de los cereales malteados para formar un mosto compuesto por una solución de azúcares fermentables y otros nutrientes necesarios para el crecimiento de las levaduras. Estos microorganismos a través de la fermentación alcohólica, consumen los azúcares simples, produciendo CO₂, etanol y productos secundarios que influenciarán el sabor y aroma de la cerveza (Willaert, 2006).

El proceso de producción de cerveza incluye las etapas del malteado del cereal, molienda, macerado, cocción, clarificación y enfriamiento del mosto, fermentación alcohólica, maduración, acondicionamiento y operaciones de terminación. En la Figura 2 se muestra un esquema simplificado del proceso.

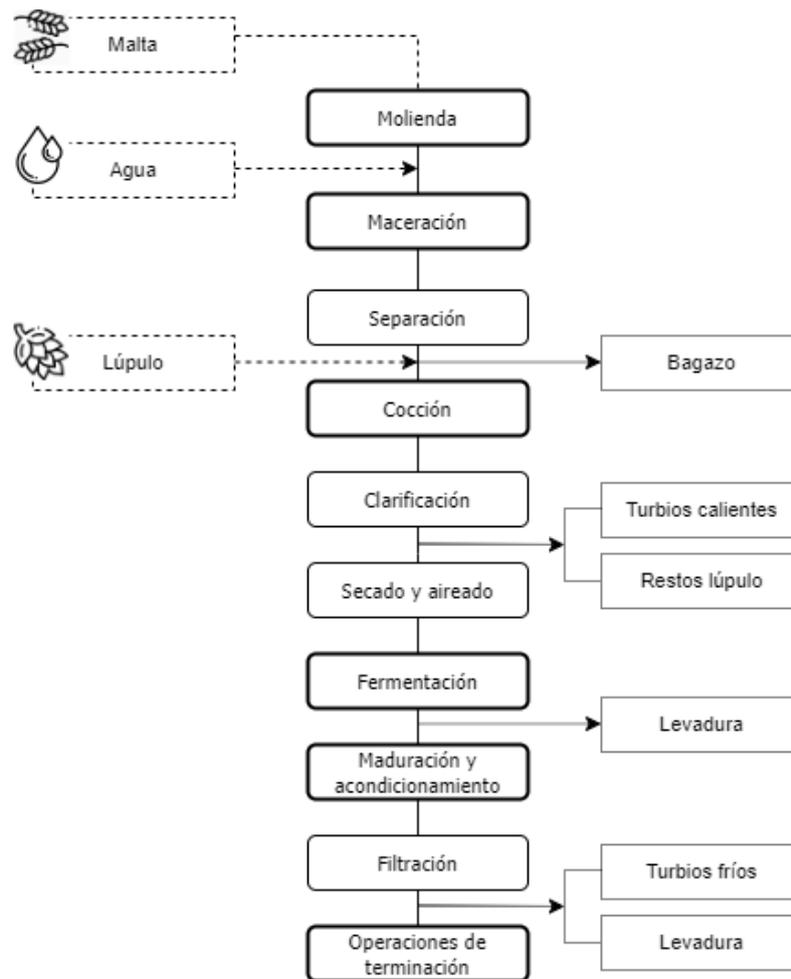


Figura 2. Esquema del proceso de producción de cerveza. Modificado de Willaert et al. (2006)

2.1.2.1. Malteado

El principal objetivo de esta etapa es activar las enzimas del grano de cebada (o cereal utilizado), que posteriormente degradarán el almidón y otros compuestos durante la maceración (Kunze, 2006; Thesseling et al., 2019). El malteado conlleva una serie de pasos que incluyen el remojo de los granos, la germinación y el secado o tostado. En las dos primeras etapas el grano es remojado y aireado periódicamente de manera de activar las enzimas. En la germinación se activan varios grupos de enzimas relevantes: las amilasas, proteasas, peptidasas y β -glucanasas. En la maceración las amilasas convierten el almidón en azúcares fermentables, las proteasas y peptidasas producirán nitrógeno libre disponible (FAN) a partir de las proteínas y las β -glucanasas se encargan de degradar la pared celular del endospermo permitiendo el acceso de otras enzimas (Thesseling et al., 2019). Posteriormente los granos son secados para detener la germinación y mantener la actividad enzimática dentro de los granos; también reduce

los riesgos de deterioro y determina el impacto de la malta en el aroma y el color final de la cerveza (Parker, 2012).

2.1.2.2. Molienda

Este proceso es necesario para exponer y romper el endospermo el grano del cereal con el objetivo de tener almidón más accesible a las enzimas para lograr una mejor extracción de los azúcares fermentables y otros componentes solubles (Harrison & Albanese, 2019). Se utiliza un molino de granos, variando el tipo de acuerdo al uso posterior. La molienda puede ser seca, con sistema de humectación o húmeda (Willaert, 2006). Las cáscaras son necesarias para los procesos posteriores de separado y lavado del grano ya que actúa como un filtro natural para poder separar el mosto de los granos con facilidad.

2.1.2.3. Maceración

En esta etapa la malta molida se mezcla con agua caliente. El objetivo principal es activar las enzimas que degradarán el almidón de la cebada en azúcares fermentables, obteniéndose también azúcares no fermentables conocidos como dextrinas (Parker, 2012). Dentro de los azúcares fermentables el principal es la maltosa (50-60%), seguido por maltotriosa (15-20%), glucosa (10-15%), sacarosa (8%) y fructosa (2%). Las dextrinas remanentes, no pueden ser degradados por las mayorías de las levaduras y forman un 20-25% de los carbohidratos totales de la cerveza final (He et al., 2014).

Durante este proceso se obtiene lo que se conoce como extracto, que es la malta solubilizada gracias a la acción de las enzimas. Las distintas enzimas provenientes de la malta se activan e inactivan a diferentes temperaturas, por lo que el proceso y el extracto obtenido es controlado por el cervecero manipulando las temperaturas y duración de cada etapa (Willaert, 2006). El perfil del mosto dependerá de las materias primas utilizadas, la malta y adjuntos, y el proceso de maceración (He et al., 2014). El extracto obtenido influenciará el contenido de alcohol de la cerveza, la concentración de azúcares remanentes, los perfiles de péptidos y aminoácidos, los nutrientes disponibles para el crecimiento de las levaduras, el pH, y algunas características de la cerveza como espuma, color y claridad (Willaert, 2006).

En la hidrólisis del almidón las principales enzimas que participan son la α -amilasa, β -amilasa y dextrinasa límite, con una menor contribución de la α -glucosidasa (Bamforth, 2009).

Un proceso tradicional de maceración puede comenzar a 45°C, temperatura en la cual se activan las proteasas y degradan las proteínas formando las fuentes de nitrógeno libre para la posterior fermentación. Luego la temperatura aumenta a 62-64°C, el almidón se gelatiniza y se vuelve accesible a las amilasas (Thesseling et al., 2019). La β -amilasa cortará los extremos no reductores de las cadenas de amilasa y amilopectina formando maltosa. Luego el mosto se calienta a 72°C, permitiendo la acción óptima de la α -amilasa para continuar cortando los enlaces 1-4 de las cadenas de polisacáridos, produciendo una mezcla de maltosa, maltotriosa y dextrinas. Finalmente se aumenta la temperatura a 78°C lo que detiene la actividad enzimática (Kunze, 2006; Willaert, 2006).

Luego de la maceración se filtra separando el líquido del sólido o bagazo. Esta filtración puede realizarse de diferentes maneras.

2.1.2.4. Cocción

La cocción del mosto, suele tener una duración de unos 60 a 90 minutos y persigue varios objetivos que incluyen la desnaturalización de las enzimas provenientes de la malta, la esterilización y estabilización microbiológica, la precipitación de proteínas y polifenoles, el agregado de lúpulo y la eliminación de compuestos volátiles y azufrados, entre otros (Kunze, 2006; Parker, 2012; Thesseling et al., 2019).

Las proteínas y polifenoles precipitan ya sea durante la cocción o en el enfriamiento. La agitación durante la cocción favorece la precipitación. Un exceso de proteínas puede dar problemas de clarificación en etapas posteriores (Willaert, 2006).

El lúpulo del amargor se agrega al inicio de la cocción, con el objetivo de extraer e isomerizar los α -ácidos para otorgar amargor (De Keukeleire, 2000). Los aromas derivados de los aceites esenciales de estos lúpulos por lo general se pierden en la cocción. Por este motivo, hacia el final, usualmente unos diez minutos antes de finalizar la cocción, se agregan los lúpulos aromáticos (Kunze, 2006; Parker, 2012).

Ocurre también durante la cocción la reacción de Maillard, donde se producen varios compuestos aromáticos volátiles y no volátiles y melanoidinas coloreadas. Una reacción muy intensa y no controlada puede producir sabores no deseados en la cerveza (Willaert, 2006). Las melanoidinas, junto con la caramelización de los azúcares y la

oxidación de polifenoles, producen un aumento de color (Willaert, 2006). El color aumenta con el aumento del pH del mosto.

La cocción remueve algunos compuestos volátiles, incluyendo compuestos no deseados, como el dimetilsulfuro (DMS), que proporciona un sabor y aroma desagradable en la cerveza terminada. Es necesario una combinación adecuada de tiempo y temperatura (Thesseling et al., 2019). Otros compuestos volátiles provenientes de la malta, de los aceites del lúpulo y también formados durante esta etapa, son removidos en el hervor (Willaert, 2006).

En esta etapa, el mosto se acidifica favoreciendo la clarificación de la cerveza. Se forman también sustancias reductoras, reduciendo el potencial de óxido reducción lo que protege al mosto de reacciones oxidativas (Kunze, 2006).

Con la evaporación de agua que ocurre en esta etapa aumenta la densidad del mosto y se concentran azúcares y otros componentes no volátiles (Willaert, 2006).

Posterior a la cocción viene la clarificación y enfriamiento del mosto, donde es necesario separar los restos de lúpulo y las partículas sólidas generadas durante la ebullición (turbios calientes), para así asegurar el sabor y estabilidad coloidal de la cerveza (Harrison & Albanese, 2019).

Los procesos de clarificación se basan en la separación de partículas en suspensión según su tamaño o densidad, mediante métodos como la sedimentación, centrifugación y/o filtración. Uno de los métodos más utilizados es el torbellino o whirlpool, donde el mosto es bombeado tangencialmente en un recipiente cilíndrico lo que produce un flujo rotativo y hace que los turbios se depositen en forma de cono en el centro del fondo del recipiente, extrayéndose el mosto clarificado por el lateral (Willaert, 2006). En las producciones más caseras el efecto del whirlpool se realiza agitando vigorosamente.

Finalizando esta etapa, el mosto es enfriado, aireado y transferido al fermentador para la siguiente etapa. Esto debe hacerse con todos los cuidados sanitarios posibles, así como en un corto tiempo para evitar posibles contaminaciones microbiológicas.

2.1.2.5. Fermentación alcohólica

Durante la fermentación alcohólica la levadura consume a los azúcares fermentables produciendo anhídrido carbónico y etanol, generando además metabolitos secundarios que influyen en el sabor y aroma de la cerveza (Callejo et al., 2019; Cubillos et al., 2019).

La eficiencia de la levadura en la fermentación alcohólica está relacionada a su habilidad de consumir los azúcares del mosto. En este proceso, las levaduras consumen los azúcares disponibles del mosto en un orden específico de preferencia secuencial, comenzando por la glucosa, seguido de la fructosa, maltosa y finalmente la maltotriosa (He et al., 2014; Willaert, 2006). La absorción y el consumo de maltosa y maltotriosa es reprimido por concentraciones elevadas de glucosa. El consumo de maltosa comienza cuando el 60% de la glucosa del mosto es absorbida. Altas concentraciones de maltosa y glucosa inhiben el consumo de maltotriosa (Willaert, 2006). Como se mencionó anteriormente, la maltotriosa tiene la menor prioridad de absorción para las levaduras cerveceras. Un consumo incompleto de este trisacárido reduce la eficiencia del proceso y puede tener un impacto en la calidad de la cerveza. Por otro lado, las dextrinas remanentes, quedan también como carbohidratos residuales, contribuyendo al sabor, aportan cuerpo, sensación en boca, plenitud en el paladar y tomabilidad a la cerveza (He et al., 2014).

Se producen además en el proceso metabolitos secundarios que incluyen alcoholes superiores, ésteres, ácidos orgánicos, diacetonas vecinales y aldehídos (Walker & Stewart, 2016). Estos compuestos influenciarán el aroma y sabor de la cerveza final.

2.1.2.6. Maduración y acondicionamiento

Al finalizar la fermentación primaria se obtiene lo que se conoce como cerveza verde. A continuación, se remueve la mayoría de la levadura y la cerveza verde es transferida a los tanques de maduración que se mantiene a temperaturas de entre -1 a 5°C. El tiempo de maduración dependerá del tipo de fermentación, siendo de unos días si se utilizan levaduras tipo ale o semanas al utilizar levaduras tipo lager (Harrison & Albanese, 2019; Thesseling et al., 2019). Durante esta etapa la levadura está aun metabólicamente activa por lo que puede continuar aportando productos de la fermentación, pero principalmente se reducen sabores y aromas no deseados como el diacetilo (Thesseling et al., 2019).

En este proceso también ocurre la clarificación dada por la sedimentación natural de las levaduras debido a la temperatura utilizada.

2.1.2.7. Operaciones de terminación

Finalmente, la cerveza terminada se envasa. Esto puede hacerse en botella, lata o barril. Para los dos primeros casos, a nivel industrial es usual pasteurizar la cerveza previamente para aumentar la vida útil (Harrison & Albanese, 2019; Kunze, 2006; Thesseling et al., 2019).

2.2. Breve historia de la cerveza

La cerveza, aunque no igual a la que conocemos actualmente, ha sido encontrada en diversas partes del mundo (norte de África, Europa, China) desde hace miles de años no siendo claro si la técnica de producir esta bebida se originó en un lugar y luego se expandió al resto, o si se descubrió en varios lugares de forma independiente. Las primeras evidencias aparecen en China y Mesopotamia hace unos 6000 - 7000 años (Cabras & Higgins, 2016; Poelmans & Swinnen, 2011). Su producción era por fermentación espontánea, a partir de cereales humedecidos y germinados expuestos al aire.

Esta bebida se extendió por el antiguo Egipto alrededor del 3000 ac, siendo consumida por todas las clases sociales, tanto en ocasiones cotidianas como en festividades (Poelmans & Swinnen, 2012). La elaboración de cerveza era realizada por mujeres, ya que se consideraba una tarea cotidiana.

Posteriormente con la expansión del imperio romano, se impuso el consumo del vino y cultivo de la vid, ya que consideraban que la cerveza era una bebida para las clases inferiores. Sin embargo, varios pueblos europeos conquistados por los romanos, como las tribus Celtas y las regiones donde la influencia de las tribus Germánicas era fuerte (región actual de Bélgica, Alemania) siguieron consumiendo cerveza (Poelmans & Swinnen, 2011)

Alrededor del 800 dc con el imperio de Carlo Magno surgió la elaboración de cerveza en monasterios. Previo a la aparición del lúpulo, el “grut” o “gruit” era uno de los ingredientes utilizados compuesto por una mezcla a base de hierbas, cuya composición variaba de acuerdo a la región, y aportaba atributos sensoriales (Romero-Medina et al., 2020). En esta época fue que comenzó a utilizarse el lúpulo como ingrediente, debido a su influencia en el sabor y conservación de la cerveza, aunque pasaron varios siglos

más antes de que esta práctica fuera extendida a otras regiones (Poelmans & Swinnen, 2012).

En el siglo XIV, disminuyó la producción de cerveza en monasterios y surgieron las cervecerías comerciales, motivado en parte por el aumento del ingreso y la expansión del comercio y las ciudades (Poelmans & Swinnen, 2011).

Guillermo IV de Baviera promulgó en 1516 la ley de la pureza o 'Reinheitsgebot' que especificaba que la cerveza sólo podía elaborarse utilizando agua, malta de cebada y lúpulo (Meussdoerffer, 2009). En esa época se desconocía de la existencia de las levaduras. Paso casi un siglo más para que Anton van Leeuwenhock observara utilizando un microscopio pequeños elementos interconectados que en ese momento no fueron considerados organismos vivos. La teoría más aceptada en la época era que la fermentación era una reacción química espontánea promovida por el contacto con el aire, y que las levaduras observadas eran un producto secundario de dicha reacción (White & Zainasheff, 2010).

Otro siglo transcurrió antes de que Antoine Lavoisier and Joseph Gay-Lussac, formularan la reacción básica que ocurre durante la fermentación, donde el mosto de uva se transforma en ácido carbónico y alcohol (Steensels & Verstrepen, 2014).

La existencia de las levaduras como organismos vivos no fue conocida hasta mediados del siglo XIX, gracias a los descubrimientos de Luis Pasteur. Hacia mitad del siglo, el uso la fermentación espontánea comenzó a declinar estableciéndose el concepto de fermentación controlada, al inocular el mosto con cultivos de levaduras específicas (Basso et al., 2016; Lodolo et al., 2008). Christian Hansen, de la cervecería Carlsberg fue uno de los pioneros en estas prácticas, mejorando la calidad y consistencia de la cerveza (Cubillos et al., 2019) Es así como comenzó el proceso de domesticación de las levaduras cerveceras, a través de procesos de selección natural y artificial, generando cepas altamente especializadas y adaptadas. Esto también tuvo un impacto en la reducción de la diversidad de levaduras cerveceras. Los avances tecnológicos de este siglo, como la refrigeración, pasteurización y domesticación de levaduras que permitieron tener un mayor control del proceso y producto, así como otros avances industriales como el motor de vapor que amplió las posibilidades de distribución, produjeron un gran aumento en las ventas y globalización de la cerveza (Cabras & Higgins, 2016).

El siglo XX se caracterizó por una consolidación de las cervecerías, tanto en Europa como Estados Unidos, aumentando la producción y consumo, pero reduciéndose el número de cervecerías (Poelmans & Swinnen, 2012). Las grandes cervecerías,

crecieron y adquirieron globalidad en detrimento de la pequeña industria. Alrededor del mundo, las ales tradicionales perdieron mercado y las cervezas lager dominaron el mercado (Poelmans & Swinnen, 2012).

2.3. Revolución de la cerveza artesanal

La falta de variedad y estandarización de la cerveza generó un efecto contrario, provocando un alza en la demanda por productos diferentes. En Estados Unidos, surgió en 1980 un renovado interés del consumidor por cervezas tradicionales como porters, pale ales, stout, etc. Ya en 1990, la tendencia de producir cervezas tradicionales y de estilos particulares se extendió al surgir y crecer las micro cervecerías, extendiéndose nuevamente la utilización de levaduras ale. Este movimiento de micro cervecerías se observó también en otras regiones, tal como Europa (Poelmans & Swinnen, 2011).

Nuestro país comenzó a experimentar este fenómeno alrededor del año 2006, experimentando su máximo entre los años 2013 al 2017. La pandemia por COVID-19 ocurrida en 2020 generó una disminución de las ventas de la mayoría de las cervecerías artesanales nacionales. Como estrategia para enfrentar los efectos negativos de la pandemia, una variedad de empresas desarrolló productos o servicios para seguir promoviendo la demanda (Santa Cruz & Sosa, 2021).

Considerando que el mercado cervecero está en constante evolución, con la elaboración de productos diversos y la búsqueda de nuevas estrategias para promover el consumo, se presentan múltiples oportunidades para investigar nuevas formas de producción. Una de las estrategias consiste en utilizar insumos innovadores que ofrezcan un valor agregado diferencial.

2.4. Levaduras no convencionales para la producción de cerveza

El uso generalizado de levaduras *S. cerevisiae* seleccionadas para la producción de diferentes tipos de bebidas y alimentos, como vino, pan, cerveza, viene dado por varias características de interés como la producción de aromas deseados, la ausencia de producción de toxinas, la alta producción y tolerancia al etanol (Johnson & Echavarrirerasun, 2011; Piškur et al., 2006). Sin embargo, la domesticación de levaduras provoca una reducción de la diversidad microbiológica disminuyendo las características

sensoriales y complejidad del producto final (Burini et al., 2021; Steensels & Verstrepen, 2014).

El metabolismo de las levaduras es responsable, además de producir etanol y CO₂ durante la fermentación alcohólica, de formar diversos productos metabólicos secundarios que afectarán el sabor y aroma de la cerveza y que son dependientes de la cepa de levadura utilizada (C. Varela, 2016). Estos compuestos son intermediarios en diversas vías metabólicas que van desde el catabolismo de los componentes del mosto hasta la síntesis de los compuestos necesarios para el crecimiento de la levadura (Stewart, 2017).

Teniendo en cuenta la demanda de los consumidores por productos novedosos e innovadores, se han realizado diversas investigaciones en el desarrollo de cervezas especiales, particularmente para la producción de cervezas con sabores y aromas novedosos, cervezas bajas en alcohol, cervezas funcionales y cervezas reducidas en calorías (Blanco et al., 2014, 2016; Burini et al., 2021; Villarreal et al., 2022). De esta manera ha surgido la búsqueda de levaduras no convencionales para la producción de cerveza, que incluyen a las levaduras *Saccharomyces* no tradicionales, así como en levaduras no - *Saccharomyces*.

A pesar de que generalmente las levaduras no convencionales presentan bajo rendimiento de fermentación y son más sensibles al estrés por etanol (Burini et al., 2021), proporcionan una fuente de insumos alternativos al producir diversos metabolitos que aportan complejidad de sabor y aromas (Basso et al., 2016).

Dentro de las levaduras *Saccharomyces* no tradicionales en la producción de cerveza, pueden encontrarse aquellas *S. cerevisiae* que tuvieron un proceso de domesticación diferente como las levaduras noruegas farmhouse, levaduras salvajes aisladas de ambientes naturales o bebidas tradicionales (Cubillos et al., 2019). También están las levaduras de diferente especie a *S. cerevisiae* como es el caso de *S. eubayanus* (Burini et al., 2022).

En cuanto a las levaduras no - *Saccharomyces*, históricamente hay estilos de cerveza que se han producido con estas levaduras, como son las cervezas belgas lámbicas y las gueuzes, generadas a través de fermentaciones espontáneas (Basso et al., 2016; Iorizzo et al., 2021; Petruzzi et al., 2016).

En los últimos años se han reportado diversas investigaciones sobre el uso de las levaduras no *Saccharomyces*, encontrando potencial para su uso en la producción de cerveza. Entre ellas encontramos levaduras de diversos géneros *Hanseniaspora*,

Lachancea, *Torulaspota*, *Brettanomyces*, *Kazachstania*, *Wickerhamomyces*, *Kluyveromyces*, *Zygoascus*, *Picchia*, *Torulaspota* (Gutiérrez et al., 2018; Holt et al., 2018; Kayadelen et al., 2023; Larroque et al., 2021).

Particularmente, Domizio et al. (2016) estudiaron levaduras de la especie *Lachancea thermotolerans* para la producción de cerveza. Realizaron ensayos con diferentes cepas para comprobar características de interés como el uso de maltosa y maltotriosa, y producción de glicerol. Seleccionaron 3 en las que realizaron análisis adicionales (tolerancia al lúpulo, floculación, estabilidad de espuma, entre otros), concluyendo que levaduras de esta especie son interesantes candidatas para la producción de cerveza, en particular para la producción de cervezas ácidas.

También se ha reportado la utilización de levaduras no convencionales utilizando cultivos mixtos, como en el caso de la dupla *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspota delbrueckii* que mostraron evaluaciones sensoriales positivas respecto a cervezas producidas sólo con *S. cerevisiae* (Kayadelen et al., 2023).

Larroque et al. (2021) estudiaron el potencial de levaduras *Saccharomyces* y no - *Saccharomyces* autóctonas para la producción de cerveza. Seleccionaron tres levaduras de las especies *Saccharomyces cerevisiae*, *Zygoascus meyeriae* y *Pichia anómala*, para utilizarse en cultivos mixtos entre *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* con características de interés para la producción de cerveza, particularmente con los aromas producidos para estilos particulares de cervezas. También evaluaron una cepa nativa uruguaya de la especie *Hanseniaspora vineae* que mostró producir perfiles aromáticas frutales de interés y que ha sido recientemente patentada por el grupo de trabajo del Área Enología y Biotecnología de las Fermentaciones de Facultad de Química para su uso en vinos por la empresa Oenobrand.

2.5. El consumidor como herramienta para diseñar productos

Las preferencias de los consumidores pueden generar cambios en la forma y tipo de producción, así como en el tipo de producto, como ocurrió con la revolución de la cerveza artesanal. Diversos estudios han mostrado la importancia del desarrollo de productos con un enfoque orientado al mercado (Donadini & Porretta, 2017; Gómez-Corona et al., 2016; Reinbach et al., 2014).

Los consumidores buscan experiencias sensoriales placenteras, significativas, auténticas y únicas a través de los alimentos que consumen (Rivaroli et al., 2020). En

particular la cerveza artesanal es un producto simbólico basado en la experiencia, encontrándose que la principal motivación para su consumo es la búsqueda de autenticidad (Gómez-Corona et al., 2016). En Italia, Aquilani et al. (2015) concluyeron que el éxito de la cerveza artesanal se debe principalmente a la calidad de la cerveza y sabores diferenciales. Establecer perfiles de los consumidores para el mercado local resulta de interés para enfocar qué características son más relevantes en la elaboración del producto y mejorar además estrategias de marketing.

Para obtener un entendimiento de los patrones de las preferencias de los consumidores hay disponibles varios métodos y técnicas (Hernández-Mora et al., 2022; P. Varela & Ares, 2014). Las pruebas con consumidores son una herramienta muy utilizada para evaluar las características sensoriales de productos, pudiéndose utilizar por ejemplo preguntas del tipo 'Marque todo lo que corresponda' (CATA: Check All That Apply), siendo metodologías más sencillas y rápidas que utilizar paneles con evaluadores entrenados (Jorge et al., 2015). En este enfoque, a partir de una lista que se presenta, se les solicita a los consumidores que seleccionen todos los términos que describan apropiadamente el producto que están evaluando, determinando la relevancia de cada término calculando la frecuencia de uso (Alcaire et al., 2017).

En la búsqueda de antecedentes para la realización de esta tesis, no se han encontrado publicaciones que estudien la percepción y motivación del consumidor uruguayo, así como las características sensoriales de cervezas artesanales nacionales.

2.6. Cervezas reducidas en carbohidratos

En los últimos años se ha observado una tendencia al consumo de productos más saludables, donde con respecto a las bebidas se ha visto reflejado en un aumento de demanda de cervezas light, y de cervezas reducidas en alcohol o sin alcohol (Chrysochou, 2014).

Es importante diferenciar las cervezas light de las cervezas reducidas en carbohidratos. Las primeras usualmente tienen una reducción en los carbohidratos no fermentables y en el contenido de alcohol, mientras que las segundas como su nombre lo indica sólo tienen una disminución en el contenido de carbohidratos. El aporte calórico de las cervezas está dado principalmente por el alcohol con 7 kcal/g, contribuyendo los carbohidratos en menos proporción con 3,75 kcal/g (Bamforth, 2005).

Como se mencionó previamente, el mosto está compuesto por azúcares fermentables, (glucosa, maltosa y maltotriosa) y por azúcares complejos no fermentables, principalmente dextrinas y dextrinas limitantes. Estos azúcares no fermentables se mantienen en la cerveza, proporcionando calorías al consumidor final de la cerveza al poder ser hidrolizadas a glucosa durante la digestión e ingresar al torrente sanguíneo (Yeo & Liu, 2014).

Para producir cervezas reducidas en calorías se pueden utilizar diversas estrategias. Una de ellas es la dilución de los carbohidratos del mosto con agua. La desventaja es que se producen cervezas calificadas como acuosas y menos valoradas por los consumidores (Basso et al., 2016).

Otra estrategia es la utilización de levaduras manipuladas genéticamente, donde se incorporan genes que codifican para glucoamilasas y α -amilasas a levaduras cerveceras (Blanco et al., 2014). Sin embargo, no todos los mercados permiten la utilización de microorganismos genéticamente modificados en la producción de alimentos por lo que puede ser una estrategia de baja aplicabilidad.

El aumento de la fermentabilidad del mosto es otra posibilidad, utilizando condiciones particulares de maceración o agregado de enzimas comerciales como glucoamilasas y dextrinasas, que degraden las dextrinas residuales (Blanco et al., 2014; Matthews et al., 2001).

También puede utilizarse un mosto convencional, donde la fermentación sea inoculando microorganismos con actividad enzimática que degraden los carbohidratos complejos o utilizando levaduras superatenuantes (Blanco et al., 2014; Burini et al., 2021). El grado de atenuación es utilizado por los cerveceros para describir la fermentación de los azúcares extraídos durante la maceración. En particular para la primera estrategia, se reportan la utilización de *Brettanomyces* y *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, que producen glucoamilasas y glucosidasas, enzimas capaces de hidrolizar carbohidratos no fermentables en el mosto a azúcares simples, que serán posteriormente fermentados y por lo tanto produciendo una cerveza reducida en hidratos de carbono (Meier-Dörnberg et al., 2018).

La obtención de cervezas reducidas en carbohidratos con un buen balance de sabor y cuerpo presenta un desafío, ya que suelen considerarse aguadas y carentes de sensación en boca, lo que ha provocado su escasa aceptación en Europa en comparación con Estados Unidos (Malfliet et al., 2009). La utilización de levaduras no convencionales puede dar una respuesta a estas características.

3

Insumos microbiológicos

3. Insumos microbiológicos

Resumen

El objetivo de este capítulo fue obtener levaduras nativas como insumo microbiológico para la elaboración de cervezas reducidas en carbohidratos. Se realizaron aislamientos a partir de insumos cerveceros, así como de uvas, plantas y frutos nativos. Se obtuvo una colección de 268 levaduras, aisladas mayoritariamente de uvas, que fueron evaluadas y seleccionadas en una primera instancia de acuerdo a su capacidad de fermentar maltosa y su actividad amilásica. La actividad amilásica fue positiva para 56 levaduras. A su vez, 27 levaduras fueron capaces de fermentar la maltosa, siendo 14 de ellas no *Sacharomyces*. No se encontraron levaduras que presentaran ambas características de interés. Posteriormente se realizaron fermentaciones a escala de laboratorio para evaluar la capacidad fermentativa de las levaduras no *Saccharomyces* con capacidad de fermentar maltosa. Se evaluó la liberación de anhídrido carbónico medido por pérdida de peso a lo largo de la fermentación y se comparó con una levadura comercial. También se evaluó la cantidad de maltosa, glucosa y maltotriosa remanente al finalizar la fermentación, así como la producción de glicerol y etanol, mediante cromatografía líquida de alta resolución. A través de los ensayos realizados se encontró que una levadura de la especie *Starmerella meliponinorum* codificada como M18_13 es una interesante candidata para la producción de cervezas reducidas en carbohidratos debido a su capacidad de consumir elevadas cantidades de maltotriosa. Además, se destacó por su producción de glicerol y etanol.

3.1. Materiales y métodos

3.1.1. Aislamiento de levaduras nativas

Se aislaron levaduras a partir de insumos de la industria cervecera (cebada, trigo, lúpulo), frutos y árboles nativos, uvas, y otras plantas. Los medios de cultivo utilizados se detallan en la Tabla 1.

Tabla 1. Medios de cultivo utilizados para el aislamiento de levaduras.

Nombre	Composición	Observaciones	Características
YPD	Dextrosa 20 g/L, Extracto de levadura 20 g/L, Peptona 10 g/L, Agar 10 g/L.	Esterilizar en autoclave	
YPM	Maltosa 20 g/L, Extracto de levadura 20 g/L, Peptona 10 g/L, Agar 10 g/L.	Esterilizar en autoclave	
WL Nutrient Agar (Sigma)	75 g/L	Esterilizar autoclave	en Pallman et al., 2001
ChromAgar (Difco):	47,7g/L.	Esterilizar hervido.	por

3.1.1.1. Aislamiento de levaduras a partir de diferentes variedades de uva

Las uvas se colectaron de las zonas vitivinícolas de los departamentos de Canelones, Maldonado y Rivera. Para los aislamientos a partir de uva se generó un mosto en primera instancia y se realizaron aislamientos tanto del mosto como de la fermentación del mismo de acuerdo al protocolo que se detalla a continuación.

- a. Sin lavarlas, se separaron las uvas del escobajo manipulando lo menos posible y cuidando la asepsia para no contaminarlas (para este paso y el siguiente se utilizaron guantes descartables).
- b. Se colocaron las uvas sanas en un recipiente de boca ancha (ej: vaso de bohemia) previamente sanitizado con alcohol 70% y se molieron con el puño de la mano (dejando el hollejo lo más entero posible, sin triturar en exceso). Se

- trasvasó el contenido del mosto a un matraz estéril rotulado con fecha, variedad de uva y origen.
- c. A partir del mosto previamente agitado se realizó una dilución 1:100 con suero fisiológico estéril, sembrándose 100 µl en superficie de placas conteniendo medio de cultivo ChromAgar. La placa sembrada correspondió al día 0 de fermentación. Se incubaron a 28°C por 48-72 hs.
 - d. Se tapó el matraz con parafilm realizando pequeñas perforaciones y se incubó en estufa refrigerada a 20°C para favorecer la fermentación.
 - e. El mosto se dejó fermentar durante 3 o 4 días, agitando diariamente y observando la aparición de burbujas. Al día 3 o 4 de fermentación, se repitieron los pasos (c-d). Debido a que a medida que avanzan los días la población de microorganismos aumenta, fue necesario diluir más el mosto para la siembra en superficie.
 - f. Luego de incubadas las siembras en superficie, se seleccionaron 2 colonias de cada tipo describiéndose color, forma, tamaño, textura, brillo y consistencia. Se realizaron estrías en WLN para obtener colonias aisladas. Se incubaron a 28°C 48-72 hs.
 - g. Se tomó una colonia aislada y se estrió nuevamente en ChromAgar para obtener nuevamente colonias aisladas y asegurar su pureza. Se incubaron a 28°C 48-72 hs.
 - h. Se anotó la descripción morfológica de las colonias.

3.1.1.2. Aislamiento de levaduras a partir de otros materiales

También se realizaron aislamientos de levaduras a partir de insumos alternativos como cereales malteados provenientes de cervecías; colecta de frutos nativos (guayabo, arazá y pitanga) recolectados en Canelones y Rivera; hojas, raíces y corteza de árboles de salida de campo a bosque nativo en el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA, estación experimental Las Brujas); y cereales en salida de campo a zona cerealera de Canelones.

Debajo se indican los pasos seguidos para el aislamiento de levaduras a partir de dichos materiales.

- a. Según la materia prima de partida se procedió de la siguiente manera para realizar los aislamientos:
 - i. Cebada y trigo: se pesó 1g

- ii. Plantas y frutos: se cortaron pequeños trozos de 2 o 3 frutos/hojas/raíces distintas
- b. Se colocó el material en tubos estériles de 12 mL con 10 mL de medio de cultivo YPM o YPD. Se incubaron en estufa a 28°C, durante 24-48hs.
- c. Se agitó y se tomaron 100 µl para sembrar en superficie de placas con medio de cultivo ChromAgar. Se incubaron las placas a 28°C durante 48-72 hs.
- d. Se seleccionó una colonia de cada tipo diferente que se encuentren bien aisladas y se realizaron estrías en medio de cultivo WLN para obtener colonias aisladas. Se incubaron a 28°C durante 48-72 hs.
- e. Nuevamente se tomaron colonias aisladas y se estriaron en medio de cultivo ChromAgar para obtener nuevamente colonias aisladas y asegurar su pureza. Se incubaron a 28°C durante 48-72 hs.
- f. Se anotó la descripción morfológica de las colonias.

Para todos los casos, las cepas se conservaron en freezer a -70°C, con solución de glicerol 20%.

3.1.2. Caracterización primaria de levaduras

La selección primaria de las levaduras se realizó mediante el screening de fermentación de maltosa y actividad α y β amilasa.

3.1.2.1. Actividad amilásica

La actividad amilásica se evaluó mediante un método basado en la reacción de yodo (Larroque, 2020). Se utilizó el medio de cultivo MAA (Medio de Actividad Amilásica): almidón soluble 5g/L y TSA 40g/L. Se autoclavó y repartió en placas. Las levaduras a evaluar se sembraron en estrías como en la Figura 3 (hasta 6 por placa) junto con una cepa de *Bacillus sp.* como control positivo. Se incubaron durante 48hs a 28°C. Luego se revelaron con solución de lugol. Se consideraron positivas las colonias con halo amarillento (la observación debe ser rápida). Se midió cualitativamente la actividad amilásica como menor, igual o mayor al control (*Bacillus sp.*), comparando el tamaño del halo producido en la placa.

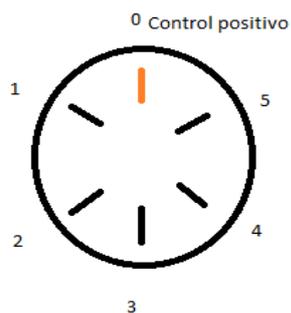


Figura 3. Esquema de sembrado para evaluar actividad amilásica

3.1.2.2. Fermentación de maltosa

Para las levaduras aisladas a partir de mosto de uva, primero se identificaron a nivel de especie (ver sección 3.1.3), y solo en los casos que, de acuerdo con la guía 'Summary of Species Characteristics' (Kurtzman et al., 2011), la especie presenta la capacidad o potencial capacidad de fermentar maltosa (el azúcar principal del mosto cervecero), o en aquellas levaduras que no están incluidas en dicha guía, se realizó el ensayo de fermentación de maltosa.

Para evaluar el desempeño de las levaduras frente a la maltosa se realizó un ensayo en tubos utilizando campanas de Durham (Kurtzman et al., 2011). La liberación de CO₂ que ocurre durante la fermentación del azúcar hace que la campana se eleve a distintos niveles. Se listan a continuación los pasos a seguir para el ensayo.

- a. Se prepararon las siguientes soluciones y se esterilizaron mediante filtración con membrana de 0,2 micras
 - Solución de Maltosa (10x): YNB (Yeast Nitrogen Base) 0,67 g, Maltosa 0,5 g, Agua destilada 10 mL
 - Solución control positivo (10x): YNB (Yeast Nitrogen Base) 0,67g, Glucosa 0,5 g, Agua destilada 10 mL
 - Solución control negativo (10x): YNB (Yeast Nitrogen Base) 0,67g, Agua destilada 10 mL
- b. Para cada cepa a estudiar se prepararon 3 tubos con la solución de maltosa, 2 tubos con solución control positivo y un tubo con solución control negativo.
- c. Se colocó en un tubo de ensayo estéril 1mL de la solución correspondiente y 9 mL de agua destilada estéril.

- d. Cada levadura a estudiar se inoculó previamente en suero fisiológico hasta obtener una turbidez según la escala Mc Farland 1. En cada tubo preparado en el punto (c) se inocularon 500 µL de la levadura que está en suero fisiológico según Escala Mc Farland.
- e. Se colocaron las campanas de Durham cuidando la esterilidad (se colocaron con pinzas previamente sumergidas en alcohol 70% y flambeadas en el mechero), chequeando que luego de ser colocadas no quedara oxígeno introducido en las mismas.
- f. Se incubaron todos los tubos en estufa a 25°C durante 3 semanas y se observó su evolución.

3.1.3. Identificación molecular

Las levaduras de interés se identificaron a nivel de especie mediante la secuenciación del dominio variable D1/D2 en el extremo 5' del gen de la subunidad 26S del ADNr (Kurtzman & Robnett, 1998) y la posterior búsqueda de homologías en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI - <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

Para la extracción de ADN se adaptó el método de Godoy (Godoy, 2013). Se cuantificó el ADN mediante NanoDrop®. Para la amplificación por PCR se utilizó el ciclo y los primers NL-1 (50-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG) y NL-4 (50-GGTCCGTGTTTCAAGACGG) (Kurtzman & Robnett, 1998; Salgado Silva et al., 2020). La secuenciación de la región amplificada fue secuenciada utilizando el primer NL-1. La amplificación por PCR y secuenciación fueron realizadas por la empresa MacroGen Korea.

Las secuencias recibidas fueron analizadas y depuradas según la calidad de las mismas utilizando el programa Mega5 (Tamura et al., 2011). Las secuencias obtenidas se compararon con la base de datos del NCBI, utilizando su programa BLASTn (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>).

3.1.4. Evaluación de la capacidad fermentativa

Considerando las levaduras que fermentaron la maltosa, se realizaron fermentaciones a escala de laboratorio (microfermentaciones) en matraces de 125 mL y 250 mL, para evaluar su desempeño en un símil mosto cervecero.

Para las primeras microfermentaciones se utilizó el símil mosto cervecero diseñado por Larroque et al. (2021), cuya composición se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2. Composición símil mosto cerveza

Compuesto	Mosto (Larroque et al., 2021)	Mosto Ajustado
Extracto de malta	70 g/L	70 g/L
Glucosa	30 g/L	5 g/L
Maltosa	-	30 g /L
Peptona	1,5 g/L	1,5 g/L
K ₂ HPO ₄	1,14 g/L	1,14 g/L
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,23 g/L	1,23 g/L
CaCl ₂ .H ₂ O	0,44 g/L	0,44 g/L
Solución elementos traza	MnCl ₂ -4H ₂ O 200 µg/L, ZnCl ₂ 135 µg/L, FeCl ₂ 30 µg/L, CuCl ₂ 15 µg/L, H ₃ BO ₃ 5 µg/L, CO(NO ₃) ₂ -6H ₂ O 30 µg/L, NaMoO ₄ .2H ₂ O 25 µg/L, KIO ₃ 10 µg/L (previamente esterilizados por filtración con membrana 0,45 mn)	MnCl ₂ -4H ₂ O 200 µg/L, ZnCl ₂ 135 µg/L, FeCl ₂ 30 µg/L, CuCl ₂ 15 µg/L, H ₃ BO ₃ 5 µg/L, CO(NO ₃) ₂ -6H ₂ O 30 µg/L, NaMoO ₄ .2H ₂ O 25 µg/L, KIO ₃ 10 µg/L (previamente esterilizados por filtración con membrana 0,45 mn)
Tiamina	0,5 mg/L (previamente esterilizados por filtración con membrana 0,45 mn)	0,5 mg/L (previamente esterilizados por filtración con membrana 0,45 mn)

Se analizó su contenido de azúcares mediante cromatografía líquida de alta eficiencia con detector de índice de refracción (HPLC-RI). En base a los resultados se ajustó el diseño del mosto (Tabla 2) considerando un contenido de azúcares similar al mosto cervecero real (sin considerar el lúpulo), de manera de utilizarlo en las siguientes fermentaciones a escala de laboratorio.

Tabla 3. Composición de principales azúcares (g/L) de símil mosto cerveza

Compuesto	Mosto Larroque et al. 2021	Mosto ajustado
Glucosa	35	12
Maltosa	30	60
Maltotriosa	10	12

3.1.4.1. Microfermentaciones

A lo largo del trabajo de tesis, se realizaron microfermentaciones con un volumen de 50mL, 70mL y 120mL de medio, por triplicado para cada levadura.

Para el inóculo, se realizaron pie de cuba para cada levadura, utilizando matraces con 15 ml de símil mosto, donde se inocularon 2 a 3 colonias aisladas de cada levadura y se mantuvieron en agitación a 25°C hasta el día siguiente. Posteriormente para la fermentación en cada matraz se inoculó la levadura de interés a partir del pie de cuba correspondiente para obtener una concentración final de 10^6 cel/mL. Se incubó en estufa a 20°C.

El avance de la fermentación se controló diariamente mediante pérdida de peso debida a la liberación de CO₂ (F. M. Carrau et al., 2008)., expresándose en gramos cada 100 mL. La fermentación alcohólica se dio por finalizada cuando la pérdida de peso alcanzó un valor constante.

Para los últimos ensayos se midió la densidad con densímetro EasyDens (Anton Paar) al inicio y al final de la fermentación. Con los datos obtenidos se calculó la atenuación aparente (%) según: $(D_i - D_f) / D_i * 100$

Al finalizar la fermentación alcohólica se tomaron muestras de cada matraz, agitando previamente, y se realizaron recuentos en cámara de Neubauer y controles de pureza mediante siembra en superficie en placa de cultivo con medio WLN. La mismas se incubaron 48 horas y se corroboró la ausencia de contaminación microbiológica y el crecimiento de la levadura sembrada en cada caso.

Posteriormente se almacenan los matraces en heladera durante 24 horas y se filtran con prefiltro estéril y luego membrana de 0,45 micras.

3.1.4.2. Análisis por HPLC

Las muestras filtradas se analizaron mediante análisis cromatográfico por HPLC con índice de refracción (HPLC-RI) (equipo Shimadzu). Para esto se utilizó una columna Supelcogel C-610H (Supelco®), con fase móvil H₂SO₄ 0,005N, flujo 0,5 mL/min, 55°C.

Se prepararon soluciones de glucosa, maltosa, maltotriosa, glicerol y etanol de acuerdo con las concentraciones de la Tabla 4 para elaborar curvas estándar para identificar y cuantificar dichos compuestos.

Tabla 4. Concentraciones para curvas estándar para cada compuesto evaluado.

Compuesto	Concentración (g/L)
Glucosa	20; 10; 5; 2,5; 1,25
Maltosa	32; 16; 8; 4; 2
Maltotriosa	20; 10; 5; 2,5
Glicerol	8; 4; 2; 1; 0,5
Etanol	10; 5; 2,5; 1,25; 0,625

3.1.4.3. Análisis estadístico

Para las curvas de fermentación, densidad, recuentos y análisis por HPLC – RI se realizó el promedio de las réplicas biológicas y se calculó el desvío estándar.

Se calcularon las diferencias significativas de cada tratamiento realizando análisis de varianza (ANOVA), siendo la variable de clasificación las levaduras y las variables dependientes los gCO₂ / 100 mL para el seguimiento de las fermentaciones, las levaduras vivas / muertas para los recuentos finales y los azúcares en el caso de los resultados de HPLC – RI. Cuando se identificaron diferencias significativas en el ANOVA se realizó el test de Tukey de comparación de medias con un nivel de significancia de 0,05. Se utilizó el programa Infostat versión 2020 (Di Rienzo J.A. et al., 2020)

3.2. Resultados

3.2.1. Aislamiento de levaduras

Se obtuvo una colección de 268 levaduras nativas para explorar su potencial uso en la producción de cerveza. El 38% fue aislado a partir de materiales de la industria cervecera (trigo, cebada, lúpulo), frutos y árboles nativos, así como flores (Figura 4). Se observa en ese grupo predominancia de aislamientos de Trigo y Pitanga, con un 10% y un 8% respectivamente.

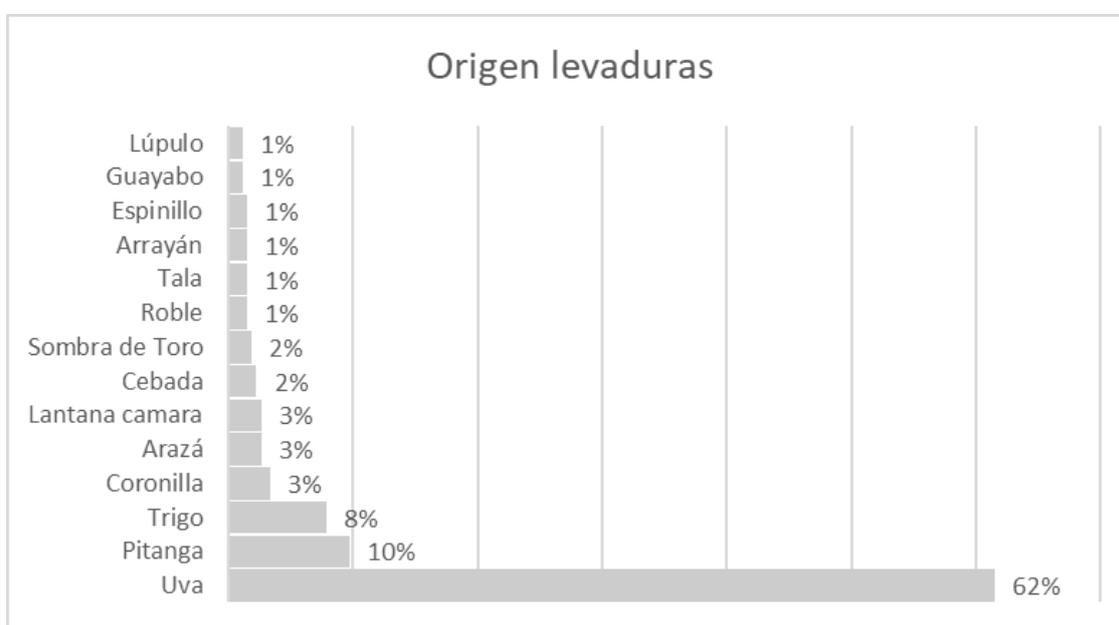


Figura 4. Origen de las levaduras aisladas

El 62% de la colección restante provino de levaduras halladas en uvas de distintas variedades de acuerdo con el detalle de la Figura 4.

En la Figura 5 se observa la diversidad de levaduras obtenidas de las distintas variedades de uva, ya sea de la uva directo o del mosto fermentado. Merlot fue la variedad con mayor cantidad y diversidad de especies, seguido por la uva Tannat. Estas dos variedades son las principales de los viñedos uruguayos, estando entre las variedades de uva tinta más plantadas (Medina et al., 2019). *Saccharomyces cerevisiae* fue la especie más abundante en la uva Merlot seguida de *Hanseniaspora vineae*,

Aureobasidium pullulans y *Cryptococcus flavescens*. En el caso de las uvas Tannat, la especie dominante fue *Aureobasidium pullulans*, seguido de *Hanseniaspora uvarum*. La uva Chardonnay fue origen del 14% de las levaduras provenientes de uva, mostrando también una gran variedad de especies. El resto de las variedades de uva aportaron a la colección menor cantidad y diversidad de levaduras.

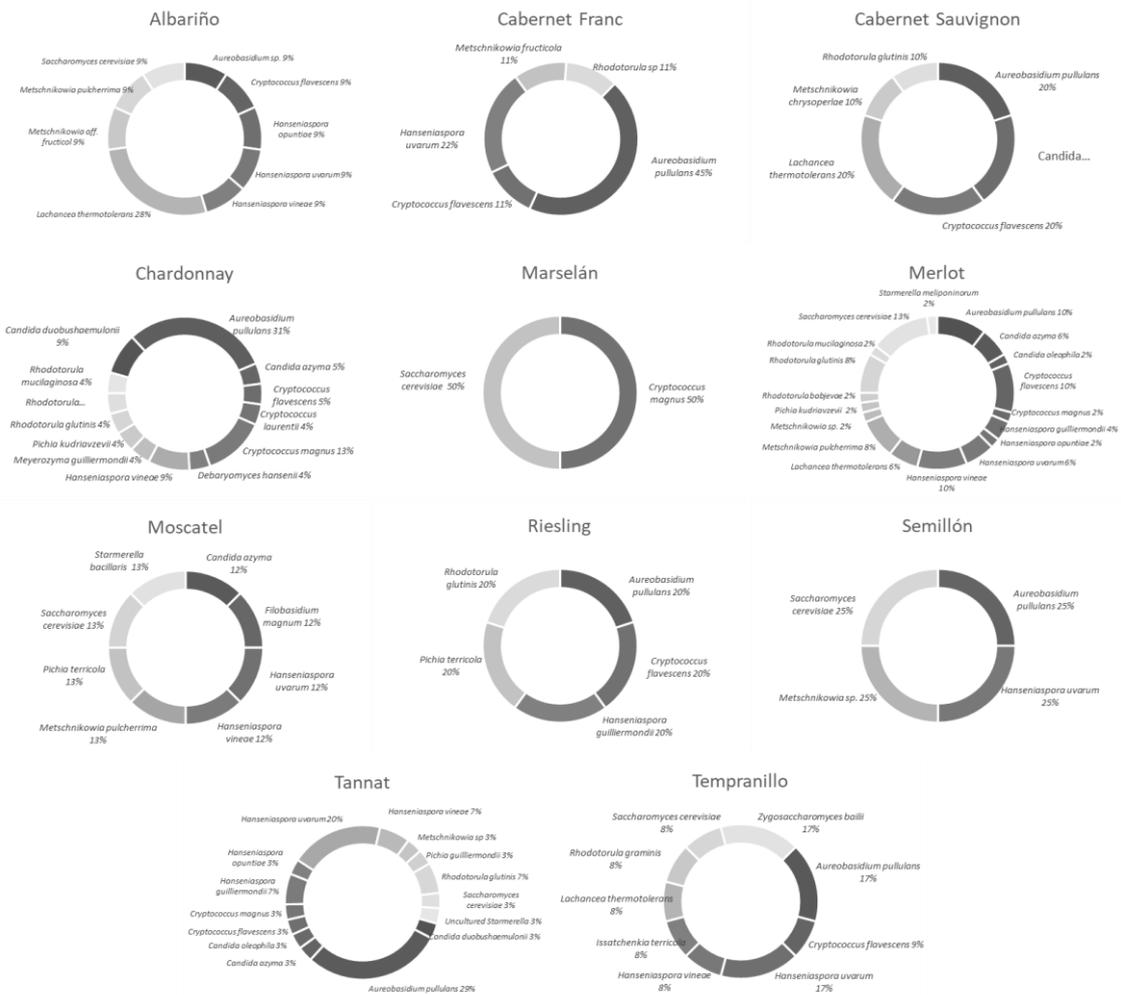


Figura 5. Porcentaje de especies encontradas en las distintas variedades de uvas colectadas en viñedos del Uruguay,

Teniendo en cuenta la riqueza microbiológica encontrada en las uvas, se identificaron molecularmente las levaduras de esta materia prima. Los géneros más abundantes fueron *Hanseniaspora sp.*, *Aureobasidium sp.* *Cryptococcus sp.* (Figura 6), de acuerdo a la comparación realizada con secuencias del repositorio NCBI.

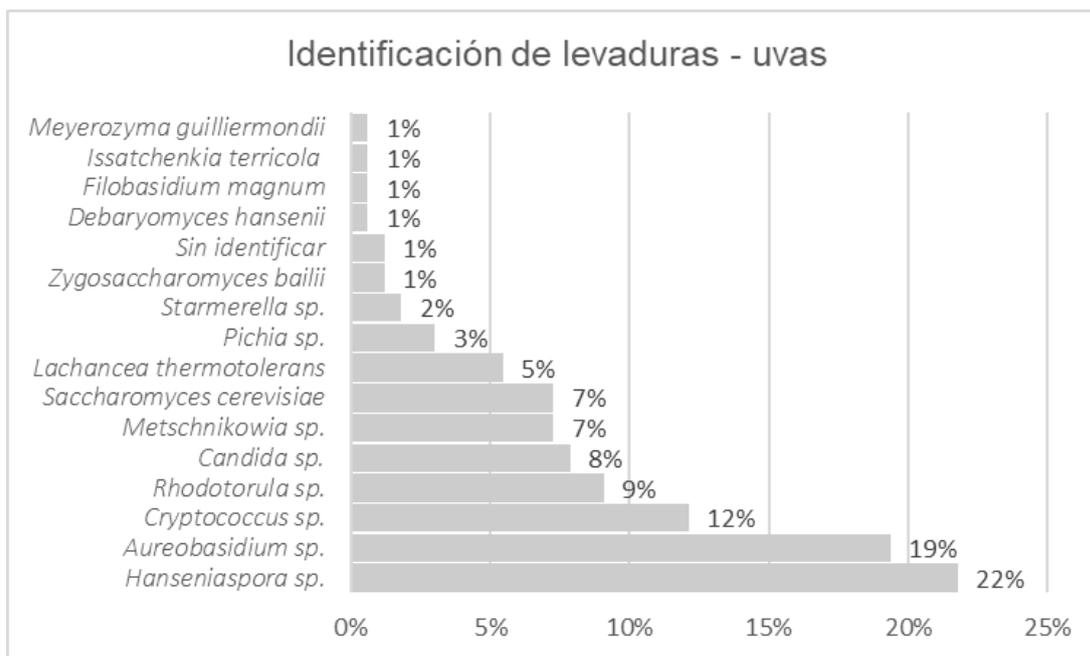


Figura 6. Identificación a nivel de especie de las levaduras aisladas de uvas

También se identificaron mediante técnicas moleculares algunas levaduras que mostraron la capacidad de fermentar maltosa (ver sesión 3.2.2.2).

3.2.2. Caracterización primaria de levaduras

3.2.2.1. Actividad amilásica

De la colección de 268 levaduras evaluadas, el 21% presentó actividad amilásica positiva. De las 56 levaduras con actividad amilásica, 17 mostraron menor actividad que el control, 18 igual que el control y 21 mayor que el control.

La mayoría de las levaduras con actividad amilásica pertenecieron a *Aureobasidium pullulans* (54%). También se encontraron cepas pertenecientes a *Cryptococcus sp.* y *Lachancea thermotolerans* (Tabla 5).

Tabla 5. Levaduras con actividad amilásica. Evaluación cualitativa en base al halo formado en comparación con cepa control de *Bacillus sp.*: +++++ Mucho más que el control, +++ más que el control, = igual al control, - menos que el control

Código	Identificación	Material	Actividad amilásica
CH18_5G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Chardonnay.	++++
M18_141G	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uva Merlot.	++++
BTP18_8	Sin identificar	Pitanga	++++
BBHP17_2	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Pitanga	+++
CF18_31G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Cabernet Franc.	+++
CH18_42G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Chardonnay.	+++
CH18_6G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tannat	+++
M18_100G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Merlot.	+++
M18_142Ga	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Merlot.	+++
R18_25F	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Riesling.	+++
T18_106G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tannat.	+++
T18_22F	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tannat California	+++
T18_8G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tannat	+++
BBCo18_11	Sin identificar	Coronilla	+++
BBHP17_1	Sin identificar	Pitanga	+++
BBHP17_3	Sin identificar	Pitanga	+++
BBR18_2	Sin identificar	Roble	+++
BBTa18_15	Sin identificar	Tala	+++
BBTa18_36	Sin identificar	Tala	+++
BPP18_14	Sin identificar	Pitanga	+++
BTP18_7	Sin identificar	Pitanga	+++
C18_180F	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Cabernet Sauvignon.	=
CF18_178G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Cabernet Franc.	=
CF18_32Ga	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Cabernet Franc.	=
CH18_15F	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Chardonnay.	=
CH18_34G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Chardonnay.	=
CH18_37G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Chardonnay.	=
M18_117G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Merlot.	=
M18_165F	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Merlot.	=
SE18_45G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Semillón.	=

Código	Identificación	Material	Actividad amilásica
T18_104G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tannat.	=
T18_157F	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tannat.	=
TE18_94G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tempranillo.	=
AL18_69G	<i>Aureobasidium sp.</i>	Uva Albariño.	=
BMeT17_1	<i>Bullera dendrophila</i>	Trigo	=
CH18_38G	<i>Debaryomyces hansenii</i>	Uva Chardonnay.	=
BBCo18_7	Sin identificar	Coronilla	=
BTP18_3	Sin identificar	Pitanga	=
M18_142Gb	Sin identificar	Uva Merlot.	=
T18_131G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tannat.	-
T18_134G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tannat.	-
T18_135G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tannat.	-
TE18_95G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Tempranillo.	-
CH18_71G	<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	Uva Chardonnay.	-
CH18_74Ga	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Chardonnay.	-
M18_136G	<i>Aureobasidium pullulans</i>	Uva Merlot.	-
BCT17_3	<i>Bulleromyces albus</i>	Trigo	-
BCT17_13	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Trigo	-
CH18_35G	<i>Cryptococcus magnus</i>	Uva Chardonnay.	-
CH18_39Ga	<i>Cryptococcus magnus</i>	Uva Chardonnay.	-
CH18_4G	<i>Cryptococcus magnus</i>	Uva Chardonnay.	-
MC18_29G	<i>Cryptococcus magnus</i>	Uva Marcelau.	-
AL18_68Gb	Sin identificar	Uva Albariño.	-
BBCo18_6	Sin identificar	Coronilla	-
BTP18_6	Sin identificar	Pitanga	-
R18_26Fb	<i>Cryptococcus flavescens</i>	Uva Riesling.	-

3.2.2.2. Fermentación de maltosa

A partir de los ensayos de capacidad fermentativa, 27 levaduras son capaces de fermentar la maltosa, siendo el 48% *Saccharomyces cerevisiae* (Tabla 6).

Tabla 6. Levaduras que fermentan maltosa.

Código	Especie	Origen	Fermenta Maltosa	Actividad amilásica
M18_13G	<i>Starmerella meliponinorum</i>	Uva Merlot	Si	Negativa
CH18_16F	<i>Candida duobushaemulonii</i>	Uva Chardonnay	Si	Negativa
CH18_18F	<i>Candida duobushaemulonii</i>	Uva Chardonnay	Si	Negativa
TE18_50G	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uva Tempranillo	Si	Negativa
AL18_67G	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uva Albariño	Si	Negativa
L18_84F	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uva Albariño	Si	Negativa
L18_93F	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uva Albariño.	Si	Negativa
M18_120G	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uva Tannat	Si	Negativa
T18_148G	<i>Pichia guilliermondii</i>	Uva Tannat	Si	Negativa
M18_160F	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uva Merlot	Si	Negativa
C18_173G	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uva Cabernet Sauvignon	Si	Negativa
C18_182F	<i>Lachancea thermotolerans</i>	Uva Cabernet Sauvignon	Si	Negativa
BCT17_10	<i>Pichia anomalus</i>	Trigo	Si	Negativa
BPL18_7	<i>Pichia myanmarensis</i>	<i>Lantana camara</i>	Si	Negativa
M18_23F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Merlot	Si	Negativa
CF18_56F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Marcelau	Si	Negativa
SE18_60F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Semillón	Si	Negativa
L18_83F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Albariño	Si	Negativa
MO18_88F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Moscatel	Si	Negativa
TE18_110F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Tempranillo	Si	Negativa
M18_112F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Merlot	Si	Negativa
M18_115G	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Merlot	Si	Negativa
M18_129F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Merlot	Si	Negativa
M18_130F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Merlot	Si	Negativa

Código	Especie	Origen	Fermenta Maltosa	Actividad amilásica
T18_156F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Tannat	Si	Negativa
M18_162F	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Uva Merlot	Si	Negativa
BPBC17_7	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cebada Pilsen	Si	Negativa

Dentro de las levaduras no-*Saccharomyces*, la mayoría con capacidad de fermentar maltosa pertenecen a la especie *Lachancea thermotolerans*, encontrando también levaduras pertenecientes a *Candida sp*, *Pichia sp.* y *Starmerella sp.* (Tabla 6).

Teniendo en cuenta que no se encontraron levaduras que fermenten la maltosa y a su vez posean actividad amilásica, se decidió utilizar como estrategia la implementación de cultivos mixtos. Los siguientes ensayos se realizaron para evaluar la capacidad fermentativa de las levaduras que fermentan la maltosa para su potencial uso posterior en cultivos mixtos con alguna de las levaduras con actividad amilásica.

3.2.3. Evaluación de la capacidad fermentativa

Con las levaduras no-*Saccharomyces* que fermentan la maltosa se realizaron microfermentaciones utilizando siempre como referencia a la cepa comercial *Saccharomyces cerevisiae* S33 (SafAle™ S-33, Laboratorio Fermentis).

En los gráficos de la Figura 7 puede observarse el seguimiento de las microfermentaciones realizadas.

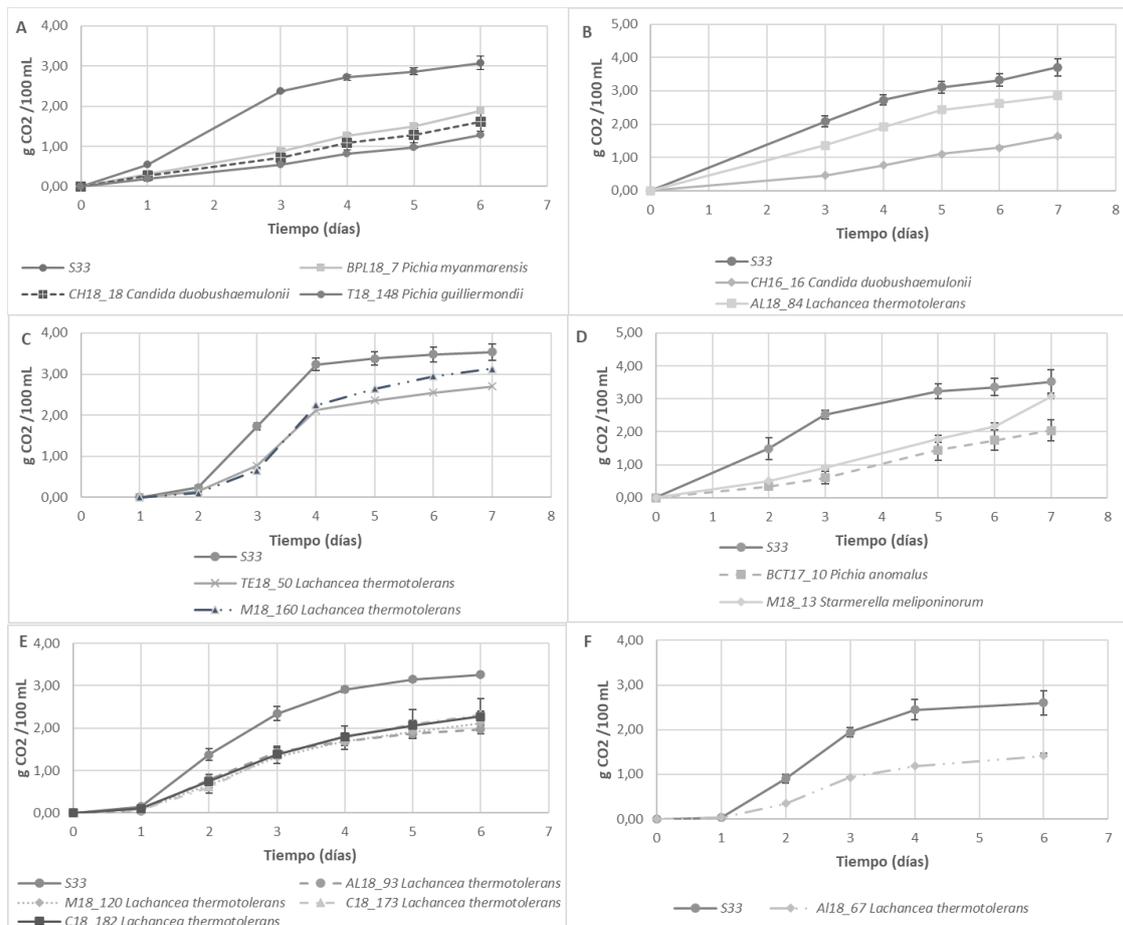


Figura 7. Seguimiento de fermentaciones por pérdida de CO₂, expresados cada 100mL. (A) *Saccharomyces cerevisiae* S33, *Pichia guilliermondii* T18_148, *Pichia myanmarensis* BPL18_7, *Candida duobushaemulonii* CH18_18. (B) *Saccharomyces cerevisiae* S33, *Candida duobushaemulonii* CH16_16, *Lachancea thermotolerans* AL18_84. (C) *Saccharomyces cerevisiae* S33, *Lachancea thermotolerans* T18_50, *Lachancea thermotolerans* M18_160. (D) *Saccharomyces cerevisiae* S33, *Starmerella meliponinorum* M18_13, *Pichia anomalus* BCT17_10. (E) *Saccharomyces cerevisiae* S33, *Lachancea thermotolerans* AL18_93, M18_120, C18_173, C18_182. (F) *Saccharomyces cerevisiae* S33, *Lachancea thermotolerans* AL18_67.

Respecto a las *L. thermotolerans* que fermentan maltosa, en general, mostraron rendimientos interesantes, seleccionándose dos de ellas, AL18_84 y M18_160 para posteriores ensayos.

Para las fermentaciones D, E y F se evaluó el producto final mediante análisis por HPLC – IR, para determinar glucosa, maltosa, maltotriosa (azúcares mayoritarios del mosto cervecero), glicerol y etanol.

En la Tabla 7 se muestra el promedio de las concentraciones en g/L de los azúcares mayoritarios del mosto (maltotriosa, maltosa, glucosa), glicerol y etanol para cada una de las cepas estudiadas.

Tabla 7. Concentración en g/L de maltotriosa, maltosa, glucosa, glicerol y etanol de las microfermentaciones D, E y F (ver Figura 7). Se muestra el promedio de las réplicas y desvío estándar. s/d: sin determinar (sin estándar). n/d: no detectado

Código / [g/L]	Fermentación	Maltotriosa	Maltosa	Glucosa	Glicerol	Etanol
S33	D	9,3±0,47	1,3±0,10	0,2±0,01	1,4±0,09	2,9±0,15
BCT17_10	D	9,6±0,21	30,6±0,71	0,3±0,12	0,7±0,01	1,6±0,15
M18_13	D	1,4±0,18	0,2±0,74	0,7±0,33	3,2±0,13	3,4±0,10
S33	E	s/d	0,7±0,20	n/d	1,9±0,43	2,1±0,42
AL18_93	E	s/d	24,5±4,05	n/d	2,9±0,80	1,7±0,23
M18_120	E	s/d	13,6±2,22	n/d	3,8±0,10	2,1±0,17
C18_173	E	s/d	14,8±2,57	n/d	4,0±0,32	2,0±0,08
C18_182	E	s/d	15,9±2,45	n/d	4,3±0,21	2,2±0,24
S33	F	s/d	0,9±1,030	n/d	2,4±0,08	2,4±0,22
AL18_67	F	s/d	11,6±3,10	n/d	4,0±0,38	2,4±0,28

Respecto a la cepa *Starmarella meliponinorum* M18_13, es interesante observar el alto consumo casi total de la maltotriosa, siendo del orden de casi 7 veces mayor que el de la cepa comercial S33. Al mismo tiempo fue la cepa con mayor producción de etanol y se encuentra dentro del grupo de las de mayor producción de glicerol. Por su rendimiento en la fermentación y su consumo de maltotriosa fue también seleccionada para los posteriores ensayos.

Respecto al glicerol, se destacaron las cepas *L. thermotolerans* M18_120, C18_173, C18_182 y la AL18_67, pero para todos estos casos se registró un bajo consumo de maltosa lo que limita su selección con fines cerveceros.

Con las cepas preseleccionadas, *S. meliponinorum* M18_13, *L. thermotolerans* AL18_84, *L. thermotolerans* M18_160, se realizaron nuevas microfermentaciones para comparar, en un único ensayo, su rendimiento respecto a la cepa comercial S33 utilizando el símil mosto con el ajuste en la composición de azúcares.

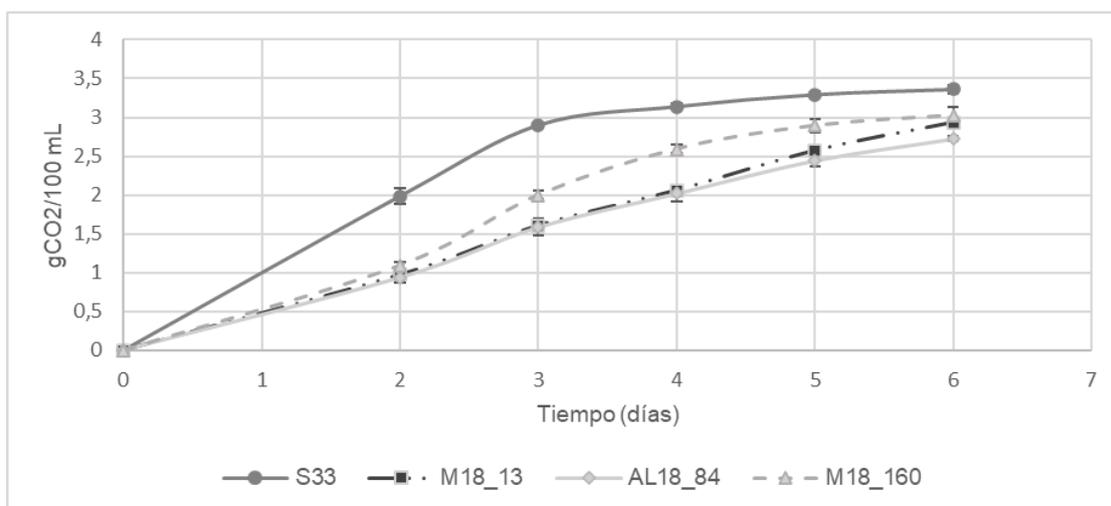


Figura 8. Microfermentaciones cepas preseleccionadas *S. meliponinorum* M18_13, *L. thermotolerans* M18_160, *L. thermotolerans* AL18_84. Levadura comercial *S. cerevisiae* S33.

Como se observa en la Figura 8, la cepa *L. thermotolerans* M18_160 tiene una curva de fermentación más similar a la cepa comercial S33, aunque tiene diferencias significativas en su cinética de fermentación (Tabla 8). Las levaduras *S. meliponinorum* M18_13 y *L. thermotolerans* AL18_84 muestran una cinética de fermentación alcohólica sin diferencias significativas entre ellas (Tabla 8).

Tabla 8. Consumo de CO₂ por día para las cepas preseleccionadas y la cepa comercial de referencia (S33).

Levadura	Día 0	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6
S33	0	1,99 ± 0,14 ^b	2,90 ± 0,00 ^c	3,14 ± 0,05 ^c	3,29 ± 0,05 ^c	3,36 ± 0,08 ^c
M18_13	0	0,97 ± 0,06 ^a	1,61 ± 0,05 ^a	2,06 ± 0,02 ^a	2,57 ± 0,03 ^a	2,93 ± 0,030 ^{ab}
AL18_84	0	0,94 ± 0,09 ^a	1,59 ± 0,15 ^a	2,02 ± 0,14 ^a	2,45 ± 0,11 ^a	2,73 ± 0,05 ^a
M18_160	0	1,09 ± 0,06 ^a	2,00 ± 0,08 ^b	2,59 ± 0,08 ^b	2,89 ± 0,15 ^b	3,03 ± 0,14 ^b

Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre las levaduras, según ANOVA con test de Tukey, significancia 0,05.

A partir del día 3 de fermentación es cuando se observan las mayores diferencias entre los comportamientos de las cepas, el cual se mantiene hasta el fin de la fermentación alcohólica. A lo largo de todo el transcurso de la fermentación, la cepa comercial de referencia es la que posee la mayor capacidad fermentativa, no siendo alcanzada por ninguna de las otras cepas del ensayo.

En la Tabla 9 se pueden observar las medidas de densidad efectuadas utilizando el densímetro EasyDens de Anton Paar para el cálculo de la atenuación aparente.

Tabla 9. Medidas de densidad y cálculo de atenuación aparente. Se muestra el promedio de la densidad de las 3 réplicas biológicas y su desviación estándar.

Muestra	Densidad	Atenuación aparente (%)
Mosto	1037	-
S33	1008 ± 0,58	78
M18_13	1008 ± 0,58	78
AL18_84	1012 ± 1,15	68
M18_160	1009 ± 0,58	76

Como se observa la cepa comercial S33 y la cepa *S. meliponinorum* M18_13 presentan los mismos valores de densidad y atenuación, seguidas por la cepa *L. thermotolerans* M18_160 con valores muy próximos.

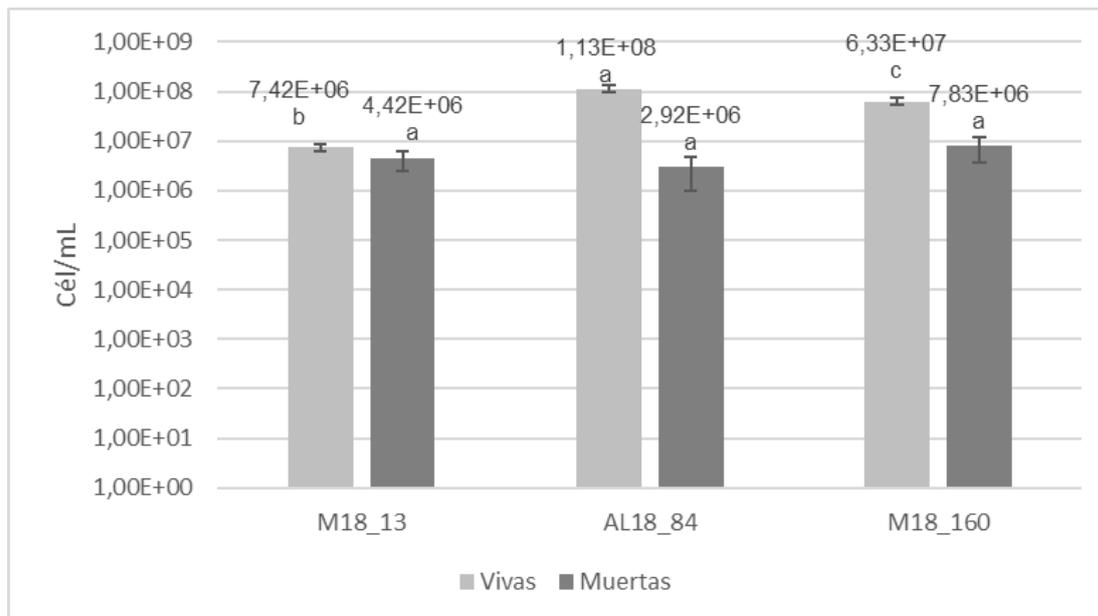


Figura 9. Recuento de levaduras vivas y muertas al finalizar la fermentación alcohólica. Se muestra el promedio de las tres réplicas biológicas y la desviación estándar. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre las levaduras, según análisis ANOVA con test de Tukey, significancia 0,05

En la Figura 9 se pueden observar las poblaciones microbianas para cada una de las levaduras. Al finalizar la fermentación, las dos *L. thermotolerans*, AL18_84 y M18_160, tienen una población de células vivas superior a la levadura *S. meliponinorum* M18_13. Sin embargo, en lo que refiere a la población de células muertas, las 3 cepas no-*Saccharomyces* muestran valores similares.

A partir del análisis por HPLC se observa nuevamente un comportamiento similar entre la cepa *L. thermotolerans* M18_160 y la cepa comercial S33 respecto al consumo de azúcares, producción de glicerol y producción de etanol (Tabla 10). Se destaca a la cepa *S. meliponinorum* M18_13 por su consumo casi total de maltotriosa y la mayor producción de glicerol, características que la distinguen de las otras dos cepas preseleccionadas y de la cepa comercial S33. Con estos resultados se seleccionan para la siguiente etapa a la levadura *L. thermotolerans* M18_160 por su rendimiento similar a la cepa comercial y a la levadura *S. meliponinorum* M18_13 por su consumo diferencial de azúcares.

Tabla 10. Concentración en g/L de maltotriosa, maltosa, glucosa, glicerol y etanol producido en las microfermentaciones con las levaduras preseleccionadas. Se muestra el promedio de las réplicas.

Código / [g/L]	Maltotriosa	Maltosa	Glucosa	Glicerol	Etanol
Mosto	12,00	59,76	11,76	n/d	n/d
S33	11,60±0,30	1,50±0,79	n/d	1,30±0,07	3,31±0,17
M18_13	2,16±0,08	0,58±0,54	6,35±0,67	4,55±0,21	3,32±0,11
AL18_84	11,32±0,59	5,20±2,55	n/d	1,97±0,14	2,89±0,08
M18_160	12,17±0,64	1,31±0,10	n/d	1,10±0,070	3,33±0,18

n/d: no detectado

Como ensayo final de la evaluación de las levaduras, se realizaron nuevamente microfermentaciones con las dos cepas que mostraron mejor rendimiento en cuanto a su cinética de fermentación y consumo de azúcares: M18_13 y M18_160, correspondientes a *S. meliponinorum* y *L. thermotolerans* respectivamente (Figura 10). A diferencia del ensayo anterior se extendió el tiempo de fermentación por 24 horas más (hasta el día 7 de fermentación), para evaluar qué sucedía con el consumo de glucosa por *S. meliponinorum* que no fue total en el ensayo anterior.

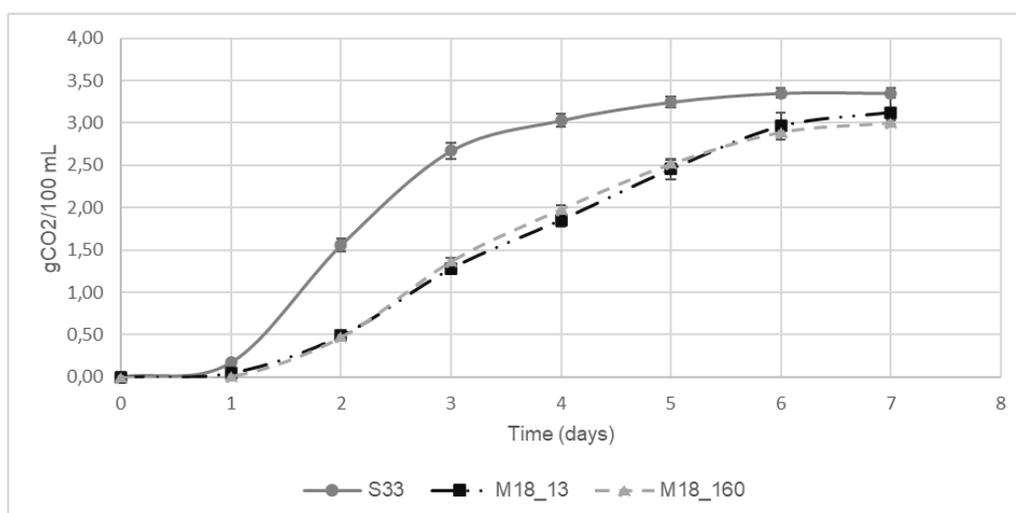


Figura 10. Microfermentaciones de la cepa comercial S33, *S. meliponinorum* M18_13 y *L. thermotolerans* M18_160.

Como se observa en la Figura 10 y la Tabla 11, nuevamente la levadura S33 comercial inicia más rápidamente la fermentación, al tiempo que las cepas *S. meliponinorum* M18_13 y *L. thermotolerans* M18_160 presentaron una cinética de fermentación similar a lo largo de toda la fermentación. Por otro lado, el hecho de haber dejado transcurrir 48 horas más de fermentación fue favorable para asegurar la finalización de la misma permitiendo el consumo de los azúcares por parte de los tres tratamientos. Como se observa en la Tabla 11, en el día 7 de la de fermentación alcohólica no se observan diferencias significativas entre las 3 cepas, incluida la cepa comercial. Luego de la fermentación se dejaron en heladera para estabilización durante 48 horas, para luego ser filtradas y proceder al análisis por HPLC.

Tabla 11. Consumo de CO₂ por día para las cepas preseleccionadas y la cepa comercial de referencia (S33).

Levadura	Día 0	Día 1	Día 2	Día 3	Día 4	Día 5	Día 6	Día 7
S33	0	0,17 ±	1,56 ±	2,67 ±	3,03 ±	3,25 ±	3,35 ±	3,35 ±
		0,01 ^b	0,11 ^b	0,13 ^b	0,10 ^b	0,09 ^b	0,08 ^b	0,08 ^a
M18_13	0	0,05 ±	0,49 ±	1,28 ±	1,86 ±	2,46 ±	2,96 ±	3,13 ±
		0,02 ^a	0,03 ^a	0,06 ^a	0,11 ^a	0,17 ^a	0,22 ^a	0,25 ^a
M18_160	0	0,01 ±	0,48 ±	1,37 ±	1,98 ±	2,52 ±	2,89 ±	3,00 ±
		0,02 ^a	0,03 ^a	0,05 ^a	0,06 ^a	0,05 ^a	0,04 ^a	0,04 ^a

Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre las levaduras, de acuerdo a análisis de varianza con test de Tukey con un nivel de significancia de 0,05.

En la Figura 11 se pueden observar los datos poblacionales de las levaduras al finalizar la fermentación. Como se observa, la levadura *S. meliponinorum* M18_13 muestra el menor crecimiento poblacional de células vivas, pero manteniéndose en el orden de 10⁷, al igual que las otras dos cepas, y presentado un recuento de células muertas intermedio entre los tres tratamientos. En este sentido, la cepa *L. thermotolerans* M18_160 fue la que presentó la mayor población de células muertas.

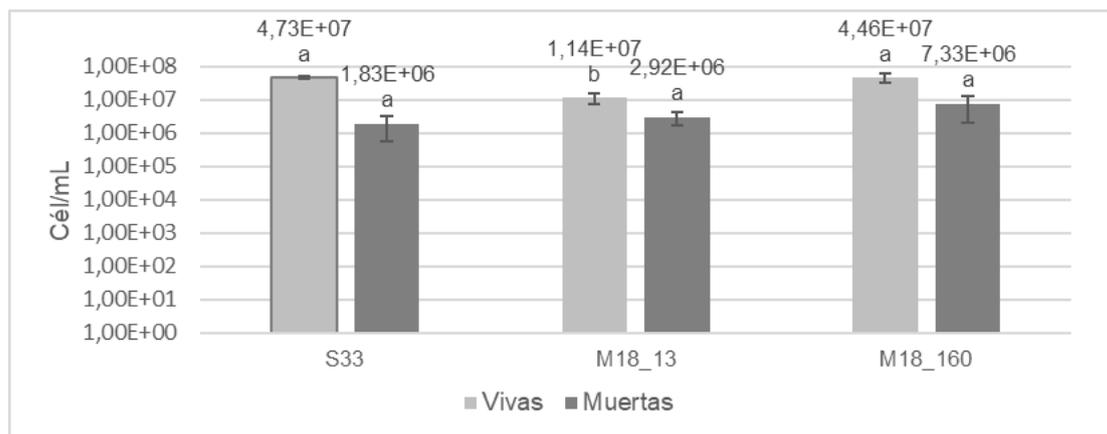


Figura 11. Recuento de levaduras vivas y muertas al finalizar la fermentación. Se muestra el promedio de las tres réplicas biológicas y la desviación estándar. Las letras diferentes denotan diferencias significativas entre las levaduras, según análisis ANOVA con test de Tukey, significancia 0,05

La densidad inicial del mosto fue de 1039. La densidad final alcanzada fue de 1008 para S33, 1009 para *L. thermotolerans* M18_160 y 1004 para *S. meliponinorum* M18_13. La atenuación aparente más alta fue la *S. meliponinorum* con un 85%, seguida por la cepa comercial S33 con un 74% y *L. thermotolerans* con un 72% (Tabla 12).

Tabla 12. Medidas de densidad y cálculo de atenuación aparente. Se muestra el promedio de la densidad de las 3 réplicas biológicas.

Muestra	Densidad	Atenuación aparente (%)
Mosto	1039	-
S33	1008 ± 0,0	74
M18_13	1004 ± 0,58	85
M18_160	1009 ± 0,58	72

Al finalizar la fermentación alcohólica se evaluaron los principales azúcares residuales, maltotriosa, producción de glicerol y producción de etanol para los productos obtenidos con cada levadura (Figura 12 y Tabla 13).

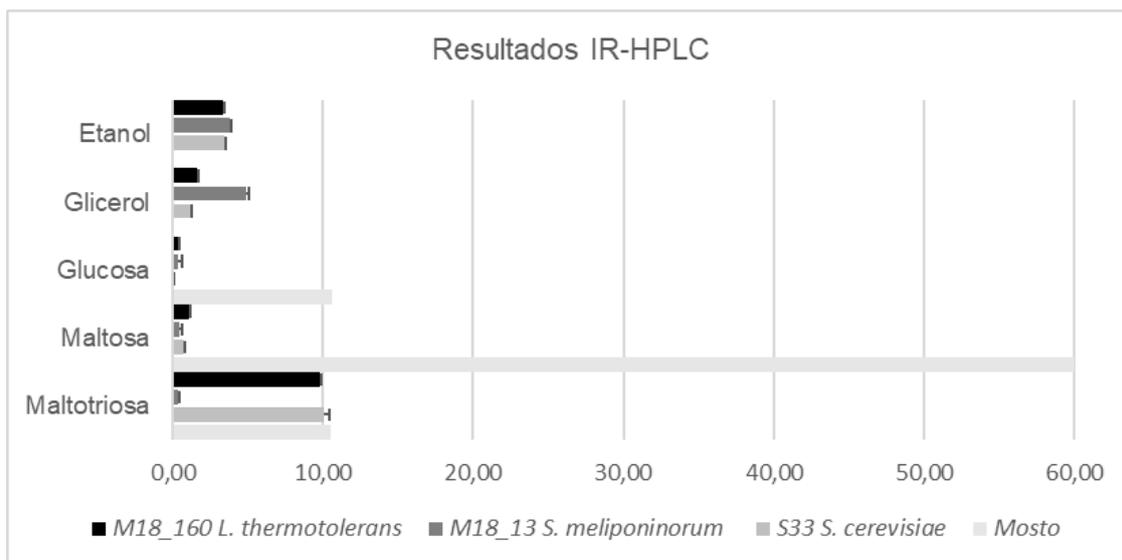


Figura 12. Concentración en g/L de maltotriosa, maltosa, glucosa, glicerol y etanol de las microfermentaciones. Se muestra el promedio de las réplicas y se indica la desviación estándar.

El consumo de glucosa fue casi total para las tres levaduras, lo que es esperable ya que es el azúcar preferencial consumido durante la fermentación alcohólica. Respecto al consumo de maltosa, no se observan diferencias significativas entre la levadura comercial S33 y la cepa de *Starmerella* M18_13, mostrando valores residuales de 0,71 y 0,49 g/L respectivamente. En el caso de *L. thermotolerans* el valor residual de maltosa fue el más alto en 1,08 g/L. Para la maltotriosa se observan diferencias significativas entre las tres levaduras. La levadura comercial mostró el menor consumo de este azúcar, seguido por *L. thermotolerans* M18_160. Para ambas levaduras los valores no difieren demasiado de los encontrados en el mosto. Como se observó en las fermentaciones previas, la levadura *S. meliponinorum* M18_13 tiene un alto consumo de maltotriosa, siendo su valor residual en este caso de 0,39 g/L. Este resultado indica un consumo del contenido inicial de maltotriosa del 96 %.

Tabla 13. Concentración en g/L de maltotriosa, maltosa, glucosa, glicerol y etanol de las microfermentaciones con las levaduras preseleccionadas. Se muestra el promedio de las réplicas. s/d: sin determinar.

Código / [g/L]	Maltotriosa	Maltosa	Glucosa	Glicerol	Etanol
Mosto	10,53	60,00	10,60	s/d	s/d
S33	10,10 ± 0,06 ^c	0,71 ± 0,32 ^a	0,12 ± 0,00 ^a	1,14 ± 0,03 ^a	3,46 ± 0,03 ^b
M18_13	0,39 ± 0,11 ^a	0,49 ± 0,08 ^a	0,38 ± 0,22 ^a	4,93 ± 0,12 ^c	3,85 ± 0,04 ^c
M18_160	9,82 ± 0,10 ^b	1,08 ± 0,09 ^b	0,44 ± 0,00 ^a	1,58 ± 0,00 ^b	3,32 ± 0,01 ^a

Las medias con una letra en común no son significativamente diferentes, de acuerdo a comparación ANOVA con test de Tukey, significancia 0,05.

Respecto a la producción de etanol y glicerol se encuentran diferencias significativas entre las tres levaduras. La producción de etanol y glicerol fue mayor para la cepa M18_13, alcanzando una concentración de 3,85 g/L y 4,93 g/L respectivamente. S33 mostró la producción más baja de glicerol con un valor de 1,14 g/L y una producción de etanol de 3,46 g/L. Finalmente la levadura M18_160 mostró valores intermedios de glicerol en 1,58 g/L y los más bajos de etanol en 3,32 g/L.

Finalmente, con las cervezas obtenidas se hizo una evaluación sensorial preliminar. En cuanto al aroma, la cepa S33 fue la mejor puntuada, seguida de M18_160 y M18_13. Para la levadura comercial S33 se mencionaron los descriptores fruta y manzana verde, frutal para la cepa M18_160 y diacetilo para la cepa M18_13.

3.3. Discusión

Considerando los materiales a partir de los cuales se aislaron las levaduras, se observa que la mayor diversidad de especies estuvo presente en el ecosistema de las uvas, sustrato reportado en numerosas ocasiones por su riqueza microbiológica (Callejo et al., 2019; Iturrutxa et al., 2023; Molinet & Cubillos, 2020; Naumov et al., 1998; Nikulin et al., 2020; C. Varela & Borneman, 2017), lo que refuerza la relevancia de esta fuente de biodiversidad y el rescate del componente nativo local para aportar diferenciación productiva.

Considerando las levaduras que presentaron actividad amilásica, la mayoría pertenecen a *Aureobasidium pullulans*, microorganismo encontrado con frecuencia y abundancia en viñedos y mostos de uva (Bozoudi & Tsaltas, 2018; Gaur et al., 2010). Se ha reportado su uso para la producción de diversas enzimas como amilasas y pectinasas, así como biocontrolador de enfermedades poscosecha causadas por hongos (Gaur et al., 2010). Es un hongo polimórfico, que se puede crecer como una levadura unicelular o como hifas policarióticas septadas. Esto conlleva a que su fase de crecimiento micelar interfiera en la fermentación, no siendo apto para su utilización directa en un cultivo mixto. Estas levaduras mantienen un interés para utilizarlas como productoras de enzimas.

Teniendo esto en consideración, es interesante destacar a la levadura M18_141G identificada como *L. thermotolerans* que también posee actividad amilásica. A pesar de no fermentar maltosa, sí fermenta la glucosa. Sería entonces una potencial candidata para producir cervezas reducidas en carbohidratos en una fermentación mixta con una levadura que sí fermente la maltosa.

De las levaduras identificadas a nivel de especie, 9 pertenecen a *L. thermotolerans*, una especie reportada como de interés para la industria cervecera, así como para la elaboración de vinos. Se ha demostrado su capacidad de producir ácido láctico durante la fermentación lo que resulta particularmente atractivo para producir cervezas ácidas, así como también se aprecia por su producción de compuestos que afectan positivamente el sabor y aroma de la cerveza (Domizio et al., 2016; Postigo et al., 2023; Zdaniewicz et al., 2020).

L. thermotolerans M18_160 mostró un rendimiento similar a la cepa comercial S33, mostrando incluso mayor consumo de maltotriosa y mayor producción de glicerol. Esta levadura no *Saccharomyces* es una candidata para explorar cultivos mixtos junto con una levadura con actividad amilásica.

De acuerdo a la estrategia abordada en esta tesis para producir cervezas reducidas en carbohidratos, se seleccionó a la levadura M18_13 identificada como *Starmerella meliponinorum* como insumo microbiológico. Una de sus características más destacables es su alta atenuación del mosto por su capacidad de consumir maltotriosa, un azúcar del mosto que no llega a fermentarse por una gran cantidad de levaduras (Burini et al., 2021). Esta característica debe ser confirmada en futuros estudios a mayores escalas y utilizando mostos cerveceros.

S. meliponinorum M18_13 fue aislada de uvas de la variedad Merlot de un viñedo en el departamento de Rivera, una región de clima fundamentalmente continental ubicado al noreste de Uruguay, cercano a la frontera con Brasil. Se han reportado levaduras de esta especie asociadas a abejas de varias especies, sus mieles y panales (Teixeira et al., 2003). Particularmente Salgado et al. (2020) aislaron ejemplares de *S. meliponinorum* de miel de abejas *Tetragonisca angustula* en Brasil con propiedades de interés en la producción de bebidas fermentadas. Tres de esas levaduras aisladas fueron capaces de crecer en 4% etanol de manera similar a la cepa comercial y dos de ellas también crecieron al someterse a una osmolaridad elevada.

Otro aspecto de interés de *S. meliponinorum* M18_13 es su producción de glicerol, superior tanto al generado por la levadura comercial como al generado por *L. thermotolerans* M18_160. El glicerol es uno de los productos secundarios más relevantes de la fermentación de azúcares a etanol por parte de las levaduras. Se ha utilizado como estrategia para obtener una reducción en etanol el aumento en la producción de glicerol, por ejemplo, realizando modificaciones genéticas en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* de manera de generar menor etanol redirigiendo el metabolismo hacia la producción de glicerol a través de la sobreexpresión del gen GDP1 que codifica la enzima glicerol 3 fosfato deshidrogenasa (Nevoigt et al., 2002). La sobreexpresión de este gen produjo además altos niveles de acetaldehído, acetoína y diacetilo, compuestos que se asocian con el descriptor 'tipo jerez' mencionado en la evaluación sensorial realizada en dicho estudio (Nevoigt et al., 2002).

El análisis sensorial preliminar mostró la presencia de los descriptores fruta y manzana verde para la cepa S33 y cítrico para la cepa M18_160. Sin embargo, para la cepa M18_13 se detectó el descriptor diacetilo, considerado junto con el acetaldehído subproductos usualmente indeseados de la cerveza (Alves et al., 2020). De todas formas, tras el proceso de la fermentación primaria la cerveza verde se somete a un proceso de maduración a baja temperatura, donde la concentración de muchos componentes como el diacetilo, la acetoína, el acetaldehído y los ácidos orgánicos se reduce en forma moderada (Nevoigt et al., 2002). En este sentido, futuros estudios

deberían realizarse para evaluar el impacto de la maduración en la reducción del diacetilo por debajo del umbral de detección.

Además, es importante mencionar que algunos estilos de cerveza aceptan bajas concentraciones opcionales de diacetilo, como los estilos brasileños (Catharina Sour), Czech Lager (Czech Pale Lager, Czech Premium Pale Lager, Czech Amber Lager, Czech Dark Lager), Pale Commonwealth Beer (British Golden Ale), Brown British Beer (Dark Mild, English Porter), Irish Beer (Irish Red Ale), Dark British Beer (Sweet Stout, Oatmeal Stout, Tropical Stout, Foreign Extra Stout), y Strong American Ale (Wheatwine) (Brewers Association, 2017).

Por otro lado, es importante mencionar que el denominado “cuerpo” es un atributo sensorial clave para la tomabilidad y aceptabilidad de algunos tipos de bebidas incluida la cerveza y de hecho constituye una característica importante en la decisión de compra (Ivanova et al., 2022). Además, el cuerpo de las bebidas es un atributo deseable para las cervezas bajas en carbohidratos (Liguori et al., 2015), que se consideran acuosas, principalmente debido a la falta de sensación en boca (Malfliet et al., 2009). En este sentido, y considerando la tendencia mundial de crecimiento exponencial del mercado de cervezas bajas en carbohidratos, el cuerpo es una característica sensorial clave que hace de *Starmarella meliponinorum* M18_13 una cepa muy prometedora.

4

Percepción y motivaciones de los consumidores

4. Percepción y motivación de los consumidores

Resumen

Este capítulo tiene como objetivo entender las motivaciones de los consumidores de cerveza artesanal. Se presenta la encuesta realizada a consumidores de cerveza para obtener información sobre las formas, estilos y frecuencias de consumo y también conocer su percepción de cerveza y cerveza artesanal, así como obtener información de los perfiles de los principales estilos de cerveza consumidos.

Se obtuvieron respuestas de 611 consumidores de cerveza (52% mujeres, 48% hombres). La mayoría de los consumidores afirmó consumir cerveza con más frecuencia que cerveza artesanal. Los estilos más consumidos de cerveza artesanal son las cervezas IPA, Blond Ale y Pale Ale, seguidos de Porter, Stout y cervezas de trigo.

Se realizaron preguntas de asociación libre con los términos cerveza y cerveza artesanal. Los términos similares fueron agrupados en categorías y posteriormente las categorías agrupadas en dimensiones. De esta forma se organizaron las respuestas en 6 dimensiones para ambos casos, conteniendo 35 categorías para cerveza y 40 para cerveza artesanal. Para el término cerveza los consumidores mencionan con mayor frecuencia el contexto y motivación de consumo y las características sensoriales del producto. Las asociaciones obtenidas para 'cerveza artesanal' son claramente diferentes, lo que sugiere distintas motivaciones para su consumo. Los términos más frecuentemente utilizados tienen relación directa a características del producto, la experiencia de su consumo o respecto a su proceso.

Por último, se solicitó a los participantes que indicaran las características que esperan encontrar en las cervezas rubias y el estilo India Pale Ale, por ser los más consumidos en nuestro país. Las cervezas artesanales rubias fueron descritas principalmente con términos vinculados al color claro, la frescura, lo frutal y la suavidad, las cervezas artesanales IPA con términos relacionados con el lúpulo, la intensidad y el amargor.

4.1. Materiales y métodos

4.1.1. Metodología

Se realizó una encuesta online a consumidores de cerveza a fin de conocer sus hábitos de consumo de cerveza, su percepción del concepto "cerveza" y "cerveza artesanal" y las características esperadas en cervezas artesanales de los estilos rubia e India Pale Ale (IPA). La encuesta fue publicada en Facebook y los datos recabados a través del software Compusense Cloud (Compusense Inc., Guelph, Ontario, Canada). Sólo podían contestar la encuesta aquellos consumidores de cerveza artesanal mayores de 18 años.

La encuesta comenzó con dos preguntas de asociación libre donde se solicitó a los consumidores escribir las primeras palabras que le venían a la mente al pensar en dos conceptos: cerveza y cerveza artesanal. El orden de estas preguntas fue al azar entre participantes. Luego se les preguntó sobre las diferencias entre cerveza y cerveza artesanal.

A continuación, se realizaron preguntas respecto a los hábitos de consumo (Tabla 14) También se solicitó a los consumidores que describieran las características sensoriales (apariciencia, aroma y sabor) de la cerveza artesanal, rubia e IPA, preguntas realizadas en orden balanceado. Finalmente se realizaron preguntas sobre los estilos de cerveza que consumían, así como preguntas sociodemográficas.

Tabla 14. Cuestionario realizado on line.

Pregunta	Opciones
Escriba las primeras palabras que le vienen a la mente cuando piensa en 'cerveza' ^A	-
Escriba las primeras palabras que le vienen a la mente cuando piensa en 'cerveza artesanal' ^A	-
¿Qué diferencia una cerveza artesanal de una cerveza industrial? ^A	-
¿Con qué frecuencia consume cerveza? ^{MO}	Todos los días Entre 4 y 6 veces por semana Entre 1 y 3 veces por semana Alguna vez por mes Ocasionalmente Nunca

Pregunta (cont.)	Opciones
¿Ha tomado ud cerveza artesanal? ^D	Si / No
¿Con qué frecuencia toma cerveza artesanal? ^{MO}	Todos los días Entre 4 y 6 veces por semana Entre 1 y 3 veces por semana Alguna vez por mes Ocasionalmente Nunca
¿Dónde compra cerveza artesanal habitualmente? ^{MO}	Supermercado Tiendas especializadas Tienda on line Directamente al fabricante Bar/pub Restaurante Cervecería
¿Qué estilo de cerveza artesanal consume habitualmente? ^{MO}	India Pale Ale (IPA) Blond Ale Pale Ale Porter De Trigo Stout Dunkel Irish Red Ale Belgian Ale Pilsner Strong Ale Brown Ale Belgian Strong Ale Dubbel Otro Barleywine Kölsch
¿Cómo describiría las características sensoriales (aparencia, olor y sabor) de una cerveza rubia artesanal? ^A	-
¿Cómo describiría las características sensoriales (aparencia, olor y sabor) de una cerveza IPA artesanal? ^A	-

Pregunta (cont.)	Opciones
Género	Femenino
	Masculino
Edad	18-25 años
	26-35 años
	36-45 años
	46-60 años
	> 60 años

^A Pregunta abierta, ^D Dicotómica si/no, ^{MO} Múltiple opción

4.1.2. Análisis de datos

Para el análisis de datos se consideraron todas las respuestas completas. Las preguntas de asociación libre se analizaron utilizando análisis de contenido con un enfoque inductivo (Krippendorff, 2004), donde todos los términos y expresiones de las respuestas de los consumidores se agrupan en categorías de acuerdo a su significado similar. La clasificación se realizó considerando la interpretación de dos investigadores (Ares et al., 2016). Para compensar diferencias subjetivas en la clasificación, las categorías finales se definieron por consenso entre ambos investigadores. Se calculó la frecuencia de mención de cada categoría contando el número de participantes que mencionaron al menos uno de los términos incluidos en cada categoría. Si el participante mencionó más de un término en una categoría sólo se consideró uno para el cálculo de la frecuencia de mención. Las categorías se fusionaron a su vez en dimensiones utilizando el mismo procedimiento.

Para el análisis estadístico de la pregunta abierta de cerveza y cerveza artesanal, se realizó una regresión logística con un modelo lineal generalizado (glm), considerando la categoría como variable dependiente y el estímulo cerveza vs cerveza artesanal como variable independiente. Se utilizó el programa R studio (R Core Team, 2023).

4.2. Resultados

4.2.1. Hábitos de consumo

Se obtuvieron 609 respuestas completas de consumidores de cerveza, siendo el 52% mujeres. Del total de encuestados, el 51% se encontraban entre 26 y 35 años, el 24% entre 36 y 45 años, el 18% entre 18 y 25 años, el 6% entre 46 y 60 años, el 1% fueron mayores a 60 años.

Al explorar la frecuencia de consumo, se observó que el consumo de cerveza artesanal es más esporádico que el consumo de cerveza industrial. Como se observa en la Figura 13, la mayoría de los participantes afirmó consumir cerveza entre 1 y 3 veces por semana, mientras que en el caso de la cerveza artesanal la mayoría de los participantes afirmó consumirla con una frecuencia inferior a 1 vez por semana (Figura 13).

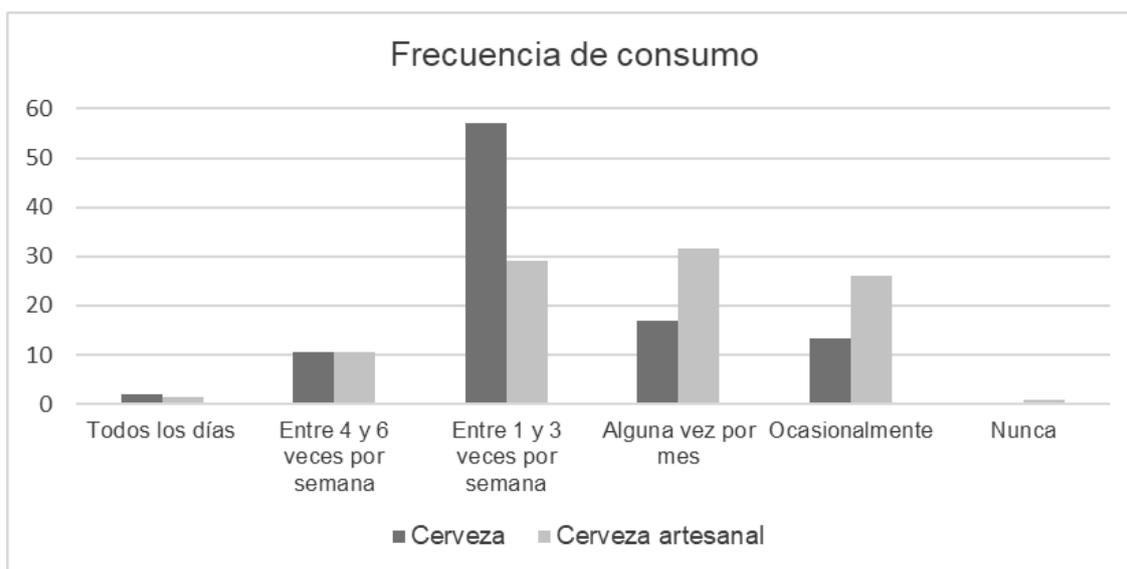


Figura 13. Frecuencia de consumo de cerveza y cerveza artesanal. Se consideró n=609.

De los 609 consumidores, 4 respondieron no consumir nunca cerveza artesanal. Los hábitos de consumo de cerveza artesanal, referidos al lugar de compra y estilos consumidos, se analizaron teniendo en cuenta sólo aquellos consumidores que consumían cerveza artesanal (n=605).

En lo que respecta al lugar de compra de cerveza artesanal, los participantes indicaron comprarla principalmente en bares y pubs, y con menor frecuencia en supermercados, cervecerías y tiendas especializadas.

Respecto a los estilos más consumidos, en la Figura 14 se observa la información recopilada. Los estilos más consumidos son las cervezas IPA, Blond Ale y Pale Ale, seguidos de Porter, Stout y cervezas de trigo.

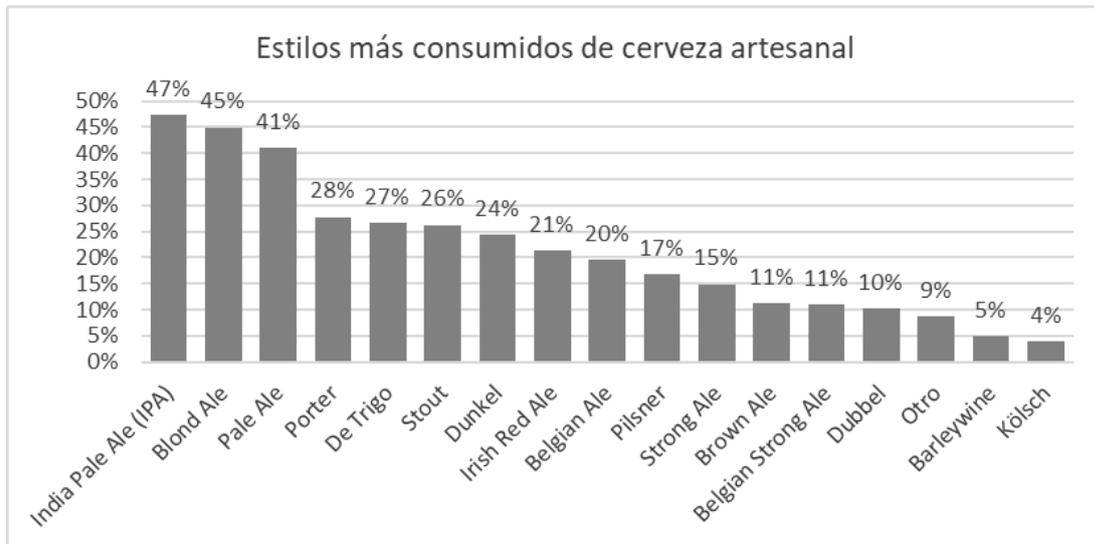


Figura 14. Estilos de cerveza artesanal más consumidos. Se consideró n=605 de acuerdo a la cantidad de consumidores de cerveza artesanal.

4.2.2. Asociación libre cerveza y cerveza artesanal

Buscando entender cómo la gente representa a la cerveza, qué es lo que el consumidor de cerveza (n=609) asocia cuando se menciona cerveza o cerveza artesanal, se les solicitó a los participantes que escribieran las primeras palabras que venían a su mente al pensar en esos términos. Las respuestas a la asociación libre fueron agrupadas en 35 categorías para cerveza y 40 para cerveza artesanal, que posteriormente en ambos casos fueron fusionadas en 6 dimensiones según: características sensoriales, contexto / motivación de consumo, características hedónicas y emociones, características no sensoriales, proceso y otros (Tabla 15).

Tabla 15. Porcentaje de consumidores (n=609) que mencionaron términos en cada categoría identificada a partir del proceso de codificación de las respuestas a la asociación libre para 'cerveza' y 'cerveza artesanal'. Se muestra además la agrupación en dimensiones y el p – valor asociado al análisis estadístico. Se indican en negrita las categorías/dimensiones para las que hubo diferencias significativas en la frecuencia de mención entre cerveza y cerveza artesanal

Dimensión	Categoría	Ejemplos	Cerveza (%)	Cerveza artesanal (%)	p-valor
Sensorial			50,1%	25,6%	<0,001
	Alcohol	Alcohol, alcohólica, resaca	4,1%	1,3%	0,003
	Amargor	Amargor, sabor amargo	4,4%	3,9%	0,668
	Aroma	Aromas, olor, aromática, vainilla, cítrico	3,6%	5,6%	0,101
	Color	Color, rubia, dorada, negra, ámbar	7,1%	4,4%	0,0489
	Cuerpo	Densa, cuerpo, robusta, consistente	0,8%	10,8%	<0,001
	Espuma	Espuma, espumosa, Buena espuma	9,0%	2,1%	<0,001
	Fresca / Fría	Fresca, fría, refrescante	33,8%	3,3%	<0,001
	Intensa	Fuerte, intensa, potente, sabor y aroma intensos	0,2%	11,0%	<0,001
	Sabor	Sabor, gusto	6,9%	15,6%	<0,001
	Otros	Prolongado sabor, turbia, tibia	2,3%	1,8%	0,545

Dimensión	Categoría	Ejemplos	Cerveza (%)	Cerveza artesanal (%)	p-valor
Contexto / Motivación de consumo			51,6%	25,9%	<0,001
	Acompañamiento	Piza, picada, comida, asado	3,0%	2,1%	0,363
	Calor	Calor, verano, aire libre	14,8%	0,3%	<0,001
	Compartir con amigos / Familia	Amigos, familia, pareja, compartir, reunión	29,6%	7,4%	<0,001
	Degustar	Degustación, probar, experiencia	0,0%	12,8%	<0,001
	Diversión / Celebración	Diversión, buenos momentos, ocasión especial, fiesta	18,6%	3,0%	<0,001
	Fin de semana	Sábado, viernes, fin de semana	1,3%	0,0%	0,00452
	Otras actividades	Viajes, trabajo, cocinar, fútbol	3,3%	2,1%	0,217
	Pub/bar	Bar, pub, restaurante, cervecería	0,5%	3,8%	<0,001
	Sed	Sed, bebida	5,9%	0,7%	<0,001
Características hedónicas y emociones			28,2%	33,8%	0,0352
	Alegría	Alegría, disfrute, felicidad, sonrisa	3,3%	0,2%	<0,001
	Aspectos emocionales	Cariño, amor, pasión	1,3%	1,3%	1
	Descanso	Descanso, des estrés, tranquilidad, relax	6,9%	1,1%	<0,001
	Disfrute	Disfrutar, disfrutable, goce	3,4%	1,6%	0,0454
	Hedónico	Rica, exquisita, excelente, buenísima	15,6%	30,7%	<0,001
Características no sensoriales del producto			7,7%	45,3%	<0,001
	Auténtica	Auténtica, verdadera, única, exclusiva	0,0%	4,9%	<0,001
	Calidad	Calidad, buena calidad	0,8%	10,7%	<0,001

Dimensión	Categoría	Ejemplos	Cerveza (%)	Cerveza artesanal (%)	p-valor
Características no sensoriales del producto	Estilos	IPA, APA, Stout	1,6%	4,4%	0,00451
	Forma de presentación	Pinta, chop, barril, tirada	2,5%	3,4%	0,31
	Gourmet	Gourmet, paladar, sofisticada	0,3%	3,4%	<0,001
	Marcas	Volcánica, Cabezas, Mastra, Davok	1,6%	3,0%	0,126
	Natural / Pura	Natural, pura, ecológica, orgánica	0,3%	3,1%	0,000178
	Novedad / Innovación	Novedosa, creatividad, experimentar, diferente	0,0%	14,3%	<0,001
	Precio	Cara, precio, gastar más	0,0%	3,9%	<0,001
	Sano	Sano, saludable	0,3%	0,8%	0,256
	Variedad	Variedad, mayor diversidad, varios tipos	0,7%	6,6%	<0,001
Proceso			8,9%	10,7%	0,289
	Artesanal	Artesanal, casera, rústica	4,1%	4,6%	0,674
	Dedicación	Dedicación, esfuerzo, tiempo, más elaborada	0,0%	3,8%	<0,001
	Ingredientes	Cebada, malta, lúpulo, levadura	5,1%	3,0%	0,0581
	Origen	Nacional, uruguayo, Brasil, Bélgica	0,2%	2,0%	0,00214
	Proceso	Proceso, madurado, levado	0,7%	0,3%	0,413
Otros	Otros	Invierno, rock, Homero Simpson, comercial, compleja	3,6%	6,1%	0,0453

De acuerdo a los resultados obtenidos, para el término 'cerveza' se observa que los consumidores piensan mayoritariamente en el contexto y motivación de consumo y las características sensoriales del producto. Ambas dimensiones mostraron diferencias significativas en comparación con cerveza artesanal y son las que tienen mayor porcentaje de mención. El 34% de consumidores mencionan la categoría 'Fresca / fría'

dentro de la dimensión 'Sensorial', seguido de altos porcentajes de mención de dos categorías de la dimensión 'Contexto / Motivación de consumo'. El 30% mencionó la categoría 'Compartir con amigos / Familia' y el de 18% utilizó palabras como diversión, buenos momentos, ocasión especial, fiesta codificados dentro de la categoría 'Diversión / celebración'.

Las asociaciones obtenidas para 'cerveza artesanal' son claramente diferentes, lo que sugiere distintas motivaciones para su consumo. Los términos más frecuentemente utilizados tienen relación directa a características del producto, la experiencia de su consumo o respecto a su proceso. La categoría 'Hedónico' fue la más relevante, mencionada con una frecuencia de 31% y reúne términos como rica, exquisita, excelente, buenísima. Esta categoría también fue mencionada para el término 'Cerveza' pero con la mitad de la frecuencia. Otras asociaciones relevantes tienen relación con las características sensoriales (dimensión 'Sensorial') principalmente términos de las categorías 'Intensa', 'Cuerpo' y 'Sabor', al mencionarse con una frecuencia de 11% para las dos primeras y de 16% la última. Respecto al contexto / motivación del consumo, términos como degustación, probar, experiencia, pertenecientes a la categoría 'Degustar', fueron mencionados con una frecuencia de 13%. Es interesante resaltar que los consumidores no mencionaron conceptos de esta categoría al responder respecto a 'cerveza'. Las categorías con mayor frecuencia de mención de la dimensión 'Características no sensoriales del producto' fueron 'Calidad' y 'Novedad / Innovación' con 11 y 14% respectivamente. Nuevamente es destacable, que al responder sobre 'cerveza' los consumidores no mencionaron términos de la categoría 'Novedad / innovación' como por ejemplo novedosa, creatividad, experimentar, diferente. Estas diferencias denotan la percepción de la cerveza artesanal como un producto diferente y novedoso.

4.2.3. Características sensoriales de los estilos de cerveza artesanal más consumidos en el país

Se les solicitó a los participantes que indicaran las características que esperan en los tipos de cerveza artesanal más consumidos en el mercado nacional (designados genéricamente como rubias y el estilo India Pale Ale -IPA-). Las cervezas artesanales rubias fueron descritas principalmente con términos vinculados al color claro y dorado/amarillo, la frescura, y la suavidad. Por otro lado, las cervezas artesanales IPA

fueron descriptas en mayor frecuencia con términos relacionados con el lúpulo, la intensidad y el amargor (Tabla 16).

Tabla 16. Descripción de los consumidores de los tipos de cerveza artesanal ‘rubia’ e IPA. Se consideraron las respuestas de consumidores de cerveza artesanal (n=605).

Dimensión	Categoría	Rubia	IPA	Ejemplos
Apariencia	Color ámbar	2%	5 %	Color ámbar, color beige, color cobre
	Color claro	12 %	4 %	Color claro, apariencia clara, clara
	Color dorado-amarillo	20 %	12 %	Color dorado, color amarillo, rubia
	Color oscuro	4%	8 %	Color oscuro, más oscura, opaca
	Turbia	11 %	6 %	Turbia, más turbia, sin filtrar
	Espuma	7%	4%	Espumosa, buena espuma, espuma cremosa
Sabor	Amarga	18 %	35 %	Amarga, más amarga, sabor amargo intenso
	Cítrica	5 %	7 %	Cítrico, olor cítrico, sabor cítrico
	Dulce	4%	2%	Dulce, dulzona, dejo a miel
	Fresca	12 %	2%	Fresca, refrescante
	Frutal	4%	4%	Sabor frutal, olor frutal, frutada
	Intensa	26 %	31 %	Intensa, fuerte, sabor más pronunciado
	Lúpulo	6%	14 %	Lupulada, aroma a lúpulo, sabor a lúpulo
	Malta	6 %	1%	Malta, malteada, sabor maltoso
	Suave	29 %	3%	Suave, sutil, sabor no muy intenso
Cuerpo	Densa / con cuerpo	15 %	12 %	Denso, con cuerpo, espesa

4.3. Discusión

La percepción del consumidor es un importante campo de estudio que permite conocer las características, preferencias y motivaciones de los consumidores de cerveza artesanal. Santa Cruz & Sosa (2021) reportan que las cervecerías artesanales uruguayas indican que la venta en resto pub de terceros, o propios en menor medida, es uno de los canales más utilizados para la comercialización de cerveza artesanal. Estos datos concuerdan con lo reportado por los consumidores en el presente estudio. La menor frecuencia de compra en supermercados y tiendas especializada también se ve alineado con la dificultad de las cervecerías artesanales uruguayas en acceder a la comercialización de sus productos por esta vía (Santa Cruz & Sosa, 2021). La adquisición de cerveza artesanal en bares está fuertemente asociado al tipo de producto, ya que esta modalidad permite un intercambio más directo entre el consumidor y el cervecero.

Los datos de consumo nuevamente se correlacionan con el reporte de las cervecerías artesanales respecto a que la variedad más elaborada es la India Pale Ale, seguida de la cerveza Blonde, las American Pale Al y la Stout (Santa Cruz & Sosa, 2021). Siguiendo el listado, se mencionan también como variedades producidas cervezas Scottish, Brown Ale, Doble IPA, Dubbel, English Pale Ale, Golden Ale, Lager, New English IPA, Porter, Sour y cervezas de trigo. Otros mercados reportan una producción diferente en cuanto a los estilos. En Italia, por ejemplo, las cervecerías artesanales producen principalmente Amber Ale, Witbier, IPA, y Pale Ale (Bimbo et al., 2023). Los estilos de cerveza varían de acuerdo a la región, reflejando preferencias culturales y tradiciones cerveceras (Da Costa Jardim et al., 2018).

Las diferencias en la percepción de cerveza y cerveza artesanal también fueron observadas por otros autores (Aquilani et al., 2015; Carvalho et al., 2018; Gómez-Corona et al., 2016; Lerro et al., 2020). A diferencia de lo hallado en esta encuesta, otros autores reportan la descripción de cerveza artesanal utilizando términos relacionados al proceso de producción de la cerveza, principalmente en relación a la escala, mencionando que es 'una cerveza producida a pequeña escala' o con una 'producción limitada' (Gómez-Corona et al., 2016). Otra investigación realizada en Italia, donde se realizó un estudio utilizando una escala mejor-peor, menciona que los consumidores declaran que el atributo más relevante de la cerveza artesanal es el sabor, seguido del proceso de fermentación, el color, la certificación y el país de origen (Lerro et al., 2020). Estos resultados refuerzan lo expuesto en esta investigación, donde

para la cerveza artesanal se destacan las características intrínsecas del producto y su proceso, diferenciándose de la cerveza comercial.

La expectativa de probar una cerveza con un sabor único y que expresa la singularidad de un territorio en particular es lo que impulsa al consumidor a tomar cerveza artesanal (Lerro et al., 2020). Los consumidores de cerveza artesanal se diferencian de los consumidores de cerveza industrial principalmente en dos aspectos, el primero relacionado a la innovación del producto y sus sabores complejos, y el segundo en relación a un mayor involucramiento en actividades relacionadas a la cerveza (Jaeger et al., 2020). Estos aspectos ponen de manifiesto la relevancia de contar con insumos innovadores y con identidad local, que permitan producir cervezas que se adapten a las preferencias del consumidor. Una estrategia para este fin es el uso de levaduras nativas que produzcan innovación, tanto en sabor y aroma, así como otorgue una identidad particular.

En relación a la cerveza reducida en carbohidratos, los resultados mostraron que la salud y el contenido de calorías de la cerveza no son características salientes en la mente de los consumidores de cerveza artesanal, lo que sugiere que los consumidores no asocian cerveza artesanal con cerveza reducida en carbohidratos, o con los potenciales beneficios que tiene en términos de salud. Las asociaciones con cerveza y cerveza artesanal sí se menciona la categoría 'sano' en ambos casos, pero con una baja frecuencia de mención (menor al 1%). Otros trabajos han investigado específicamente a la cerveza light, reportándose que los consumidores de cerveza en Islandia perciben a la cerveza light como más saludable que la cerveza regular, siendo los principales motivos para su compra el sabor, la salud y el control del peso (Chrysochou, 2014). Los mismos autores reportan que el bajo contenido de calorías es un factor más relevante que el bajo contenido de alcohol en cervezas light. Es importante destacar que la encuesta realizada en esa investigación presentó la limitación de no consultar específicamente respecto a la cerveza reducida en calorías. Es necesario realizar nuevos estudios para conocer las expectativas e intención de compra de los consumidores uruguayos sobre este tipo de cerveza artesanal.

5

Preferencias sensoriales de los consumidores

5. Preferencias sensoriales de los consumidores

Resumen

En este capítulo se presenta la evaluación sensorial con consumidores realizada a cervezas artesanales comerciales rubias y cervezas India Pale Ale, los dos estilos más consumidos en nuestro país. Los consumidores fueron reclutados en ferias de cerveza o plazas de comida, en dos instancias para las cervezas rubias y en una instancia para las IPA. Cada consumidor debió evaluar las muestras presentadas indicando en la lista de términos presentada todos los términos que describían a cada muestra (prueba CATA) e indicando la aceptabilidad para cada una utilizando una escala hedónica semiestructurada de 9 puntos. También se consultaron datos socio demográficos y se solicitó describir mediante la misma prueba CATA a las cervezas rubia e IPA 'ideal'.

A partir del análisis de correspondencia sobre los datos de la pregunta marque todo lo que corresponda, se identificaron 4 grupos de cervezas para la cerveza rubia y cuatro para la cerveza IPA.

Se realizaron análisis de penalización para identificar las características sensoriales que afectan positiva y negativamente la aceptabilidad de los consumidores para ambos tipos de cerveza. Para cervezas rubias, los términos con el mayor impacto positivo en la aceptabilidad fueron frutal, suave, frutas tropicales, dulce, cítrica y poco amarga. Por el contrario, los atributos con mayor impacto negativo en la aceptabilidad fueron defectuosa, sabor extraño, ácida y amarga. En el caso de las cervezas IPA, los términos con el mayor impacto positivo en la aceptabilidad fueron dulce, suave, frutas tropicales, caramelo, frutal y poco amarga. Por el contrario, los atributos con mayor impacto negativo en la aceptabilidad fueron defectuosa, sabor extraño, ácida y amarga.

5.1. Materiales y métodos

5.1.1. Marque todo lo que corresponda

Para la caracterización sensorial de cervezas artesanales ‘rubias’ (donde se incluyeron los estilos Blonde Ale, Golden Ale y American Pale Ale), y cervezas India Pale Ale (IPA) se utilizaron preguntas tipo ‘Marque todo lo que corresponda’ (preguntas CATA por sus siglas en inglés – Check All That Apply) (Varela & Ares, 2012). Se evaluaron 12 marcas comerciales de cervezas artesanales IPA, 10 nacionales y 2 extranjeras. Para las cervezas rubias se evaluaron 12 marcas nacionales y 2 extranjeras.

Tabla 17. Estilos de las cervezas evaluadas

Categoría	Nº muestra	Estilo
Rubias	Muestra 1	Blonde Ale
	Muestra 2	Rubia
	Muestra 3	Blonde Ale
	Muestra 4	Blonde Ale
	Muestra 5	Golden Ale
	Muestra 6	Blonde
	Muestra 7	English Blonde Ale
	Muestra 8	Golden Ale
	Muestra 9	Golden Ale
	Muestra 10	American Pale Ale
	Muestra 11	Golden Ale
	Muestra 12	Golden Ale
	Muestra 13	Belgian Blonde Ale
	Muestra 14	Blonde
IPA	Muestra 1	IPA
	Muestra 2	IPA
	Muestra 3	IPA
	Muestra 4	IPA
	Muestra 5	American IPA
	Muestra 6	IPA
	Muestra 7	IPA
	Muestra 8	IPA
	Muestra 9	IPA
	Muestra 10	IPA
	Muestra 11	IPA session
	Muestra 12	Belgian IPA

Los consumidores se reclutaron en tres lugares diferentes que incluyeron una feria artesanal de cerveza organizada en Punta del Este, el Mercado Agrícola de Montevideo y Sinergia Montevideo. Se trabajó con 133 consumidores para cervezas rubias y 100 para cervezas IPA, comprendidos entre 18 y 78 años, con un promedio de 33 ± 11 años. Se les solicitó probar las muestras y seleccionar las características que mejor describía a cada una. Se utilizó un diseño incompleto, donde cada consumidor debió probar 7 muestras para el caso de las cervezas rubias y 6 para el caso de las IPA. Las cervezas se mantuvieron refrigeradas hasta el momento de la degustación sirviéndose a una temperatura aproximada de 4°C.

En primer lugar, se solicitó evaluar la aceptabilidad de cada muestra en una escala del uno al nueve, siendo 1 Me disgusta mucho, 5 me es indiferente y 9 Me gusta mucho.

Para la pregunta CATA se utilizó una lista de 23 términos de olor y sabor (Tabla 18), generados a partir de los resultados de la encuesta online (sección **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) y datos de la guía de estilos de Brewers Association (Brewers Association, 2017). Se solicitó a los consumidores probar las muestras y marcar todos los términos que consideraban aplicaban para describir su aroma y sabor. También se solicitó marcar todos los términos que describieran a la cerveza ideal, ya sea rubia o IPA.

En el Anexo I puede verse un ejemplo de las boletas utilizadas.

Tabla 18. Lista de términos utilizados en las pruebas CATA para cervezas rubias e IPA

✓ Ácida	✓ Clavo de olor	✓ Frutas tropicales	✓ Sabor extraño
✓ Alcohólica	✓ Defectuosa	✓ Intensa	✓ Suave
✓ Amarga	✓ Dulce	✓ Levadura	✓ Tostada
✓ Caramelo	✓ Especiada	✓ Lúpulo	✓ Trigo
✓ Cebada	✓ Floral	✓ Malta	✓ Vegetal
✓ Cítrica	✓ Frutal	✓ Poco amarga	

También se recabaron datos demográficos de acuerdo con el detalle de la Tabla 19.

Tabla 19. Cuestionario entregado a los consumidores. ^A Pregunta abierta, ^D Dicotómica si/no, ^{MO} Múltiple opción

Pregunta
Marque todas las palabras que considera adecuadas para describir su cerveza rubia / IPA ideal ^{MO}
Género ^{MO}
Edad ^A

5.1.2. Análisis de datos pregunta CATA

Para el análisis de las respuestas a las preguntas CATA, se determinó la frecuencia de uso de cada término contando el número de consumidores que seleccionó a cada uno.

Se aplicaron modelos lineales generalizados (GLM) con distribución binomial para analizar los datos obtenidos en la evaluación sensorial de las distintas cervezas. Para evaluar las diferencias entre cervezas en la selección de cada descriptor sensorial, se realizó un análisis de devianza mediante la función `anova()`.

Se realizaron análisis de correspondencia para obtener una representación bidimensional entre las muestras y los términos de las preguntas CATA. Este análisis se realizó con la tabla de frecuencias conteniendo a los términos CATA en las columnas y las muestras como filas.

Con los datos de aceptabilidad recabados y la descripción de la cerveza ideal solicitada se realizaron análisis de penalización para cada estilo (Ares et al., 2014).

5.2. Resultados

5.2.1. Cervezas rubias

Se encontraron diferencias entre las cervezas en 11 características: amarga, lúpulo, malta, cítrica, intensa, suave, frutal, frutas tropicales, ácida, caramelo y floral. Al solicitarles a los consumidores una descripción de su cerveza rubia 'ideal' los términos mencionados más frecuentemente fueron suave, poco amarga y cebada (Tabla 20).

Tabla 20. Porcentaje de consumidores que utilizó cada uno de los términos para describir 14 muestras de cerveza artesanales rubias.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10	Muestra 11	Muestra 12	Muestra 13	Muestra 14	Ideal
Amarga*	11	21	31	27	16	35	34	18	15	29	35	16	13	22	24
Poco amarga	27	14	22	23	15	24	24	25	21	15	26	30	29	24	67
Cebada	9	8	17	20	13	7	21	12	18	12	16	14	22	27	50
Trigo	12	11	13	19	12	10	6	4	10	8	14	14	10	14	33
Lúpulo*	12	8	16	11	3	12	15	12	15	27	16	20	3	14	43
Malta*	8	16	14	16	3	21	6	13	9	7	10	7	6	10	25
Cítrica*	21	5	5	9	10	4	24	13	16	25	1	7	15	8	41
Intensa*	20	14	22	17	19	19	34	12	25	40	20	11	6	10	39
Suave*	24	27	31	34	22	25	25	29	21	14	22	36	44	30	80
Frutal*	23	5	6	9	15	13	43	18	16	33	12	11	13	11	47
Especiada	12	6	8	14	7	10	9	4	13	11	12	14	3	13	22
Frutas* tropicales	9	0	3	3	12	3	32	7	3	34	3	5	7	8	37
Levadura	8	8	5	10	9	9	19	15	7	7	7	7	12	10	13
Ácida*	30	21	11	6	18	12	13	21	30	14	13	18	16	10	8
Dulce	18	11	8	14	12	22	15	9	16	11	12	11	15	11	42
Tostada	3	10	13	14	10	18	15	13	15	10	9	7	7	5	36

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10	Muestra 11	Muestra 12	Muestra 13	Muestra 14	Ideal
Caramelo*	3	22	5	10	6	19	4	9	4	5	3	4	7	3	28
Clavo de olor	8	5	3	11	15	4	6	1	10	8	6	7	4	11	9
Floral*	14	5	5	7	12	7	15	12	6	23	13	4	15	6	19
Vegetal	8	3	8	3	10	9	9	7	7	10	13	4	6	8	1
Sabor extraño*	35	29	14	23	36	26	7	29	18	5	16	13	25	14	4
Alcohólica*	6	8	14	1	4	12	19	6	15	11	13	4	6	8	10
Defectuosa	14	13	6	9	27	6	4	12	7	0	3	2	15	3	1

*

* Indica que existieron diferencias significativas entre las muestras.

Respecto al análisis de correspondencia realizado entre los atributos y las cervezas evaluadas (Figura 15), se graficaron las primeras dos dimensiones que representan el 59% de la inercia.

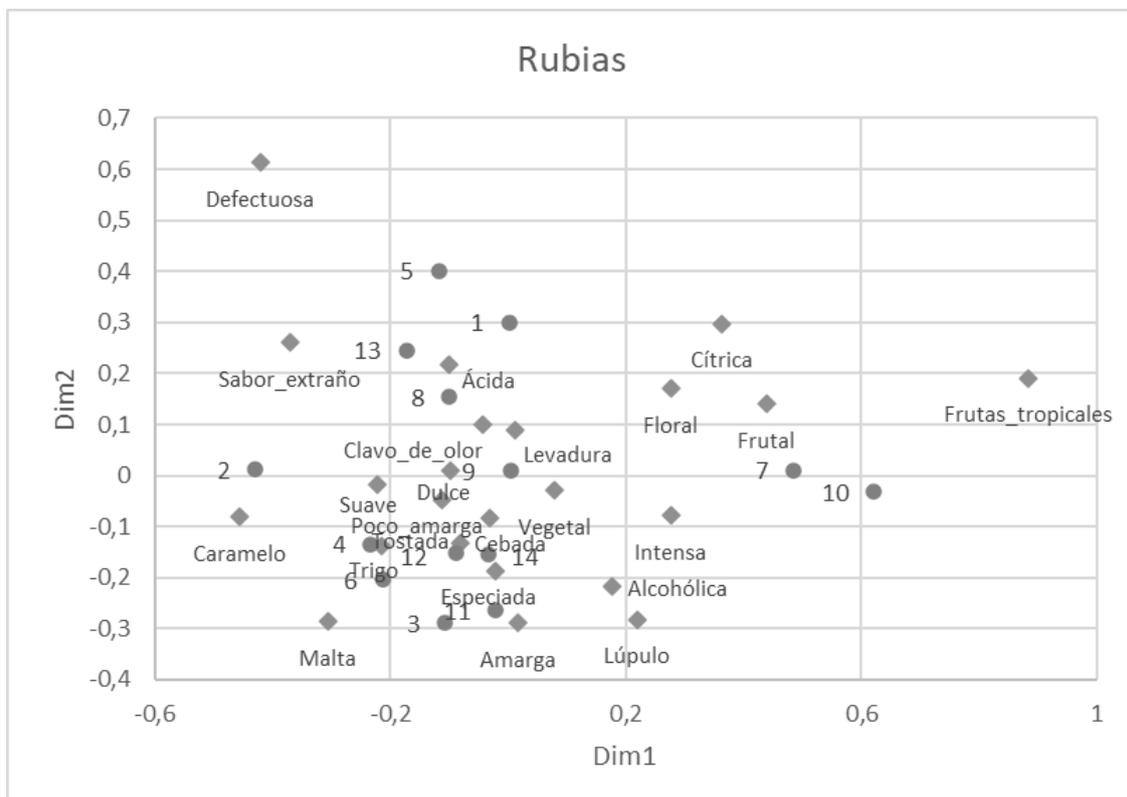


Figura 15. Análisis de correspondencia de cervezas rubias analizadas con los atributos de la prueba CATA.

Las cervezas evaluadas se congregan en cuatro grupos de cervezas. El primero compuesto por las muestras 7 y 10 descritas principalmente como frutal, frutas tropicales, cítrica, floral. El segundo incluye a las muestras 1, 5, 13 y 8, asociadas a defectuosa, ácida, sabor extraño y posicionadas en valores positivos de la dimensión 2 y valores negativos de la dimensión 1. Un tercer grupo reúne las muestras 3, 4, 6, 9, 11,12,14 asociadas con los términos levadura, vegetal, dulce, suave, poco amarga, tostada, trigo, cebada, especiada. La muestra 2 se asoció principalmente a caramelo y sabor extraño.

Se utilizó el análisis de penalización para identificar las características sensoriales que afectan positiva y negativamente la aceptabilidad de los consumidores. Como se observa en la Figura 16, para cervezas rubias, los términos con el mayor impacto positivo en la aceptabilidad fueron frutal, suave, frutas tropicales, dulce, cítrica y poco amarga. Por el contrario, los atributos con mayor impacto negativo en la aceptabilidad fueron defectuosa, sabor extraño, ácida y amarga.

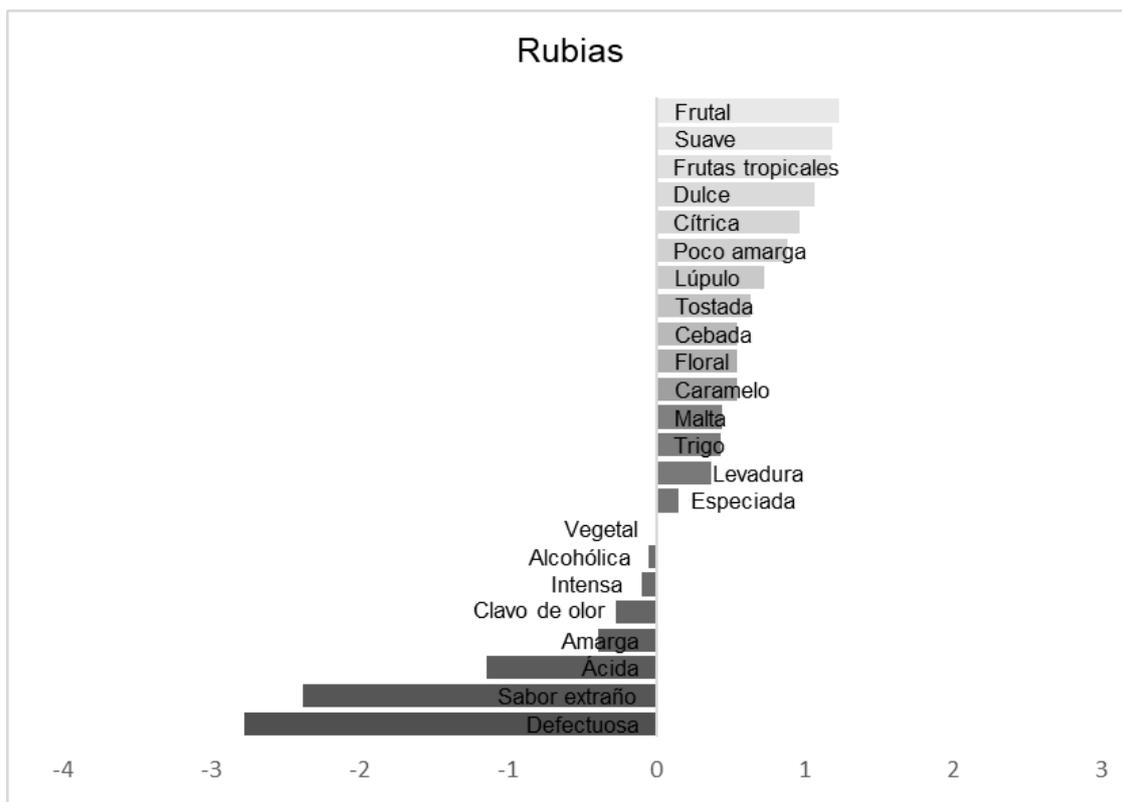


Figura 16. Impacto de las características sensoriales en la aceptabilidad de los consumidores de cervezas rubias artesanales.

5.2.2. Cervezas IPA

En cuanto a las cervezas artesanales IPA se encontraron diferencias entre las cervezas en 10 características. Al solicitar a los consumidores una descripción de su cerveza IPA ‘ideal’ los términos mencionados más frecuentemente fueron poco amarga y malta (Tabla 21).

Tabla 21. Porcentaje de consumidores que utilizó cada uno de los términos para describir 12 muestras de cerveza artesanales IPA.

	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10	Muestra 11	Muestra 12	Ideal
Amarga*	45	61	35	22	42	31	53	38	50	46	45	28	24
Poco amarga	33	20	25	39	20	39	22	28	25	26	24	44	44

Cebada	8	14	2	16	10	20	10	18	10	12	14	20	36
Trigo	4	12	13	10	4	4	0	4	8	6	8	10	16
Lúpulo	16	18	4	12	18	14	16	14	19	22	10	8	26
Malta*	24	12	4	25	26	33	8	18	15	26	24	16	41
Cítrica*	18	16	27	29	22	6	14	4	25	4	6	6	24
Intensa*	24	51	25	14	22	12	24	12	33	28	41	14	35
Suave*	22	10	17	22	26	33	20	40	17	22	8	30	38
Frutal*	10	10	23	14	22	4	14	4	23	4	8	6	17
Especiada	8	12	4	6	6	8	8	6	13	8	10	8	12
Frutas tropicales*	8	0	25	6	24	2	4	6	12	2	2	10	12
Levadura	6	4	8	8	4	10	6	2	6	12	10	12	14
Ácida	22	24	21	12	16	10	20	12	23	8	24	18	12
Dulce	14	12	15	12	2	10	6	6	4	8	6	12	28
Tostada*	16	24	6	6	12	14	10	20	13	32	18	14	15
Caramelo	10	8	8	20	6	10	8	10	2	6	4	14	21
Clavo de olor*	4	14	0	2	6	6	6	2	10	8	2	0	6
Floral*	6	8	13	16	10	4	14	6	19	0	6	4	6
Vegetal	8	6	10	8	10	6	10	6	6	4	4	6	6
	Muestra 1	Muestra 2	Muestra 3	Muestra 4	Muestra 5	Muestra 6	Muestra 7	Muestra 8	Muestra 9	Muestra 10	Muestra 11	Muestra 12	Ideal
Sabor extraño	24	20	23	25	22	14	20	20	17	16	20	24	7
Alcohólica	10	10	15	8	14	12	6	10	23	16	20	12	29
Defectuosa	2	4	4	2	4	2	4	8	4	2	6	4	1

* Indica que existieron diferencias significativas entre las muestras.

Al realizar el análisis correspondencia (Figura 17), las dimensiones 2 y 3 representan un 73% de la varianza. Al igual que en caso de las cervezas rubias se pueden observar cuatro grupos. Uno de los grupos incluye las muestras 2 y 10 descritas principalmente como ácida, especiada, intensa. Las muestras 4 y 12 conforman un segundo grupo asociadas a caramelo y poco amarga, estando las muestras 5 y 7 asociadas a un tercer grupo relacionado mayoritariamente a suave y frutas tropicales. Las demás muestras se encuentran en una posición intermedia del mapa de correspondencia.

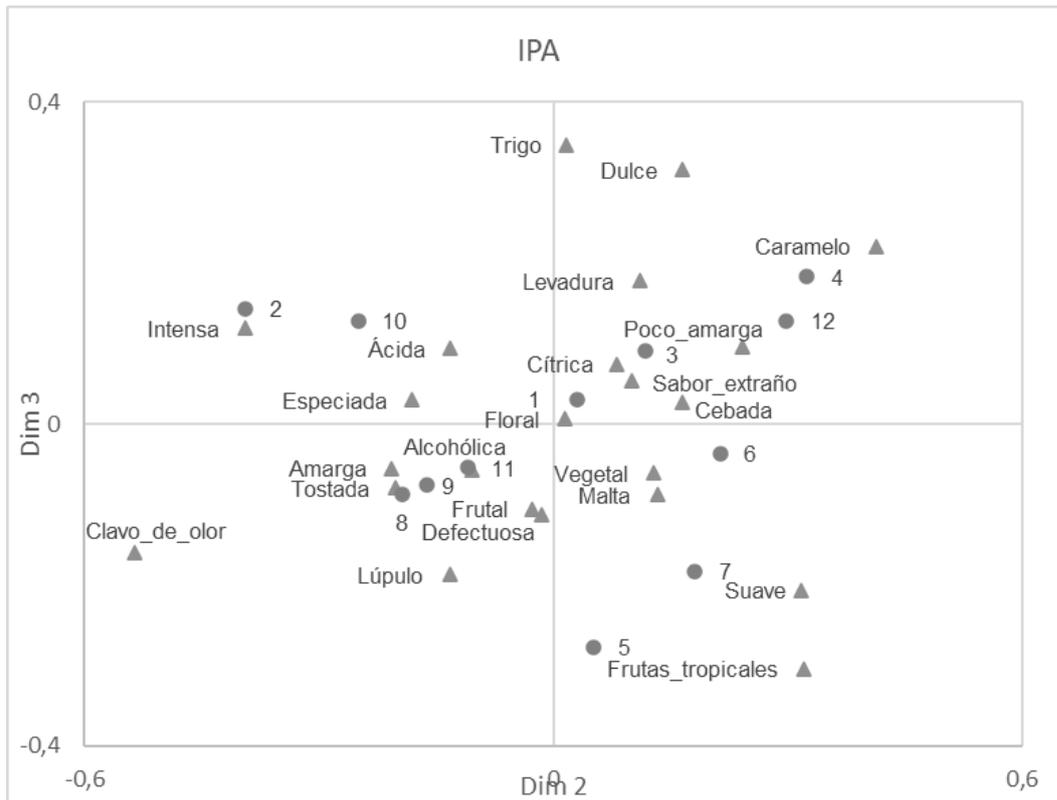


Figura 17. Análisis de correspondência de cervesas IPA analizadas con los atributos de la prueba CATA.

Respecto al análisis de penalización, para las cervesas IPA, los términos con el mayor impacto positivo en la aceptabilidad fueron dulce, suave, frutas tropicales, caramelo, frutal y poco amarga. Por el contrario, los atributos con mayor impacto negativo en la aceptabilidad fueron defectuosa, sabor extraño, ácida y amarga (Figura 18).

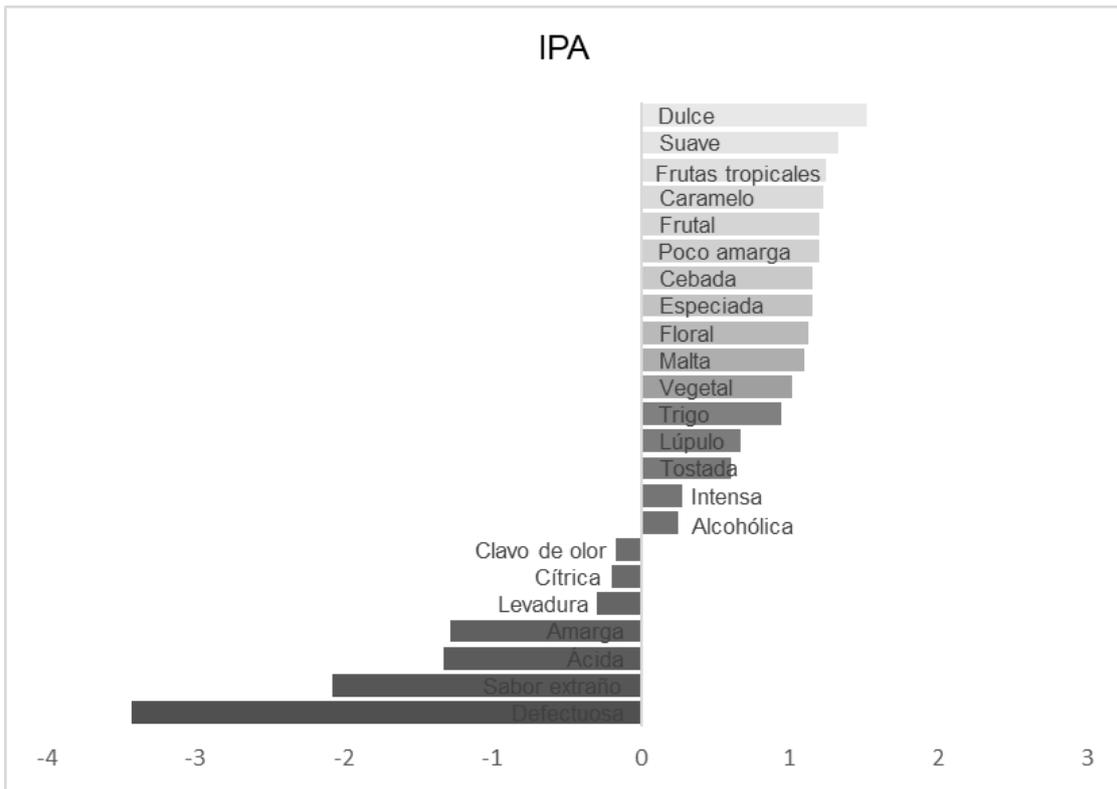


Figura 18. Impacto de las características sensoriales en la aceptabilidad de los consumidores de cervezas IPA artesanales.

5.3. Discusión

En esta sección se presentó el estudio sensorial de cervezas artesanales nacionales rubias e IPA utilizando preguntas del tipo CATA.

El movimiento de la cerveza artesanal está en auge y ofrece muchos aspectos sensoriales diferentes que deben evaluarse para obtener información sobre cómo reaccionan las distintas personas ante los diferentes productos, para determinar a qué grupo de personas les gusta un determinado tipo de cerveza (Habschied et al., 2020).

A través del análisis de penalización se conocieron los términos con el mayor impacto positivo y negativo para cada estilo. En ambos casos los términos dulce, suave y frutas tropicales fueron términos con alto impacto positivo, diferenciándose en mayor aceptabilidad a cítrico para las rubias y a caramelo para las IPA.

Los términos con mayor impacto negativo fueron iguales para ambos casos, siendo defectuosa, sabor extraño, ácida y amarga. En el caso de las cervezas IPA, se penalizó negativamente el término amarga, a pesar de ser una característica de este estilo de cerveza (Brewers Association, 2017).

La investigación realizada, presenta el primer antecedente de este tipo de análisis de cervezas artesanales nacionales con consumidores en el Uruguay. La información recabada es una herramienta de utilidad para conocer la descripción de los productos del mercado artesanal de los dos estilos más consumidos de cerveza. También brinda información de las preferencias de los consumidores uruguayos pudiendo orientar así la búsqueda hacia nuevos insumos que consideren las preferencias locales.

6

Conclusiones y perspectivas

6. Conclusiones y perspectivas

El objetivo general de esta tesis fue generar insumos para la elaboración de cervezas artesanales reducidas en carbohidratos considerando aspectos microbiológicos y sensoriales.

A partir de la información recabada a través de la encuesta realizada a consumidores uruguayos de cerveza se concluye que se mantiene una percepción diferencial para cerveza y cerveza artesanal. La cerveza artesanal se relaciona con características del producto, la experiencia de su consumo o respecto a su proceso, percibiendo este tipo de producto como diferente e innovador. Estos resultados refuerzan la importancia de obtener insumos novedosos y diferenciales para la producción de cervezas artesanales, particularmente de cervezas reducidas en carbohidratos. En ese sentido, la búsqueda de levaduras nativas como insumos microbiológicos resultó una estrategia adecuada.

Al respecto de los insumos microbiológicos, se obtuvo una colección de 268 levaduras nativas con varias candidatas de interés para el foco de esta tesis, así como para otros usos futuros en bebidas fermentadas. Se evaluó su actividad amilásica y su capacidad de fermentar maltosa. Se destacaron 56 levaduras con actividad amilásica, 27 levaduras con capacidad de fermentar maltosa, siendo 14 no *Saccharomyces* y 13 correspondientes a *Saccharomyces cerevisiae*. A partir de los resultados de microfermentaciones y el análisis de los azúcares finales y producción de glicerol y etanol se seleccionó a una levadura de la especie *Starmerella meliponinorum* como candidata para la producción de levaduras reducidas en carbohidratos. Se destacó por su alto porcentaje de atenuación, dado por su capacidad de consumir la maltotriosa, así como por su producción de glicerol superior a la cepa comercial de referencia.

El conocimiento de las preferencias de los consumidores a nivel local es de gran relevancia para el aporte de información como guía en la innovación y desarrollo de nuevos productos, en particular en aquellos con un nicho específico como la cerveza reducida en carbohidratos. En el presente trabajo se caracterizaron sensorialmente y se evaluó su aceptación por parte de los consumidores de cervezas artesanales nacionales de los dos estilos de cerveza más consumidos en nuestro país. Complementariamente los consumidores describieron una cerveza ideal para estas variedades, aportando datos sobre las características que el consumidor busca en esos estilos.

Como perspectivas para continuar evaluando la levadura seleccionada perteneciente a la especie *S. meliponinorum*, sería de interés evaluar su capacidad fermentativa en un mosto real y a escala piloto, evaluando el rendimiento de la fermentación, así como el

consumo de azúcares y producción de etanol y glicerol. Adicionalmente sería de interés realizar una evaluación del perfil aromático volátil por espectrometría de gases acoplado a masa y correlacionar los datos con descriptores sensoriales. La evaluación sensorial de las cervezas producidas sería utilizando grupos de consumidores a través de la metodología CATA. Estos resultados podrían compararse con los obtenidos en el capítulo 5, considerando las preferencias observadas de los consumidores para las cervezas rubias e IPAs.

Los resultados de esta tesis abren además otras posibles líneas de investigación. Por ejemplo, las levaduras obtenidas pertenecientes a *Aureobasidium pullulans* son potenciales candidatos para continuar su exploración en la producción de enzimas amilásicas para la producción de cervezas reducidas en carbohidratos u otros tipos de cerveza, como el trabajo realizado por Tourné (2023). Se cuenta también con una pequeña colección de 8 *Lachancea thermotolerans* que fermentan maltosa y serían interesantes candidatos para su uso en producción de cerveza, en particular cervezas ácidas. La levadura *Lachancea thermotolerans* que presentó actividad amilásica, pero no fermenta maltosa, aunque si glucosa, es una interesante candidata para explorar su utilización en la producción de cervezas reducidas en calorías utilizando un cultivo mixto, por ejemplo, en conjunto con una levadura *Saccharomyces*.

7

Referencias

7. Referencias

- Alcaire, F., Antúnez, L., Vidal, L., Zorn, S., Giménez, A., Castura, J. C., & Ares, G. (2017). Comparison of static and dynamic sensory product characterizations based on check-all-that-apply questions with consumers. *Food Research International*, 97, 215-222. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2017.04.012>
- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., & Becker, T. (2014). *Humulus lupulus* - a story that begs to be told. A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 289-314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- Alves, V., Gonçalves, J., Figueira, J. A., Ornelas, L. P., Branco, R. N., Câmara, J. S., & Pereira, J. A. M. (2020). Beer volatile fingerprinting at different brewing steps. *Food Chemistry*, 326. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.126856>
- Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S., & Secondi, L. (2015). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Quality and Preference*, 41, 214-224. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2014.12.005>
- Ares, G., Dauber, C., Fernández, E., Giménez, A., & Varela, P. (2014). Penalty analysis based on CATA questions to identify drivers of liking and directions for product reformulation. *Food Quality and Preference*, 32, 65-76. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.05.014>
- Ares, G., Vidal, L., Allegue, G., Giménez, A., Bandeira, E., Moratorio, X., Molina, V., & Curutchet, M. R. (2016). Consumers' conceptualization of ultra-processed foods. *Appetite*, 105, 611-617. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2016.06.028>
- Bamforth, C. W. (2005). Beer, carbohydrates and diet. *Journal of the Institute of Brewing*, 111(3), 259-264. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2005.tb00681.x>
- Bamforth, C. W. (2009). Current perspectives on the role of enzymes in brewing. *Journal of Cereal Science*, 50(3), 353-357. <https://doi.org/10.1016/j.jcs.2009.03.001>
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, 86, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Bimbo, F., De Meo, E., Baiano, A., & Carlucci, D. (2023). The Value of Craft Beer Styles: Evidence from the Italian Market. *Foods*, 12(6). <https://doi.org/10.3390/foods12061328>

- Blanco, C. A., Andrés-Iglesias, C., & Montero, O. (2016). Low-alcohol Beers: Flavor Compounds, Defects, and Improvement Strategies. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(8), 1379-1388. <https://doi.org/10.1080/10408398.2012.733979>
- Blanco, C. A., Caballero, I., Barrios, R., & Rojas, A. (2014). Innovations in the brewing industry: Light beer. *International Journal of Food Sciences and Nutrition*, 65(6), 655-660. <https://doi.org/10.3109/09637486.2014.893285>
- Bozoudi, D., & Tsaltas, D. (2018). The multiple and versatile roles of *Aureobasidium pullulans* in the vitivinicultural sector. *Fermentation*, 4(4), 1-15. <https://doi.org/10.3390/fermentation4040085>
- Brewers Association. (2017). *Brewers Association 2017 Beer Style Guidelines*. [Guía técnica]. <http://www.brewersassociation.org/educational-publications/beer-styles/>
- 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*, 53(4), 359-377. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2022). Selection of *Saccharomyces eubayanus* strains from Patagonia (Argentina) with brewing potential and performance in the craft beer industry. *European Food Research and Technology*, 248(2), 519-531. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03897-6>
- Cabras, I., & Higgins, D. M. (2016). Beer, brewing, and business history. *Business History*, 58(5), 609-624. <https://doi.org/10.1080/00076791.2015.1122713>
- 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., Pietrafesa, R., Massari, C., Poeta, C., & Romano, P. (2010). Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for Nero d'Avola wine and evaluation of selected starter implantation in pilot fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 144(1), 187-192. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.09.009>
- Carrau, F., & Boido, E. (2020). Yeasts for low input winemaking: microbial terroir and flavor differentiation. *Advances in Applied Microbiology*, 111, 89-121. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S006521642030006X>

- Carrau, F. M., Medina, K., Farina, L., Boido, E., Henschke, P. A., & Dellacassa, E. (2008). Production of fermentation aroma compounds by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts: Effects of yeast assimilable nitrogen on two model strains. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1196-1207. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00412.x>
- Carvalho, N. B., Minim, L. A., Nascimento, M., Ferreira, G. H. de C., & Minim, V. P. R. (2018). Characterization of the consumer market and motivations for the consumption of craft beer. *British Food Journal*, 120(2), 378-391. <https://doi.org/10.1108/BFJ-04-2017-0205>
- Chrysochou, P. (2014). Drink to get drunk or stay healthy? Exploring consumers' perceptions, motives and preferences for light beer. *Food Quality and Preference*, 31(1), 156-163. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.08.006>
- Cubillos, F. A., Gibson, B., Grijalva-Vallejos, N., Krogerus, K., & Nikulin, J. (2019). Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast*, 36(6), 383-398. <https://doi.org/10.1002/yea.3380>
- Da Costa Jardim, C., De Souza, D., Machado, I. C. K., Pinto, L. M. N., De Souza Ramos, R. C., & Garavaglia, J. (2018). Sensory profile, consumer preference and chemical composition of craft beers from Brazil. *Beverages*, 4(4). <https://doi.org/10.3390/beverages4040106>
- De Keukeleire, D. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*, 23(1), 108–112. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>
- Di Rienzo J.A., Casanoves F., Balzarini M.G., Gonzalez L., Tablada M., & Robledo C.W. (2020). *InfoStat versión 2020*. [Software]. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba.
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., & Bamforth, C. W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 599-604. <https://doi.org/10.1002/jib.362>
- Donadini, G., & Porretta, S. (2017). Uncovering patterns of consumers' interest for beer: A case study with craft beers. *Food Research International*, 91, 183-198. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.11.043>
- Durello, R. S., Silva, L. M., & Bogusz, S. (2019). Hop Chemistry. *Química Nova*, 42(8), 900-919. <https://doi.org/10.21577/0100-4042.20170412>
- Fox, G. (2018). Starch in Brewing Applications. En *Starch in Food: Structure, Function and Applications: Second Edition* (pp. 633-659). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-100868-3.00016-0>

- Francesca, N., Gaglio, R., Alfonzo, A., Settanni, L., Corona, O., Mazzei, P., Romano, R., Piccolo, A., & Moschetti, G. (2016). The Wine: Typicality or Mere Diversity? The Effect of Spontaneous Fermentations and Biotic Factors on the Characteristics of Wine. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 8, 769-773. <https://doi.org/10.1016/j.aaspro.2016.02.064>
- Gaur, R., Singh, R., Gupta, M., & Gaur, M. K. (2010). *Aureobasidium pullulans*, an economically important polymorphic yeast with special reference to pullulan. *African Journal of Biotechnology*, 9(47), 7989-7997. <https://doi.org/10.5897/ajb10.948>
- Gibson, B., Geertman, J. M. A., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D., Louis, E. J., Magalhães, F., & 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>
- Godoy, A. (2013). *Aislamiento e identificación molecular de especies de levaduras No-Saccharomyces presentes en uvas*. [Tesis de grado, Facultad de Ciencias, Universidad de la República]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/1544>
- Gómez-Corona, C., Escalona-Buendía, H. B., García, M., Chollet, S., & Valentin, D. (2016). Craft vs. industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite*, 96, 358-367. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2015.10.002>
- González, M. (2017). *Principios de Elaboración de las Cervezas Artesanales* (1.^a ed.). Lulu Enterprises. <https://www.lulu.com>
- Gutiérrez, A., Boekhout, T., Gojkovic, Z., & Katz, M. (2018). Evaluation of non-Saccharomyces yeasts in the fermentation of wine, beer and cider for the development of new beverages. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 389-402. <https://doi.org/10.1002/jib.512>
- Habschied, K., Živković, A., Krstanović, V., & Mastanjević, K. (2020). Functional beer—a review on possibilities. *Beverages*, 6(3), 1-15. <https://doi.org/10.3390/beverages6030051>
- Harrison, M. A., & Albanese, J. B. (2019). Beer/Brewing. *Encyclopedia of Microbiology*, 467-477. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-809633-8.13014-6>
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J., & Chen, L. (2014). Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer - A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(3), 157-163. <https://doi.org/10.1002/jib.145>

- Hernández-Mora, Y. N., Verde-Calvo, J. R., Malpica-Sánchez, F. P., & Escalona-Buendía, H. B. (2022). Consumer Studies: Beyond Acceptability—A Case Study with Beer. *Beverages*, 8(4). <https://doi.org/10.3390/beverages8040080>
- 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>
- Iorizzo, M., Coppola, F., Letizia, F., Testa, B., & Sorrentino, E. (2021). Role of yeasts in the brewing process: Tradition and innovation. *Processes*, 9(5). <https://doi.org/10.3390/pr9050839>
- Iturrutxa, E., Hill, A. E., & Torija, M. J. (2023). Profiling potential brewing yeast from forest and vineyard ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 394. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110187>
- Ivanova, N., Yang, Q., Bastian, S. E. P., Wilkinson, K. L., & Ford, R. (2022). Consumer understanding of beer and wine body: an exploratory study of an ill-defined concept. *Food Quality and Preference*, 98. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2021.104383>
- Jaeger, S. R., Worch, T., Phelps, T., Jin, D., & Cardello, A. V. (2020). Preference segments among declared craft beer drinkers: Perceptual, attitudinal and behavioral responses underlying craft-style vs. traditional-style flavor preferences. *Food Quality and Preference*, 82, 103884. <https://doi.org/10.1016/J.FOODQUAL.2020.103884>
- Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Yeast biotechnology. En C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.) *The Yeasts* (Vol. 1, pp. 21-44). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3>
- Jorge, E. da C., Mendes, A. C. G., Auriema, B. E., Cazedey, H. P., Fontes, P. R., Ramos, A. de L. S., & Ramos, E. M. (2015). Application of a check-all-that-apply question for evaluating and characterizing meat products. *Meat Science*, 100, 124-133. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2014.10.002>
- Kayadelen, F., Agirman, B., Jolly, N. P., & Erten, H. (2023). The influence of *Torulaspora delbrueckii* on beer fermentation. *FEMS yeast research*, 23. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foad006>
- King, A. J., & Dickinson, R. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 16(6), 499-506. [https://doi.org/https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E](https://doi.org/https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E)

- Kunze, W. (2006). *Tecnología para cerveceros y malteros* (1.^a ed., trad. Bauer, Claudio R.). VLB Berlin.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., Boekhout, T., & Robert, V. (2011). Methods for isolation, phenotypic characterization and maintenance of yeasts. En C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts* (5.^a ed., Vol. 1, pp. 87-110). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00007-0>
- Kurtzman, C. P., & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, *73*, 331-371.
- Lappa, I. K., Kachrimanidou, V., Pateraki, C., Koulougliotis, D., Eriotou, E., & Kopsahelis, N. (2020). Indigenous yeasts: Emerging trends and challenges in winemaking. *Current Opinion in Food Science*, *32*, 133-143. <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2214799320300333>
- Larroque, M. N. (2020). *Selección de levaduras no tradicionales para la elaboración de cervezas artesanales*. [Tesis de Maestría. Facultad de Química, Universidad de la República]. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/32066>
- Larroque, M. N., Carrau, F., Fariña, L., Boido, E., Dellacassa, E., & Medina, K. (2021). Effect of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* native yeasts on beer aroma compounds. *International Journal of Food Microbiology*, *337*. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108953>
- Lerro, M., Marotta, G., & Nazzaro, C. (2020). Measuring consumers' preferences for craft beer attributes through Best-Worst Scaling. *Agricultural and Food Economics*, *8*(1). <https://doi.org/10.1186/s40100-019-0138-4>
- Liguori, L., De Francesco, G., Russo, P., Albanese, D., Perretti, G., & Di Matteo, M. (2015). Quality improvement of low alcohol craft beer produced by evaporative pertraction. *Chemical Engineering Transactions*, *43*, 13-18. <https://doi.org/10.3303/CET1543003>
- Lodolo, E. J., Kock, J. L. F., Axcell, B. C., & Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* - The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, *8*(7), 1018-1036. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x>
- Malfliet, S., Goiris, K., Aerts, G., & de Cooman, L. (2009). Analytical-sensory determination of potential flavour deficiencies of light beers. *Journal of the Institute of Brewing*, *115*(1), 49-63. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2009.tb00344.x>

- Matthews, S. L., Byrne, H., & Hennigan, G. P. (2001). Preparation of a low carbohydrate beer by mashing at high temperature with glucoamylase. *Journal of the Institute of Brewing*, 107(3), 185-194. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2001.tb00090.x>
- Medina, K., Martin, V., Boido, E., & Carrau, F. (2019). Yeast Biotechnology for Red Winemaking. *Red Wine Technology*, 69-83. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00005-0>
- Meier-Dörnberg, T., Kory, O. I., Jacob, F., Michel, M., & Hutzler, M. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe? spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization. *FEMS Yeast Research*, 18(4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/foy023>
- Meusdoerffer, F. G. (2009). A Comprehensive History of Beer Brewing. En H. M. Esslinger (Ed.), *Handbook of brewing: processes, technology, markets* (p. 746). Wiley-VCH. <https://doi.org/https://doi.org/10.1002/9783527623488.ch1>
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2016). Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. *Yeast*, 33(4), 129-144. <https://doi.org/10.1002/YEA.3146>
- Molinet, J., & Cubillos, F. A. (2020). Wild Yeast for the Future: Exploring the Use of Wild Strains for Wine and Beer Fermentation. *Frontiers in Genetics*, 11. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.589350>
- Naumov, G. I., Naumova, E. S., & Sniegowski, P. D. (1998). *Saccharomyces paradoxus* and *Saccharomyces cerevisiae* are associated with exudates of North American oaks. *Canadian Journal of Microbiology*, 1045-1050. PMID: 10029999.
- Nevoigt, E., Pilger, R., Mast-Gerlach, E., Schmidt, U., Freihammer, S., Eschenbrenner, M., Garbe, L., & Stahl, U. (2002). Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Research*, 2(2), 225-232. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2002.tb00087.x>
- Nikulin, J., Eerikäinen, R., Hutzler, M., & Gibson, B. (2020). Brewing characteristics of the maltotriose-positive yeast *Zygotorulaspora florentina* isolated from oak. *Beverages*, 6(4), 1-19. <https://doi.org/10.3390/beverages6040058>
- O'Rourke, T. (2003). *Hops and hop products* (Vol. 3, N° 1). The Brewer International.
- Palmer, J., & Kaminski, C. (2013). *Water. A comprehensive guide for brewers.*

- Parker, D. K. (2012). Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. *Alcoholic Beverages*, 133-158. <https://doi.org/10.1533/9780857095176.2.133>
- Petruzzi, L., Rosaria Corbo, M., Sinigaglia, M., & Bevilacqua, A. (2016). Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. *Food Reviews International*, 32(4), 341-363. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1075211>
- 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. En *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 98, N° 5, pp. 1937-1949). <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Piškur, J., Dowska, R., Polakova, S., Merico, A., & Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, 22(4). doi: 10.1016/j.tig.2006.02.002.
- Poelmans, E., & Swinnen, J. F. M. (2011). From Monasteries to Multinationals (and Back): A Historical Review of the Beer Economy. *Journal of Wine Economics*, 6(2), 196-216. <http://dx.doi.org/10.2139/ssrn.1995425>
- Poelmans, E., & Swinnen, J. F. M. (2012). A Brief Economic History of Beer. En *The Economics of Beer*. Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/acprof:oso/9780199693801.003.0001>
- Poreda, A., Czarnik, A., Zdaniewicz, M., Jakubowski, M., & Antkiewicz, P. (2014). Corn grist adjunct - application and influence on the brewing process and beer quality. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(1), 77-81. <https://doi.org/10.1002/jib.115>
- Postigo, V., Esteban, S., & Arroyo, T. (2023). *Lachancea thermotolerans*, an Innovative Alternative for Sour Beer Production. *Beverages*, 9(1), 20. <https://doi.org/10.3390/beverages9010020>
- Postigo, V., Sánchez, A., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2022). New Approaches for the Fermentation of Beer: Non-Saccharomyces Yeasts from Wine. *Fermentation*, 8(6). <https://doi.org/10.3390/fermentation8060280>
- R Core Team. (2023). *R: A Language and Environment for Statistical Computing*. [Software]. R Foundation for Statistical Computing.
- Rani, H., & Bhardwaj, R. D. (2021). Quality attributes for barley malt: "The backbone of beer". *Journal of Food Science*, 86(8), 3322-3340. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.15858>

- Reinbach, H. C., Giacalone, D., Ribeiro, L. M., Bredie, W. L. P., & Frøst, M. B. (2014). Comparison of three sensory profiling methods based on consumer perception: CATA, CATA with intensity and Napping®. *Food Quality and Preference*, 32, 160-166. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2013.02.004>
- Rivaroli, S., Baldi, B., & Spadoni, R. (2020). Consumers' perception of food product craftsmanship: A review of evidence. *Food Quality and Preference*, 79. <https://doi.org/10.1016/j.foodqual.2019.103796>
- Romero-Medina, A., Estarrón-Espinosa, M., Verde-Calvo, J. R., Lelièvre-Desmas, M., & Escalona-Buendía, H. B. (2020). Renewing Traditions: A Sensory and Chemical Characterisation of Mexican Pigmented Corn Beers. *Foods*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/foods9070886>
- Roudil, L., Russo, P., Berbegal, C., Albertin, W., Spano, G., & Capozzi, V. (2019). Non-*Saccharomyces* Commercial Starter Cultures: Scientific Trends, Recent Patents and Innovation in the Wine Sector. *Recent Patents on Food, Nutrition & Agriculture*, 11(1), 27-39. <https://doi.org/10.2174/2212798410666190131103713>
- Salgado Silva, M., Marina Arruda, L., Lanna Xavier, P., Ximena Díaz Ramírez, M., Augusto da Silveira, F., Cristiano Santana, W., Henrique Alves da Silva, P., Gomes Fietto, L., & Renon Eller, M. (2020). Selection of yeasts from bee products for alcoholic beverage production. *Brazilian Journal of Microbiology*, 51, 323-334. <https://doi.org/10.1007/s42770-019-00184-1/Published>
- Sannino, C., Mezzasoma, A., Buzzini, P., & Turchetti, B. (2019). Non-conventional yeasts for producing alternative beers. En *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application* (pp. 361-388). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3_11
- Santa Cruz, E., & Sosa, A. (2021). *Estudio diagnóstico sobre el sector cervecero artesanal en Uruguay*. [Informe técnico]. <https://amau.uy/wp-content/uploads/2022/03/Diagnostico-cerveceria-artesanal-en-Uruguay.pdf>
- Schönberger, C., & Kostelecky, T. (2011). 125th anniversary review: The role of hops in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 117(3), 259-267. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2011.tb00471.x>
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, 61-80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>

- Steinbach, J., Burgardt, V. de C. da F., & Machado-Lunkes, A. (2023). Perceptions, attitudes, and motivational factors for consumers and nonconsumers of traditional and craft beers. *Journal of Sensory Studies*, 38(2). <https://doi.org/10.1111/joss.12813>
- Stewart, G. G. (2017). The production of secondary metabolites with flavour potential during brewing and distilling wort fermentations. *Fermentation*, 3(4). <https://doi.org/10.3390/fermentation3040063>
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., & Kumar, S. (2011). MEGA5: Molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10), 2731-2739. <https://doi.org/10.1093/molbev/msr121>
- Teixeira, A. C. P., Marini, M. M., Nicoli, J. R., Antonini, Y., Martins, R. P., Lachance, M. A., & Rosa, C. A. (2003). *Starmerella meliponinorum* sp. nov., a novel ascomycetous yeast species associated with stingless bees. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 53(1), 339-343. <https://doi.org/10.1099/ijs.0.02262-0>
- Thesseling, F. A., Bircham, P. W., Mertens, S., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). A Hands-On Guide to Brewing and Analyzing Beer in the Laboratory. *Current protocols in microbiology*, 54(1), e91. <https://doi.org/10.1002/cpmc.91>
- Tourné, F. (2023). *Análisis de las amilasas presentes en cepas de Aureobasidium pullulans nativas para su aplicación a la producción de cerveza*. Tesis de grado. Facultad de Química, Universidad de la República. <https://hdl.handle.net/20.500.12008/37168>
- Varela, C. (2016). The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9861-9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>
- Varela, C., & Borneman, A. R. (2017). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, 34(3), 111-128. <https://doi.org/10.1002/YEA.3219>
- Varela, P., & Ares, G. (2012). Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for product characterization. *Food Research International*, 48(2), 893-908. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.06.037>
- Varela, P., & Ares, G. (2014). *Novel Techniques in Sensory Characterization and Consumer Profiling*. CRC Press.

- Vaughan Martini, A., & Martini, A. (1987). Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie Van Leeuwenhoek*, *53*, 77-84. <https://doi.org/10.1007/BF00419503>
- Villarreal, P., Quintrel, P. A., Olivares-Muñoz, S., Ruiz, J. J., Nespolo, R. F., & Cubillos, F. A. (2022). Identification of new ethanol-tolerant yeast strains with fermentation potential from central Patagonia. *Yeast*, *39*(1-2), 128-140. <https://doi.org/10.1002/yea.3662>
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, *2*(4). <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Wang, J. J., Wang, Z. Y., He, X. P., & Zhang, B. R. (2012). Integrated expression of the α -amylase, dextranase and glutathione gene in an industrial brewer's yeast strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *28*(1), 223-231. <https://doi.org/10.1007/s11274-011-0811-6>
- White, C., & Zainasheff, J. (2010). *Yeast: the practical guide to beer fermentation*. Brewers Publications.
- Willaert, R. (2006). Section V. Beverages: The Beer Brewing Process: Wort Production and Beer Fermentation. En *Handbook of Food Products Manufacturing* (Vol. 1, pp. 443-506). John Wiley & Sons, Inc. <https://doi.org/10.1002/9780470113554.ch20>
- Yeo, H. Q., & Liu, S. Q. (2014). An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects. *International Journal of Food Science and Technology*, *49*(7), 1607-1618. <https://doi.org/10.1111/ijfs.12488>
- Zdaniewicz, M., Satora, P., Pater, A., & Bogacz, S. (2020). Low lactic acid-producing strain of *Lachancea thermotolerans* as a new starter for beer production. *Biomolecules*, *10*(2). <https://doi.org/10.3390/biom10020256>

Anexo

Anexo I

Participante N°1

Estimado participante,

Usted ha sido invitado a participar en un estudio sobre percepción de cerveza en el marco de un proyecto desarrollado por investigadores de la Facultad de Química de la Universidad de la República.

Antes de comenzar a participar en el estudio, por favor lea este consentimiento detalladamente. Siéntase libre de plantear todas las preguntas que tenga para asegurarse de que entiende los procedimientos del estudio al investigador que lo acompañe.

El estudio consiste en evaluar siete muestras de cervezas artesanales y responder una serie de preguntas, lo cual no le llevará más de 10 minutos. Es importante que tenga en cuenta que únicamente nos interesa conocer su percepción ya que en este estudio no existen respuestas correctas o incorrectas.

Los ingredientes de las cervezas son agua, malta, lúpulo y levadura.

No podrán participar del estudio menores de 18 años, celíacos, personas que no puedan consumir alcohol o alérgicas a alguno de los ingredientes de las cervezas. Luego de la prueba no debe conducir aunque no tome las muestras de cerveza.

Todos los datos del proceso son estrictamente confidenciales. La participación es voluntaria y usted tiene el derecho de no participar o abandonar el estudio en el momento en que lo desee. El estudio no conlleva ningún riesgo para su salud física o mental.

Si tiene alguna pregunta sobre este estudio o sobre su participación en el mismo, puede contactar a:

Dr. Gastón Ares
Mail: gares@fq.edu.uy
Tel: 22922021 int. 225
Facultad de Química - UdelaR

Si ha leído y comprendido la información de este consentimiento y todas sus preguntas sobre el estudio y su participación fueron atendidas, por favor complete sus datos y firme el presente formulario de consentimiento informado para participar del estudio.

Nombre _____

Email _____

Firma _____

FORMULARIO DE EVALUACIÓN

INSTRUCCIONES:

- Usted deberá evaluar una serie de cervezas IPA artesanales, las cuales le serán presentadas en vasos plásticos codificados con números de tres cifras.
- Usted deberá evaluar las cervezas de a una, en el orden que se indica en el formulario.
- Para cada una de las cervezas, Usted deberá indicar cuánto le gusta y seleccionar las palabras que describen sus características.
- Una vez que termine de evaluar cerveza, tome un poco de agua antes de pasar a la siguiente.

Muestra N° 312

Por favor, pruebe la cerveza indicada en el formulario y responda las preguntas.

¿Cuánto le gusta esta
cerveza?

**Me disgusta
mucho**
**Me es
indiferente**
**Me gusta
mucho**

Marque todas las palabras que considera adecuadas para describir esta cerveza:

Amarga	<input type="checkbox"/>	Cítrica	<input type="checkbox"/>
Alcohólica	<input type="checkbox"/>	Caramelo	<input type="checkbox"/>
Poco amarga	<input type="checkbox"/>	Intensa	<input type="checkbox"/>
Defectuosa	<input type="checkbox"/>	Tostada	<input type="checkbox"/>
Cebada	<input type="checkbox"/>	Suave	<input type="checkbox"/>
Sabor extraño	<input type="checkbox"/>	Dulce	<input type="checkbox"/>
Trigo	<input type="checkbox"/>	Frutal	<input type="checkbox"/>
Vegetal	<input type="checkbox"/>	Ácida	<input type="checkbox"/>
Lúpulo	<input type="checkbox"/>	Especiada	<input type="checkbox"/>
Floral	<input type="checkbox"/>	Levadura	<input type="checkbox"/>
Malta	<input type="checkbox"/>	Frutas tropicales	<input type="checkbox"/>
Clavo de olor	<input type="checkbox"/>		

Marque todas las palabras que considera adecuadas para describir su CERVEZA IPA
ARTESANAL IDEAL:

- | | | | |
|---------------|--------------------------|-------------------|--------------------------|
| Amarga | <input type="checkbox"/> | Cítrica | <input type="checkbox"/> |
| Alcohólica | <input type="checkbox"/> | Caramelo | <input type="checkbox"/> |
| Poco amarga | <input type="checkbox"/> | Intensa | <input type="checkbox"/> |
| Defectuosa | <input type="checkbox"/> | Tostada | <input type="checkbox"/> |
| Cebada | <input type="checkbox"/> | Suave | <input type="checkbox"/> |
| Sabor extraño | <input type="checkbox"/> | Dulce | <input type="checkbox"/> |
| Trigo | <input type="checkbox"/> | Frutal | <input type="checkbox"/> |
| Vegetal | <input type="checkbox"/> | Ácida | <input type="checkbox"/> |
| Lúpulo | <input type="checkbox"/> | Especiada | <input type="checkbox"/> |
| Floral | <input type="checkbox"/> | Levadura | <input type="checkbox"/> |
| Malta | <input type="checkbox"/> | Frutas tropicales | <input type="checkbox"/> |
| Clavo de olor | <input type="checkbox"/> | | |