

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

Memoria de Título

**EFFECTO DEL USO DE LEVADURAS DEL GÉNERO *BRETTANOMYCES* EN LA
ELABORACIÓN DE CERVEZA**

FELIPE PATRICIO SAAVEDRA FARÍAS

Santiago de Chile
2022.

**UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE PREGRADO**

Memoria de Título

EFFECT OF THE USE OF *BRETTANOMYCES* YEASTS IN BREWING

FELIPE PATRICIO SAAVEDRA FARÍAS

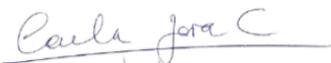
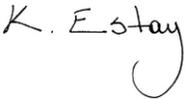
Santiago de Chile
2022.

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE CIENCIAS AGRONOMICAS
ESCUELA DE PREGRADO

**EFFECTO DEL USO DE LEVADURAS DEL GÉNERO *BRETTANOMYCES* EN LA
ELABORACIÓN DE CERVEZA**

Memoria para optar al Título Profesional de:
Ingeniero Agrónomo

Felipe Patricio Saavedra Farías

Profesores Guía		Calificaciones
Carla Jara C. Ingeniera Agrónoma- Enóloga. Dra.		6,5
Jaime Romero O. Bioquímico, Dr.		6,5
Profesores evaluadores Karina Estay V. Ingeniera Agrónoma, Dra.		5,5
Tomislav Curkovic S. Ingeniero Agrónomo, Ph. D.		6,5

Santiago de Chile
2022

ÍNDICE

1	RESUMEN.....	1
	PALABRAS CLAVE:	1
2	ABSTRACT	2
	KEYWORDS	2
3	INTRODUCCIÓN	3
3.1	Objetivo general.....	7
4	MATERIALES Y MÉTODOS	7
5	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	9
5.1	Género <i>Brettanomyces</i> , características generales	9
5.2	Factores del mosto de cebada malteada que afectan la actividad de las levaduras <i>Brettanomyces</i> en la fermentación alcohólica durante el proceso de elaboración de cerveza	12
5.2.1	Azúcares fermentables.....	12
5.2.2	Nitrógeno fácilmente utilizable por las levaduras	13
5.2.3	Temperatura.....	16
5.2.4	pH	21
5.2.5	Oxígeno disuelto en el mosto cervecero.....	24
5.3	Actividad de la enzima β -glucosidasa de las levaduras <i>Brettanomyces</i> implicadas en la elaboración de cerveza	27
5.4	Compuestos volátiles	32
5.4.1	Producción de fenoles por parte de las levaduras <i>Brettanomyces</i>	32
5.4.2	Producción de ésteres por parte de las levaduras <i>Brettanomyces</i>	34
5.5	Levaduras <i>Brettanomyces</i> y su influencia en las cervezas <i>Lambic</i>	36
6	CONCLUSIONES	40
7	BIBLIOGRAFÍA.....	41

1 RESUMEN

La cerveza tiene su origen en Mesopotamia hace varios siglos atrás y llega a Chile hace más de 200 años.

Hoy en día, Chile ha experimentado un alza en el consumo de esta bebida alcohólica, y mundialmente la alternativa de usar de levaduras No *Saccharomyces* toma cada vez más fuerzas para elaborar cervezas innovadoras y originales. Una de las levaduras No-*Saccharomyces* es la levadura *Brettanomyces*, conocida por el deterioro que causa a los vinos en la industria enológica. Sin embargo, al utilizarla en el rubro cervecero, esta levadura genera una composición organoléptica muy particular favoreciendo la elaboración de cervezas agrías o *sour*.

La levadura *Brettanomyces* es muy versátil, esto se debe a que se pueden obtener distintas cervezas según el método de fermentación, ya sea una fermentación primaria, espontánea; mixta o secuencial. De esta manera, se obtienen cervezas con aromas y/o sabores afrutados, terrosos y corral, junto a una acidez equilibrada. Esta característica el Beer Judge Certification Program (BJCP) lo llama “*Funky*”.

En definitiva, las levaduras No-*Saccharomyces* cumplen un rol diferenciador en la elaboración de cerveza, destacando la importancia de la participación de la levadura *Brettanomyces* en la elaboración de cervezas de origen belga tradicionales como las *Lambic* y *Geuze*.

Por lo tanto, este estudio abarca información sobre el sustrato utilizado por la levadura *Brettanomyces* para su desarrollo en el mosto cervecero, las características de la fermentación como la temperatura, el pH y el oxígeno disuelto en el mosto. También muestra los compuestos aromáticos que se producen en la fermentación por la levadura *Brettanomyces*.

PALABRAS CLAVE: Levaduras No *Saccharomyces*, *Lambic*, *Brettanomyces*

2 ABSTRACT

Beer originated in Mesopotamia several centuries ago and arrived in Chile more than 200 years ago.

Nowadays, Chile has experienced a great increase in the consumption of this alcoholic beverage, and worldwide the alternative of using Non-*Saccharomyces* yeasts is gaining more and more strength to elaborate innovative and original beers.

One of the many non-saccharomyces yeasts is *Brettanomyces* yeast, known for the deterioration it causes to wines in the wine industry. However, when used in the brewing industry, this yeast generates a very particular organoleptic composition favoring the production of sour beers.

Brettanomyces yeast is very versatile. The reason is that different types of beers can be obtained by it, depending on the fermentation method, either primary, spontaneous, mixed or sequential. In this manner, earthy and farmyard scent and flavor can be achieved, with a balanced acidity. The Beer Judge Certification Program (BJCP) called this features “*Funky*”

To summarize, yeast, *Saccharomyces* or non-*Saccharomyces*, play an essential role in beer brewing, highlighting the importance of the participation of *Brettanomyces* yeast in the production of *Lambic* beers.

Therefore, this study covers information on the substrate used by *Brettanomyces* yeast for its development in the brewing wort, fermentation characteristics such as temperature, pH and dissolved oxygen in the wort. It also shows the aromatic compounds that are produced in fermentation by the *Brettanomyces* yeast.

KEYWORDS: Non-*Saccharomyces* yeast, Wild yeast, *Brettanomyces*

3 INTRODUCCIÓN

La cerveza proviene de los sumerios en el sur de Babilonia, específicamente, en la llanura entre los ríos Tigris y Éufrates a finales del cuarto milenio antes de Cristo (A.d C.), siendo la cebada la materia prima básica para su elaboración (Hornsey, 2015). La cerveza, se introdujo a Chile en los años de la Independencia y su consumo se inició con la apertura de los puertos al comercio exterior. Incluso, en el año 1825, el médico británico Andrés Blest instaló la primera Cervecería en Valparaíso en la Plaza del Orden (Couyoumdjian, 2004).

La cerveza, al igual que el vino, aceite de oliva y vinagre es un alimento. Este alimento, es una bebida alcohólica compuesta de cebada malteada, lúpulo, levadura y agua, según la ley de pureza alemana *Reinheitsgebot* (BGB1, 1993 citado por Wunderlich and Back, 2009). No obstante, existen las cervezas denominadas especiales que contienen otros ingredientes además de los tradicionales. En Chile el Servicio Agrícola y Ganadero (SAG), las define como bebidas alcohólicas, las cuales contienen al menos un 65% de cerveza en su elaboración, junto con tener la facultad de poder incluir productos y extractos naturales o artificiales idénticos a los naturales, tales como miel, frutos, y especias (SAG, 2015).

Las levaduras es uno de los ingredientes principales en la elaboración de cerveza, y tradicionalmente a lo largo de la historia se han utilizado levaduras del género *Saccharomyces* para llevar a cabo la fermentación alcohólica. Por un lado, la levadura *Saccharomyces cerevisiae* posee características tecnológicas que le permiten fermentar el mosto entre 18°-24°C (cervezas Ale). Por lo general, estas cervezas son más complejas con ésteres y características afrutadas, como las *weissbier* de Baviera. Por otro lado, la levadura *Saccharomyces pastorianus* (cervezas Lager), son aquellas que fermentan entre 8°-14°C, son cervezas refrescantes, de cuerpo medio a medio bajo y algunos estilos son más maltosas sensorialmente, como las cervezas Pilsner y Munich *dunkel* (Lodolo *et al.*, 2008; Wunderlich and Back, 2009; White and Zainashef, 2010; Gallone *et al.*, 2018). Las diferencias en el producto final que hacen que estas levaduras se destaquen en la industria cervecera, debido a sus características esenciales, tales como la alta producción de etanol y la alta tolerancia a éste mismo.

Respecto al consumo global de bebidas alcohólicas, la cerveza se ubica en el segundo lugar de las bebidas alcohólicas más consumida en todo el mundo, representando un 34,8% del consumo total (World Health Organization, 2014). A nivel mundial, Republica Checa, es el consumidor de cervezas líder con 138 litros per cápita, seguido por Austria con 105 litros per cápita y Alemania con 101 litros per cápita hasta el año 2017 (The brewers of europe, 2018). En el caso de Chile, la World Health Organization (2014), reportó que esta bebida alcohólica abarca un 30% de las bebidas alcohólicas consumidas a nivel nacional, y entre el año 2005 y 2020 hubo un aumento del consumo nacional de 30 a 58 litros per cápita, es

decir un aumento del 92% (ACECHI, 2021). Estos antecedentes llevan a analizar que a nivel mundial un aumento del comercio internacional tiene como consecuencia una mayor competencia en el mercado, debido a que las marcas locales compiten con las internacionales. Este aspecto, estimula a las cervecerías locales a elaborar productos innovadores para competir de mejor manera con las marcas extranjeras (Calvo-Porrall and Levy-Mangin, 2015).

En el caso de Chile, la innovación en la elaboración de cerveza es una cualidad que se puede desarrollar, debido a que representa una oportunidad para difundir o darle la importancia al uso de cultivos iniciadores No-*Saccharomyces* o levaduras salvajes no caracterizadas. A esto se puede adicionar, la aplicación de procesos fermentativos espontáneos con el fin de generar productos originales e innovadores. De esta forma, aumentar la gama de productos, y así, satisfacer el paladar del consumidor (Calvo-Porrall *et al.*, 2020)

A nivel de especies, las levaduras No-*Saccharomyces* se han aislado y caracterizado para el desarrollo de cervezas especiales, debido que algunas de estas cepas pueden proporcionar diferentes características organolépticas, por ejemplo, aromas y sabores relacionados con descriptores aromáticos a lácteos (leche y/o yogurth) entregados por el ácido láctico que proporciona levadura *Lachancea thermotolerans* y en el caso de la levadura *Brettanomyces* características afrutadas o florales (Capece *et al.*, 2018). Además, entre los metabolitos resultantes del desarrollo y reproducción de las levaduras No-*Saccharomyces* en el mosto cervecero se incluyen grupos aromáticos como ésteres y alcoholes superiores, junto a compuestos como acetaldehído, ácido acético, terpenoides y glicerol (Yeo and Liu, 2014). Adicionalmente, las algunas levaduras No-*Saccharomyces* tienen la capacidad de poder utilizar otras fuentes de carbono, como dextrinas y pueden enfrentar de mejor manera algún estrés. Por ejemplo, la levadura *Brettanomyces* tienen la capacidad de poder usar la celobiosa y dextrinas, además, de tener una gran tolerancia a un medio con alto contenido de etanol, soportando hasta 15 % v/v. (Galafassi *et al.*, 2011; Leisegang *et al.*, 2006).

En la actualidad, la levadura *Brettanomyces* pertenece al grupo de las levaduras No - *Saccharomyces* más trascendentales en la producción de cervezas agrías, debido a su influencia en las cervezas *Lambic* (Basso *et al.*, 2016; Capece *et al.*, 2018). Su origen se remonta al año 1903, cuando Hielte Clausen aisló a la primera levadura *Brettanomyces*, denominándola como *Brettanomyces clausenii* (Colomer *et al.*, 2019). Se han reportado diversos orígenes de esta levadura en la naturaleza, tales como vino, sidra, yogurth y kombucha (Smith and Divol, 2016). De todos los posibles orígenes en la industria cervecera se destacan 5 especies de levaduras *Brettanomyces*. Las cuales son reconocidas en la elaboración de cerveza. Éstas son *B. anomalus* (*B. clausenii*), *B. bruxellensis* (*B.*

abstinens, *B. custersii*, *B. intermedins*, *B. lambicus*), *B. custersianus*, *B. naardensis*, and *B. nanus* (Sparrow, 2005; Smith and Divol, 2016; Colomer *et al.*, 2019).

Las levaduras del género *Brettanomyces* generan una nueva clase de cerveza. A nivel organoléptico, se obtiene una cerveza, generalmente, más seca con un sabor ácido y posee características afrutadas, fenólicas, a madera y sour según el estilo base de cerveza que se utilice para su elaboración. Contiene notas *funky*, es decir, la cerveza elaborada con estas levaduras posee un *flavor* ligeramente terroso, con descriptores aromáticos relacionados con granja, establo, sudor de caballo y medicinal pero su intensidad depende de la edad de la cerveza y la cepa utilizada. (BJCP, 2021; Colomer *et al.*, 2019). Se pueden obtener distintas cervezas elaboradas con levaduras *Brettanomyces*, según el tipo de la fermentación utilizada para elaborar la cerveza. El primer tipo de fermentación es una fermentación primaria con levaduras *Brettanomyces*. Es decir, la fermentación alcohólica se lleva a cabo solo con levaduras *Brettanomyces*. El segundo tipo de fermentación es una fermentación espontánea, en la cual actúan diversos microorganismos propios del ambiente donde se elabore la cerveza, generalmente participan bacterias, levaduras *Saccharomyces* y levaduras No *Saccharomyces* en el proceso. Este método, internamente, está dividido en 3 fases. En primer lugar, está la principal parte de la fermentación, dominada por levaduras *Saccharomyces*, seguido de bacterias acéticas y bacterias lácticas en la fase de acidificación, y ya terminando la fermentación, actúan las levaduras *Brettanomyces* en la llamada fase de maduración (De Roos and De Vuyst, 2018). El tercer tipo de fermentación es la fermentación alcohólica mixta, lo que quiere decir que la fermentación alcohólica se lleva a cabo mediante coexistencia de levaduras *Saccharomyces* y levaduras *Brettanomyces*, utilizando ambas levaduras para generar etanol, dióxido de carbono y compuestos secundarios al mismo tiempo (White and Zainashef, 2010). El último tipo de fermentación es la secuencial, en este caso la fermentación alcohólica se ejecuta con levaduras *Saccharomyces* y luego una fermentación secundaria, en la cual las levaduras *Brettanomyces* son las que terminan de metabolizar compuestos como las dextrinas, celubiosa y nitratos (Colomer *et al.*, 2019). Estas metabolizaciones generan cervezas resultantes con características organolépticas relacionadas con ésteres frutados y una acidez equilibrada (Sparrow, 2005; De Roos and De Vuyst, 2018), dejando como consecuencia una contribución a la eliminación de compuestos de aromas no deseados y excreción de compuestos activos de sabor de la levadura. Estas características sensoriales se ven reflejadas en el producto final con una cerveza con más cuerpo y profundidad, eliminando compuestos de sabor indeseables, tales como dicetonas vecinales, sulfuro de hidrógeno y acetaldehído, compuestos que entregan descriptores aromáticos como mantequilla, cartón y manzana verde respectivamente (Willaert, 2012).

Por tanto, al igual que en la industria enológica, en la industria cervecera la elección de la levadura tiene un gran impacto en la calidad del producto final. Además, el uso de

levaduras específicas es un factor diferenciador en el estilo de la cerveza. Por consiguiente, un aumento en la diversidad de cervezas, se generan cervezas con distintos sabores y perfiles aromáticos según las diferentes concentraciones de grupos aromáticos y compuestos que la cerveza posea, tales como las cervezas *Gueuze* y *Lambic*, que contienen etil fenol, etil guayacol, ácido isovalérico, acetato de etilo y ácido acético (De Roos and De Vyust, 2018; Witrick *et al.*, 2020). Otra característica de las levaduras *Brettanomyces* se refiere a su capacidad de bajar el pH del mosto. En ese sentido, el estudio realizado por Galafassi *et al.*, (2011) resaltan las características de 2 levaduras no convencionales del género *Brettanomyces* en la elaboración de cerveza, las cuales fueron sometidas a las mismas condiciones de oxígeno limitado y pH que decreció de 4,5 al inicio del cultivo a 2,5 al final del proceso en producción de etanol. Por un lado, *Dekkera bruxellensis*, obtuvo un buen rendimiento de etanol, junto con producir glicerol y bajos niveles de ácido acético. Por otro lado, *Brettanomyces naardenensis*, produjo menor rendimiento de etanol, pero una mayor producción de glicerol y ácido acético que la levadura *Dekkera bruxellensis*. Otro reporte importante es el de Colomer *et al.*, (2020b), en éste exhiben el potencial cervecero de distintas cepas de la levadura *Brettanomyces* en mosto de cerveza Pilsner. La fermentación primaria duró 7 días, donde el contenido de ácido acético y de etanol que produjeron varía de 5 a 20 [g/L] y 0,5 a 2,5 [% v/v], respectivamente. Asimismo, las levaduras de fermentación espontánea usualmente usadas para la elaboración de cervezas *Lambic* y/o *Farmhouse* arrojaron los niveles más altos de alcoholes superiores, como Isobutanol, 2-feniletanol y alcohol isoamílico. Por último, las cepas cerveceras belgas CRL-21 y CRL-25 produjeron una elevada cantidad de acetato de isoamilo y acetato de etilo, 26 [mg/L] y 170 [mg/L], respectivamente. Lo que concierne a los niveles de diacetilo en la cerveza, en la mayoría de las cepas analizadas en este estudio, los resultados fueron sobre 0,05 [mg/L] excepto en la levadura *B. naardensis*. Dejando en evidencia el potencial cervecero de esta levadura para obtener cervezas tradicionales y cervezas especiales con un perfil organoléptico particular.

De acuerdo, a lo antes expuesto, a la creciente búsqueda de innovación de cervezas y el alza en el mercado de la cerveza artesanal mundial.

3.1 Objetivo general

Analizar el efecto del uso de levaduras del género *Brettanomyces* sobre características químicas y sensoriales en la elaboración de cerveza.

4 MATERIALES Y MÉTODOS

Para llevar a cabo esta Memoria de Título se consultó diversas fuentes de información científica. Dentro del material bibliográfico utilizado se encuentran revistas científicas, libros y tesis disponibles mayormente en internet. Entre las bases de datos consultadas para la recopilación de información se encuentran Science Direct, Wiley Online Library, Science Direct y Scopus.

La información necesaria para la realización del presente estudio se obtuvo de diversas fuentes bibliográficas mencionadas a continuación:

- Artículos de revistas tales como FEMS Yeast Research, Fermentation, Yeast, Microorganism, Food Microbiology, entre otras.
- Memorias de título y tesis de postgrado de distintas universidades nacionales e internacionales.
- Libros de literatura científica cervecera tales como “Brewing Yeast and Fermentation”, “Yeast: The practical guide to beer fermentation” y “Biochemistry of Beer Fermentation”.

En primera instancia se realizó la búsqueda de información alusiva al uso de levaduras tradicionales en cervecería, utilizando palabras claves como “beer fermentation”, “fermentation performance” y “brewing yeast requirements”. En segundo lugar, se investigó respecto al aislamiento e identificación de levaduras en ambientes naturales, a través del uso de términos como “wild yeast”, “yeast isolation”, “*Brettanomyces* fermentation” y “Lambic”. Luego, se investigó acerca del uso de levaduras no convencionales, específicamente de levaduras *Brettanomyces* en la elaboración de cerveza por medio de los términos “Non-conventional yeast in brewing”, “wild yeast brewing” y “*Brettanomyces* in brewing”. Para finalizar con la selección de documentos alusivos a características químicas y sensoriales de la levadura *Brettanomyces* en la elaboración de cervezas. Los resultados contemplados fueron restringidos a publicaciones que datan del año 2000 hasta la actualidad.

Posteriormente a la revisión y análisis de la información obtenida, se incluyeron los siguientes tópicos en esta revisión bibliográfica:

1. Género *Brettanomyces*, características generales
2. Factores del mosto de cebada malteada que afectan la actividad de *Brettanomyces* en la fermentación alcohólica durante el proceso de elaboración de cerveza
3. Actividad de la enzima β -glucosidasa de las levaduras *Brettanomyces* implicadas en la elaboración de cerveza
4. Compuestos volátiles
5. Levaduras *Brettanomyces* y su influencia en las cervezas *Lambic*

5 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Género *Brettanomyces*, características generales

En el año 1933, desde un vino francés se aisló la levadura *Mycotorulum* que en ese tiempo nombraron como *Brettanomyces intermedius* (van der Walt y van Kerken, 1959, citado por Schifferdecker *et al.*, 2014). Luego, en los años 60 la literatura informó que *B. bruxellensis* produce ascosporas. Esto llevo a reclasificar el género *Brettanomyces* y por ende se propuso un nuevo género llamado *Dekkera* para las formas ascosporógenas de este microorganismo, atribuyéndole su nombre en honor a Nellie Margaretha Stelling-Dekker y su contribución a la taxonomía de levaduras ascosporógenas (van der Walt and van Kerken, 1960, van der Walt, 1964, citado por Schifferdecker *et al.*, 2014). De igual forma, Piškur *et al.* (2012) determinaron la secuencia del genoma completo de la cepa Y879 (CBS2499) (Figura 1) y la han usado para inferir características importantes para la alimentación de esta levadura.



Figura 1 *Dekkera bruxellensis* Y879 (CBS 2499) (Schifferdecker *et al.*, 2014)

Hoy en día, existen 6 especies reconocidas dentro del género *Brettanomyces*, dividiéndose según su tipo de reproducción (Péter *et al.*, 2017). Por un lado, en su forma anamórfica (reproducción asexual) se encuentran las especies *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. custersianus*, *B. naardenensis*, *B. nanus* y la especie recientemente propuesta, *B. acidodurans*. Por otro lado, la forma teleomórfica (reproducción sexual) en donde existen dos levaduras de este género, *Dekkera bruxellensis* y *Dekkera anómala* (Péter *et al.*, 2017).

Además, este género ha ganado espacio en la industria cervecera debido a sus múltiples características, fisiológicas, tales como su potencial para producir y tolerar etanol, tolerancia a pH bajo, tolerancia a bajas concentraciones de oxígeno, la absorción de nitratos y la producción de aromas que aumentan la complejidad del producto final. La levadura *Brettanomyces* produce a nivel aromático compuestos fenólicos, ésteres de etilo y ácidos grasos, entregando a la cerveza una percepción sensorial relacionados con descriptores aromáticos tales como clavo, cuero húmedo, frutas tropicales y/o especias. A su vez, esta levadura es capaz de producir niveles considerables de ácido acético (Ver apartado 4.2.4) contribuyendo activamente a la acidez total en las fermentaciones en condiciones aeróbicas, llegando a comprometer su propia supervivencia (Barata *et al.*, 2008; Steensels and Verstrepen, 2014; Moktaduzzaman *et al.*, 2016; Colomer *et al.*, 2019). Junto a esto, es importante considerar la tasa de inoculación de levaduras para la elaboración de cervezas. En el caso de las levaduras *Brettanomyces* la tasa inoculación de células utilizada en la fermentación del mosto cervecero, es de 2×10^5 células/mL. Recalcando, que si la cerveza será fermentada en barrica se debe utilizar la tasa de inoculación anterior al doble para que la levadura pueda establecerse de mejor forma. Lo que en comparación con la tasa de inoculación de las cepas de levadura *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* es mucho más baja, ya que estas levaduras ocupan aproximadamente $0,75 \times 10^6$ células/mL y $1,5 \times 10^6$ células/mL respectivamente (White and Zainasheff, 2010).

Las levaduras *Saccharomyces* y *Brettanomyces* tienen en común un fenotipo llamado efecto crabtree. Este efecto, se da en condiciones aeróbicas, permitiendo a la levadura reprimir el proceso de respiración celular en presencia de una fuente de carbono fermentable en concentraciones mayores a 0,3%. Es decir, permite que la levadura asimile rápidamente la glucosa y genere etanol, inhibiendo así la propagación de otros tipos de microorganismos (Menoncin and Bonatto, 2019). Sin embargo, una diferencia entre las levaduras *Brettanomyces* y las levaduras *Saccharomyces* es el efecto Custer o “Pasteur negativo”, el cual consiste en la capacidad por parte de la levadura para realizar la fermentación en presencia de oxígeno, existiendo distintos niveles de tolerancia al oxígeno en la fermentación alcohólica por parte de las levaduras. Lo que en el caso de las levaduras *Brettanomyces* es una característica benéfica para lograr diferentes perfiles organolépticos en la cerveza final (Figura 5). Específicamente, las levaduras *Brettanomyces* y *Dekkera spp.* fermentan azúcares a etanol más rápido en condiciones aeróbicas que en anaeróbicas, obteniendo una buena producción de biomasa, un consumo total de los azúcares disponibles y alta producción de ácido acético (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003; Barnett and Entian, 2005; Colomer *et al.*, 2019).

Otro aspecto relevante, es la capacidad de metabolizar otros tipos de azúcares fermentables que pueden encontrar en el mosto cervecero, como celobiosa y dextrinas, aparte de poder metabolizar maltosas y glucosa (Colomer *et al.*, 2019). Esta cualidad es muy útil, debido

que esta levadura tiene una mayor capacidad de sobrevivir a ambientes hostiles en donde no se encuentren azúcares fermentables tradicionales (maltosas, glucosa, entre otras). Incluso, se pueden utilizar barricas para la fermentación de mosto cervecero con levaduras *Brettanomyces* junto a cualquier tipo de fermentación de los mencionado anteriormente.

En este mismo contexto, las levaduras convencionales no pueden asimilar el nitrato del mosto cervecero, nitrato que proviene del lúpulo en la cocción y en *Dry Hopping*. Esta acción tiene un impacto positivo para la industria cervecera porque las levaduras del género *Brettanomyces*, tienen la capacidad de sobrevivir a ambientes pobres en nitrógeno asimilando el nitrato del medio (Woolfit *et al.*, 2007). Además, las levaduras *Brettanomyces* presentan una temperatura óptima de fermentación entre 21° y 25°C, similar a las levaduras *S. cerevisiae* (Colomer *et al.*, 2019).

Las levaduras *Brettanomyces* en el proceso fermentativo no solo generan etanol, sino que también tienen la capacidad de producir ácido acético (Galafassi *et al.*, 2011). Dicha producción de ácido acético está estrictamente relacionada con el contenido de oxígeno que esté presente en la fermentación. Por ejemplo, con un flujo de aire de 120 L/h se puede obtener un rendimiento de 5 g/L de ácido acético, rendimiento que puede aumentar o disminuir, dependiendo del flujo de aire en la fermentación (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003). La producción de ácido acético, por parte de las levaduras *Brettanomyces*, es una característica fermentativa importante, principalmente en dos aspectos. Por un lado, relevante para la preservación de cervezas tradicionales como las *Lambic*. Por otro lado, para la innovación cervecera. Además, las levaduras *Brettanomyces* le entregan al producto final compuestos aromáticos como ésteres y compuestos fenólicos, lo que se traduce a un perfil organoléptico que se percibe con descriptores aromáticos a plátano, licoroso, medicinal y afrutado (Witrick *et al.*, 2020).

Por lo tanto, se puede señalar que las levaduras *Brettanomyces* están siendo protagonistas en la elaboración de nuevas cervezas a causa de sus características particulares como la asimilación de otras fuentes de carbono, nitratos y por sobre todo la producción de aromas característicos que hacen de la cerveza un producto particular.

5.2 Factores del mosto de cebada malteada que afectan la actividad de las levaduras *Brettanomyces* en la fermentación alcohólica durante el proceso de elaboración de cerveza

5.2.1 Azúcares fermentables

El mosto cervecero, a base de cebada malteada, proporciona distintos azúcares y variadas concentraciones. Este mosto está compuesto principalmente por maltosa, la cual representa un (50-60%) de los azúcares totales. Luego en mayor proporción se encuentra la maltotriosa y las dextrinas con aproximadamente un (15-20%) y (20-30%) respectivamente. La glucosa se encuentra en menor proporción con un (10-15%), la fructosa (1-2%) y la sacarosa (1-2%) de los azúcares totales (Budroni *et al.*, 2016).

Las levaduras tradicionales, *S. cerevisiae* o *S. pastorianus*, metabolizan azúcares obteniendo etanol. Estas levaduras en la fermentación alcohólica (primaria) parten metabolizando los azúcares de cadena más corta, tales como glucosa y fructosa. Luego continúan con los azúcares de cadena más larga como maltosa y maltotriosa (White and Zainasheff, 2010).

En el caso, de la levadura *Brettanomyces*, además de metabolizar glucosa, y el resto de los azúcares fermentables por las levaduras *Saccharomyces*, tiene la ventaja de metabolizar azúcares de cadena más larga, como dextrinas y celubiosa (Colomer *et al.*, 2019). Esta característica hace a esta levadura destacarse, siendo de gran utilidad para la industria cervecera. Es decir, aumenta el abanico de cepas de levaduras cerveceras a utilizar y, también, abre las alternativas para elaborar cervezas con menor contenido de azúcares residuales y de mayor grado alcohólico (Menoncin and Bonatto, 2019).

5.2.2 Nitrógeno fácilmente utilizable por las levaduras

El Nitrógeno fácilmente utilizable (sigla FAN en inglés), incluye aminoácidos, iones amonio y pequeños péptidos, garantizando un desarrollo eficiente de las células y, por ende, un rendimiento adecuado de la fermentación (Lekkas *et al.*, 2007).

Un compuesto relevante para la elaboración de cervezas sour o agrías es la concentración de nitrato disponible en el mosto cervecero, el cual tiene límites en su concentración máxima en el agua y alimentos. La Unión Europea (UE), determinó el límite máximo en 50 mg/L de nitrato en el agua. Con respecto a la cerveza, el contenido de nitratos en el mosto aumenta en primera instancia en el proceso de cocción, cuando se añade el lúpulo, ingrediente esencial de esta bebida alcohólica que principalmente proporciona notas de amargor y aromas. Luego, el segundo aumento del nivel de nitratos en la cerveza se produce en el proceso de maduración. Esto se podría deber a la adición de lúpulos en seco en maduración (*Dry hopping*), para proporcionar aroma a la cerveza (Anderson *et al.*, 2004; Kippenberger *et al.*, 2014 citado por Colomer *et al.*, 2020a).

En este mismo contexto, Woolfit *et al.*, (2007) reportaron que la asimilación de nitrato por la levadura *D. bruxellensis* puede seguir la vía descrita para los hongos filamentosos. En primer lugar, el nitrato entra a la célula mediante un transportador de nitrato, que posteriormente se convierte en amonio por medio de dos reducciones catalizadas por las enzimas nitrato reductasa y nitrito reductasa (Siverio 2002). Este proceso metabólico no lo poseen las levaduras del tipo *Saccharomyces*, por ende, solo pueden asimilar amonio.

En adición a este tema, Galafassi *et al.*, (2013) reportaron cómo se comporta el metabolismo del nitrato de la levadura *D. bruxellensis* en condiciones aeróbicas y anaeróbicas. Por una parte, *D. bruxellensis* se cultivó en un medio aeróbico y con nitrato de sodio como única fuente nitrogenada. Este tratamiento provocó una tasa de crecimiento similar de la levadura *Brettanomyces* en un medio aeróbico y con amonio como fuente nitrogenada. Con respecto al producto final de la fermentación de glucosa en el medio aeróbico con nitrato, se produjo más ácido acético en lugar de etanol en comparación con el medio aeróbico con amonio, el cual que tiene una mayor tasa de producción de etanol (Tabla 1).

Tabla 1. Parámetros de crecimiento durante la fermentación aeróbica por parte de la levadura *D. bruxellensis* en medios compuestos de amonio, nitrato y una mezcla de amonio con nitrato como fuente nitrogenada (Galafassi *et al.*, 2013)

	Amonio	Nitrato	Mezcla
Tasa de crecimiento h^{-1}	0.11-0.12	0.092±0.006	0.0077±0.004
Q(mM g peso seco h^{-1})			
Glucosa	3.6-3.7	2.94±0.5	2.42±0.28
Etanol	3.9-4.4	1.65±0.007	1.30±0.09
Acetato	0.62-0.70	1.83±0.009	1.59±0.10
Y(g g ⁻¹ glucosa)			
Biomasa	0.17-0.18	0.19±0.004	0.23±0.008
Etanol	0.320-0.335	0.133±0.006	0.138±0.006
Acetato	0.058-0.060	0.216±0.006	0.166±0.011

Tabla 2. Parámetros de crecimiento durante la fermentación anaeróbica por parte de levadura *D. bruxellensis* en medios compuestos por amonio y una mezcla de amonio con nitrato como fuente nitrogenada (Galafassi *et al.*, 2013)

	Amonio con casaminoácidos	Amonio y Nitrato sin casaminoácidos
Tasa de crecimiento h^{-1}	0.007-0.075	0.084±0.006
Q (mM g <i>peso seco</i> h^{-1})		
Glucosa	1.47-1.60	4.08±0.26
Etanol	1.74-1.90	5.98±0.42
Acetato	0.02-0.02	0.43±0.02
Nitrato	-	0.46±0.02
Y (g g^{-1} <i>glucosa</i>)		
Biomasa	0.132-0.150	0.10±0.005
Etanol	0.34-0.35	0.35±0.021
Acetato	0	0.033±0.001

Por otra parte, *D. bruxellensis* se cultivó en condiciones anaeróbicas con una mezcla de amonio y nitrato como fuente nitrogenada. En este medio, las células de la levadura *D. bruxellensis* crecieron a una tasa similar a la observada en condiciones aeróbicas (Tabla 1). Se presentó una diferencia en la producción de etanol, debido que al tener como fuente nitrogenada nitrato, se produjo etanol como producto principal, junto con la producción de ácido acético (Tabla 2). Por lo tanto, todos estos datos demuestran que la asimilación de nitrato mejora la capacidad de la levadura *D. bruxellensis* para su desarrollo en un medio anaeróbico.

5.2.3 Temperatura

En el proceso productivo de la elaboración de la cerveza, la temperatura cumple un rol fundamental para obtener una cerveza de alta calidad. Es decir, si se tiene un problema en el proceso cervecero, en primer lugar, el problema puede ser por contaminación microbiana y, en segundo lugar, el problema puede ser la temperatura, la cual no fue la adecuada para alguna etapa de la fermentación y/o maduración (White and Zainasheff, 2010).

La floculación, es un mecanismo de defensa de las levaduras frente al entorno hostil que se genera en la fermentación alcohólica. Este proceso consta en la agrupación de las levaduras, es decir, es un proceso reversible y asexual por el cual las levaduras se adhieren entre sí formando flóculos. Según la cepa de levadura, esta agrupación puede llevarse a cabo en la parte superior o en la parte inferior del fermentador (Ale o Lager). Para la industria cervecera, la floculación es utilizada para separar la levadura de la cerveza luego del proceso de fermentación. Al carecer de esta característica, las levaduras quedarían como partículas no deseadas en suspensión. Por lo tanto, una vez en terminada la fermentación, en promedio quedan $10 - 15 \times 10^6$ levaduras/mL para la maduración de la cerveza (Pires and Brányik, 2015; Li *et al.*, 2017). Existen diversos estudios que reportan que la floculación depende de la cepa de levadura. Por una parte, Jin and Speers (2000) descubrieron que la floculación de la cepa *S. pastorianus* LCC125 variaba 24,1% a 5°C y 66,8% a 25°C, siendo el factor temperatura clave. Por otra parte, también se reportó que, si se somete a las levaduras *S. cerevisiae* a 37°C por 24 horas o a un choque térmico de 52°C por 5 minutos seguido de un enfriamiento rápido e incubación a 25°C, se produce floculación de las levaduras (Claro *et al.*, 2007). También, se informó que la floculación se reprime a 25°C y las células sedimentan mejor a una temperatura de 5°C (Stratford 1992 citado por Verstrepen *et al.*, 2003).

Al analizar las características fisiológicas de la levadura *Brettanomyces*, ésta no posee la capacidad de flocular. Por tanto, afecta a la introducción y distribución del género *Brettanomyces* en la industria cervecera, pero sigue siendo una buena alternativa debido a sus otras características fisiológicas mencionadas anteriormente (Colomer *et al.*, 2019).

Sin embargo, la temperatura, no solo afecta a la floculación de las levaduras, sino que también afecta a la formación de biomasa y crecimiento de las estas. De esta manera, Brandam *et al.*, (2008) reportan la reacción de la levadura *B. bruxellensis* sometida a 5 temperaturas diferentes en fermentación alcohólica (Figura 1A y 1B, Figura 2, Figura 3A y 3B). En la figura 1A, se expone la evolución de la biomasa (g/L) en función de las 6 temperaturas de fermentación diferentes (15°C, 20°C, 25°C, 30°C, 32°C y 35°C). Generalmente, el máximo de biomasa al final de la fermentación fue de 5,6 g/L a excepción de la fermentación que se llevó a cabo a 35°C. La biomasa se visualizó fuertemente

afectada alcanzando un máximo de solo 2 g/L de biomasa al final de la fermentación. Es decir, se evidenció una disminución de un 65% con respecto a las otras temperaturas. Junto a esto, comparando las temperaturas de fermentación, se analiza que la concentración de biomasa máxima a 15°C se produjo luego de 220 horas, mientras, que a 32°C se produjo la misma concentración de biomasa luego de 50 horas. Por lo tanto, se concluye que a mayor temperatura de fermentación más rápida es la producción de biomasa, hasta un límite de 35°C en este caso. No obstante, a una temperatura de 15°C se mantiene un aumento de biomasa más paulatino en el tiempo.

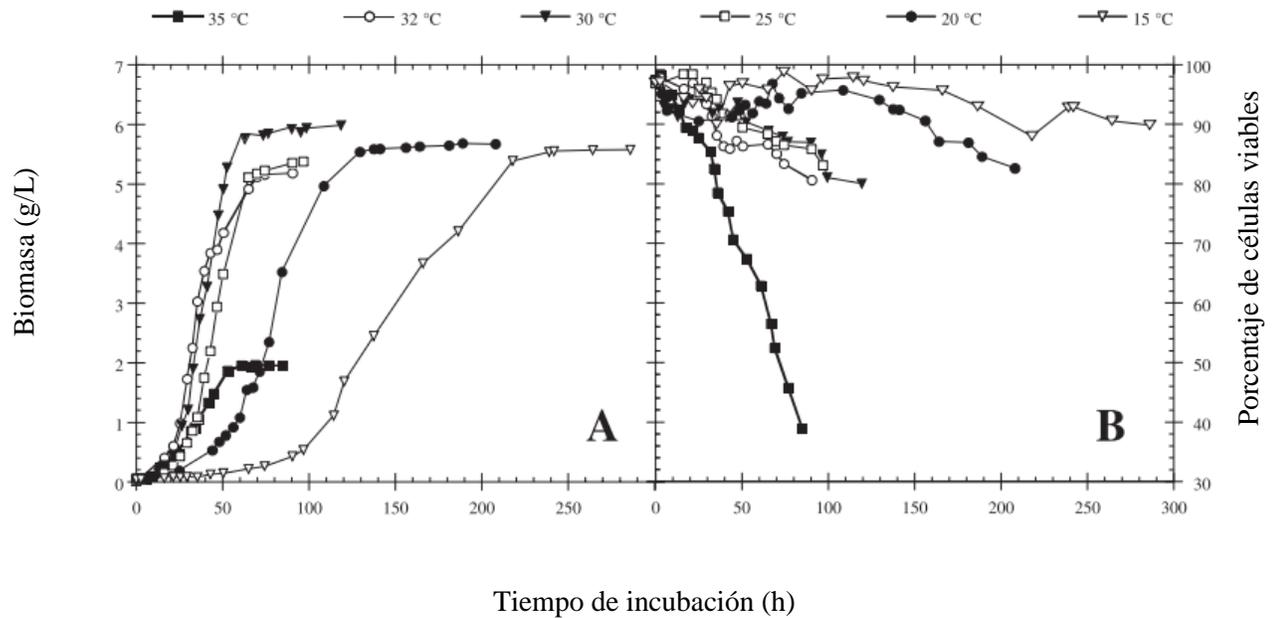


Figura 1. Efecto de la temperatura en la biomasa (A) y en el porcentaje de células viables (B) en la fermentación (Brandam *et al.*, 2008)

En la figura 1B, se expone el efecto de la temperatura sobre la viabilidad celular (%) de *B. bruxellensis*. En primer lugar, a 15°C se obtuvo el mejor porcentaje de viabilidad celular (90% ≤), el cual se mantuvo constante durante toda la fermentación. En segundo lugar, el rango entre 20 - 32°C se mantuvo con una viabilidad celular de un 86% en promedio hasta el final de la fermentación. En último lugar, la fermentación a una temperatura de 35°C obtuvo una muy baja viabilidad celular (≤ 40%). Es decir, que una temperatura de fermentación de 35°C afecta negativamente no solo a la producción de biomasa, sino que también a la viabilidad celular para llevar a cabo a la fermentación.

De la misma forma, y no menos importante, es la evolución de la tasa de crecimiento microbiano específica durante la fermentación (Figura 2). Esta tasa fue mayor a 0 desde el inicio de la fermentación. No hubo fase de retardo en ninguna de las 6 temperaturas analizadas. La menor tasa de crecimiento de las levaduras fue en la fermentación conducida a una temperatura de 15°C y la máxima tasa de crecimiento se obtuvo a 32°C. La diferencia fue que el aumento y disminución de la tasa de crecimiento para la fermentación a 15°C fue más paulatina en el tiempo, llegando a su máximo en 50 horas con un valor de 0,04 (1/h) y a 0 (1/h) luego de 250 horas aproximadamente. En cambio, la fermentación a 32°C tuvo un aumento y disminución de la tasa de crecimiento de las levaduras mucho más acelerada, alcanzando su máximo aproximadamente 10 horas después de comenzada la fermentación, consiguiendo una tasa de crecimiento de 0,18 (1/h), retornando a un valor de 0 (1/h) luego de 60 horas aproximadamente.

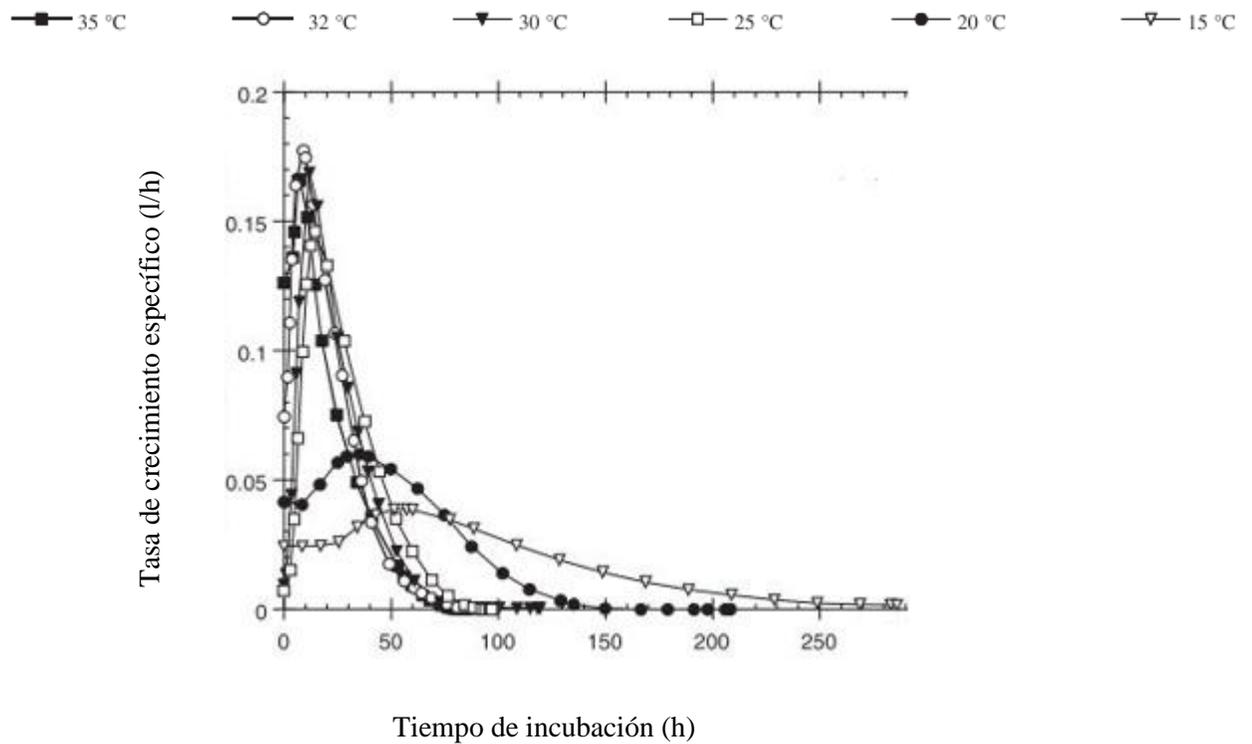


Figura 2. Efecto de la temperatura en la tasa de crecimiento específico durante la fermentación (Brandam *et al.*, 2008).

La evolución de las concentraciones de etanol (g/L) y ácido acético (g/L), productos principales que genera la levadura *B. Bruxellensis* se muestran la figura 3A y 3B. Por un lado, con relación a la concentración de etanol producida por temperaturas de fermentación entre 15°C y 32°C solo hubo concentraciones de etanol entre 16 y 18 g/L. Sin embargo, a 35°C la fermentación presentó problemas y se generó paradas de fermentación, produciendo solo 5,5 g/L de etanol. Por otro lado, se obtuvo un patrón similar en la producción de ácido acético en temperaturas de fermentación. Entre 15°C y 32°C, las tasas de producción de ácido acético difieren solo un poco, con valores de 3,4 y 4 g/L, respectivamente. Ahora bien, a 35°C solo se obtuvo 0,58 g/L de etanol, evidenciándose muerte celular (Figura 3B).

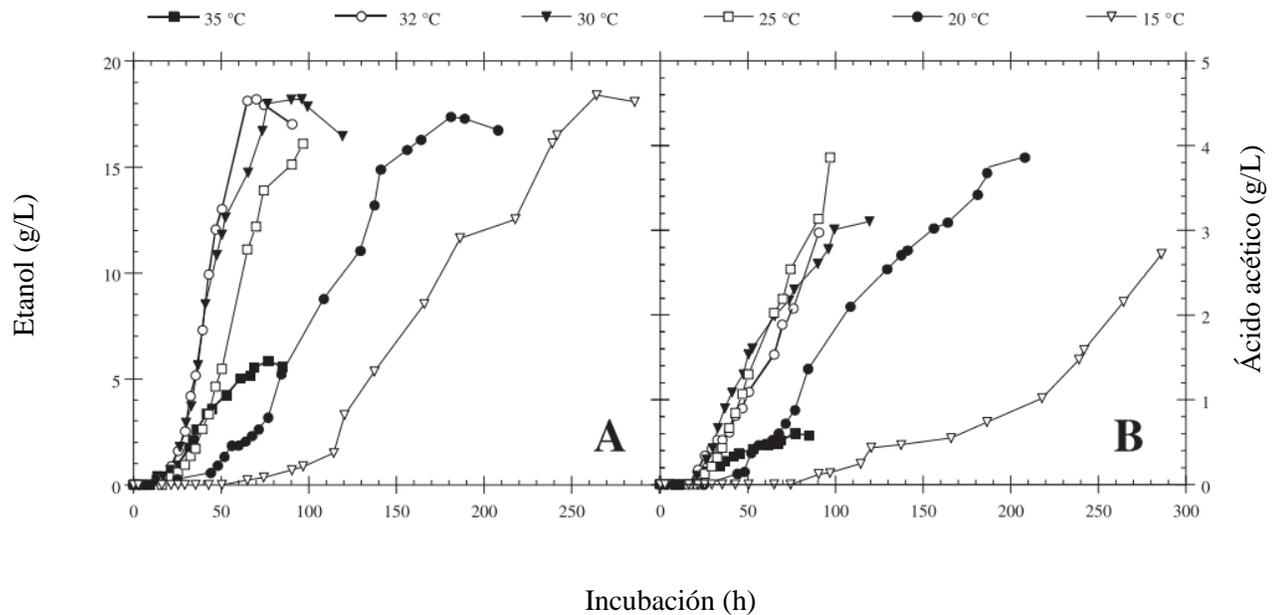


Figura 3. Efecto de la temperatura en la producción de etanol (A) y ácido acético (B) durante la fermentación (Brandam *et al.*, 2008).

Finalmente, es fundamental conocer la temperatura de fermentación de la levadura a utilizar para elaborar cervezas. Por lo tanto, al elaborar cervezas con levaduras *Brettanomyces*, es necesario utilizar temperaturas de fermentación entre 15°C y 32°C, y con un rango óptimo entre 20°C y 25°C, vital para lograr el perfil organoléptico deseado. (Colomer *et al.*, 2019).

5.2.4 pH

El pH es un factor significativo en la fermentación, dado que su función es ejercer control frente a la contaminación microbiana, el crecimiento de las levaduras y la producción de alcohol (Suarez, 2013). Además, al igual que la temperatura, el pH cumple un rol fundamental en la floculación de las levaduras cerveceras tradicionales (*Saccharomyces*). En este escenario la floculación se lleva a cabo a un pH entre 1,5 y 9, siendo un pH 4,5 el óptimo. Aunque la levadura *Brettanomyces* tenga una baja capacidad de floculación, de igual manera se produce una floculación estable a un pH entre 3,0 y 6,0. Rango en el cual se encuentra el pH de floculación de cervezas sour o ácidas que oscilan entre pH 3 y 3,9 (Tonsmeire et al., 2011; Li et al, 2017).

Además de producir etanol, la levadura *Brettanomyces* también es capaz de producir ácido acético (Colomer et al., 2019). Por lo que cabe destacar los resultados del estudio de Galafassi et al., (2011), los cuales determinaron la capacidad de producir etanol y ácido acético de las cepas *D. bruxellensis* CBS 2499, *D. bruxellensis* CBS 2796 y *B. naardenensis* CBS 7540 (Tabla 3). Las 2 cepas se cultivaron a un pH no controlado, el cual disminuyó de un valor inicial 4,5 a 2,5 al final de la fermentación.

Destacando entre los resultados, que ambas cepas metabolizaron la glucosa principalmente a etanol, con altos rendimientos (Tabla 3). Solo se visualizan diferencias en la tasa de producción de etanol. En el caso la concentración de ácido acético y glicerol. *D. bruxellensis* tuvo un bajo rendimiento en comparación con *B. naardensis* (Tabla 3). Por lo que se concluye que para elaborar cervezas más ácidas se podría utilizar *B. naardensis*. Ya que la tasa de producción de ácido acético duplica a la tasa de *D. bruxellensis*. Además, generalmente estas cervezas más ácidas se utilizan para hacer mezclas de cervezas, denominadas *blend*, pues bajan el pH de otras cervezas (Tonsmeire, 2014).

Tabla 3. Parámetros de reproducción de *D. bruxellensis* CBS 2499, *D. bruxellensis* CBS 2796 y *B. naardenensis* CBS 7540 en condiciones de oxígeno limitado (Galafassi *et al.*, (2011)).

	<i>D. bruxellensis</i>		<i>B. naardenensis</i>
	CBS 2499	CBS 2796	CBS 7540
Tasa de crecimiento específico (h^{-1})	0.083±0.006	0.11±0.01	0.042±0.005
Rendimiento ($mg\ g^{-1}\ glucosa$)			
Biomasa	73±4	80±3	89±7
Etanol	440±30	430±25	360±60
Glicerol	7.8±0.7	5.2±0.6	36±3
Ácido acético	1.3±0.2	1.4±0.2	4.3±0.2
Tasas de producción ($mmol\ g^{-1}\ h^{-1}$)			
Etanol	2.83±0.03	5.3±0.3	3.07±0.15
Glicerol	0.022±0.002	0.01±0.006	0.25±0.02
Ácido acético	0.025±0.002	0.021±0.001	0.047±0.005
Tasa de consumo de glucosa ($mmol\ g^{-1}\ celulas\ h^{-1}$)	2.5±0.18	3.99±0.32	2.99±0.24

Con respecto a las cepas de levaduras *Brettanomyces* usadas en el estudio mencionado anteriormente, Rospedowska *et al.*, (2011) comparó estas 2 cepas en su estudio y obtuvo resultados muy diferentes. *D. bruxellensis* pudo crecer en medios aeróbicos y anaeróbicos (Tabla 4), clasificándola como una levadura anaeróbica facultativa con Crabtree positivo. En cambio, a *B. naardenensis* se le posiciona como una levadura aeróbica con Crabtree negativo. En definitiva, con los antecedentes mostrados determinan que la levadura *D. bruxellensis* presenta una mejor capacidad para producir alcohol en un medio anaeróbico y ácido acético en un medio aeróbico (Tabla 4).

Tabla 4. Parámetros de crecimiento de *D. bruxellensis* y *B. naardenensis* (Rospedowska *et al.*, 2011).

Condiciones de Crecimiento	<i>D.bruxellensis</i>			<i>B. naardenensis</i>
	Aerobiosis		Anaerobiosis	Aerobiosis
	Glucosa 20 gL ⁻¹	Glucosa 20 gL ⁻¹	Glucosa 7 gL ⁻¹	Glucosa 20 gL ⁻¹
Tasa específica de crecimiento	0,119-0,122	0,110-0,115	0,070-0,075	0,34-0,36
Rendimiento (g por g glucosa)				
Biomasa	0,176-0,182	0,260-0,265	0,132-0,150	0,45-0,48
Etanol	0,32-0,335	0,23-0,24	0,34-0,35	0
Glicerol	0	0	0,007-0,007	0
Ácido acético	0,058-0,06	0,09-0,10	0	0
Q (mmol g por g peso seco por h)				
Biomasa	3,6-3,7	2,5-2,64	1,47-1,6	5,4-5,5
Etanol	3,9-4,4	2,2-2,39	1,74-1,9	0
Glicerol	0	0	0,02-0,02	0
Ácido acético	0,62-0,7	0,62-0,69	0	0

5.2.5 Oxígeno disuelto en el mosto cervecero

Este factor es igual o más importante que los otros en la fermentación alcohólica, debido a que las levaduras necesitan oxígeno durante la fase de latencia para producir esteroides. Estos compuestos son fundamentales para la permeabilidad de la membrana de la levadura. No obstante, el uso excesivo de oxígeno puede dar lugar a niveles elevados de alcoholes superiores, acetaldehído y otros problemas organolépticos. Generalmente para la fermentación de cervezas con levaduras cerveceras tradicionales (*Saccharomyces*) se utiliza aproximadamente entre 8 a 10 ppm (White and Zainasheff, 2010).

En el caso de la levadura *Brettanomyces*, el oxígeno desempeña un papel importante en el desarrollo y la producción de compuestos como el ácido acético y el etanol (White and Zainasheff, 2010). Es así, como en una fermentación secuencial, con levaduras *Brettanomyces* el oxígeno puede asegurar con éxito el término de la fermentación de la levadura *Saccharomyces* y un rol clave en el en la propagación de la levadura *Brettanomyces* (Capece *et al.*, 2018).

Por otra parte, Aguilar Uscanga *et al.*, (2003) mencionan el efecto de distintas tasas de aireación en la producción de etanol y ácido acético por parte de la levadura *Brettanomyces* (Figura 4 y 5). Las distintas tasas de aireación tienen una gran incidencia en la relación ácido acético/etanol. Relación que si es elevada se debe a que el oxígeno estuvo presente en la fermentación alcohólica.

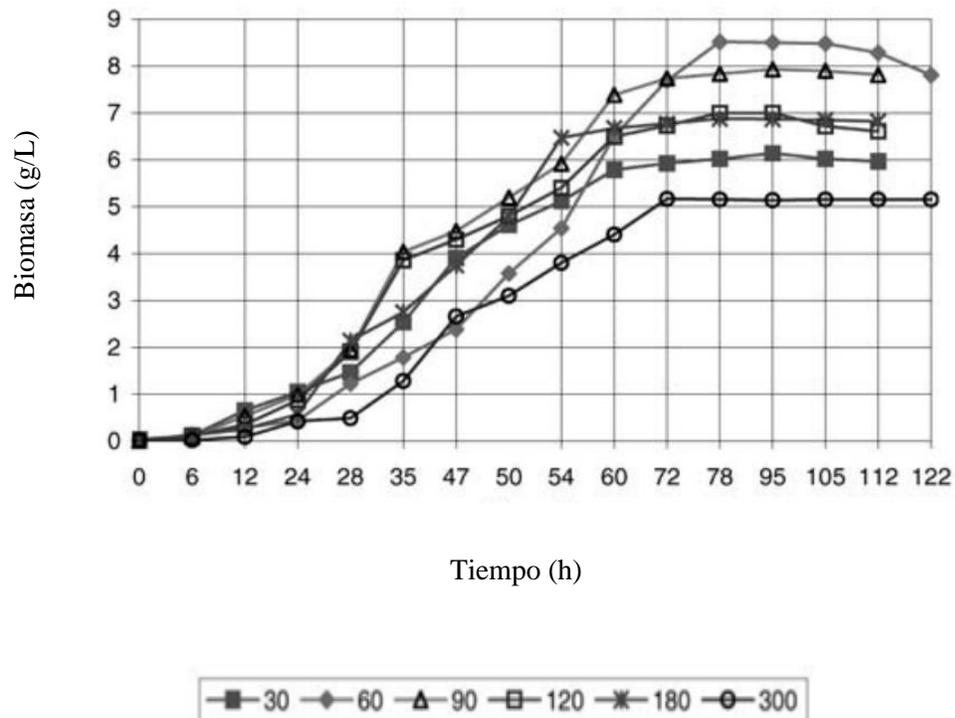


Figura 4. Efecto de los caudales de aire (l/h) en la producción de biomasa de la levadura *B. bruxellensis* (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003)

Por un lado, en la figura 4 se muestra el efecto de 6 distintas condiciones de aireación en la producción de biomasa de levaduras *Brettanomyces*. En este sentido, el mejor resultado se da a una aireación de 60 L/h, dando como resultado 8,5 g/L de concentración de biomasa, siendo este el valor máximo. Sobre 60 L/h de oxígeno, la concentración de biomasa comienza a disminuir llegando a obtener 5 g/L como mínimo a una condición de 300 L/h de oxígeno. Además, a una aireación de 30 L/h solo se obtuvieron 6 g/L. Por otro lado, en la figura 5 se visualiza la producción de etanol y ácido acético, junto al consumo de glucosa para todos los niveles de aireación. En efecto, en el intervalo de aireación entre 0 a 120 L/h se consumió todo el sustrato, por parte de la levadura *B. bruxellensis*. Sobre ese rango no se consume todo el sustrato, destacando que a la máxima condición de aireación de (300 L/h), se consumió aproximadamente solo el 50% de la glucosa. Por consiguiente, la máxima concentración de ácido acético fue de 11 g/L aproximadamente, a una condición de 300 L/h de oxígeno, condición de aireación en la cual la producción de etanol es la menor de todas. Caso contrario, es la tasa de aireación de 0 L/h en donde se obtuvo la mayor producción etanol, pero una nula producción de ácido acético.

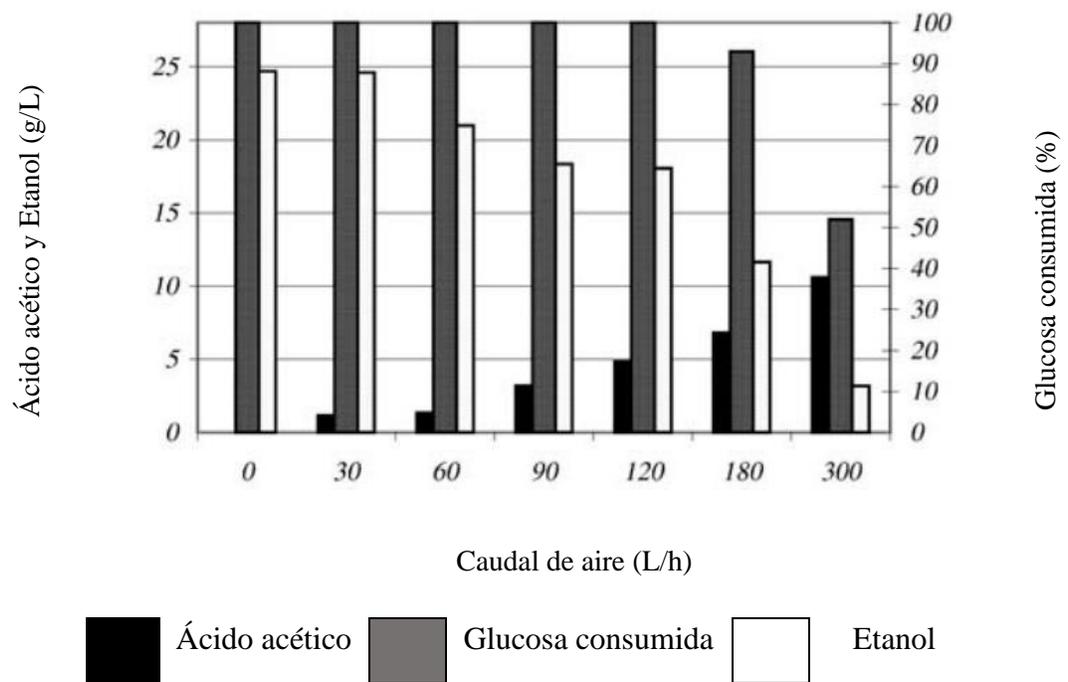


Figura 5. Efecto de las condiciones de aireación sobre la producción de ácido acético y, etanol, y el consumo de glucosa por *B. bruxellensis* al final de las fermentaciones (Aguilar Uscanga *et al.*, 2003).

Por lo tanto, al analizar estos resultados, se podría utilizar una condición de aireación entre 60 y 120 L/h para obtener una concentración de biomasa de 7 a 8,5 g/L de levaduras *Brettanomyces*, junto con una producción relevante de ácido acético 5 g/L y etanol 18 g/L para la elaboración de cervezas ácidas.

5.3 Actividad de la enzima β -glucosidasa de las levaduras *Brettanomyces* implicadas en la elaboración de cerveza

Para el proceso de elaboración cervecera, es fundamental la acción de diversas baterías enzimáticas. Por ejemplo, en la maceración del mosto específicamente, la enzima que principalmente ejerce acción es la α -glucosidasa. Esta enzima, hidroliza la amilosa y la amilopectina, rompiendo los enlaces α -1,4 glucosídico de la terminal no reductora, obteniéndose como producto una β -glucosa dejando azúcares fermentables para las levaduras, de cadenas más cortas como glucosa o maltosa (Li *et al.*, 2017).

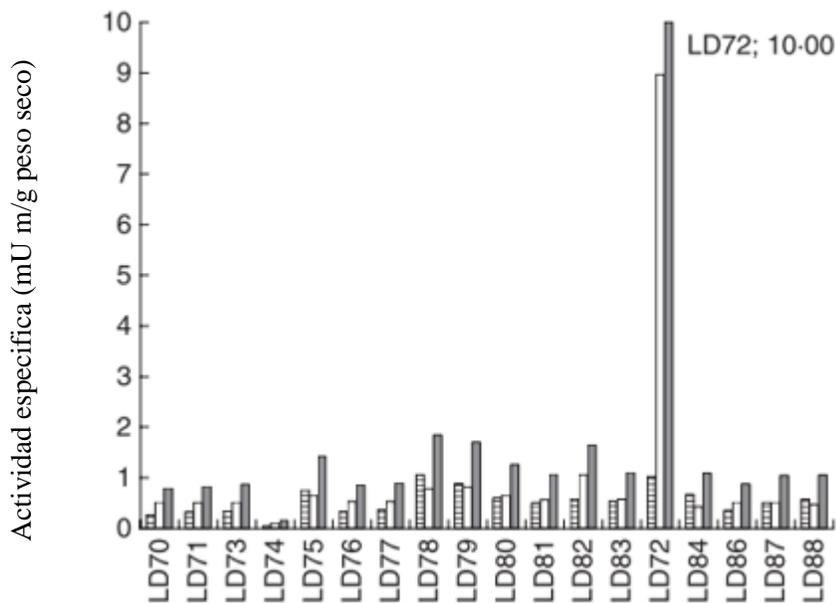
En el caso de las levaduras *Brettanomyces*, la gran mayoría de las cepas poseen actividad de la enzima β -glucosidasa, que ejerce la misma función que la otra enzima antes mencionada. Es decir, reducen el tamaño de la cadena de los azúcares. Pero a diferencia de la enzima α -glucosidasa, β -glucosidasa actúa en la fermentación alcohólica, rompiendo los enlaces β (1 \rightarrow 4) entre una molécula de glucosa y otra azúcar simple. Los ejemplos más relevantes son, la celobiosa, disacárido compuesto por dos moléculas de glucosa unidas por un enlace β . Este compuesto es constituyente de la madera, y, por ende, importante en la estructura de las barricas de roble. Al igual que la lactosa, disacárido compuesto por galactosa y glucosa unidas por un enlace β (Tonsmaire, 2014).

En general, las cepas de levadura *Brettanomyces* que producen β -glucosidasa también son capaces de hidrolizar los glucósidos que provienen de especias, flores, lúpulos y frutas usadas para la elaboración de la cerveza. Los glucósidos, son moléculas que constan de una glucosa unida a una aglicona (aromas no volátiles). Por lo tanto, al romper el enlace glucosídico se libera una azúcar más metabolizada junto a la aglicona, la cual expresa una actividad aromática, pudiendo potenciar o modificar el aroma del lúpulo (Tonsmaire, 2014; Crauwels *et al.*, 2015; Capece *et al.*, 2018).

Es necesario señalar que Daenen *et al.*, (2008a) evaluaron la actividad de la hidrolasa glucosídica en distintas cepas de levadura *Brettanomyces*. No obstante, primero realizaron una selección de levaduras, para posteriormente mediante una hidrólisis de un sustrato glucosídico (arbutina, 4-MUG, p-nitrofenil-b-D-glucopiranosido (pNPG), salicina y celobiosa) detectar la acción de la enzima. Esto se traduce en la formación de biomasa o la liberación de una aglicona rastreadable determinando la presencia de la actividad hacia los glucósidos (Figura 6).

Los resultados arrojaron las distintas capacidades de las distintas cepas de levaduras *Dekkera* y *Brettanomyces* para reproducirse. Por un lado, no mostraron crecimiento para ninguna cepa de levadura en medios de agar con arbutina (YNB-A) como única fuente de nitrógeno más citrato de amonio férrico. Sin embargo, al omitir el citrato de amonio férrico,

se produjo un crecimiento en algunas cepas (Tabla 5). Por otro lado, cultivos en extracto de levadura y peptona con arbutina (YP-A) más citrato de amonio férrico mostraron el crecimiento de algunas cepas de *Dekkera* y *Brettanomyces*. Además, al analizar el cultivo de levaduras en medio de extracto de levadura Peptona Dextrosa (YPD) con 4-umbeliferil- β -d-glucopiranosido (4-MUG), se evidenció un halo fluorescente en todas las cepas de levaduras *Brettanomyces*. Este halo varía según la cepa de levadura (Tabla 5). De igual forma, se confirmó el crecimiento de las levaduras *Brettanomyces* en celobiosa, debido a que probaron el crecimiento de las levaduras en salicina (YNB-S), específicamente las levaduras *B. intermedius* CMBS LD85, *B. custersii* CMBS LD72, *B. anomalus* CMBS LD84 y *D. anomala* CMBS LD88 (Tabla 5).



Cepas de levaduras *Dekkera* y *Brettanomyces*

Figura 6. Selección de cepas de levadura *Dekkera* y *Brettanomyces* sobre pNPG. Las levaduras LD70, LD86, LD87 pertenecen a la cepa *D. bruxellensis*; LD78-LD83 a la cepa *B. bruxellensis*; LD71, LD73-LD77 a la cepa *B. lambicus*; LD72 a la cepa *B. custersii* y finalmente LD84: a la cepa *B. anomalus* y LD88 a *D. anómala* (Daenen *et al.*, 2008a).

Tabla 5. Detección cualitativa de la actividad hidrolasa glucosídica en las levaduras cerveceras mediante métodos de cribado basados en medios sólidos

Yeast	Medio solido (2 % agar)	N° of strains	Comment	YNB-A		YP-A		YNB-C	YNB-S	YPD 4-MUG
				/	Fe^{+3}	/	Fe^{+3}			
				Detección por:	Desarrollo	Color marrón	Desarrollo			
<i>D. bruxellensis</i>	3	<i>D. bruxellensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+ or ++
<i>B. bruxellensis</i>	6	<i>B. bruxellensis</i>	-	-	-	-	-	-	-	+ or ++
	6	<i>B. Lambicus</i>	-	-	-	-	-	-	-	+ or ++
	1	<i>B. custersii</i>	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
<i>D. anomala</i>	1	<i>D. anómala</i>	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++
<i>B. anomalus</i>	1	<i>B. anomalus</i>	+++	-	+	++	+++	+++	+++	+++

Dicho estudio, genera como consecuencia que Daenen *et al.*, (2008b) se planteasen otra interrogante. Pero esta vez, con el objetivo de evaluar la actividad de la enzima glucósido hidrolasa de la levadura *B. custersii* LD72. Esta levadura se utilizará para el uso en la producción de cervezas especiales de fruta, utilizando un medio de re-fermentación de cerveza Lager sin lúpulos, a la cual se le añadieron cerezas (*Prunus cerasus L.*). Se monitoreó la refermentación, mediante un seguimiento de la liberación de los compuestos aromáticos de la cereza después de 2, 13 y 43 días (Tabla 5).

Como resultado en la cerveza con adición de pulpa de cereza, jugo y carozos, se obtiene una disminución del benzaldehído notablemente al final de la refermentación (Tabla 6). En el caso de las concentraciones de alcohol bencílico aumentaron en todas las condiciones de refermentación (Tabla 6). Además, la misma tendencia se encontró para los contenidos de para eugenol, el trans y cis-iso Eugenol (a excepción del medio con carozo). De la misma manera, se presentó el mismo patrón de liberación de agliconas para salicilato de metilo,

linalol, α -terpineol, geraniol y α -ionol, aumentando su concentración con el tiempo de fermentación (Tabla 5).

Tabla 6. Evolución en el tiempo (días) de los compuestos volátiles de cerveza lager con adición de cerezas enteras, pulpa de cereza, jugo de cereza y carozo de cereza en refermentación con levaduras por *Brettanomyces custersii* LD72 (Daenen *et al.*, 2008).

Tipo	Compuesto Volatil	Cerezas enteras			Pulpa de Cereza			Jugo de cereza			Carozo			
		Tiempo (días)			Tiempo (días)			Tiempo (días)			Tiempo (días)			
		2	13	43	43	2	13	43	2	13	43	2	13	43
		%*			$\mu\text{g L}^{-1}$	%*			%*			%*		
Aromático	Trans-2-Hexen-1-ol	38.4	158.2	100	80.2	171.1	239.0	164.1	320.4	249.9	224.5	6.9	18.5	15.7
Alifático	Benzaldehido	175.8	349.6	100	80.5	916.9	274.5	28.1	1893	551.2	69.0	1562	90.7	276.5
	Alcohol benzílico	1.2	57.6	100	27211	3.0	27.5	30.5	3.2	20.8	22.1	10.6	56.0	66.9
	Acetato de bencílo	3.8	28.3	100	3.8	2.4	13.2	24.9	2.2	11.5	18.5	4.9	31.9	47.9
	Salicilato de metilo	0.4	44.8	100	8.5	1.8	38.2	82.9	0.4	21.3	33.9	0.6	1.9	2.0
	Eugenol	2.4	55.5	100	329	4.8	43.7	75.9	2.6	31.6	42.9	0.8	0.8	1.2
	Trans-Iso-eugenol	1.6	52.8	100	27.9	3.3	37.2	84.6	1.4	25.8	30.1	ND	0.7	0.7
	Cis-Iso-eugenol	0.5	58.0	100	7.3	4.1	39.7	75.9	0.6	27.9	33.6	ND	ND	ND
Terpenoides	Linanool	44.8	61.7	100	18.5	46.8	62.3	89.5	53.1	59.0	65.2	48.1	48.1	48.8
	α -Terpineol	19.9	26.9	100	5.4	21.0	28.3	111.0	25.5	40.3	47.5	117.4	20.9	33.5
	Geraniol	13.4	66.4	100	27.5	9.1	57.9	71.0	12.9	45.6	52.0	11.2	4.5	4.6
Norisoprenoide	α -Ionol	ND	45	100	-	ND	40.8	66.7	ND	22.9	30.2	ND	ND	ND
	β -damascona	65.6	88.6	100	98.5	62.3	112.1	116.9	94.0	110.0	135.6	45.6	20.9	38.0

Los datos se presentan con respecto a la concentración en el día 43 para las "cerezas enteras", de las que también se da la concentración absoluta ($\mu\text{g L}^{-1}$)

En definitiva, se destaca la participación enzimática (β -glucosidasa) de las levaduras *B. anomalus*, *D. anómala* y *B. custersii*. Siendo esta última la más relevante y utilizada para la elaboración de cervezas con fruta obteniendo buen resultado en la liberación de agliconas. Por tanto, se podría demostrar una mayor capacidad para la liberación de volátiles de los glucósidos del lúpulo, por parte de la levadura *B. custersii*. Además, se produjo la expresión de los compuestos odorantes unidos a los glucósidos de la cereza, como el linalol y geraniol. Detalle muy importante debido a que la levadura *Brettanomyces custersii* es la especie de levadura dominante en las últimas etapas de una fermentación espontánea, que genera cervezas *Lambic*. Además, *B. custersii* presenta una buena adaptabilidad al medio para su crecimiento asimilando celubiosa procedente de las barricas de madera (Vanderhaegen *et al.*, 2003). Por tanto, la actividad enzimática de *B. custersii* propicia la liberación de distintos aromas en la cerveza, diversificando la calidad organoléptica en cervezas elaboradas con lúpulo o con adición de cerezas naturalmente.

5.4 Compuestos volátiles

5.4.1 Producción de fenoles por parte de las levaduras *Brettanomyces*

En particular, en la cerveza existe una amplia gama de compuestos fenólicos. Estos compuestos derivan de dos orígenes, de las materias primas o son extraídos a lo largo del proceso cervecero. Los polifenoles aportan propiedades antioxidantes, la sensación en boca, la turbidez y la retención de espuma de esta bebida alcohólica. Pero los compuestos fenólicos pueden poseer un impacto positivo o negativo en el aroma y sabor de la cerveza dependiendo del estilo cervecero (Callemien and Collin, 2009; Lentz, 2018).

En particular, las levaduras *Brettanomyces* en fermentación generan fenoles volátiles, específicamente 4-vinilguaiacol (4-VG), 4-vinilfenol (4-VP), 4-etilguaiacol (4-EG) y 4-etilfenol (4-EP). Los fenoles volátiles, tienen su origen de los ácidos hidroxinámicos (HCA), ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y el ácido sináptico. Estos compuestos fenólicos provienen de la malta y los lúpulos (Figura 7) (Harris *et al.*, 2009; Lentz, 2018).

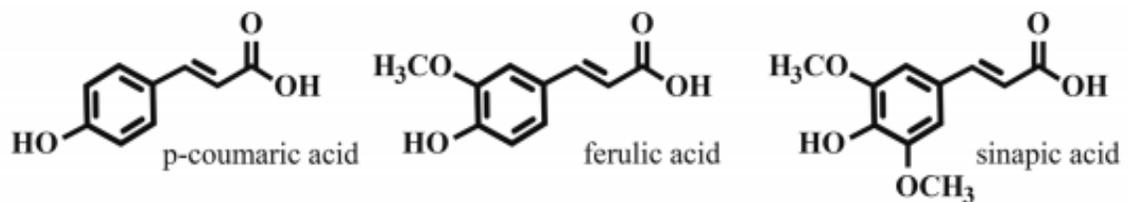


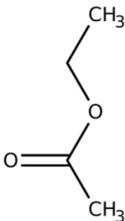
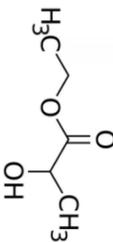
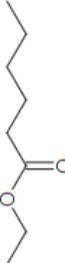
Figura 7. Estructura de los ácidos hidroxicinámicos (Lentz, 2018)

El proceso se lleva a cabo por medio de enzimas. En primer lugar, 4-VG y 4-VP se obtienen a partir de la descarboxilación de ácido ferúlico y *p*-cumárico por medio de la acción de la enzima fenilacrilico descarboxilasa (PAD1) (Figura 8). Luego, para obtener 4-EG también actúa una enzima, en este caso, la vinilfenol reductasa (VPR) que reduce el producto de la reacción anterior (Figura 8) (Harris *et al.*, 2009). Siendo muy relevante el último paso porque generalmente se detectan altas concentraciones de 4-EG y 4-EP en fermentaciones con levaduras *Brettanomyces* y bajas concentraciones de 4-VG y 4-VP (Holt *et al.*, 2018). A continuación, se muestran los fenoles volátiles producidos por las levaduras *Brettanomyces*, su estructura química y el aroma que evoca cada uno en la cerveza (Tabla 7).

5.4.2 Producción de ésteres por parte de las levaduras *Brettanomyces*

Este grupo de compuestos volátiles, al igual que los fenoles entregan a las bebidas alcohólicas aromas característicos. En este caso, proporcionan un *flavor* frutal o floral a la cerveza. Por lo tanto, son un grupo importante dentro de los compuestos aromáticos que produce la levadura *Brettanomyces* (Verstrepen *et al.*, 2003). Los principales compuestos que gesta es levadura son ésteres de étilo, tales como, lactato, hexanoato y octanoato de etilo, los cuales evocan descriptores afrutados, a manzana verde y piña (Tabla 8) (Tyrawa *et al.*, 2019). Igualmente, producen ésteres de acetato, como acetato de isoamilo y acetato de etilo, los cuales evocan descriptores a banana y licor respectivamente (Tabla 8) (Gamero *et al.*, 2014; Crauwels *et al.*, 2015; Tyrawa *et al.*, 2019). Resaltando también, la particularidad que tienen las levaduras *Brettanomyces* de esterificar ácidos grasos de cadena media - larga, cambiando el *flavor* de la cerveza obtenida, desde un *flavor* a queso rancio a un *flavor* dulce, relacionados con uva y manzana (Colomer *et al.*, 2019).

Tabla 8. Ésteres volátiles producidos por levaduras *Brettanomyces* (Tyrawa *et al.*, 2019)

	Acetato de étilo	Lactato de étilo	Hexanoato de étilo	Octanoato de étilo	Decanoato de étilo	Acetato de isoamilo
Estructura química						
Aroma	Afrutado Licoroso Barniz	Acaramelado Afrutado	Manzana verde Aniz	Piña	Manzana roja	Afrutado Banana

En el caso de las levaduras *Saccharomyces*, en especial la levadura *S. cerevisiae* posee 4 enzimas que son las responsables de la formación de ésteres de acetato y ésteres de ácidos grasos de cadena media. Estas enzimas son la acetiltransferasa I y II, para la formación de ésteres de acetato. Para la formación de ésteres de ácidos grasos de cadena media actúan las enzimas acil-CoA/etanol o O-aciltransferasa (Pires *et al.*, 2014). Pero en el caso de las levaduras *Brettanomyces*, no se dispone de información bioquímica sobre la biosíntesis de ésteres, solamente se sugiere que específicamente la levadura *B. bruxellensis* es capaz de producir grandes cantidades de ésteres de acetato y ésteres de ácidos grasos de cadena media (Menoncin and Bonatto, 2019).

De igual forma, los ésteres son un grupo de compuestos aromáticos importantes en las cervezas de fermentación espontánea. Si bien no hay datos específicos de cuantos gramos por litro de ésteres contienen las cervezas *Lambic* y *Gueuze*, estas cuentan con la presencia de lactato de etilo y acetato de etilo, proporcionando un carácter licoroso y afrutado característico de la cerveza final (Colomer *et al.*, 2019).

Por lo tanto, este grupo aromático producido por las levaduras *Brettanomyces* contribuye a la elaboración de cervezas con aromas afrutados, como los mencionados anteriormente (Tabla 8). Además, al elaborar cervezas con cultivos mixtos, mejora el desarrollo del *flavor* de los ácidos grasos de cadena media (Colomer *et al.*, 2019). En consecuencia, esta estrategia ayuda a la innovación en la producción de cervezas y a la conservación de antiguos estilos cerveceros en zonas específicas de elaboración de cerveza.

5.5 Levaduras *Brettanomyces* y su influencia en las cervezas *Lambic*

La cerveza antiguamente se fermentaba espontáneamente, pero con el paso del tiempo la industria evolucionó y se limitó a la utilización a una cepa de levadura para su elaboración. No obstante, actualmente, ha aumentado el interés por este tipo de fermentación debido al incremento mundial de la elaboración de cervezas artesanales a pequeña escala (Garavaglia and Swinnen, 2018).

El estilo cervecero *Lambic* tiene su origen en Bruselas, Bélgica. Siendo el estilo cervecero más antiguo que se elabora en la actualidad, el cual comenzó cerca del año 1320 (Sparrow, 2005). Este estilo cervecero, se destaca por su fermentación espontánea, que se lleva a cabo gracias a la acción de la biodiversidad de microorganismos residentes del Valle de río Senne. Posteriormente, se realiza una crianza en barricas de madera (Sparrow, 2005). Como características generales, esta cerveza generalmente se compone de 60%-70% de malta Pilsner y el resto trigo sin maltar. Con densidades iniciales que varían entre 1.048 y 1.057 en su mayoría (Tonsmeire, 2014)

Las cervezas *Lambic*, se elaboran tradicionalmente en los meses de octubre a fines de abril, meses en los cuales predomina un clima frío en el hemisferio norte, beneficioso para evitar arruinar el mosto durante los meses de verano. Se utiliza la estrategia *coolship*, la cual usa las noches frías para enfriar el mosto en bandejas poco profundas para tener mayor contacto con el ambiente y se pueda enfriar más rápido. En este proceso, se enfría el mosto de 100°C a 20°C aproximadamente (Sparrow, 2005). A medida que el mosto se va enfriando, éste mismo se inocula con microbiota del ambiente de la cervecería, para luego fermentar en barriles de madera, en los cuales el mosto cervecero fermenta a una temperatura entre 10-25°C y luego madura en el mismo barril (Sparrow, 2005).

En la industria enológica y destilados, las barricas para la elaboración de vino o whisky se seleccionan según la madera y su tostado, que propician la formación de taninos o compuestos fenólicos en la maduración. Estos compuestos van desapareciendo a medida que las barricas se usan varias veces (De Roos *et al.*, 2018). Debido a la porosidad de las barricas, éstas son difíciles de higienizar y con el tiempo podrían estar albergando microbiota que puede deteriorar estas bebidas alcohólicas (Guzzon *et al.*, 2017). Todo lo anterior, es benéfico para la producción de cervezas *Lambic*, por lo que se utilizan barricas usadas previamente en otras bebidas alcohólicas, porque no se necesitan las características de la madera, sino los microorganismos que pueda poseer la barrica para la fermentación espontánea de este estilo cervecero, tales como *Dekkera bruxellensis* y *Pediococcus* (Spitaels *et al.*, 2015). Además, la fermentación de este estilo de cerveza no solo consta de levaduras *Brettanomyces*, sino que están involucradas otras levaduras *Saccharomyces* y *Non-Saccharomyces* en el proceso fermentativo.

La fermentación espontánea, utilizada en cervezas *Lambic* se divide en 4 etapas. En la primera etapa, están presentes 2 levaduras *Kloeckera apiculata* y enterobacterias. Éstas últimas son de rápido crecimiento y debido a su producción de ácido acético y ácido láctico provocan una baja en el pH de 5,1 a 4,6. Las enterobacterias, no perduran en el proceso fermentativo, puesto que desaparecen rápidamente debido a la baja de pH y el aumento sucesivo de alcohol a medida que avanza la fermentación. Además, no son capaces de desarrollarse a temperaturas de elaboración de cervezas. Luego, la segunda etapa la domina *Saccharomyces sp.*, que primordialmente se dedica a metabolizar maltosas y otros azúcares fermentables, generando etanol. La tercera etapa, se lleva a cabo ya en los meses de alta temperatura, favoreciendo el desarrollo de las bacterias acéticas y lácticas, en general del género *Pediococcus* y *Acetobacter*. Finalmente, en la cuarta etapa se encuentran las levaduras *Brettanomyces* que, debido a su excepcional metabolismo como, por ejemplo, el consumo de dextrinas, el uso de nitratos, alta tolerancia al etanol, entre otros (Ver apartado 2), son aptas para sobrevivir a las condiciones de fermentación alcohólica en la producción de cervezas *Lambic*. Por tanto, esta fase desempeña un rol esencial y se genera el perfil aromático característico de este estilo de cervezas. (De Roos and De Vuyst, 2018; Witrick *et al.*, 2020). Perfil organoléptico, que además de entregar concentraciones de ésteres y fenoles (Ver apartado 4), proporciona descriptores aromáticos propios de las levaduras *Brettanomyces*, tales como, clavo de olor, corral, plástico, medicinal, metálico, sudor, especiado, sudor, definiendo todos estos descriptores en un solo concepto como *Funky* o *Brett Flavor* (Steensels *et al.*, 2015).

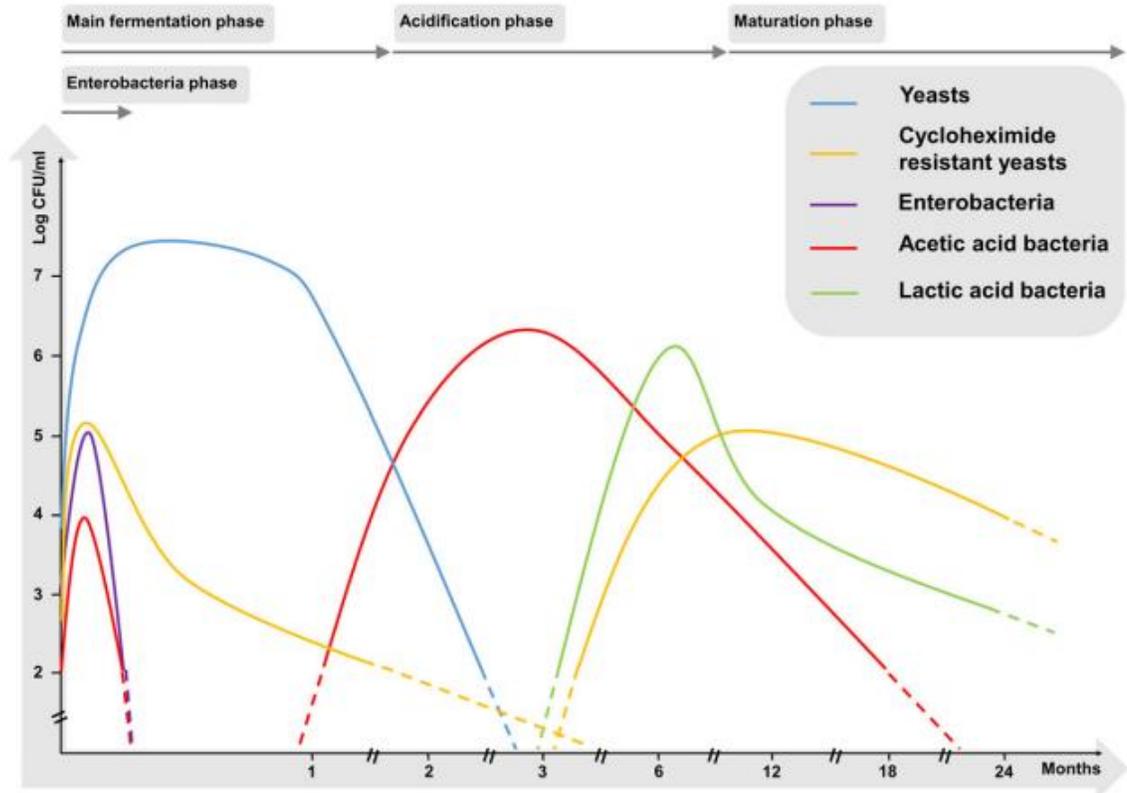


Figura 9. Fases de la fermentación alcohólica de cervezas Lambic (De Roos and De Vuyst 2018)

La figura 9, muestra el ciclo de las distintas levaduras y bacterias a lo largo del proceso fermentativo de una cerveza estilo *Lambic*. En donde se evidencia una sucesión microbiana en la producción de este estilo de cerveza, propia de una cervecería tradicional situada en el Valle del río Senne, cerca de Bruselas. Se distinguen las 4 fases antes mencionadas, la primera consiste en una levadura nativa y enterobacterias, junto a un crecimiento limitado de bacterias acéticas. Seguido de una fase de fermentación alcohólica, realizada por las levaduras *Saccharomyces*, una fase de acidificación debido al crecimiento de las bacterias lácticas y acéticas, finalizando con una fase de maduración con levaduras *Brettanomyces*. (De Roos and De Vuyst, 2018).

Análogamente, por un lado, este tipo de cerveza es usado como base para crear un tipo de cervezas llamadas *Gueuze*, en la cual se mezclan cervezas *Lambic* con 1, 2 y/o 3 años de crianza en barricas generando un *Blend* de cervezas, tal como se hace en algunos vinos. Por otro lado, las cervezas *Lambic* también se usan como base para generar otro estilo de

cerveza llamado “*Kriek*”, la cual consta de una cerveza *Lambic* más la adición de frutas, en este caso particular, adición de cerezas (Crauwels *et al.*, 2015).

En el caso de las levaduras que participan en la fermentación de este estilo de cerveza, la levadura *Brettanomyces* tiene un rol protagonista, debido a que es importante en el perfil aromático de las cervezas *Lambic*. Las levaduras *Brettanomyces* en la 4ta etapa de fermentación son capaces de sintetizar compuestos fenólicos y ésteres, los cuales son imprescindibles en el producto final de este estilo cervecero. Generando compuestos como 4-etilguaiacol, el 4-etilfenol, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, entre otros (Ver apartado 4) (Witrick *et al.*, 2020).

Por lo tanto, la participación en conjunto de levaduras y bacterias, previo al trabajo de las levaduras *Brettanomyces* en el mosto cervecero producen un perfil organoléptico complejo y único, destacando un sabor ácido junto con aromas a ésteres y fenoles en el producto final llamado cerveza *Lambic*.

6 CONCLUSIONES

La utilización de levaduras del género *Brettanomyces* son una gran herramienta para la industria cervecera, debido a que puede utilizar otras fuentes de carbono para la fermentación alcohólica, generando cervezas con menor cantidad de azúcares residuales.

Las temperaturas de fermentación entre 20°-25°C, son óptimas para las levaduras *Brettanomyces*, presentando un mejor desarrollo de biomasa. Es relevante destacar que fermentar a temperaturas entre 20-32°C permitirá tener una viabilidad del 86% de levaduras *Brettanomyces*. Además, este rango de temperatura no afecta la producción de etanol y ácido acético, ya que se mantiene una producción de 16-18 g/L de etanol y una producción de ácido acético de 3-4 g/L.

Una de las propiedades de las levaduras *Brettanomyces* es su uso para elaborar cervezas ácidas, teniendo en cuenta 2 variables, la cepa de levadura *Brettanomyces* y el oxígeno disuelto en el mosto cervecero. La cepa *B. naardensis* produce cervezas más ácidas que la cepa *B. bruxellensis*, pero hay que considerar la cantidad de oxígeno disuelto en el mosto. Dicha variable es una herramienta importante para la elaboración de cervezas, debido que mientras más alta es la tasa de aireación del mosto mayor es la producción de ácido acético, ocurriendo lo opuesto a una condición sin oxígeno en la fermentación, condición en la cual no existe producción de ácido acético.

β -glucosidasa es una importante enzima de las levaduras *Brettanomyces*, aportando a la liberación las agliconas provenientes de los glucósidos logrando potenciar el aroma de la cerveza final. Aparte, esta enzima es útil para acortar las cadenas de azúcares y por ende obtener una mejor eficiencia del uso de los azúcares, ya que estarán disponibles para la fermentación. Destacando la acción de las cepas *B. custersii* y *B. anomalus*.

La producción de fenoles por parte de las levaduras *Brettanomyces* aportan a la sensación en boca, la turbidez y la retención de espuma, además de aromas ligados a descriptores medicinales. Junto a eso, la producción de esterres por parte de las levaduras *Brettanomyces* aportan aromas frutales. Lo que conlleva a la formación natural y diversificación de aromas en la elaboración de cervezas.

En definitiva, es esencial continuar la investigación de estas levaduras debido a sus grandes características que poseen para la elaboración de cervezas, ampliando el conocimiento, la innovación y la conservación de cervezas tradicionales.

7 BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar Uscanga, M. Délia, M. Strehaiano, P. 2003. *Bretanomyces bruxellensis*: Effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 61: 157-162
- Anderson, N. De Dreu, C. Nijstad, B. 2004. The routinization of innovation research: a constructively critical review of the state-of-the-science. *Journal of Organizational Behavior*, 25: 147:173
- Annemüller, G. Manger, H. Lietz, P.2008. Die Berliner Weisse
- Ashrafi, A. Jokar, M. Mohammadi Nafchi, A.2018. Preparation and characterization of biocomposite film based on chitosan and kombucha tea as active food packaging. *International Journal of Biological Macromolecules*, 108:444-454
- Asociación de Productores de Cervezas Chile (ACECHI). 2021. Evolución pércapita de cervezas en Chile. Asociación de productores de cerveza de Chile Consultado el: 3 de enero del 2022
- Barata, a. Caldeira, J. Botalheiro, D. Plagaria, M. Malfeito-ferreira. Loureiro, V. 2008. Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International journal of microbiology*, 121:201-207
- Barnett, J. Entian, K. 2005. A history of research on yeasts 9: regulation of sugar metabolism. *Yeast*, 22: 835-894
- Basso, R. Alcarde, A. Portugal C. 2016. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?. *Food Research International* 86: 112-120
- Beer Judge Certification Program, (BJCP). 2021. Guía de Estilos de Cerveza [en línea]. Estados Unidos. Recuperado en: <<https://www.bjcp.org/bjcp-style-guidelines/>>. Consultado el: 6 de diciembre del 2021.
- Bokulich, N. and Bamforth, C. 2013. The microbiology of malting and brewing. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 77(2):157-172.
- Budroni, N. Zara, G. Ciani, M. Comitini, F. 2016. *Saccharomyces* and Non-*Saccharomyces* starters yeasts. *Brewing Technology*.
- Brandam, C. Castro, C. Délia, M. 2008. Effect of temperatura on *Brettanomyces bruxellensis*: Metabolic and kinetic aspects. *Canadian Journal of Microbiology*, 54: 11-18.

- Callemien, D. Collin, S. 2010. Structure, organoleptic properties, quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer-A review. *Food Reviews International*, 26: 1-84
- Calvo-Porrá, C. Levy-mangin, J. 2015. Global brands or local heroes?: Evidence from the Spanish beer market. *British Food Journal*, 117: 565-587.
- Calvo-Porrá, C. Rivaroli, S. Orosa-Gonzalez, J. 2020. How consumer involvement influences beer flavour preferences. *International Journal of Wine Business Research*, 32:537-554.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., and Romano, P. 2018. Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*, 4(2):38.
- Ciani, M. Canonico, L. Oro, L. Comitini, F. 2019. Footprint of nonconventional yeasts and their contribution on alcoholic fermentations. *Biotechnological Progress and Beverage Consumption*, 19: 435-365.
- Claro, F. Rijsbrack, K. Soares, E. 2007. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: Effect of ethanol, heat and osmotic stress. *Journal of Applied Microbiology*, 102: 693-700.
- Colomer, M., Funch, B., and Forster, J. 2019. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current opinion in biotechnology*, 56:30-35
- Colomer, M. Funch, B. Soldovnikova, N. Hopley, T. Förster, J. 2020a. Biotransformation of hop derived compounds by *Brettanomyces* yeast strains. *Journal of the Institute of Brewing*.
- Colomer, M. Chailyan, A. Fennessy, T. Olsson, K. Johnsen, L. Solodovnikova, N. Forster, J. 2020b. Assessing Population Diversity of *Brettanomyces* Yeast Species and Identification of Strains for Brewing Applications. *Frontiers in Microbiology*, 11: 1-21.
- Couyoumdjian, J. 2004. Una bebida moderna: la cerveza en Chile en el siglo XIX. Chile, Santiago. Pontificia Universidad Católica de Chile, Instituto de historia.
- Crauwels, S. Steensels, J. Aerts, G. Willems, K. Verstrepen, K. Lievens, B. 2015. *Brettanomyces bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. *Brewing Science*, 68: 110-121.
- Daenen, L. Saison, D. Sterckx, F. Delvaux, F.R. Verachtert, H. Derdelinckx, G. 2008a. Screening and evaluation of the glucoside hydrolase activity in *Saccharomyces* and *Brettanomyces* brewing yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 104: 478-488.

- Daenen, L. Sterckx, F. Delvaux, F. Verachtert, H. Derdelinckx, G. 2008b. Evaluation of the glycoside hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used in the production of special fruit beers. *FEMS Yeast Research*, 8: 1103-1114.
- De Barros Pita, W. Bezerra, F. De Souza Liberal, T. Ardaillon, D. De Morais, M. 2011. The ability to use nitrate confers advantage to *Dekkera bruxellensis* over *S. cerevisiae* and can explain its adaptation to industrial fermentation processes. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 100: 99-107
- De Roos, J. Van der Veken, D. De Vuyst, L. 2018. The interior surfaces of wooden barrels are an additional microbial inoculation source for lambic beer production. *Applied Environmental Microbiology*.
- De Roos, J., and De Vuyst, L. 2018. Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(1):25-38.
- Domizio, P., House, J., Joseph, C., Bisson, L., and Bamforth, C. 2016. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4):599-604.
- Dzialo, M. Park, R. Steensels, J. Lievens, B. Verstrepen, K. 2017. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 41: 95-128
- Galafassi, S. Merico, A. Pizza, F. Hellborg, L. Molinari, F. Piskur. Compagno, C. 2011. *Dekkera/Brettanomyces* yeasts for ethanol production from renewable sources under oxygen-limited and low-pH conditions. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 38: 1079-1088.
- Galafassi, S. Capusoni, C. Muktaduzzaman, Md. Compagno, C. 2013. Utilization of nitrate abolishes the "custers effect" in *Dekkera bruxellensis* and determines a different pattern of fermentation products. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 40: 297-303.
- Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J., Maere, S., Verstrepen, K., and Steensels, J. 2018. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current opinion in biotechnology*, 49:148-155.
- Garavaglia, C. Swinnen, J. 2018. Economics of the craft beer revolution: A comparative international perspective. University of Milano-Bicocca and Bocconi University, Milan, Italy. 3-51.

- Guzzon, R. Bernard, M. Barnaba, C. Bertoldi, D. Pixner, K. Larcher, R. 2017. The impact of different barrel sanitation approaches on the spoilage microflora and phenols composition of wine. *Journal of Food Science and Technology*, 54: 810-821.
- Harris, V. Ford, C. Jiranek, V. Grbin, P. 2009. Survey of enzyme activity responsible for phenolic off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81: 1117-1127.
- Holt, S. Mukherjee, V. Lievens, B. Verstrepen, K. Thevelein, J. 2018. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology*, 72: 55-66.
- Hornsey, I. 2015. Beer: History and Types. *Encyclopedia of food and health*. 345 -354.
- Jin, Y. Speers, R. 2000. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58: 108-116.
- Leisegang, R. Nevoigt, E. Spielvogel, A. Niederhaus, A. Stahl, U. 2006. Genetically Engineered Food. Methods and Detection, Fermentation of food by means of genetically modified yeast and filamentous fungi. Alemania, Weinheim
- Lekkas, C., Stewart, G., Hill, A., Taidi, B., y Hodgson, J. 2007. Elucidation of the role of nitrogenous wort components in yeast fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 113: 3–8.
- Lentz, M. Harris, C. 2015. Analysis of Growth Inhibition and Metabolism of Hydroxycinnamic Acids by Brewing and Spoilage Strains of *Brettanomyces* Yeast. *Foods*. 4: 581-593.
- Lentz, M. 2018. The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. *Fermentation*.
- Menoncin, M. Bonatto, D. 2019. Molecular and biochemical aspects of *Brettanomyces* in brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 125: 402-411.
- Moktaduzzaman, Md. Galafassi, S. Vigentini, Ll. Foschino, R. Corte, L. Cardinali, G. Piskur, J. Compagno, C. 2016. Strain-dependent tolerance to acetic acid in *Dekkera bruxellensis*. *CrossMark*, 66:352-359.
- Li, Q. Wang, J. Liu, C. 2017. Beers. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering: Food and Beverages Industry*, 305-351.

- Lodolo, E., Kock, J., Axcell, B. and Brooks, M. 2008. The yeast *Saccharomyces cerevisiae*—the main character in beer brewing. *FEMS yeast research*, 8(7):1018-1036.
- Péter, G. Dlačny, D. Tóbiás, A. Fülöp, L. Podgorsek, M. Cadez, N. 2017. *Brettanomyces acidodurans* sp. nov., a new acetic acid producing yeast species from olive oil. *CrossMark* 110: 657-664.
- Pires, E. Brányik, T. 2015. *Biochemistry of Beer Fermentation*. Springer briefs in biochemistry and molecular biology. [en línea]. 68 p.
- Pires, E. Teixeira, J. Brányik, T. Vicente, A. 2014. Yeast: the soul of beer's aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*. 98:1937–1949.
- Piškur, J. Ling, Z. Marcet-Houben, M. Ishchuk, O. Aerts, A. LaButti, K. Copeland, A. Lindquist, E. Barry, K. Compagno, C. Bisson, L. Grigoriev, I. Gabaldón, T. Phister, T. 2012. The genome of wine yeast *Dekkera brucellensis* provides a tool to explore its food-related properties. *International Journal of Food Microbiology*, 157: 202-209.
- Rayne, S- Eggers, N. 4-Ethylphenol and 4-Ethylguaiacol Concentrations in Barreled Red Wines from the Okanagan Valley Appellation, British Columbia. *American journal of enology and viticulture*. 59: 92-97.
- Rozpedowska, E. Hellborg, L. Ishchuk, O. Orhan, F. Galafassi, S. Merico, A. Woolfit, M. Compagno, C. Piškur, J. 2011. Parallel evolution of the make-accumulate-consume strategy in *Saccharomyces* and *Dekkera* yeasts. *Nature communications*, 2.
- Saladrigas, V. Claros, G. 2002. *Vocabulario de Biología Molecular*, 3:13-28.
- Servicio Agrícola y Ganadero (SAG). Ley N° 18.455. Fija normas sobre producción, elaboración y comercialización de alcoholes etílicos, bebidas alcohólicas y vinagres. Santiago: SAG, 2015. 79p. [Publicada en Diario Oficial el: 23 de octubre de 1986].
- Schifferdecker, A., Dashko, S., Ishchuk, O., and Piškur, J. 2014. The wine and beer yeast *Dekkera bruxellensis*. *Yeast*, 31(9):323-332.
- Siverio, J. 2002. Assimilation of nitrate by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 26: 277-284.
- Smith, B. Divol B. 2016. *Brettanomyces bruxellensis*, a survivalist prepared for the wine apocalypse and other beverages. *Food microbiology*, 59:161-175.

- Sparrow, J. 2005. *Wild Brews: Beer beyond the influence of brewer's yeast*. Boulder, Colorado, Estados Unidos: Brewers Publications. 199p.
- Spitaels, F. Wieme, A. Janssens, M. Aerts, M. Van Landschoot, A. De Vuyst, L. Vandamme, P. The microbial diversity of an industrially produced lambic beer shares members of a traditionally produced one and reveals a core microbiota for lambic beer fermentation. *Food Microbiology*, 49: 23-32.
- Steensels, J. Daenen, L. Malcorps, P. Derdelinckx, G. Verachtert, H. Verstrepen, K. 2015. *Brettanomyces* yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206: 24-38.
- Steensels, J. Verstrepen, K. 2014. Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, 61-80.
- Suárez, M. 2013. *Cerveza: componentes y propiedades*. 75 p. Tesis Master Universitario en Biotecnología Alimentaria. Universidad de Oviedo, Oviedo, España.
- The Brewes of Europe. 2018. *Beer statistics 2018 Edition*. 1-36.
- Tonsmeire, M. 2014. 318 p. *American sour beers, Innovative techniques for mixed fermentations*. Colorado, Estados Unidos.
- Tyrawa, C. 2019. 98 p. *Demystifying *Brettanomyces bruxellensis*: Fermentation kinetics, flavour compound production, and nutrient requirements during wort fermentation*. Tesis Master of Science in Molecular and Cellular Biology. University of Guelph. Guelph, Ontario, Canada.
- Yeo, H. Liu, S. 2014. An overview of selected specialty beers: developments, challenges and prospects. *International Journal of Food Science and Technology*, 49: 1607-1618.
- Vanderhaegen, B. Neven, H. Coghe, S. Verstrepen, K. J. Derdelinckx, G. Verachtert, H. 2003. Bioflavoring and beer refermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62: 140-150.
- Verstrepen, K. Derdelinckx, G. Verachtert, H. Delvaux, F. 2003. Yeast flocculation: What brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology*
- White, C y Zainashef J. 2010. 218 p. *Yeast: The practical guide to beer fermentation*. Colorado, Estados Unidos. Brewers Publications. (Serie Brewing Elements).

- Willaert, R. 2012. Biochemistry of beer fermentation. *Food Biochemistry and Food Processing*, 2: 627-653.
- Witrick, K. Pitts, E. O'Keefe, S. 2020. Analysis of Lambic Beer Volatiles during Aging Using Gas Chromatography–Mass Spectrometry (GCMS) and Gas Chromatography–Olfactometry (GCO). *Beverages*, 6: 31.
- WHO. 2014. Global status report on alcohol and health. World Health Organization (WHO). Ginebra: 86 p
- Woolfit, M. Rozpełowska, E. Piskur, J. Wolfe, K. 2007. Genome Survey Sequencing of the Wine Spoilage Yeast *Dekkera (Brettanomyces) bruxellensis*. *Eukaryotic Cell*, 6: 721-733. 30 de agosto del 2020.
- Wunderlich, S. Back, W. 2009. General aspects of beer and constituents – Beer making, Hops and Yeast. *Beer in Health and Disease Prevention*, I: 3-16. Consultado el 30 julio del 2021