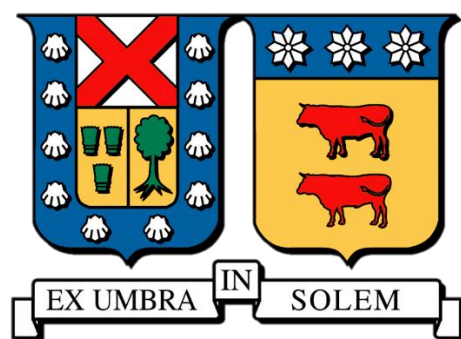


UNIVERSIDAD TÉCNICA FEDERICO SANTA MARÍA
DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA CIVIL QUÍMICA Y AMBIENTAL

VALPARAÍSO, CHILE



**ESTUDIO DEL IMPACTO DEL CO-CULTIVO ENTRE
LEVADURAS NO-SACCHAROMYCES Y BACTERIAS
ÁCIDO-LÁCTICAS EN EL COMPORTAMIENTO DE LA
FERMENTACIÓN PARA LA ELABORACIÓN DE UNA
CERVEZA CON ATRIBUTOS DISTINTIVOS Y MENOR
GRADUACIÓN ALCOHÓLICA.**

CATALINA ANDREA MANDIOLA GONZÁLEZ

MEMORIA PARA OPTAR AL TÍTULO DE:

INGENIERA CIVIL QUÍMICA

PROFESOR GUÍA: DR. CRISTIAN RAMIREZ BUSTOS

PROFESOR CO-REFERENTE: DR. SERGIO ALMONACID MERINO

Octubre , 2023

RESUMEN

Las levaduras desempeñan un papel esencial en el proceso de elaboración de la cerveza, al ser responsables de la fermentación, de estas se obtienen diversos compuestos que caracterizan el producto final, las diferentes rutas metabólicas producen etanol, dióxido de carbono y metabolitos secundarios muy influyentes en el sabor y aroma de la cerveza como los ácidos orgánicos y compuestos volátiles.

Se realizó un estudio de microfermentaciones mixtas, utilizando bacterias ácido-lácticas (*L. fructivorans* y *L. mesenteriodes*) y levaduras no-*Saccharomyces* (*C. boidinii*, *C. olephila* y *M. pullcherrima*), para evaluar el efecto que tienen estos microorganismos en la elaboración de una cerveza con atributos distintivos. Se compararon los compuestos volátiles, perfil fermentativo y graduación alcohólica con una cerveza convencional monocultivo con *Saccharomyces cerevisiae*.

Se llevaron a cabo análisis cromatográficos para cuantificar ácidos, azúcares, compuesto volátiles y etanol de muestras finales e iniciales. Adicionalmente se realizaron mediciones diarias de pH, densidad, conteo celular y bacteriano, densidad óptica y °Brix.

El perfil fermentativo de los co-cultivos señala una menor duración de la fermentación (25% menos), y mayor contenido de biomasa (10% -1026%) que la fermentación tradicional. Los microorganismos utilizados en el cultivo mixto tienen una velocidad de crecimiento variable entre 0.10 – 0.24 h⁻¹ mientras que la *Saccharomyces cerevisiae* alcanza una velocidad de crecimiento de 0.06 h⁻¹.

Respecto al contenido de etanol, todos los cultivos mixtos obtuvieron un menor %v/v (volumen) de etanol respecto al cultivo puro, reduciendo en un 27% - 39% la graduación alcohólica de la cerveza. Por otra parte, el consumo de azúcares es diferenciado por la cantidad residual de maltotriosa, las levaduras nativas en conjunto a las bacterias solo consumen de un 0% a un 14% este azúcar, mientras que el consumo de maltotriosa de la *Saccharomyces* es del 94%. En cuanto a los ácidos orgánicos, las levaduras no convencionales consumieron ácido málico entre un 18% a un 44%, al contrario de la levadura convencional que produjo este compuesto en un 204% respecto al contenido inicial. En el cultivo mixto se produce ácido láctico entre un 7% y 640% según la concentración inicial, mientras que la *Saccharomyces* solo logra un 7% de producción. Con respecto al ácido acético es formado mayoritariamente por los co-cultivos variando entre un 21% a un 141%, y la cerveza convencional logra una formación del 10% de este compuesto. Finalmente, en los compuestos volátiles identificados, el cultivo mixto predomina en el 53% de estos, destacando en los ésteres etil decanoato y en el etil dodecanoato, es decir, los principales descriptores de la cerveza resultante son las notas frutales y florales, obteniendo compuestos volátiles deseables.

La investigación realizada sugiere que el uso de levaduras nativas en cerveza proporciona ventajas competitivas respecto de una tradicional, brindando la oportunidad de entrar al mercado, cumpliendo con la exigencia de atributos organolépticos y la tendencia de vida saludable demandada por los consumidores.

ÍNDICE

RESUMEN	2
Índice de figuras	4
Índice de tablas	5
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS	7
1.1 Introducción.....	8
1.2 Objetivos.....	9
1.2.1 Objetivo general:.....	9
1.2.2 Objetivos específicos:	9
CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO.....	10
2.Marco Teórico	11
2.1 La cerveza	11
2.2 Cerveza baja en alcohol	12
2.3 Materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza	13
2.3.1 Agua	13
2.3.2 Grano	16
2.3.3 Lúpulo	16
2.3.4 Levadura.....	17
2.4 Proceso de elaboración de la cerveza.....	17
2.4.1 Malteado.....	19
2.4.2 Molienda.....	19
2.4.3 Maceración	19
2.4.4 Filtración	20
2.4.5 Cocción.....	20
2.4.6 Enfriamiento.....	21
2.4.7 Fermentación	21
2.4.8 Maduración.....	23
2.5 Levaduras no <i>Saccharomyces</i> y bacterias.....	24
2.6 Compuestos volátiles	26
2.6.1 Alcoholes superiores	27
2.6.2 Ésteres	27
2.6.3 Terpenos	28
2.6.4 Compuestos carbonilos	28

2.6.5 Compuestos sulfurados	28
2.6.6 Dicetonas Vecinales	29
CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS	30
3. Materiales y métodos.....	31
3.1 General.....	31
3.2 Preparación de materia prima	32
3.3 Preparación del material	33
3.4 Montaje de experimentos.....	33
3.5 Monitoreo y mediciones	34
3.5.1 Monitoreo diario de fermentaciones	34
3.5.2. Mediciones de muestras iniciales y finales.	35
3.6 Análisis estadístico	37
CAPITULO IV: RESULTADOS	39
4. Resultados.....	40
4.1 Perfil fermentativo	40
4.2 Crecimiento celular.....	45
4.3 Variación del contenido de etanol	46
4.4 Ácidos orgánicos.....	47
4.5 Azúcares.....	50
4.6 Compuestos volátiles	52
CAPITULO V: CONCLUSIONES	55
5. Conclusiones.....	56
CAPITULO VI: REFERENCIAS	57
6. Referencias	58

Índice de figuras

Figura 1. Incremento porcentual en el valor de mercado de las cervezas bajas en alcohol y el tamaño de este en el período de 5 años de 2012 a 2017. Fuente: (Bellut & Arendt, 2019)	12
Figura 2. Proceso de elaboración de la cerveza (Brewing). Fuente: (Hamilton, sf).....	18
Figura 3. Representación gráfica de la curva típica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo. Fuente: (Wang et al., 2015).....	23
Figura 4. Consumo de azúcar en ensayos de control (Sc) (línea de puntos) y fermentación mixta: cultivo coinoculado (Sj + Sc-co) (línea discontinua) y cultivo secuencial (Sj + Sc-24h) (línea completa). Fuente: (Portaro et al., 2022).....	26

Figura 5. Desglose de experimentos.....	31
Figura 6. Mediciones iniciales, durante y finales de fermentaciones.....	32
Figura 7. Placas con crecimiento de 24 hrs.	32
Figura 8. Conteo celular en microscopio.....	35
Figura 9. Densidad respecto a los días de fermentación, cultivo mixto con bacteria LF y contraste con SC.....	40
Figura 10. Densidad respecto a los días de fermentación, cultivo mixto con bacteria LM y contraste con SC.....	41
Figura 11. Crecimiento de biomasa según día de fermentación, cultivo mixto con LF en contraste con SC.....	43
Figura 12. Crecimiento de biomasa según día de fermentación, cultivo mixto con LM en contraste con SC.....	43
Figura 13. Variación de potencial de hidrógeno (pH) según día de fermentación, cultivo mixto con LF y control con SC.....	44
Figura 14. Variación de potencial de hidrógeno (pH) según día de fermentación, cultivo mixto con LM y control con SC.....	45
Figura 15. Grado alcohólico de cada fermentación.....	47
Figura 16. Compuestos volátiles agrupados según clasificación.....	53

Índice de tablas

Tabla 1. Parámetros químicos: Elementos esenciales, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012).....	14
Tabla 2. Parámetros químicos: Elementos no esenciales, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012).....	14
Tabla 3. Parámetros químicos: Sustancias orgánicas, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012).....	14
Tabla 4. Parámetros químicos: Plaguicidas, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012).....	14
Tabla 5. Parámetros químicos: Productos secundarios desinfección, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012).....	15
Tabla 6. Parámetros químicos: Organolépticos, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012).....	15
Tabla 7. Iones presentes en la cerveza y sus efectos. Extraído de: (Larroque,2020).....	16
Tabla 8. Principales enzimas que actúan en el proceso de maceración. Fuente: (Gisbert Verdú, 2016).....	20
Tabla 9. Descripción de los monoterpenos más relevantes encontrados en la cerveza. Fuente: (Larroque, 2020).....	28
Tabla 10. Compuestos de azufre y su descriptor de sabor. Extraído de: (Mora Pesántez, 2021).	29

Tabla 11. Dicetonas y su concentración típica, con su límite de detección organoléptico. Extraído de: (Cañamar Pimentel, 2007)	29
Tabla 12. Definición de abreviaturas para cada microorganismo utilizado en investigación.	40
Tabla 13. Velocidad de crecimiento de cada microorganismo.....	42
Tabla 14. Crecimiento celular y bacteriano según fermentación.	46
Tabla 15. Concentraciones iniciales y finales de ácido málico, según cultivo.....	48
Tabla 16. Concentraciones iniciales y finales de ácido láctico, según cultivo.....	48
Tabla 17. Concentraciones iniciales y finales de ácido acético, según cultivo.	49
Tabla 18. Parámetros de análisis de diferentes cervezas. Extraído de: (Klopper et al., 1986)	49
Tabla 19. Descripción de los ácidos orgánicos volátiles más relevantes en la cerveza. Fuente: (Larroque, 2020).....	49
Tabla 20. Descripción de los ácidos orgánicos no volátiles más relevantes en la cerveza. Fuente: (Larroque, 2020).....	50
Tabla 21. Azúcares iniciales según fermentación.	51
Tabla 22. Azúcares finales según fermentación	51
Tabla 23. Consumo y formación de azúcares según fermentación.	51
Tabla 24. Resultados obtenidos en el seguimiento de carbohidratos en cervezas. Fuente: (Nogueira et al., 2005).....	52
Tabla 25. Compuestos volátiles presentes en cada fermentación y porcentaje de abundancia respectiva.	54

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

1.1 Introducción

La cerveza es una bebida alcohólica obtenida por un proceso de fermentación de cereales germinados, se caracteriza por tener un mercado competitivo y muy exigente, el cual se ha visto en gran aumento en los últimos años. Así, surge la oportunidad de estudiar el efecto de levaduras no convencionales y el uso de bacterias ácido-lácticas para proporcionar rasgos diferenciales.

El mercado cervecero en el país ha tenido un crecimiento exponencial del 92% en los últimos 15 años (Asociación Nacional De Avisadores, 2022), mientras que el consumo per cápita en Chile rodea los 59 litros anuales (Asociación de Productores de Cerveza de Chile, 2022), y con respecto al consumo de las cervezas sin alcohol, se tuvo un crecimiento del 127% entre los años 2012 y 2017 (Bellut & Arendt, 2019).

Las características principales de una cerveza ya sean olores, sabores y consistencia se atribuyen a las materias primas utilizadas (malta, lúpulo, microorganismos, etc) y a las técnicas empleadas en el proceso de elaboración. En la etapa de fermentación, actúan los microorganismos transformando los azúcares en alcohol, donde tradicionalmente participa la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, en el caso de las cervezas tipo ale, o la *Saccharomyces pastorianus* en el caso de las cervezas tipo lager (Larroque, 2020).

Por otra parte, las levaduras no *Saccharomyces* tiene escasos precedentes de participar en la fermentación de cervezas, pero si se han utilizado bastante en la vinificación por sus aportes en complejidad del producto final, mejorando sus características organolépticas (Devi et al., 2022).

En específico son de interés las levaduras del género *Candida* por su capacidad de mejorar la complejidad del aroma en vinos, su tolerancia a las altas concentraciones de alcohol y la disminución de acidez en el medio (Perpetuini et al., 2021). Mientras que las de género *Metschnikowia*, proporcionan aumentos significativos en contenidos compuestos volátiles y perfiles sensoriales de los vinos (Kelanne et al., 2022).

Con respecto a las bacterias ácido-lácticas (BAL) estas están ligadas a efectos probióticos dado los subproductos que generan provocando un impacto beneficiario para nuestra salud al ser consumidos (Beekwilder et al., 2009). Incluso, estas bacterias se han utilizado en diversos alimentos para potenciar su valor nutricional (Parra Huertas, 2010). Además, las BAL están directamente ligadas a la fermentación maloláctica de los vinos, causando la desacidificación de estos, aportando estabilidad al color y contribuyendo a la complejidad del sabor de los vinos (Devi et al., 2022).

Se tienen diferentes tipos de BAL, al igual que en los microorganismos anteriormente mencionados, en particular los *Lactobacillus* son bacterias no patógenas, estrictamente fermentativas y altamente beneficiosas para nuestra salud (Åvall-Jääskeläinen & Palva, 2005), mientras que las *Leuconostoc* son bacterias de gram positivo y demostró en un rápido

consumo de azúcares libres en fermentaciones de kimchi, produciendo mayores cantidades de ácidos láctico y acético y manitol (Jung et al., 2012)

1.2 Objetivos

1.2.1 Objetivo general:

- Evaluar el efecto del uso de *Candida spp* y *Metschnikowia spp* en fermentaciones co-cultivo con *Lactobacillus* y *Leuconostoc*, para la elaboración de una cerveza con atributos distintivos, menor duración de fermentación y menor graduación alcohólica.

1.2.2 Objetivos específicos:

- Desarrollar fermentaciones co-cultivo de *Lactobacillus*, *Leuconostoc*, *Candida spp* y *Metschnikowia spp*, para analizar la cinética de fermentación y contrastar con la fermentación monocultivo convencional.
- Estudiar los metabolitos finales (ácidos, azúcares, compuestos volátiles y etanol), de los experimentos, para determinar aspectos distintivos de la cerveza resultante del cultivo mixto y compararla con la cerveza tradicional.

CAPÍTULO II: MARCO TEÓRICO

2.Marco Teórico

2.1 La cerveza

La cerveza es una bebida alcohólica obtenida por un proceso de fermentación de cereales germinados (malta), que se compone usualmente por agua, el compuesto más abundante, cercano al 85%, igualmente se tiene alcohol y anhídrido carbónico (dióxido de carbono disuelto en la cerveza), los cuales se producen a partir de la fermentación de los azúcares (fermentables), este proceso es originado por las levaduras, las cuales son hongos unicelulares que, a simples rasgos, transforman los azúcares en alcohol (Castorena-García et al., 2020).

Generalmente se utilizan dos tipos de levaduras, *Saccharomyces cerevisiae*, la cual produce una fermentación alta, más conocida como tipo ale e igualmente se tiene la *Saccharomyces pastorianus*, de baja fermentación o tipo lager (Larroque, 2020). También, en la composición de esta bebida alcohólica se encuentra la maltosa (azúcar presente en la malta), dextrina (polímero intermedio entre el almidón y la dextrosa), sustancias nitrogenadas, materias minerales, ácidos orgánicos, compuestos volátiles y en baja cantidades taninos.

Esta bebida es descubierta entre los años 9 mil y 4 mil a.C, en la zona de la Mesopotamia del Oriente Medio, por los sumerios. Uno de los mayores problemas que tenían los antiguos cerveceros era la conservación de esta bebida, puesto que, al estar en contacto con el aire, se forman compuestos no deseados, principalmente aldehídos. Recién en el siglo XIV se crearon las primeras industrias cerveceras, en este momento se comenzó a usar el lúpulo como único saborizante y aromatizante, antes de esta fecha se utilizaban mezclas de especias. Luego, en el siglo XIX tras la revolución industrial, comenzaron a embotellarse las cervezas logrando conservar en el tiempo esta bebida mediante máquinas frigoríficas y empleando la utilización de conservantes. Es aquí donde el francés Louis Pasteur, demostró que las levaduras de la cerveza son microorganismos, y calificó la fermentación como “La vida sin aire” (1885), también se comienza a experimentar con diversos tipos de fermentaciones (baja y alta), puesto que fue posible regular la temperatura en el proceso de elaboración. Además, las grandes fábricas empezaron a utilizar diferentes granos como maíz y arroz en vez de cebada, dado su alto contenido en almidones y menor precio en el comercio, por ende, comenzaron a verse cervezas de estilos variados, puesto que la materia prima principal (granos) le da diferentes atributos a la cerveza, dependiendo de cual y de cuanta cantidad se utilice en el proceso de elaboración (Larroque, 2020).

En Chile la cerveza aparece con los inmigrantes alemanes en 1850, quienes la trajeron de Europa, y luego comenzaron a producirla en el país. A fines de este siglo la bebida alcohólica ya estaba repartida por todo el país, con tres empresas precursoras: La cervecería Anwandter de Valdivia, la cervecería Aabel de Osorno y la Cervecería Ebner de Santiago (Couyoumdjian, 2004).

El consumo de cerveza en Chile ha ido en gran aumento, de hecho, el mercado cervecero chileno ha tenido un crecimiento exponencial del 92% en los últimos 15 años (Asociación Nacional De Avisadores, 2022), lo cual confirma la preferencia del consumo de bebidas alcohólicas en el país, incluso, la cerveza abarca el 77% del mercado de bebidas alcohólicas consumidas en Chile (ACECHI, 2021). El consumo per cápita en el país rodea los 59 litros anuales (Asociación de Productores de Cerveza de Chile, 2022) y con respecto a las cervezas sin alcohol, hubo un crecimiento del 127% entre los años 2012 y 2017 (Bellut & Arendt, 2019).

En la actualidad, están apareciendo muchas micro-cervecerías en diferentes partes del mundo, lo cual genera que, al igual que las fábricas industriales de esta bebida, pertenezcan a un mercado competitivo y muy exigente (Fuentes, 2011). Es por esto que, la mayoría trata de diferenciarse en las técnicas y materias primas empleadas en el proceso de elaboración, para así obtener un producto de alta calidad, proporcionándole mayores cualidades organolépticas al producto.

2.2 Cerveza baja en alcohol

Las cervezas bajas en alcohol han desarrollado una mayor demanda en los últimos años, el cual es producido por las nuevas tendencias de estilo de vida, el público busca las alternativas más saludables y sustentables, sin dejar de lado la exigencia. En la Figura 1 se observa que el crecimiento del consumo de bebidas desalcoholizadas tiene mayor relevancia dependiendo de la demografía, sin embargo, el más significativo se observa en Latinoamérica, donde existe un incremento del tamaño de mercado del 168% y un aumento del 296% en el valor del mercado (Bellut & Arendt, 2019).

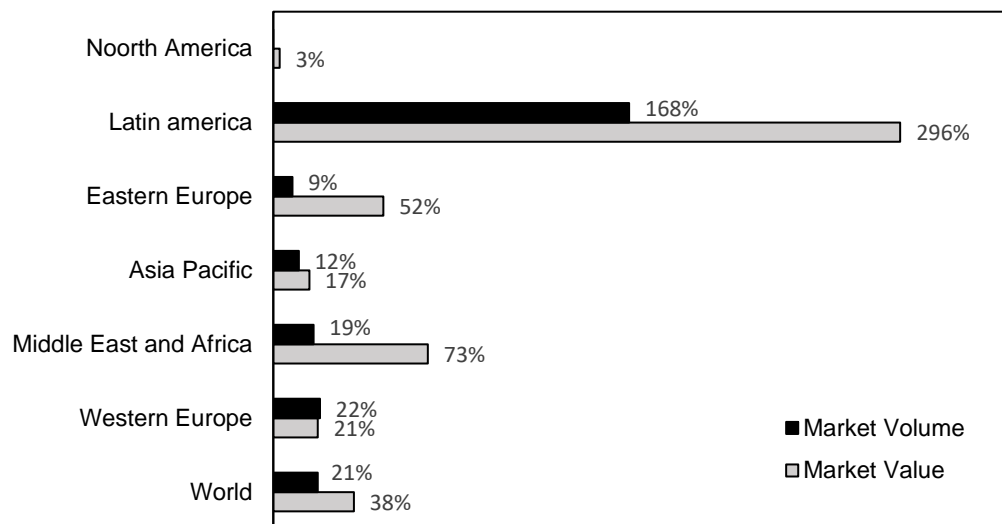


Figura 1. Incremento porcentual en el valor de mercado de las cervezas bajas en alcohol y el tamaño de este en el período de 5 años de 2012 a 2017. Fuente: (Bellut & Arendt, 2019)

Actualmente el mayor desafío es cumplir con la exigencia organoléptica de los consumidores, puesto que las cervezas sin alcohol se caracterizan por sus *off-flavors*, es decir, sabores amargos, agrios y dulces, además de notas olfativas desagradables, concluyendo en un conjunto de características poco deseadas (Burini et al., 2021).

Las levaduras mayormente utilizadas para la elaboración de estas bebidas son del género *Saccharomyces*, que además sean incapaces de metabolizar azúcares complejos

Existen métodos físicos y biológicos para elaborar cervezas sin alcohol, dentro de los primeros se encuentra la evaporación y la filtración por membrana, los cuales constan en la eliminación del alcohol del producto final, por lo general son procesos costosos debido al uso de maquinaria específica. En cambio, los métodos biológicos se basan en la formación reducida (acotada) de alcohol en la etapa de fermentación, debido a que se logra impedir que las levaduras produzcan grandes cantidades de alcohol, utilizando procesos como la pasteurización, centrifugación o un rápido enfriamiento (0°C), este proceso no tiene costos adicionales referentes a la producción de la cerveza, pero suele presentar *off-flavors* (sabores y aromas no deseados). Por lo tanto, en este punto es donde nuevamente el uso de las levaduras no convencionales es relevante, ya que es una técnica que disminuye la cantidad de alcohol en las cervezas, pero también genera un gran aporte en la complejidad del *flavor* (sabores y aromas deseables), al ser capaces de producir altas cantidades de ésteres, aminorando la percepción de sabores poco deseables (Burini et al., 2021).

Las levaduras mayormente utilizadas para la elaboración de estas bebidas son del género *Saccharomyces*, que además sean incapaces de metabolizar azúcares complejos, como la maltosa y/o maltitriosa, estas levaduras suelen tener una baja tolerancia al etanol, por lo que al utilizarlas se induce el término (temprano) de la fermentación en un tiempo acotado (Kunze, 2006).

2.3 Materias primas utilizadas en la elaboración de cerveza

2.3.1 Agua

El agua es la materia prima principal de la cerveza, y según su procedencia y composición afecta directamente en la calidad de la cerveza. Dependiendo del tamaño de la cervecería, en el proceso se puede consumir desde 3 a 8 veces la cantidad de cerveza producida, por lo que es de suma importancia reducir el consumo que se produce en el proceso productivo, lo cual puede ser posible mediante la recirculación de agua y la reutilización de esta. (Kunze, 2006)

En Chile se establecen parámetros para clasificar el agua como potable, según la norma NCh 409/01, existen requisitos físicos, químicos, bacteriológicos y de desinfección que aseguran la inocuidad del agua y verifican que sea apta para el consumo humano.

En términos microbiológico, el agua potable debe estar exenta de *Escherichia coli*, la presencia de bacterias coliformes totales puede detectarse en el 10%-25% del total de muestras mensuales en el caso de tener menos de 10 muestras mensuales, en el caso de que sean más muestras se acepta solo el 5% (Echeverría, 2012)

Los parámetros químicos se determinan en la Tabla 1, 2, 3, 4, 5 y 6.

Tabla 1. Parámetros químicos: Elementos esenciales, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012)

Elementos esenciales	Concentración mg/L
Cobre	≤ 2.0
Zinc	≤ 3.0
Cromo	≤ 0.05
Fluoruro	≤ 1.5
Hierro	≤ 0.3
Manganeso	≤ 0.1
Magnesio	≤ 125
Selenio	≤ 0.01

Tabla 2. Parámetros químicos: Elementos no esenciales, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012)

Elementos no esenciales	Concentración mg/L
Arsénico	≤ 0.01
Cianuro	≤ 0.05
NO ₃	≤ 50.0
NO ₂	≤ 3.0
Cadmio	≤ 0.01
Mercurio	≤ 0.001
Plomo	≤ 0.05

Tabla 3. Parámetros químicos: Sustancias orgánicas, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012)

Sustancias orgánicas	Concentración µg/L
Tetracloroetano	≤ 40
Benceno	≤ 10
Tolueno	≤ 700
Xilenos	≤ 500

Tabla 4. Parámetros químicos: Plaguicidas, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012)

Plaguicidas	Concentración µg/L
DDT+DDD+DDE	≤ 2
2,4 D	≤ 30
Lindano	≤ 2
Metoxicloro	≤ 20
Pentaclorofenol	≤ 9

Tabla 5. Parámetros químicos: Productos secundarios desinfección, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012)

Productos secundarios de desinfección	Concentración mg/L
Monocloramina	≤ 3.0
Dibromoclorometano	≤ 0.1
Bromodiclorometano	≤ 0.06
Tribromometano	≤ 0.1
Trihalometanos	≤ 1.0
Triclorometano	≤ 0.2

Tabla 6. Parámetros químicos: Organolépticos, agua potable NCh409. Extraído de: (Echeverría, 2012)

Organolépticos	Valor o característica
Amoniaco	≤ 1.5 mg/L
Cloruros	≤ 400 mg/L
Sulfatos	≤ 500 mg/L
pH	6.5 -8,5
Sólidos disueltos	≤ 1500 mg/L
Color	≤ 20 unidades Pt-Co
Olor	Inodora
Sabor	Insípida
Compuestos fenólicos	≤ 0.002 mg/L

Para el rubro cervecero es importante considerar el contenido de sales como calcio, magnesio y el bicarbonato de calcio ya que estos compuestos determinan el pH inicial. Por otro lado, el sodio, el cloro y el sulfato afectan en el sabor del mosto. Mientras mayor sea el pH inicial menor es la calidad de la cerveza resultante, además la composición del agua utilizada puede influir en la formación de *off-flavors* (aromas no deseados). Algunos efectos que causan la presencia de ciertos iones en el agua se muestran en la Tabla 7.

Tabla 7. Iones presentes en la cerveza y sus efectos. Extraído de: (Larroque,2020)

IONES	FÓRMULA	EFEECTO
Bicarbonato	HCO ₃ ⁻	Aumento de pH
Calcio	Ca ⁺²	Disminución de pH
Cloro	Cl ⁻	Dulzor, efecto contrario al sulfato
Hierro(II)	Fe ⁺²	Metálico, astringente
Hidronio	H ₃ O ⁺	Disminución pH, potencia al amargor
Magnesio	Mg ⁺²	Cofactor de varias enzimas
Sodio	Na ⁺²	Dulce, ácido en alta concentración
Sulfato	SO ₄ ⁻²	Sequedad, astringencia, potencia amargor

2.3.2 Grano

Existen parámetros definidos para determinar la calidad del grano, lo cual interfiere en el producto final, la humedad, la pureza varietal, el poder germinativo, la sensibilidad al agua, el porcentaje de proteína, el peso y tamaño del grano entre otros, además de las características subjetivas como el color, olor y aspecto. Dependiendo del estilo que se quiera lograr sirven diferentes características que se buscan en el grano para producir la cerveza (ARIAS, 1991).

La cebada (*Hordeum vulgare*) es el grano que aporta el almidón requerido para la elaboración de la cerveza, este grano debe pasar por un proceso previamente a ser utilizado, para pasar a ser malta (cebada malteada). Existen distintos tipos de cebada, pero se tienen variedades bastante marcadas, está la de tipo invernal y la cebada de verano, también se pueden clasificar según el orden de los granos o por cantidad de hileras, por lo general estas se distinguen por los rendimientos de cultivo. Se sabe que existen alrededor de 500 variedades de cebadas, pero las que se utilizan en el rubro cervecero se limitan según restricciones según el rendimiento de formación de granos, capacidad de absorber agua, la sensibilidad al agua, el poder germinativo, capacidad de formación de enzimas y el rendimiento en extractos en el malteado. La cebada tiene una estructura externa e interna, dependiendo de su formación aumentará o disminuirá su calidad para la producción de cerveza. (Kunze, 2006)

Su composición química (en base seca) es en su mayoría hidratos de carbono con un 70-85%, luego vienen las proteínas entre 10.5 a 11.5 %, sustancias minerales 2 - 4 %, también grasas 1.5-2.0% y otras sustancias de 1 a 2%. Los hidratos de carbono son mayormente almidones, azúcares, celulosa y hemicelulosa, lo cual es muy importante para el proceso de elaboración de cerveza. El almidón está contenido en la parte del endospermo que es parte de la estructura interna del grano, y constituye el 50-65% de la cebada. (Kunze, 2006).

2.3.3 Lúpulo

El lúpulo es una planta, la cual es crucial para la elaboración de la cerveza, donde solo se utilizan las inflorescencias de las plantas femeninas, estas flores contienen resinas amargas y aceites etéreos, dando así amargor y aroma a la cerveza. Se cultivan principalmente en Alemania, EE.UU, Republica Checa y China. Existen muchas variedades de lúpulos, y se clasifican según las variedades aromáticas, variedades amargas y variedades de alto contenido de α-ácidos (Almaguer et al., 2014).

En su composición química tiene proteínas 20%, compuestos amargos (β -ácidos inicialmente, luego pasan a α -ácidos) 18.5%, sustancias minerales 8%, taninos (polifenoles hidrosolubles) 3%, aceite de lúpulo 0.5% (terpenos), y el resto es celulosa. Los α -ácidos además de ser los principales causantes del amargor de la cerveza, son tensioactivos ayudando a estabilizar la espuma de la cerveza, también contribuyen a sus propiedades antisépticas dando estabilidad biológica a la cerveza, y es el factor que define el valor comercial del lúpulo. Los terpenos cumplen un rol fundamental en las características del lúpulo siendo los componentes que definen el aroma de la cerveza, formados por la volatilización del aceite de lúpulo (Kunze, 2006).

2.3.4 Levadura

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares, pertenecientes al reino Fungi, estos fueron los primeros en ser utilizados como fuente de proteína. Existen especies patógenas y otras que llevan siglos siendo utilizadas para elaborar alimentos fermentados (Larroque, 2020).

Una de las levaduras más estudiadas es la *Saccharomyces cerevisiae*, la cual está aprobada para ser utilizada como aditivo alimentario, es una levadura heterótrofa, y consigue energía mediante el consumo de glucosa (Suárez-Machín et al., 2016).

Como anteriormente se mencionó, para la elaboración de cerveza se utilizan levaduras convencionales como la *Saccharomyces cerevisiae* y la *Saccharomyces pastorianus*, para elaborar las cervezas de tipo Ale y Lager. Por lo general las levaduras utilizadas en el rubro cervecero son del género *Saccharomyces*, y se utilizan principalmente por su capacidad de producción de etanol, la ausencia de generación de toxinas, su alta tolerancia al alcohol, y su habilidad de lograr una buena fermentación incluso en presencia de oxígeno. Además, estas levaduras logran contribuir en los perfiles organolépticos y producen algunos compuestos de *flavor*, lo cual es una combinación de aromas, sabores y sensaciones en boca (Burini et al., 2021). Se sabe que el etanol, el dióxido de carbono y el glicerol son los principales compuestos producidos en la etapa de fermentación, sin embargo, estos no tienen una repercusión significativa en el aroma y sabor de la cerveza resultante, sino que, son los metabolitos secundarios los que determinan el *flavor* del producto final, tales como los carbonilos (aldehídos y cetonas), alcoholes superiores, ésteres, dicetonas, diacetilo, ácidos grasos y orgánicos, compuestos azufrados y compuestos fenólicos (phenolic *off-flavors*, POF) (Olaniran et al., 2017)

Sin duda, es crucial mantener los compuestos de sabor y aroma dentro de ciertos límites, ya que un exceso de estos podría prevalecer y afectar negativamente el equilibrio sensorial de la cerveza (Guido et al., 2004).

2.4 Proceso de elaboración de la cerveza

El proceso de elaboración de la cerveza consta de una serie de pasos, los cuales varían respecto a las técnicas empleadas por cada cervecería (industrial o artesanal), y también de las recetas utilizadas, provocando diferencias entre los productos que se tienen en el mercado. En la Figura 2 se encuentran las principales etapas de fabricación de la cerveza, las cuales

corresponden a la fase de malteado, molienda, maceración, filtración, cocción, fermentación, enfriamiento y maduración.

El proceso de elaboración de la cerveza se describe según Gisbert Verdú (2016).

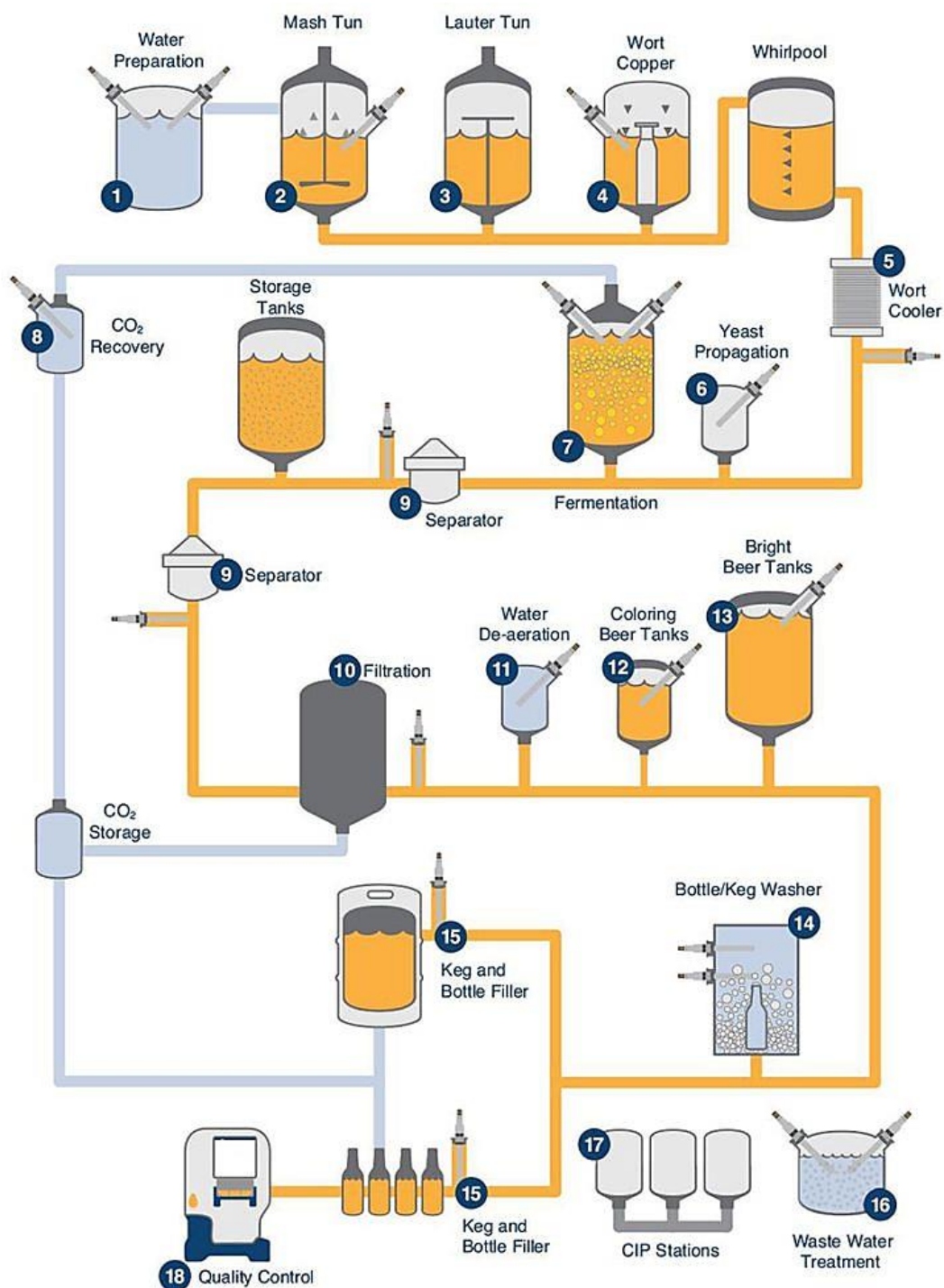


Figura 2. Proceso de elaboración de la cerveza (Brewing). Fuente: (Hamilton, sf)

2.4.1 Malteado

El malteado, es un pretratamiento que se le realiza al grano, para que esté acondicionado y pueda ser utilizado en el proceso de elaboración de la cerveza, de hecho, este paso generalmente no lo realizan las cervecerías, pero aun así es un paso que no puede faltar para hacer la bebida.

Comienza cuando se remoja el grano, conservando una humedad entre el 35 - 45%, posteriormente se realiza en un proceso de germinación, donde el grano remojado reposa unos días, controlando la temperatura y humedad para aumentar la actividad enzimática, causando la descomposición de proteínas, haciendo que se transformen en aminoácidos, y liberando los carbohidratos (almidones) contenidos en el grano. Luego, se interrumpe la germinación, aplicando calor a los granos para reducir su humedad hasta un 2 o 3%. El tostado de la malta es determinante para dar color y aromas al grano, lo que influye directamente en la cerveza resultante. Finalmente, se eliminan las raíces y tallos que hayan crecido en el proceso de germinación, y la malta está lista para ser utilizada.

2.4.2 Molienda

La molienda, es la trituration mecánica de los granos, el propósito de esta etapa es exponer el almidón para que las enzimas logren descomponer la mayor cantidad de sólidos insolubles y transformarlos en azúcares fermentables en la maceración. Otra finalidad es homogenizar el tamaño del sólido, y para esto generalmente se utilizan molinos de rodillos ajustables (2 rodillos).

2.4.3 Maceración

La maceración es el primer paso para producir el mosto y demora un tiempo entre 60 y 90 min, en esta etapa se incorpora el grano molido a un tanque de maceración con agua, la cual debe estar precalentada a unos 70°C y con un pH de 5.5 ± 0.1 aproximadamente. En este proceso, se busca extraer la mayor cantidad de azúcares fermentables, y para ello hay que favorecer la actividad enzimática. Al tratarse de diferentes enzimas se tienen distintos puntos óptimos de temperatura y pH, pero el rango de interés de la temperatura oscila entre los 55 y 68 °C para obtener una mayor conversión, y con respecto al pH lo ideal es mantenerlo relativamente ácido, aunque este parámetro no afecta tanto como la temperatura. En la Tabla 8 se encuentran algunas de las enzimas que normalmente están presentes en el proceso de maceración.

Tabla 8. Principales enzimas que actúan en el proceso de maceración. Fuente: (Gisbert Verdú, 2016)

Enzimas	Otros nombres
α -amilasa bacteriana	D-aldohexopyranosiddehydrogenase
α -amilasa fúngica	Glucosidexylosyltransferase
Amilo glucosidasa	Amylo-(1,4 to 1,6)transglucosidase
Pululasana	α -dextrin endo-1,6- α -glucosidase
β -glucanasa bacteriana	β -glucosidekinase
β -glucanasa fúngica	
Xilanasa	Endo-1,4- β -xylanase
Proteasas neutras	α -lyticendopeptidase
α -acetatodescarboxilasa	ALDC

Según Kunze (2006), el objetivo de la maceración es degradar totalmente el almidón, y conseguir azúcares y dextrinas solubles. Todas las sustancias que entran en solución se denominan extracto, el cual se forma en esta etapa del proceso debido a la actividad enzimática.

La actividad enzimática es altamente influenciada por la temperatura, dependiendo del tipo de enzima tiene un valor óptimo de temperatura, también es importante no exceder los límites de este parámetro ya que puede ocurrir la inactivación (desnaturalización) enzimática, así también la actividad enzimática es afectada por el valor del pH.

La degradación del almidón consta de 3 etapas, el engrudamiento (hinchamiento y apertura de los granos de almidón en solución caliente y acuosa), la licuefacción (ruptura de cadenas largas de almidón por α -amilasa) y la sacarificación (rompimiento de cadenas, formación de residuos de glucosa por β -amilasas). Luego de este proceso, se obtienen azúcares fermentables como maltotriosa, maltosa y glucosa, mientras que el extracto fermentable queda conformado por glucosa y fructosa (11.9%), sacarosa (5.1%), maltosa (65.4%), maltotriosa (17.6%).

2.4.4 Filtración

Este proceso es fundamental, es el intermedio entre la maceración y la cocción, se produce al trasladar el mosto producido en la maceración. El tanque de maceración cuenta con un fondo falso, el cual tiene orificios por donde puede pasar el extracto, pero no el grano, por lo que, para mover el mosto a la olla de cocción es importante que la bomba que lo succiona no utilice una potencia tan alta, porque de esa forma pasarían granos a la fuerza, lo cual es perjudicial para el proceso.

Después de que la maceración termina y se pasa el mosto a la olla de cocción, lo ideal es “lavar” el grano con agua a 70°C para retirar los azúcares restantes y optimizar la eficiencia del proceso.

2.4.5 Cocción

Esta etapa consiste en hervir el mosto, con la finalidad de eliminar agentes patógenos. Por las altas temperaturas (sobre 100°C) se mueren las enzimas presentes, también precipitan

proteínas con polifenoles, los cuales deben ser retirados en su mayoría, el agua comienza a evaporarse por ende el mosto aumenta su concentración de azúcar y también se evaporan compuestos aromáticos indeseados. El tiempo de este proceso acaba entre 60 y 90 min.

Por otra parte, este es el punto donde generalmente se agrega el lúpulo, el cual le da atributos aromáticos y amargor al mosto, de hecho, existen diferentes técnicas para añadir el lúpulo, puesto que dependiendo del resultado que se quiera tener cambia el momento de incorporarlo, si se agrega al inicio de esta etapa le proporcionará mayor amargor al mosto.

Finalizando esta etapa una opción es pasar el mosto a un Whirlpool, para que este sea agitado, aireándolo y también para que decanten los sólidos restantes del mosto para quitar un poco la turbidez de la bebida. Se aprovecha de enfriar el mosto al momento de trasladarlo, haciéndolo pasar por un intercambiador de placas.

2.4.6 Enfriamiento

En esta etapa se debe reducir la temperatura del mosto, dependiendo del estilo de cerveza que se está haciendo, debe estar entre los 18 - 21°C para una fermentación de tipo ale, o 7 - 13°C si se trata de una fermentación de tipo lager. Esta etapa se realiza para poder incorporar la levadura sin que estas mueran. Generalmente se utilizan intercambiadores de placas o de serpentín.

2.4.7 Fermentación

La fermentación es un proceso catabólico de oxidación incompleta, es decir, se degradan sustancias complejas en otras más simples, no requiere oxígeno y se forman moléculas de ATP. Este proceso se conforma de diferentes etapas, primero ocurre la glucólisis, donde se oxida la glucosa hasta ácido pirúvico, obteniéndose 2 ATP por molécula de glucosa, luego de la formación de ácido pirúvico viene otra cadena de reacciones donde se produce el compuesto final de la fermentación.

Las fermentaciones más conocidas son:

- Fermentación alcohólica. Es un proceso donde las levaduras tienen el mayor protagonismo, puesto que estas consumen los azúcares presentes como la glucosa, la fructosa, la sacarosa, etc, transformándolos en alcohol (etanol) y CO₂. Esta fermentación es utilizada para los procesos de elaboración de la cerveza, vino, sidra, entre otros. En la actualidad se está probando este tipo de fermentación para usar el etanol resultante como biocombustible.
- Fermentación acética: En esta fermentación actúan bacterias acéticas del género acetatobacter, las cuales en presencia de oxígeno transforman el alcohol etílico en ácido acético, característico por ser el compuesto principal del vinagre.
- Fermentación láctica: Aquí actúan las bacterias ácido-lácticas en ausencia de oxígeno, consumiendo el azúcar presente (generalmente monosacáridos) para excretarlos como ácido láctico. Generalmente, esta fermentación se utiliza mucho en

alimentos, puesto que estas bacterias, pueden dar diversos atributos a los alimentos y lo más importante es que genera la desactivación de los procesos de descomposición.

En el caso de la elaboración de cerveza como se mencionó anteriormente ocurre una fermentación de tipo alcohólica, realizándose mediante un sistema de cultivo batch, haciéndose una sola vez la carga de microorganismos (en este caso levaduras).

Ahora bien, el mosto es introducido en un fermentador, donde se debe incorporar la levadura, y dependiendo del tipo de levadura usada, cambian los atributos del producto final, es decir, se producen estilos de cervezas diferentes.

- Fermentación de tipo ale (alta fermentación): La levadura que generalmente se usa es la *Saccharomyces cerevisiae* que fermenta entre 18-21° durante 2-5 días y se posiciona en la parte superior del fermentador. Las cervezas de fermentación alta suelen ser más turbias y el olor tiene tendencias a ser afrutado, especiado, etc. Con respecto al sabor, suelen ser robustos, con más cuerpo.
- Fermentación lager (baja fermentación): En esta fermentación pueden verse diversos géneros de levaduras como la *Saccharomyces carlsbergensis* o también la *Saccharomyces pastorianus*, su rango de operación óptimo de temperatura es entre los 7 a 13 °C, su fermentación dura de 1 a 3 semanas y se posiciona en la parte inferior del fermentador. Las cervezas obtenidas por esta fermentación son transparentes, de baja turbidez, y olfativamente sutil, siendo proporcionados mayoritariamente por las maltas y lúpulos utilizados. Tiene texturas más ligeras.
- Fermentación lámbica: Esta fermentación ocurre de manera espontánea, son las más antiguas y difíciles de producir, puesto que, en vez de alimentar levaduras al mosto en un fermentador, esta debe fermentar a partir de las bacterias que hay en el ambiente, por ende, requiere de mucho tiempo (1 a 3 años) y suelen tener mucha menos cantidad de CO₂.

Para que asegurar la fermentación dentro del equipo, se debe tener un mosto que cumpla con los siguientes requerimientos:

- Debe contener aproximadamente 79 g/L de fuente de carbono, precisamente de azúcares fermentables.
- Fuente de nitrógeno (aminoácidos) en una cantidad de 200 mg/L- 230 mg/L.
- Minerales.
- Vitaminas.
- Oxígeno inicial para el crecimiento de las levaduras, en un rango de 8 – 10 mg/L.

Por otro lado, con respecto a la cinética de crecimiento de los microorganismos, esta tiene diferentes etapas, como se puede observar en la Figura 3.

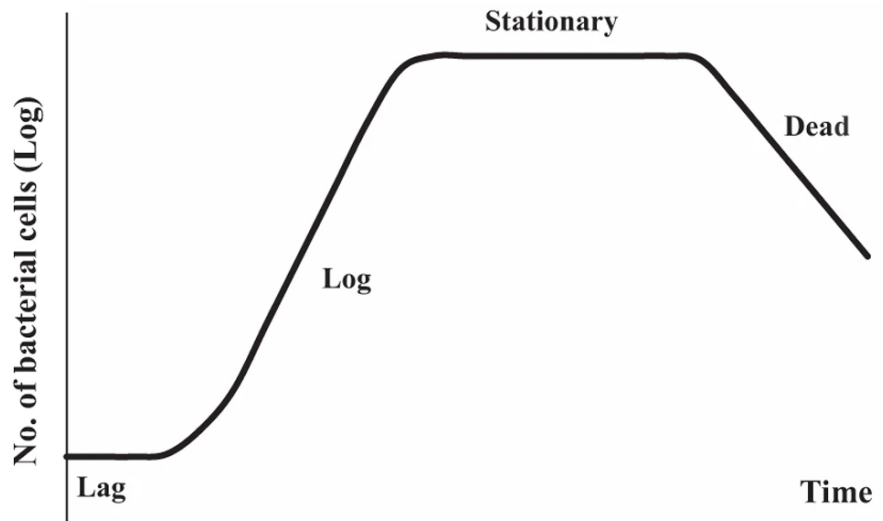


Figura 3. Representación gráfica de la curva típica de crecimiento bacteriano en medio de cultivo. Fuente: (Wang et al., 2015)

La fase de lactancia es en el momento en el que los microorganismos están adaptándose al sustrato, en la fase II comienzan a crecer y además se comienzan a producir los metabolitos primarios, que en el caso de la cerveza sería el etanol, luego en la fase III algunas levaduras comienzan a morir y por ende la fermentación comienza a detenerse, además se comienzan a formar los metabolitos secundarios, el cual sería CO₂. Finalmente, se llega a la fase estacionaria donde la mayoría de los microorganismos se mueren y se detiene la fermentación. Igualmente, al finalizar la fermentación se pueden formar subproductos indeseados tales como diacetilo, aldehídos, alcoholes superiores, ésteres y compuestos de azufre (Wang et al., 2015).

2.4.8 Maduración

Una vez pasada la etapa de fermentación se tiene la maduración de la cerveza, aquí se realizan las terminaciones finales de la bebida alcohólica. Para ello es muy importante el control de la temperatura, que dependiendo del estilo de cerveza se utilizará un rango específico de este parámetro, con el cual se trabajará durante 1 semana hasta incluso 3 meses.

Aquí lo que se quiere es eliminar la mayor cantidad de levadura del fermentador para evitar olores y sabores indeseados en el producto final, como también ayuda a clarificar la cerveza, esto se logra haciendo purgas de los compuestos que decantaron en el fermentador.

Cabe destacar que en esta etapa es donde comienza a formarse más cantidad de CO₂ en la cerveza, por lo que dependiendo de la temperatura de maduración habrá mayor o menor cantidad de CO₂ disuelto en la bebida.

Una vez que la cerveza está lista puede envasarse en diversos formatos, para ser comercializada.

2.5 Levaduras no *Saccharomyces* y bacterias

Las levaduras no convencionales están comenzando a ganar su lugar dentro de las cervecías dada la búsqueda intensiva de diferenciación productiva, la exigencia del consumidor y la competencia en la industria. Las levaduras no *Saccharomyces* disponen de una limitada capacidad fermentativa producto de su baja eficiencia metabólica primaria, destacando el metabolismo secundario, el cual impacta en la calidad organoléptica de la cerveza resultante, son capaces de proporcionar aromas y sabores distintivos, a través de sistemas biológicos (*bioflavoring*). Por lo mismo, son ampliamente usadas en conjunto a las *Saccharomyces cerevisiae*, para obtener mayor cantidad de etanol y aprovechar la formación subproductos deseados por los enólogos (Michel et al., 2016). Esto da paso a diferentes aplicaciones, principalmente como la producción de cervezas bajas o sin alcohol, también en cervezas bajas en calorías, o cervezas funcionales (Basso, 2019).

Las levaduras no *Saccharomyces* han tenido una importante participación en procesos de vinificación, contribuyendo en su composición aromática, formando ésteres, alcoholes superiores y compuestos aromáticos azufrados, favoreciendo el perfil organoléptico y definición del vino. A diferencia de las levaduras *Saccharomyces*, las no convencionales excretan una amplia diversidad de enzimas extracelulares tales como glucosidasas, lipasas, proteasas, entre otras, las cuales se caracterizan por alterar compuestos del mosto transformando algunos en activos aromáticos, obteniendo así una composición completamente diferente a la que se produce por una fermentación regular (Larroque, 2020).

En los últimos años la media de la concentración de etanol en vinos se ha visto en aumento, dado que los consumidores tienden a preferir estilos de vinos con mayor madurez, y una mayor madurez de la uva provoca un aumento en el contenido de azúcares totales del mosto, y a su vez el de alcohol. Este último afecta las propiedades sensoriales del vino, disminuyendo su calidad organoléptica, y por ello que se busca constantemente reducir la cantidad de etanol en el producto. Las levaduras no *Saccharomyces* son una opción conveniente dada su baja capacidad de completar la fermentación, por la baja tolerancia al alcohol y por no poder metabolizar todos los azúcares disponibles (Contreras et al., 2014).

Con el tiempo el nivel de exigencia de los consumidores de bebidas alcohólicas como el vino y la cerveza ha aumentado, y por ende se buscan alternativas para diferenciar los productos, y es aquí donde las levaduras no convencionales juegan un rol fundamental.

En la actualidad, se está evaluando el efecto de estos microorganismos en la elaboración de cerveza, dándole atributos sensoriales diferenciales, o llegando a productos bajos en calorías, sin alcohol, e incluso funcionales. Es por esto que, se estudió el efecto de las siguientes levaduras:

- *Candida boidinii*
- *Candida oleophila*
- *Metschnikowia pulcherrima*

El género *Candida spp* es filogenéticamente heterogénea, se pueden encontrar alrededor de 314 especies, se caracterizan por ser mesófilas, creciendo de buena manera entre 25 a 30°C, no crece en un ambiente anaerobio, es capaz de fermentar varios azúcares, logra asimilar nitrógeno, además de producir compuestos de interés como alcoholes superiores, ácidos orgánicos, ésteres, diacetilos, glicerol, etc. Además, logran excretar enzimas de gran valor comercial como pectinasas, β -glucosidasas, proteasas, invertasas, amilasas y lipasas (García et al., 2018).

Por otra parte, el género *Metschnikowia*, es capaz de producir vinos con menor concentración de etanol que vinos fermentados con levaduras convencionales, además en cultivos secuenciales se demostró un aumento de ésteres y alcoholes superiores (Contreras et al., 2014).

Por lo general tienen mayor actividad al inicio de la fermentación y su crecimiento disminuye con el aumento de la concentración de etanol, aun así, la fermentación con este género de levaduras produce un perfil aromático complejo, ya que excretan β -glucosidasa y α -L-ramnosidasa, quienes interactúan con precursores del aroma (Kelanne et al., 2022).

Adicionalmente, se evaluó la utilización de bacterias ácido-lácticas (BAL) en la elaboración de cervezas. Estas bacterias están relacionadas con la fermentación láctica, donde transforman azúcares fermentables en ácido láctico. Además, realizan la fermentación málica la cual es muy valorada en el proceso de vinificación puesto que transforma el ácido málico en ácido láctico. El efecto más apreciado de este tipo de fermentaciones va más allá de la capacidad de acidificación del medio y preservación del alimento, puesto que se consiguen cambios positivos en las texturas, sabores y olores en el producto final (Åvall-Jääskeläinen & Palva, 2005). Mediante las BAL se producen subproductos de alto interés como enzimas digestivas, vitaminas, sustancias antibacterianas, definidas como potencial probiótico provocando un impacto beneficiario para nuestra salud al ser consumidos, ayudando en la reconstrucción y refuerzo de la microflora intestinal (Beekwilder et al., 2009). Por lo que para este caso de estudio se utilizará la bacteria ácido-láctica *Lactobacillus fructivorans* y *Leuconostoc mesenteroides*.

Con respecto al tipo de cultivo de estos microorganismos se tienen diferentes técnicas, una de estas es el monocultivo, el cual consiste en hacer crecer un cultivo puro, es decir, que solo está presente un microorganismo. También se tiene el co-cultivo, donde se encuentra presente más de un microorganismo, esta técnica tiene mayor complejidad puesto que no siempre pueden coexistir al mismo tiempo los microorganismos de interés, a veces se utiliza más de un sustrato para este cultivo. Otra técnica es la inoculación secuencial, donde primero se añade un microorganismo y luego otro, de modo que, en este caso, la fermentación se realice en partes, obteniendo resultados diferentes en ambas etapas debido a las condiciones del medio y al microorganismo utilizado (Del Fresno et al., 2017).

En este caso de estudio se utilizó la técnica del co-cultivo, en configuración levadura-bacteria, ya que comúnmente se realizan levadura-levadura, y así observar las interacciones, crecimiento y comportamiento de los microorganismos. Este método se ha utilizado

arduamente en los procesos de vinificación, estudiando levaduras *Saccharomyces* en conjunto a no convencionales. Obteniendo tasas de crecimiento mayores que las de monocultivo, además de concentraciones mayores de alcoholes superiores que una de un cultivo puro y secuencial (Portaro et al., 2022).

En la Figura 4, se puede apreciar el consumo de azúcares en el tiempo, en monocultivo, co-cultivo y secuencial, donde Sc corresponde a *Saccharomyces cerevisiae* y Sj se atribuye a *Schizosaccharomyces japonicus*. Destacando que las dos primeras tienen un consumo similar, mientras que los microorganismos en fermentación secuencial toman mucho más tiempo en consumir los azúcares.

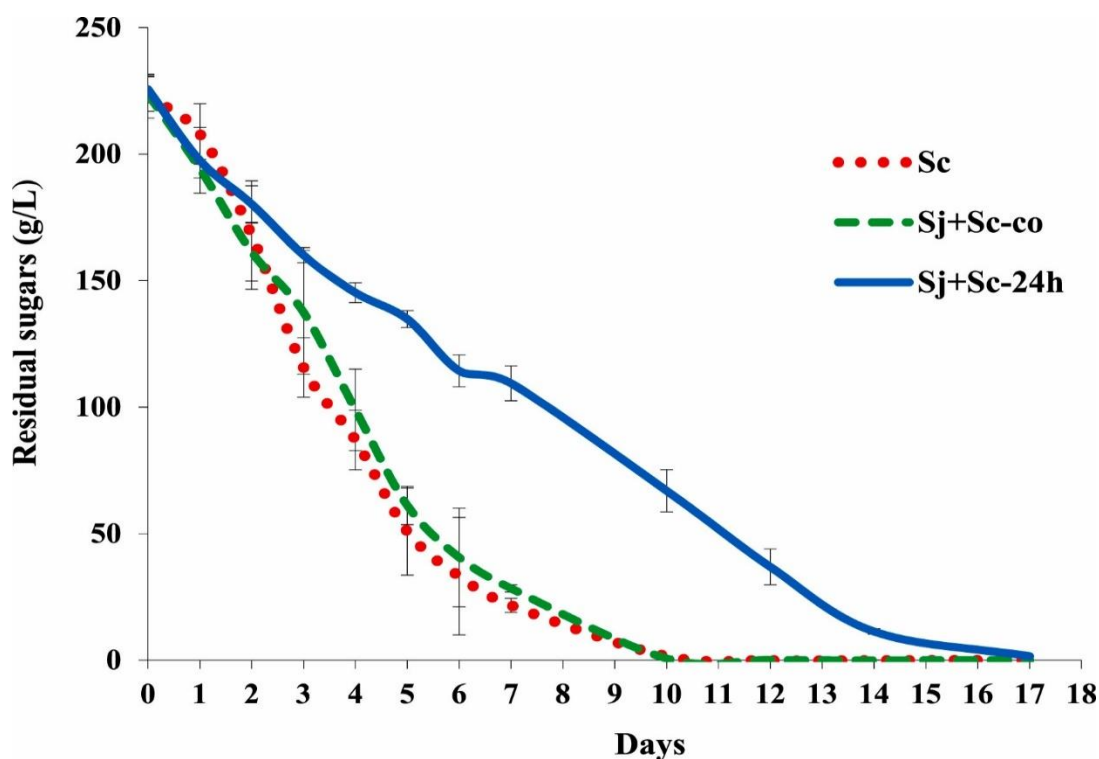


Figura 4. Consumo de azúcar en ensayos de control (Sc) (línea de puntos) y fermentación mixta: cultivo coinoculado (Sj + Sc-co) (línea discontinua) y cultivo secuencial (Sj + Sc-24h) (línea completa). Fuente: (Portaro et al., 2022).

2.6 Compuestos volátiles

Está comprobado que existe una gran variedad de compuestos que cumplen un rol importante en el desarrollo en el sabor y propiedades sensoriales de la cerveza, afectando directamente en la calidad del producto final. Existen alrededor de 800 compuestos diferentes que influyen en el sabor y aroma de la cerveza (*flavor*), algunos de estos se pueden clasificar como alcoholes superiores, ésteres, ácidos grasos, compuestos carbonílicos, compuestos de azufre, terpenos, compuestos furánicos, fenoles volátiles, entre otros. Estos aromatizantes activos provienen de diferentes orígenes, como la cebada y lúpulo, subproductos metabólicos de los microorganismos, microorganismos contaminantes o de la estabilidad de los compuestos aromatizantes en la maduración de la cerveza (Olaniran et al., 2017).

A pesar de que las sustancias antes mencionadas se producen a concentraciones muy bajas, influyen en la complejidad de los aromas de las bebidas fermentadas, es por esto que, un cambio leve en sus concentraciones puede afectar en gran proporción en el *flavor* de la cerveza (Loviso & Libkind, 2018), (Olaniran et al., 2017).

2.6.1 Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores se generan en el proceso metabólico de la levadura como metabolitos secundarios de la síntesis de aminoácidos a partir del piruvato a través de la vía anabólica o mediante el catabolismo de la vía catabólica (Pires et al., 2014).

Los principales alcoholes superiores que se encuentran en las bebidas alcohólicas son los alcoholes alifáticos, n-propanol, 2-metilpropan-1-ol, 3-metilbutan-1-ol y los alcoholes aromáticos β -feniletanol y alcohol bencílico. Dependiendo de la concentración presente en la cerveza su impacto puede ser positivo o negativo, por ejemplo, el hexan-1-ol, puede tener un impacto negativo en las bebidas debido a sus notas herbáceas y grasosas. El alcohol isoamílico es el componente más relevante para el sabor dentro del grupo de alcoholes superiores, influyendo en la percepción de la bebida, ya que un aumento en su concentración puede hacer que el sabor de la cerveza sea más robusto, en cuanto a la ingestión o inhalación de este compuesto provoca efectos sedantes, hipnóticos y anticonvulsivos similares a los del etanol. Por otra parte, el alcohol isobutílico puede tener un efecto no deseado en la calidad de la cerveza si su concentración supera el 20% de la suma total de n-propanol, alcohol isobutílico y alcohol isoamílico, (Kobayashi et al., 2006).

2.6.2 Ésteres

Estos compuestos son los más volátiles presentes en la cerveza, es por ello que, influye directamente en el aroma de esta. La formación de ésteres está estrechamente relacionada con el crecimiento de la levadura y el metabolismo de los lípidos, siendo un producto de la fermentación (Olaniran et al., 2017).

Dependiendo de las concentraciones puede generar una mejora en el carácter del aroma de la cerveza, cuando hay un exceso de estos compuestos otorgan tendencias muy afrutadas, lo cual logra ser indeseable para los consumidores. Por otra parte, al encontrarse muchas variedades pueden provocar un efecto sinérgico entre ellos, afectando el sabor de la cerveza incluso encontrándose por debajo de las concentraciones del umbral de precepción (Pires et al., 2014).

Existen dos categorías principales de ésteres volátiles presentes en bebidas fermentadas. El primer grupo incluye ésteres acetatos, como por ejemplo el acetato de etilo (aroma a disolvente), el acetato de isoamilo (aroma a plátano), y el acetato de feniletilo (rosas y miel). Mientras que la segunda categoría engloba los ésteres etílicos, incluyendo el hexanoato de etilo (aroma a semilla de anís y manzana), el octanoato de etilo (aroma a manzana agria) y el decanoato de etilo. De estos ésteres, el acetato de etilo suele estar presente en mayor concentración y representa aproximadamente un tercio del total de ésteres en la cerveza. Dada su solubilidad en lípidos, los ésteres etílicos tienen la capacidad de difundirse a través de la membrana celular hacia el medio de fermentación, lo que explica sus concentraciones más elevadas en la cerveza. Por otra parte, los ácidos grasos de cadena más larga, como los

ésteres de acetato de etilo, se forman dentro de las células de levadura durante la fermentación y permanecen dentro de esta (Saerens et al., 2008).

El umbral de percepción de acetato de etilo es de 30 mg/L (en el caso del estilo lager <5 mg/L), el acetato de isoamilo y acetato de 2-deniletilo se acepta sobre 2 y 3,8 mg/L, respectivamente, mientras que el hexanoato de etilo posee un umbral de concentración por debajo de 0,005 mg/L, el de octanoato de etilo de 0,5 mg/L y decanoato de etilo de 1,5 mg/L. Cuando se superan los umbrales de concentración se generan *off-flavors* (Šmogrovičová & Dömény, 1999).

2.6.3 Terpenos

Estos compuestos son derivados del lúpulo y proporcionan notas florales en el espectro del aroma de la cerveza, dentro de los principales se tiene linalol, α -terpino, β -citronelol, geraniol y nerol (Michel et al., 2016).

En la Tabla 9, se presentan los umbrales de algunos monoterpenos importantes y su descripción aromática:

Tabla 9. Descripción de los monoterpenos más relevantes encontrados en la cerveza. Fuente: (Larroque, 2020)

Monoterpenos	Umbral de percepción mg/L	Descripción aromática
Linalol	0.005	Lavanda
α -Terpinol	0.002	Lila
β -Citronelol	0.008	Limón, lima
Geraniol	0.006	Rosa
Nerol	0.5	Rosa, cítrico
β -Mirceno	1.9	Picante, balsámico
Limoneno	0.2	Limón

2.6.4 Compuestos carbonilos

En la cerveza los compuestos carbonilos se encuentran en bajas concentraciones, estos se originan durante la elaboración del mosto, a través de procesos como las reacciones de Maillard y la oxidación de lípidos, como también por las vías metabólicas que conducen a la formación de alcoholes superiores durante la fermentación. El acetaldehído, que se genera en el metabolismo de la levadura durante la conversión de glucosa en alcohol, aporta un distintivo sabor a manzana verde. Este compuesto es de particular relevancia debido a su papel como intermediario en la producción de etanol y acetato. El umbral de sabor del acetaldehído oscila entre 10 y 20 mg/L, y su presencia en la cerveza por encima de este valor puede resultar en sabores desagradables a "hierba". No obstante, muchos catadores pueden percibir este compuesto en niveles mucho más bajos (Lodolo et al., 2008).

2.6.5 Compuestos sulfurados

Estos compuestos provienen de las materias primas (lúpulo, malta o levadura), desarrollándose mediante la degradación térmica de estas. Los compuestos de azufre son de gran importancia para las levaduras ya que son requeridos para el crecimiento y metabolismo

de estas, ayudando en la formación de aminoácidos y proteínas, adicionalmente aportan a las propiedades organolépticas de la cerveza.

Se clasifican en volátiles y no volátiles, los primeros cumplen un rol predominante en la determinación del *flavor* de la cerveza, como por ejemplo el metanotiol, etanotiol, sulfuro de dimetilo, disulfuro de dimetilo, metional, metionol, acetato de 3-(metiltio) propilo, entre otros. La mayoría de los compuestos generan aromas no deseados (huevo podrido, repollo, cebolla, ajo), pero hay algunos que logran una influencia positiva en el sabor (frutal) (Mora Pesántez, 2021).

En la Tabla 10, se presentan algunos de los compuestos azufrados y sus descriptores de sabor:

Tabla 10. Compuestos de azufre y su descriptor de sabor. Extraído de: (Mora Pesántez, 2021).

Compuesto de azufre	Descriptores de sabor
Sulfito	Picante
Sulfuro de hidrogeno	Huevo podrido
Dioxido de azufre	Sulfuroso, fósforo quemado
Metanotiol	Putrefacción, desagüe
Etanotiol	Putrefacción
Propanotiol	Putrefacción, caucho
Dietil sulfuro	Maíz dulce, tomates enlatados
Dimetil disulfuro	Vegetales cocidos
Dietil disulfuro	Ajo, caucho quemado
Dimetil tridulfuro	Vegetales podridos
Metil tioacetato	Repollo
Etil tioacetato	Repollo
Metionol	Papa cruda

2.6.6 Dicetonas Vecinales

Las dicetonas vecinales provienen del metabolismo de los aminoácidos en las levaduras. Principalmente se encuentra la presencia de la 2,3-butanodiona (diacetilo) y 2,3-pentanodiona en la cerveza y son de alta importancia ya que estas determinan el tiempo de maduración de la cerveza. El diacetilo tiene una mayor influencia en el perfil organoléptico que la 2,3-pentanodiona, y se reconocen por sabores indeseables en la cerveza como el sabor a mantequilla (Cañamar Pimentel, 2007).

Las concentraciones típicas y su límite de detección organoléptico se encuentran en la Tabla 11:

Tabla 11. Dicetonas y su concentración típica, con su límite de detección organoléptico. Extraído de: (Cañamar Pimentel, 2007)

Dicetona	Concentración típica en cerveza [mg/L]	Límite de detección organoléptico [mg/L]
2,3-butanodiona	0.06	0.15
2,3-pentanodiona	0.01	0.9

CAPÍTULO III: MATERIALES Y MÉTODOS

3. Materiales y métodos

3.1 General

Se experimentó con 3 levaduras nativas no convencionales, *Candida oleophila* (CO), *Candida boidinii* (CB) y *Metschnikowia pulcharrima* (MP), todas en cultivo mixto con *Lactobacillus fructivorans* (LF o B18) y *Leuconostoc mesenteroides* (LM o B44). Además, se tendrá un control de cultivo puro de *Saccharomyces cerevisiae*. Todos los experimentos se hicieron en triplicado en matraces Erlenmeyer de 500 mL fermentando a 30°C.

En la Figura 5 se tiene un desglose del trabajo experimental desarrollado en esta investigación. Se exponen las combinaciones de microorganismos utilizadas en las microfermentaciones.

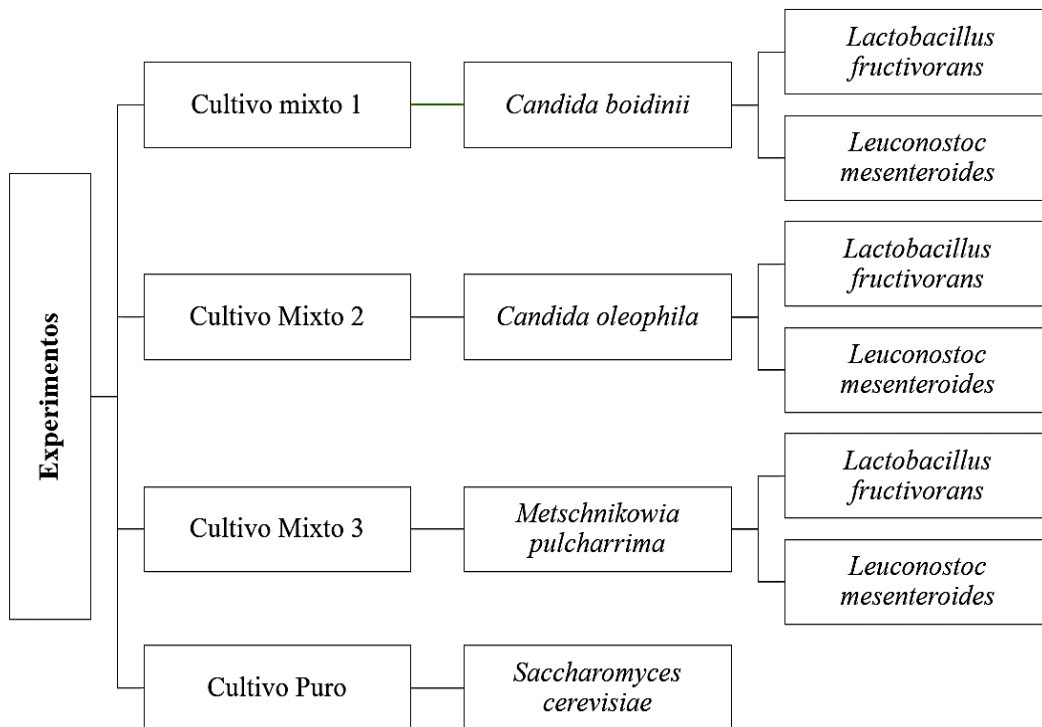


Figura 5. Desglose de experimentos.

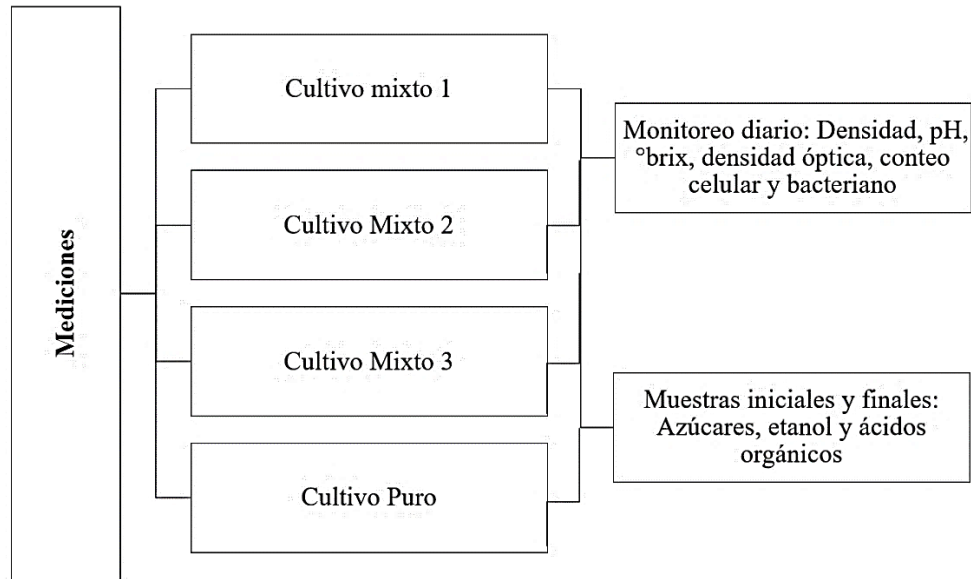


Figura 6. Mediciones iniciales, durante y finales de fermentaciones.

En la Figura 6 se tienen las mediciones realizadas, donde se observó el comportamiento cinético de la fermentación de todos los experimentos. Se llevó a cabo un monitoreo diario, donde se midió densidad, pH, °brix, densidad óptica, conteo celular y bacteriano para cada cultivo. Además, se cuantificaron metabolitos finales e iniciales (etanol, azúcares y ácidos orgánicos) de los experimentos a través de métodos cromatográficos.

3.2 Preparación de materia prima

Se utilizaron dos microorganismos, levaduras no *Saccharomyces* dos del género *Candida spp* y una del género *Metschnikowia spp*, y bacterias ácido-lácticas de tipo *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. Los microorganismos son obtenidos de la librería de microorganismos UTFSM-PUC, en formato de cultivo stock, estos fueron aislado de experimentos anteriores, se conserva a -80°C en una congeladora (Haier ULT Frezzer, DW-86W100J, China), y está diluido en glicerina en razón 1:4. El cultivo stock se deja a temperatura ambiente, y una vez que está líquido se debe traspasar a placas Petri de 90 mm, con un asa bacteriológica, dejándolos crecer por 24 a 48 hrs (Figura 7).



Figura 7. Placas con crecimiento de 24 hrs.

Las placas tienen medios de agar diferentes dependiendo del microorganismo, en el caso de trabajar con levaduras se utiliza el Yeast and Mold Agar (YMA), y cuando se trabaja con bacterias se utiliza el MRS Agar, estos medios se esterilizan en un reactor autoclave (Amilab, Chile) durante 15 min a 121°C (autoclavar), se calculan 20 mL de agar por placa. Es importante que las placas también estén estériles, generalmente se ocupan placas de plástico que vienen estériles de fábrica, y en el caso de utilizar placas de vidrio esterilizan en una estufa (Memmert, uf 55, Alemania) a 170°C por 2 horas.

Una vez crecidos los microorganismos, se traspasan de las placas a tubos Falcon de 50 mL, con un asa bacteriológica, al igual que en el caso anterior, se usan medios líquidos diferentes para cada microorganismo, para bacterias se prepara MRS Broth y para levaduras se prepara Saborand Dextrosa Broth (SDB).

Cabe destacar que, para hacer el preinóculo se debe mantener un ambiente estéril, por lo que se trabaja entre mecheros, para evitar contaminaciones. Luego de inocular el medio líquido se deja crecer por 24 a 48 horas manteniendo una temperatura de 30°C.

Antes de realizar el montaje de las fermentaciones se debe asegurar la concentración de los preinoculos, se busca que el inóculo contenga 10^6 [células vivas/mL] y 10^6 [UFC/mL] por matraz. Para ello, en el caso de las bacterias se utiliza una curva de calibración que relaciona la absorbancia con la concentración. Y en el caso de las levaduras se obtiene a través de un conteo en microscopio (Montic, BA310), donde se asocia la cantidad de células vivas en los cuadrados de una cámara de Neubauer con la dilución de la muestra, obteniendo así el volumen a inocular.

Finalmente, para el control con *Saccharomyces cerevisiae*, se usa una comercial en formato polvo (Safale S-05, EE.UU), la cual se diluye en razón 1:10 con agua peptonada estéril para formar el preinóculo.

3.3 Preparación del material

Todo lo que entra en contacto con los microorganismos debe estar estéril, para evitar contaminación, es por esto que previo al montaje de los experimentos se debe autoclavar todo el material a 121°C por 15 min o esterilizar en la estufa a 170°C por 2 horas.

Materiales a esterilizar:

- Agua peptonada
- Puntas para pipetas
- Tubos ependorf
- Matraces Erlenmeyer
- Vaso precipitado de 5 litros
- Probeta de 1 litro

3.4 Montaje de experimentos

Para el hacer el montaje de los experimentos, se inicia preparando los medios para las fermentaciones (sustrato), el cual contiene 150 g/L de extracto de malta (bacteriological malt

extract, Biokar Diagnosis, Francia), como fuente de azúcares (glucosa, maltosa, fructosa, sacarosa, trisacáridos y dextrinas) y vitaminas (Tiamina, biotina, riboflavina, ácido nicotínico, ácido fólico e inositol), 10 g/L de extracto de levadura (yeast extract, Biokar Diagnosis, Francia) como fuente de nitrógeno, estos se preparan en fracos shot de tapa rosca de 1 litro y se hierven antes de esterilizarlos. Una vez esterilizado el medio se añaden 2.2 g/L de lúpulo (Cascade, BarthHaas), y se simula la etapa de hervor del proceso de elaboración, por ende, las condiciones de temperatura y tiempo son 100°C y se mantienen por 30 min. Una vez que pasa este tiempo, se debe enfriar rápidamente, para que el lúpulo no isomerice, por lo que se somete a un baño de agua con hielo. Cuando este se enfría se debe filtrar con gasa, para distribuirlo en los matraces Erlenmeyer de 500 mL, estos tienen sondas para toma de muestras y un airlock para liberar el CO₂ sin que ingrese aire. Finalmente, se puede realizar la inoculación de todos los matraces y posteriormente se sellan todas las aberturas del matraz con papel Parafilm y se dejan en una incubadora con agitación (MRC, TOU200, Israel) a 30 °C con 100 RPM.

Las fermentaciones mixtas son: *C. boidinii* + *L. fructivorans*, *C. oleophila* + *L. fructivorans*, *M. pulcherrima* + *L. fructivorans*, *C. boidinii* + *L. mesenteroides*, *C. oleophila* + *L. mesenteroides*, *M. pulcherrima* + *L. mesenteroides*. Mientras que el control hace referencia a la fermentación de cultivo puro de *S. cerevisiae*.

Todo el proceso descrito previamente se debe realizar en un ambiente estéril, utilizando mecheros y en todo momento desinfectando con etanol, ya sean las superficies o las manos.

3.5 Monitoreo y mediciones

3.5.1 Monitoreo diario de fermentaciones

Se tomaron 2 muestras diarias por matraz, midiendo densidad con picnómetro, viendo así la evolución de la cinética de la fermentación, también se midieron °brix en refractómetro (Hanna Instruments, HI 96811), para observar el comportamiento del consumo de azúcares. También se midió densidad óptica en espectrofotómetro, para ver el crecimiento celular, se hizo conteo celular en microscopio, para saber el número de células vivas por mL de muestra, y además se hizo conteo bacteriano en placas y mediciones de pH.

Las muestras son tomadas en un ambiente estéril para evitar contaminaciones, por medio de la sonda instalada en el matraz, se utilizan jeringas estériles para sacar estas muestras, y se llenan tubos Falcon de 15 mL. Estas muestras se diluyen en razón 1:10 en agua destilada, aunque para la *Saccharomyces cerevisiae* se utilizó agua peptonada ya que así se mantienen más células vivas. Se necesita muestra diluida para el conteo celular y para medir absorbancia, por lo que para el primero, se debe disponer de tubos Ependorf con 0.25 mL de agua destilada, 0.25 mL de azul de metileno, y así colocar 0.5 mL de muestra, se extrajeron 0.2 mL de la mezcla a una cámara de Neubauer y se realizó el conteo celular en microscopio. Para esto se deben contar las células transparentes de 5 cuadros, los cuales contienen 16 cuadrados pequeños para tener una buena representatividad, donde las células que se ven azules o celeste están muertas, mientras que las que se ven transparentes se contabilizan como vivas, tal como se aprecia en la Figura 8.

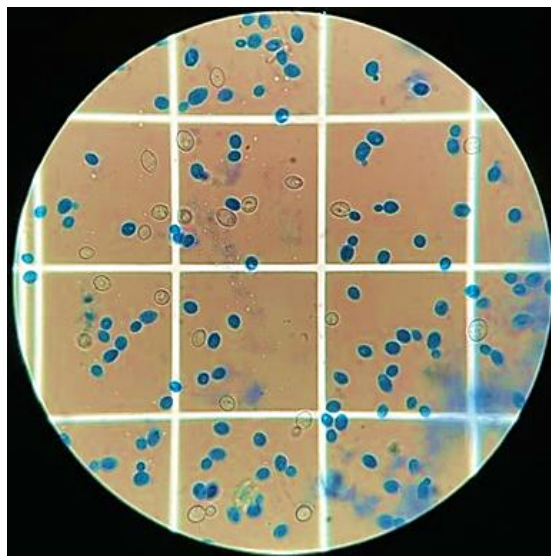


Figura 8. Conteo celular en microscopio.

En cambio, para las demás mediciones se necesitó la muestra sin diluir, para el caso del conteo bacteriano, se sacó 0.1 mL y se diluyó en 0.9 mL de agua peptonada, en tubos Ependorf, siendo esa la primera dilución de 10^{-1} UFC/mL, luego se sigue diluyendo hasta 10^{-5} UFC/mL. Cuando las diluciones están listas, se sacan 3 gotas por dilución para colocar en cada esquina de placa, marcando con su dilución y cultivo correspondiente, al cabo de 2 días se logra hacer el conteo bacteriano.

3.5.2. Mediciones de muestras iniciales y finales.

Para medir metabolitos finales se aplicarán diferentes métodos, se utilizará cromatografía líquida para el caso de la cuantificación e identificación de azúcares y ácidos orgánicos, mediante HPLC con detector ELSD y UV respectivamente, mientras que para etanol se realizará a través de cromatografía de gases con detector FID.

Determinación de azúcares: Para la realización de este análisis cromatográfico se utiliza el equipo HPLC con detector de dispersión de luz evaporativa (ELSD) waters 2424, y también lo compone un desgasificador, una bomba y un horno de columna, se usó una columna Inertsil NH2 5 μ m de diámetro de partícula, 15 cm de largo, (GL Sciences) como fase estacionaria, y como fase móvil acetonitrilo de grado HPLC (Multisolvant, Scharlau) y agua ultrapura (Purificador MILLIPORE Simplicity), con un gradiente inicial de 85% y 15% respectivamente. En la sección del inyector se encuentra un loop el cual se debe limpiar con agua milli Q por cada inyección y también se debe ambientar para asegurar el correcto ingreso de muestra al equipo.

Antes de comenzar a analizar las muestras se realiza una curva de calibración con estándares de concentraciones conocidas, para ello se usa fructosa: D-Fructosa 98,8% (Central Drug House (P) Ltd.), glucosa: D-Glucosa, Anhidra (pureza no especificada) (J.T. Baker), sacarosa: D (+)-Sacarosa 99,7% (ACROS ORGANICS), Maltosa: D-(+)-Maltosa monohidrato 99% (SIGMA-ALDRICH), Maltotriosa: Maltotriosa 95% (SIGMA-ALDRICH).

Para realizar las mediciones de las muestras, estas deben ser pretratadas, inicialmente se deben centrifugar a 3500 RPM durante 15 minutos, para separar los sólidos suspendidos (residuos de lúpulo y levaduras) de la muestra líquida, esta última se diluye con fase móvil y se afora en matraces 5 mL, y para eliminar el oxígeno disuelto se utiliza ultrasonido (Ultrasonic Cleaner Single Frequency Type, BIOBASE) por 15 minutos, debido a que la presencia de burbujas puede dañar el equipo o producir errores en las mediciones, al terminar nuevamente se centrifugan por 15 minutos a 3500 RPM, ya que se genera un precipitado producto de la mezcla de muestra con fase móvil. Luego, se utilizan filtros de 0.22 μm (membrana MCE, JET BIOFIL) y tubos Eppendorf de 1.5 mL para dejar lista la muestra inyectable.

En la preparación de la muestra, se utilizan diluciones 1:5 y 1:50 mL muestra/mL total, ya que dependiendo de la muestra hay azúcares que solo son cuantificables con la primera dilución y otros solo con la segunda.

La muestra es inyectada de forma manual y tiene un tiempo de procesamiento de 30 minutos, cuando se consiguen los cromatogramas, se analiza el área de los peaks, con la curva de calibración se puede determinar a qué analito corresponde según tiempos de retención y a la vez cuantificar su concentración según el área del peak.

Determinación de ácidos orgánicos: Para este análisis se usa un HPLC con detector UV de longitud de onda múltiple (Ultimate 3000) compuesto por bomba, un muestreador automático (autosampler) y compartimiento de columna, en este caso la fase estacionaria es una columna de intercambio iónico Aminex HPX-87H 300 mm x 7.8 y 9 μm de diámetro de partícula (Bio-rad). La fase móvil corresponde a ácido sulfúrico 0.005 M (PA, 95 – 97%, Merck) y agua ultrapura (purificador de agua MILLIPORE Simplicity).

La longitud de onda utilizada para detectar los analitos es de 220 nm, el flujo de fase móvil es de 0.6 mL/min, el volumen de inyección es de 20 μL y la temperatura de la columna es de 50°C.

Para armar la curva de calibración se usan estándares de concentraciones conocidas, en este caso se trabaja con ácido acético: ácido acético 100% (SIGMA-ALDRICH), ácido láctico: L-(+)-ácido láctico 98% (SIGMA-ALDRICH), ácido málico: DL-ácido málico (pureza no especificada) (Merck), ácido tartárico: L (+) ácido tartárico AR 99,75% (CDH).

El pretratamiento de las muestras comienza con la centrifugación de estas a 3500 RPM por 15 minutos, separando los restos sólidos de levadura y lúpulo, luego la fase líquida se mezcla con fase móvil a razón 1:5 mL muestra/ mL solución, luego de esto las muestras son sometidas a ultrasonido durante 15 minutos para eliminar el oxígeno disuelto, luego se filtran (filtros MCE de 0.22 μm) y son inyectadas en viales ámbar de 1.5 mL para posteriormente colocarlas en el compartimiento del autosampler.

Entre mediciones se configura para que se mida un blanco, el cual corresponde a fase móvil pura, para así lograr limpiar la columna y prevenir una alteración en los resultados del análisis. Cuando se consiguen los cromatogramas, se analiza el área de los peaks, con la curva

de calibración se puede determinar a qué analito corresponde según tiempos de retención y a la vez cuantificar su concentración según el área del peak.

Determinación de etanol: La cuantificación de etanol se hace a través de un cromatógrafo de gases acoplado a un detector de ionización de llama (GC-FID, HP 5890 SERIES II), como fase estacionaria se tiene una columna capilar 007-634, Cyanopropylphenyl Methylpolysiloxane de 60 L x 0.25 mm (ID) x 1.4 μm espesor de película, QUADREX, el ajuste del equipo es Splitless. La muestra se entra al sistema al ser inyectada (200 μL , jeringa Gastight Samplelock) donde un horno la vaporiza, este horno inicialmente parte en 40°C pero va aumentando en el tiempo a 10°C por minuto hasta llegar a los 250°C, luego el gas portador el cual se transporta la muestra, en este caso se usa Nitrógeno a 30 mL/min, al llegar al detector se mezcla con hidrogeno y aire (gas auxiliar) quemándose en la llama. La muestra emite una señal eléctrica la cual es leída por el equipo.

En este caso la curva de calibración se realiza solo con etanol: etanol 100% (Supelco). Por otra parte, la muestra es previamente tratada, tomando 5 mL de muestra líquida se añade a vial Headspace con sello crimp de 20 mL, y 5 mL de agua ultrapura, con 1 g de cloruro de sodio el cual cumple el rol de agente extractor al promover la volatilización de alcoholes en la muestra, y 200 μL de metanol para aplicar correcciones a los resultados y aumentar la precisión de estos. Una vez sellado el vial con agitador metálico, se pone en un baño termostático a 80 °C por 30 minutos mientras se mezclan los compuestos, pasado el tiempo la muestra está lista para ser inyectada.

Determinación de compuestos volátiles: El análisis de los compuestos volátiles presentes en la cerveza fue llevado a cabo por el laboratorio de servicios analíticos de la Pontificia Universidad Católica de Valparaíso. Para este propósito, se empleó el sistema GC-MS HeadSpace SPME. Se extrajeron 3 mL de la muestra, y se agregaron 0.5 g de NaCl. Posteriormente, se procedió a incubar la muestra a 40°C durante una hora bajo agitación magnética. Al término de este periodo, la fibra SPME fue inyectada en el sistema cromatográfico. Se utilizó un equipo GC-MS de la marca Shimadzu, modelo GCMS-QP5050, para llevar a cabo el análisis. La identificación de los compuestos se efectuó a través de la base de datos del equipo, donde se va comparando los analitos de la muestra con los compuestos de la biblioteca del equipo.

Las condiciones cromatográficas fueron las siguientes: Columna cromatográfica RTX-5 (30 m, 0.25 mm ID, 0.25 μm df), temperatura columna 40°C, temperatura inyector 230°C, temperatura detector 270°C, sampling time 1.00 min, presión columna 48.9 KPa, flujo 1.0 mL/min, gradiente de temperatura: 5 min a 40°C, 4 °C/min hasta 130°C, 3 min a 130°C, 5°C/min hasta 230°C y 10 min a 230°C.

3.6 Análisis estadístico

Para realizar el análisis estadístico de los resultados se utilizará la técnica ANOVA y el test de Turkey con un intervalo de confianza del 95%. Este análisis se aplicará en los resultados de grado alcohólico entre las fermentaciones, para así tener un método correctamente comparativo.

El Análisis de la Varianza (ANOVA) es una técnica estadística empleada para contrastar las medias de conjuntos de datos, determinando si hay divergencias de importancia entre ellas. Si la variabilidad entre los conjuntos es superior a la variabilidad dentro de los conjuntos, entonces es probable que exista una diferencia de importancia en las medias. En cambio, si la variabilidad dentro de los conjuntos supera a la variabilidad entre los conjuntos, entonces cualquier disparidad percibida en las medias podría ser simplemente aleatoria.

Por otra parte, el método de Turkey es complementario al ANOVA, y se utiliza para establecer intervalos de confianza que abarquen todas las diferencias en parejas entre las medias de los datos, manteniendo bajo control la tasa de error en el conjunto a un nivel específico (5% en este caso). Para mitigar el aumento en la tasa de error, el método de Tukey ajusta el nivel de confianza de cada intervalo individual para que el nivel de confianza resultante concuerde con el valor que se haya especificado.

CAPITULO IV: RESULTADOS

4. Resultados

En la Tabla 12 se definen las abreviaciones correspondientes a cada microorganismo utilizado en fermentaciones, para comprender los resultados.

Tabla 12. Definición de abreviaturas para cada microorganismo utilizado en investigación.

Abreviación	Microorganismo
LF	<i>Lactobacillus fructivorans</i>
LM	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
CB	<i>Candida boidinii</i>
CO	<i>Candida oleophila</i>
MP	<i>Metschnikowia pulcherrima</i>
SC	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>

4.1 Perfil fermentativo

La densidad de la cerveza se mide para estimar el contenido de carbohidratos en g/L, siendo una medida indirecta de los azúcares presente en el mosto/cerveza, el consumo de azúcares está relacionado con la formación de alcohol (Kunze, 2006). Los valores finales de la densidad varían respecto al estilo de la cerveza, pero estos oscilan entre 1,006 y 1,040 según Brewers Association (2022).

En la Figura 9 y 10, se presentan los valores de la densidad en el tiempo, según cada microfermentación.

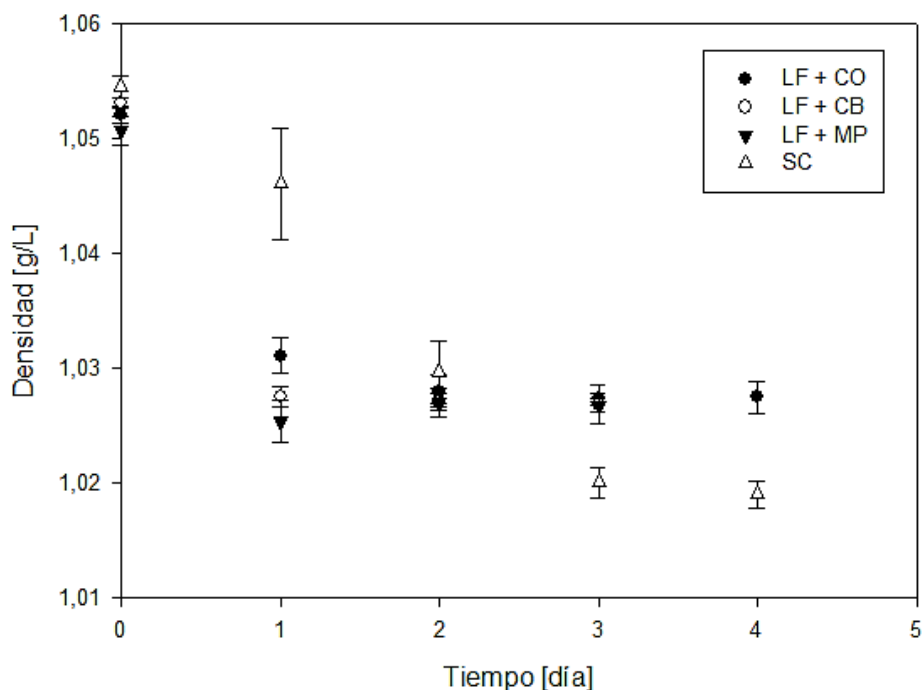


Figura 9. Densidad respecto a los días de fermentación, cultivo mixto con bacteria LF y contraste con SC.

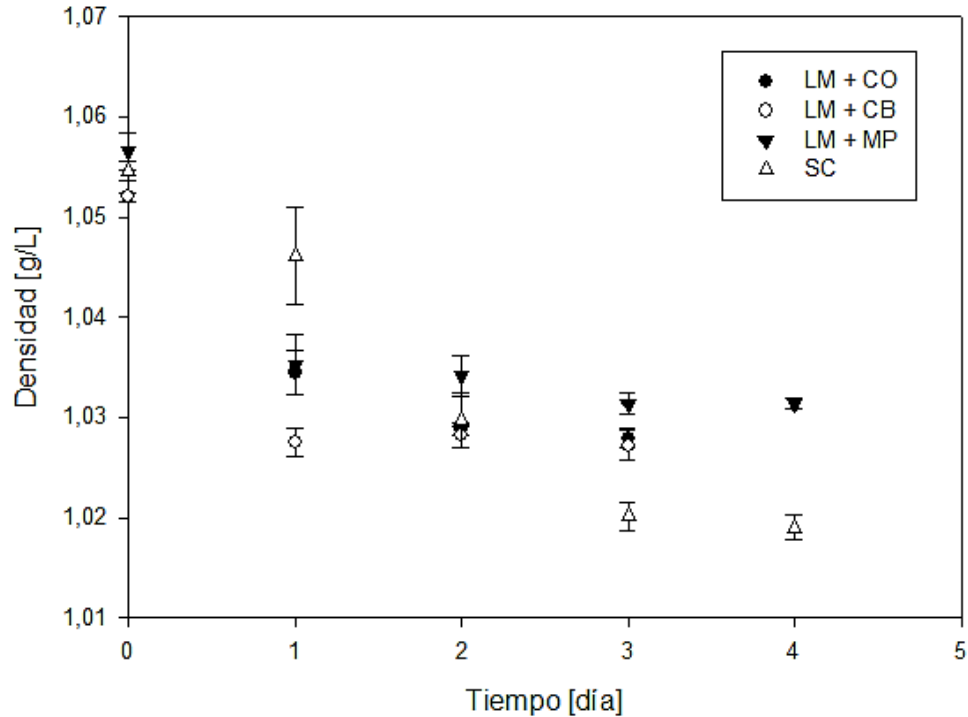


Figura 10. Densidad respecto a los días de fermentación, cultivo mixto con bacteria LM y contraste con SC.

Los valores finales de densidad en cultivos mixtos fluctuaron entre 1.027-1.031 g/L, lo cual es un valor alto para el bajo contenido alcohólico obtenido. Esto sucede ya que las levaduras nativas no son capaces de digerir los azúcares más complejos como la maltosa y la maltotriosa (baja capacidad fermentativa) (Michel et al., 2016).

En contraste con la microfermentación de control con *Saccharomyces cerevisiae* la cual termina con un valor mucho más acorde de 1.017 g/L, esto debido a su capacidad de procesar azúcares complejos antes mencionada.

Respecto a la duración de la fermentación, esta es determinada cuando dos puntos consecutivos de densidad tienen el mismo valor. Se aprecia que los cultivos mixtos demoran 3 días en acabar, mientras que la microfermentación de *Saccharomyces cerevisiae* terminan en 4 días, por lo tanto, los cultivos mixtos reducen el tiempo de fermentación en un 25% respecto del monocultivo tradicional.

Adicionalmente, en la Tabla 13 se tiene la velocidad de crecimiento de cada microorganismo según la fermentación, donde se observa que ambas bacterias tienen una velocidad similar, en cambio las levaduras se ven afectadas según la bacteria, en el caso de *L. fructivorans* tienen un crecimiento más rápido compitiendo con el crecimiento de esta misma, a diferencia del otro cultivo mixto con *L. mesenteroides* donde se ve perjudicada la velocidad de crecimiento de las levaduras. Por otra parte, al comparar con la velocidad de crecimiento de las levaduras nativas con *S. cerevisiae*, esta última se tarda mucho más en crecer, lo cual

también se ve reflejado en la cantidad de células vivas que se encuentran al terminar a fermentación.

Tabla 13. Velocidad de crecimiento de cada microorganismo.

Fermentación	Especie	Velocidad [h-1]
LF+CO	LF	0.203
	CO	0.229
LF+CB	LF	0.203
	CB	0.215
LF+MP	LF	0.229
	MP	0.188
SC	SC	0.060
LM+CO	LM	0.210
	CO	0.107
LM+CB	LM	0.233
	CB	0.127
LM+MP	LM	0.238
	MP	0.100

Por otra parte, el crecimiento de biomasa, medido a través de la densidad óptica la cual es una medida indirecta de la biomasa. En este caso se puede observar en la Figura 11 y 12 que en los cultivos mixtos destaca el crecimiento de la microfermentación de *Lactobacillus fructivorans* con *Candida olephila* y *Leuconostoc mesenteroides* con *Metschnikowia pulcherrima*. Cabe destacar que en todos los casos fue mayor el crecimiento de biomasa en cultivos mixtos que en el monocultivo tradicional.

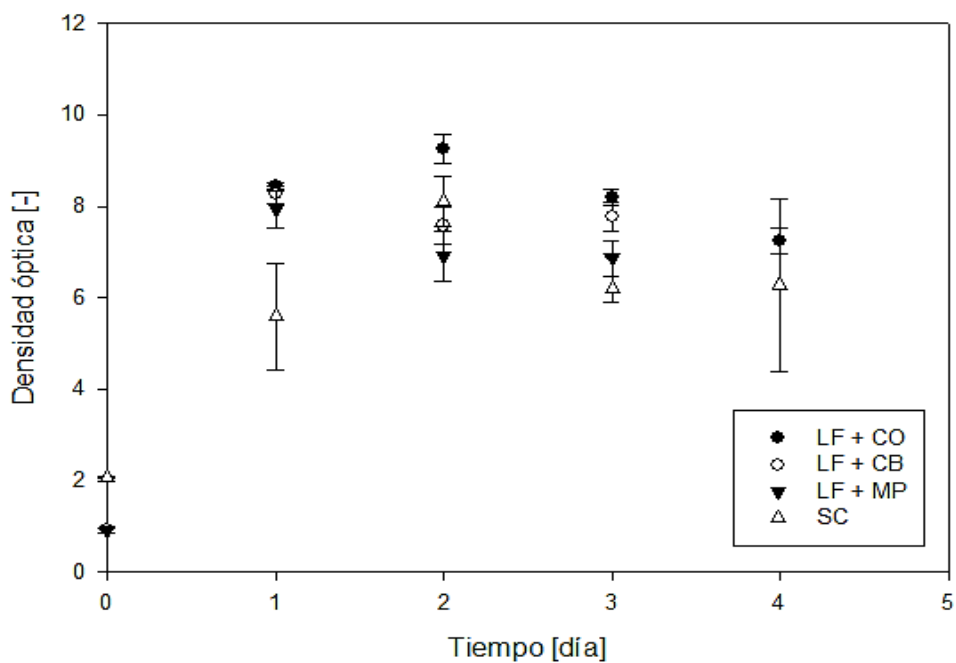


Figura 11. Crecimiento de biomasa según día de fermentación, cultivo mixto con LF en contraste con SC.

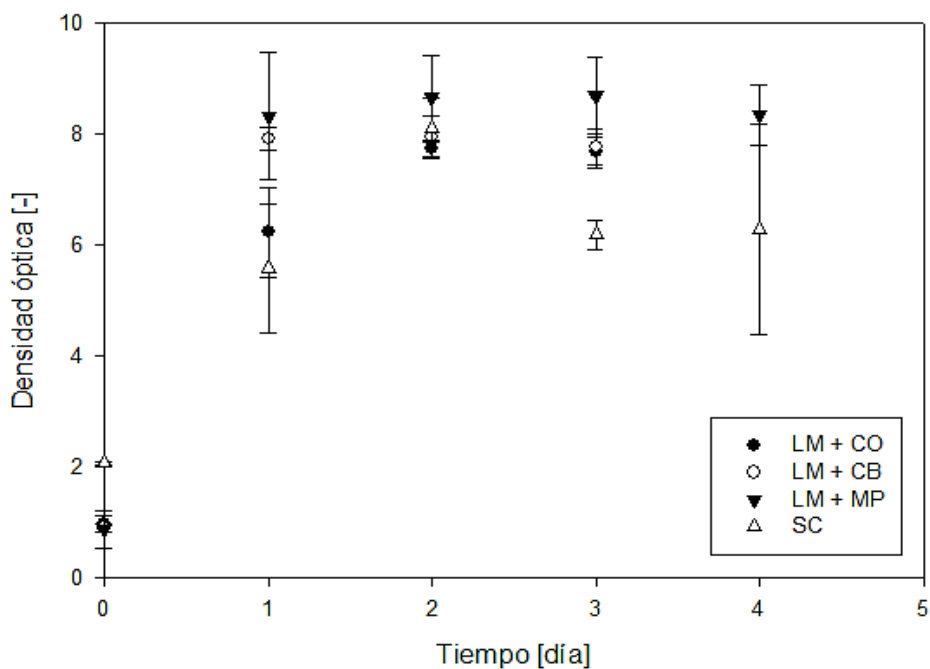


Figura 12. Crecimiento de biomasa según día de fermentación, cultivo mixto con LM en contraste con SC.

Las levaduras tienen la aptitud de sobrevivir en entornos más ácidos, lo que las categoriza como microorganismos resistentes a la acidez, aguantando niveles de pH de 3.5 a 5.5. Esto representa una ventaja al no tener que competir con las bacterias por el sustrato. Mientras

que, las bacterias (externas) son propensas a generar contaminación en medios como el mosto durante la elaboración de cerveza, dado que algunas de ellas no toleran niveles de pH tan bajos, dejando de ser un problema en el producto final (Amaya & Díaz, 2019).

El valor del potencial de hidrógeno (pH) va disminuyendo mientras avanza la fermentación bajando desde 5.6 hasta 4.6 – 4.1, el nivel de acidez, expresado en términos de pH, ejerce una influencia crucial en la calidad de la cerveza y también actúa como control microbiológico aminorando las probabilidades de contaminación por bacterias (Larroque, 2020).

Un pH inferior a 4.4 fomenta la precipitación de compuestos coloidales inestables de proteínas-polifenoles, acelera el proceso de maduración y mejora el sabor de la cerveza. Además, es un requisito previo para garantizar una mayor estabilidad biológica en la cerveza. Niveles de pH más reducidos (especialmente por debajo de 4.1) resultan en un sabor ácido en la cerveza los cuales deben ser evitados. Hay factores favorecen una disminución del valor pH como el ablandamiento del agua (alcalinidad), la acidificación biológica del mosto, calidad del mosto, entre otros (Kunze, 2006).

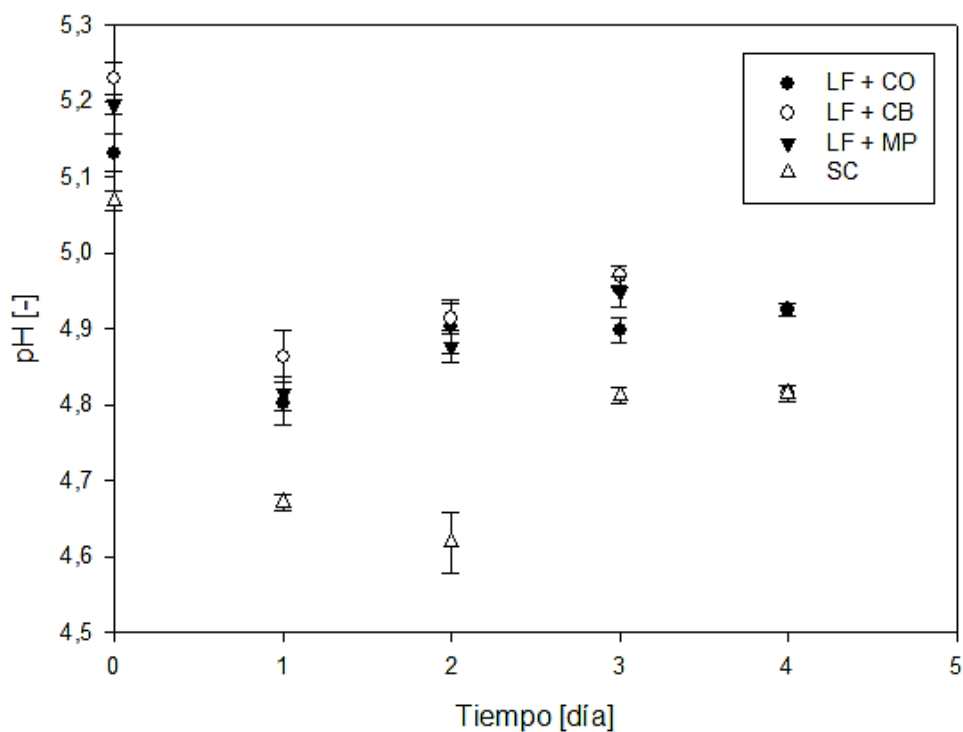


Figura 13. Variación de potencial de hidrógeno (pH) según día de fermentación, cultivo mixto con LF y control con SC.

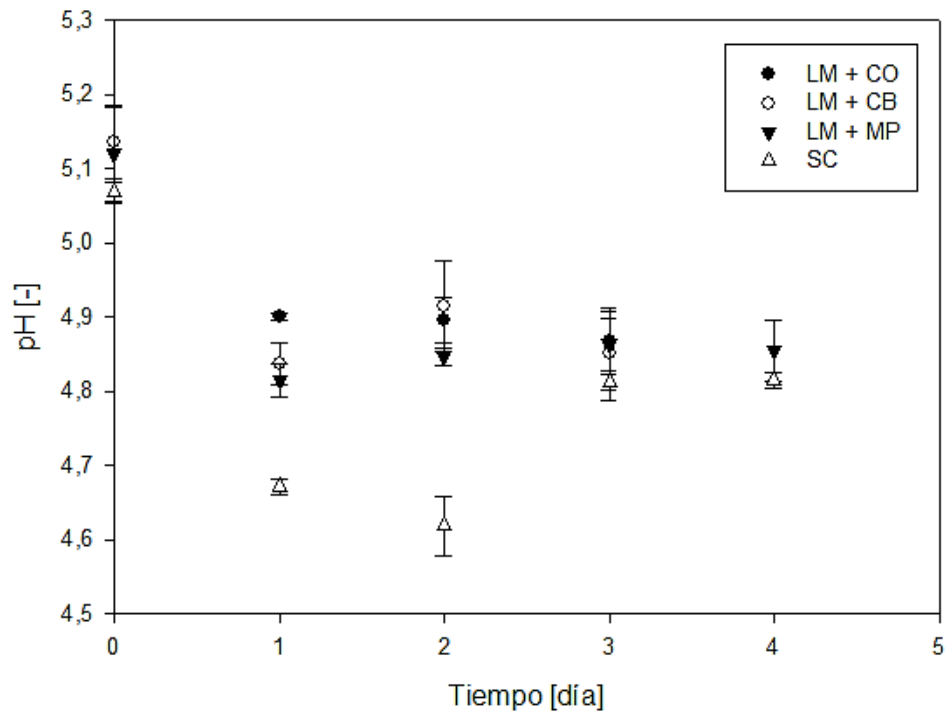


Figura 14. Variación de potencial de hidrógeno (pH) según día de fermentación, cultivo mixto con LM y control con SC.

Con respecto a los valores obtenidos (Figura 13 y 14), el monocultivo finaliza con una mayor acidez en la cerveza lo cual es debido a la producción de ácidos orgánicos en comparación con los cultivos mixtos que presentan una menor acidez final.

4.2 Crecimiento celular

En la Tabla 14 se puede apreciar el crecimiento de biomasa de las microfermentaciones, en todas se presenta un aumento respecto a la concentración inicial, sobresaliendo más el crecimiento bacteriano. Por otra parte, la tasa de crecimiento representa el crecimiento de la población microbiana, se destaca por su rápido y arduo crecimiento las levaduras *Candida boidinii* y *Metschnikowia pulcherrima*, y la bacteria *Leuconostoc mesenteroides*.

El crecimiento de biomasa para los co-cultivos es de 10% a 1026% mayor que el monocultivo convencional.

Finalmente, los cultivos mixtos presentan una mayor tasa de crecimiento y mayor población microbiana respecto del cultivo puro de *Saccharomyces cerevisiae*. Esto ocurre debido a la presencia de más de un microorganismo, los cuales comienzan a competir por el consumo de sustrato (azúcares presentes), provocando un crecimiento más acelerado que un cultivo puro (Portaro et al., 2022).

Tabla 14. Crecimiento celular y bacteriano según fermentación.

Fermentación	Especie	Concentración inicial	Concentración Final	Tasa de crecimiento %
LF+CO	LF	1x10 ⁶ [UFC/mL]	7x10 ⁷ [UFC/mL]	131
	CO	1x10 ⁶ [cel/mL]	3x10 ⁷ [cel/mL]	124
LF+CB	LF	1x10 ⁶ [UFC/mL]	2x10 ⁷ [UFC/mL]	121
	CB	1x10 ⁶ [cel/mL]	1 x10 ⁷ [cel/mL]	117
LF+MP	LF	1x10 ⁶ [UFC/mL]	3x10 ⁷ [UFC/mL]	124
	MP	1x10 ⁶ [cel/mL]	6 x10 ⁷ [cel/mL]	129
SC	SC	1x10 ⁶ [cel/mL]	1 x10 ⁷ [cel/mL]	117
LM+CO	LM	1x10 ⁶ [UFC/mL]	4x10 ⁷ [UFC/mL]	126
	CO	1x10 ⁶ [cel/mL]	1 x10 ⁸ [cel/mL]	134
LM+CB	LM	1x10 ⁶ [UFC/mL]	4x10 ⁷ [UFC/mL]	127
	CB	1x10 ⁶ [cel/mL]	4x10 ⁷ [cel/mL]	126
LM+MP	LM	1x10 ⁶ [UFC/mL]	3x10 ⁸ [UFC/mL]	140
	MP	1x10 ⁶ [cel/mL]	2x10 ⁷ [cel/mL]	122

4.3 Variación del contenido de etanol

En la Figura 15 se observa el contenido de alcohol en las microfermentaciones, donde se aprecia que en cultivos mixtos es menor la producción de etanol que en la fermentación convencional. En específico el contenido de etanol es mayor que lo obtenido por Postigo et al. (2022), con las fermentaciones monocultivo con *M. pulcherrima*, y menores que lo reportado por Einfalt (2021) con la misma especie, por lo que se puede deducir que se encuentra dentro de los rangos estudiados. Por otra parte, las *Candida spp.* logran la reducción de etanol con respecto a una fermentación convencional como lo exponen Benavides et al. (2022), y logran una mayor graduación alcohólica que otras especies del mismo género estudiadas por Michel et al. (2016).

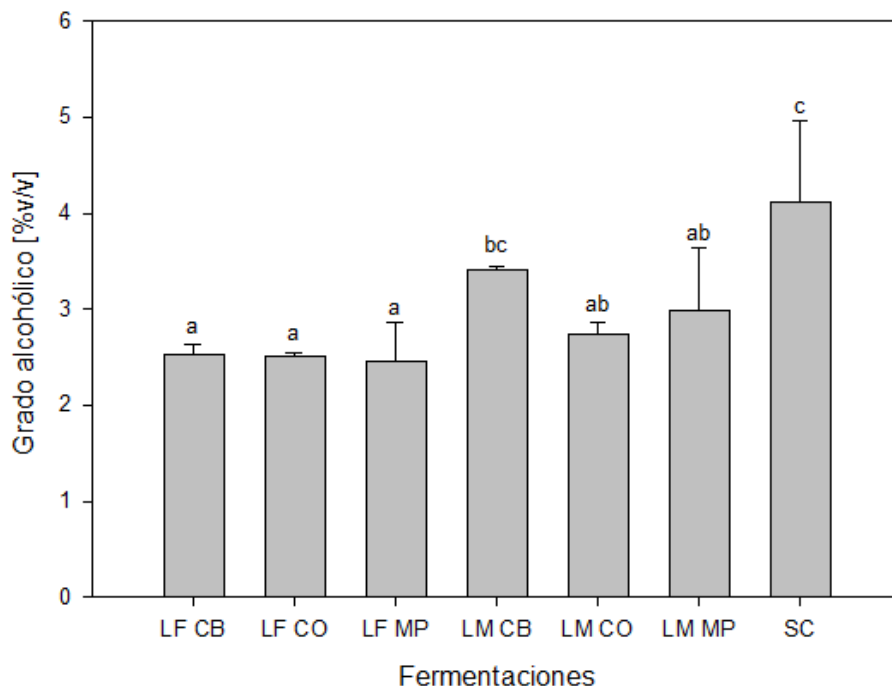


Figura 15. Grado alcohólico de cada fermentación.

Adicionalmente, en la Figura 15 se aprecia que las fermentaciones mixtas con *L. frutivorans* logran un contenido de alcohol muy similar entre sí, sin tener diferencias significativas en sus resultados, mientras que las del co-cultivo con *L. mesenteroides* varían entre sí, y con *C. boidinii* se acerca mucho más a lo obtenido en el monocultivo con *S. cerevisiae*.

Los cultivos mixtos logran una reducción en la producción de etanol de un 17% a 40%, respecto de la fermentación convencional.

4.4 Ácidos orgánicos

Los ácidos orgánicos son metabolitos secundarios muy influyentes en el sabor de la cerveza, dependiendo de la concentración de estos pueden ser más o menos percibidos, pero también son los que determinan el pH de la cerveza resultante, lo cual cumple un rol fundamental para evitar la proliferación de microorganismos deteriorativos (Coote & Kirsop, 1974).

Estos proporcionan información relevante acerca de la calidad y de las propiedades organolépticas de la cerveza. Dentro de los ácidos más importantes que se encuentran presentes en esta bebida alcohólica es el ácido acético, cítrico, láctico, málico y pirúvico (Rodrigues et al., 2010).

La producción o consumo de estos metabolitos depende del microorganismo presente en la fermentación, siendo productos de la glicolisis, el ciclo del ácido cítrico, y el metabolismo de los aminoácidos y ácidos grasos (Larroque, 2020).

En la Tabla 15, 16 y 17, se presentan los valores de ácidos orgánicos resultantes de cada microfermentación obtenidos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) con detector UV.

Tabla 15. Concentraciones iniciales y finales de ácido málico, según cultivo.

Muestras	Ácido málico mg/L		
	Inicial	Final	Consumo (-) / formación(+)
LF+CB	402 ± 32 ^a	329 ± 50 ^a	-73
LF+CO	416 ± 29 ^a	273 ± 38 ^a	-143
LF+MP	402 ± 32 ^a	318 ± 84 ^a	-84
LM+CB	393 ± 89 ^a	261 ± 47 ^a	-132
LM+CO	393 ± 89 ^a	311 ± 41 ^a	-83
LM+MP	393 ± 89 ^a	220 ± 76 ^a	-173
SC	416 ± 29 ^a	1267 ± 280 ^b	851

Tabla 16. Concentraciones iniciales y finales de ácido láctico, según cultivo.

Muestras	Ácido láctico mg/L		
	Inicial	Final	Consumo (-) / formación(+)
LF+CB	21 ± 0 ^a	157 ± 39 ^c	136
LF+CO	84 ± 4 ^b	90 ± 21 ^b	6
LF+MP	21 ± 0 ^a	120 ± 11 ^{bc}	98
LM+CB	30 ± 12 ^a	98 ± 14 ^b	68
LM+CO	30 ± 12 ^a	97 ± 19 ^b	68
LM+MP	30 ± 12 ^a	38 ± 0 ^a	8
SC	85 ± 4 ^b	91 ± 28 ^{ab}	6

Tabla 17. Concentraciones iniciales y finales de ácido acético, según cultivo.

Muestras	Ácido acético mg/L		
	Inicial	Final	Consumo (-)/ formación(+)
LF+CB	329 ± 86 ^a	792 ± 68 ^a	463
LF+CO	444 ± 52 ^{ab}	722 ± 68 ^a	278
LF+MP	329 ± 86 ^a	618 ± 73 ^a	289
LM+CB	482 ± 78 ^b	584 ± 70 ^a	102
LM+CO	482 ± 78 ^b	595 ± 105 ^a	113
LM+MP	482 ± 78 ^b	617 ± 40 ^a	135
SC	444 ± 52 ^{ab}	491 ± 91 ^a	46

En la investigación de Klopper et al. (1986) se encontraron diversos valores de ácidos orgánicos presentes en cervezas comerciales, los cuales se presentan en la Tabla 18.

Tabla 18. Parámetros de análisis de diferentes cervezas. Extraído de: (Klopper et al., 1986)

Estilo	pH	Ácido málico mg/L	Ácido Acético mg/L	Ácido Láctico mg/L
Pilsener	3.9 - 5.0	24 - 104	9 - 138	10 - 284
Sin Alcohol	5.0	99	146	58
Ale	4.1 - 4.7	175 - 211	56 - 136	15 - 901
Sour	3.5 - 4.2	6 - 67	185 - 2340	62 - 1362

Mientras que en la Tabla 19 y 20 se describen los ácidos orgánicos más relevantes presentes en la cerveza y la percepción aromática de cada uno de estos, según la investigación de Larroque (2020).

Tabla 19. Descripción de los ácidos orgánicos volátiles más relevantes en la cerveza. Fuente: (Larroque, 2020)

Ácidos orgánicos volátiles	Umbral de percepción mg/L	Descripción aromática
Ácido acético	175	Vinagre
Ácido butírico	0.14	Ceroso, rancio
Ácido caprílico	0.5	Queso, aroma a animal
Ácido caproico	3	Dulce
Ácido caprico	15	Aroma a cabra, polvo
Ácido láurico	6.1	Aroma jabonoso

Tabla 20. Descripción de los ácidos orgánicos no volátiles más relevantes en la cerveza. Fuente: (Larroque, 2020)

Ácidos orgánicos no volátiles	Umbral de percepción mg/L	Descripción aromática
Ácido oxálico	500	Salado, oxidado
Ácido cítrico	400	Ácido
Ácido málico	700	Manzana
Ácido fumárico	400	Agrio, ácido
Ácido succínico	220	Ácido
Ácido láctico	400	Agrio, ácido
Ácido pirúvico	300	Salado, forraje

De acuerdo con la Tabla 18, Tabla 19 y Tabla 20, las microfermentaciones realizadas están dentro de los rangos aceptables y tolerables de ácidos orgánicos en cerveza. El ácido málico resultante fluctúa entre 220 y 330 mg/L en cultivos mixtos y sobre 1200 mg/L para el monocultivo, por lo que para el cultivo mixto se encuentra por debajo del umbral de percepción (Tabla 20), pero a la vez tiene mayor contenido de este ácido que una cerveza ale (Tabla 18), por otra parte, el cultivo con SC sobrepasa los niveles del umbral de percepción (Tabla 20), alcanzando los niveles de una cerveza sour (Tabla 18). En cuanto al ácido láctico para co-cultivo se encuentra entre 38 y 160 mg/L, y para cultivo puro es menor que 100 mg/L, ambos muy similares, encontrándose por debajo del umbral de percepción (Tabla 20) y entrando en los rangos de varios tipos de cerveza incluso sin alcohol (Tabla 18). Por último, respecto al ácido acético contiene menores cantidades el monocultivo (bajo 500 mg/L) que los cultivos mixtos, los cuales se cuentan con concentraciones finales de este ácido que varían de 600 a 800 mg/L, en este caso para ambas fermentaciones excede el umbral de percepción (Tabla 19) y llegan a concentraciones típicas de una cerveza sour (Tabla 18), esto afectará en su sabor, sobresaliendo una marcada acidez.

Cabe destacar que cada uno de los experimentos afectará de manera diferente en el perfil organoléptico de la cerveza resultante. En particular, el monocultivo de *Saccharomyces cerevisiae* se verá afectado por la gran cantidad de ácido málico formado, se espera que influya en el aroma de la cerveza con una inclinación a manzana verde. Mientras que, todos los cultivos tendrán una tendencia marcada a ser percibidos con sabor vinagre, dada la alta cantidad producida de ácido acético.

Los co-cultivos obtuvieron un consumo de ácido málico de un 18% a un 44%, mientras que la *S. cerevisiae* forma este compuesto produciendo el 204% del contenido inicial, respecto al ácido láctico este es producido por los cultivos mixtos variando de un 7% a un 640% del contenido inicial, en cambio, el cultivo puro solo logra una formación del 7%, y por último el ácido acético lo producen mayoritariamente la fermentación mixta generando el 21% a un 141% del contenido inicial, mientras que la fermentación convencional solo produce un 10%.

4.5 Azúcares

Los carbohidratos de la cerveza juegan un papel importante, puesto que son esenciales para que ocurra la fermentación. Además, cualquier cambio en su composición puede influir en

las características sensoriales de la cerveza por lo que su determinación es de gran interés (Li et al., 2020).

En la Tabla 21, 22 y 23 se presentan el contenido de azúcares obtenido mediante cromatografía de gases.

Tabla 21. Azúcares iniciales según fermentación.

Concentración inicial g/L					
Muestras	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Maltosa	Maltotriosa
LF+CB	2.5 ± 0.2 ^a	2.1 ± 1.7 ^a	2.4 ± 2.0 ^a	35.7 ± 4.8 ^a	16.3 ± 5.9 ^a
LF+CO	2.3 ± 0.4 ^a	2.5 ± 1.3 ^a	3.3 ± 2.8 ^a	36.9 ± 3.4 ^a	13.6 ± 5.8 ^a
LF+MP	2.5 ± 0.2 ^a	2.1 ± 1.7 ^a	2.4 ± 2.0 ^a	35.7 ± 4.8 ^a	16.3 ± 5.9 ^a
LM+CB	1.6 ± 0.4 ^a	5.7 ± 0.5 ^b	1.1 ± 0.2 ^a	51.4 ± 0.7 ^b	20.4 ± 0.7 ^a
LM+CO	1.6 ± 0.4 ^a	5.7 ± 0.5 ^b	1.1 ± 0.2 ^a	51.4 ± 0.7 ^b	20.4 ± 0.7 ^a
LM+MP	3.2 ± 0.0 ^a	2.0 ± 0.4 ^a	3.2 ± 1.6 ^a	49.0 ± 6.0 ^b	18.6 ± 1.9 ^a
SC	2.3 ± 0.4 ^a	2.5 ± 1.3 ^a	3.3 ± 2.8 ^a	36.9 ± 3.4 ^a	13.6 ± 5.8 ^a

Tabla 22. Azúcares finales según fermentación

Concentración final g/L					
Muestras	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Maltosa	Maltotriosa
LF+CB	N/D	N/D	N/D	N/D	15.5 ± 0.5 ^a
LF+CO	N/D	N/D	N/D	N/D	13.9 ± 2.8 ^a
LF+MP	N/D	N/D	N/D	N/D	14.0 ± 3.1 ^a
LM+CB	N/D	N/D	N/D	N/D	20.7 ± 3.0 ^a
LM+CO	N/D	N/D	N/D	N/D	19.4 ± 2.7 ^a
LM+MP	N/D	N/D	N/D	N/D	17.5 ± 3.5 ^a
SC	0.29 ± 0.0	0.36 ± 0.2	N/D	1.11 ± 0.0	0.76 ± 0.0 ^b

Tabla 23. Consumo y formación de azúcares según fermentación.

Consumo %					
Muestras	Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Maltosa	Maltotriosa
LF+CB	100%	100%	100%	100%	5%
LF+CO	100%	100%	100%	100%	0%
LF+MP	100%	100%	100%	100%	14%
LM+CB	100%	100%	100%	100%	2%
LM+CO	100%	100%	100%	100%	5%
LM+MP	100%	100%	100%	100%	6%
SC	88%	86%	100%	97%	94%

En la investigación de Nogueira et al. (2005) se realizaron análisis de cerveza bajo en alcohol (1), cerveza con 6% vol (2) y otra de 4.5% vol (3), donde se obtuvieron valores de azúcares totales expuestos en la Tabla 24.

Tabla 24. Resultados obtenidos en el seguimiento de carbohidratos en cervezas. Fuente: (Nogueira et al., 2005)

Muestras	Fructosa g/L	Glucosa g/L	Maltosa g/L	Maltotriosa g/L
1	2.6 ± 0.04 ^a	4.6 ± 0.5 ^a	38.5 ± 0.6 ^a	8.1 ± 0.2 ^a
2	2.4 ± 0.07 ^a	4.2 ± 0.2 ^a	38.3 ± 0.4 ^a	7.4 ± 0.3 ^a
3	N/D	N/D	0.35 ± 0.00 ^b	1.3 ± 0.1 ^b

Se observa que, en el caso de la fermentación control se obtienen concentraciones finales de azúcares similares a las expuestas en la Tabla 24 específicamente a la cerveza de 4.5% vol, donde el total de azúcares residuales corresponde a 4.6 ± 0.2 g/L, y la SC obtiene 2.5 ± 0.2 g/L de azúcares totales. Por el contrario, en los cultivos mixtos nuevamente se ve reflejada la baja capacidad fermentativa de las levaduras nativas, dejando un gran residual de azúcares complejos, específicamente de maltotriosa, excediendo los niveles de una fermentación común (Michel et al., 2016). Para co-cultivos se asemeja el consumo de azúcares finales de maltosa y maltotriosa de la cerveza sin alcohol obtenido por Nogueira et al. (2005) expuesto en la Tabla 24.

Dependiendo del estilo de cerveza varía la cantidad de azúcares totales. Las cervezas que se elaboran con menos cantidad de grano tienen menos disposición de azúcares por lo que su contenido inicial y final de carbohidratos es menor. Las cervezas de tipo lager poseen un contenido de carbohidratos totales de 10 a 30 g/L, mientras que las de tipo ale varían de 15 a 60 g/L, y las cervezas bajas en alcohol o sin alcohol tienen una fermentación corta y por lo tanto presentan un contenido total de azúcares promedio de 55 g/L (Ferreira, 2009).

Respecto al consumo y formación de azúcares se destaca el poco consumo de maltotriosa por parte de los cultivos mixtos, siendo nulo alcanzando solo un 14% según valor inicial, mientras que la *S. cerevisiae* consume el 94% de este azúcar y más del 85% de todos los azúcares presentes en el mosto.

4.6 Compuestos volátiles

Como antes se mencionó, los compuestos volátiles son los metabolitos secundarios con gran influencia en la calidad de la cerveza resultante, capaces de construir la mayor parte del *flavor* de esta. Se realizó, la identificación de algunos compuestos volátiles, incluyendo su porcentaje de abundancia en las muestras, para esto se escogieron las fermentaciones mixtas que tienen menor graduación alcohólica y mayor desarrollo de las levaduras nativas, ya que son estas las que destacan por su alteración en el carácter aromático y sensorial de la cerveza.

En la Tabla 25, se presentan la identificación de compuestos volátiles y su porcentaje de abundancia de las fermentaciones mixtas entre *Lactobacillus fructivorans* y las levaduras nativas seleccionadas (CB, CO y MP), contrastando con la fermentación monocultivo con *Saccharomyces cerevisiae*. Mientras que en la Figura 16 se aprecia la obtención de compuestos volátiles según clasificación de cada fermentación.

Las fermentaciones mixtas lograron predominar en el 53% de las categorías por sobre la fermentación monocultivo. Destacando en compuestos que otorgan notas atractivas florales y frutales, como el alcohol superior feniletil, en ésteres como el acetato de isoamilo, acetato de etilo, acetato de 2-feniletil, etil decanoato y etil dodecanoato, y también en el terpeno linalool.

Los resultados coinciden con la investigación de Toh et al. (2018) donde se obtienen cantidades significativamente mayores de decanoato de etilo, dodecanoato de etilo y de octanoato de etilo fue significativamente mayor al utilizar cultivos mixtos. Y también concuerdan con la investigación de Larroque (2020) donde se obtiene que la inclusión de levaduras no-*Saccharomyces* potencia el perfil aromático y sensorial de cepas nativas, obteniendo mayores concentraciones de compuestos volátiles que la fermentación convencional.

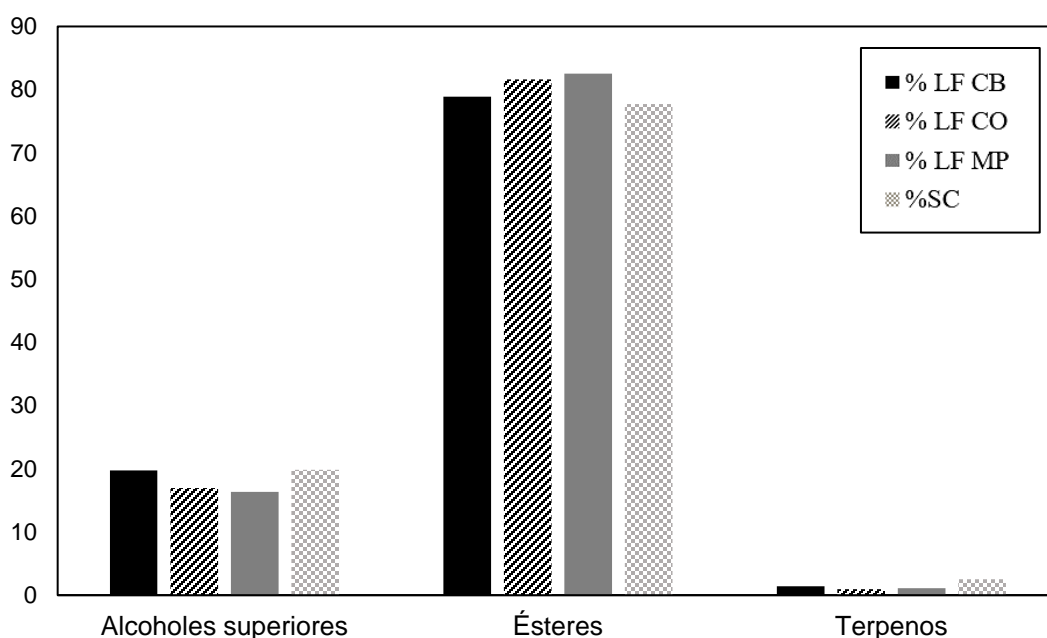


Figura 16. Compuestos volátiles agrupados según clasificación.

Tabla 25. Compuestos volátiles presentes en cada fermentación y porcentaje de abundancia respectiva.

Grupo	Compuesto volátil	% LF CB	% LF CO	% LF MP	% SC	Descriptor
Alcoholes	Etanol	7.15	5.69	6.20	8.82	Alcohol
	Isopentanol	8.72	7.48	6.99	8.62	Alcohol, dulce
	Feniletil alcohol	3.85	3.77	3.14	2.42	Rosas, dulces, floral
	Acetato de isoamilo	10.04	8.56	9.33	5.75	Plátano, manzana
	Acetato de etilo	2.37	1.80	1.80	2.18	Solvente, afrutado, dulce
	Acetato de 2-feniletil	3.27	2.22	3.02	1.03	Rosas, miel, manzana, dulce
	Etil decanoato	25.79	26.39	27.53	16.5	Frutal, graso, uva
	Etil 9-decenoato	8.09	5.19	8.61	11.7	Afrutado, graso
Éteres	Etil hexanoato	1.26	1.2	1.41	2.16	Manzana, anís, miel
	Etil hexadecanoato	0.82	1.14	1.06	0.98	Cera
	Etil miristato	0.72	0.82	0.95	0.24	Aceite vegetal
	Etil nonanoato	0.66	0.73	0.53	1.52	Afrutado, graso
	Etil E-11-hexadecenoato	0.88	0.79	1.17	1.55	-
	Etil dodecanoato	7.70	7.68	7.64	4.77	Dulce, jabonoso, floral
	Isoamil octanoato	0	0.6	0	1.03	Dulce, frutal, ceroso
	Octanoato de etilo	17.28	24.50	19.5	28.3	Manzana, pera, banana, ananá, floral, frutado
Terpenos	Linalool	1.41	0.94	1.12	1.29	Floral, cítrico
	Acetona de geranilo	0	0.5	0	0.86	Dulce, rosas
	Citronellol	0	0	0	0.35	Floral, rosa dulce, cítrico

CAPITULO V: CONCLUSIONES

5. Conclusiones

Los cultivos mixtos obtuvieron una menor graduación alcohólica respecto a la cerveza tradicional, reduciendo hasta un 40% el contenido de etanol, por lo que para el mercado cervecero actual puede representar una ventaja competitiva, obteniendo una cerveza que apunta a las nuevas tendencias de vida saludable.

Los estudios realizados sugieren que el uso de levaduras nativas puede otorgar sabores y aromas deseables, logrando distinción respecto de una cerveza convencional, obteniendo la predominancia en el 53% de los compuestos volátiles. Es posible mejorar la calidad de las cervezas bajas en alcohol, o incluso entrar al mercado de las cervezas sin alcohol, con la utilización de otros microorganismos. En relación con las fermentaciones monocultivo convencionales existe una limitada complejidad de *flavor* en la cerveza resultante, siendo más difícil destacar en la industria cervecera.

Otra ventaja de trabajar con co-cultivos, es la reducción del tiempo de fermentación en un 25% respecto a la fermentación tradicional, logrando una mayor velocidad de crecimiento celular y bacteriano, lo cual, en un escalamiento del proceso, puede significar un ahorro en cuanto a costos asociados a la elaboración y menor tiempo de proceso.

Finalmente, las fermentaciones mixtas entre levaduras no-*Saccharomyces* y bacterias ácido-lácticas logran cumplir con la expectativa de la reducción del contenido de etanol y también potenciar características organolépticas de la cerveza, logrando así los objetivos de la investigación.

Las levaduras y bacterias lograron coexistir provechosamente, lo cual abre puertas para seguir investigando opciones innovadoras como la elaboración de cervezas funcionales. Se recomienda seguir la investigación evaluando el potencial probiótico de la cerveza resultante, contenido de polifenoles y antioxidantes, para evaluar los atributos que otorgan las bacterias ácido-lácticas.

CAPITULO VI: REFERENCIAS

6. Referencias

- ACECHI. (2021). *Del blog: ¿Por qué Chile es considerado un país cervecero?* <https://acechi.cl/del-blog-por-que-chile-es-considerado-un-pais-cervecero/>
- 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>
- Amaya, N., & Díaz, D. (2019). *Evaluación de perfiles fermentativos para la elaboración de cerveza artesanal por levaduras nativas.* <https://repository.uamerica.edu.co/handle/20.500.11839/7724>
- ARIAS, G. (1991). *Calidad industrial de la cebada cervecera.* INIA. UNIDAD DE DIFUSION E INFORMACION TECNOLOGICA. <http://www.ainfo.inia.uy/digital/bitstream/item/2919/1/111219220807120028.pdf>
- Asociación de Productores de Cerveza de Chile. (2022). *Consumo de cerveza en Chile.* <https://acechi.cl/consumo-de-cerveza-en-chile/>
- Asociación Nacional De Avisadores, A. (2022, enero 19). *Radiografía al consumo de cerveza en Chile.* <https://www.anda.cl/radiografia-al-consumo-de-cerveza-en-chile/>
- Åvall-Jääskeläinen, S., & Palva, A. (2005). Lactobacillus surface layers and their applications. *FEMS Microbiology Reviews*, 29(3), 511–529. <https://doi.org/10.1016/j.fmrre.2005.04.003>
- Basso, T. P. (2019). *Yeasts in Biotechnology.* <https://doi.org/10.5772/intechopen.77938>
- Beekwilder, J., Marcozzi, D., Vecchi, S., de Vos, R., Janssen, P., Francke, C., van Hylckama Vlieg, J., & Hall, R. D. (2009). Characterization of Rhamnosidases from *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus acidophilus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(11), 3447–3454. <https://doi.org/10.1128/AEM.02675-08>
- Bellut, K., & Arendt, E. (2019). Chance and Challenge: Non- *Saccharomyces* Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing – A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77, 1–15. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1569452>
- Benavides, S., Franco, W., Ceppi De Lecco, C., Durán, A., & Urtubia, A. (2022). Evaluation of Indigenous *Candida oleophila* and *Candida boidinii* in Monoculture and Sequential

- Fermentations: Impact on Ethanol Reduction and Chemical Profile in Chilean Sauvignon Blanc Wines. *Journal of Fungi*, 8(3), 259. <https://doi.org/10.3390/jof8030259>
- Brewers Association. (2022). 2022 Beer Style Guidelines: EEUU, vol9. https://cdn.brewersassociation.org/wp-content/uploads/2022/02/25084047/2022_BA_Beer_Style_Guidelines_Final.pdf
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(4), 359–377. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Castorena-García, J. H., Juárez-Pérez, V., Cano-Hernández, M., Santiago-Santiago, V., & López-Mejía, O. A. (2020). Caracterización Físico-química de Cerveza Artesanal don Adjunto de Maíz Azul y Derivados de Caña de Azúcar. *Conciencia Tecnológica*, 60. <https://www.redalyc.org/journal/944/94465715001/>
- Cañamar Pimentel, C. A. (2007). Impacto del contenido de alfa amino nitrógeno en el mosto para producir cerveza, sobre la síntesis de dicetonas vecinales y alcohol isoamílico en una fermentación utilizando levadura *Saccharomyces uvarum* [Masters, Universidad Autónoma de Nuevo León]. <https://eprints.uanl.mx/21252/>
- Contreras, A., Hidalgo, C., Henschke, P. A., Chambers, P. J., Curtin, C., & Varela, C. (2014). Evaluation of Non-Saccharomyces Yeasts for the Reduction of Alcohol Content in Wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(5), 1670–1678. <https://doi.org/10.1128/AEM.03780-13>
- Coote, N., & Kirsop, B. H. (1974). The Content of Some Organic Acids in Beer and Other Fermented Media. *Journal of the Institute of Brewing*, 80(5), 474–483. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1974.tb06797.x>
- Couyoumdjian, J. R. (2004). Una bebida moderna: la cerveza en Chile en el siglo XIX. *Historia (Santiago)*, 37(2), 311–336. <https://doi.org/10.4067/S0717-71942004000200002>
- Del Fresno, J. M., Morata, A., Loira, I., Bañuelos, M. A., Escott, C., Benito, S., González Chamorro, C., & Suárez-Lepe, J. A. (2017). Use of non-Saccharomyces in single-culture, mixed and sequential fermentation to improve red wine quality. *European Food Research and Technology*, 243(12), 2175–2185. <https://doi.org/10.1007/s00217-017-2920-4>
- Devi, A., Anu-Appaiah, K. A., & Lin, T.-F. (2022). Timing of inoculation of *Oenococcus oeni* and *Lactobacillus plantarum* in mixed malo-lactic culture along with compatible

- native yeast influences the polyphenolic, volatile and sensory profile of the Shiraz wines. *LWT*, 158, 113130. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2022.113130>
- Echeverría, E. (2012). Normas NCh 409. Calidad y Muestreo del Agua Potable. Santiago: Universidad de Chile.
- Einfalt, D. (2021). Barley-sorghum craft beer production with *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Metschnikowia pulcherrima* yeast strains. *European Food Research and Technology*, 247(2), 385–393. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03632-7>
- Ferreira, I. M. P. L. V. O. (2009). 27 - Beer Carbohydrates. En V. R. Preedy (Ed.), *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 291–298). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-373891-2.00027-4>
- Fuentes, L. (2011). *Cerveza Analisis de Mercado | PDF | Cerveza | Oligopolio*. Scribd. <https://es.scribd.com/doc/55697281/Cerveza-Analisis-de-Mercado>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2018). Advances in the Study of *Candida stellata*. *Fermentation*, 4(3), 74. <https://doi.org/10.3390/fermentation4030074>
- Gisbert Verdú, M. (2016). *Diseño del proceso industrial para la elaboración de cerveza* [Proyecto/Trabajo fin de carrera/grado, Universitat Politècnica de València]. <https://riunet.upv.es/handle/10251/73275>
- Guido, L. F., Rodrigues, P. G., Rodrigues, J. A., Gonçalves, C. R., & Barros, A. A. (2004). The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: an industrial approach. *Food Chemistry*, 87(2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.033>
- Hamilton. (sf). Cervecería | Análisis de procesos. <https://www.hamiltoncompany.com/process-analytics/applications/brewing/brewhouse#process>
- Hu, K., Zhao, H., Edwards, N., Peyer, L., Tao, Y., & Arneborg, N. (2022). The effects of cell-cell contact between *Pichia kluyveri* and *Saccharomyces cerevisiae* on amino acids and volatiles in mixed culture alcoholic fermentations. *Food Microbiology*, 103, 103960. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103960>
- Jespersen, L., & Jakobsen, M. (1996). Specific spoilage organisms in breweries and laboratory media for their detection. *International Journal of Food Microbiology*, 33(1), 139–155. [https://doi.org/10.1016/0168-1605\(96\)01154-3](https://doi.org/10.1016/0168-1605(96)01154-3)

- Jung, J. Y., Lee, S. H., Lee, H. J., Seo, H.-Y., Park, W.-S., & Jeon, C. O. (2012). Effects of *Leuconostoc mesenteroides* starter cultures on microbial communities and metabolites during kimchi fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, 153(3), 378–387. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2011.11.030>
- Kelanne, N. M., Siegmund, B., Metz, T., Yang, B., & Laaksonen, O. (2022). Comparison of volatile compounds and sensory profiles of alcoholic black currant (*Ribes nigrum*) beverages produced with *Saccharomyces*, *Torulaspora*, and *Metschnikowia* yeasts. *Food Chemistry*, 370, 131049. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131049>
- Klopper, W. J., Angelino, S. a. G. F., Tuning, B., & Vermeire, H. A. (1986). Organic Acids and Glycerol in Beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(3), 225–228. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04405.x>
- Kobayashi, M., Nagahisa, K., Shimizu, H., & Shioya, S. (2006). Simultaneous control of apparent extract and volatile compounds concentrations in low-malt beer fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 73(3), 549–558. <https://doi.org/10.1007/s00253-006-0516-1>
- Kunze, W. (2006). *Tecnología para cerveceros y Malteros*. Berlín : VLB Berlin.
- Larroque, M. N. (2020). *Selección de levaduras no tradicionales para la elaboración de cervezas artesanales*. <https://www.colibri.udelar.edu.uy/jspui/handle/20.500.12008/32066>
- Li, M., Du, J., & Zhang, K. (2020). Profiling of carbohydrates in commercial beers and their influence on beer quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 100(7), 3062–3070. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10337>
- 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>
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2018). Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 436–446. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.-J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a

- focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569–587. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Mora Pesántez, G. E. (2021). Estudio de la influencia de compuestos azufrados presentes en la cerveza. Universidad del Azuay. <http://dspace.uazuay.edu.ec/handle/datos/10478>
- Nogueira, L. C., Silva, F., Ferreira, I. M. P. L. V. O., & Trugo, L. C. (2005). Separation and quantification of beer carbohydrates by high-performance liquid chromatography with evaporative light scattering detection. *Journal of Chromatography A*, 1065(2), 207–210. <https://doi.org/10.1016/j.chroma.2004.12.074>
- Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., & Pillay, B. (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/jib.389>
- Parra Huertas, R. A. (2010). Review. Bacterias ácido lácticas: papel funcional en los alimentos. *Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 8(1), 93–105. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_abstract&pid=S1692-35612010000100012&lng=en&nrm=iso&tlng=es
- Perpetuini, G., Rossetti, A. P., Tittarelli, F., Battistelli, N., Arfelli, G., Suzzi, G., & Tofalo, R. (2021). Promoting *Candida zemplinina* adhesion on oak chips: A strategy to enhance esters and glycerol content of Montepulciano d’Abruzzo organic wines. *Food Research International*, 150, 110772. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110772>
- Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. A. (2014). Yeast: the soul of beer’s aroma—a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(5), 1937–1949. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0>
- Portaro, L., Maioli, F., Canuti, V., Picchi, M., Lencioni, L., Mannazzu, I., & Domizio, P. (2022). *Schizosaccharomyces japonicus*/*Saccharomyces cerevisiae* mixed starter cultures: New perspectives for the improvement of Sangiovese aroma, taste, and color stability. *LWT*, 156, 113009. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.113009>
- Postigo, V., O’Sullivan, T., Elink Schuurman, T., & Arroyo, T. (2022). Non-Conventional Yeast: Behavior under Pure Culture, Sequential and Aeration Conditions in Beer Fermentation. *Foods*, 11(22), 3717. <https://doi.org/10.3390/foods11223717>
- Rodrigues, J. E. A., Erny, G. L., Barros, A. S., Esteves, V. I., Brandão, T., Ferreira, A. A., Cabrita, E., & Gil, A. M. (2010). Quantification of organic acids in beer by nuclear

- magnetic resonance (NMR)-based methods. *Analytica Chimica Acta*, 674(2), 166–175. <https://doi.org/10.1016/j.aca.2010.06.029>
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F., Verstrepen, K. J., Van Dijck, P., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2008). Parameters Affecting Ethyl Ester Production by *Saccharomyces cerevisiae* during Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(2), 454–461. <https://doi.org/10.1128/AEM.01616-07>
- Šmogrovičová, D., & Dömény, Z. (1999). Beer volatile by-product formation at different fermentation temperature using immobilised yeasts. *Process Biochemistry*, 34(8), 785–794. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(98\)00154-X](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(98)00154-X)
- Suárez-Machín, C., Garrido-Carralero, N. A., & Guevara-Rodríguez, C. A. (2016). Levadura *Saccharomyces cerevisiae* y la producción de alcohol. Revisión bibliográfica. *ICIDCA. Sobre los Derivados de la Caña de Azúcar*, 50(1), 20–28. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=223148420004>
- Toh, D. W. K., Chua, J. Y., & Liu, S. Q. (2018). Impact of simultaneous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* on volatile and non-volatile constituents in beer. *LWT*, 91, 26–33. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.025>
- Wang, L., Fan, D., Chen, W., & Terentjev, E. M. (2015). Bacterial growth, detachment and cell size control on polyethylene terephthalate surfaces. *Scientific Reports*, 5(1), 15159. <https://doi.org/10.1038/srep15159>