

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ

Colegio de Posgrados

Impacto de dos cepas alternativas de *Saccharomyces cerevisiae* sobre las características físico-químicas y organolépticas de cervezas artesanales

Proyecto de investigación y desarrollo

Carlos Caiza Valencia

Sonia Zapata, Ph.D.

Directora de Trabajo de Titulación

Lucía Ramírez, Ph.D.

Directora de Trabajo de Titulación

Trabajo de titulación de posgrado presentado como requisito
para la obtención del título de Máster en Ciencia y Tecnología de Alimentos

Quito, 26 de julio de 2021

UNIVERSIDAD SAN FRANCISCO DE QUITO USFQ
COLEGIO DE POSGRADOS

HOJA DE APROBACIÓN DE TRABAJO DE TITULACIÓN

**Impacto de dos cepas alternativas de *Saccharomyces cerevisiae*
sobre las características físico-químicas y organolépticas de
cervezas artesanales**

Carlos Caiza Valencia

Nombre del Director del Programa:	Lucía Ramírez Cárdenas
Título académico:	Ph.D.
Director del programa de:	Maestría en Ciencia y Tecnología de Alimentos
Nombre del Decano del colegio Académico:	Eduardo Alba Cabrera
Título académico:	Ph.D.
Decano del Colegio:	Ciencias e Ingenierías
Nombre del Decano del Colegio de Posgrados:	Hugo Burgos Yáñez
Título académico:	Ph.D.

Quito, Julio 2021

© DERECHOS DE AUTOR

Por medio del presente documento certifico que he leído todas las Políticas y Manuales de la Universidad San Francisco de Quito USFQ, incluyendo la Política de Propiedad Intelectual USFQ, y estoy de acuerdo con su contenido, por lo que los derechos de propiedad intelectual del presente trabajo quedan sujetos a lo dispuesto en esas Políticas.

Asimismo, autorizo a la USFQ para que realice la digitalización y publicación de este trabajo en el repositorio virtual, de conformidad a lo dispuesto en la Ley Orgánica de Educación Superior del Ecuador.

Nombre del estudiante: Carlos Caiza Valencia

Código de estudiante: 00215382

C.I.: 1717602807

Lugar y fecha: Quito, 26 de julio de 2021.

ACLARACIÓN PARA PUBLICACIÓN

Nota: El presente trabajo, en su totalidad o cualquiera de sus partes, no debe ser considerado como una publicación, incluso a pesar de estar disponible sin restricciones a través de un repositorio institucional. Esta declaración se alinea con las prácticas y recomendaciones presentadas por el Committee on Publication Ethics COPE descritas por Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing, disponible en <http://bit.ly/COPETHeses>.

UNPUBLISHED DOCUMENT

Note: The following graduation project is available through Universidad San Francisco de Quito USFQ institutional repository. Nonetheless, this project – in whole or in part – should not be considered a publication. This statement follows the recommendations presented by the Committee on Publication Ethics COPE described by Barbour et al. (2017) Discussion document on best practice for issues around theses publishing available on <http://bit.ly/COPETHeses>.

DEDICATORIA

A mis angelitos, las tres mujeres más importantes de mi vida, que siempre me brindan su apoyo, cuidados y amor incondicional. Mamita María, mi amada esposa Adriana y mi pequeña Pocholita.

A mi papito Humberto y mi querido hermano Felipe por su amor, ayuda, compañía y consejos.

Al nuevo angelito de mi vida, mi sobrino Josué.

Finalmente, a los angelitos que ya no me acompañan físicamente pero siempre los llevo en mi corazón. A ti mamá Clarita y a ti ñaño Marquito.

AGRADECIMIENTOS

Esta tesis no habría visto la luz después de un largo y difícil camino de no ser por muchas personas que me enseñaron que todo esfuerzo y sacrificio ha valido las futuras alegrías, por eso les estoy eternamente agradecido.

Un especial agradecimiento a Sonia Zapata y Lucía Ramírez por su asistencia y dirección a lo largo de esta tesis, y por su enorme comprensión y paciencia, sobre todo paciencia.

A Joselyn Rivera por su gran ayuda con la identificación de las cepas de levadura, su apoyo para mantenerlas en buenas condiciones y permitirme usarlas en este proyecto.

A mis queridos amigos y colegas cerveceros Juan y Julio, gracias por su colaboración en el desarrollo experimental.

A mis amigos y compañeros de viaje en estos dos años de Maestría, por su amistad, consejos y ayuda. Gracias Xavier, Lore, Mayra, Ibeth, Gaby, Susy, Maribel y Deisy.

También quiero agradecer a la Universidad San Francisco de Quito y todo su personal docente, administrativo y de servicio por brindarme la oportunidad para realizar mis estudios de Maestría.

Un agradecimiento muy especial a mi madre, mi hija, mi padre y mi hermano por siempre estar ahí, en las situaciones más difíciles y cuando he perdido la esperanza. Ustedes son mi luz en los momentos de oscuridad.

Finalmente, a ti mi hermosa casualidad, mi mejor amiga, mi compañera de vida, aventuras y locuras, mi soporte, mi universo. Gracias por cada instante compartido, por toda tu paciencia y apoyo durante estos cuatro años donde entendí que el verdadero amor existe, gracias por aceptarme y amarme tal como soy, por no dejar que me rinda y siempre tener las palabras adecuadas en el momento justo, gracias por estar aquí conmigo y nunca soltar mi mano. Gracias Adriana.

RESUMEN

Las levaduras involucradas en la fermentación espontánea de bebidas tradicionales como la chicha (cerveza de maíz) o alimentos (como queso o pan) se han mostrado prometedoras para ser utilizadas como cultivos iniciadores en la industria de cerveza para mejorar el perfil organoléptico del producto final y también para generar cervezas innovadoras. En esta investigación, se evaluó el comportamiento fermentativo de dos cepas de *S. cerevisiae* aisladas de una chicha y un alimento con el fin de seleccionar condiciones favorables para realizar fermentaciones controladas y producir cervezas artesanales. Para esto se aplicaron diferentes diseños experimentales en ensayos de crecimiento y fermentación. En la prueba de crecimiento se determinó que las dos cepas pueden crecer en condiciones similares a las de producción de cervezas Ale y Lager (fermentación a 12 y 20 °C). Los ensayos de fermentación evidenciaron la capacidad de las dos cepas de asimilar tanto glucosa como maltosa, presentes en el mosto de cebada, además de poseer buena tolerancia a la presencia de etanol, características que se atribuyeron a un proceso de domesticación similar al de las cepas cerveceras. La temperatura óptima de fermentación para las dos cepas fue de 20 °C, pero también a 12 °C en periodos más largos. Se probó una co-inoculación de las dos cepas y no hubo diferencias con los atributos organolépticos de las cervezas obtenidas con cultivos puros. Por lo tanto, las dos cepas tienen gran potencial para ser empleadas como cultivos iniciadores en la industria cervecera, especialmente para cervezas artesanales tipo Ale.

Palabras clave: *S. cerevisiae*, fermentación, cerveza artesanal, cultivos mixtos, domesticación.

ABSTRACT

Yeasts involved in spontaneous fermentations of traditional beverages such as chicha (corn beer) or foods (such as cheese or bread) have shown promise as starter cultures in the beer industry to improve the organoleptic profile of the final product and also to generate innovative beers. In this research, the fermentation profile of two *S. cerevisiae* strains isolated from chicha and food was evaluated to select conditions for controlled fermentations and to produce craft beers. For this purpose, different experimental designs were applied in growth and fermentation tests. The growth test showed that two strains can grow in similar conditions to those for the production of Ale and Lager beers (fermentation at 12 and 20 °C). The fermentation tests showed the capacity of the two strains to assimilate both glucose and maltose, present in the wort, in addition to having good tolerance to the presence of ethanol, characteristics that were attributed to the similar domestication process in brewing strains. The best fermentation temperature for two strains was 20 °C, but they also fermented at 12 °C for longer periods. A co-inoculation of two strains was tested and there were no differences with the organoleptic attributes of the beers obtained with pure cultures. Therefore, two strains have great potential to be used as starter cultures in the brewing industry, especially for craft ale beers.

Key words: *S. cerevisiae*, fermentation, artisanal beer, mixed cultures, domestication.

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN.....	14
Antecedentes	14
Justificación	16
OBJETIVOS	18
Objetivo General	18
Objetivos Especificos.....	18
HIPÓTESIS	18
MARCO TEÓRICO	19
Alimentos Fermentados	19
Bebidas Fermentadas	20
Cerveza	23
Microorganismos relacionados con la fermentación.....	26
Microorganismos no convencionales empleados en fermentaciones alcohólicas	28
Levaduras.....	30
Levaduras cerveceras	31
Compuestos secundarios de interés en la producción de cerveza.....	32
Fenoles	¡Error! Marcador no definido.
Ácidos orgánicos.....	33
Alcoholes superiores.....	33
Ésteres	34
MATERIALES Y MÉTODOS.....	35
Cepas de levaduras.....	35
Cultivo de levaduras y preparación de cultivos iniciadores.....	35
Recuento microscópico de levaduras.....	36
Crecimiento microbiano	36
Fermentación alcohólica	37
Preparación del mosto de malta	37
Fermentación a escala de laboratorio.....	38
Fermentaciones a escala piloto	39
Parámetros de Fermentación	39
Densidad de mosto.....	39
pH del mosto.....	40
Grados Brix.....	40
Porcentaje de alcohol.....	40
Ponderación de las variables de respuesta.....	41
Cuantificación de Diacetilo.....	42
Evaluación Sensorial.....	42
Análisis Estadístico.....	43
RESULTADOS.....	44
Crecimiento microbiano	44
Fermentación alcohólica	48
Mosto de Malta.....	48
Fermentación a escala de laboratorio.....	48
Ponderación de las variables de respuesta.....	50
Fermentaciones a escala piloto.....	50

Cuantificación de Diacetilo.....	50
Evaluación sensorial.....	51
DISCUSIÓN.....	53
Conclusiones	60
Referencias	62

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Consumo y producción de bebidas fermentadas en los cinco continentes para el año 2018.	21
Tabla 2 Bebidas fermentadas elaboradas a partir de cereales.	23
Tabla 3 Microorganismos responsables de la fermentación de los alimentos.	26
Tabla 4 Levaduras fermentativas aisladas de alimentos y bebidas.	31
Tabla 5 Compuestos generados por levaduras que contribuyen a los aromas y sabores de la cerveza.	32
Tabla 6 Condiciones para ensayo de crecimiento microbiano.	37
Tabla 7 Tratamientos para los ensayos de fermentación alcohólica.	38
Tabla 8 Escala de ponderaciones de las variables de respuesta.	41
Tabla 9 Análisis de Varianza (ANOVA) del crecimiento microbiano de los tratamientos. ...	44
Tabla 10 Crecimiento microbiano de los tratamientos.	45
Tabla 11 Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) del Número de levaduras, Grados Brix, Densidad de mosto, pH y Porcentaje de alcohol de los tratamientos.	49
Tabla 12 Número de levaduras, porcentaje de alcohol, pH, densidad de mosto y grados Brix de los tratamientos en el ensayo de fermentación.	49
Tabla 13 Ponderaciones de las variables de respuesta.	50
Tabla 14 Parámetros al finalizar la fermentación.	50
Tabla 15 Concentraciones de Diacetilo total y libre en las muestras de cerveza.	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Clasificación de alimentos fermentados.	20
Figura 2 Clasificación de las bebidas fermentadas según la fuente de carbono.	22
Figura 3 Proceso de elaboración de cerveza.	24
Figura 4 Esquema de las rutas metabólicas de las levaduras cerveceras.	32
Figura 5 Crecimiento celular de tres cepas de <i>S. cerevisiae</i> durante 24 h a 20 °C en medio de glucosa.	45
Figura 6 Crecimiento celular de tres cepas de <i>S. cerevisiae</i> durante 24 h a 20 °C en medio de maltosa.	46
Figura 7 Crecimiento celular de tres cepas de <i>S. cerevisiae</i> durante 24 h a 12 °C en medio de glucosa.	46
Figura 8 Crecimiento celular de tres cepas de <i>S. cerevisiae</i> durante 24 h a 12 °C en medio de maltosa.	47
Figura 9 Parámetros de fermentación de las cepas ScC, ScCh, ScA y ScCh:ScA: del número de células (A), grados Brix (B), pH (C) y densidad (D) durante 96 h de fermentación a 20 °C en mosto de cebada.	48
Figura 10 Perfiles sensoriales de las cinco cervezas evaluadas jueces certificados en una escala discreta de 10 puntos.	52

INTRODUCCIÓN

Antecedentes

La industria de bebidas fermentadas, alcohólicas y no alcohólicas, a nivel mundial está atravesando por un cambio. Los consumidores, especialmente de vino, cerveza y bebidas tradicionales, exigen mayor calidad. Este cambio obliga a los productores a mejorar e innovar sus procesos para brindar nuevos productos que satisfagan la demanda más especializada (Burini et al., 2020).

En la mayoría de las industrias, los nuevos retos están centrados sobre la potenciación del perfil organoléptico de sus diferentes productos (Jeromel et al., 2019; Ravasio et al., 2018; van Rijswijk, 2017). Actualmente, la innovación y diferenciación radica en las levaduras empleadas en el proceso de fermentación, donde se generan los distintos compuestos que conforman el perfil aromático y de sabor en las bebidas fermentadas.

En la industria cervecera, las levaduras utilizadas para la elaboración de las cervezas tipo Ale aportan más compuestos de aroma que las levaduras empleadas en las tipo Lager. Por otro lado, en comparación con las grandes cervecerías multinacionales, los cerveceros artesanales tienen mayor oportunidad de generar cervezas innovadoras ya que sus procesos son más flexibles (Burini et al., 2020).

Por estas razones los cerveceros, especialmente artesanales, están empleando levaduras no convencionales para la producción de cervezas innovadoras que sean las preferidas de los consumidores.

En Ecuador, el movimiento de las cervecerías artesanales ha ganado terreno en los últimos diez años, pero paralelamente la exigencia de los consumidores se ha elevado generando retos para los productores. La estrategia más común ha sido elaborar cervezas especiales con la adición de ingredientes novedosos que aporten sabores y/o aromas diferentes para ganar la preferencia del mercado. Sin embargo, la utilización de levaduras no convencionales para elaborar cerveza ha sido poco explotada, lo mismo ocurre con las bebidas ancestrales como la chicha, ya que no existe interés dentro los productores para potenciar esta bebida muy tradicional a nivel nacional (Grijalva et al., 2020; Piló et al., 2018).

Justificación

Las bebidas fermentadas, alcohólicas y no alcohólicas, tienen un importante impacto en el mercado mundial y, recientemente, ha incrementado su posicionamiento debido a varios factores, como el interés del consumidor por bebidas innovadoras y/o bebidas ancestrales, que destacan por su valor nutritivo, historia, tradiciones y costumbres (Burini et al., 2020).

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida caracterizada por su proceso de fermentación. Gracias a las levaduras, un extracto rico en nutrientes conocido como mosto, azúcares simples son transformados en etanol y dióxido de carbono (Burini et al., 2020; Hornsey, 2003). Existen varios tipos o estilos de cerveza, un criterio ampliamente utilizado para la clasificación se basa en la temperatura de fermentación. Procesos a bajas temperaturas, para las cervezas tipo *Lager* y altas temperaturas para cervezas de tipo *Ale*. Esta clasificación está relacionada al tipo de levadura que se encarga de fermentar los azúcares en el mosto (Burini et al., 2020; Ravasio et al., 2018; van Rijswijck, 2017). Generalmente, las cervezas tipo *Ale*, producidas por levaduras que fermentan entre 18-24 °C son conocidas por sus aromas frutales característicos de estas levaduras y, por otro lado, en las cervezas tipo *Lager* participan levaduras completamente diferentes que trabajan en rangos de temperatura de 8-12 °C y producen aromas menos complejos (Gamero et al., 2020; Ravasio et al., 2018).

El género más empleado en la industria cervecera es *Saccharomyces*. Esta preferencia se debe a la gran versatilidad que posee. Por ejemplo, su gran eficiencia en la metabolización de azúcares para producir etanol, sintetizar un amplio espectro de compuestos aromáticos y su alta tolerancia al etanol (Bader et al., 2019; Burini et al., 2020; Buzzini et al., 2017; Ciani et al., 2019; Gamero et al., 2020; Petruzzi et al., 2016; Ravasio et al., 2018).

En años recientes existe un creciente interés hacia levaduras no convencionales ya que han mostrado una gran adaptabilidad a los procesos fermentativos de azúcares y, además que en estos procesos generan varios compuestos volátiles que potencian el perfil organoléptico en bebidas fermentadas como el vino y la cerveza (Burini et al., 2020; Gamero et al., 2020; Jeromel et al., 2019; Michel et al., 2016; Ravasio et al., 2018).

La chicha, o cerveza de maíz, es una bebida ancestral consumida en varios países de América del Sur como Ecuador, Bolivia, Perú y Argentina. Es una bebida fermentada de bajo contenido alcohólico o incluso sin alcohol, elaborada con maíz y otros adjuntos dependiendo del lugar o región de preparación. En la fermentación intervienen varios microorganismos, muchos son propios del ambiente y de la región, por su elaboración casera o artesanal y por acción espontánea. Entre los microorganismos que fermentan la chicha se encuentran varias especies de levaduras pertenecientes a los géneros: *Saccharomyces*, *Brettanomyces*, *Candida*, entre otras, que han sido aisladas, estudiadas y domesticadas para utilizarlas en la producción controlada de bebidas fermentadas (Grijalva, 2019; Piló et al., 2018).

El crecimiento de cervecerías artesanales, enfocadas en cervezas tipo *Ale* con acentuados aromas por los compuestos volátiles producidos por levaduras de alta fermentación, así como el aumento de consumidores especializados ha impulsado la innovación y diferenciación en sus productos, y en general en su matriz productiva (Bader et al., 2019; Burini et al., 2020; Ciani et al., 2019). Aquí es donde las distintas levaduras, convencionales y no convencionales aisladas de diversos entornos naturales, toman un rol protagónico para la generación de productos innovadores y con características únicas.

OBJETIVOS

Objetivo General

Evaluar la utilización de dos cepas no convencionales de *S. cerevisiae* en la producción controlada de cerveza artesanal y su efecto sobre las características físico-químicas y organolépticas.

Objetivos Específicos

- Evaluar el crecimiento de dos cepas de *S. cerevisiae* en presencia de dos fuentes de carbono: maltosa y glucosa.
- Conocer el desempeño fermentativo de las levaduras para la producción de cerveza a partir de mosto de cebada.
- Analizar la influencia de cepas alternativas sobre parámetros físico-químicos y organolépticos de cerveza artesanal.

HIPÓTESIS

Levaduras no convencionales de *S. cerevisiae* tienen la capacidad para producir cervezas innovadoras y distintivas.

MARCO TEÓRICO

Alimentos Fermentados

Los alimentos fermentados se refieren a los alimentos que sufren el proceso biotecnológico de fermentación, es decir, ocurren cambios deseables por la acción de microorganismos en condiciones aeróbicas o anaeróbicas, por ejemplo, la fermentación acética y la fermentación alcohólica respectivamente (Bamforth, 2005). Los procesos fermentativos ya eran utilizados por el hombre desde hace miles de años, pero recién a mediados del siglo XIX se empezó a entenderlos y mejorarlos gracias a los avances en microbiología (Bamforth, 2005). La fermentación básicamente ayuda a preservar los alimentos por la generación de metabolitos que inhiben el desarrollo microbiano, incluido el crecimiento de ciertos patógenos. Además, con la fermentación se pueden eliminar compuestos tóxicos, mejorar la calidad nutricional y organoléptica de los alimentos y también aportar probióticos (Bamforth, 2005).

En la actualidad, los consumidores tienen mayor interés hacia productos descritos como saludables y naturales, con mejores características organolépticas (sabor, aroma, textura, etc.). Esto permite que el campo de alimentos fermentados tenga un nuevo impulso y genere más oportunidades de investigación, mejora y desarrollo. Por otro lado, los alimentos fermentados están protagonizando un papel importante sobre la identidad cultural, dentro de la economía local y logran realzar la gastronomía de cada pueblo o región, como es el caso de la chicha andina (Grijalva, 2019).

Debido a la amplia variedad de alimentos fermentados que existe a nivel mundial, no se puede establecer una clasificación general. Sin embargo, ciertas categorías o grupos (**Figura 1**) en

función de los microorganismos que intervienen en el proceso de fermentación son considerados (Bamforth, 2005; Grijalva, 2019).

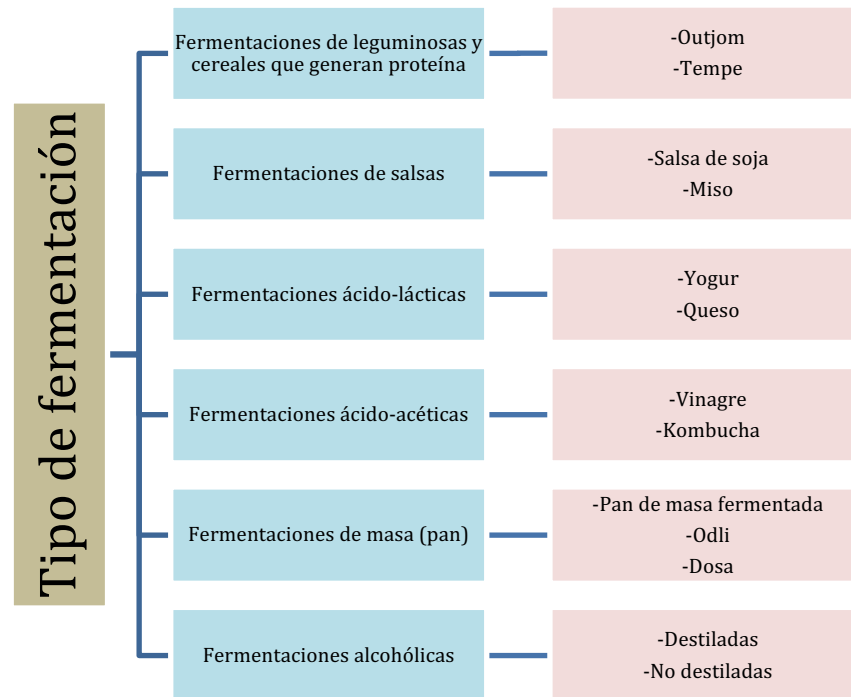


Figura 1 Clasificación de alimentos fermentados.
Fuente: Grijalva, 2019 con modificaciones.

Actualmente, más de 5000 alimentos fermentados son consumidos y, la mayoría son alimentos ancestrales elaborados a escala artesanal, es decir, pequeñas cantidades para satisfacer a grupos locales en una determinada región (Makwana & Hati, 2019).

Bebidas Fermentadas

Las bebidas fermentadas son soluciones complejas que poseen miles de compuestos químicos (metabolitos) que se producen durante el proceso fermentativo o procesos posteriores a la fermentación (Makwana & Hati, 2019). Las bebidas fermentadas son populares en todos los

continentes, siendo el continente africano donde se producen y consumen la mayor parte de éstas, ya sea por costumbres y tradiciones muy arraigadas o por la necesidad de preservar adecuadamente los alimentos. Sin embargo, durante las dos últimas décadas, en Europa, América y Asia ha crecido el interés por las bebidas fermentadas, ya sean tradicionales o nuevas (Grijalva, 2019). En la **Tabla 1** se muestran datos sobre el consumo y producción de bebidas fermentadas por continentes.

Tabla 1 Consumo y producción de bebidas fermentadas en los cinco continentes para el año 2018.

Continente	Consumo (kg/persona/año)	Producción anual (miles de toneladas)
África	12.78	15175
América	0.18	122
Asia	1.2	5392
Europa	1.62	1649
Oceanía	0.84	14

Fuente: Faostat, s.f.

Las bebidas fermentadas han sido consumidas por miles de años alrededor de todo el mundo, y por un largo periodo los microorganismos encargados de la fermentación fueron completamente desconocidos (Bader et al., 2019). La mayoría de las bebidas fermentadas apareció de manera accidental o natural; es decir, los procesos fermentativos ocurrieron espontáneamente. Éstos son dependientes de varias condiciones como temperatura, oxígeno, sustrato, etc. A lo largo de la historia los seres humanos fueron estudiando y explicando la mayoría de los procesos de fermentación y se crearon las primeras fábricas de producción a gran escala, entre las más antiguas están las productoras de vino y de cerveza (Bader et al., 2019). Los pioneros en estudiar la fermentación fueron Antonie van Leeuwenhoek (1683) y Louis Pasteur (1857) quienes sentaron las bases para el desarrollo e investigación sobre productos fermentados en general. A partir de esta época se descubrió que existen

microorganismos encargados de transformar los carbohidratos de diferentes fuentes (**Figura 2**) en etanol, dióxido de carbono y muchos otros metabolitos, entre éstos, compuestos de aroma y de sabor (Bader et al., 2019; Buzzini et al., 2017; Pires, Teixeira et al., 2014; Speers & Forbes, 2015).

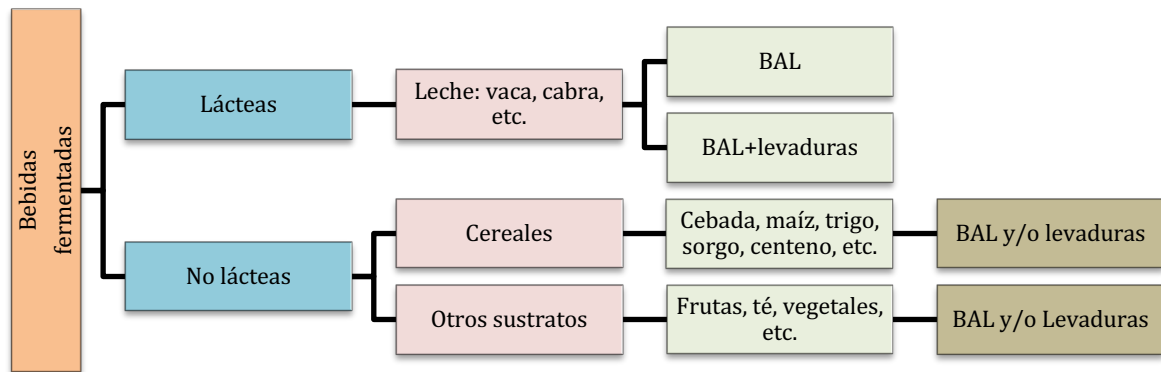


Figura 2 Clasificación de las bebidas fermentadas según la fuente de carbono.
Fuente: Grijalva, 2019 con modificaciones.

Comúnmente, las bebidas fermentadas se dividen en bebidas alcohólicas y no alcohólicas. Las bebidas alcohólicas incluyen a la cerveza, vino, bebidas destiladas y varias bebidas ancestrales como el mezcal y la chicha. Dentro de las bebidas no alcohólicas están bebidas derivadas de la leche como yogur, kéfir o kumis y también algunas bebidas tradicionales (Makwana & Hati, 2019).

Los avances en microbiología han permitido que algunas bebidas, tal vez las más populares, sean industrializadas y comercializadas a nivel global mientras que otras aún se producen a baja escala, de manera artesanal o doméstica empleando métodos tradicionales (Grijalva, 2019). Las bebidas fermentadas ancestrales o tradicionales son consideradas como patrimonio cultural en la mayoría de países o regiones donde todavía se preparan (Piló et al., 2018). Un gran porcentaje

de las bebidas ancestrales se elabora mediante procesos no controlados y espontáneos sin utilizar cultivos conocidos o estándares. Sin embargo, se ha demostrado que las bebidas que resultan de estos procesos son inocuas y de calidad para el consumo humano. Las fermentaciones espontáneas han despertado la curiosidad e interés de grupos de investigación que estudian los microorganismos encargados de estas fermentaciones ya que pueden tener varias aplicaciones industriales; además de poseer un gran valor nutritivo por sus características probióticas (Grijalva, 2019). Entre las bebidas fermentadas más reconocidas y estudiadas están la cerveza, sake, chicha, etc. (**Tabla 2**).

Tabla 2 Bebidas fermentadas elaboradas a partir de cereales.

Materia prima	Producto	Región
Sorgo, arroz, mijo	Cerveza	África
Arroz	Cerveza, sake	China y Japón
Trigo, centeno, maíz, otros	Boza	Egipto, Turquía, Europa del este
Cebada, trigo	Cerveza	Europa occidental, América
Maíz	Chicha	Sudamérica
Maíz	Mahewu	África

Fuente: Grijalva, 2019 con modificaciones.

Actualmente se desarrollan nuevas bebidas (o bebidas ancestrales mejoradas) basadas en formulaciones antiguas y muy tradicionales, empleando cultivos mixtos y nativos que han sido controlados y domesticados, con la idea de ofrecer productos funcionales o más saludables y que, al mismo tiempo, rescaten las tradiciones de pueblos y poblaciones aborígenes, además potencien y promocionen su cultura en todo el mundo (Lopes et al., 2019).

Cerveza

La cerveza es uno de los productos biotecnológicos más antiguos creado por el ser humano, con aproximadamente 10000 años de edad (Hornsey, 2003). Su creación, probablemente, fue

accidental gracias a la fermentación espontánea de granos de cebada o trigo expuestos a los microorganismos propios del ambiente (levaduras salvajes) (Hornsey, 2003).

Para la elaboración de cerveza se emplean, por lo general, cuatro ingredientes: agua, cebada malteada, flores de lúpulo y levadura. El proceso de elaboración es largo y bastante complejo, al punto que no se entiende completamente (Hornsey, 2003). Cada una de las etapas (**Figura 3**) es importante para crear un producto final de calidad y, en especial, la fermentación es la etapa más delicada, donde las levaduras transforman los carbohidratos y aportan el perfil organoléptico muy característico de la cerveza (Briggs et al., 2004; Hornsey, 2003).

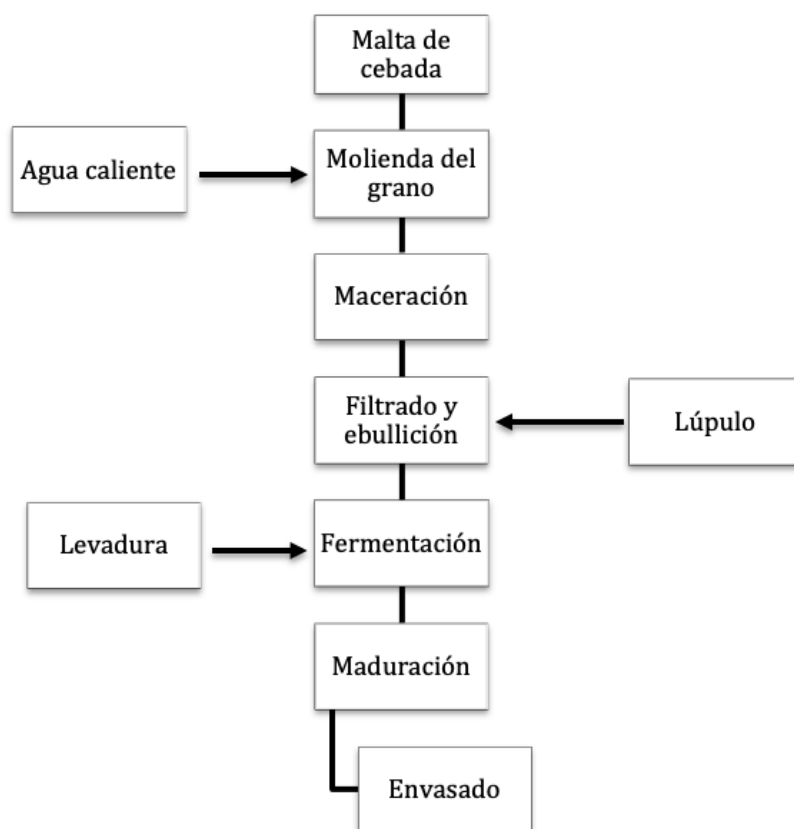


Figura 3 Proceso de elaboración de cerveza.

Fuente: Bamforth, 2005.

Desde su creación hasta el siglo XVII, la cerveza fue elaborada por fermentación espontánea, es decir, que el mosto preparado era dejado en reposo por varios días a la intemperie

permitiendo que los microorganismos presentes en el ambiente se desarrollen y al mismo tiempo generen compuestos como etanol, ácido láctico, acetaldehído, entre otros. Este tipo de fermentación no se controlaba y se creía que era un acto divino o mágico (Hornsey, 2003). Para mediados del siglo XVII, los científicos ya empezaron a entender los misterios que escondía el proceso de fermentación, y en 1680 Antonie van Leeuwenhoek fue el primero en observar microscópicamente células de levadura. Casi 200 años más tarde, en 1837 aproximadamente, tres científicos (Cagniard-Latour, 1838; Kützing, 1837; Schwann, 1837) describieron que la transformación del azúcar a etanol era mediada por microorganismos y, finalmente, en 1857 Louis Pasteur determinó que los microorganismos responsables de la fermentación eran las levaduras (Hornsey, 2003; van Rijswijck, 2017; White & Zainasheff, 1981). Estos descubrimientos permitieron entender mejor el proceso y desarrollar técnicas de aislamiento y selección de microorganismos puros, *Saccharomyces cerevisiae* en especial, para tener un adecuado control de la fermentación y elaborar bebidas fermentadas a gran escala (Hornsey, 2003; van Rijswijck, 2017). A partir de estos avances, la industria cervecera ha podido afirmarse en el mercado y ofrecer una gran variedad de estilos. En general, los tipos de cerveza se pueden agrupar en dos grandes categorías: tipo Lager o cervezas de baja fermentación y cervezas tipo Ale de alta fermentación (Burini et al., 2020; Hornsey, 2003). Las cervezas tipo Ale son producidas por cepas especiales de levadura que fermentan generalmente entre 18 y 24 °C y se caracterizan por generar más compuestos asociados a aromas y sabores. Por otro lado, las cervezas tipo Lager tienen un perfil más neutro en cuanto a sus sabores y aromas, y son elaboradas empleando cepas que trabajan de forma óptima entre los 5 y 15 °C (Hornsey, 2003; White & Zainasheff, 1981).

Microorganismos relacionados con la fermentación

Microorganismos fermentadores son aquellos microorganismos que tienen la capacidad de fermentar (asimilar azúcares) naturalmente varios alimentos y bebidas (Bamforth, 2005; Grijalva, 2019). En general, los ingredientes y el ambiente son la fuente principal de microorganismos en fermentaciones espontáneas mientras que a nivel industrial la fermentación ocurre debido a la inoculación de microorganismos seleccionados específicamente para el sustrato (Bamforth, 2005; White & Zainasheff, 1981). Existe una amplia variedad de géneros y especies responsables de la fermentación de alimentos (**Tabla 3**), entre las principales se incluyen a bacterias, hongos filamentosos y levaduras.

Tabla 3 Microorganismos responsables de la fermentación de los alimentos.

Microorganismo	Género y especie
Bacterias Ácidolácticas (BAL)	<i>Enterococcus, Lactobacillus, Pediococcus, Leuconostoc, Lactococcus, Streptococcus, entre otros.</i>
Bacillus	<i>B. circulans, B. subtilis, B. megaterium, B. thuringiensis, etc.</i>
Actinobacteria	<i>Kocuria, Micrococcus.</i>
Otros	<i>Acetobacter, Staphylococcus, Bifidobacterium, Gluconobacter, Hafnia.</i>
Levaduras	<i>Brettanomyces, Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Dekkera, Galactomyces, Hanseniaspora, Kluyveromyces, Pichia, Rhodotorula, Rhodosporidium, Saccharomyces, Saccharomycodes, Schizosaccharomyces, Torulaspora, Zygosaccharomyces.</i>
Hongos filamentosos	<i>Amylomyces, Aspergillus, Monascus, Parcilomyces, Penicillium, Rhizopus.</i>

Fuente: Bamforth, 2005

En la actualidad se emplean cultivos de microorganismos puros o mixtos que tienen la categoría de seguros para consumo (GRAS, por sus siglas en inglés, Generally Recognized As Safe) y,

según el microorganismo, las fermentaciones pueden clasificarse como (Bamforth, 2005; Grijalva, 2019):

- a. **Fermentación alcohólica:** es un proceso que genera etanol y dióxido de carbono, metabolizados a partir de azúcares como maltosa o glucosa (Briggs et al., 2004; Hornsey, 2003). Es uno de los procesos más conocidos mediado por levaduras, del género *Saccharomyces* en su mayoría, hongos filamentosos y bacterias ácido lácticas (BAL).
- b. **Fermentación ácida:** produce ácidos orgánicos y el pH del medio disminuye. Puede clasificarse en (Bamforth, 2005):
 - i. **Ácido-láctica:** los microorganismos transforman los carbohidratos en ácido láctico y otras sustancias por las vías homofermentativa o heterofermentativa.
 - ii. **Acética:** ocurre por la oxidación del etanol a ácido acético producida por bacterias del género *Acetobacter*.
- c. **Fermentación alcalina:** fase de transformación que hidroliza las proteínas a aminoácidos y péptidos y provoca un aumento de pH del medio. Esta fermentación es mediada por el género *Bacillus*.

A nivel mundial, el etanol es el principal producto de la fermentación alcohólica en términos de producción (aproximadamente 100 mil millones de litro/año). Entre sus aplicaciones están las bebidas alcohólicas y su uso como biocombustibles renovables (Steensels & Verstrepen, 2014). En el área de las bebidas alcohólicas, la elección y correcto uso de levaduras es clave para garantizar la calidad sensorial del producto final (Burini et al., 2020; Steensels & Verstrepen, 2014).

Microorganismos no convencionales empleados en fermentaciones alcohólicas

La fermentación alcohólica es un proceso biotecnológico complejo que involucra muchas reacciones y formación de muchos productos como compuestos volátiles que contribuyen al perfil organoléptico de las bebidas (Burini et al., 2020; Gamero et al., 2020; Ravasio et al., 2018). La amplia gama de metabolitos sintetizados durante la fermentación está relacionada con la variedad de microorganismos (levaduras y bacterias) involucrados durante esta etapa. Debido al gran número de especies existentes, no se conoce el metabolismo de la mayoría pero, en la actualidad, hay un marcado interés en el estudio de las rutas metabólicas, especialmente de bacterias ácido lácticas (BAL) y levaduras, en fermentaciones espontáneas como una herramienta para incrementar el perfil organoléptico de las bebidas fermentadas. Varios estudios destacaron el potencial de algunas especies de levaduras no convencionales para la producción de vino, cerveza o bebidas tradicionales como la chicha (Gamero et al., 2020; Holt et al., 2018; van Rijswijck, 2017).

Por estas razones la búsqueda de nuevas especies o cepas de levaduras y BAL ha aumentado. Para ello se investigan entornos naturales, e incluso industriales, donde ocurren fermentaciones con el propósito de encontrar microorganismos que sean útiles y puedan ayudar a entender mejor la historia evolutiva de estas especies, como es el caso de la levadura *S. eubayanus*, madre de las levaduras tipo Lager, descubierta e identificada en los bosques patagónicas de Argentina (Burini et al., 2020; B. Gibson et al., 2018). Investigaciones han demostrado el potencial fermentativo, tolerancia a condiciones de estrés, producción de compuestos de aroma y sabor en especies de levaduras que eran consideradas contaminantes alimenticios (Basso et al., 2016; Capece et al. , 2018; Gschaedler, 2017; Petruzzi et al., 2016). Además, muchas de estas

levaduras poseen una capacidad fermentativa similar o mejor que las cepas industriales (Basso et al., 2016; Petruzzi et al., 2016).

Algunas de las aplicaciones novedosas que se están analizando son la generación de bebidas con bajo contenido de alcohol, bajo contenido de calorías, bebidas funcionales y la producción de bebidas con mejores atributos de aroma y/o sabor (Gamero et al., 2020; Michel, Meier-Dörnberg, et al., 2016). También es importante señalar que la selección de cepas nativas, aisladas de entornos especiales, representa una estrategia para escalar a nivel industrial productos tradicionales y, de esta manera, rescatar y potenciar culturas ancestrales (Burini et al., 2020). En este sentido, las micro-cervecerías o cervecerías artesanales están experimentando procesos de fermentación y acondicionamiento con levaduras no convencionales para generar cervezas innovadoras y diferenciales (Callejo et al., 2019; Grijalva et al., 2020; Steensels & Verstrepen, 2014).

Algunas cepas de la especie *S. cerevisiae* aisladas de chichas han sido identificadas y se ha demostrado que poseen perfiles diferentes de ADN mitocondrial (Piló et al., 2018). Estas cepas también fueron capaces de asimilar varios azúcares simples y compuestos como la arabinosa o la ribosa por lo que han convertido en alternativas para la producción de cervezas (Burini et al., 2020; Piló et al., 2018). Sin embargo, se debe tener en cuenta que la aplicación comercial, de alguna de estas cepas, aún requiere estudios muy detallados sobre su metabolismo para conocer las condiciones óptimas de crecimiento y los productos que resultan de la metabolización de los sustratos para garantizar que sean seguros para la industria (Burini et al., 2020; Nubia Grijalva, 2019).

Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares heterotróficos que están presentes en una gran cantidad de ambientes. La mayoría son aerobias pero algunas (como las levaduras cerveceras) son anaerobias facultativas que pueden reproducirse sexual o asexualmente (Bamforth, 2005; Nubia Grijalva, 2019). Generalmente tienen forma esférica, ovalada o cilíndrica. Al ser organismos heterótrofos, pueden asimilar varias fuentes de carbono, especialmente los carbohidratos como hexosas y pentosas (Bamforth, 2005; White & Zainasheff, 1981).

Estos microorganismos juegan un papel importante en la biotecnología de alimentos, en particular en los productos fermentados (Bamforth, 2005), ya que la mayoría de especies, especialmente *Saccharomyces*, son inocuas para los seres humanos (Burini et al., 2020; Nubia Grijalva, 2019).

Existe una gran cantidad de especies de levaduras identificadas (más de 1500) de las cuales aproximadamente 200 han sido aisladas de algún tipo de alimento o bebidas fermentados (**Tabla 4**) (Burini et al., 2020) y aquellas que son capaces de producir etanol son las más importantes a nivel comercial y de investigación (Burini et al., 2020; Nubia Grijalva, 2019).

El género *Saccharomyces* es el más empleado en fermentaciones alcohólicas actualmente (Nubia Grijalva, 2019) y la especie *S. cerevisiae* es la más importante por su versatilidad, cortos periodos de replicación y simplicidad de cultivo (White & Zainasheff, 1981).

Tabla 4 Levaduras aisladas de alimentos y bebidas.

Levadura	Origen	Actividad metabólica
<i>Saccharomyces</i>	Vino, cerveza, fermentos ancestrales, queso	Fermentación de Azúcares
		Hidrólisis de pectina
		Inhibición de patógenos
		Actividad proteolítica
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Queso, embutidos	Regulación de pH
		Producción de factores de crecimiento
<i>Candida</i> (fementadoras)	Vino, fermentos indígenas	Actividad proteolítica
		Inhibición de patógenos
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Bebidas fermentadas	Producción de aromáticos
		Baja producción de etanol

Fuente: Burini et al., 2020 y Grijalva, 2019.

Levaduras cerveceras

Las levaduras cerveceras pertenecen básicamente a dos especies: *S. pastorianus* o *S. cerevesiae*. Éstas son las encargadas de la fermentación del mosto, pero además se generan diversos compuestos secundarios propios de su metabolismo, que determinan principalmente el perfil de aroma y sabor en las cervezas (Bader et al., 2019; Pires et al., 2014; F. Priest & Campbell, 1996). El metabolismo de las levaduras da paso a un 80% de todos los compuestos aromáticos de la cerveza (y de todas las bebidas fermentadas), con la formación de alrededor de 500 metabolitos de aroma y sabor diferentes que varían según la especie y cepa empleada (Pires et al., 2014; F. Priest & Campbell, 1996). En la **Figura 4** se muestra un resumen de las distintas rutas metabólicas que se generan por el metabolismo de carbohidratos gracias a la acción de levaduras.

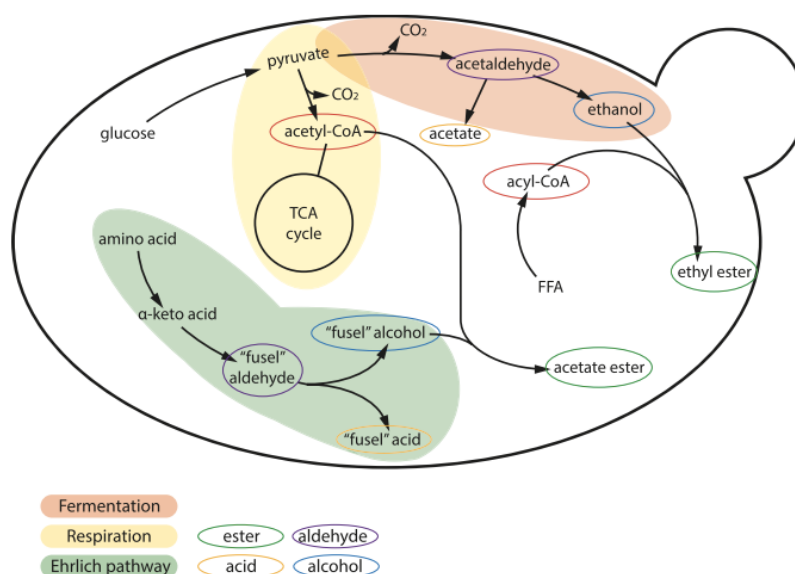


Figura 4 Esquema de las rutas metabólicas de las levaduras cerveceras.
 Fuente: van Rijswijk, 2017.

Compuestos secundarios de interés en la producción de cerveza

Según la levadura empleada y las condiciones de fermentación, se generan más de 500 metabolitos secundarios que determinan el perfil organoléptico de una cerveza. Entre los compuestos de interés y deseados en la cerveza están: fenoles, alcoholes superiores, ésteres y ácidos orgánicos. Varios compuestos volátiles han sido identificados y estudiados (.

Tabla 5) durante el proceso de fermentación y en el producto final (White & Zainasheff, 1981).

Fenoles

En la mayoría de los estilos de cerveza, los fenoles son compuestos no deseados. Los más comunes son 4-vinilguaiacol, 4-vivilfenol, 4-etilfenol, estireno, eugenol y vainillina (Budroni et al., 2017; Michel, Meier-Dörnberg, et al., 2016; F. Priest & Campbell, 1996; van Rijswijk, 2017).

Tabla 5 Compuestos generados por levaduras que contribuyen a los aromas y sabores de la cerveza.

Compuesto	Aroma	Umbral detección (mg/L)
Sulfuro de hidrógeno	Huevos podridos	0.005
Dióxido de sulfuro	Azufre	25
Acetaldehído	Manzana verde	10
Diacetilo	Mantequilla	0.1-0.15
2,3-pentanodiona	Toffee	0.9
4-vinilguaiacol	Clavo de olor	0.3
4-etilguaiacol	Rosas, dulce	0.13
Ácido acético	Vinagre	175
Ácido caprílico	Establo	15
Ácido láctico	Agrio	400
n-propanol	Alcohol, dulce	600
Isobutanol	Solvente	100
Isoamil alcohol	Banana	50-65
Etil acetato	Solvente	33
Isoamil acetato	Banana	1.6
Etil octanoato	Manzana verde	0.9
Linalool	Lavanda	0.005
Geraniol	Rosa	0.006

Fuente: van Rijswijck, 2017 y White & Zainasheff, 1981.

Ácidos orgánicos

Constituyen el grupo más grande de compuestos que forman el sabor de la cerveza. Se clasifican como volátiles y no volátiles, entre los más importantes están el ácido acético, propiónico, isobutírico, butírico, valérico, cáprico y láurico. En bajas concentraciones pueden tener efectos positivos dependiendo del estilo de cerveza pero en altas concentraciones producen efectos no deseados como sabores avinagrados (Budroni et al., 2017; Michel, Meier-Dörnberg, et al., 2016; F. Priest & Campbell, 1996; van Rijswijck, 2017).

Alcoholes superiores

Además de etanol, en la fermentación ocurre la síntesis de otros alcoholes, de mayor peso molecular, que contribuyen con sabores y aromas florales, herbales e incluso frutales. Los

alcoholes predominantes en la cerveza son el n-propanol, isobutanol, 2-feniletanol y el alcohol isoamílico (Budroni et al., 2017; Michel, Meier-Dörnberg, et al., 2016; F. Priest & Campbell, 1996; van Rijswijck, 2017).

Ésteres

Junto a los alcoholes superiores, los ésteres son compuestos secundarios que contribuyen con el perfil aromático en las cervezas. Se presentan en concentraciones bajas, pero tienen un alto impacto en el aroma y sabor. Los compuestos identificados con mayor frecuencia son etil acetato, isoamil acetato, isobutil acetato y fenil-etil acetato (Budroni et al., 2017; Michel, Meier-Dörnberg, et al., 2016; F. Priest & Campbell, 1996; van Rijswijck, 2017).

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepas de levaduras

En este estudio se utilizó tres cepas: a) cepa comercial S-04 de *Saccharomyces cerevisiae* de la marca Fermentis (ScC) b) *S. cerevisiae* aislada de una chicha de maíz (ScCh) y c) *S. cerevisiae* aislada de un alimento (ScA) en el Instituto de Microbiología de la Universidad San Francisco de Quito. Las cepas b y c fueron identificadas por métodos clásicos y moleculares.

Cultivo de levaduras y preparación de cultivos iniciadores

Para la activación de las cepas de levadura provenientes de alimentos se usaron dos medios de cultivo: YPD (extracto de levadura 1.0 % (p/v), peptona 2.0 % (p/v), dextrosa 2.0 % (p/v)) y YPM (extracto de levadura 0.3 % (p/v), peptona 0.5 % (p/v), maltosa 0.3 % (p/v), dextrosa 1.0 % (p/v)) marca Difco™. Los medios de cultivo se prepararon de acuerdo con las indicaciones del fabricante, se distribuyó en tubos 10 mL de cada medio.

Con ayuda de un asa de cultivo se tomó un inóculo de cada levadura y se transfirió a 10 mL de medio de cultivo líquido (YPD y YPM) y se incubó por 24 h a 25 °C.

Posteriormente, se transfirió los 10 mL de cultivo de cada levadura a 100 mL del mismo medio de cultivo y se incubó a 20 °C durante 24 h. La levadura comercial se activó en agua estéril siguiendo las especificaciones del fabricante y se realizó el mismo proceso (Nubia Grijalva, 2019; White & Zainasheff, 1981).

Recuento microscópico de levaduras

El número de levaduras por mL de cultivo se midió con una Cámara de Neubauer (hematocitómetro). Para esto se tomó 0.5 mL de la muestra y se depositó sobre la Cámara para realizar el conteo en cada cuadrícula según indica el protocolo de White & Zainasheff (1981) y fue necesario realizar diluciones seriadas (1:10) cuando el número de levaduras era mayor a 100 por cuadrante.

El número de células por mL se calculó con la fórmula (White & Zainasheff, 1981):

$$\text{Número de levaduras (células/mL)} = N * 5 * 10^n * 10^4$$

Donde, N es el número de células contadas en los cuadrantes y n es el número de diluciones realizadas. Para los ensayos de crecimiento y fermentación se fijó el número de levaduras inicial 10^6 células/mL (White & Zainasheff, 1981).

Crecimiento microbiano

Según el protocolo modificado de Gibson *et al.* (2013), se inoculó 10 mL de los cultivos iniciadores de cada levadura con una concentración inicial de 10^6 células/mL en 100 mL de medio YPD o YPM luego se incubaron a 12 °C y 20 °C sin agitación por 24 h.

Se aplicó un Diseño Completamente al Azar con arreglo factorial 2x2x3 correspondiente a la combinación de tres factores: Fuente de carbono (glucosa y maltosa según el medio de cultivo YPD o YPM, respectivamente), Temperatura de incubación (12 y 20 °C) y Cepa de levadura (ScC, ScCh y ScA). Se realizaron tres réplicas, se obtuvo 36 unidades experimentales y un total de 12 tratamientos (**Tabla 6**). Como variable de respuesta se cuantificó el número de levaduras

(células/mL) a las 24 horas de incubación que acuerdo con Grijalva (2019) y van Rijswijk (2017) el número mínimo de levaduras alcanza valores promedios de 10^8 células/mL.

Tabla 6 Condiciones para ensayo de crecimiento microbiano.

Tratamiento	Cepa de Levadura	Fuente de Carbono	Temperatura de crecimiento
T1	ScC	Glucosa	12 °C
T2	ScC	Glucosa	20 °C
T3	ScC	Maltosa	12 °C
T4	ScC	Maltosa	20 °C
T5	ScCh	Glucosa	12 °C
T6	ScCh	Glucosa	20 °C
T7	ScCh	Maltosa	12 °C
T8	ScCh	Maltosa	20 °C
T9	ScA	Glucosa	12 °C
T10	ScA	Glucosa	20 °C
T11	ScA	Maltosa	12 °C
T12	ScA	Maltosa	20 °C

Fermentación alcohólica

Preparación del mosto de malta

El mosto estandarizado se obtuvo en una planta piloto de 80 L marca Blichmann. Para su producción se empleó malta base Pale Ale de la casa comercial Eriks triturada en un molino de dos rodillos marca Malt Master (por 10 min aproximadamente), hasta exposición del endospermo. Se mezclaron 13.80 kg de malta triturada con 42 litros de agua para el proceso de maceración simple a 64°C por 60 min. A continuación, se filtró y colectó el primer mosto, luego se lavó el grano con 70 L de agua a 75°C acidificada a pH 5.5 y el agua de lavado se mezcló

con el primer mosto hasta obtener una densidad aproximada de 1.036 g/mL (White & Zainasheff, 1981). Se esterilizó el mosto por ebullición durante 60 min y se añadió 125 g de lúpulo East Golding a los 10 min de iniciada la ebullición. Al finalizar, el mosto se enfrió, se midió pH, densidad de mosto y grados Brix y almacenó en barriles y frascos estériles a 0°C hasta su posterior utilización.

Fermentación a escala de laboratorio

Para la fermentación a escala de laboratorio en un litro de mosto contenido en un matraz de 2L, se inoculó 100 mL de cada cultivo iniciador con un número inicial de levaduras de 10^6 células/mL y se selló con tapón de caucho y una trampa de aire llena de ácido peracético (0.1 % v/v) (White & Zainasheff, 1981). El proceso de fermentación tuvo lugar a 20 °C sin agitación. Los tratamientos fueron dispuestos en un Diseño Completamente al Azar de un solo factor (cepa de levadura) (**Tabla 7**). Se realizaron tres réplicas y se obtuvo 12 unidades experimentales. Las variables de respuesta fueron: número de levaduras, pH, grados Brix, porcentaje de alcohol y densidad de mosto.

Tabla 7 Tratamientos para los ensayos de fermentación alcohólica.

Tratamiento	Cepa de Levadura	Tipo de inóculo
T1	ScC (control)	Puro
T2	ScCh	Puro
T3	ScA	Puro
T4	ScCh:ScA	Mixto

Durante este periodo se tomó muestras a las 0, 4, 8, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 h para determinar el valor de los Parámetros de Fermentación hasta cuando permanecieron constantes (96 h).

Fermentaciones a escala piloto

Las fermentaciones se realizaron en recipientes cilindro-cónicos simulando las condiciones a escala industrial. Los cuatro tratamientos a escala de laboratorio fueron replicados en estas condiciones.

En los fermentadores se inoculó 15 L de mosto con 10^6 células/mL de cada levadura a 20 °C (Brian Gibson et al., 2013).

A lo largo de la fermentación se tomó muestras, asépticamente, para determinar densidad de mosto, pH, porcentaje de alcohol y grados Brix y finalizó cuando ya no hubo cambios en estos parámetros (96 h). Una vez que la fermentación terminó, la cerveza se maduró por dos semanas a 4 °C y se gasificó en barriles a 17 PSI (Briggs et al., 2004). Las cervezas se almacenaron en estas condiciones para la Evaluación Sensorial.

Parámetros de Fermentación

Densidad de mosto

La densidad del mosto antes, durante y al final de la fermentación se determinó con un densímetro. En una probeta de 100 mL se recogió aproximadamente 70 mL de la muestra para sumergir el densímetro y que este flote. La medida se tomó sobre la barra graduada una vez que se estabilizó (R. Barth, 2013). Para ensayos de fermentación con cepas no convencionales la densidad inicial del mosto se recomienda entre 1.040 a 1.060 g/mL (Briggs et al., 2004; White & Zainasheff, 1981), mientras que la densidad final depende de la actividad de la levadura

empleada y puede variar en el rango de 1.012 a 1.028 g/mL (Grijalva, Krogerus, et al., 2020; van Rijswijk, Wolkers - Rooijackers et al., 2017).

pH del mosto

El pH de las muestras se cuantificó con un potenciómetro portátil marca BOECO, introduciendo el electrodo, previamente lavado, en una muestra de 50 mL (White & Zainasheff, 1981). Los valores de pH varían a lo largo del proceso de fermentación. Para la producción de cerveza, el pH del mosto antes de la fermentación puede tener valores desde 5.4 hasta 4.2 mientras que, al finalizar, los valores pueden ir desde 5.0 hasta 3.0 según la cepa de levadura empleada y el estilo de cerveza (R. Barth, 2013).

Grados Brix

Los grados Brix se midieron utilizando un refractómetro manual marca ATAGO. Se colocó aproximadamente 0.5 mL de muestra sobre la superficie plana del refractómetro y se consideró el valor medido sobre la escala graduada (R. Barth, 2013). Los valores referenciales antes de la fermentación, para pruebas de crecimiento, están en el rango de 10 a 14 °Brix y al finalizar el proceso de 3 a 7 °Brix para el mosto de cebada (R. Barth, 2013; Nubia Grijalva, 2019).

Porcentaje de alcohol

El porcentaje teórico de alcohol se cuantificó relacionando las densidades inicial y final del mosto con la expresión:

$$\% alc. (v/v) = \frac{D_o - D_f}{0.0075}$$

Donde, D_o es la densidad del mosto antes de la fermentación y D_f es la densidad al finalizar la fermentación (Hornsey, 2003). El porcentaje de alcohol para una cerveza estándar, así como para ensayos de capacidad de fermentación oscila entre 3 y 7 % (v/v) (Barth, 2013; Hornsey, 2003).

Ponderación de las variables de respuesta

La concentración microbiana o número de levaduras (células/mL) y los Parámetros de Fermentación fueron ponderados para calificar a los tratamientos en el ensayo de fermentación a escala de laboratorio. El peso para cada variable se estableció con una escala de 1 a 5 (**Tabla 8**) según la influencia en la calidad organoléptica de la cerveza. (Parker, 2012; Yonezawa & Fushiki, 2002).

Tabla 8 Escala de ponderación de las variables de respuesta.

Variable de respuesta	Peso ponderado	
	Cumple	No cumple
pH	5	0
% alcohol	4	0
Concentración microbiana	3	0
Grados Brix	2	0
Densidad	1	0

El pH fue la variable de mayor importancia (5), porque está relacionada directamente con sabores ácidos (generalmente, no deseados) en cerveza que son fácilmente apreciados durante la evaluación sensorial (Bamforth, 2005; White & Zainasheff, 1981). De igual manera, el porcentaje de alcohol (4) y número de levaduras (3) influyen en el sabor y aroma de una bebida fermentada (White & Zainasheff, 1981). Mientras que los sabores y aromas debido a la presencia de etanol son comunes para muchos estilos de cerveza, los relacionados a levaduras son atributos no deseados por los consumidores (Parker, 2012). Los grados Brix (2) no tienen un impacto directo, al igual que la densidad de mosto (1), sobre aromas o sabores, pero son

indicadores de la actividad metabólica que posee una determinada levadura (Briggs et al., 2004) y de los azúcares residuales que aportan al cuerpo a la cerveza.

Cuantificación de Diacetilo

El diacetilo se detectó y cuantificó mediante Cromatografía de Gases en Espacio de Cabeza (HSGC, por sus siglas en inglés) según el método descrito por Dysvik et al. (2020). Para esto, 10 g de cada muestra se filtró a través de filtros (poro < 2 micras) para eliminar el CO₂. Las muestras se colocaron en el muestreador automático de espacio de cabeza a 50 °C y 60°C del colector. El muestreador estaba conectado al sistema de Cromatografía de Gases con detector de ionización de llama. Como gas portador se utilizó Helio a 5.0mL/min. Las muestras se inyectaron a 10 PSI de presión y los componentes se separaron en columna de 25m * 0.53 mm de diámetro interior con espesor de película de 5 m. Para la cuantificación se utilizó 500 L de estándar externo de 2,3-butanodiona (diacetilo).

La concentración umbral detectable de diacetilo libre en una cerveza industrial es de 100 ppb, mientras que para cervezas artesanales la concentración puede ir de 500 a 1000 ppb (White & Zainasheff, 1981).

Evaluación Sensorial

Se evaluaron 4 muestras de cerveza (ScC, ScCh, ScA, ScCh:ScA), con la participación de 6 jueces entrenados y certificados por el Beer Judge Certification Program (BJCP) que utilizaron la hoja de evaluación Beer Scoresheet (**ANEXO A: HOJA DE EVALUACIÓN BEER SCORESHEET**). Las muestras se analizaron en orden aleatorio individual (Parker, 2012). Los atributos evaluados fueron: aroma (maltoso, lupulado, levadura

y alcohol), apariencia (color, claridad, espuma y retención de espuma), sabor (maltoso, lupulado, amargo, levadura, balanceado y regusto) y sensación en boca (cuerpo, carbonatación, astringencia, calidez y cremosidad). Se aplicó una escala discreta de 1 a 10 (para la mayor intensidad) según los métodos modificados de la BrewersAssociation (2010) y de Rossi et al. (2018).

La evaluación se desarrolló en la ciudad de Quito, en la cervecería Andes Brewing Co. Cada juez tuvo un lugar asignado previamente en mesas para tres participantes y dispuso de la hoja de calificación para cada cerveza. Las bebidas fueron servidas a 12 ± 1 °C, 100 mL en vasos de vidrio codificados con números al azar de tres dígitos (Parker, 2012; Simpson, 2016). Las muestras se presentaron de forma monádica al panel para su respectiva calificación. Entre cada una de las muestras se ofreció a los panelistas agua mineral sin gas y galletas sin sal, para limpiar su paladar (Simpson, 2016). Los valores promedios de cada atributo se representaron en un diagrama de radar (Rossi et al., 2018).

Análisis Estadístico

Los datos fueron evaluados mediante Análisis de Varianza (ANOVA) y prueba de Tukey al 5% de probabilidad. Se utilizó el software R-studio versión 4.0.5 (disponible en: <https://www.rstudio.com/products/rstudio/download/#download>).

RESULTADOS

Crecimiento microbiano

Hubo diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$) y todos los factores tanto de forma individual (Cepa de levadura, Fuente de carbono y Temperatura) como sus interacciones influyeron significativamente ($p \leq 0.05$) en el crecimiento microbiano de los tratamientos (Tabla 9).

Tabla 9 Análisis de Varianza (ANOVA) del crecimiento microbiano de los tratamientos.

Fuente de variación	Grados de libertad	Suma de cuadrados	Cuadrados medios	P-valor
Tratamientos	11	2.499E+16	2.272E+15	<2.2E-16*
Cepa de levadura	2	8.246E+15	4.123E+15	<2.2E-16*
Fuente de Carbono	1	1.147E+15	1.147E+15	<2.2E-16*
Temperatura	1	2.414E+15	2.414E+15	<2.2E-16*
Levadura:Fuente de carbono	2	4.729E+13	2.365E+13	9.321E-7*
Levadura:Temperatura	2	1.165E+16	5.824E+15	<2.2E-16*
Fuente de carbono:Temperatura	1	1.009E+15	1.009E+15	<2.2E-16*
Levadura:Fuente de carbono:Temperatura	2	4.774E+14	2.387E+14	<2.2E-16*
Residuos	24	2.169E+13	9.036E+11	
Total	35			

* Significativo al 5% de probabilidad.

Cepa de levadura: ScC, ScCh y ScA.

Fuente de carbono: Glucosa (YPD) y Maltosa (YPM)

Temperatura: 12 °C y 20 °C

Como se observa en la **Tabla 10**, en presencia de glucosa e incubación a 20 °C, la cepa ScCh (T6) mostró el mayor crecimiento ($p \leq 0.05$), alcanzó un promedio de $1.24 \cdot 10^8$ células/mL (**Figura 5**), esta cepa también creció en presencia de maltosa a 20 °C (T8) pero no alcanzó el límite inferior de 10^8 células/mL establecido (**Figura 6**). A baja temperatura (12 °C), la cepa ScCh (T7) mostró un crecimiento de $4.55 \cdot 10^7$ células/mL en presencia de maltosa y $4.06 \cdot 10^7$ células/mL en presencia de glucosa (T5) pero no alcanzó el límite establecido hasta las 24 h de incubación (**Figura 7 y**

Figura 8).

Tabla 10 Crecimiento microbiano en los diferentes tratamientos.

Tratamiento	Número de células/mL
T6	$1.24\text{E}+08 \pm 0.79\text{E}+06^a$
T8	$9.01\text{E}+07 \pm 0.20\text{E}+06^b$
T10	$5.81\text{E}+07 \pm 0.15\text{E}+07^c$
T3	$5.10\text{E}+07 \pm 0.90\text{E}+06^d$
T1	$5.05\text{E}+07 \pm 0.87\text{E}+06^d$
T9	$4.84\text{E}+07 \pm 0.79\text{E}+06^{de}$
T12	$4.75\text{E}+07 \pm 0.35\text{E}+06^{ef}$
T7	$4.55\text{E}+07 \pm 0.22\text{E}+07^f$
T11	$4.09\text{E}+07 \pm 0.36\text{E}+06^g$
T5	$4.06\text{E}+07 \pm 0.60\text{E}+06^g$
T2	$3.84\text{E}+07 \pm 0.71\text{E}+06^g$
T4	$1.71\text{E}+07 \pm 0.10\text{E}+06^h$

Medias \pm DE.

Medias seguidas de por lo menos una misma letra no difieren entre sí al 5% de probabilidad, por la prueba de Tukey.

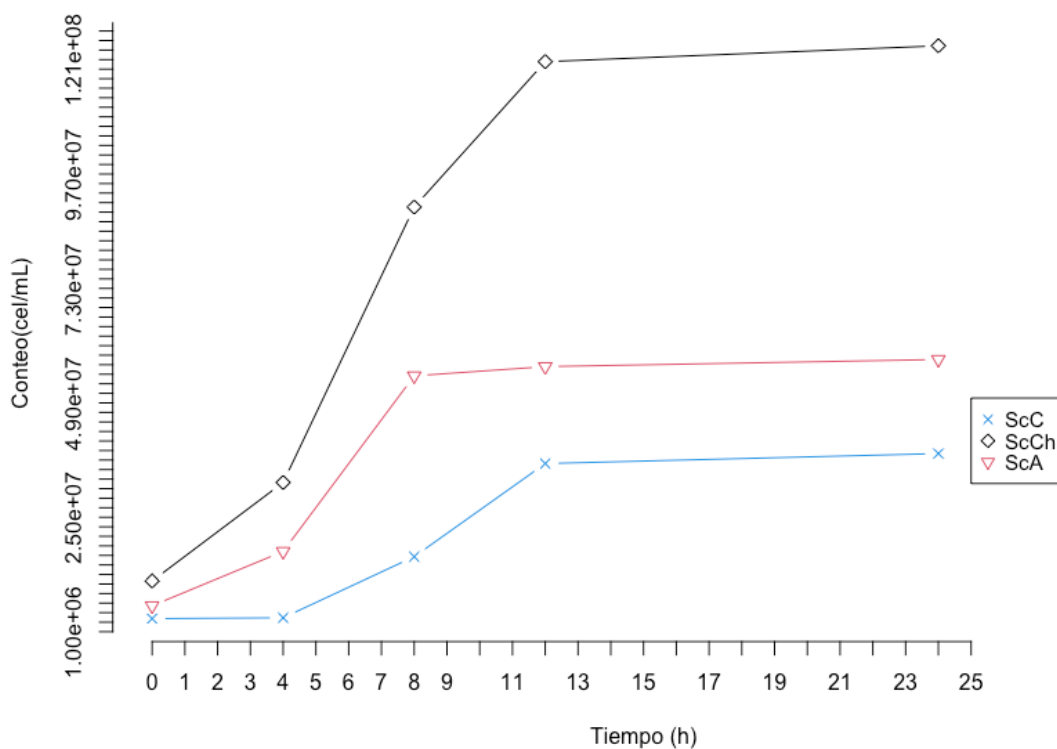


Figura 5 Crecimiento celular de tres cepas de *S. cerevisiae* durante 24 h a 20 °C en medio de glucosa.

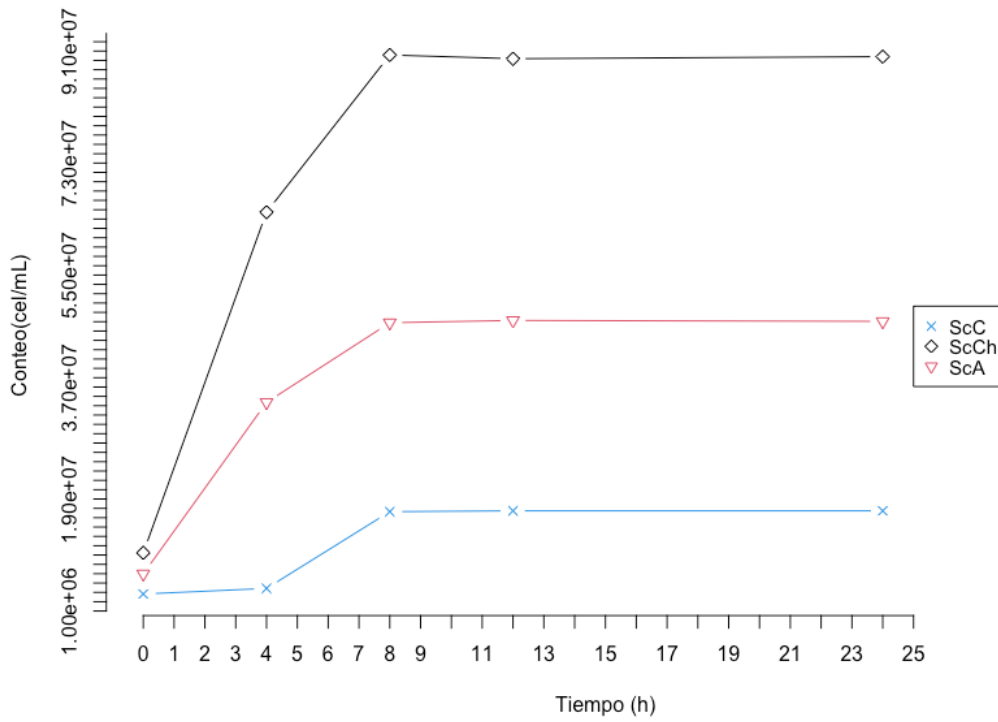


Figura 6 Crecimiento celular de tres cepas de *S. cerevisiae* durante 24 h a 20 °C en medio de maltosa.

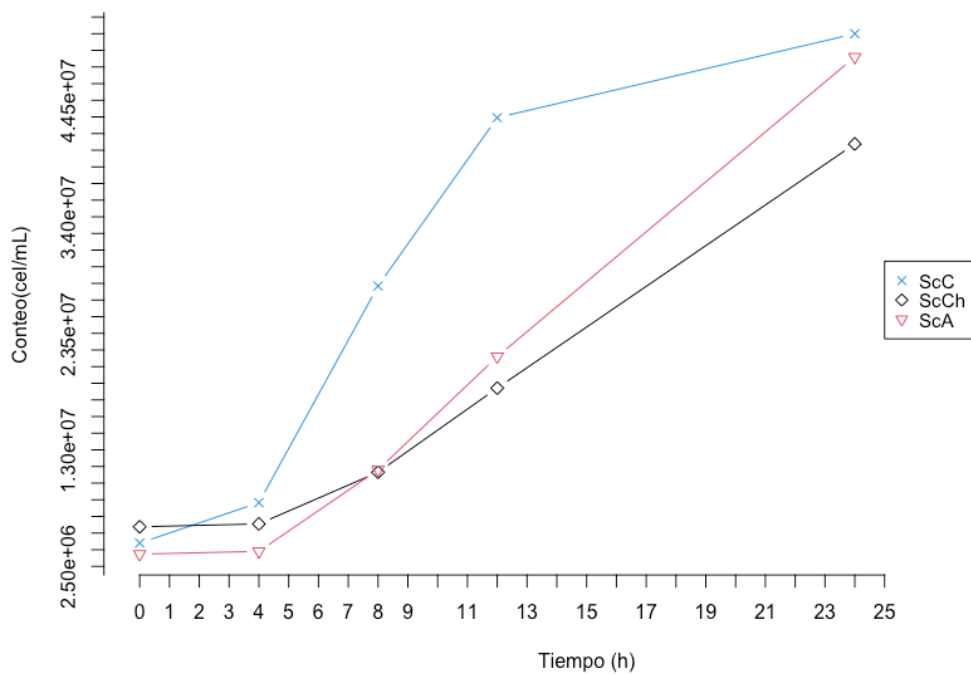


Figura 7 Crecimiento celular de tres cepas de *S. cerevisiae* durante 24 h a 12 °C en medio de glucosa.

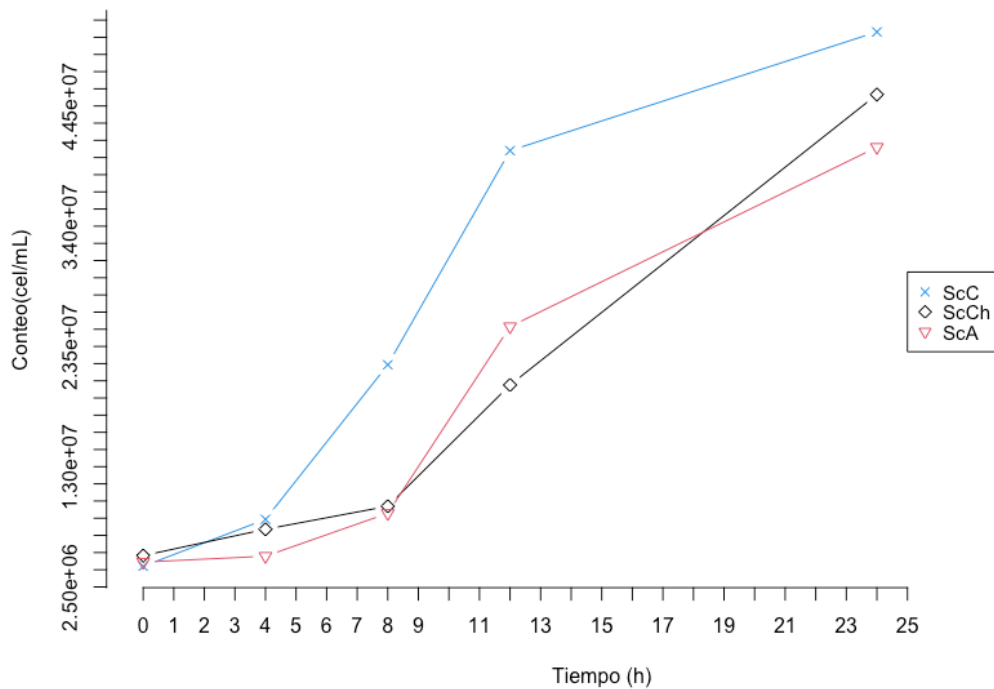


Figura 8 Crecimiento celular de tres cepas de *S. cerevisiae* durante 24 h a 12 °C en medio de maltosa.

La cepa ScA (T10), mostró su mayor crecimiento ($p \leq 0.05$), $5.81 \cdot 10^7$ células/mL en presencia de glucosa a 20 °C (**Figura 5**) mientras que en presencia de maltosa y a 12 °C de incubación (T11) fue su crecimiento más bajo ($p \leq 0.05$), con una media de $4.09 \cdot 10^7$ células/mL (

Figura 8). Para el crecimiento en glucosa a 12 °C (T9) y en maltosa a 20 °C (T12) no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$) en la variable de respuesta (**Figura 7** y **Figura 6**).

Por otro lado, a 12 °C la cepa ScC (**Figura 7** y

Figura 8) en presencia de maltosa (T3) y de glucosa (T1), reportó valores medios de $5.10 \cdot 10^7$ y $5.05 \cdot 10^7$ células/mL, respectivamente y no hubo diferencia significativa ($p > 0.05$). El crecimiento más bajo para esta cepa se mostró a 20 °C (**Figura 5** y **Figura 6**) donde alcanzó las $3.84 \cdot 10^7$ células/mL en presencia de glucosa (T2) y $1.71 \cdot 10^7$ células/mL en presencia de

maltosa (T4), es decir, la temperatura influyó significativamente ($p \leq 0.05$) en el crecimiento de estos dos tratamientos.

Fermentación alcohólica

Mosto de Malta

Las tres variables de respuesta Grados Brix (13.80 °Brix), Densidad de mosto (1.055 g/mL) y pH (5.00) cumplieron los rangos establecidos (Parámetros de Fermentación) para pruebas de crecimiento y fermentación.

Fermentación a escala de laboratorio

Los Parámetros de Fermentación se determinaron a lo largo de 96 h hasta cuando sus valores permanecieron constantes (**Figura 9**).

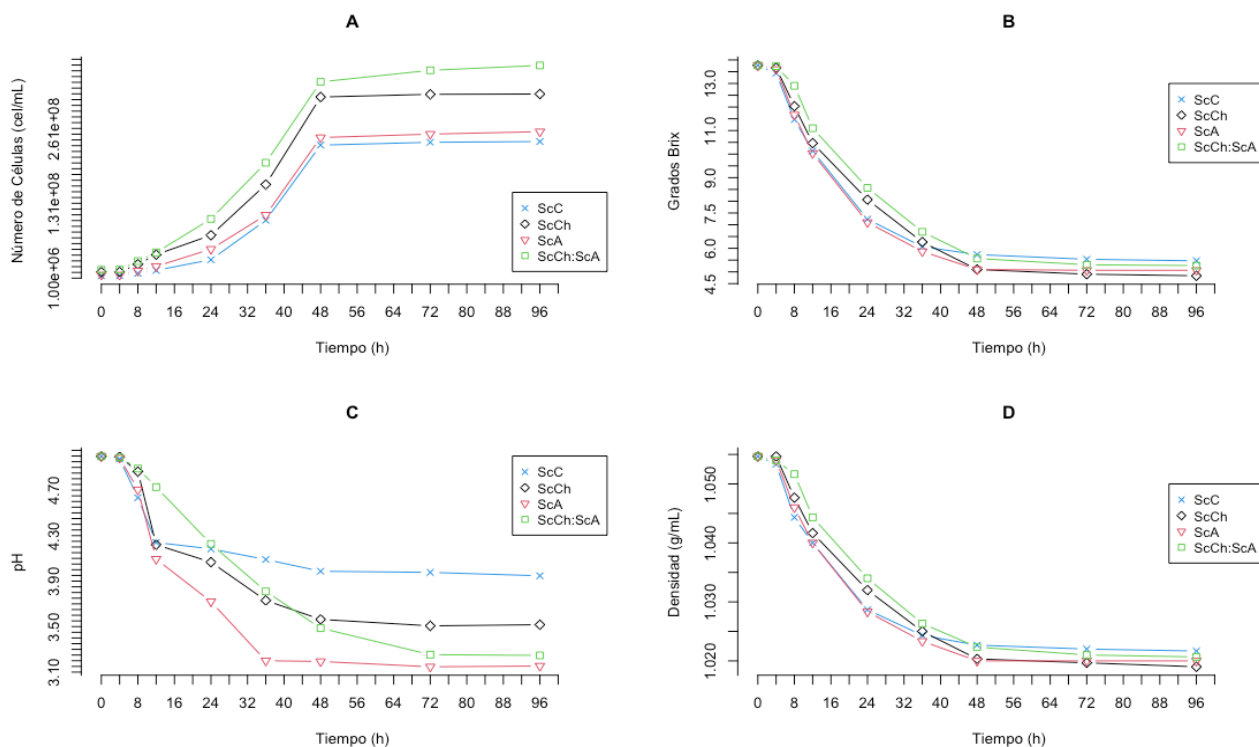


Figura 9 Parámetros de fermentación de las cepas ScC, ScCh, ScA y ScCh:ScA: del número de células (A), grados Brix (B), pH (C) y densidad (D) durante 96 h de fermentación a 20 °C en mosto de cebada.

Existió diferencia significativa entre los tratamientos ($p \leq 0.05$). El factor analizado (cepa de levadura) influyó significativamente ($p \leq 0.05$) sobre el número de levaduras (células/mL), densidad de mosto, grados Brix, pH y porcentaje de alcohol de los tratamientos (**Tabla 11**).

Tabla 11 Resumen del Análisis de Varianza (ANOVA) del Número de levaduras, Grados Brix, Densidad de mosto, pH y Porcentaje de alcohol de los tratamientos.

Fuente de Variación	Grados de Libertad	Cuadrados medios				
		Número de levaduras	Grados Brix	Densidad de mosto	pH	Alcohol (% v/v)
Tratamientos	3	1.109E+16*	0.221*	0,003778*	0.380*	0.068*
Residuos	8	3,08E+15	0.003	1,67E-04	0.001	0.003
Total	11					

* Significativo al 5% de probabilidad

La cepa ScCh:ScA presentó el mayor crecimiento ($3.70 \cdot 10^8$ células/mL) mientras que la cepa ScC (control) tuvo el más bajo ($2.38 \cdot 10^8$ células/mL), pero todos los tratamientos alcanzaron el límite inferior de 10^8 células/mL (**Tabla 12**).

Tabla 12 Número de levaduras, porcentaje de alcohol, pH, densidad de mosto y grados Brix de los tratamientos.

Cepa de levadura	Número de levaduras (células/mL)*	Alcohol (% v/v)*	pH*	Densidad de mosto (g/mL)*	Grados Brix*
ScCh:ScA	$3.70E+08 \pm 0.55E+06^a$	4.58 ± 0.08^{bc}	3.25 ± 0.01^c	1.02 ± 0.00^{ab}	5.27 ± 0.06^b
ScCh	$3.21E+08 \pm 5.77E+05^b$	4.80 ± 0.00^a	3.52 ± 0.01^b	1.01 ± 0.00^c	4.83 ± 0.06^d
ScA	$2.56E+08 \pm 3.06E+06^c$	4.67 ± 0.00^{ab}	3.15 ± 0.01^d	1.02 ± 0.00^{bc}	5.07 ± 0.06^c
ScC (control)	$2.38E+08 \pm 1.53E+06^d$	4.44 ± 0.08^c	3.95 ± 0.04^a	1.02 ± 0.00^a	5.47 ± 0.06^a

Medias \pm DE

Medias seguidas de por lo menos una misma letra no difieren entre si al 5 % de probabilidad, por la prueba de Tukey.

Las cepas ScCh y ScA generaron la mayor concentración de etanol y no hubo influencia significativa entre ellas ($p > 0.05$). La media del porcentaje de etanol de los cuatro tratamientos está dentro del rango de 3 a 7 % (v/v) recomendado (**Tabla 12**).

Durante la fermentación se obtuvo niveles bajos de pH (entre 3.15 y 3.95), dentro del rango establecido. La cepa comercial ScC presentó el más alto pH (3.95) y la cepa ScA mostró el promedio más bajo (pH=3.15) ($p \leq 0.05$).

Ponderación de las variables de respuesta

La ponderación total (**Tabla 13**) de las variables de interés fue la misma para todos los tratamientos, es decir, todos cumplieron con las especificaciones lo que determinó que fueran replicados a escala piloto.

Tabla 13 Ponderaciones de las variables de respuesta.

Cepa de levadura	pH	Alcohol	Densidad celular	Grados Brix	Densidad	Total
ScCh:ScA	5	4	3	2	1	15
ScCh	5	4	3	2	1	15
ScA	5	4	3	2	1	15

Fermentaciones a escala piloto.

El tiempo de fermentación a escala piloto a 20 °C duró entre siete y diez días hasta cuando los Parámetros de Fermentación se mantuvieron estables (**Tabla 14**) y cumplieron con lo establecido para una cerveza estándar.

Tabla 14 Parámetros al finalizar la fermentación.

Cepa de levadura	Densidad (g/mL)	Grados Brix	Alcohol (% v/v)	pH
ScCh:ScA	1.018	4.50	4.93	4.80
ScCh	1.022	5.10	4.40	4.60
ScA	1.016	4.20	5.20	4.80
ScC (control)	1.011	3.80	5.87	4.90

Cuantificación de Diacetilo

El diacetilo total y diacetilo libre se cuantificaron por HSGC en las cuatro muestras de cervezas obtenidas del ensayo de fermentación piloto y sus valores se presentan en la .

Tabla 15.

Tabla 15 Concentraciones de Diacetilo total y libre en las muestras de cerveza.

Cepa de levadura	Diacetilo total (ppb)	Diacetilo libre (ppb)
ScCh:ScA	130	24
ScCh	212	90
ScA	96	18
ScC	226	110

Las cuatro cervezas cumplieron con las especificaciones para diacetilo libre. Las cepas ScCh, ScA, y ScCh:ScA generaron valores menores al umbral de detección (100 ppb) mientras que la cepa ScC mostró el valor más alto (110 ppb) pero dentro de rango para cervezas artesanales (White & Zainasheff, 1981).

Evaluación sensorial

La evaluación sensorial se realizó con la participación de jueces certificados y cada uno calificó las muestras en una escala discreta de 10 puntos para representar gráficamente los atributos mínimos requeridos en una cerveza (**Figura 10**).

El perfil aromático de las cuatro cepas presentó los mismos polígonos, pero las cepas ScCh, ScA y ScCh:ScA mostraron un acentuado aroma a levadura (o fermento) en comparación con

la cepa ScC. Además, esta cepa destacó por su aroma a lúpulo y alcohol más intenso en comparación a las demás levaduras.

Las cervezas presentaron perfiles diferentes de sabor. Las cepas ScCh, ScA y ScCh:ScA tuvieron un mayor sabor a levadura a diferencia de la cepa ScC que se caracterizó por mayores sabores a lúpulo y malta. El amargor fue similar para las cuatro cepas y respecto al balance de sabor, las cepas ScCh, ScA y ScCh:ScA tuvieron mejor puntuación, pero también se identificó que estas cepas, excepto la cepa ScCh, poseían un regusto no deseado.

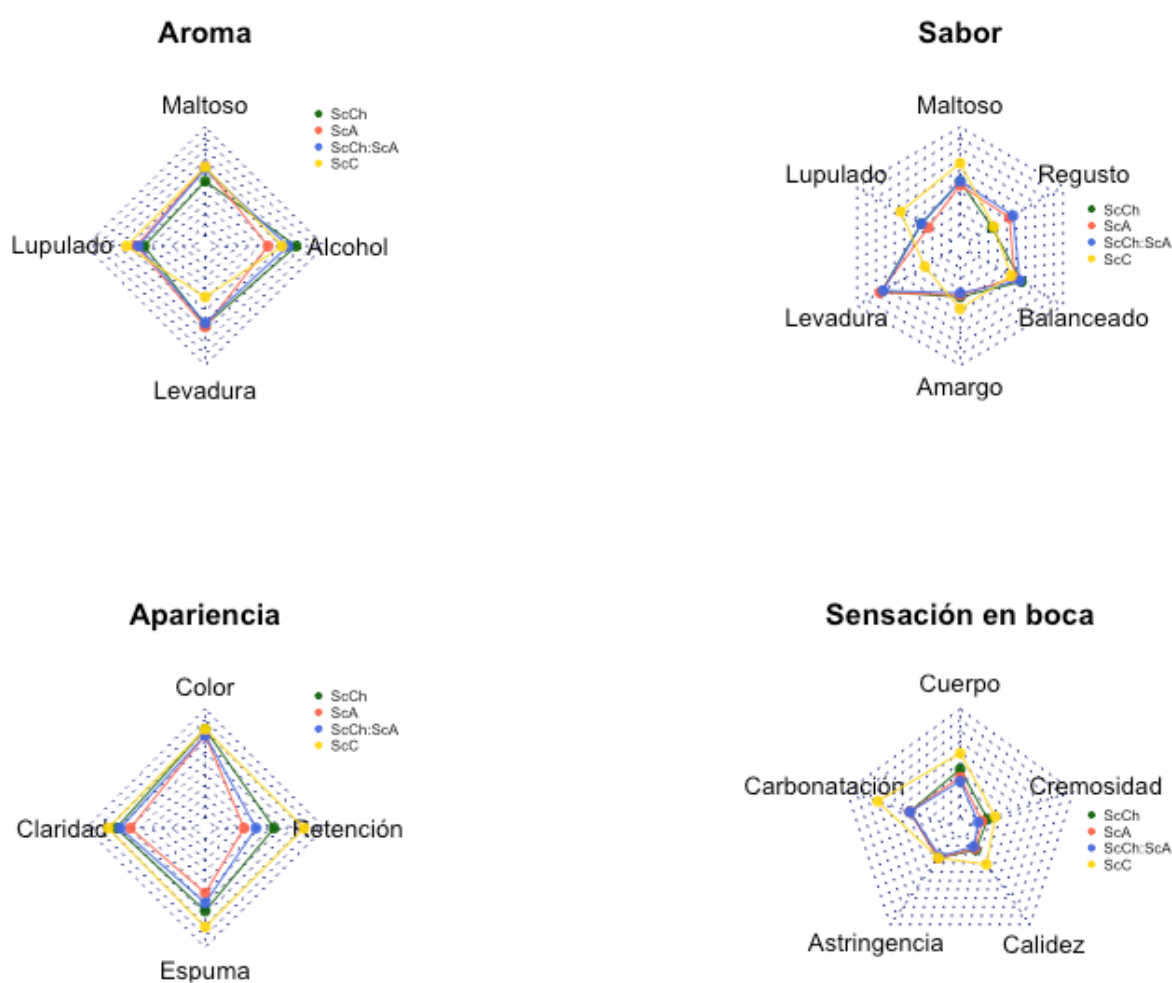


Figura 10 Perfiles organolépticos de las cervezas evaluadas.

El perfil de apariencia de las cervezas generó diferentes polígonos, la cepa ScC mostró una cerveza con mayor espuma y mejor retención, además fue calificada como más cristalina en

comparación a las cervezas fermentadas con las cepas ScA, ScCh y ScCh:ScA. El color fue el único atributo en el que las cuatro cepas obtuvieron los mismos valores.

Finalmente, el perfil de sensación en boca evidenció que la levadura ScC tuvo un mejor nivel de carbonatación, una sensación de calidez más intensa y mejor cuerpo. Para la cremosidad y astringencia, las cuatro levaduras obtuvieron valores bajos en la escala empleada.

DISCUSIÓN

Tanto las cepas de *S. cerevisiae* domesticadas como comercial fueron capaces de crecer en los medios suplementados con glucosa y maltosa (**Figura 5**, **Figura 6**, **Figura 7** y **Figura 8**), y alcanzaron concentraciones de 10^8 células/mL. Esto indica que son capaces de asimilar estos azúcares y producir etanol en concentraciones adecuadas para la industria cervecera tal como señalan Grijalva et al. (2020) y van Rijswijck et al. (2017).

Uno de los rasgos característicos de domesticación de levaduras es la capacidad para fermentar una amplia variedad de azúcares, como maltosa y glucosa, que están presentes en varios sustratos, especialmente en la industria de bebidas fermentadas (Bamforth, 2005; Nubia Grijalva, 2019). Estos azúcares son las fuentes de carbono más abundantes en el mosto de cebada, la metabolización eficiente de los dos es un requisito indispensable en la elaboración de cerveza (Bamforth, 2005; Briggs et al., 2004). Las cepas de levadura domesticadas en bebidas o alimentos fermentados pueden asimilar fácilmente la glucosa, pero solo algunas pueden asimilar la maltosa (Bamforth, 2005; Nubia Grijalva, 2019; Ravasio et al., 2018).

La presencia de maltosa en chichas andinas podría explicar que algunas cepas salvajes de *S. cerevisiae* estén adaptadas para asimilar este azúcar (Chaves et al., 2020; N. J. Grijalva, 2019; Piló et al., 2018). La asimilación de azúcares por parte de *S. cerevisiae* está relacionada a la presencia de ciertas proteínas de membrana (permeasas) las cuales permiten el transporte de azúcares al interior de las células (Bamforth, 2005; White & Zainasheff, 1981) y, en consecuencia, su metabolización. Se ha encontrado que varias cepas salvajes aisladas de chicha poseen genes encargados de codificar estas proteínas de membrana y les permite transformar la glucosa y/o maltosa en etanol (Piló et al., 2018). Los principales genes encargados de codificar permeasas son HXT, MALT y AGT para el transporte de glucosa, maltosa y maltotriosa respectivamente. Estos genes son expresados según la especie y cepa de levadura en presencia del sustrato donde son domesticadas (Marongiu et al., 2015; Piló et al., 2018).

La temperatura es un factor que influye directamente en el desarrollo y crecimiento microbiano (Bamforth, 2005; White & Zainasheff, 1981). A temperaturas entre 18 y 30 °C, la mayoría de levaduras domesticadas y salvajes presenta una buena tasa de crecimiento (Bader et al., 2019; Bamforth, 2005) pero existen excepciones para levaduras adaptadas a ambientes fríos con temperaturas entre 4 y 15 °C, como es el caso de *S. eubayanus* o *S. cerevisiae* var. *boulandii* (Burini et al., 2020; van Rijswijck, 2017). Los ensayos de crecimiento a una temperatura de 12 °C permiten conocer la adaptabilidad de las cepas a bajas temperaturas y su posible aplicación en la elaboración de cervezas tipo Lager (Burini et al., 2020; Nubia Grijalva, 2019). Las tres cepas estudiadas mostraron crecimiento a 12 °C pero la temperatura óptima de crecimiento fue 20 °C como se emplea en la elaboración de cervezas artesanales tipo Ale (Hornsey, 2003; White & Zainasheff, 1981). La domesticación de levaduras está reflejada en su genoma y fenotipos.

Las cepas cerveceras han presentado un mayor grado de adaptabilidad a los procesos de elaboración ya que se manejan condiciones muy controladas y estables (Gallone et al., 2016). Por otro lado, las cepas salvajes, aisladas de alimentos o bebidas fermentadas espontáneamente, no se desarrollan en condiciones estables, es decir, sus entornos naturales son muy diversos (Piló et al., 2018). Varios estudios han mostrado variaciones a nivel genético entre cepas cerveceras y salvajes, incluso entre cepas aisladas de diferentes chichas se han identificado variaciones genómicas y fenotípicas (Cubillos et al., 2019; Piló et al., 2018). Estas diferencias se atribuyen a los diversos ambientes (temperatura y tiempo de fermentación, tipo de sustrato, etc.) donde se desarrollan estas levaduras (N. Grijalva et al., 2020). Las levaduras aisladas de alimentos poseen una mejor adaptación a temperaturas altas (mayores a 15 °C) debido a su proceso de domesticación a estas condiciones. Las chichas de la región andina difieren respecto a su elaboración, pero por lo general, fermentan a temperaturas de 18 a 30 °C (N. Grijalva et al., 2020; Piló et al., 2018). Los ensayos de fermentación permiten evaluar el potencial de las levaduras y su posible aplicación en la industria, para esto se requiere un sustrato estándar (mosto) con una baja densidad inicial (entre 1.040 y 1.060 g/mL), ya que una concentración elevada de azúcares puede inhibir el metabolismo de las levaduras por exceso de sustrato o estrés osmótico (Briggs et al., 2004; White & Zainasheff, 1981). Además se necesita de un bajo amargor porque una alta cantidad de compuestos provenientes del lúpulo puede detener el crecimiento de algunas especies de levaduras (Dysvik et al., 2020; van Rijswijck, 2017). El mosto de cebada debe simular perfectamente las condiciones que requieren algunos estilos de cerveza, tanto tipo Ale como Lager (R. Barth, 2013; White & Zainasheff, 1981), y este sustrato debe tener cantidades adecuadas de nitrógeno y vitaminas que favorezcan el crecimiento y multiplicación microbiana (R. Barth, 2013). En el presente estudio los Grados Brix (13.80

°Brix), Densidad de mosto (1.055 g/mL) y pH (5.00) cumplieron con las especificaciones requeridas para el crecimiento y fermentación (N. Grijalva et al., 2020; van Rijswijck, 2017).

Los ensayos de fermentación (**Figura 9**) mostraron que las cepas no convencionales pueden metabolizar los azúcares presentes en el sustrato de cebada a pesar de no haber sido domesticadas para este propósito. Los grados Brix y la densidad representan la concentración de sólidos disueltos en la cerveza, es decir la cantidad de azúcares totales que no fueron metabolizados por las levaduras durante la fermentación (R. Barth, 2013; Briggs et al., 2004) y aportan cuerpo a la cerveza que, dependiendo del estilo, puede ser favorable (R. Barth, 2013).

Grijalva (2019) presentó cepas de levaduras, aisladas de chichas, que tenían la capacidad para fermentar maltosa en condiciones similares a las de esta investigación y mostraron el mismo rango de concentraciones de etanol, de 3 a 7% (v/v). En general, experimentos con levaduras no convencionales han identificado varias cepas de *S. cerevisiae* capaces de fermentar azúcares presentes en el mosto y generar concentraciones de etanol iguales a las obtenidas en el presente trabajo (Troilo et al., 2020; van Rijswijck, 2017). Las bajas densidades que se reportaron en los ensayos de fermentación ratificaron que todas las cepas estudiadas pueden metabolizar la glucosa y maltosa para producir alcohol durante la fermentación y, además, poseen una buena tolerancia al estrés osmótico en presencia de etanol, característica que se requiere en la industria cervecera (Burini et al., 2020).

El pH es otro factor de importancia para las diferentes reacciones químicas que ocurren durante el proceso de elaboración (R. Barth, 2013; White & Zainasheff, 1981). Por ejemplo, pH

superiores a 5.8, durante la maceración, provocan una ineficiente conversión del almidón en azúcares fermentables; mientras que durante la cocción no se logra la coagulación de proteínas y valores muy altos contribuyen a la astringencia por la excesiva extracción de taninos (R. Barth, 2013; Briggs et al., 2004). Para el desarrollo y crecimiento microbiano, el pH también juega un rol importante (Bamforth, 2005; White & Zainasheff, 1981), pH menor a 5.4 antes de iniciar la fermentación ayuda a inhibir bacterias contaminantes del mosto y favorece el crecimiento de la mayoría de especies de levaduras (Bamforth, 2005; White & Zainasheff, 1981). Además, durante la fermentación el pH disminuye por el metabolismo de azúcares y la producción de etanol, dióxido de carbono y acetaldehído, entre otros (R. Barth, 2013). Según el tipo de cerveza y la cepa de levadura empleada el pH en el producto final puede variar desde 5.0 hasta 3.0 (R. Barth, 2013; White & Zainasheff, 1981). El pH mostró relación con los valores de azúcares residuales (grados Brix finales) que concuerda con Piló et al. (2018) y N. Grijalva et al. (2020) según los cuales, la transformación de azúcares a etanol y dióxido de carbono disminuye el pH del medio. Por otro lado, las cepas no convencionales poseen varias rutas de asimilación de azúcares (Bamforth, 2005). La fermentación heteroláctica y homoláctica son características en varias especies de levaduras, especialmente en aquellas que fueron aisladas de fermentaciones espontáneas (Capece et al., 2018; Rossi et al., 2018). Estas rutas metabólicas pueden acidificar el medio por la formación de lactato y acetato (Bamforth, 2005). En la fermentación homoláctica el piruvato se reduce directamente a ácido láctico (disminución de pH) mientras que en la fermentación heteroláctica pueden generarse lactato, etanol y dióxido de carbono, a la vez. Estas levaduras no están adaptadas a la generación exclusiva de etanol y, por sus condiciones de entorno, cuando disponen de oxígeno y concentraciones bajas de azúcares son capaces de activar su respiración aeróbica para obtener energía y, como consecuencia, también generan ácido láctico (Bamforth, 2005).

El diacetilo (2,3-butanodiona) es un compuesto volátil que se considera indeseable en la cerveza. Su límite de detección en cervezas industriales es 100 ppb mientras que en cervezas artesanales varía entre 500 y 1000 ppb (White & Zainasheff, 1981). Las cuatro levaduras utilizadas generaron cervezas con diferentes concentraciones de diacetilo. Las cervezas elaboradas con las cepas ScA y ScCh:ScA mostraron los valores más bajos de diacetilo libre (18 y 24 ppb, respectivamente). Estas cepas fueron capaces de asimilar más eficientemente el diacetilo para formar 2,3-butano-diol que es un compuesto que no altera el sabor y aroma de la cerveza porque su umbral de detección (50 a 100 ppm) es mucho más alto (Morales, 2018). Por otro lado, la cerveza obtenida con la cepa ScCh presentó 90 ppb de diacetilo libre y la cepa comercial ScC generó la cerveza con la mayor concentración de diacetilo (110 ppb). Dysvik et al. (2020) reportó concentraciones entre 300 y 1100 ppb de diacetilo libre en cervezas fermentadas con diferentes cepas de *S. cerevisiae* que fueron evaluadas y aceptadas en un panel de consumidores, o sea estos rangos de diacetilo libre no fueron detectados sensorialmente.

El diacetilo es una dicetona vecinal que se forma durante la fermentación de la cerveza y se caracteriza por un sabor indeseable del tipo mantequilla o caramelo. En consecuencia, debe ser eliminada antes de que la cerveza llegue al consumidor (Briggs et al., 2004; White & Zainasheff, 1981). El diacetilo se forma como un subproducto no deseado a partir del piruvato por levaduras cerveceras y salvajes, su remoción prolonga el proceso de preparación general de la cerveza ya que las mismas levaduras se encargan de absorber este compuesto y reducirlo a 2,3-butano-diol durante la maduración (Morales, 2018). En general, durante la fermentación se produce diacetilo total (ácido α -acetolactato y diacetilo libre), pero el diacetilo libre se detecta sensorialmente en concentraciones elevadas (Briggs et al., 2004). La presencia de diacetilo en

el producto final se produce por temperaturas muy altas de fermentación ($> 22\text{ }^{\circ}\text{C}$) y/o periodos cortos de maduración (menores a cinco días) (White & Zainasheff, 1981), que pueden controlarse a nivel industrial y artesanal, lo que justifica las concentraciones bajas de diacetilo en las muestras analizadas en este proyecto.

Por otro lado, los atributos sensoriales más comunes al evaluar una cerveza son: Aroma, Sabor, Apariencia y Sensación en Boca. Cada uno posee un conjunto de descriptores según el tipo de evaluación que se realice (Parker, 2012; Yonezawa & Fushiki, 2002). Levaduras no convencionales son empleadas, generalmente, para potenciar el perfil de aromas en una cerveza, sea en cultivos puros o mixtos, y también para generar cervezas funcionales de alto valor nutritivo (Burini et al., 2020). Varias investigaciones han demostrado la capacidad que poseen algunas especies de levaduras para generar compuestos volátiles que contribuyen al perfil de aromas de una cerveza según su estilo (Gamero et al., 2020; Ravasio et al., 2018). Al evaluar las cervezas fermentadas con las cuatro cepas de levadura en este estudio, se observó que las cepas ScCh y ScA tienen potencial para ser empleadas en cervecería en cultivos puros, ya que mostraron perfiles semejantes a la cepa control (**Figura 10**). El acentuado aroma y sabor a levadura detectados en las dos cepas se justificó por la producción elevada de biomasa (mayor crecimiento microbiano) como se reportó Marongiu et al. (2015) al emplear cepas de *S. cerevisiae* aisladas de masa madre para elaborar cervezas artesanales. Otra característica notoria de las cepas ScC y ScA, fue la baja presencia y retención de espuma que se atribuye a la falta de capacidad de asimilar y/o degradar proteínas presentes en el mosto, así como a la síntesis de ácidos grasos y aminoácidos que favorecen la formación y retención de espuma (Briggs et al., 2004; Hornsey, 2003). Estas cepas también mostraron una baja producción de aromas asociados al lúpulo, como fue indicado por Marongiu et al. (2015), además de que la producción de

compuestos aromáticos está relacionada a la capacidad de asimilar e interactuar con los aceites esenciales provenientes del lúpulo. Las cepas cerveceras están adaptadas para utilizar estas resinas (como el geranial o el linalol) para la síntesis de compuestos volátiles característicos de aromas frutales y florales en cervezas (Briggs et al., 2004) mientras que las cepas salvajes no poseen esta habilidad como fue reportado por Piló et al. (2018) y Marongiu et al. (2015) debido a la ausencia de proteínas especializadas de transporte y las variaciones genéticas en regiones específicas de ADN mitocondrial.

CONCLUSIONES

Las dos cepas utilizadas en cultivos puros (ScCh y ScA) fermentaron el mosto de cebada y generaron cervezas con perfiles semejantes a la de la cepa control, además de acentuados sabores y aromas a fermento debido a la gran producción de biomasa que podrá ser mejorado a través de la adaptación forzada.

La temperatura óptima de crecimiento para las cepas fue de 20 °C, lo que mostró gran potencial para generar cervezas tipo Ale. También tuvieron crecimiento a 12 °C aunque a menor velocidad, característica que se podría aprovechar en la elaboración de cervezas tipo Lager. Las cepas ScCh y ScA podrían fermentar el mosto de cebada a baja temperatura (10 a 14 °C) pero en periodos más largos.

Los parámetros físico-químicos (% alcohol, pH, densidad y grados Brix) de las cervezas obtenidas en la fermentación piloto cumplieron con la especificación para cervezas tipo Ale, en especial para cervezas claras de bajo amargor y porcentaje de alcohol moderado.

Las dos cepas salvajes de *S. cerevisiae*, ScCh y ScA, mostraron rasgos de domesticación semejantes a los descritos en cepas cerveceras como el uso de glucosa y maltosa, además de tolerancia al etanol y una buena asimilación de diacetilo en la etapa de maduración.

La co-inoculación (ScCh:ScA) no presentó ventajas sobre las cepas puras en los ensayos realizados en este estudio, sin embargo, la cerveza obtenida con este cultivo mostró atributos sensoriales adecuados para la industria cervecera.

Las dos cepas de *S. cerevisiae* aisladas de alimentos, mostraron bajas concentraciones de diacetilo.

Las dos cepas de *S. cerevisiae* aisladas de alimentos, tienen potencial para la innovación, diferenciación y diversificación de cerveza artesanal, pero es necesario profundizar estudios sobre su potencial fermentativo y actividades enzimáticas.

REFERENCIAS

- Bader, J., Brigham, C., Stahl, U., & Popović, M. (2019). Fermented beverages produced by mixed cultures, pure cultures, and defined cocultures. En A. Grumezescu (Ed.), *Fermented Beverages: The Science of Beverages* (1a ed., pp. 67–101). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00003-8>
- Bamforth, C. (2005). *Food, Fermentation and Micro-organisms* (2a ed.; D. Cook, Ed.). California: Blackwell Science Ltd a Blackwell Publishing company.
- Barth, R. (2013). The chemistry of beer. En M. Barth (Ed.), *ACS Symposium Series* (1a ed., Vol. 1130). <https://doi.org/10.1021/bk-2013-1130.ch004>
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, 86, 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- BrewersAssociation. (2010). Craft Brewers Guide to Building a Sensory Panel. *Brewers Association*, 10. Recuperado de <http://brewersassociation.org>
- Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P., & Stevens, R. (2004). *Brewing: Science and Practice* (1a ed.; D. Briggs & C. Boulton, Eds.). <https://doi.org/10.1533/9781855739062>
- Budroni, M., Zara, G., & Ciani, M. (2017). Saccharomyces and Non-Saccharomyces Starter Yeasts. En M. Budroni, G. Zara, & M. Ciani (Eds.), *Brewing Technology* (1a ed., pp. 267–322). <https://doi.org/10.5772/intechopen.68792>
- Burini, J., Eizaguirre, J., Loviso, C., & Libkind, D. (2020). Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. *Revista Argentina de Microbiología*, 1250, 19. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Buzzini, P., Di Mauro, S., & Turchetti, B. (2017). Yeasts as starter cultures. En B. Speranza,

- A. Bevilacqua, & M. Corbo (Eds.), *Starter Cultures in Food Production* (1a ed., pp. 16–49). <https://doi.org/10.1002/9781118933794.ch2>
- Callejo, M. J., García Navas, J. J., Alba, R., Escott, C., Loira, I., González, M. C., & Morata, A. (2019). Wort fermentation and beer conditioning with selected non-Saccharomyces yeasts in craft beers. *European Food Research and Technology*, *245*(6), 1229–1238. <https://doi.org/10.1007/s00217-019-03244-w>
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*, *4*(2), 11. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020038>
- Chaves, C., Rossi, C., Maggio, F., Paparella, A., & Serio, A. (2020). Changes Occurring in Spontaneous Maize Fermentation: An Overview. *Fermentation*, *6*(1), 25. <https://doi.org/10.3390/FERMENTATION6010036>
- Ciani, M., Canonico, L., Oro, L., & Comitini, F. (2019). Footprint of nonconventional yeasts and their contribution in alcoholic fermentations. En A. Grumezescu (Ed.), *Biotechnological Progress and Beverage Consumption: The Science of Beverages* (1a ed., pp. 435–465). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-816678-9.00014-X>
- Dysvik, A., La Rosa, S. L., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Østlie, H. M., De Rouck, G., ... Wicklund, T. (2020). Co-fermentation Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* Species Tolerant to Brewing-Related Stress Factors for Controlled and Rapid Production of Sour Beer. *Frontiers in Microbiology*, *11*(February), 1–16. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00279>
- Faostat. (s/f). Food and agriculture organization of the United Nations FAOSTAT. Recuperado de <http://www.fao.org/faostat/en/#data/FBS>
- Gamero, A., Dijkstra, A., Smit, B., & de Jong, C. (2020). Aromatic Potential of Diverse Non-Conventional Yeast Species for Winemaking and Brewing. *Multidisciplinary Digital Publishing Institute*, *6*(2), 50. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020050>
- Gibson, B., Geertman, J., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D., Louis, E. J., ... Sampaio, J. P. (2018). New yeasts - new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research*, *17*(4), 1–32. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>
- Gibson, Brian, Storgårds, E., Krogerus, K., & Vidgren, V. (2013). Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast*, *30*(7), 255–266. <https://doi.org/10.1002/yea.2960>
- Grijalva, Krogerus, Nikulin, Magalhães, Aranda, Matallana, & Gibson. (2020). Potential application of yeasts from Ecuadorian chichas in controlled beer and chicha production. *Food Microbiology*, *98*, 28. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103644>
- Grijalva, N., Aranda, A., & Matallana, E. (2020). Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. *International Journal of Food Microbiology*, *317*, 11.

<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108462>

- Grijalva, Nubia. (2019). *Caracterización bioquímica y tecnológica de levaduras aisladas en bebidas fermentadas tradicionales de Ecuador*. Universidad de Valencia.
- Gschaedler, A. (2017). Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. *Current Opinion in Food Science*, 13, 73–77. <https://doi.org/10.1016/j.cofs.2017.02.004>
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology*, 72, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
- Hornsey, I. (2003). *A History of Beer and Brewing* (1a ed.; D. Higgins & I. Cabras, Eds.). The Royal Society of Chemistry.
- Jeromel, A., Korenika, A. M. J., & Tomaz, I. (2019). An influence of different yeast species on wine aroma composition. En A. Grumezescu (Ed.), *Fermented Beverages: The Science of Beverages* (1a ed., pp. 171–285). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00006-3>
- Lopes, A. C. A., Eda, S. H., Andrade, R. P., Amorim, J. C., & Duarte, W. F. (2019). New alcoholic fermented beverages-potentials and challenges. En A. Grumezescu (Ed.), *Fermented Beverages: The Science of Beverages* (1a ed., pp. 577–603). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00014-2>
- Makwana, M., & Hati, S. (2019). Fermented beverages and their health benefits. En A. Grumezescu (Ed.), *Fermented Beverages: The Science of Beverages* (1a ed., pp. 1–29). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-815271-3.00001-4>
- Marongiu, A., Zara, G., Legras, J. L., Del Caro, A., Mascia, I., Fadda, C., & Budroni, M. (2015). Novel starters for old processes: use of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from artisanal sourdough for craft beer production at a brewery scale. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(1), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s10295-014-1525-1>
- Michel, M., Jacob, F., & Hutzler, M. (2016). Non-*Saccharomyces* yeast in brewing. En M. Michel, F. Jacob, & M. Hutzler (Eds.), *Yeast in brewing* (pp. 1–22). Technische Universität München.
- 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>
- Morales, M. (2018). Reacciones químicas en la cerveza. *Revista de Química*, 32(1), 4–11. Recuperado de <https://www.researchgate.net/publication/326674595>
- Parker, D. K. (2012). Beer: production, sensory characteristics and sensory analysis. En A. Grumezescu & A. M. Holban (Eds.), *Alcoholic Beverages* (1a ed., pp. 133–158). <https://doi.org/10.1533/9780857095176.2.133>

- Petruzzi, L., Maria Rosaria, C., Wendland, J., & Bevilacqua, A. (2016). Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. *Food Reviews International*, 32(4), 341–363. <https://doi.org/10.1080/87559129.2015.1075211>
- Piló, F., Carvajal, E., Guamán, M., Portero, P., Morato, A., Daher, L., ... Rosa, C. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* populations and other yeasts associated with indigenous beers (chicha) of Ecuador. *Brazilian Journal of Microbiology*, 49(4), 808–815. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2018.01.002>
- 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>
- Priest, F., & Campbell, I. (1996). *Brewing Microbiology* (2a ed., Vol. 51; F. G. Priest & I. Campbell, Eds.). <https://doi.org/10.1007/978-1-4757-4679-2>
- Ravasio, D., Carlin, S., Boekhout, T., Groenewald, M., Vrhovsek, U., Walther, A., & Wendland, J. (2018). Adding flavor to beverages with non-conventional yeasts. *Fermentation*, 4(1), 1–16. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010015>
- Rossi, S., Turchetti, B., Sileoni, V., Marconi, O., & Perretti, G. (2018). Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from non-brewing environments in beer production. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 381–388. <https://doi.org/10.1002/jib.503>
- Simpson, W. J. (2016). Sensory Analysis in the Brewery. En C. Bamforth (Ed.), *Brewing Materials and Processes: A Practical Approach to Beer Excellence* (1a ed., pp. 257–289). <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-799954-8.00013-7>
- Speers, A., & Forbes, J. (2015). Yeast: An overview. En A. Hill (Ed.), *Brewing Microbiology: Managing Microbes, Ensuring Quality and Valorising Waste* (2a ed., pp. 3–9). <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-331-7.00001-0>
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, 61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
- Troilo, A., De Francesco, G., Marconi, O., Sileoni, V., Turchetti, B., & Perretti, G. (2020). Low Carbohydrate Beers Produced by a Selected Yeast Strain from an Alternative Source. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 78(1), 80–88. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1682887>
- van Rijswijck, I. (2017). *Co-cultivation of non-conventional yeast with Saccharomyces cerevisiae to increase the aroma complexity of fermented beverages* (Wageningen University). <https://doi.org/10.18174/419524>
- van Rijswijck, I., Wolkers - Rooijackers, J., Abee, T., & Smid, E. (2017). Performance of non-

conventional yeasts in co-culture with brewers' yeast for steering ethanol and aroma production. *Microbial Biotechnology*, 10(6), 1591–1602. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12717>

White, C., & Zainasheff, J. (1981). *Yeast The Practical Guide to Beer Fermentation* (1a ed., Vol. 53; W. L. Pengelly, Ed.). Brewers Publicatons.

Yonezawa, T., & Fushiki, T. (2002). Testing for Taste and Flavour of Beer. En J. Jackson & H. Linskens (Eds.), *Analysis of Taste and Aroma* (1a ed., pp. 29–45). https://doi.org/10.1007/978-3-662-04857-3_3

ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO A.	67.
---------------	-----

ANEXO A: HOJA DE EVALUACIÓN BEER SCORESHEET



BEER SCORESHEET

AHA/BJCP Sanctioned Competition Program
Structured Version

NATIONAL
**HOMEBREW
COMPETITION**



Judge Name _____
BJCP ID & Rank _____
Email _____

Location _____ Date _____
Category# _____ Entry# _____
Sub (a-f) _____
Subcategory (Spell out) _____
Special Ingredients _____

Position in flight _____
Entry _____
of _____
Advanced to MINI-BOS _____
PLACE _____
CONSENSUS SCORE _____
may not be an average of judge's individual scores

Non-BJCP Qualifications

Cicerone Rank _____
Pro Brewer Brewery _____
Industry Describe _____
Judging Years _____

Scoresheet Instructions

Use the scales to indicate the intensity of the primary attribute. Use the space provided to describe the primary attribute. Add secondary attribute(s) intensity/description as appropriate. For "Fermentation", consider esters, phenols, etc. If character is inappropriate for style, mark the box to the right. If character is absent, mark the circle to the left. Provide summary of beer and key feedback for improvement. Assign scores for each section and total. Review with other judge(s) and agree on consensus score. Enter consensus score at top of sheet.

Example: How to fill in a Scoresheet

This example is from the flavor section for a Weissbier that is good, but too bitter for style.

Flavor 13

None L M H Inappropriate

Malt Wheat. Subtle grainy notes

Hops OK for style

Bitterness Way too high for style

Fermentation Banana. Low Clove. Hint of bubblegum

Flaws for style (mark L-M-H for all that apply)

Acetaldehyde		Metallic	
Alcoholic / Hot		Musty	
Astringent		Oxidized	
Brettanomyces		Plastic	
Diacetyl		Solvent / Fusel	
DMS		Sour / Acidic	
Estery		Smoky	
Grassy		Spicy	
Light-Struck		Sulfur	
Medicinal		Vegetal	

Scoring Guide	Outstanding	45-50	World-class example of style.
	Excellent	38-44	Exemplifies style well, requires minor fine-tuning.
	Very Good	30-37	Generally within style parameters, minor flaws.
	Good	21-29	Misses the mark on style and/or minor flaws.
	Fair	14-20	Off flavors/aromas or major style deficiencies.
Problematic	0-13	Major off flavors and aromas dominate	

Bottle Inspection ok _____

Aroma

None L M H Inappropriate

Malt _____

Hops _____

Fermentation _____

Other _____

12

Appearance

Yellow Gold Amber Copper Brown Black Inappropriate

Color _____

Clarity Other _____

Head White Ivory Beige Tan Brown Inappropriate

Retention Quick _____

Texture _____

3

Flavor

None L M H Inappropriate

Malt _____

Hops _____

Bitterness _____

Fermentation _____

Balance Hoppy _____ Malty _____

Finish/Aftertaste Dry _____ Sweet _____

Other _____

20

Mouthfeel

Thin M Full Inappropriate

Body _____

Carbonation None L M H Inappropriate

Warmth _____

Creaminess None L M H Inappropriate

Astringency _____

Other _____

5

Overall

Classic Example _____ Not to Style _____

Flawless _____ Significant Flaws _____

Wonderful _____ Lifeless _____

Feedback Provide comments on style, recipe, process, and drinking pleasure. Include helpful suggestions to the brewer.

10

Judge Total 50