



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE
CENTRO REGIONAL UNIVERSITARIO BARILOCHE

Desarrollo de cultivos iniciadores cerveceros
basados en levaduras nativas para la
producción de bebidas fermentadas con alto valor agregado

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctora en Biología

Lic. Julieta Amalia Burini

DIRECTOR: Dr. Diego Libkind Frati

CO-DIRECTORA: Dra. Andrea Trochine

2022

Trabajo de posgrado titulado

**Desarrollo de cultivos iniciadores cerveceros basados en levaduras nativas
para la producción de bebidas fermentadas con alto valor agregado**

Desarrollado en el Centro de Referencia de Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC)

del

Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales

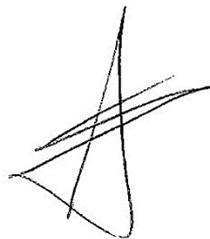
(IPATEC, UNCo-CONICET)



Lic. Julieta Amalia Burini



Dr. Diego Libkind Frati



Dra. Andrea Trochine



AGRADECIMIENTOS

A mis directores. Diego y Andrea, gracias por esta gran oportunidad de aprendizaje y crecimiento, por la confianza, por la guía y el acompañamiento; por llevar este trabajo adelante conmigo.

A la ANPCyT y al CONICET, por las becas que permitieron realizar este trabajo de tesis.

A las cervecerías e instituciones con las que trabajamos en conjunto.

A la Universidad Nacional del Comahue y al IPATEC, por el espacio de formación.

¡A la Educación Pública y Gratuita! Que sea así SIEMPRE.

A todas las personas que, en la multiplicidad de maneras posibles, me acompañaron en esta etapa. Les agradezco y les comparto:

En el tabaco, en el café, en el vino,
al borde de la noche se levantan
como esas voces que a lo lejos cantan
sin que se sepa qué, por el camino.
Livianamente hermanos del destino,
dióscuros, sombras pálidas, me espantan
las moscas de los hábitos, me aguantan
que siga a flote entre tanto remolino.
Los muertos hablan más pero al oído,
y los vivos son mano tibia y techo,
suma de lo ganado y lo perdido.
Así un día en la barca de la sombra,
de tanta ausencia abrigará mi pecho
esta antigua ternura que los nombra.

J.C.

Aimena, Alejito, Andre, Anto, Beita, Berta, BrewSisters, Cata, CeciS, Celestina, Charlito, ClaraC, Claribela, Clau, Conito, Cuore, Damián, Diego, Dori, Eiza, Elgordo, Elrond, Elsita, Ema, Enano, Facu, Gabita, Ger, Gery, Giusi, Juan, Juanita, Julis, Kari, Li, Lorelita, LuC, Lucas, Lucero, Luchita, MABB, Maila, Malenis, Mamona, Manolo, Marcos, Marian, Marivi, Mati, Moliné, Nahue, Nata, NatiB, Naty, Niquito, Nonna, Nonno, Pampero, Panchi, Paula, Pepo, Pepito, Pupa, Ro, Rochi, SantiS, SantiV, Santiago, SoniaF, Sugar, Sunshine, TiaElsa, Tincho, TioBruno, Tito, Tomi, Vale, Viejasvinagre, Viejo, Virya, WBs, Yohan.

RESUMEN

El continuo crecimiento en el mercado de la cerveza artesanal, y el aumento del interés y las exigencias de los consumidores, han orientado los esfuerzos del sector hacia la producción de cervezas diferenciales e innovadoras. En este punto, las levaduras no convencionales, distintas de las levaduras cerveceras tradicionales *S. cerevisiae* (ale) y *S. pastorianus* (lager), han cobrado gran protagonismo como herramientas para el desarrollo de nuevos productos. De gran interés resulta la especie criotolerante *S. eubayanus*, aislada por primera vez en la Patagonia Argentina e identificada como uno de los parentales de la especie híbrida *S. pastorianus* (levadura lager). Este trabajo buscó contribuir al conocimiento sobre el comportamiento fermentativo de *S. eubayanus*, desarrollar cultivos iniciadores aptos para su aplicación en la industria cervecera y evaluar sus estrategias de aplicación a escala productiva.

Inicialmente, cinco cepas de *S. eubayanus* (representativas de las cinco subpoblaciones estructuradas geográficamente) fueron ensayadas en fermentaciones a escala laboratorio evaluándose su capacidad fermentativa (velocidad de fermentación, atenuación, perfil de azúcares consumidos) y su perfil organoléptico (ésteres, alcoholes superiores, fenoles, evaluación sensorial). Las diferentes características fermentativas observadas y la producción diferencial de compuestos volátiles entre las cepas demostraron variabilidad fenotípica intraespecífica. Por su parte, la cepa CRUB 1568^T fue seleccionada debido a su buen rendimiento fermentativo, moderada producción de los fenoles 4-vinilguaiacol y 4-vinilfenol, y su aporte de los ésteres frutados hexanoato y octanoato de etilo.

A partir de la cepa seleccionada, se buscaron establecer las condiciones de propagación para el desarrollo de cultivos iniciadores para la producción de cerveza. Se evaluaron distintas técnicas para la determinación de la viabilidad y vitalidad de los inóculos, seleccionándose el método de tinción con violeta de metileno alcalino y las fermentaciones a escala laboratorio, respectivamente. Se seleccionó un medio de cultivo a base de extracto de malta comercial, cuya composición fue optimizada evaluando 9 factores con dos niveles, a través de un diseño experimental del tipo Plackett-Burman. Dos factores mostraron influencia significativa sobre la producción de biomasa (extracto de levadura y peptona ácida de caseína), y fueron posteriormente optimizados mediante un Diseño Central Compuesto, a través de la Metodología de Superficie Respuesta. Con el medio de cultivo optimizado (medio extracto de malta con 0,31 % p/v de extracto de levadura y 0,12 % p/v de peptona ácida de caseína) logró obtenerse una producción de biomasa igual a la del medio sin optimizar (12 g/L), pero con una reducción de costos del 40 %. Por último, se realizó el escalado de la propagación a 20 L, obteniéndose cultivos de *S. eubayanus* puros y de calidad, de tamaño suficiente como para inocular fermentadores de hasta 700 L.

Previo al traspaso de los cultivos iniciadores al sector cervecero, se evaluó la interacción de *S. eubayanus* con el lúpulo. Para ello, se estudió el comportamiento fermentativo de la cepa CRUB 1568^T en mostos sin lupular y lupulados, así como el impacto de la levadura en el amargor medido (IBU, por sus siglas en inglés) y en la percepción sensorial del amargor. *S. eubayanus* presentó tolerancia a los compuestos del lúpulo (20 y 60 IBUs), observándose incluso una velocidad de fermentación aumentada en mostos lupulados (del 34 % y 62 %, respectivamente). Por su parte, los IBUs obtenidos para cervezas fermentadas con *S. eubayanus* resultaron superiores que para las cepas industriales (18 % mayor), siendo esta diferencia notoria sensorialmente e incluso percibida como un amargo áspero (*harsh*). Estos resultados permiten adoptar criterios para su aplicación y predecir adecuadamente el perfil final de las cervezas producidas con esta levadura.

Posteriormente, *S. eubayanus* CRUB 1568^T fue ensayada a escala semi-piloto de 20-40 L en mosto cervecero, obteniéndose un comportamiento similar a lo observado a escala laboratorio. Sin embargo, cuando esta levadura salvaje se aplicó a escala productiva (1000-1500 L), mostró

un bajo rendimiento de fermentación. Las fermentaciones se completaron en 20 días (prácticamente el doble de tiempo que a escala laboratorio y semi-piloto) con una atenuación promedio del 30 % (la mitad de lo observado previamente). Se decidió evaluar si un aumento en el suministro de oxígeno durante la fermentación podría ayudar a mejorar el rendimiento fermentativo a mayor escala. Se encontró una mejora en la eficiencia de la fermentación aplicando distintos regímenes de oxigenación, llegando a obtenerse fermentaciones completas en 5-7 días, con niveles de atenuación del 60 %.

Este trabajo fomenta el uso de levaduras no convencionales en la elaboración de cerveza. La selección de levaduras autóctonas del ambiente representa un valioso recurso, no sólo para el desarrollo de cervezas innovadoras con mayor diferenciación productiva, sino que abre la posibilidad de otorgar un carácter regional al producto, con una consecuente mejora en la competitividad para el sector. Encontramos que la aplicación de estas levaduras en la industria requiere de un manejo diferente al de las levaduras cerveceras tradicionales, abriéndose así un punto de partida para continuar con investigación y experimentación en relación a las diferentes estrategias que se pueden abordar.

ABSTRACT

The continuous growth in the craft beer market, and the increased interest and demands of consumers, have directed the efforts of brewers towards the production of differential and innovative beers. In this sense, non-conventional yeasts - other than the traditional domesticated ale (*Saccharomyces cerevisiae*) and lager (*Saccharomyces pastorianus*) yeasts - have gained attention as tools for new product development. Of great interest is the cryotolerant species *S. eubayanus*, isolated for the first time in Patagonia (Argentina) and identified as one of the parents of the hybrid species *S. pastorianus* (lager yeast). This work sought to contribute to the knowledge about the fermentative behavior of *S. eubayanus*, develop starter cultures suitable for the brewing industry, and evaluate different strategies for its application on a productive scale.

First, five strains of *S. eubayanus* (representative of the five geographically structured subpopulations) were tested in laboratory-scale fermentations, evaluating their fermentation performance (fermentation rate, attenuation, sugars consumption) and their organoleptic profile (esters, higher alcohols, phenols, sensory evaluation). The different fermentative characteristics observed and the differential production of volatile compounds between the strains demonstrated intraspecific phenotypic variability of the species. The strain CRUB 1568^T was selected due to its good fermentation performance, moderate production of phenols (4-vinylguaiacol and 4-vinylphenol), and its contribution of the fruity ester's ethyl hexanoate and ethyl octanoate.

From the selected strain, it was sought to establish the propagation conditions for the development of starter cultures for brewing. Different techniques were evaluated to determine the viability and vitality of the biomass produced, selecting the alkaline methylene violet staining method and laboratory-scale fermentations, respectively. A culture medium based on commercial malt extract was selected and optimized by evaluating 9 factors, with two levels for each factor, through an experimental Plackett-Burman design. Two factors showed significant influence on biomass production (yeast extract and acid casein peptone), and were later optimized by a Central Composite Design, through Response Surface Methodology. With the optimized culture medium (malt extract medium with 0.31 % w/v of yeast extract and 0.12 % w/v of acid casein peptone) it was possible to obtain a biomass production equal to that of the non-optimized medium (12 g/L), but with a 40 % cost reduction. Finally, the propagation was scaled-up to 20 L, being able to obtain pure and quality *S. eubayanus* cultures, with adequate cell density to inoculate fermenters of up to 700 L.

Prior to transfer the starter cultures to the brewing industry, the interaction of *S. eubayanus* with hops was evaluated. For this, the fermentation performance of *S. eubayanus* CRUB 1568^T in hopped and unhopped wort was studied, as well as the impact of the yeast on the measured (IBU) and sensory perception of bitterness. *S. eubayanus* showed tolerance to hop compounds (20 and 60 IBUs), presenting even an increased fermentation rate in hopped worts (34 % and 62 %, respectively). On the other hand, the IBUs obtained for beers fermented with *S. eubayanus* were 18 % higher than for the industrial strains, with this difference being notorious sensorially and even perceived as a harsh bitterness. These results allow us to adopt criteria for the application of *S. eubayanus* in brewing, and adequately predict the final profile of the beers produced with this yeast.

Subsequently, *S. eubayanus* CRUB 1568^T was tested on brewing wort at a semi-pilot scale (20-40 L), observing a similar behavior to that obtained in the laboratory. Nevertheless, when this wild yeast was applied on a productive scale (1000-1500 L), it showed a poor fermentation performance. Fermentations were completed in 20 days (almost twice as long as laboratory and semi-pilot scales) with an average attenuation of 30 % (half of what was previously observed).

It was decided to test whether an increase in oxygen supply during fermentation could help improve fermentation performance on a larger scale. An improvement in fermentation performance was found by applying different oxygenation regimens, achieving complete fermentations in 5-7 days, with attenuation levels of 60 %.

This work encourages the use of non-conventional yeasts in brewing. The selection of native yeasts from the environment represents a valuable resource, not only for the development of innovative beers with greater productive differentiation, but also opens the possibility of conferring regional character to the product, with a consequent improvement in competitiveness. It was certainly found that the application of these yeasts in the industry requires different handling than traditional brewing yeasts, and opens a starting point for research and experimentation in relation to the different strategies that can be addressed.

LISTA DE ABREVIATURAS, UNIDADES Y DEFINICIONES

a.C: antes de Cristo

d.C: después de Cristo

°C: grado Celsius o grado centígrado

L: litro

mL: mililitro

µL: microlitro

kg: kilogramo

g: gramo

mg: miligramo

mm: milímetro

µm: micrómetro

h: hora

min: minuto

%: porcentaje

M: molar; $1 \text{ M} = 1 \text{ mol/L}$

mM: milimolar

µM: micromolar

N: normal; $1 \text{ N} = 1 \text{ equivalente/L}$

v/v: relación volumen/volumen

p/v: relación peso/volumen

p/p: relación peso/peso

ppm: partes por millón, mg/L

rpm: revoluciones por minuto

g: fuerza centrífuga relativa o fuerza g

UV: ultravioleta

°Bx: grados Brix; $1 \text{ °Bx} = 1 \text{ g sacarosa/100 g solución}$

°P: grados Plato; $1 \text{ °P} = 1 \text{ g extracto soluble/100 g solución}$

CO₂: dióxido de carbono o gas carbónico

µ: velocidad de fermentación

lag: fase de latencia o retardo

IBUs: Unidades Internacionales de Amargor (por sus siglas en inglés)

ÍNDICE

| | |
|---|----|
| CAPÍTULO 1. Introducción General | 1 |
| 1.1. La cerveza..... | 1 |
| 1.1.1. Breve historia de la cerveza..... | 1 |
| 1.1.2. Materias primas y proceso de elaboración | 3 |
| 1.1.3. La cerveza artesanal en Argentina..... | 8 |
| 1.1.4. Nuevas tendencias en el sector productivo..... | 10 |
| 1.2. Levaduras | 11 |
| 1.2.1. Levaduras y sus aplicaciones biotecnológicas | 11 |
| 1.2.2. El género <i>Saccharomyces</i> y su rol en las bebidas fermentadas | 12 |
| 1.2.3. Levaduras cerveceras | 15 |
| 1.2.4. Levaduras cerveceras y su impacto en el perfil sensorial..... | 16 |
| 1.2.5. Levaduras no convencionales en la industria cervecera..... | 19 |
| 1.2.6. <i>S. eubayanus</i> , madre de la levadura lager..... | 20 |
| HIPÓTESIS | 22 |
| OBJETIVO GENERAL | 22 |
| OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 22 |
| CAPÍTULO 2. Selección de cepas de <i>Saccharomyces eubayanus</i> para el desarrollo de inóculos cerveceros | 23 |
| 2.1. Introducción..... | 23 |
| 2.2. Materiales y métodos..... | 25 |
| 2.2.1. Cepas de levaduras | 25 |
| 2.2.2. Fermentaciones a escala laboratorio..... | 26 |
| 2.2.3. Caracterización de las propiedades fermentativas..... | 27 |
| 2.2.4. Caracterización del perfil organoléptico | 28 |
| 2.2.5. Evaluación sensorial..... | 30 |
| 2.2.6. Análisis estadísticos | 30 |
| 2.3. Resultados | 31 |
| 2.3.1. Capacidad fermentativa de las subpoblaciones de <i>S. eubayanus</i> | 31 |

| | |
|---|-----------|
| 2.3.2. Producción de compuestos volátiles y perfil sensorial de las cepas de <i>S. eubayanus</i> | 33 |
| 2.4. Discusión..... | 39 |
| CAPÍTULO 3. Condiciones de propagación y desarrollo de los cultivos iniciadores cerveceros | 46 |
| 3.1. Introducción..... | 46 |
| 3.2. Materiales y métodos..... | 51 |
| 3.2.1. Cepas utilizadas y esquema de propagación | 51 |
| 3.2.2. Selección de un medio de cultivo sólido para crecimiento y conservación de cepas | 52 |
| 3.2.3. Selección de un método para evaluar la calidad de la biomasa: viabilidad..... | 53 |
| 3.2.4. Selección de un método para evaluar la calidad de la biomasa: vitalidad..... | 54 |
| 3.2.5. Selección del medio de cultivo para la propagación | 55 |
| 3.2.6. Relevamiento de factores fisicoquímicos relevantes para la producción de biomasa | 55 |
| 3.2.7. Optimización de los factores relevantes para la producción de biomasa | 57 |
| 3.2.8. Escalado de los cultivos iniciadores | 57 |
| 3.3. Resultados | 58 |
| 3.3.1. Medio de cultivo sólido para el crecimiento y conservación de <i>S. eubayanus</i> | 58 |
| 3.3.2. Método para evaluar la calidad de la biomasa: viabilidad..... | 59 |
| 3.3.3. Método para evaluar la calidad de la biomasa: vitalidad..... | 61 |
| 3.3.4. Medio de cultivo para la propagación de <i>S. eubayanus</i> | 62 |
| 3.3.5. Factores fisicoquímicos relevantes para la producción de biomasa | 65 |
| 3.3.6. Metodología de Superficie Respuesta: optimización del medio de cultivo para propagación | 67 |
| 3.3.7. Escalado | 70 |
| 3.4. Discusión..... | 72 |
| CAPÍTULO 4. <i>S. eubayanus</i> y su interacción con el lúpulo | 81 |
| 4.1. Introducción..... | 81 |
| 4.2. Materiales y métodos..... | 83 |
| 4.2.1. Comportamiento fermentativo de <i>S. eubayanus</i> en presencia de lúpulo..... | 83 |
| 4.2.2. Impacto de <i>S. eubayanus</i> en el amargor de la cerveza | 85 |
| 4.2.3. Análisis estadísticos | 87 |

| | | |
|---|--|------------|
| 4.3. | Resultados | 87 |
| 4.3.1. | Comportamiento fermentativo de <i>S. eubayanus</i> en presencia de lúpulo | 87 |
| 4.3.2. | Impacto de <i>S. eubayanus</i> en el amargor de la cerveza | 92 |
| 4.4. | Discusión | 97 |
| CAPÍTULO 5. Escalado de <i>S. eubayanus</i> y su comportamiento fermentativo | | 102 |
| 5.1. | Introducción..... | 102 |
| 5.2. | Materiales y métodos..... | 103 |
| 5.2.1. | Comportamiento fermentativo de <i>S. eubayanus</i> a escala semi-piloto | 103 |
| 5.2.2. | Comportamiento fermentativo de <i>S. eubayanus</i> a escala productiva | 105 |
| 5.2.3. | Evaluación de la oxigenación como estrategia de aplicación a escala productiva | 106 |
| 5.3. | Resultados | 107 |
| 5.3.1. | Comportamiento fermentativo de <i>S. eubayanus</i> a escala semi-piloto | 107 |
| 5.3.2. | Comportamiento fermentativo de <i>S. eubayanus</i> a escala productiva | 109 |
| 5.3.3. | Evaluación de la oxigenación como estrategia de aplicación a escala productiva | 110 |
| 5.4. | Discusión..... | 115 |
| CONCLUSIONES | | 121 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS | | 123 |
| ANEXOS | | 153 |
| TRABAJO DE RESPALDO | | |

CAPÍTULO 1

INTRODUCCIÓN GENERAL

Capítulo 1.

Introducción General

1.1. La cerveza

1.1.1. Breve historia de la cerveza

La cerveza es uno de los productos biotecnológicos más antiguos. Esta bebida alcohólica se ha fabricado durante miles de años y, actualmente, es un producto de gran relevancia en la industria de los alimentos y bebidas. Se trata de la tercera bebida a nivel mundial en términos de popularidad, junto con el agua y el té, y, después de las bebidas espirituosas, es el segundo tipo de bebida alcohólica más consumida en todo el mundo, con casi el 35 % del consumo, en comparación con sólo el 8 % de consumo de vino (Melewar & Skinner, 2020). Algunos autores vinculan los inicios de la cerveza a los orígenes de la agricultura y la elaboración del pan (remontados al año 8000 a.C) en la Mesopotamia (entre los ríos Tigris y Éufrates de Sumeria, actualmente Irak). Posteriormente, se traslada esta actividad a Egipto por intercambio cultural y comercialización (4000-3500 años a.C) (Bamforth, 2007; Nelson, 2005). Las teorías de los orígenes de la cerveza indican que la caída de lluvia en vasijas descubiertas llenas de grano resultaría en el descubrimiento del malteado y de la malta. En lugar de desechar ese grano húmedo (germinado), se lo esparció para su secado y, más tarde, cuando el grano se cocinó en pan, se descubrió que era especialmente dulce. Por su parte, las hogazas de pan también se guardaban en vasijas de barro que, por efecto de la lluvia, pudieron dar lugar a un nuevo y afortunado descubrimiento: el pan húmedo pudo resultar en el medio ideal para el crecimiento de microorganismos (entre ellos la levadura) dando lugar a la fermentación. Como se verá, no fue hasta miles de años después, durante el siglo XIX, que se identificó a la levadura como la responsable de la fermentación. La preparación de la mezcla de pan y agua se encuentra descrita en Egipto (Figura 1.1), donde se atribuía el efecto estimulante producido por el alcohol a Osiris, Dios de la agricultura. Por su parte, los sumerios consideraban este brebaje como una bebida divina, que hacía que las personas se sientan emocionadas, maravillosas y felices, y lo ofrecían a sus dioses. En estas culturas la producción de cerveza era dominio de las mujeres, y se estableció como una bebida de gran importancia a nivel cultural, social, económico y medicinal (Bamforth, 2007; Homan, 2004; Nelson, 2005; O'Briant, 2017; Rabin et al., 2013).



Figura 1.1. A la izquierda, modelo que representa a una mujer egipcia mezclando y filtrando pan y agua para producir cerveza (2500 a.C). A la derecha, impresión de un sello sumerio del 2600 a.C; las personas que beben cerveza están representadas en la fila superior, y lo hacen juntos desde una vasija grande con tallos largos.

A diferencia de los griegos y romanos, tradicionales bebedores de vino, los celtas, galos, babilonios y nativos de Bohemia también eran asiduos consumidores de cerveza. Posteriormente, griegos y romanos desarrollaron un gusto por la cerveza. La bebida elaborada inicialmente era muy distinta a la que hoy conocemos y se bebía de manera distinta. La costumbre de los sumerios, babilonios, sirios, hititas, armenios, egipcios y griegos era beber su cerveza sin filtrar directamente de grandes tinajas utilizando pajitas o tubos (Figura 1.1). Esto ayudaba a filtrar algunos de los residuos de la infusión, que eran muy amargos en la boca (Bamforth, 2007; Nelson, 2005; Rabin et al., 2013).

El establecimiento del imperio carolingio hizo que el consumo de cerveza se estableciera en el norte de Europa. Su producción, comercialización y consumo pronto tuvo un auge sin precedentes, introduciéndose mejoras en el proceso de elaboración, con métodos para macerar, fermentar, almacenar y cuidar el producto que cambiaron el carácter de la cerveza europea. El precedente establecido por Carlomagno, combinado con el poder de la iglesia dio lugar a que los monjes controlen la elaboración y venta de la cerveza durante los siguientes siglos, perfeccionando aún más esta bebida (Rabin et al., 2013). El consumo de cerveza y su elaboración florece en el periodo de la Edad Media en el norte de Europa. Es en este periodo medieval cuando se deja de aromatizar la cerveza con hierbas (como el mirto, romero, cilantro, o mezclas como el *gruit*), para emplear por primera vez el lúpulo; introducido por Hildegarda

de Bingen, abadesa del monasterio de Rupertsberg en 1079. El lúpulo no sólo aromatizaba, sino que además aportaba amargor y propiedades conservantes (Hieronymus, 2012; Rabin et al., 2013). En el año 1516, los duques Wilhelm IV y Ludwig X declararon el *Reinheitsgebot*, la primera ley de pureza de cerveza, lo que refleja la importancia de esta bebida. La ley sobrevive hasta el día de hoy restringiendo las materias primas a la malta, el lúpulo, la levadura y el agua. Como se concibió originalmente, la ley no incluía la levadura, ya que aún no se había descubierto (Bamforth, 2007). El siglo XIX, trajo consigo una serie de descubrimientos que tuvieron un impacto decisivo en la cerveza como el producto que hoy conocemos. Como veremos, Hansen aisló la primera cepa de levadura pura lo que dio lugar a un mayor control microbiológico por parte de los cerveceros y al crecimiento del mercado de cervezas lager. Por su parte, el químico francés Louis Pasteur introduce la pasteurización, un avance muy importante para la industria cervecera, permitiendo tiempos prolongados de conservación y transporte. Durante el desarrollo industrial de principios del siglo XIX surgen además dos inventos que también revolucionaron el arte de elaborar cerveza. La máquina de vapor de James Watts introdujo la energía de vapor en las cervecerías y, cuando Carl von Linde inventó la refrigeración, la elaboración de cervezas lager (que requiere temperaturas frías) se volvió independiente de las estaciones (Bamforth, 2007; Rabin et al., 2013).

1.1.2. Materias primas y proceso de elaboración

Los principales ingredientes para la producción de cerveza son el agua, la cebada malteada, el lúpulo y la levadura (Figura 1.2). La cantidad, la variedad, el modo de empleo, el uso de otros ingredientes y las etapas del proceso de producción, van a variar de acuerdo al tipo/estilo de cerveza que se quiera elaborar (relacionado con las tradiciones del lugar geográfico dónde se originó el mismo), a los recursos y capacidades de cada productor/fábrica, y a las tendencias de un mercado en continuo crecimiento (Barth, 2013; Briggs et al., 2004; Priest & Stewart, 2006; Villacreces et al., 2022).

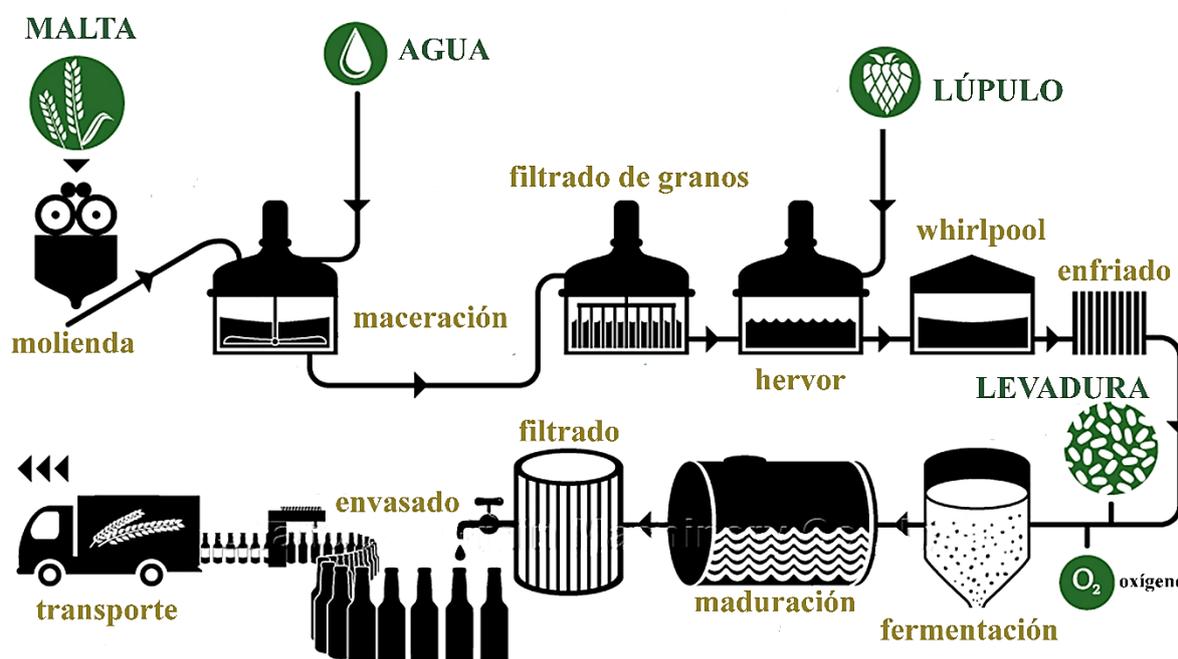


Figura 1.2. Etapas del proceso de elaboración de cerveza (en minúscula y dorado) y los cuatro ingredientes principales utilizados para su producción (en mayúscula y verde).

En términos cuantitativos, el agua es el ingrediente principal utilizado para la elaboración de cerveza. Se requieren entre 3-6 L de agua para producir 1 L de cerveza (incluyendo el agua necesaria para limpieza/sanitización, enfriamiento, mantenimiento de temperatura de fermentadores/maduradores, entre otros). Como requerimiento general, el agua debe ser potable, libre de microorganismos patógenos y libre de cloro. En términos de composición, la cerveza tiene un contenido de agua superior al 90 % p/v (dependiendo del estilo producido), por lo que las propiedades químicas del agua van a tener un impacto decisivo en las características organolépticas y en la calidad del producto (Barth, 2013; Briggs et al., 2004; Palmer & Kaminski, 2013). Tanto es así que hay casos en los que, sólo las diferencias en la composición del agua, distinguen un estilo de otro. Por ejemplo, el agua de la ciudad de Burton-on-Trent tiene una dureza permanente muy alta (alto contenido de sulfato de calcio) y la ciudad se hizo famosa por sus cervezas Pale Ale amargas y fuertes, mientras que Londres tiene suministros de agua alcalina (alto contenido de carbonatos) y se asocia con la producción de cervezas oscuras (Palmer & Kaminski, 2013; Priest & Stewart, 2006). En este punto, los principales iones que pueden estar presentes y/o ser agregados al agua cervecera y un resumen

de sus efectos se encuentran listados en la Tabla 1.1. Los mismos, suelen ser adicionados como las correspondientes sales de: carbonato de calcio, bicarbonato de sodio, sulfato de calcio, cloruro de calcio, sulfato de magnesio, cloruro de magnesio y/o cloruro de sodio; el tipo y cantidad de la sal agregada dependerá de las características de la cerveza a producir y el contenido inicial de iones del agua que se use en el proceso (Briggs et al., 2004; Palmer & Kaminski, 2013; Priest & Stewart, 2006).

Tabla 1.1. Principales iones involucrados en la elaboración de cerveza.

| Ion | Rango de uso (ppm)* | Efecto |
|--|---------------------|--|
| Alcalinidad (CaCO ₃) | 0 - 100 | Elevada alcalinidad genera sarro en los equipos y problemas durante el proceso por pH elevados. En cervezas con alta concentración de maltas caramelo y/o tostadas ayuda a balancear la acidez. |
| Calcio (Ca ²⁺) | 50 - 150 | En macerado, reacciona con los fosfatos de la malta y reduce el pH, involucrado en el funcionamiento enzimático óptimo. En hervor, mejora la precipitación de proteínas y lúpulo (<i>trub</i>). En fermentación, implicado en la floculación de las levaduras. |
| Cloruro (Cl ⁻) | 0 - 100 | Impacto sensorial. Acentúa el dulzor, el cuerpo y el balance. |
| Magnesio (Mg ²⁺) | 0 - 40 | En macerado, ayuda a disminuir el pH (menor efecto que el calcio). En fermentación, cofactor de enzimas del metabolismo respiratorio, fermentativo y respuesta a estrés de las levaduras. |
| Sodio (Na ⁺) | 0 - 50 | Impacto sensorial. Acentúa los sabores. En elevadas concentraciones da acidez y astringencia. |
| Sulfato (SO ₄ ²⁻) | 0 - 250 | Impacto sensorial. Imparte sensación de sequedad, astringencia y un amargor más pronunciado y asertivo. |

*Valores que superen el límite superior pueden traer consecuencias negativas a nivel sensorial y en el comportamiento fermentativo de la levadura (toxicidad). Floculación: tendencia de las células de levadura a agregarse, formando una masa multicelular (o flóculo).

En una siguiente etapa, el agua se pone en contacto con el segundo ingrediente, la malta (o cebada malteada) que es la que va a aportar los azúcares simples necesarios para la producción de etanol durante la fermentación. La malta se obtiene a partir del grano de cebada a través de un proceso que se denomina malteado, y que consta de tres pasos principales (Barth, 2013; Briggs et al., 2004; Mallett, 2014):

- 1) Remojo, donde el grano aumenta su humedad (12 a 45 % p/p) y se activan las enzimas endógenas.
- 2) Germinación, donde se produce la liberación y degradación parcial del almidón contenido en el endospermo (degradación de la matriz proteica) y se sintetizan enzimas esenciales para la maceración (α y β -amilasas, dextrinasas, β -glucanasas, proteinasas, peptidasas y fosfatasas). Se dice que el grano está modificado.
- 3) Secado, donde se detiene la germinación de manera controlada (para resguardar las enzimas), se disminuye la humedad (44 a < 5 %) y se estabiliza el grano. En este punto, los procesos específicos y temperaturas de secado durante el malteado darán lugar a la gran variedad de maltas que hoy existen en el mercado, clasificadas en dos grandes grupos: maltas base, usadas en un 60-100 % en la receta, son irremplazables ya que poseen el paquete enzimático intacto y el almidón parcialmente degradado necesarios para la maceración; y maltas especiales (maltas caramelo, maltas tostadas; usadas en proporciones de 0-20 %) que, debido a reacciones de caramelización y/o de Maillard, van a aportar sabores, aromas, cuerpo y color (el color de la cerveza está dado por el tipo de maltas utilizadas).

Para la producción de determinados estilos de cerveza pueden ser utilizadas además maltas de trigo, de centeno o de avena, e ingredientes que se denominan adjuntos (arroz, maíz, avena, jarabes/melazas, miel, lactosa, entre otros) (Mallett, 2014; Meusdoerffer & Zarnkow, 2009; Priest & Stewart, 2006).

Cuando la malta es puesta en contacto con el agua, comienza la etapa de maceración (Figura 1.2), en este punto la malta debe estar molida para exponer el almidón y las enzimas del interior del grano y aumentar la superficie de contacto para la extracción. Durante este proceso, las enzimas que fueron sintetizadas durante el malteado comienzan a actuar y se produce la degradación del almidón en moléculas de menor tamaño, obteniéndose lo que se denomina mosto dulce. Si bien su composición es muy variable, existen características comunes a la mayoría de los mostos. Los principales carbohidratos de menor tamaño, fermentables por las levaduras cerveceras, son el trisacárido maltotriosa (15 % p/p), los disacáridos maltosa (45–65 % p/p) y sacarosa (5 % p/p) y los monosacáridos glucosa y fructosa (10 % p/p). Los azúcares no fermentables, principalmente dextrinas, comprenden el 20-30 % p/p de la fracción de carbohidratos, junto con varios sacáridos que incluyen arabinosa, xilosa, ribosa, isomaltosa, panosa e iso-panosa. Este mosto contiene además productos de la degradación de las proteínas,

como péptidos y nitrógeno amino libre (conocido como FAN, por sus siglas en inglés), relevantes también para las levaduras durante la fermentación (Boulton & Quain, 2006). El proceso de maceración dura 1–2 h, y se mantiene en un rango de pH de 5,2-5,6 y de temperatura de 62–72 °C, lo que permite el funcionamiento óptimo de las enzimas involucradas en la degradación del almidón. Los distintos tiempos y temperaturas de maceración permiten obtener distintos resultados en perfil de azúcares, pudiendo obtenerse por ejemplo un mosto más fermentable (mayor contenido de maltosa y glucosa) en el rango bajo de temperatura, o un mosto menos fermentable (más dextrinas) en el rango superior (Briggs et al., 2004; Mallett, 2014).

Una vez finalizada la sacarificación o macerado, se separa el mosto dulce de los granos (filtrado de granos o *lautering*) y es transferido a la olla de hervor (*kettle*), donde se producirá el hervor del mosto durante 1-2 h con el fin principal de inactivar las enzimas, disminuir la carga microbiana y eliminar compuestos volátiles indeseables. En esta etapa del proceso aparece el tercer ingrediente involucrado, el lúpulo (Figura 1.2) cuyas características serán detalladas en el Capítulo 4 (sección 4.1). Durante el hervor, los componentes asociados a las resinas del lúpulo (principalmente α -ácidos) son isomerizados térmicamente dando lugar a los iso- α -ácidos, compuestos que aportan amargor y propiedades antimicrobianas a la cerveza; en este punto se tiene lo que se denomina mosto (ya no mosto dulce). Adiciones de lúpulo tardías, cerca del fin del hervor, son utilizadas para aportar menos amargor y más sabor y aroma (provenientes de los aceites esenciales, que son volátiles) (Briggs et al., 2004; De Keukeleire, 2000). En una siguiente etapa, se separa el lúpulo y las proteínas coaguladas (*trub*) en un proceso denominado *whirlpool*, este es otro punto donde se puede adicionar lúpulo para favorecer el aporte de sabor y aroma. La cantidad, el tiempo de contacto y las variedades de lúpulo utilizados dependerán de las características de la cerveza que se quiera lograr (De Keukeleire, 2000; Hieronymus, 2012; Janish, 2019).

Como se puede observar en la Figura 1.2, la siguiente etapa consta del enfriamiento y oxigenación del mosto y su transferencia a fermentadores. En este punto se agrega la levadura, el último, pero no por eso menos importante, ingrediente del proceso de producción de cerveza. La cerveza como proceso biotecnológico se da gracias a este microorganismo, encargado de transformar los azúcares fermentables del mosto en etanol (principalmente) a través de la fermentación alcohólica; la sección 1.2 estará dedicada a las levaduras. La inoculación de la levadura se debe realizar inmediatamente, para evitar contaminaciones. La fermentación

finaliza cuando cesa el consumo de azúcares por parte de las levaduras (periodo de atenuación) y no se perciben dicetonas vecinales (compuestos indeseables que son reabsorbidos por la levadura luego de la atenuación, principalmente diacetilo). La atenuación es una característica asociada a las levaduras cerveceras, que se define como la proporción de azúcares del mosto que son consumidos por las mismas, y se expresa como porcentaje (%). Asimismo, otro concepto que caracteriza a las levaduras cerveceras es el de floculación, que suele darse al final de la fermentación. Se define como la tendencia de las células de levadura a agregarse formando una masa multicelular (o flóculo) que sedimenta rápidamente del medio o sube a la superficie. Diferentes cepas tienen diferentes grados de atenuación y de floculación, lo que las caracteriza (Boulton, 2020; White & Zainasheff, 2010).

El tiempo de fermentación puede variar según la cepa de levadura utilizada y su tasa de inoculación, el contenido inicial de azúcar en el mosto y la temperatura de fermentación. Cuando la fermentación se completa, se obtiene la cerveza, que es separada de la levadura (la cual puede o no ser reutilizada en subsiguientes fermentaciones). Por último, la cerveza es madurada o acondicionada a temperaturas bajas (0–4 °C), lo que permite la integración de los aromas y sabores y mejora la apariencia y estabilidad del producto. Luego la cerveza puede o no ser filtrada y/o pasteurizada, se carbonata, se envasa (barriles, botellas, latas) y distribuye (Briggs et al., 2004; Priest & Stewart, 2006; White & Zainasheff, 2010).

1.1.3. La cerveza artesanal en Argentina

En Argentina, el Código Alimentario Argentino define la cerveza como “la bebida resultante de fermentar, mediante levadura cervecera, al mosto de cebada malteada o de extracto de malta, sometido previamente a un proceso de cocción, adicionado de lúpulo. Una parte de la cebada malteada o de extracto de malta podrá ser reemplazada por adjuntos cerveceros”. En 2017, se modificó el Código Alimentario Argentino para que las cervezas que no contengan aditivos alimentarios, que posean sólo ingredientes naturales y cuya elaboración sea manual o semiautomática puedan comercializarse con la leyenda “elaboración artesanal” (CAA, 2018). Sin embargo, no existe en nuestro país una definición formal de cerveza artesanal o cervecerías artesanales. En la mayoría de los países que establecen esta definición, el común denominador incluye que para ser consideradas artesanales deben ser independientes (no tener a un gran grupo nacional o extranjero por detrás de sus acciones, o que los mismos no superen el 25 % de las acciones) (Villacreces et al., 2022).

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La cerveza artesanal en el continente americano se ha vuelto muy popular, con Estados Unidos como pionero y liderando el crecimiento en este sector desde 1965. Esta revolución del sector artesanal se extendió a los países de América Latina, en particular, Brasil, Chile, Argentina y México. En Argentina, la cerveza artesanal comenzó a prosperar a medida que los jóvenes emprendedores convirtieron su pasatiempo de elaboración casera (*homebrewers*) en un negocio y comenzaron a difundir el movimiento de la cerveza artesanal por todo el territorio nacional (Belmartino & Liseras, 2020; Villacreces et al., 2022; Winkelman et al., 2019). En consonancia con lo que ocurre a nivel global, hasta el 2019 (pre-pandemia COVID-19), las microcervecías tuvieron en Argentina una expansión a una tasa anual del 30 %. Según la Cámara de Cerveceros Artesanales de Argentina (CCAA), “el sector artesanal, hasta antes de la pandemia, abarcaba alrededor del 3 % del mercado total de cerveza del país. El mismo emplea a 6500 personas (casi la misma cantidad que emplean las multinacionales en el país), con la existencia de 1900 microproductores y 400 nanocervecías. En cuanto a producción, los datos registran que pasó de 16 millones de litros en 2015 a 106 millones de litros en los últimos registros pre-pandemia de 2019, comercializándose un 12 % en formato lata y el resto vendido en barriles” (comunicación personal, Federico Villa - Director de Comunicación y Prensa de la CCAA, 2022).

La cerveza fue introducida en Argentina por inmigrantes europeos a mediados del siglo XVIII, y fue en Buenos Aires donde comenzaron los primeros intentos de producción local empleando insumos importados. Ya en la segunda mitad del siglo XIX, aparecen algunos establecimientos comerciales que más tarde se consolidaron como las grandes marcas de cerveza industrial que hoy se conocen. Estas empresas se especializaron en la producción de una cerveza ligera de tipo lager que moldeó el gusto de los consumidores locales durante los años que dominó el mercado de la cerveza. Por su parte, el movimiento artesanal no surge en Buenos Aires, sino en ciudades más pequeñas como Bariloche, El Bolsón, Mar del Plata y Villa General Belgrano, para luego extenderse al resto del país (Belmartino & Liseras, 2020; Ferreyra, 2014).

San Carlos de Bariloche tiene una larga tradición cervecera, con una de las primeras cervecías artesanales fundada en 1989. Actualmente, existen numerosos emprendimientos de pequeña y nano escala que coexisten a la par de marcas consolidadas y reconocidas del mercado. Los primeros producen en promedio sólo 5600 L/año y son, en general, productores que se encuentran en diferentes estadios de evolución y niveles de formalidad (habilitaciones). Por otra parte, son nueve las marcas consolidadas en la ciudad que producen entre 40000 y 168000

Los anuales, con distribución casi exclusiva en bares y resto-bares; aunque, luego de la pandemia COVID-19, una fracción creciente de su producción comenzó a comercializarse en latas (Colino, 2017; Winkelman et al., 2019). Esta región cuenta con diversas ventajas en relación a la producción de cerveza. Por un lado, posee fácil acceso a materias primas e insumos de calidad: como el agua (con muy bajo contenido mineral) y el lúpulo de la zona de El Bolsón y Lago Puelo; además de presentar un clima templado-frío, que implica menores esfuerzos y costos para la regulación y mantenimiento de la temperatura de fermentación y maduración. Asimismo, en Bariloche se encuentra el Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera del IPATEC, que da soporte al sector cervecero para la mejora de la calidad de los procesos y productos. El sector en esta ciudad también se caracteriza por una elevada demanda, el conocimiento de sus productores, su dinamismo y capacidad de creatividad e innovación constante (Belmartino & Liseras, 2020; Colino, 2017; Winkelman et al., 2019).

1.1.4. Nuevas tendencias en el sector productivo

El continuo aumento del mercado de la cerveza artesanal se encuentra ligado a la demanda de consumidores que ya no eligen productos estandarizados e industrializados, sino que buscan productos genuinos, singulares y de alta calidad, y que se han vuelto más específicos y sofisticados en sus hábitos de consumo. El movimiento artesanal está atento a esta nueva demanda y apunta continuamente a este nicho de mercado en la búsqueda de capturar a los consumidores, en lugar de precios bajos. Así, las cervezas artesanales se caracterizan por la diversidad y la diferenciación productiva, por atributos sensoriales originales, nuevos sabores y aromas y un enfoque en la mejora continua de la calidad (Belmartino & Liseras, 2020; Pokrivčák et al., 2019; Villacreces et al., 2022).

Los cerveceros artesanales no sólo reinterpretan los estilos estándar de cerveza, caracterizándolos de una manera nueva o innovadora, sino que además desarrollan nuevos estilos (como la IPA Argenta o la Catherina Sour, incorporadas en 2015 en la reconocida guía de estilos BJCP) (Strong & England, 2015). La innovación en el uso de ingredientes es uno de los puntos clave para estos desarrollos. A raíz de la producción y demanda de estilos de cerveza lupulados, como la India Pale Ale, Imperial IPA o New England IPA, el sector artesanal no sólo ha cambiado la forma en que se adiciona el lúpulo durante el proceso de elaboración (técnicas de *hop-stand*, *dry-hopping*, *hop-back*, entre otros); sino que en la búsqueda por nuevos sabores y aromas han dado lugar a una demanda sin precedentes para el desarrollo de variedades

de lúpulo diferenciadas y aromáticas (Castro et al., 2022; Janish, 2019; Lafontaine & Shellhammer, 2019). Asimismo, el uso de frutas, hierbas, especias y verduras es una estrategia ampliamente aplicada para obtener aromas, sabores, apariencia y sensaciones en boca diferenciadas (Lemoine et al., 2021; Strong & England, 2015). Por su parte, el uso de cereales alternativos (quinoa, amaranto, sorgo, mijo, trigo sarraceno), sobre todo para la producción de cervezas libres de gluten, es otro de los focos de las tendencias actuales de bebidas saludables, funcionales y/o nutraceuticas. En este punto entran las cervezas bajas en calorías, sin alcohol o bajas en alcohol (NABLAB, por sus siglas en inglés) y probióticas (Burini et al., 2021a; Priest & Stewart, 2006). El concepto de lo local o regional es otro punto de tracción de la industria artesanal, que se enfoca en el uso de ingredientes de origen regional para agregar localismo y diferenciación (Villacreces et al., 2022).

1.2. Levaduras

1.2.1. Levaduras y sus aplicaciones biotecnológicas

Las levaduras son hongos unicelulares eucariotas clasificados dentro de los filum Ascomycota, y Basidiomycota. Generalmente, se caracterizan por dividirse asexualmente por gemación o fisión y por presentar, en algunos casos, estados sexuales que no están contenidos en un cuerpo fructífero (formación de esporas); algunas levaduras forman parte del estadio levaduriforme de hongos que tienen fases filamentosas y unicelulares (dimórficos) (Boekhout et al., 2021; Kurtzman et al., 2011). Las levaduras se encuentran presentes en una gran diversidad de ambientes y han sido aisladas de una amplia gama de sustratos: plantas, insectos, animales, hábitats acuáticos, suelos, hongos, frutas, alimentos y bebidas fermentadas tradicionales, e incluso de ambientes con condiciones extremas (acidez, temperaturas frías y cálidas, radiación, alto contenido de metales pesados, entre otras) (Buzzini et al., 2017; Libkind et al., 2016).

Actualmente existen 2000 especies descritas (se cree que sólo representan el 1-5 % de las existentes en el planeta). La mayoría de ellas son capaces de catabolizar los monosacáridos glucosa y fructosa aeróbicamente y, sólo alrededor del 30 % (la mayoría ascomicetes) tienen la capacidad de fermentar (en ausencia y/o presencia de oxígeno) estos azúcares simples (Boekhout et al., 2021; Kurtzman et al., 2011; Stewart, 2017). En este punto, la capacidad fermentativa de algunas levaduras, incluso en presencia de oxígeno (levaduras *Crabtree*-positivas), les confiere una ventaja adaptativa. La asimilación rápida de azúcar y nitrógeno, junto con la síntesis y excreción de un producto tóxico (alcohol), desplaza a otros

microorganismos y permite que esas levaduras dominen el ambiente (Dashko et al., 2014; Fay & Benavides, 2005; Pfeiffer & Morley, 2014; Piskur et al., 2006).

Como se vio en la sección 1.1.1, las levaduras han acompañado a la humanidad desde el neolítico (10000-7000 años a.C) en relación directa con la producción y el consumo de alimentos y bebidas fermentadas como el pan, el vino y la cerveza; de gran relevancia en las sociedades debido a la importancia económica, cultural y al desarrollo de tecnologías profundamente arraigados en su historia. Hoy en día, el impacto de las levaduras en la industria alimentaria se extiende más allá de estos fermentos populares, contribuyendo a la fermentación de una amplia gama de otros productos, donde distintas especies de levadura pueden trabajar en consorcio con bacterias o/y hongos filamentosos (miso, quesos, chocolate, kefir, kombucha, salsa de soja, kimchi, bebidas destiladas, entre otros). Asimismo, cumplen un rol esencial en las industrias nutraceútica, farmacéutica y del bioetanol, y son modelos adecuados para estudios de genética molecular, biotecnología, biología evolutiva, genómica y biología de células eucariotas debido a su facilidad de cultivo, genomas pequeños y a sus ciclos de vida simples y relativamente rápidos (Cavaliere et al., 2003; de Souza Varize et al., 2019; Fay & Benavides, 2005; Fleet, 2006; Steensels & Verstrepen, 2014; Verstrepen et al., 2006).

1.2.2. El género *Saccharomyces* y su rol en las bebidas fermentadas

Las levaduras del género *Saccharomyces* son los microorganismos predominantes en la producción de bebidas fermentadas (principalmente la especie *Saccharomyces cerevisiae* y especies relacionadas); de hecho, presentan gran abundancia y dominio en muchas fermentaciones espontáneas. Estas levaduras presentan diversas características cruciales como el uso de la fermentación como vía metabólica preferida, combinada con el ya mencionado efecto *Crabtree*-positivo, la ausencia de producción de toxinas que afecten la salud (no patógenas), la producción de sabores deseables, y una alta producción y tolerancia de etanol (Steensels & Verstrepen, 2014; Stewart, 2017; Walker & Stewart, 2016). El género está compuesto por ocho especies naturales: *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. uvarum*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* y *S. jurei*, y por las especies híbridas *S. pastorianus* y *S. bayanus* (Naseeb et al., 2017) (Figura 1.3). Como se mencionó, *S. cerevisiae* es la especie más reconocida en la producción de alimentos y bebidas fermentadas. Sin embargo, las especies criotolerantes *S. uvarum* y *S. kudriavzevii*, y las especies híbridas *S. bayanus* y *S. pastorianus*, juegan un papel fundamental en la producción de bebidas como la cerveza, el vino y la sidra

(Burini et al., 2021b; González Flores et al., 2017; Origone, 2018). Además, *S. paradoxus* y las últimas incorporaciones al género, *S. eubayanus* y *S. jurei*, también están siendo estudiadas para su aplicación en la industria de las fermentaciones (Burini et al., 2021b; Hutzler et al., 2021; Lohrmann, 2021; Nikulin et al., 2020).

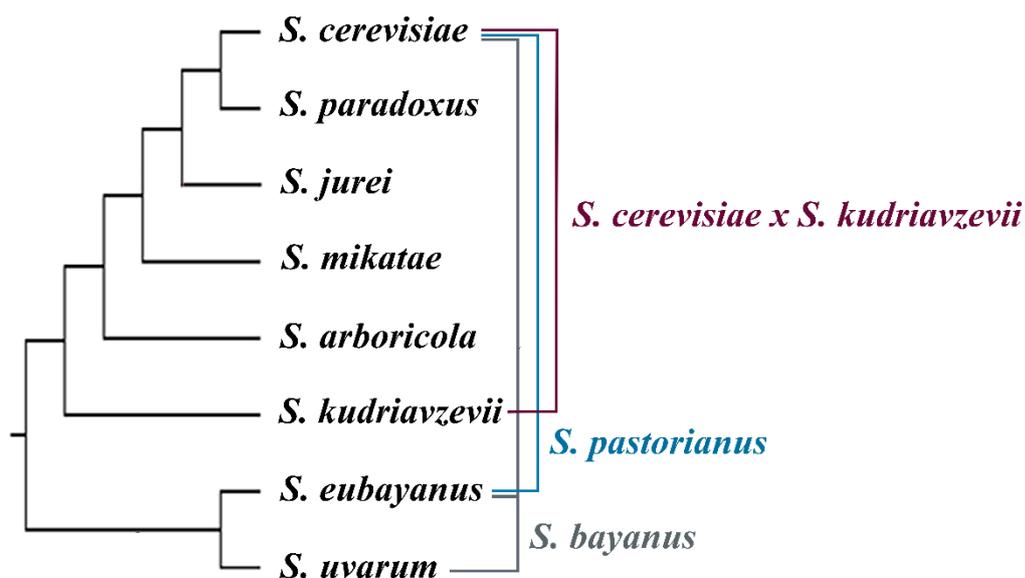


Figura 1.3. Relaciones filogenéticas de las especies del género *Saccharomyces* biológicamente reconocidas (negro), junto con los híbridos más relevantes para la industria de las bebidas fermentadas (en colores) (adaptado de González Flores et al., 2022).

Debido a la cercana relación de los humanos con las bebidas fermentadas, sin saberlo, han dado forma a la historia evolutiva de los microorganismos responsables de las mismas. Las personas notaron que exponer frutas y granos al medio ambiente cambiaba las características de estos productos (proceso que se denominó más tarde fermentación, del latín *fervere* -hervir-). Los artesanos expertos pronto comprendieron que valía la pena conservar una pequeña muestra de masa fermentada o sedimento de cerveza y mezclar esta muestra con un nuevo lote sin fermentar. De esta forma, sin darse cuenta, en realidad estaban utilizando cultivos iniciadores (impuros) al trasladar los microorganismos de un ciclo de fermentación al siguiente. Esta intervención del hombre en los procesos fermentativos ha sometido a las levaduras a múltiples trayectorias independientes de domesticación y a miles de generaciones de selección artificial, dando lugar a cepas altamente especializadas y adaptadas a las condiciones creadas por el hombre. En este punto, el género *Saccharomyces* resulta en el grupo más investigado y

descrito en relación a la domesticación de microorganismos (Borneman et al., 2011; Steensels et al., 2019; Steensels & Verstrepen, 2014; Verstrepen et al., 2006). En el caso de la cerveza, existen cientos de cepas comerciales domesticadas con rasgos de interés industrial (velocidad de fermentación, floculación, producción o no de fenoles volátiles, producción de ésteres, tolerancia al etanol, entre otras) que difieren entre los distintos linajes, reflejando así su entorno de domesticación específico. En los últimos años, y gracias a las nuevas técnicas de secuenciación, se ha podido acceder a los genomas completos de cientos de estas cepas y establecer las firmas de domesticación (Gallone et al., 2016; Gonçalves et al., 2016).

Curiosamente, mientras que la domesticación de animales y cultivos fue principalmente el resultado de un esfuerzo humano intencional, la domesticación de microorganismos sucedió en gran medida sin intención. La existencia de microorganismos fue descubierta por Antonie van Leeuwenhoek a fines del siglo XVII, quien fue el primero en observar microscópicamente organismos unicelulares. Tiempo después, en el siglo XIX, Louis Pasteur demostró que la fermentación alcohólica es un proceso provocado por organismos vivos (Pasteur, 1876; Stewart, 2017). Al saber que los microorganismos eran responsables del proceso de fermentación, se comenzó a prestar mucha atención a la higiene de las cervecerías y al cuidado de las levaduras. Esto derivó en el aislamiento del primer cultivo de levadura puro en 1883, más específicamente de la levadura de cerveza lager, por Emil Hansen en la fábrica de cerveza Carlsberg. A finales de ese mismo año, Old Carlsberg Brewery comenzó a utilizar uno de los aislados de Hansen, Unterhefe N° 1 (*S. carlsbergensis*, ahora reclasificada como *S. pastorianus*), para la producción de sus cervezas lager. Este es el primer reporte del uso de un cultivo iniciador de levadura que consta de una cepa microbiana bien definida y caracterizada. Dada la extraordinaria consistencia y eficiencia de las fermentaciones controladas con un cultivo iniciador apropiado, esta técnica fue rápidamente adoptada por otras cervecerías e industrias, lo que resultó en el uso generalizado de cultivos puros de *Saccharomyces* (Steensels et al., 2019; Stewart, 2017).

En el contexto de esta sección, y en relación al desarrollo de esta tesis, se definen a las especies y/o cepas de levaduras salvajes (o nativas) como aquellas aisladas de nichos no fermentativos y que no muestran signos de domesticación.

1.2.3. Levaduras cerveceras

Dentro de las levaduras domesticadas involucradas en la producción de cerveza (levaduras cerveceras), existen dos grandes grupos cuyos orígenes y características están bien diferenciados: las levaduras ale, pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* y las levaduras lager pertenecientes a la especie híbrida *S. pastorianus*. Originalmente, estas cepas se clasificaron en función de sus características de fermentación, por lo que a las cepas ale se las llama también de fermentación alta (o *top fermenting yeasts*) por posicionarse en la superficie del fermentador, y a las cepas lager se las denomina de fermentación baja (o *bottom fermenting yeasts*) por asentarse en el fondo del fermentador; actualmente, esta distinción ya es obsoleta ya que muchos tipos de levadura ale tienen la capacidad de asentarse en el fondo del fermentador y muchas fermentaciones lager suceden en la superficie (Hill, 2015; White & Zainasheff, 2010). Las cepas ale han sido seleccionadas con el tiempo por sus ventajosas propiedades cerveceras, como la floculación, la utilización eficiente de azúcares y el perfil de aromas y sabores, pero requieren temperaturas más cálidas para una fermentación óptima. Estas levaduras fermentan a temperaturas de 18–24 °C y producen cervezas con pronunciadas notas frutales y florales (Hill, 2015; Meier-Dörnberg et al., 2017). Una característica que parece haber sido seleccionada durante la domesticación de estas levaduras cerveceras es la producción de compuestos fenólicos, determinando lo que se conoce como fenotipo POF (por sus siglas en inglés, *phenolic off flavors*). Dado que los fenoles son componentes de aroma y sabor deseados para algunos estilos de cerveza (como las cervezas bávaras de trigo y algunas cervezas belgas), las cepas que fermentan estos tipos de cerveza conservaron los genes relacionados con la producción de fenoles, no así aquellas en las que esta característica se asociaba a aromas y sabores indeseables (Gallone et al., 2016; Gibson et al., 2017).

La fermentación de cervezas lager requiere un conjunto único de condiciones en comparación con otros estilos de cerveza, siendo la temperatura baja (5-15 °C) la característica más notable. Estas temperaturas son necesarias para proporcionar el sabor y el aroma limpios y frescos asociados con el estilo, es decir, un nivel relativamente bajo de sabores frutales o florales (que son más deseables en la mayoría de los estilos de cerveza ale). *S. pastorianus*, además, exhibe una alta resistencia a diversos factores de estrés, lo que la hace muy útil para la producción industrial de cerveza. El éxito de esta especie en las fermentaciones lager puede explicarse por su condición híbrida (Figura 1.3) ya que *S. pastorianus* es el resultado de la hibridación entre una cepa ale de la especie *S. cerevisiae* (que le aporta al híbrido sus características generales de

fermentación eficiente) y la especie criotolerante *S. eubayanus* (que le aporta la tolerancia al frío) (Gibson et al., 2013; Libkind et al., 2011; Nakao et al., 2009; Walther et al., 2014).

Se han identificado dos grupos principales de levaduras cerveceras lager, los linajes Saaz y Froberg (también llamados híbrido alotriploide Grupo I e híbrido alotetraploide Grupo II, respectivamente). Ambos grupos, además de diferencias fisiológicas y fermentativas en la utilización de maltotriosa, el crecimiento y la tolerancia al frío, difieren en cuanto a la producción de compuestos aromáticos (Gibson et al., 2013). Originalmente, Dunn & Sherlock (2008) propusieron que ambos linajes derivarían de dos eventos de hibridación distintos entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*. Sin embargo, a raíz del ensamblaje a nivel de cromosomas y el análisis comparativo del genoma de cepas de *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* y *S. eubayanus*, se confirmó que las cepas del Grupo I y del Grupo II se originaron a partir de un único evento de hibridación que involucraba una cepa heterocigota de *S. cerevisiae*, seguida de diferentes trayectorias evolutivas (Hewitt et al., 2014; Salazar et al., 2019).

1.2.4. Levaduras cerveceras y su impacto en el perfil sensorial

Durante la fermentación del mosto cervecero, los azúcares producidos en la etapa de maceración son consumidos por la levadura y convertidos, principalmente, en etanol y dióxido de carbono (CO₂), esto genera una disminución en la densidad del mosto y un aumento progresivo en la concentración de etanol (Figura 1.4). Además, las levaduras consumen otros compuestos necesarios para el crecimiento de las células y la fermentación, como las fuentes de nitrógeno (FAN), el fósforo, diversos iones, metales y factores de crecimiento. Inicialmente, además, se produce el consumo inmediato del oxígeno adicionado (Figura 1.2, Figura 1.4) (Boulton, 2020; Hill, 2015; White & Zainasheff, 2010).

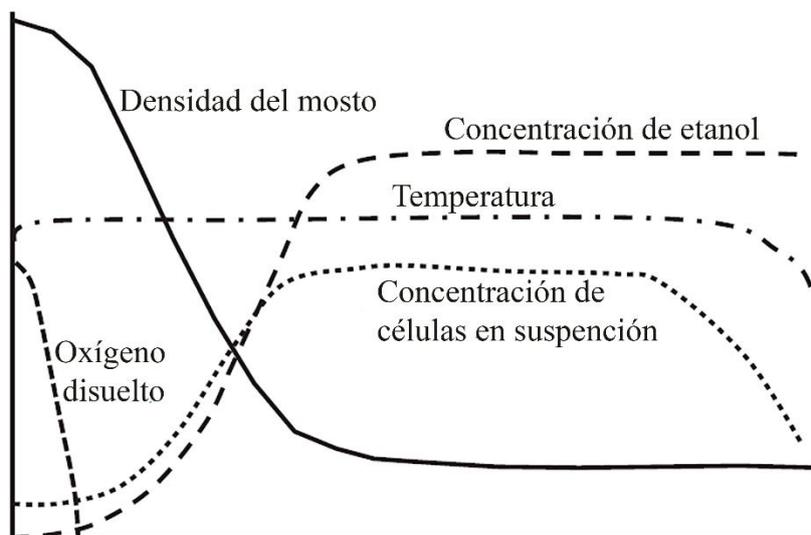


Figura 1.4. Esquema del progreso de una fermentación cervecera típica que muestra la densidad del mosto, la concentración de levadura suspendida, la temperatura y la concentración de etanol (adaptada de (Boulton, 2020) .

En este punto, si bien el etanol y el CO_2 son los principales productos de la fermentación, durante esta etapa se producen además numerosos compuestos orgánicos que tienen un impacto determinante en el aroma y el sabor final de la cerveza (Lodolo et al., 2008; Olaniran et al., 2017; Pires et al., 2014). Estos compuestos aromáticos y de sabor son intermediarios en las rutas metabólicas que van desde el catabolismo de los componentes del mosto (azúcares, compuestos nitrogenados y compuestos de azufre) hasta la síntesis de los componentes necesarios para el crecimiento de la levadura (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos, etc.), y se listan como: carbonilos (aldehídos/cetonas), alcoholes superiores/*fusel*, ésteres, dicetonas vecinales o VDKs (diacetilo y pentanodiona), ácidos grasos y orgánicos, fenoles volátiles y compuestos de azufre (Figura 1.5). Obviamente, los compuestos activos deben mantenerse dentro de ciertos límites o pueden perjudicar el equilibrio sensorial de la cerveza, además de presentar toxicidad (Loviso & Libkind, 2018, 2019; Olaniran et al., 2017; Pires et al., 2014). El acetaldehído y el diacetilo se consideran sabores indeseables (deméritos) en la cerveza, y sus concentraciones deben mantenerse por debajo de su umbral de percepción (10 y 0,2 mg/L, respectivamente). Por otro lado, los alcoholes superiores en pequeña cantidad tienen impactos positivos, que se vuelven negativos si superan los 300 mg/L. Además, los ésteres son agradables en cantidades moderadas, pero si se producen en exceso pueden afectar

negativamente el aroma de la cerveza (Briggs et al., 2004; Lodolo et al., 2008; Ravasio et al., 2018; White & Zainasheff, 2010).

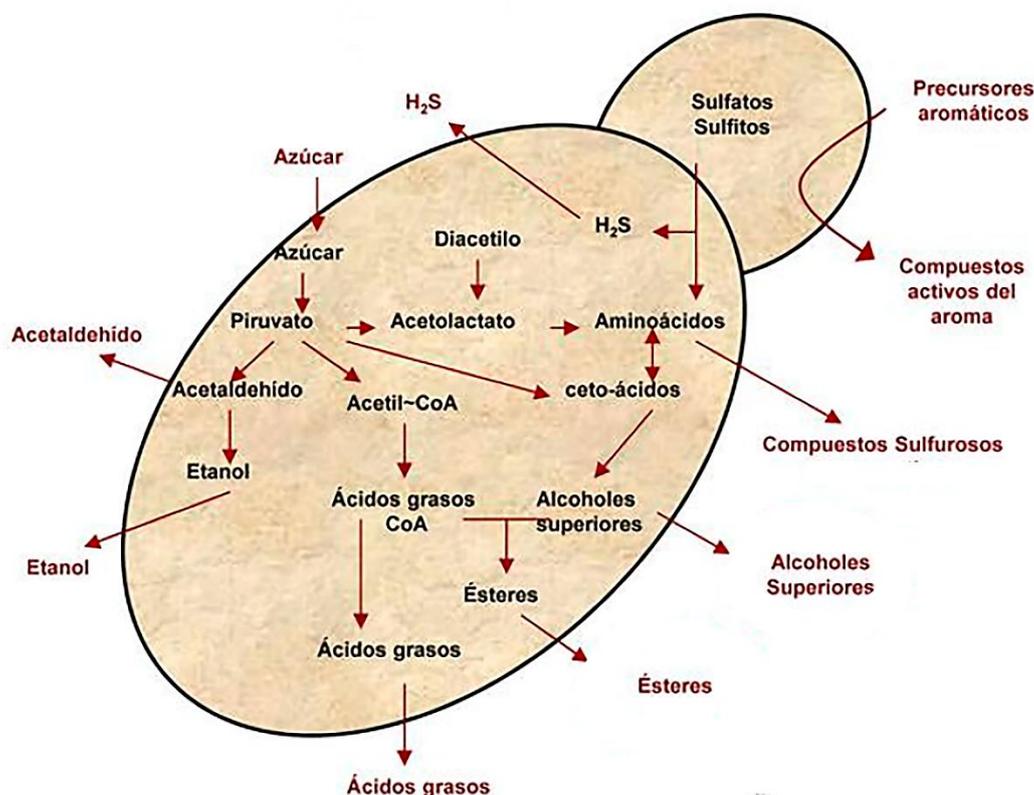


Figura 1.5. Metabolismo fermentativo y producción de compuestos secundarios durante la fermentación alcohólica (adaptado de Ferrer Piquer, 2018).

La levadura cervecera, por sí sola, es capaz de producir alrededor de 500 compuestos de sabor y aroma diferentes (White & Zainasheff, 2010). Las cepas de levadura son tan diversas como los aromas y sabores resultantes y, por lo tanto, la elección de la cepa de levadura está directamente relacionada con las características organolépticas y los sabores individuales y especiales creados al desarrollar distintos tipos y estilos de cerveza (Burini et al., 2021a; Meier-Dörnberg et al., 2017). Los perfiles sensoriales generados por un tipo de levadura respecto de otra pueden deberse a diferencias interespecíficas en términos genómicos, a los mecanismos de regulación de la expresión de los genes responsables de la síntesis de cada compuesto y a la actividad de las enzimas participantes; tanto mutaciones puntuales en zonas regulatorias o en genes estructurales, como mutaciones de mayor envergadura (deleciones, duplicaciones, aneuploidías, poliploidías) son responsables de la diversidad fenotípica de las cepas de levaduras cerveceras (Loviso & Libkind, 2018).

1.2.5. Levaduras no convencionales en la industria cervecera

La expansión en el sector de la cerveza artesanal y el creciente número de consumidores especializados han llevado a los/as cerveceros/as a innovar en los métodos de producción utilizando nuevas variedades de lúpulo, maltas e ingredientes especiales, entre otros (sección 1.1.4). Actualmente, es también en la fermentación donde se encuentran nuevas alternativas y, en este punto, las levaduras no convencionales (distintas de las levaduras cerveceras tradicionales) se vuelven protagonistas. Generalmente, estas levaduras presentan bajos rendimientos de fermentación y son más sensibles al estrés por etanol, pero pueden mostrar una gran variedad de posibilidades para las fermentaciones de cerveza con el fin de proporcionar aromas y sabores distintivos y mejorados (*bioflavoring*), nuevos enfoques en el perfil organoléptico general, y la producción, por ejemplo, de cervezas bajas en calorías, sin alcohol, y probióticas (Burini et al., 2021a; de Souza Varize et al., 2019; Michel et al., 2016). En un relevamiento de más de 100 especies de levaduras diferentes estudiadas por su rendimiento fermentativo y su potencial producción de compuestos aromáticos, muchas especies de levaduras no convencionales mostraron una diversidad muy alta de perfiles de aroma y, cuando se aplicaron en mosto de cerveza, se confirmó su capacidad para la obtención de productos distintivos (Gamero et al., 2016). En pocos años, las levaduras no convencionales cambiaron su papel de microorganismos potencialmente indeseables (asociados con el deterioro de los alimentos, incluida la cerveza), a actores principales en el desarrollo de productos innovadores para ganar una posición de mercado en este segmento en ascenso.

Las levaduras no convencionales con aplicación en la producción de cerveza comprenden un gran abanico de géneros no sacaromicéticos que pertenecen, en su mayoría, al filum Ascomycota (géneros *Brettanomyces*, *Torulaspota*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, entre otros) (Canonico et al., 2016; De Francesco et al., 2015; Domizio et al., 2016; Saerens & Swiegers, 2013; Serra Colomer et al., 2019) y, en pocos casos, al filum Basidiomycota (por ej. *Mrakia*) (De Francesco et al., 2018). Asimismo, se incluyen levaduras del género *Saccharomyces* que involucran levaduras industriales de *S. cerevisiae*, pero domesticadas para otros procesos fermentativos (como cachaça, sake, masa madre) (Araújo et al., 2018; Marongiu et al., 2015); o levaduras no domesticadas provenientes del ambiente (Burini et al., 2021b; Hutzler et al., 2021; Nikulin et al., 2020). En este punto, la biodiversidad de los ambientes naturales comprende una gran fuente para la bioprospección de levaduras no convencionales. Como fue mencionado, se han

descrito 2000 especies de levaduras que sólo representarían el 1-5 % del total de especies; por lo tanto, no es de extrañar que cada vez más trabajos de investigación y proyectos se encuentren en la búsqueda de levaduras nativas alternativas para la innovación en la industria de las bebidas fermentadas. Este enfoque tiene además la ventaja de proporcionar identidad regional y exclusividad a las bebidas producidas con las levaduras salvajes locales (Cubillos et al., 2019; González Flores et al., 2022; Meier-Dörnberg et al., 2017).

En el marco de la presente tesis doctoral se realizó la publicación de un artículo de revisión relacionado con el uso de levaduras no convencionales en la industria cervecera (Burini et al., 2021a).

1.2.6. *S. eubayanus*, madre de la levadura lager

Dentro de la bioprospección en el área de las bebidas fermentadas, resulta de gran interés el caso de la levadura criotolerante *S. eubayanus*. Si bien se había determinado que la levadura involucrada en la elaboración de cerveza lager era un híbrido entre dos especies de levaduras sacromicéticas diferentes (híbrido interespecífico) (Kodama et al., 2006; Nilsson-Tillgren et al., 1981; Vaughan Martini & Martini, 1987), la identidad de los parentales era objeto de debate. El problema se resolvió en 2011, con el descubrimiento en los bosques de la Patagonia de la nueva especie *S. eubayanus*, que posee una coincidencia genética del 99,6 % con la parte parental no-*S. cerevisiae* del híbrido lager (Libkind et al., 2011).

Esta especie, en su estado original o puro, se encuentra exclusivamente en los ambientes naturales, en particular asociada a árboles como los del género *Nothofagus* y *Araucaria*, típicos de los bosques de la Patagonia argentina. En esta región cientos de cepas fueron aisladas en muestras de corteza, hojas, suelo, semillas y del hongo endémico *Cyttaria spp* (Eizaguirre, 2019; Libkind et al., 2011; Rodríguez et al., 2014). Unos pocos aislamientos fueron posteriormente obtenidos de bosques en el este de Asia (Bing et al., 2014), América del Norte (Langdon et al., 2019; Peris et al., 2014) y Nueva Zelanda (Gayevskiy & Goddard, 2016), pero sorprendentemente no en Europa (posible sitio original del evento de hibridación que dio lugar a la levadura lager). Se cree que *S. pastorianus* surgió debido a un evento de hibridación interespecífica que tuvo lugar en respuesta a las presiones selectivas durante rondas sucesivas de fermentaciones a baja temperatura. Esto se dio como resultado de una ley bávara del siglo XVI que prohibía la elaboración de cerveza durante los meses de verano debido a la calidad inferior de las cervezas elaboradas en esta estación (Dunn & Sherlock, 2008). Además de *S.*

pastorianus, otros híbridos con contribuciones de *S. eubayanus* han sido aislados de ambientes industriales, lo que indica que esta especie ha intervenido desde hace mucho tiempo en la historia de las fermentaciones (Almeida et al., 2014; Gallone et al., 2019; Langdon et al., 2020; Nguyen & Boekhout, 2017).

La criotolerancia es una característica promisoriosa en levaduras cerveceras para la producción de cervezas lager, ya que la baja temperatura es el factor principal que determina sus propiedades sensoriales. Asimismo, el desarrollo de vino y sidra a bajas temperaturas hace de la criotolerancia una característica ventajosa para estas industrias (Gonzalez Contreras, 2019; González Flores et al., 2017; Magalhães et al., 2017; Origone, 2018). En este punto, *S. eubayanus* es una de las especies con mayor tolerancia al frío dentro del género *Saccharomyces*, presentando un rápido y eficiente crecimiento a temperaturas entre 5-10 °C (Gibson et al., 2013; Krogerus et al., 2015; Mertens et al., 2015). Se propone que los mecanismos que gobiernan la criotolerancia de *S. eubayanus* están relacionados con diferencias en la composición de la membrana, así como con la expresión diferencial de genes metabólicos centrales en relación con otras levaduras sacaromycéticas (Baker et al., 2019; Krogerus et al., 2015). Además, la presencia de transportadores de α -glucósidos que funcionan mejor a temperaturas más bajas (como *MTT1*) podría influir en su rendimiento a estas temperaturas (Magalhães et al., 2016; Vidgren et al., 2010).

Desde su descubrimiento, *S. eubayanus* ha sido intensamente estudiada en distintas áreas, desde la comprensión de la evolución, ecología y genética de poblaciones del género *Saccharomyces* (Borovkova et al., 2020; Dunn & Sherlock, 2008; Eizaguirre et al., 2018; Gallone et al., 2016; Langdon et al., 2020; Monerawela & Bond, 2017; Nespolo et al., 2020; Peris et al., 2014, 2016; Salazar et al., 2019), hasta la generación de híbridos con mejoras tecnológicas para su aplicación en la industria de las bebidas fermentadas (Diderich et al., 2018; Eizaguirre, 2019; Gorter de Vries, 2019; Hebly et al., 2015; Krogerus et al., 2015; Krogerus, Magalhães, et al., 2016; Krogerus et al., 2017, 2021; Magalhães et al., 2017; Mertens et al., 2015; Nikulin et al., 2018; Origone, 2018), e incluso para el biocontrol de microorganismos contaminantes (Mazzucco et al., 2019; Villalba et al., 2020).

Por su parte, el gran interés que generó el descubrimiento de la madre de las levaduras lager en el sector científico-tecnológico para el estudio de su potencial aplicación en la industria cervecera, es la base en la que se fundamenta el desarrollo de esta tesis doctoral.

HIPÓTESIS

El desarrollo de inóculos cerveceros de calidad a partir de cepas de *Saccharomyces eubayanus* seleccionadas sentará las bases para la fabricación de cervezas con características distintivas que permitirán el desarrollo de productos innovadores de carácter regional.

OBJETIVO GENERAL

Establecer las condiciones y parámetros de propagación requeridos para el desarrollo de cultivos iniciadores cerveceros a partir de cepas de *S. eubayanus* evaluando sus aptitudes fermentativas a escala laboratorio y productiva con vistas en la obtención de cervezas con alto valor agregado.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar cepas de *S. eubayanus* para la generación de cultivos iniciadores con potencial aplicación en la producción de cerveza, contemplando la aptitud fermentativa y el desarrollo de perfiles organolépticos distintivos, interesantes y favorables para el sector cervecero.
2. Definir el medio de cultivo y optimizar las condiciones de propagación en el laboratorio, para la obtención de cultivos iniciadores de *S. eubayanus* libres de contaminantes y con características adecuadas en cuanto a la cantidad y calidad de la biomasa producida, que permitan inocular fermentadores de 500 L.
3. Evaluar la interacción entre *S. eubayanus* y el lúpulo adicionado para aportar amargor, estudiando el comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* en presencia de lúpulo, así como el impacto de la levadura en el amargor medido y percibido en el producto final.
4. Evaluar el comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* a escala piloto (25-50 L) y a escala productiva (< 300 L), y desarrollar estrategias de aplicación de los cultivos iniciadores de *S. eubayanus* en fábrica en vistas de una fermentación eficiente que se integre a los tiempos productivos.

CAPÍTULO 2

SELECCIÓN DE CEPAS DE *S. eubayanus*

Capítulo 2.

Selección de cepas de *Saccharomyces eubayanus* para el desarrollo de inóculos cerveceros

2.1. Introducción

El uso de levaduras nativas es una forma natural de introducir diversidad en el sector cervecero y, como ya fue descrito en el Capítulo 1, existe una gran diversidad de especies con potencial para la producción de cervezas diferenciales. Sin embargo, dado que estas levaduras no se encuentran adaptadas al ambiente fermentativo (no domesticadas), sus características y capacidades de aplicación deben evaluarse cuidadosamente. En este sentido, desde el descubrimiento de *S. eubayanus*, se han realizado numerosos estudios para evaluar su comportamiento fermentativo y potencial para la producción de cervezas. La cepa CRUB 1568^T (CBS 12357 / PYCC 6148) de *S. eubayanus* mostró un crecimiento más rápido que la mayoría de las levaduras lager en medios de laboratorio que contenían glucosa o maltosa como fuente de carbono a 10 °C (Gibson et al., 2013), mientras que a 20 °C todavía era competitiva, pero mostraba crecimiento reducido a temperaturas de 25 °C o más en comparación con las levaduras cerveceras (Mertens et al., 2015; Walther et al., 2014). Eizaguirre, (2019) evaluó la osmotolerancia y tolerancia al etanol de *S. eubayanus* en medio agar YM conteniendo altas concentraciones de glucosa (40, 50 y 60 % p/v) y etanol (5, 10, 15 y 20 % v/v), mostrando la capacidad de tolerar estos factores de estrés, incluso a bajas temperaturas (10 °C). También confirmó la capacidad de *S. eubayanus* para tolerar el estrés producido por altas concentraciones de azúcares en mostos de alta densidad (hasta 22 °P), y la de producir un alto porcentaje de etanol (7,6 % v/v). En cuanto a su rendimiento fermentativo, *S. eubayanus* fermenta la glucosa y la maltosa del mosto, con valores de atenuación promedio para la cepa tipo del 65 % (Eizaguirre et al., 2018; Krogerus, Arvas, et al., 2016; Magalhães et al., 2016). Asimismo, presenta una floculación nula evidenciada por la biomasa en suspensión, aunque al final de la fermentación hay una rápida caída o sedimentación de las células de levadura (Eizaguirre, 2019; Krogerus, Arvas, et al., 2016; Krogerus et al., 2015).

Por otra parte, diversos estudios relacionados con la genética poblacional de la especie han demostrado que se estructura en dos grandes poblaciones con una elevada diversidad genética,

CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE CEPAS DE *S. EUBAYANUS*

la población A (PA) y la población B (PB) (Eizaguirre et al., 2018; Langdon et al., 2020; Nespolo et al., 2020; Peris et al., 2014, 2016). Las cepas pertenecientes a la PA sólo han sido aisladas en la Patagonia Argentina y se dividen en dos subpoblaciones: PA-1 y PA-2 (Eizaguirre et al., 2018). Los aislamientos realizados en otras partes del mundo pertenecen a la PB. En la Patagonia Argentina la misma se divide en tres subpoblaciones: PB-1, PB-2 y PB-3. Los aislamientos de otras regiones geográficas pertenecen a alguna/as de las mismas subpoblaciones que se encuentran en la Patagonia, como aquellos encontrados en Nueva Zelanda (Gayevskiy & Goddard, 2016) y en Chile (Nespolo et al., 2020), o bien pertenecen a una subpoblación específica del hemisferio norte (denominada Holártica o PB-Holártica), que incluye aislamientos de Tíbet y de Estados Unidos (Bing et al., 2014; Brouwers, Brickwedde, et al., 2019; Peris et al., 2016). La distribución global y la estructura poblacional geográficamente bien diferenciada de *S. eubayanus* resulta similar a lo que se ha observado para otras especies salvajes del género *Saccharomyces*, como *S. paradoxus* (Leducq et al., 2014, 2016) y *S. uvarum* (Almeida et al., 2014). Por su parte, estudios de comparación del genoma completo de cepas de *S. eubayanus* sugieren que el origen del híbrido lager está asociado a los aislamientos pertenecientes al hemisferio norte, ya que dentro del linaje holártico se encontraron cepas con identidades de secuencia de ADN del 99,82 % (Tíbet) y 99,72 % (Carolina del Norte) en comparación con el sub-genoma de *S. eubayanus* del híbrido lager, siendo que para la cepa patagónica la coincidencia genética es del 99,6 % (Bing et al., 2014; Libkind et al., 2011; Peris et al., 2016). Sin embargo, ninguno de estos aislamientos es exactamente el donante del híbrido porque el mismo también contiene alelos específicos, aunque minoritarios, de las otras poblaciones. La Patagonia no sólo alberga la mayor diversidad y abundancia de aislamientos de *S. eubayanus*, con una tasa de aislamiento 20-200 veces mayor que en otras partes del mundo (Eizaguirre et al., 2018), sino que posee cuatro subpoblaciones restringidas sólo a esta región; todo esto indica que sería el lugar de origen de la diversidad de *S. eubayanus* o al menos del último ancestro común de las poblaciones PA y PB-Holártica (Langdon et al., 2020; Libkind et al., 2020).

La gran cantidad de aislamientos patagónicos de *S. eubayanus* pertenecientes a diferentes poblaciones genéticas resulta de interés para el sector cervecero ya que es un indicativo potencial de diversidad fenotípica entre cepas, que abre el abanico para la innovación. Es por ello que en este capítulo se propuso evaluar la aptitud fermentativa y organoléptica de cepas de *S. eubayanus* aisladas en la Patagonia Argentina, pertenecientes a cada una de las

subpoblaciones genéticas descritas para esta región, para seleccionar aquella más promisoría para su aplicación en la industria cervecera.

2.2. Materiales y métodos

2.2.1. Cepas de levaduras

Se utilizaron 5 cepas de *S. eubayanus* aisladas de la Patagonia Andina (Argentina), pertenecientes a la colección de microorganismos del Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC) (Tabla 2.1). Las mismas fueron seleccionadas en base a su origen geográfico y a sus características genéticas (representantes de la diversidad genética de la especie), sumado a su desempeño fermentativo (mayor velocidad de fermentación, atenuación y producción de dióxido de carbono, y menor duración de fase lag) en microfermentaciones a partir de un relevamiento de 60 aislamientos (Eizaguirre et al., 2018). Se utilizó como control la cepa Frohberg comercial de *S. pastorianus* W34/70 (Weihenstephan 34/70). Todas las cepas fueron crioconservadas a -80 °C en glicerol 20 % v/v y, previo a su uso, se cultivaron y se mantuvieron en agar YM (ANEXO N°1).

Tabla 2.1. Cepas de *S. eubayanus* estudiadas.

| Cepa | Subpoblación | Sitio de aislamiento | Sustrato |
|--------------------------------------|--------------|--------------------------------|---|
| CRUB 2104 | PA-1 | Arroyo del medio, Nahuel Huapi | Corteza de <i>Nothofagus antarctica</i> |
| CRUB 2031 | PA-2 | Batea Mahuida, Lanin | Corteza de <i>Nothofagus antarctica</i> |
| CRUB 1568 ^T = CBS12357 | PB-1 | Rucahuenu, Nahuel Huapi | Cuerpo fructífero <i>Cyttaria hariatii</i> de <i>Nothofagus dombeyi</i> |
| CRUB 2005 | PB-2 | Challhuaco, Nahuel Huapi | Corteza de <i>Nothofagus pumilio</i> |
| CRUB 1935 | PB-3 | Lagunita PN, Tierra del Fuego | Corteza de <i>Nothofagus antarctica</i> |

Información obtenida de Eizaguirre (2019) y Libkind et al. (2011).

2.2.2. Fermentaciones a escala laboratorio

Las fermentaciones experimentales se llevaron a cabo en frascos de 250 mL conteniendo 150 mL de mosto de congreso con una densidad inicial de 12,0 °P (Evans et al., 2011), los mismos fueron cerrados con trampas de aire (tipo *airlock*) llenas de agua estéril (Figura 2.1). El mosto fue producido a partir de malta de cebada Pilsen en un equipo automático Robobrew All Grain (ANEXO N°1); una vez obtenido fue esterilizado (121 °C - 20 min) y almacenado a 4 °C. Previo a su uso el medio fue suplementado con 0,3 ppm de zinc (ANEXO N°1) y oxigenado en condiciones de esterilidad a una concentración de oxígeno inicial de 16 ppm, determinada mediante un medidor portátil Hach (HQ30D) con sensor de oxígeno disuelto luminiscente. Las cepas de levadura se cultivaron aeróbicamente en Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de medio de extracto de malta (ANEXO N°1) a 20 °C con agitación orbital (140 rpm) hasta alcanzar la fase de crecimiento exponencial. Posteriormente, los frascos se inocularon individualmente a una tasa de $1,5 \times 10^6$ células viables/mL siguiendo la ecuación propuesta para una fermentación lager estándar (White & Zainasheff, 2010):

$$\text{Células a inocular} = \text{Tasa de inóculo} \times \text{densidad del mosto (°P)} \times \text{volumen del mosto (mL)}$$

El número de células y la viabilidad fueron determinados mediante tinción con violeta de metileno alcalino con microscopio (Olympus CX22LED) y cámara de Neubauer (Smart et al., 1999). Se realizaron tres fermentaciones independientes a 10 °C para cada cepa.



Figura 2.1. Sistema de fermentación a escala laboratorio

2.2.3. Caracterización de las propiedades fermentativas

La cinética de las fermentaciones fue monitoreada cada 12 h por pérdida de peso del sistema (liberación de CO₂) con balanza de precisión de 0,01 g, hasta peso constante (Lopes et al., 2007). Finalizada la fermentación, se separó el sobrenadante de la levadura por centrifugación a 5000 × g por 10 min en centrífuga refrigerada (Sigma), se filtró (filtro jeringa PES 0,22 μm) y se almacenó la muestra a 4 °C para análisis posteriores.

El pH inicial y final se determinó mediante medidor de pH (Sartorius PR15). La atenuación aparente, relacionada con la capacidad de las levaduras de consumir los azúcares presentes en el mosto, se determinó mediante refractómetro (Alla France) como la diferencia entre la densidad inicial del mosto (DI) y la final en el sobrenadante de la fermentación (DF), y fue expresada como porcentaje de atenuación (%) (White & Zainasheff, 2010):

$$[(DI-DF)/(DI-1)] \times 100$$

Por otra parte, el consumo de azúcares también fue evaluado por cromatografía líquida de alta precisión (HPLC – Waters). Los azúcares fermentables (glucosa, maltosa y maltotriosa) y el etanol y el glicerol producidos fueron determinados según Nguyen et al. (2010). Para esto, la columna de elución (Rezex™ ROA-Organic Acid H+ (8 %) 300 x 7,8 mm) fue estabilizada a 60 °C y equilibrada con ácido sulfúrico 0,005 N. Las muestras y los estándares filtrados (PES 0,22 μm) se inyectaron directamente (10 μL) en la columna cromatográfica. La elución se realizó con un gradiente isocrático (100 % ácido sulfúrico 0,005 N) a un caudal de 0,6 mL/min. El detector de Índice de Refracción (RI) se fijó a 40 °C. La identificación y cuantificación se realizó por medio de curvas de calibración de los estándares: Glucosa anhidra ≥ 99,5 % p/p (Sigma), Maltosa monohidrato 98 % p/p (Sigma), Maltotriosa hidratada 95 % p/p (Sigma), Glicerina 99,5 % p/v (Cicarelli) y Etanol Absoluto 99,3 % v/v (Sintorgan). Las curvas de calibración fueron construidas a partir de soluciones stock realizadas para cada compuesto en agua ultrapura. La concentración (% p/v) de las soluciones stock fueron: 5 % glucosa, 10% maltosa, 4 % maltotriosa, 1 % glicerol y 5 % etanol. Se realizaron 4 diluciones de las soluciones stock a partir de las cuales fueron construidas las curvas de calibración para cada compuesto (0,1-5 % glucosa; 0,2-10 % para maltosa; 0,1-4 % maltotriosa; 0,01-1 % glicerol; 0,1-5 % etanol).

2.2.4. Caracterización del perfil organoléptico

Los fenoles volátiles (4-vinilfenol, 4-vinilguaiacol, 4-etilfenol y 4-etilguaiacol) fueron determinados por HPLC (Waters) de acuerdo con Saez et al. (2011). Las muestras y los estándares filtrados (PES 0,22 μm) se inyectaron directamente (100 μL) en una columna Luna™ 5 μm C18(2) 100 Å (250 x 4.6 mm). La fase móvil se compuso de acetonitrilo y agua con ácido fórmico (0,12 g/L, pH = 3,5). Se realizó una elución en gradiente de acetonitrilo (10 min-75 % acetonitrilo, 5 min-60 %, 5 min-50 %, 15 min-40 %, 5 min-75 %), con un reequilibrio de la columna de 10 min luego de finalizada cada corrida. El flujo se fijó en 0,9 mL/min. Los espectros en línea se adquirieron en un rango de longitud de onda de 220-700 nm (detector de arreglo de diodos) con una resolución de 1,2 nm y los compuestos fueron identificados a 230 y 280 nm. La identificación y cuantificación se realizó a partir de curvas de calibración construidas con los estándares 4-vinilfenol (solución 10,1 % p/p en propilenglicol; Sigma), 4-etilfenol (99 % p/p; Sigma), 4-vinilguaiacol (99,7 % p/p; Sigma) y 4-etilguaiacol (98,1 % p/v; Sigma). Se prepararon soluciones stock para cada compuesto en acetonitrilo con una concentración de 20 ppm. A partir de las mismas, se realizó una curva de calibración de 5 puntos (0,1-2 ppm) en matriz cerveza (sin fenoles).

Los ésteres y alcoholes superiores de relevancia en cerveza (Loviso & Libkind, 2018, 2019) se determinaron mediante micro extracción en fase sólida acoplada a cromatografía de gases con detector de ionización de llama (SPME-GC-FID) (Silva et al., 2008). Para pre-equilibrar las muestras y estándares se agregaron 3,5 g de cloruro de sodio a 10 mL de muestra filtrada (PES 0,45 μm) y se agitaron por 50 min a 40 °C; después de lo cual se expuso una fibra SPME 85 μm CAR/PDMS en el espacio de cabeza de la muestra durante 50 min. La fibra se desorbió en el puerto de inyección de un cromatógrafo de gases Thermo Scientific FOCUS y los analitos se separaron en una columna DB5 (30 m 0,25 mm DI x 0,25 μm) utilizando las siguientes condiciones: sistema de inyección splitless (2 min), temperatura del inyector de 250 °C y flujo constante (1,5 mL/min) de nitrógeno como gas portador. El programa de temperatura fue: 5 min a 35 °C con rampa de 15 °C/min hasta 250 °C; manteniendo 5 min a 250 °C. La temperatura de ionización de llama se setó a 270 °C. Los compuestos fueron identificados por comparación con estándares y cuantificados a través de curvas estándar. Se utilizó 1-butanol (Sigma) como patrón interno.

La contribución de cada compuesto volátil también se evaluó cuantitativamente usando Valores de Actividad Odorante (Odor Activity Values, OAV). Los OAV se calcularon dividiendo las

concentraciones medias de los compuestos aromáticos cuantificados por los umbrales de percepción sensorial reportados en la literatura. Se considera que los compuestos con un OAV mayor que 1 contribuyen individualmente al aroma. A continuación (Tabla 2.2) se encuentran listados los compuestos volátiles evaluados en este trabajo y sus respectivos umbrales de percepción.

Tabla 2.2. Compuestos volátiles cuantificados y sus características sensoriales

| Familia | Compuesto | Características de aroma y sabor | Umbral de percepción (ppm)* |
|----------------------|----------------------|---|-----------------------------|
| Fenoles volátiles | 4-vinilguaiacol | Clavo de olor, medicinal, fenólico, ahumado | 0,3 |
| Fenoles volátiles | 4-vinilfenol | Fenólico, medicinal, especiado | 0,2 |
| Ésteres | Acetato de etilo | Frutal, solvente, dulce | 21-30 |
| Ésteres | Acetato de isobutilo | Ananá | 0,7-1 |
| Ésteres | Acetato de isoamilo | Banana, pera, solvente | 1,2 |
| Ésteres | Hexanoato de etilo | Manzana, frutal | 0,21 |
| Ésteres | Octanoato de etilo | Frutal, manzana, ananá, brandy | 0,9 |
| Alcoholes superiores | Isobutanol | Solvente | 200 |
| Alcoholes superiores | Amil/Isoamil alcohol | Alcohólico, banana, solvente | 70/65 |
| Alcoholes superiores | 2-feniletanol | Rosas | 40 |

*(Coghe et al., 2004; Cui et al., 2015; Engan, 1972; Meilgaard, 1982; Vanbeneden et al., 2008).

2.2.5. Evaluación sensorial

El perfil organoléptico de las fermentaciones fue evaluado por un panel sensorial entrenado del CRELTEC, compuesto por 6 personas (4 mujeres y 2 hombres de 25 a 50 años). Los triplicados de las fermentaciones se mezclaron en partes iguales y se les asignó un código aleatorio. Las evaluaciones se realizaron a ciegas con 30 mL de muestra a temperatura ambiente, asegurando la ventilación del ambiente. Se les pidió a los panelistas que evalúen los siguientes descriptores: acidez, dulzor, ésteres (notas frutadas), alcohol (solvente, calentamiento en boca), sulfuros (goma, huevos podridos, fósforo), diacetilo (manteca, caramelo de leche), acetaldehído (manzana verde) y fenoles (clavo de olor, especiado, ahumado). La intensidad de cada atributo se evaluó mediante una escala estructurada de 0 a 5, donde 0 indica que el descriptor no fue percibido y valores entre 1 y 5 indican la intensidad (muy baja a muy alta).

2.2.6. Análisis estadísticos

Los parámetros cinéticos en los ensayos a escala de laboratorio se calcularon individualmente a partir de cada fermentación utilizando la pérdida de CO₂ (g) diario del sistema y la ecuación de Gompertz reparametrizada (Zwietering et al., 1990):

$$Y = A * \exp(-\exp(((\mu_{max} * e) / A) * (\lambda - t) + 1))$$

donde $Y = \ln(N_t / N_0)$, N_0 es el peso inicial del sistema (g) y N_t el peso en el tiempo t ; $A = \ln(N_\infty / N_0)$ es la producción máxima de CO₂ con N_∞ como máximo asintótico; μ_{max} es la tasa máxima de fermentación (h^{-1}); y λ el período de tiempo necesario para iniciar la fermentación vigorosa (fase lag). El ajuste de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 8.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

Se realizaron análisis estadísticos sobre los datos de fermentación utilizando ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para la comparación de medias en el software GraphPad Prism versión 8.00. El nivel estadístico de significancia se fijó en $p < 0,05$.

Para los compuestos volátiles se realizó un análisis de componentes principales (ACP) y gráficos de araña utilizando, respectivamente, los paquetes FactoMineR y fmsb del software estadístico R (R Development Core Team, 2015).

2.3. Resultados

2.3.1. Capacidad fermentativa de las subpoblaciones de *S. eubayanus*

Las cinéticas de fermentación de las cepas de *S. eubayanus* representativas de las cinco subpoblaciones pueden observarse en la Figura 2.2, junto con los parámetros cinéticos asociados a las mismas (Tabla 2.3). Todas las cepas presentaron curvas de fermentación similares (Figura 2.2), con una fase de retardo de fermentación inicial (fase lag), una fase de fermentación activa (fase exponencial) y una fase de cese de fermentación (fase estacionaria). Todas las cepas de *S. eubayanus* estudiadas tuvieron una cinética similar, con velocidades de fermentación (μ) y producción de CO₂ similares, con excepción de la cepa CRUB 1935 (33 % menor μ y 21 % menor producción de CO₂, $p < 0,0001$). Por su parte, la cepa control W34/70 superó significativamente a todas las cepas de *S. eubayanus* en cuanto a los parámetros de fermentación evaluados (30 % mayor producción de CO₂ y 35 % mayor μ , $p < 0,0001$). Para todas las cepas, la fermentación a 10 °C se completó a los 12 días luego de inoculadas (Figura 2.2).

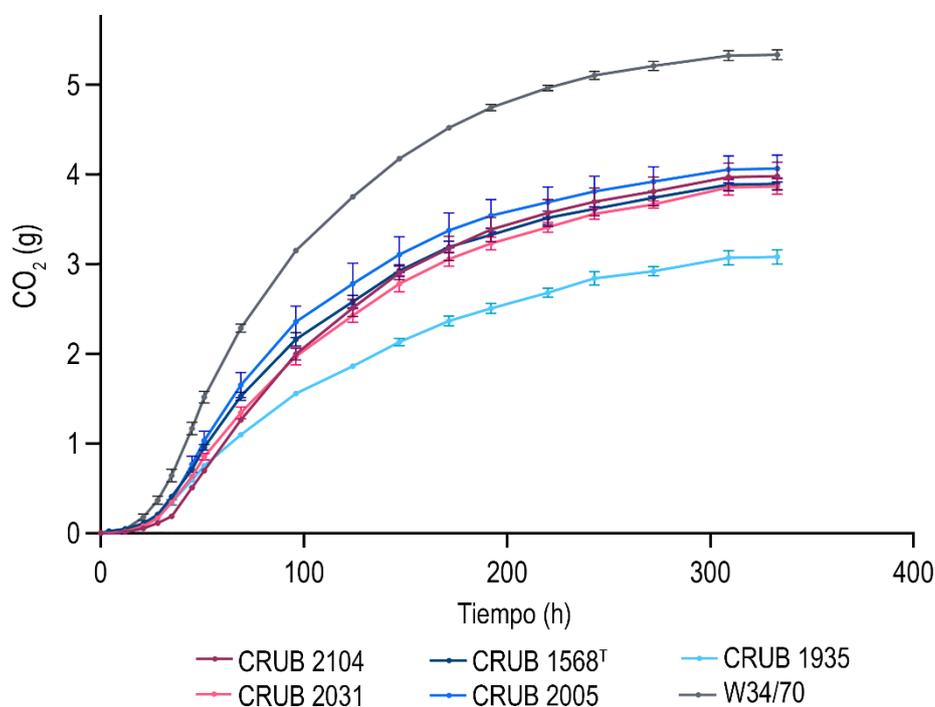


Figura 2.2. Cinética de fermentación de las cepas de *S. eubayanus* y la cepa comercial de *S. pastorianus* (W34/70), representada como producción de CO₂ a lo largo del tiempo. Las fermentaciones se realizaron en mosto de congreso por triplicado ($n = 3$). Se grafica la media con las barras de error.

CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE CEPAS DE *S. EUBAYANUS*

En cuanto al consumo de azúcares (Figura 2.3), ninguna de las cepas de *S. eubayanus* pudo utilizar la maltotriosa presente en el mosto, asociado a una atenuación promedio 22 % menor y una producción promedio de etanol 25 % menor, en relación a la cepa control de *S. pastorianus* ($p < 0,0001$, Tabla 2.3, Figura 2.3). La maltosa fue consumida por todas las cepas de *S. eubayanus*, pero no tan eficientemente como por la levadura lager (consumo promedio 20 % menor, $p = 0,006$). La cepa CRUB 1935 no solo exhibió una cinética de fermentación disminuida en relación con otras cepas de *S. eubayanus*, sino que también mostró una disminución de 11 % en la atenuación, junto con un consumo de maltosa un 20 % menor (67 % versus 87 % promedio; $p < 0,0001$) y una producción de etanol un 21 % menor ($p < 0,0001$) (Tabla 2.3, Figura 2.3). Asimismo, esta cepa, junto con el control lager, presentaron 15 % menos de glicerol producido.

Tabla 2.3. Características fermentativas de las cepas evaluadas en fermentaciones a escala de laboratorio.

| | CRUB 2104 | CRUB 2031 | CRUB 1568 ^T | CRUB 2005 | CRUB 1935 | W34/70 |
|--|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Velocidad de fermentación (h ⁻¹) | 0,028 ± 0 ^b | 0,026 ± 0 ^b | 0,028 ± 0 ^b | 0,031 ± 0 ^b | 0,019 ± 0 ^c | 0,041 ± 0 ^a |
| Producción de CO ₂ (g) | 3,9 ± 0,2 ^b | 3,7 ± 0 ^b | 3,7 ± 0,1 ^b | 3,9 ± 0,1 ^b | 3,0 ± 0,1 ^c | 5,2 ± 0,1 ^a |
| Atenuación (%) | 66,1 ± 1,6 ^b | 64,8 ± 1,3 ^b | 65,7 ± 0,8 ^b | 66,1 ± 1,3 ^b | 54,4 ± 1,7 ^c | 85,8 ± 0 ^a |
| Etanol (% v/v) | 3,85 ± 0,15 ^b | 3,93 ± 0,10 ^b | 3,86 ± 0,07 ^b | 3,87 ± 0,05 ^b | 3,07 ± 0,09 ^c | 4,97 ± 0,04 ^a |
| Glicerol (g/L) | 0,70 ± 0 ^a | 0,70 ± 0 ^a | 0,70 ± 0 ^a | 0,73 ± 0 ^a | 0,60 ± 0 ^b | 0,60 ± 0 ^b |
| pH final | 4,64 ± 0,03 ^b | 4,69 ± 0,02 ^a | 4,59 ± 0,02 ^c | 4,59 ± 0,01 ^c | 4,68 ± 0,02 ^a | 4,59 ± 0,01 ^c |

Las fermentaciones se realizaron por triplicado ($n = 3$). Se utilizó el ANOVA de una vía y test de Tukey para evaluar estadísticamente las diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias entre las cepas para cada parámetro ($p < 0,05$).

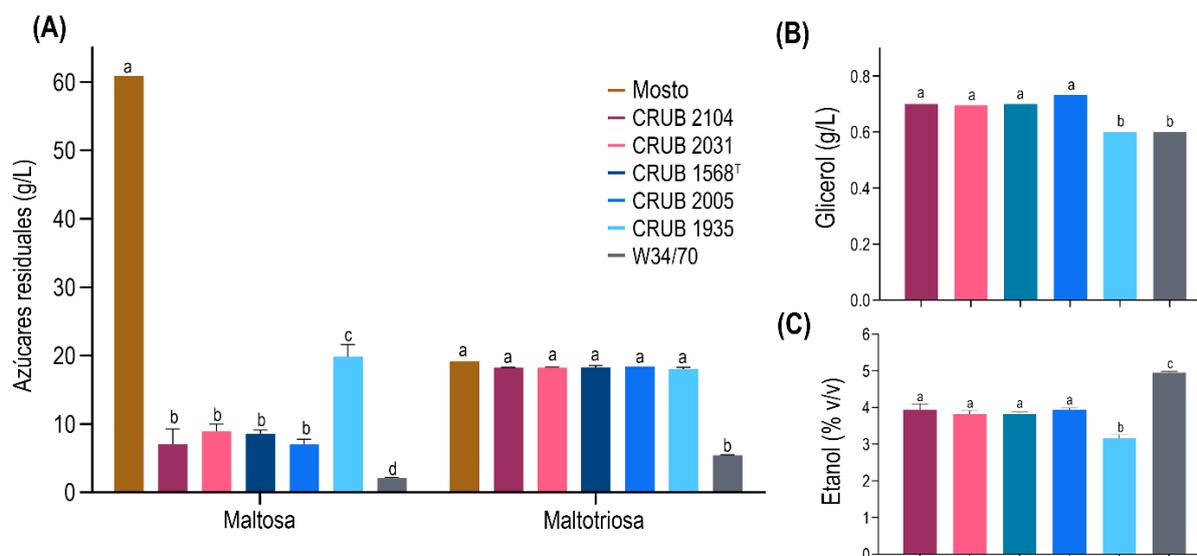


Figura 2.3. (A) Azúcares residuales, (B) glicerol producido y (C) etanol producido en fermentaciones a escala de laboratorio en mosto de congreso para las cinco cepas de *S. eubayanus* y la cepa comercial de *S. pastorianus* (W34/70). Las fermentaciones se realizaron por triplicado (n = 3) y se llevó a cabo ANOVA de una vía y test de Tukey para evaluar las diferencias estadísticamente significativas. Letras distintas representan diferencias entre las cepas (p < 0,05).

2.3.2. Producción de compuestos volátiles y perfil sensorial de las cepas de *S. eubayanus*

Los fenoles volátiles, ésteres y alcoholes superiores fueron analizados con el fin de caracterizar la producción de compuestos que podrían afectar el perfil organoléptico de las cervezas producidas por cepas de *S. eubayanus*; los resultados se muestran en la Tabla 2.4, la Tabla 2.5 y la Figura 2.4. Todas las cepas de *S. eubayanus* evidenciaron la producción de fenoles volátiles, los mismos fueron identificados como 4-vinilguayaacol (4-VG) y 4-vinilfenol (4-VP). En todas las cepas ambos compuestos se encontraron por encima del umbral de percepción en la cerveza con OAV > 1 (Tabla 2.4, Tabla 2.5), siendo las cepas CRUB 2005 y CRUB 1935 las que presentaron los mayores valores de producción. Por su parte, no se detectaron fenoles volátiles en las fermentaciones llevadas a cabo por la cepa control W34/70.

Con respecto a los ésteres y alcoholes superiores, todas las cepas fueron capaces de producir los compuestos volátiles analizados, pero sólo unas pocas presentaron niveles de compuestos que superaron los umbrales de percepción en la cerveza (Tabla 2.4, Tabla 2.5, Figura 2.4).

Tabla 2.4. Concentración (ppm) de los compuestos volátiles evaluados para cada cepa en fermentaciones de mosto congreso a escala laboratorio.

| Compuesto | CRUB 2104 | CRUB 2031 | CRUB 1568 ^T | CRUB 2005 | CRUB 1935 | W34/70 |
|----------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 4-vinilguaiacol | 0,37 ± 0,03 ^{b,c} | 0,35 ± 0,01 ^c | 0,43 ± 0,04 ^b | 0,50 ± 0,01 ^a | 0,53 ± 0,02 ^a | nd |
| 4-vinilfenol | 1,40 ± 0,16 ^b | 1,21 ± 0,6 ^b | 1,35 ± 0,17 ^b | 1,88 ± 0,10 ^a | 2,04 ± 0,03 ^a | nd |
| Acetato de etilo | 23,92 ± 0,68 ^b | 14,61 ± 1,24 ^c | 17,16 ± 0,59 ^c | 9,14 ± 0,86 ^d | 24,13 ± 1,63 ^b | 34,25 ± 2,84 ^a |
| Acetato de isobutilo | 0,07 ± 0,01 ^a | 0,07 ± 0,01 ^a | 0,02 ± 0 ^c | 0,03 ± 0 ^c | 0,05 ± 0 ^b | 0,07 ± 0,01 ^a |
| Acetato de isoamilo | 0,79 ± 0,08 ^b | 0,71 ± 0,06 ^{b,c} | 0,67 ± 0,04 ^{b,c} | 0,39 ± 0,06 ^d | 0,56 ± 0,03 ^c | 1,76 ± 0,12 ^a |
| Hexanoato de etilo | 0,24 ± 0,01 ^b | 0,15 ± 0,01 ^c | 0,26 ± 0,03 ^b | 0,13 ± 0,03 ^c | 0,21 ± 0,01 ^b | 0,80 ± 0,02 ^a |

CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE CEPAS DE S. EUBAYANUS

| | | | | | | |
|---|-----------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| Octanoato de etilo | 2,11 ± 0,43 ^b | 0,97 ± 0,27 ^{c,d} | 1,96 ± 0,47 ^{b,c} | 0,61 ± 0,09 ^d | 0,76 ± 0,30 ^d | 4,52 ± 0,95 ^a |
| Isobutanol | 27,91 ± 6,34 ^{a,b} | 30,67 ± 9,69 ^a | 24,69 ± 6,10 ^{a,b} | 17,67 ± 1,60 ^{a,b} | 31,97 ± 7,31 ^a | 14,17 ± 1,79 ^b |
| Alcohol amílico/isoamílico | 74,49 ± 9,97 ^a | 87,64 ± 18,38 ^a | 74,78 ± 4,06 ^a | 63,54 ± 4,47 ^a | 89,67 ± 19,39 ^a | 62,90 ± 3,97 ^a |
| 2-feniletanol | 72,01 ± 6,93 ^a | 60,16 ± 17,66 ^{a,b} | 66,39 ± 19,32 ^{a,b} | 40,70 ± 3,24 ^b | 62,66 ± 12,38 ^{a,b} | 49,94 ± 3,55 ^{a,b} |
| Ésteres totales | 27,13 | 16,51 | 20,07 | 10,30 | 25,71 | 41,40 |
| Alcoholes superiores totales | 174,41 | 178,47 | 165,86 | 121,91 | 184,30 | 127,01 |

nd = no detectado. Las fermentaciones se realizaron por triplicado (n = 3). Se realizó ANOVA de una vía y test de Tukey para evaluar estadísticamente las diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias entre las cepas para cada compuesto volátil (p < 0,05).

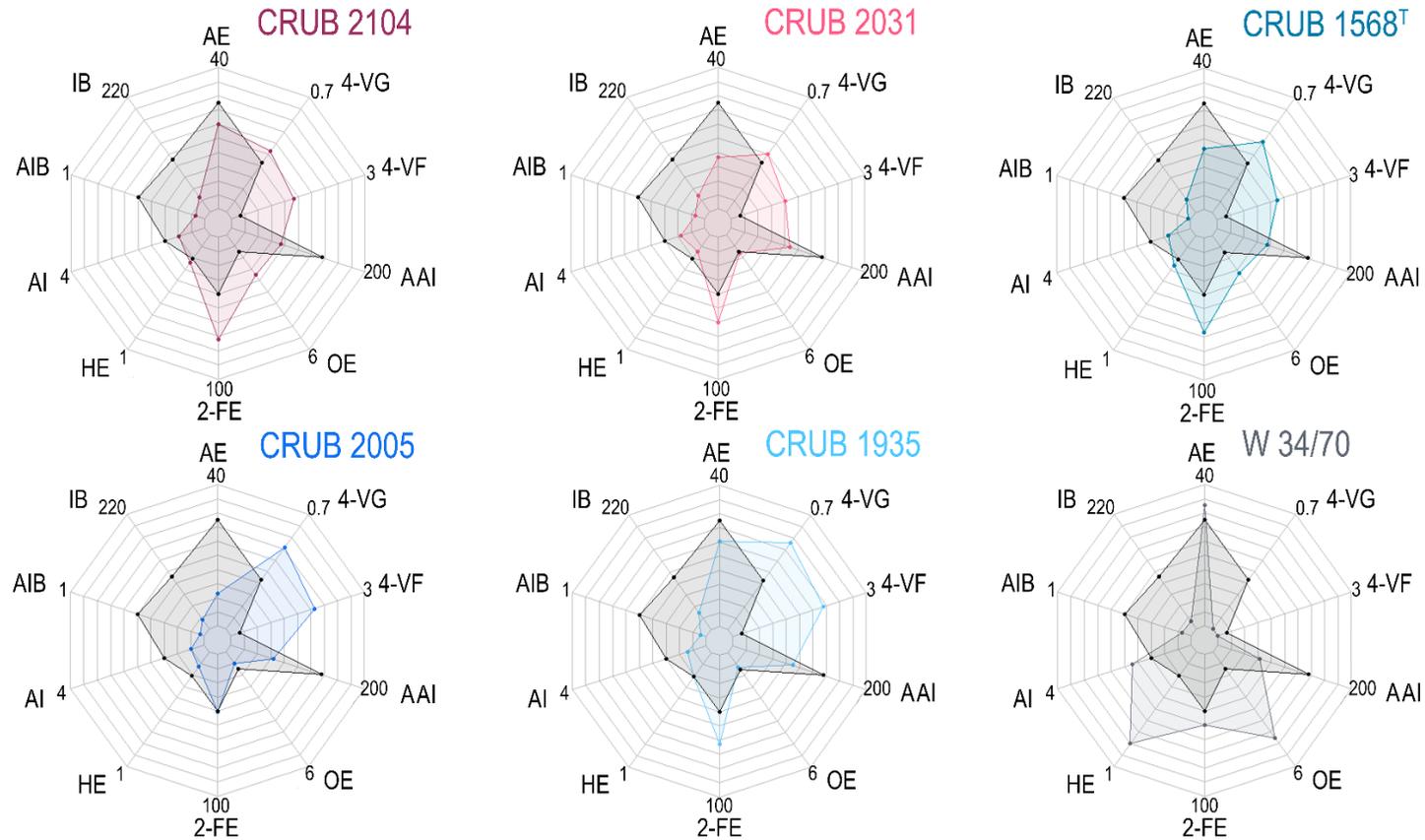


Figura 2.4. Representación gráfica de los compuestos volátiles producidos por las cepas evaluadas en mosto congreso a escala laboratorio (en colores). Para cada gráfico de araña los umbrales de percepción de los compuestos se representan en negro. AE: acetato de etilo, 4-VG: 4-vinilguaiacol, 4-VF: 4-vinilfenol, AAI: alcohol amílico/isoamílico, OE: octanoato de etilo. 2-FE: 2-feniletanol, HE: hexanoato de etilo, AI: acetato de isoamilo, AIB: acetato de isobutilo, IB: isobutanol.

CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE CEPAS DE S. EUBAYANUS

Las cepas CRUB 2104 y CRUB 1568^T produjeron hexanoato de etilo y octanoato de etilo a niveles por encima de los umbrales de percepción; y la cepa CRUB 2031 produjo sólo octanoato de etilo por encima de dicho umbral. Las cepas de *S. eubayanus* CRUB 2005 y CRUB 1935 no mostraron una producción significativa de ésteres (OAV < 1, Tabla 2.5). Por otro lado, la cepa control exhibió los niveles más altos de producción de acetato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo. Con respecto a los alcoholes superiores, el 2-feniletanol fue el único compuesto que se encontró en concentraciones superiores al umbral (OAV > 1, Tabla 2.5) para todas las cepas, excepto la CRUB 2005.

Tabla 2.5. Valores de actividad odorante (OAV) para los compuestos volátiles analizados para cada cepa.

| Compuesto | CRUB 2104 | CRUB 2031 | CRUB 1568 ^T | CRUB 2005 | CRUB 1935 | W34/70 | Umbrales (ppm) |
|----------------------------|-----------|-----------|------------------------|-----------|-----------|--------|----------------|
| 4-vinilguaiacol | 1,23 | 1,17 | 1,43 | 1,67 | 1,77 | nd | 0,3 |
| 4-vinilfenol | 7 | 6,05 | 6,75 | 9,4 | 10,2 | nd | 0,2 |
| Acetato de etilo | 0,94 | 0,57 | 0,67 | 0,36 | 0,95 | 1,34 | 25,5 |
| Acetato de isobutilo | 0,1 | 0,1 | 0,03 | 0,04 | 0,07 | 0,1 | 0,7 |
| Acetato de isoamilo | 0,66 | 0,59 | 0,56 | 0,33 | 0,47 | 1,47 | 1,2 |
| Hexanoato de etilo | 1,14 | 0,71 | 1,24 | 0,62 | 1 | 3,8 | 0,21 |
| Octanoato de etilo | 2,34 | 1,08 | 2,18 | 0,68 | 0,84 | 5,02 | 0,9 |
| Isobutanol | 0,19 | 0,20 | 0,16 | 0,12 | 0,21 | 0,09 | 150 |
| Alcohol amílico/isoamílico | 0,55 | 0,65 | 0,55 | 0,47 | 0,66 | 0,47 | 135 |
| 2-feniletanol | 1,8 | 1,5 | 1,66 | 1,01 | 1,56 | 1,25 | 40 |

nd: no detectado.

Para evaluar la existencia de una correlación entre los perfiles organolépticos y las características filogenéticas de las cepas, se realizó un análisis global de componentes principales (ACP) utilizando los 10 compuestos volátiles seleccionados (Figura 2.5). La representación de las variables activas en los dos primeros ejes explicó el 88,9 % de la variabilidad total. Las variables de mayor relevancia para el componente principal 1 (CP1) fueron los ésteres hexanoato de etilo, octanoato de etilo, acetato de etilo y de isoamilo, y ambos fenoles (4-VG y 4-VF); y para el CP2 las variables de mayor relevancia fueron los alcoholes superiores. Observando el gráfico, las cepas pertenecientes a la población A (CRUB 2104 y CRUB 2031) se localizaron en la zona superior del plano y se caracterizaron por una mayor producción de alcoholes superiores. Por su parte, las cepas pertenecientes a la población B (CRUB 1568^T, CRUB 2005 y CRUB 1935) se localizaron en el cuadrante izquierdo inferior, agrupadas en relación a una mayor producción de fenoles y menor producción de alcoholes superiores. Por último, en el cuadrante inferior derecho se localizó la cepa lager, caracterizada por una mayor producción de ésteres de etilo y acetato, y baja de fenoles y alcoholes superiores.

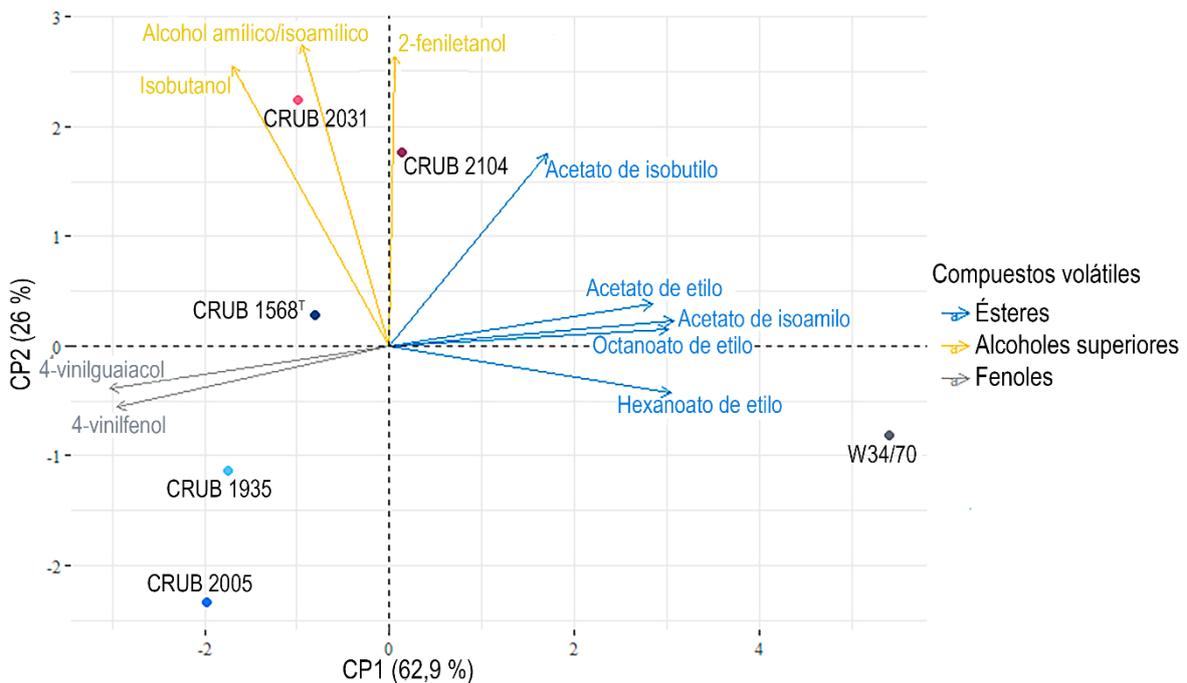


Figura 2.5. Análisis de componentes principales (ACP) generado a partir de la producción de compuestos volátiles de las cepas evaluadas en mosto congreso a escala laboratorio. Los vectores designan el compuesto volátil analizado, coloreado según el tipo: ésteres, alcoholes superiores y fenoles volátiles.

Debido a su buen rendimiento fermentativo relativo, y a la producción moderada de fenoles volátiles y de ésteres frutados, la cepa CRUB 1568^T fue seleccionada para continuar con los ensayos posteriores.

2.4. Discusión

El aprovechamiento de la diversidad natural para el aislamiento de levaduras con potencial biotecnológico es una estrategia que proporciona y abre un abanico de nuevas cepas para su uso en la industria de las bebidas fermentadas (Cubillos et al., 2019). En el laboratorio, este trabajo implica la clasificación taxonómica de las levaduras a nivel de especie y/o cepa utilizando métodos de biología molecular; pero además requiere una caracterización en términos de rendimiento fermentativo, producción de metabolitos e impacto sensorial en el producto final. En este punto, se evaluó el comportamiento fermentativo y el perfil organoléptico de diferentes cepas de *S. eubayanus* aisladas de la Patagonia (Argentina) para la selección y aplicación de aquellas más promisorias para la industria cervecera. Como control se utilizó la cepa Froberg de *S. pastorianus* W34/70. Se trata de una de las cepas lager más aplicadas en la industria cervecera, se utiliza ampliamente como referencia en comparaciones de rendimiento fermentativo y perfil sensorial entre levaduras lager (Meier-Dörnberg et al., 2017), y fue la primera cepa lager a la que se le secuenció el genoma completo (Nakao et al., 2009).

La baja atenuación observada para las cepas de *S. eubayanus* estudiadas, en comparación con el control lager, es principalmente el resultado de la incapacidad de *S. eubayanus* de consumir la maltotriosa (segundo azúcar más abundante en mosto de cebada). Esta característica fue evidenciada a nivel sensorial, donde las fermentaciones realizadas con las cepas de *S. eubayanus* se percibieron más dulces en comparación con la cepa lager (Figura 2.6). La inhabilidad de consumo de maltotriosa concuerda con diversos estudios, donde se evidenció no sólo para la cepa de tipo de *S. eubayanus*, sino para cepas aisladas de Chile, Tíbet y América del Norte (Baker et al., 2015; Brouwers, Brickwedde, et al., 2019; Brouwers, Gorter de Vries, et al., 2019; Gibson et al., 2013; Magalhães et al., 2016; Mardones et al., 2020). El transporte de maltotriosa al interior de la célula es el mecanismo que limita la capacidad de *S. eubayanus* de fermentarlo como fue evidenciado en ensayos de consumo con maltotriosa marcada ([¹⁴C]-maltotriosa) donde se observó una actividad nula para el transporte de este azúcar (Gibson et al., 2013; Magalhães et al., 2016). En las levaduras cerveceras la asimilación de maltotriosa ocurre debido a la presencia de genes que codifican permeasas, como el *MTT1* y el *AGT1*. En

CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE CEPAS DE *S. EUBAYANUS*

la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae* (ale), los transportadores *AGTI* son esenciales para una fermentación eficiente de la maltotriosa (Alves-Jr et al., 2007). En el caso de *S. pastorianus* (híbrido lager), los genes *AGTI* derivados del parental *S. cerevisiae* permanecen no funcionales, y se cree que el transporte de maltotriosa es llevado a cabo por una forma divergente de los genes *AGTI* y *MTT1/MTY1* heredados del parental salvaje (Cousseau et al., 2013; Dietvorst et al., 2005; Krogerus et al., 2015; Salema-Oom et al., 2005). Sin embargo, ninguno de los genomas de *S. eubayanus* disponibles contiene el gen *MTT1*, aunque si se han observado secuencias relativamente cercanas al gen *AGTI* (Baker & Hittinger, 2019; Magalhães et al., 2016). Recientemente, a partir de la construcción de un híbrido *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* (aislada del Himalaya), se demostró que la heterosis, a través de la interacción de señales reguladoras entre los dos subgenomas (*crossstalk*), es en parte responsable del consumo de maltotriosa del híbrido, aportando evidencias al origen evolutivo de este fenotipo esencial de las levaduras cerveceras lager (Brouwers, Brickwedde, et al., 2019). Hasta el momento, no se ha logrado que cepas salvajes de *S. eubayanus* asimilen la maltotriosa, sino sólo a través de estrategias de modificación genética (Baker & Hittinger, 2019; Brouwers, Gorter de Vries, et al., 2019). En este trabajo encontramos una capacidad limitada para utilizar maltotriosa en todas las subpoblaciones de *S. eubayanus* y, teniendo en cuenta los otros trabajos reportados, argumentamos que es una característica general de la especie.

El uso de maltotriosa es uno de los ejemplos característicos de rasgos de domesticación en las levaduras cerveceras, la mayoría de las especies sacaromicéticas salvajes no pueden utilizar este azúcar (Gallone et al., 2018; Salema-Oom et al., 2005). La incapacidad de consumir maltotriosa está reportada para otras especies del género *Saccharomyces*, como *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. arboricola* y *S. uvarum* (Hutzler et al., 2021; Lohrmann, 2021; Nikulin et al., 2018, 2020). Sorprendentemente, un estudio reciente evidenció la fermentación de maltotriosa por parte de la especie salvaje *S. jurei*, donde el mecanismo asociado podría involucrar transportadores transmembrana (Hutzler et al., 2021). Aunque el consumo de todos los azúcares del mosto es un objetivo en términos de productividad, en algunos estilos de cerveza la presencia de una proporción de azúcares residuales destaca características como cuerpo, sensación en boca y maltosidad y es considerado un rasgo positivo (Garret, 2011).

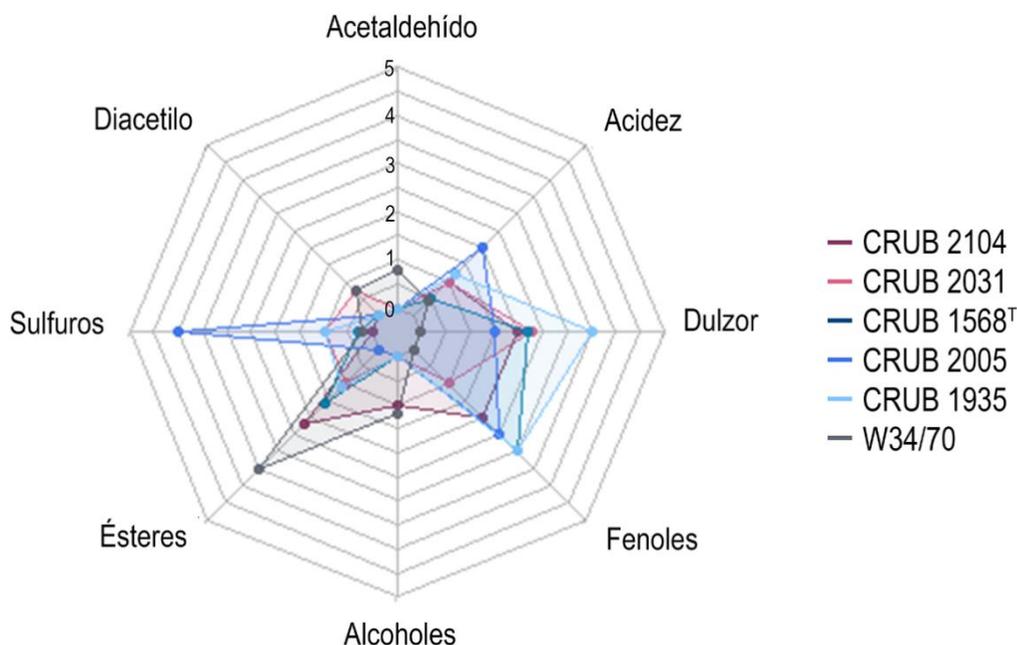


Figura 2.6. Análisis sensorial de las fermentaciones realizadas en mosto congreso. Los valores en la figura resultan del cálculo de las medias de los descriptores sensoriales evaluados por cada uno de los panelistas.

Dentro de las cepas de *S. eubayanus* estudiadas, la cepa CRUB 1935 (PB-3, Tierra del Fuego) se diferenció por presentar un rendimiento fermentativo reducido. Nespolo et al., (2020) también encontraron diferentes capacidades fermentativas entre aislamientos de *S. eubayanus* pertenecientes a diferentes subpoblaciones en Sudamérica; sin embargo, contrariamente a lo observado en este y en otros estudios (Eizaguirre et al., 2018), las cepas localizadas en latitudes inferiores fueron las que mostraron mayores tasas de fermentación.

Las diferencias en el rendimiento fermentativo entre cepas de levadura se encuentran relacionadas con la capacidad diferencial para utilizar los azúcares presentes en el mosto durante la fermentación (Baker et al., 2015; Meneses, 2007; Vidgren et al., 2009). Esto fue lo observado para la cepa CRUB 1935, donde la cinética fermentativa disminuida se vio acompañada de un menor consumo de maltosa, una menor producción de etanol, y con fermentaciones percibidas más dulces a nivel sensorial (Figura 2.6). La correlación positiva entre la cinética fermentativa y el consumo de maltosa se encuentra reportada tanto para *S. cerevisiae*, como para *S. eubayanus* (Meneses et al., 2002; Nespolo et al., 2020). En una primera aproximación, analizando las diferencias entre las principales proteínas predichas asociadas al consumo de maltosa entre la cepa CRUB 1935 y la cepa CRUB 1568^T de *S. eubayanus*, se observó que, de las diez proteínas estudiadas, hubo cambios a nivel de aminoácidos en siete de ellas, siendo la maltasa en la que se encontró la mayor cantidad de modificaciones (Burini et

al., 2021b). Si bien algunos de los cambios observados podrían ser responsables de la menor capacidad de fermentación de la cepa CRUB 1935, sólo se concibe como una hipótesis dado que la tasa de fermentación de maltosa se correlacionó previamente con la actividad de transportadores (genes MALT), en lugar de su hidrólisis (actividad de maltasa), siendo la primera el paso limitante en la utilización de este azúcar (Diderich et al., 2018; Kodama et al., 1995; Rautio & Londesborough, 2003). Actualmente, dentro de nuestro grupo de trabajo, se están realizando estudios transcripcionales (ARN mensajero) para comprender las bases genéticas de las diferencias de asimilación de maltosa en las distintas cepas.

Junto con el etanol y el dióxido de carbono, el glicerol es uno de los compuestos mayoritarios producidos durante la fermentación, con un contenido en cerveza que suele encontrarse entre 0,9 a 3,5 g/L (Klopper et al., 1986; Langstaff & Lewis, 1993; Li et al., 2015; Zhao et al., 2015). El mismo juega un papel importante en la percepción organoléptica contribuyendo positivamente a la sensación en boca, la suavidad y el cuerpo por encima de los 10 g/L (Langstaff & Lewis, 1993; Zhao et al., 2015). Valores de producción de glicerol de 3 a 9 g/L fueron reportados para *S. eubayanus* en mosto de vino y sidra (González Flores et al., 2017; Origone, 2018; Origone et al., 2020); superando 4 a 10 veces lo observado en este trabajo (0,6-0,7 g/L). Los mostos de vino y sidra están compuestos principalmente de monosacáridos (glucosa y fructosa), a diferencia del mosto de cebada donde la maltosa (disacárido) y la maltotriosa (trisacárido) son los azúcares fermentables principales. Piddocke et al. (2009) evidenciaron un mayor rendimiento de glicerol en fermentaciones suplementadas con glucosa en relación a aquellas suplementadas con maltosa, relacionado con el hecho de que en condiciones de alto contenido de monosacáridos se generan más moléculas de DHAP (fosfato de dihidroxiacetona) y NADH (forma reducida de dinucleótido de nicotinamida y adenina) que son derivadas a la vía de biosíntesis de glicerol (Zhao et al., 2015).

Con respecto a la producción de compuestos volátiles y al perfil sensorial, encontramos que los fenoles volátiles fueron de los compuestos de aroma y sabor más distintivos producidos por todas las cepas de *S. eubayanus*. En particular fueron identificados el 4-vinilfenol (4-VF) y 4-vinilguaiacol (4-VG). La producción de 4-VG para cepas de *S. eubayanus* fue reportada previamente (Diderich et al., 2018; Krogerus et al., 2015; Mertens et al., 2015; Urbina et al., 2020); sin embargo, es la primera vez que se evidencia la producción de 4-VF para *S. eubayanus* (excediendo 8 veces en promedio su umbral de percepción, OAV = 8). En estudios relacionados con vino y sidra donde se evaluaron cepas de *S. eubayanus* aisladas de *Araucaria araucana* en

la Patagonia, fueron identificados los etil derivados (4-etilfenol y 4-etilguaicol) (González Flores et al., 2017; Origone, 2018); sin embargo, los valores reportados se encontraron dos órdenes de magnitud por debajo del umbral de percepción para estos compuestos. Sensorialmente, las fermentaciones con las cepas CRUB 1568^T y CRUB 1935 fueron las que se percibieron más fenólicas, seguidas muy de cerca por la cepa CRUB 2005; esto se relaciona con lo obtenido analíticamente. Las distintas concentraciones de 4-VF y 4-VG producidas por las diferentes cepas revela una variabilidad intraespecífica, que pudo ser incluso evidenciada a nivel sensorial (Figura 2.6). El 4-VF y el 4-VG son los productos de descarboxilación de los ácidos p-cumárico y ferúlico, precursores fenólicos presentes en el mosto. Esta transformación está mediada por enzimas que involucran la acción de los genes *FDCI* y *PADI* (Mukai et al., 2014; Vanbeneden et al., 2008). En las levaduras salvajes, como es el caso de *S. eubayanus*, las enzimas *PADI* y *FDCI* ayudan a desintoxicar los ácidos fenilacrílicos que se encuentran en las paredes celulares de las plantas; por lo que es de esperar que la actividad de estos genes se conserve a menos que haya una contra selección (Gallone et al., 2016). Por su parte, las cervezas lager son conocidas por sus perfiles sensoriales limpios y libres de fenoles apreciables, lo que concuerda con la ausencia de estos compuestos para la cepa de control W34/70. En la mayoría de las levaduras industriales ale y lager, estos genes han sido inactivados o eliminados naturalmente por distintos tipos de mutaciones que llevaron a su pérdida de función y se consideran signos de domesticación en la industria cervecera (Gallone et al., 2016; Gonçalves et al., 2016; Langdon et al., 2020). Sensorialmente, el 4-VF y 4-VG se perciben como clavo de olor, medicinal, especiado, picante y/o ahumado, y se consideran sabores indeseados (denominados *off flavors* o POF) en muchos estilos de cerveza. Sin embargo, en algunos estilos especiales, como las cervezas de trigo y las saison, estos sabores fenólicos son una parte esencial del perfil organoléptico aportando a la complejidad integral (Coghe et al., 2004; Cui et al., 2015; Lentz, 2018; Vanbeneden et al., 2008).

Por su parte, como ya se describió, los ésteres y los alcoholes superiores constituyen grupos importantes de compuestos aromáticos responsables de impartir aromas florales y frutados que contribuyen al carácter organoléptico general de la cerveza (Holt et al., 2019; Lodolo et al., 2008; Verstrepen et al., 2003). En este punto, se evaluó la presencia de ésteres de acetato (acetato de etilo, acetato de isobutilo y acetato de isoamilo), ésteres etílicos (hexanoato de etilo y octanoato de etilo) y alcoholes superiores (isobutanol, alcohol amílico e isoamílico y 2-feniletanol). Se encontró que todos los compuestos fueron producidos por las cepas de *S.*

CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE CEPAS DE *S. EUBAYANUS*

eubayanus analizadas, de acuerdo con lo observado en otras investigaciones (Gibson et al., 2013; Hutzler et al., 2021; Krogerus et al., 2015, 2017; Mardones et al., 2020; Mertens et al., 2015; Urbina et al., 2020); sin embargo, sólo algunos de ellos superaron los umbrales de percepción. Las cepas CRUB 2104 y CRUB 1568^T produjeron los niveles más altos de los ésteres frutados hexanoato de etilo y octanoato de etilo (frutado, manzana, piña, brandy) y de 2-feniletanol (rosas); lo que fue percibido a nivel sensorial por el panel de cata (Figura 2.6). La producción diferencial de compuestos volátiles entre las cepas de *S. eubayanus* demuestra variabilidad fenotípica intraespecífica, lo que fue reportado también por Mardones et al. (2020) y Urbina et al. (2020). Mardones *et al.* (2020) de hecho propusieron que estas variabilidades fenotípicas podrían verse influenciadas por diferencias en la captación y acumulación de aminoácidos precursores. Por su parte, la cepa control W34/70 superó ampliamente a las cepas salvajes en la producción de ésteres frutados, lo que fue corroborado sensorialmente (Figura 2.6); los panelistas describieron las fermentaciones realizadas con esta cepa con un fuerte aroma a pera y manzana. Steensels et al. (2014) encontraron que la producción de ciertos compuestos aromáticos deseables, como los ésteres, podrían haber sido seleccionados en las levaduras industriales y, por lo tanto, podría tratarse de un signo de domesticación. Asimismo, al tratarse de un híbrido, no sólo la selección posee un rol importante, sino que el aporte significativo del sub-genoma *S. cerevisiae* también debe considerarse en la producción de ésteres (Loviso & Libkind, 2018; Nykänen & Nykänen, 1977). Por último, se observó una separación de las cepas de *S. eubayanus* según su estructura poblacional (PA y PB) en relación a la producción de compuestos volátiles. Por el contrario, Mardones et al. (2020) no observaron evidencias de agrupamientos basados en el origen geográfico o la genética para la producción de compuestos volátiles. Sin embargo, hay que tener en cuenta que en su caso se estudiaron 8 cepas pertenecientes sólo a la población PB de *S. eubayanus*. Nuestros resultados deben considerarse como una tendencia, ya que el análisis se realizó con una cepa de cada subpoblación y sólo un control lager. Análisis futuros deberían realizarse con un mayor número de cepas para corroborar estos resultados.

La cepa CRUB 1935 resultó tener el peor rendimiento fermentativo. Además, las cepas CRUB 1935 y CRUB 2005 presentaron una elevada producción de fenoles volátiles y un bajo aporte al carácter organoléptico frutal/floral (OAVs de ésteres y alcoholes superiores < 1). La cepa CRUB 2031 presentó una moderada producción de compuestos aromáticos activos; sin embargo, en el análisis sensorial se percibió una alta producción de sulfuro de hidrógeno

CAPÍTULO 2. SELECCIÓN DE CEPAS DE *S. EUBAYANUS*

(descrito como huevos podridos), con un impacto negativo en el perfil organoléptico. Mardones et al. (2020), también observaron una alta producción de sulfuros en algunas cepas chilenas de *S. eubayanus*, y encontraron que eran capaces de sobre expresar la vía asimiladora de reducción de sulfatos (que da como resultado la producción de sulfuro de hidrógeno). De esta manera, las cepas más prometedoras para su aplicación en la industria cervecera resultaron ser las cepas CRUB 2104 (PA-1) y CRUB 1568^T (PB-1), también descritas en el análisis sensorial como las más agradables en cuanto a fenoles, con aromas dulces y frutados. Del ACP para compuestos volátiles (Figura 2.5), puede observarse que la cepa CRUB 1568^T se ubicó cerca del centro, lo que indica una producción moderada de todos los compuestos analizados y, por lo tanto, fue la seleccionada para continuar con los ensayos propuestos.

CAPÍTULO 3

OPTIMIZACIÓN DE LA PROPAGACIÓN

Capítulo 3.

Condiciones de propagación y desarrollo de los cultivos iniciadores cerveceros

3.1. Introducción

En el ámbito cervecero, la propagación implica una serie de etapas de escalado de biomasa que culminan con la correcta inoculación del cultivo iniciador (*starter*) en un fermentador a escala de producción. Históricamente, la propagación de levaduras cerveceras se caracterizaba por ser algo más parecido a fermentaciones a pequeña escala que un proceso orientado al crecimiento de biomasa, siendo la productividad celular de tales sistemas baja (del orden de 7×10^7 cel/mL) (Quain, 2006; Smart, 2003). En la actualidad, sin embargo, la filosofía de la propagación se ha movido significativamente a ser un proceso en el que la levadura se cultiva intencionalmente, tanto en el laboratorio como en la cervecería, en presencia de oxígeno (Bokulich & Bamforth, 2017; Smart, 2003). En estas condiciones aeróbicas, es posible lograr no sólo mejores rendimientos de levadura en tiempos más cortos, sino que la conversión de nutrientes a biomasa es más eficiente y el aporte continuo de oxígeno permite obtener células sanas con reservas de esteroides y ácidos grasos insaturados, necesarios para una fermentación posterior más eficiente y saludable (fermentación rápida, mejor atenuación, producto de mayor calidad) (Quain, 2006; Smart, 2003).

Las levaduras tienen la capacidad de reproducirse desde un único individuo o célula, hasta cantidades que logran suplir con la demanda de volúmenes industriales (Cuevas, 2020); sin embargo, esta tarea requiere una correcta manipulación. Si bien el objetivo principal de la propagación es la producción de biomasa, es necesario que el resultado final sea un cultivo puro en el mejor estado fisiológico posible (Cahill et al., 2000; Smart, 2003; White & Zainasheff, 2010): “una cantidad menor de levadura saludable hará una mejor cerveza que una gran cantidad de levaduras deterioradas” (White & Zainasheff, 2010). Un cultivo puro implica que sólo debe estar compuesto por la cepa de levadura propagada y debe estar libre de contaminantes; este punto es crítico y la correcta manipulación, higiene y sanitización a lo largo del proceso es fundamental (Quain, 2006; White & Zainasheff, 2010). Por su parte, el estado fisiológico del cultivo iniciador es esencial para la obtención de cervezas consistentes de buena

calidad, y se define mediante dos indicadores: la viabilidad y la vitalidad de las células de levadura.

La viabilidad se define, generalmente, como el porcentaje de células vivas en una población, y proporciona una medida predictiva de su capacidad de reproducirse y crecer una vez inoculadas en el mosto (Briggs et al., 2004; Kwolek-Mirek & Zadrag-Tecza, 2014; Luarasi et al., 2017). Este parámetro puede ser determinado por diferentes métodos. En microbiología tradicional uno de los métodos más utilizados es el análisis del número de colonias (UFC o unidades formadoras de colonias); donde el recuento de colonias de una dilución de la muestra en un medio sólido está directamente relacionado con el número de células viables en la suspensión original. La ventaja es la facilidad de uso y el bajo costo, pero tiene como desventaja el largo tiempo de espera de los resultados (48 h de incubación); lo que hace que su uso sea limitado para respaldar las decisiones con respecto a la aptitud de la levadura para ser inoculada en fábrica (Briggs et al., 2004; Kwolek-Mirek & Zadrag-Tecza, 2014). Los métodos de determinación de viabilidad rápidos y más utilizados en el ámbito cervecero son aquellos basados en el uso de colorantes vitales. Los mismos se dividen en dos grandes grupos: (1) aquellos donde el colorante penetra en las células dañadas o muertas tiñendo el núcleo o el citoplasma, pero no en las células viables donde la membrana está intacta (colorantes fluorescentes que se unen al ADN -yoduro de propidio o el bromuro de etidio-, o colorimétricos - azul tripán o eritrosina B-); y (2) aquellos donde el colorante penetra tanto en las células vivas como muertas y, posteriormente, las células vivas pueden bombear el colorante afuera (floxina B) o reducirlo (azul de metileno, violeta de metileno) y permanecer incoloras. Estos métodos permiten la observación directa de las células de levadura, distinguiendo entre células vivas o muertas, y midiendo el porcentaje de estas dos categorías en toda la población (Briggs et al., 2004; Kwolek-Mirek & Zadrag-Tecza, 2014; Smart, 2003; Stewart, 2017). El método más utilizado para la evaluación de la viabilidad de levaduras en las cervecerías es aquel que emplea azul de metileno y cámara de Neubauer para recuento (Pierce, 1970; White & Zainasheff, 2010).

La viabilidad, si bien es un indicador robusto, resulta limitada para evaluar íntegramente el estado fisiológico y el potencial fermentativo de un inóculo, siendo necesario determinar también la vitalidad de las levaduras. La vitalidad está vinculada con el estado fisiológico de las células, y se describe a través de características y capacidades relacionadas con la actividad metabólica y la resistencia al estrés (Guido, 2004; Lodolo & Cantrell, 2007; Michel et al., 2020;

Mochaba et al., 1998; Smart, 2003; Smart et al., 1999). Se considera que la vitalidad es un reflejo de la previsibilidad y eficiencia de la fermentación y de la calidad organoléptica del producto final (Briggs et al., 2004; Michel et al., 2020; Mochaba et al., 1998). Los métodos para determinar la vitalidad de las levaduras se basan en estudios de distintos aspectos del estado fisiológico o actividad metabólica de las células (Tabla 3.1) como: determinación del contenido de ATP o NADH celular, determinación del potencial de la membrana mitocondrial, determinación de actividades enzimáticas (esterasa, oxidorreductasas u otras enzimas redox) o citometría de flujo con uso de colorantes (Kwolek-Mirek & Zadrag-Tecza, 2014; Mochaba et al., 1998). Estos métodos requieren el uso de equipos y materiales avanzados, son caros, de larga duración y su aplicabilidad en la industria es limitada. Se han sugerido pruebas más rápidas y específicas (en relación a la actividad fermentativa), que incluyen medidas de la tasa de absorción de oxígeno, absorción de glucosa, contenido de esteroides, evolución de CO₂ y formación de etanol. Actualmente, el método más popular es el de Poder de Acidificación (PA) o *Acidification Power Test*, que se basa en la premisa de que cuánto más activa o vital se encuentre la levadura, reducirá el pH del medio (lo acidificará) en menor tiempo; registrándose tanto la salida espontánea de protones H⁺ (poder de acidificación espontánea) como la salida de H⁺ inducida por el sustrato (poder de acidificación inducido por el sustrato). Las células de levadura intentan mantener un equilibrio entre las concentraciones de iones de hidrógeno (H⁺) intracelulares y extracelulares. Los protones (H⁺) se excretan espontáneamente al poner en contacto la levadura con un medio no tamponado, o luego de adicionar un sustrato adecuado. El eflujo espontáneo de H⁺ se sostiene únicamente por las reservas endógenas de H⁺ y fuentes de energía de reserva como el glucógeno. La energía para la salida de H⁺ inducida por sustrato se obtiene de fuentes endógenas y exógenas fermentables. Dado que el éxito de la fermentación de una cervecera depende tanto del crecimiento de la levadura como de la tasa de utilización del sustrato, el PA general (PA espontáneo más PA inducido por el sustrato) será tomado como indicador del rendimiento general de la fermentación. (Kara et al., 1988; Opekarová & Sigler, 1982).

Tabla 3.1 Métodos descriptos para la evaluación de la vitalidad de levaduras (Müller-Auffermann et al., 2014).

| Método basado en: | Ejemplos |
|--|---|
| Actividad metabólica | Tinción de vitalidad Microcalorimetría Reducción de dicetonas vecinales (VDK) Actividad proteasa, esterasa u oxidorreductasa Prueba de liberación de iones de magnesio (MRT) Consumo de oxígeno específico Prueba de Poder de Acidificación Valor de pH intracelular (ICP) |
| Medida de componentes celulares | Trifosfato de adenosina (ATP) Carga de energía de adenilato (AEC) NADH (fluorométrico) Glucógeno y trehalosa Esteroles y ácidos grasos insaturados |
| Capacidad fermentativa o tasa de flujo glucolítico | Tasa de flujo glucolítico Medida de liberación de CO ₂ Ensayos de fermentación |

Como se describió, la propagación tiene como objetivo principal la obtención de biomasa. Tanto a nivel productivo, como en el laboratorio, resulta fundamental determinar las condiciones y parámetros que optimizan el proceso, dando como resultado el rendimiento máximo para la variable deseada (Bhavsar et al., 2018; Myers, 2016). Tradicionalmente, el método de optimización más utilizado era el OFAT (*One Factor At a Time*), que consiste en cambiar un factor a la vez manteniendo los otros fijos. Este factor se varía hasta encontrar su mejor ajuste, luego se fija en este nivel y se cambia el otro factor hasta que se encuentra su mejor ajuste y se mantiene constante. Todo el proceso se repite con otro factor. Este método no sólo no muestra el efecto combinado de todas las variables involucradas, sino que además lleva mucho tiempo y requiere más experimentos para determinar los niveles óptimos para cada parámetro (Bhavsar et al., 2018; Wahid & Nadir, 2013). Con la aplicación de diseños de experimentos o diseño experimental estadístico (DoE) se logran superar las limitaciones del método clásico, ya que pueden proporcionar modelos estadísticos que ayudan a comprender las

interacciones entre los parámetros del medio a diferentes niveles, y su influencia y efecto sobre la variable respuesta (Díaz et al., 2005; Myers, 2016).

En las etapas iniciales de la optimización de un medio de cultivo, los diseños factoriales fraccionados son herramientas muy útiles, encontrándose de hecho entre los tipos de diseño más utilizados en la industria (Gutierrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008; Myers, 2016). Si el experimentador puede suponer razonablemente que ciertas interacciones de orden superior son insignificantes, entonces se puede obtener información sobre los efectos principales y las interacciones de orden inferior ejecutando solo una fracción del experimento factorial completo; los más aplicados suelen ser los experimentos de factores a dos niveles, siendo el número de experimentos $N = 2^{k-p}$ (donde k es el número de variables o factores y p es el fraccionamiento aplicado). Un uso importante de los diseños factoriales fraccionados es en experimentos de relevamiento (*screening*), en los que se consideran muchos factores con el propósito de identificar aquellos (si los hay) que tienen efectos importantes, utilizando la menor cantidad posible de corridas experimentales. Los factores que se identifican como importantes se investigan más a fondo en experimentos de optimización posteriores (Grömping, 2014; Gutierrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008; Lawson, 2014; Myers, 2016). El diseño experimental de Plackett-Burman, es un tipo de análisis factorial fraccionado de dos niveles que permite la evaluación de "N-1" variables mediante "N" número de experimentos (N debe ser un múltiplo de cuatro), donde los experimentos se realizan en varias combinaciones de valores altos y bajos de las variables del proceso y se analizan para determinar su efecto (Plackett & Burman, 1946). El diseño analiza los datos de entrada y presenta un orden de rango de las variables con la magnitud del efecto, designando signos a los efectos para indicar si un aumento en los valores de los factores es positivo o negativo (Gutierrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008; X. Li et al., 2009; Myers, 2016; Plackett & Burman, 1946).

Una vez identificados los factores de impacto significativo, se puede aplicar la Metodología de Superficie de Respuesta (MSR); una herramienta de optimización eficaz que permite la evaluación simultánea de los factores y sus interacciones en un bajo número de ensayos experimentales. Uno de los diseños de superficie de respuesta más populares es el Diseño Central Compuesto (DCC, Figura 3.1), que se puede construir a partir de un diseño factorial completo o fraccionado, agregando un punto central (con réplicas) y puntos que salen del cuadrado (axiales o puntos estrella) de manera que todos los puntos quedan equidistantes del

centro ($\alpha = (2^{k-p})^{0.25}$, donde k es el número de factores y p el número de fracciones) (Bhavsar et al., 2018; Gutierrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008; Lenth, 2009).

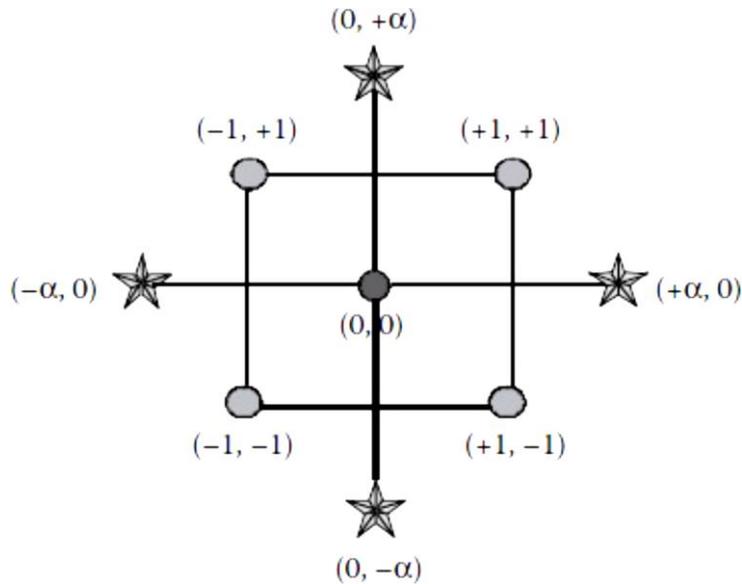


Figura 3.1. Diseño Central Compuesto con los valores codificados. En gris oscuro el punto central (0,0); en gris claro los puntos que forman parte del diseño factorial y los puntos estrella conformados por el valor $\alpha = (2^{k-p})^{0.25}$ (Anderson & Whitcomb, 2016).

En este capítulo se propuso definir las condiciones óptimas de propagación de *S. eubayanus*, para la obtención de cultivos iniciadores libres de contaminantes y con características adecuadas en cuanto a la cantidad y calidad de células producidas, con el objetivo de inocular fermentadores de escala productiva (500-1000 L).

3.2. Materiales y métodos

3.2.1. Cepas utilizadas y esquema de propagación

Se realizó la optimización de las condiciones de propagación para la cepa CRUB 1568^T seleccionada en el Capítulo 2, perteneciente a la colección de microorganismos del IPATEC (crio-conservada a -80 °C en glicerol 20 % v/v).

Para las propagaciones se siguió el protocolo estándar de propagación desarrollado en el laboratorio (CRELTEC, IPATEC): tres colonias aisladas en placa se inoculan en un tubo con 5 mL de medio mosto extracto de malta (ANEXO N°1) de 6 °Bx (ETAPA I) y se sigue un factor de escalado 1:10 (Annemuller et al., 2011; Boulton & Quain, 2006; Briggs et al., 2004; White & Zainasheff, 2010) en Erlenmeyer hasta un volumen final de inóculo de 500 mL (Figura 3.2). Cada etapa de propagación se realizó por triplicado en agitador orbital (INFORS HT) durante 48 h, a una velocidad de agitación de 140 rpm y una temperatura de incubación de 22 °C.

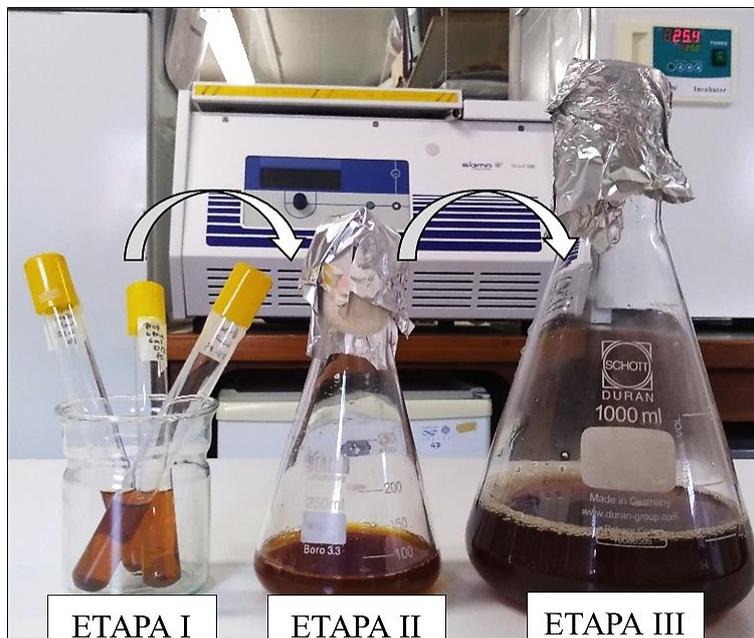


Figura 3.2. Esquema de propagación.

En la última etapa de propagación (48 h antes de finalizar) se realiza un control de calidad microbiológico para asegurar la ausencia de microorganismos contaminantes. Para ello, el contenido de cada propagación es estriado en placa en dos medios de cultivo comerciales: el medio diferencial de *Wallerstein* (WLD) para aislamiento selectivo de bacterias aeróbicas ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y/o *Escherichia coli* (incubado en estufa a 30 °C por 28 h), y el medio *Lin's Cupric Sulfate Medium* (LCSM) para detección de levaduras no sacaromícéticas (incubado a 25 °C por 48 h).

3.2.2. Selección de un medio de cultivo sólido para crecimiento y conservación de cepas

Se evaluaron seis medios de cultivo en placa para el crecimiento de *S. eubayanus*. Para ello se realizó una suspensión de levaduras de 1×10^9 cel/mL en agua destilada estéril y se sumergió el *loop* del ansa durante 3 segundos, luego de lo cual se realizó un estriado por agotamiento en cada uno de los medios de cultivo por triplicado. Las placas fueron incubadas a 25 °C durante 96 h. Se registró el momento en que se evidenció crecimiento de biomasa, el calibre de la colonia de mayor tamaño encontrada (Calibre mayor) y el calibre promedio de todas las colonias aisladas (Calibre promedio) finalizadas las 96 h. Los medios ensayados fueron Agar Mosto, Agar Papa, Agar Malta, YM, YPD y MYP (ANEXO N°1).

3.2.3. Selección de un método para evaluar la calidad de la biomasa: viabilidad

La viabilidad de las células de *S. eubayanus* se evaluó mediante la técnica de tinción vital y posterior recuento con cámara de Neubauer en microscopio (Olympus CX22LED, con ocular USB acoplado a computadora y captura de imágenes con el software ISCapture). Para ello, se realizaron diluciones seriadas de los cultivos de trabajo en agua destilada (factor de dilución de 1:20) y una dilución final en partes iguales (1:1) con la solución del colorante a evaluar, se mezcló agitando con vórtex y se incubó a 25 °C durante 5 min (para colorantes citrato) y 15 min (para los colorantes alcalinos). Se asumió como viables a las células no teñidas.

Se ensayaron cuatro colorantes vitales (Kwolek-Mirek & Zadrag-Tecza, 2014; Smart et al., 1999; White & Zainasheff, 2010) (ver preparación en ANEXO N°1): Azul de Metileno Citrato (AMC), Azul de Metileno Alcalino (AMA), Violeta de Metileno Citrato (VMC) y Violeta de Metileno Alcalino (VMA), y cinco condiciones de viabilidad (distintas proporciones de células vivas y muertas): 100 % vivas - 70 % vivas/30 % muertas - 50 % vivas/50 % muertas - 30 % vivas/70 % muertas y 100 % muertas. Cada condición con su colorante fue evaluada por duplicado, con un total aproximado de 800 células evaluadas por condición.

Los cultivos fueron obtenidos siguiendo el esquema de propagación previamente descrito. Al finalizar la propagación, las células de levadura se centrifugaron en tubos de centrífuga de polipropileno (PP) de 50 mL a 3000 x g durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, el pellet fue lavado tres veces con agua destilada fría y estéril, y las células se resuspendieron hasta el mismo volumen inicial en agua destilada estéril. La mitad de la suspensión fue separada para realizar un tratamiento térmico (Smart et al., 1999) y obtener así un cultivo de células 100% muertas. Para ello, se incubó en un baño de agua a 70 °C durante 4 h; luego de lo cual se adicionó agua destilada para recuperar el volumen evaporado. Ambas suspensiones fueron mezcladas en distintas proporciones para obtener las condiciones de trabajo y aplicar las distintas tinciones.

Para realizar todos los recuentos a partir de las imágenes capturadas, junto con el Dr. Carlos Bertoli (CPA IPATEC) se desarrolló un macro para ImageJ (Schindelin et al., 2012) con el cual se logró realizar los recuentos automáticos de células totales y viables para *S. eubayanus* y *S. cerevisiae*. Se contrastó el recuento manual con el macro generado (comparación según Bland & Altman, (1986) con pruebas t pareadas), comprobándose que el método digital de conteo es equivalente al método manual, presenta menor dispersión de los datos y disminuye sustancialmente los tiempos de conteo (Bertoli et al., 2018). Se está proyectando transferir este

desarrollo de recuento automático a la aplicación para celulares Microbrew.AR (<https://www.microbrew.com.ar>, disponible para Android e IOS), desarrollada también por el mismo grupo de trabajo (Bertoli et al., 2021).

3.2.4. Selección de un método para evaluar la calidad de la biomasa: vitalidad

Se evaluó la vitalidad de las levaduras en cuatro condiciones de cultivo: cultivo en fase exponencial, cultivo en fase estacionaria, cultivo mantenido en heladera 30 días y cultivo en condiciones de inanición (*starving*). Los cultivos fueron obtenidos en medio mosto extracto de malta (ANEXO N°1), siguiendo el esquema de propagación previamente descrito (Sección 3.2.1). En la última etapa de la propagación se realizó un seguimiento de la densidad óptica (DO) a 620 nm y se separaron muestras en la fase exponencial y entrada la fase estacionaria; de esta última se guardaron muestras en la heladera a 4°C durante 30 días y una muestra fue procesada para la condición de inanición. Para la misma, las células se centrifugaron en tubos de centrífuga de PP de 50 mL a 3000 x g durante 5 min a 4 °C, se descartó el sobrenadante, el pellet fue lavado tres veces con agua destilada fría y estéril, y las células se resuspendieron hasta el mismo volumen inicial en agua destilada estéril; por último se incubaron a 25 °C en un agitador orbital (120 rpm) durante el 72 h (Smart et al., 1999).

Para las cuatro condiciones, la vitalidad fue evaluada por el método de Poder de Acidificación (PA) en paralelo a la aptitud fermentativa en fermentaciones a escala laboratorio. Para ello, una fracción de cada cultivo fue inoculado por duplicado en mosto congreso siguiendo la misma metodología que en la sección 2.2.2; se calcularon los parámetros cinéticos (velocidad de fermentación (μ), fase de retardo (lag) y producción total de CO₂) una vez obtenida la curva (sección 2.2.6). La otra parte del cultivo fue utilizado para evaluar, por duplicado, el Poder de Acidificación de la siguiente manera (Kara et al., 1988; Smart et al., 1999): en tubos de centrífuga de PP de 50 mL se centrifugó el cultivo a 3000 x g durante 5 min a 4 °C, se lavó el pellet tres veces con agua destilada estéril y fría y se resuspendió para lograr una concentración celular de 1×10^9 cel/mL. Por otro lado, en agitador magnético se agitaron continuamente 15 mL de solución fisiológica estéril (pH 6,5) a 150 rpm y 20-25 °C durante 5 min permitiendo el equilibrio de la sonda de pH. Se registró el pH inicial (PA0) antes de agregar 5 mL de la suspensión de levaduras. A continuación, se registró el pH después de 10 min (PA10, indicativo del poder de acidificación espontáneo). Se añadieron inmediatamente 5 mL de solución de glucosa (20 % p/v) y se registró el pH después de 10 min más de incubación (PA20, indicativo

del poder de acidificación inducido por sustrato). El PA se calculó restando el valor de pH inicial (PA0) y final (PA20).

3.2.5. Selección del medio de cultivo para la propagación

Se evaluaron dos medios de cultivo sugeridos para la propagación, mosto congreso con modificaciones y mosto extracto de malta (ANEXO N°1). Para ambos medios se midió el pH inicial, la densidad y la composición de azúcares. Se siguió el esquema estándar de propagación (Sección 3.2.1) midiéndose diariamente en cada etapa la densidad por refractómetro, y el número de células y la viabilidad mediante tinción con violeta de metileno alcalino, microscopio (Olympus CX22LED) y cámara de Neubauer (Smart et al., 1999). Finalizada la propagación se evaluó el número de células final y su viabilidad por recuento, el peso seco, los azúcares consumidos, el pH, y la vitalidad en fermentaciones a escala laboratorio. A partir de los datos obtenidos se seleccionó el medio más adecuado para continuar con los ensayos pertinentes a propagación.

3.2.6. Relevamiento de factores fisicoquímicos relevantes para la producción de biomasa

Se realizó un relevamiento de nueve factores para evaluar su influencia sobre la producción de biomasa y seleccionar aquellos con los efectos principales para su posterior optimización. Cada factor se representó en dos niveles, alto (+) y bajo (-), definidos en base a la literatura relacionada y a experiencia previa (Tabla 3.2). Se aplicó un diseño experimental de Plackett-Burman (Plackett & Burman, 1946) ejecutado en un solo bloque y con el orden de los experimentos completamente aleatorio. Se obtuvo un modelo de regresión basado en los datos experimentales y un gráfico de efectos principales (Daniel Plot o *Half Normal Plot*) (Gutierrez Pulido & de la Vara Salazar, 2008). La significancia estadística se determinó mediante la evaluación del valor F, y la proporción de varianza explicada por el modelo obtenido fue dada por el coeficiente de determinación múltiple, R^2 . El diseño experimental y los análisis fueron realizados en el software R con el paquete FrF2 (Grömping, 2014).

Tabla 3.2. Variables y niveles utilizados en el diseño estadístico para el relevamiento de los componentes del medio que afectan la producción de biomasa.

| Código | Factor | Niveles | | Referencias |
|----------|--|----------------------|----------------------|---|
| | | - | + | |
| A | Tasa de inóculo (cel/mL) | 10 x 10 ⁶ | 70 x 10 ⁶ | (Annemuller et al., 2011; White & Zainasheff, 2010) |
| B | Agitación (rpm) | 120 | 200 | (Cahill et al., 2000; Lei et al., 2012; Novak et al., 2007; Quain, 2006) |
| C | Temperatura (°C) | 20 | 28 | (Annemuller et al., 2011; Boulton & Quain, 2006; Cahill et al., 2000; Lei et al., 2012; |
| D | Peptona ácida de caseína (% p/v) | 0 | 0,3 | (Evans et al., 2011; Schmidt, 2005) |
| E | Extracto de levadura (% p/v) | 0 | 0,25 | (Li et al., 2009) |
| F | K ₂ PO ₄ (% p/v) | 0 | 0,3 | (Li et al., 2009; Origone, 2018) |
| G | Zinc* (ppm) | 0 | 0,3 | (Annemuller et al., 2011; Kurz et al., 2002; Lei et al., 2012) |
| H | Magnesio* (ppm) | 0 | 100 | (Annemuller et al., 2011; Saltukoglu & Slaughter, 1983) |
| I | Hierro* (ppm) | 0 | 0,2 | (Annemuller et al., 2011; Velu et al., 2016) |

*Adicionados como soluciones de las correspondientes sales de sulfato heptahidratadas (ZnSO₄, MgSO₄ y FeSO₄ x 7 H₂O).

Los experimentos fueron llevados a cabo por duplicado en Erlenmeyer de 250 mL conteniendo 50 mL de extracto de malta (Calsa) disuelto en agua destilada hasta 8 °Bx y esterilizado en autoclave (121 °C-15 min). Los mismos fueron inoculados con un pre-cultivo en tubo de *S. eubayanus* (tubos con medio extracto de malta 6 °Bx, primera etapa de propagación). Se realizó el seguimiento de las curvas de crecimiento para cada tratamiento midiendo la DO a 620 nm en microplaca (lector de placas Synergy, BioTek), tomando cuatro muestras por día durante 72 h. Al finalizar, se midió la cantidad y viabilidad de las células mediante tinción con violeta de metileno alcalino, microscopio (Olympus CX22LED) y cámara de Neubauer (Smart et al., 1999). Asimismo, se evaluó la biomasa final por peso seco. Para ello, 2 mL del cultivo se

colocaron en tubos de centrífuga de PP de 15 mL y se centrifugaron a 3000 x g durante 5 min, se descartó el sobrenadante y el pellet fue lavado tres veces con agua destilada cuidando que no haya pérdida de biomasa. Por último, el pellet se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se transfirió cuantitativamente a tubos Khan (previamente secados y tarados), resuspendiendo en 1 mL extra de agua destilada. Los tubos fueron colocados en estufa a 80 °C hasta peso constante y la biomasa expresada en gramos por litro.

3.2.7. Optimización de los factores relevantes para la producción de biomasa

Se utilizó la Metodología de Superficie Respuesta (MSR) para optimizar las variables seleccionadas en la sección anterior, basada en un Diseño Central Compuesto (DCC) en un bloque que incluyó cuatro réplicas del punto central y puntos estrella con un $\alpha = 1.414$. Cada experimento se realizó por duplicado y los valores promedio de producción de biomasa se tomaron como respuesta. Los modelos se desarrollaron buscando un alto R^2 y una falta de ajuste (*lack of fit*) no significativa ($p > 0,05$). La construcción de los modelos matemáticos, gráficos y el análisis de datos se realizaron utilizando el paquete rsm del software R (Lenth, 2009). La ejecución de los tratamientos y el procesamiento y análisis de las muestras fue el mismo que en la sección 3.2.6. Posteriormente, se realizó la validación de los resultados obtenidos con las condiciones optimizadas. Para ello, se llevó a cabo un tratamiento en las condiciones originales junto con un tratamiento en las condiciones optimizadas (con 4 réplicas de cada uno), comparándose el rendimiento promedio de biomasa obtenido en ambos casos. Por su parte, se validó el modelo predictivo comparando la biomasa predicha por el modelo, con la biomasa obtenida experimentalmente.

3.2.8. Escalado de los cultivos iniciadores

Se utilizó un propagador cilindro-cónico de acero inoxidable de 25 L enchaquetado, con resistencia interna para control de temperatura y agitador de paletas interno con controlador de velocidad (Figura 3.3). El cultivo fue aireado continuamente a un flujo de 0,75 L/min con aire comprimido estéril (filtrado con filtro de 0,22 μm), a través de un anillo interno de acero inoxidable perforado (aireador o *sparger*, Figura 3.3), la agitación de las paletas fue regulada a 120 rpm y la temperatura a 20 °C. El propagador, con todas sus piezas, fue limpiado con detergente alcalino (Oxidial 2 % v/v), enjuagado y esterilizado con vapor durante 1 h. Se utilizó el medio extracto de malta optimizado, a una densidad de 12 °Bx y esterilizado en autoclave (121 °C-20 min) (Priest et al., 1996), que fue inoculado con un pre-cultivo de *S. eubayanus*

realizado siguiendo el esquema de propagación. Se tomaron muestras diarias del cultivo para realizar el recuento y viabilidad de las células, así como el seguimiento del consumo de azúcares por refractómetro. Cuando el consumo de azúcares fue total (valor constante en dos medidas consecutivas), se evaluó la cantidad y calidad de biomasa generada y se calculó el rendimiento. La biomasa producida se cosechó en un cosechador de acero inoxidable con acoples clamp y válvula de liberación de dióxido de carbono (Figura 3.3), y fue utilizada para su aplicación y evaluación en cervecerías locales.



Figura 3.3. A la izquierda, propagador utilizado para el escalado y obtención de biomasa de *S. eubayanus*. En el medio, piezas internas del propagador. A la derecha, cosechador para la conservación y el traslado de la biomasa.

3.3. Resultados

3.3.1. Medio de cultivo sólido para el crecimiento y conservación de *S. eubayanus*

El crecimiento diferencial de la cepa CRUB 1568^T en los distintos medios de cultivo sólidos evaluados se puede observar en la Figura 3.4. *S. eubayanus* fue capaz de crecer en los seis medios ensayados. Sin embargo, en los medios YM, YPD y MYP el crecimiento de la biomasa se observó a las 48 h, mientras que para los medios A. malta, A. mosto y PDA el crecimiento fue más lento y tuvo lugar entre 72 y 96 h. Los medios YM y Agar Malta presentaron las colonias de menor calibre (Tabla 3.3). En este punto, se obtuvo un mayor tamaño de colonias en los medios YPD y MYP, seleccionándose el primero como medio sólido para el crecimiento en placa y mantenimiento de *S. eubayanus*.

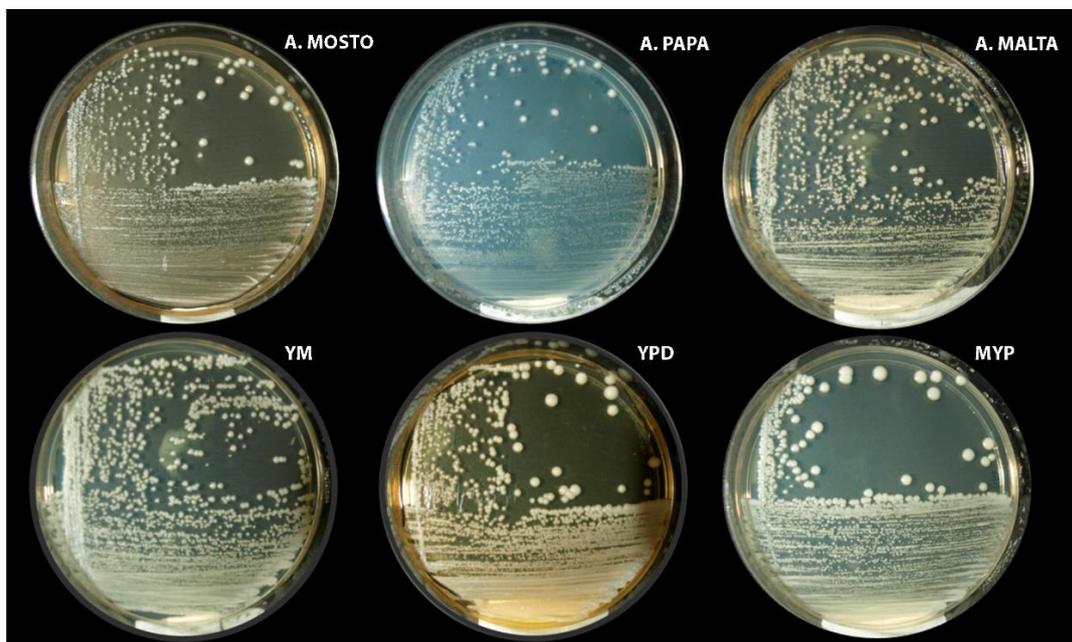


Figura 3.4. Crecimiento y obtención de colonias aisladas de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en distintos medios de cultivo sólidos.

Tabla 3.3. Datos del crecimiento de colonias de *S. eubayanus* en los medios de cultivo ensayados.

| Medio de cultivo | Calibre mayor (mm) | Calibre promedio (mm) |
|------------------|--------------------------|--------------------------|
| A. Mosto | 3,48 ± 0,03 ^c | 2,85 ± 0,03 ^d |
| A. Papa | 3,10 ± 0,05 ^d | 3,10 ± 0,02 ^c |
| A. Malta | 2,50 ± 0,03 ^e | 2,51 ± 0,01 ^e |
| YM | 2,55 ± 0,01 ^e | 2,53 ± 0,01 ^e |
| YPD | 4,64 ± 0,02 ^a | 3,44 ± 0,03 ^b |
| MYP | 4,40 ± 0,03 ^b | 3,61 ± 0,02 ^a |

Se realizó un ANOVA de una vía seguido del test de Tukey para evaluar estadísticamente las diferencias significativas. Letras diferentes por columna representan diferencias entre los medios de cultivo evaluados ($p < 0,05$).

3.3.2. Método para evaluar la calidad de la biomasa: viabilidad

En la Figura 3.5 se puede observar, a modo de ejemplo, una muestra de *S. eubayanus* teñida con los cuatro colorantes ensayados; a partir de estas imágenes se realizó el recuento de células totales y muertas (teñidas) para los distintos tratamientos. El colorante AMA, si bien presentó células que se tiñeron completamente de azul, se observaron otras con una coloración heterogénea y ambigua que dificultó el discernimiento entre células vivas y muertas, e impidió

una evaluación adecuada de la viabilidad. Para los otros tres colorantes se lograron distinguir fácilmente las células muertas (teñidas) de las vivas (blancas).

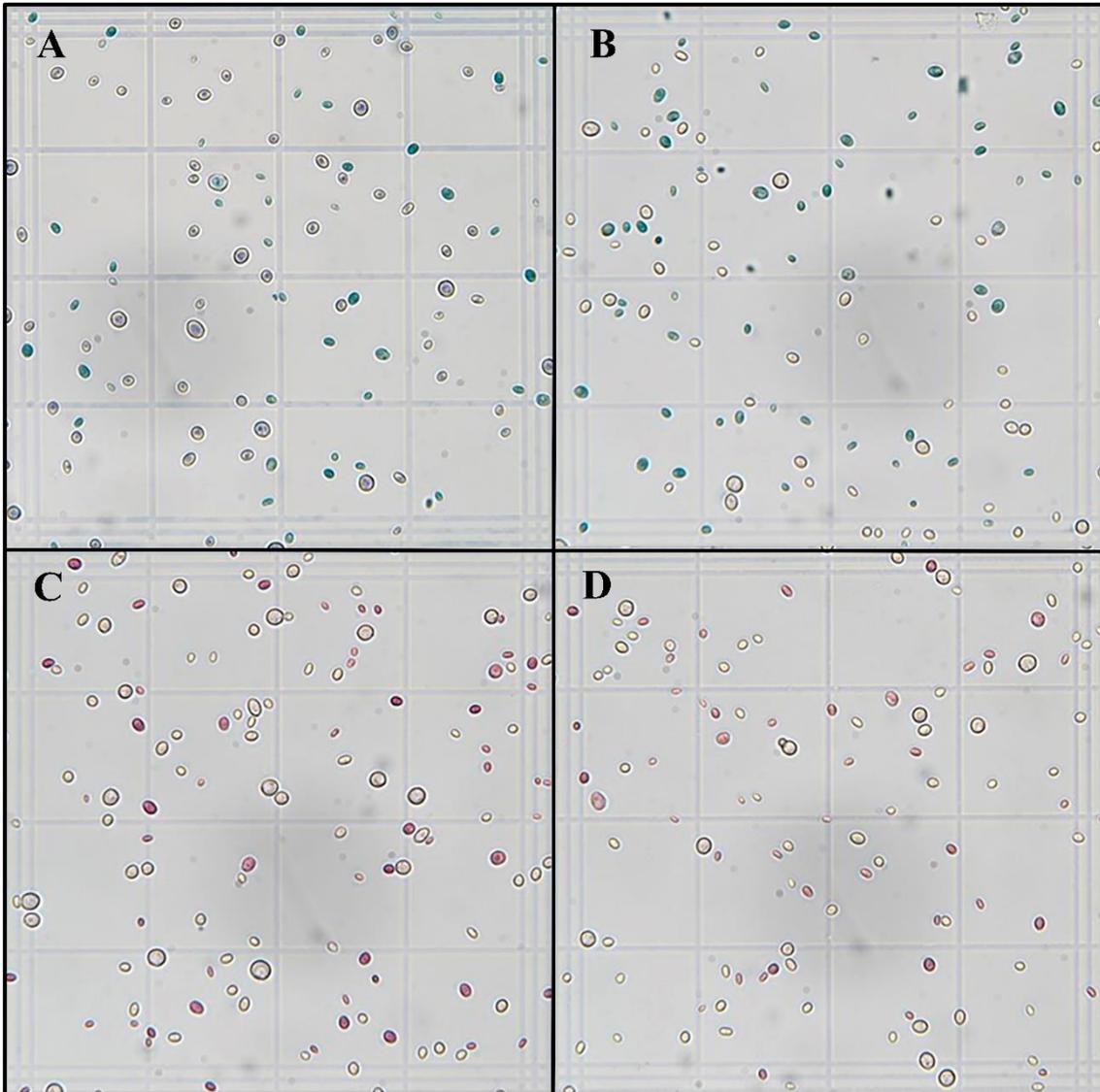


Figura 3.5. Tinción vital para *S. eubayanus* CRUB 1568^T en la condición 50 % vivas / 50 % muertas con los colorantes A: Azul de Metileno Alcalino (AMA), B: Azul de Metileno Citrato (AMC), C: Violeta de Metileno Alcalino (VMA) y D: Violeta de Metileno Citrato (VMC).

Al inicio del ensayo fue analizado también un quinto colorante, el azul de tripán, dado que Echeverrigaray et al. (2020) y Szabo (2013) encontraron buenas correlaciones entre este colorante y la viabilidad de *S. cerevisiae*. Sin embargo, debido a que en este trabajo una evaluación preliminar del azul de tripán con *S. eubayanus* dio negativa, y que no se encontraron otros reportes de la aplicación de este colorante para evaluar la viabilidad de levaduras utilizadas en la industria cervecera, se decidió discontinuar su evaluación.

Con el fin de seleccionar el colorante vital apropiado para evaluar la viabilidad de la biomasa obtenida para *S. eubayanus*, se obtuvo la proporción de células muertas respecto del total (M/T) para cada colorante en cada condición. Luego se la relativizó respecto a la proporción esperada (sección 3.2.2) y se obtuvo así el porcentaje de desviación en cada caso (Tabla 3.4):

$$\text{Desviación (\%)} = [(M/T)^{\text{muestra}} - (M/T)^{\text{esperada}}] * 100 / (M/T)^{\text{esperada}}$$

Tabla 3.4. Desviación (%) de la proporción de células muertas obtenidas para cada colorante evaluado respecto de la esperada, para un cultivo de *S. eubayanus* CRUB 1568^T ensayado en distintas condiciones.

| Tratamiento | Proporción esperada (M/T) | VMA | VMC | AMA | AMC |
|---------------------|---------------------------|------------------|-------------------|-------------------|-------------------|
| 0M-100V | 0 | 0 | 0,21 | 14,71 | 0,34 |
| 30M-70V | 0,3 | 9,53 | 16,72 | 24,14 | 28,89 |
| 50M-50V | 0,5 | 13,56 | 21,36 | 24,78 | 23,62 |
| 70M-30V | 0,7 | 7,88 | 9,95 | 18,20 | 17,58 |
| 100M-0V | 1 | 0,27 | 3,62 | 10,46 | 16,31 |
| Desviación promedio | | 6,2 ^c | 10,4 ^b | 18,5 ^a | 17,3 ^a |

*M: células muertas. V: células vivas. T: células totales (V+M). VMA: Violeta de Metileno Alcalino. VMC: Violeta de Metileno Citrato. AMA: Azul de Metileno Alcalino. AMC: Azul de Metileno Citrato.

En todos los tratamientos, ambas variantes de azul de metileno mostraron la mayor desviación respecto de la proporción de células muertas esperada. Por su parte, el VMA demostró ser el colorante más preciso en cuanto a la capacidad de arrojar resultados similares a los esperados en las distintas condiciones (Tabla 3.4).

3.3.3. Método para evaluar la calidad de la biomasa: vitalidad

Dentro de las condiciones fisiológicas evaluadas para la cepa CRUB 1568^T, no se encontraron diferencias en la vitalidad entre el inóculo en fase exponencial y estacionaria con ninguno de los métodos utilizados (Tabla 3.5), sólo se observó un 15 % de retardo del inicio de la fermentación para el cultivo en fase estacionaria. Ambas condiciones presentaron la menor fase lag y el mayor Poder de Acidificación (PA). En la condición de inanición, se observó una mayor fase lag y un PA 44 % menor, sin embargo, evidenció la mejor aptitud fermentativa (mayor μ y mayor liberación de CO₂) (Tabla 3.5; Figura 3.6). Asimismo, el inóculo conservado en heladera 30 días mostró una buena velocidad de fermentación, una buena liberación de CO₂, una fase lag larga (56 % mayor) y un PA 13 % menor (Tabla 3.5). En todos los casos la

viabilidad de los inóculos (medida con violeta de metileno alcalino) se mantuvo en valores altos de 98-100 %.

Tabla 3.5. Vitalidad, evaluada como aptitud fermentativa (μ , lag y producción total de CO₂) en fermentaciones a escala laboratorio en mosto congreso y Poder de Acidificación (PA), para un cultivo de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en cuatro condiciones fisiológicas.

| | Exponencial | Estacionaria | Inanición | Heladera 30 días |
|--------------------------|------------------------------|------------------------------|--------------------------|------------------------------|
| μ (h ⁻¹) | 0,026 ± 0,001 ^{b,d} | 0,029 ± 0,001 ^{b,c} | 0,034 ± 0 ^{a,c} | 0,030 ± 0,002 ^{b,c} |
| Lag (h) | 27,2 ± 1,4 ^c | 32,5 ± 0,29 ^b | 41,6 ± 1,0 ^a | 42,5 ± 1,3 ^a |
| CO ₂ (g) | 3,85 ± 0,01 ^c | 3,81 ± 0,04 ^c | 4,32 ± 0,14 ^a | 4,12 ± 0,14 ^b |
| PA* | 2,83 ± 0,11 ^a | 2,82 ± 0,01 ^a | 1,58 ± 0,04 ^c | 2,45 ± 0,08 ^b |

μ (h⁻¹): velocidad de fermentación. Lag (h): fase de retardo de la fermentación. CO₂ (g): liberación total de CO₂. PA: Índice de Poder de Acidificación. Los valores se expresan como la media ± desviación estándar. En filas, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas mediante un ANOVA de una vía seguido del test de Tukey (p < 0,05). * Valores de PA ≥ 2,4 indican un muy buen estado fisiológico; valores entre 2,0 - 2,4 se consideran aceptables; valores entre 1,8 - 2,0 indican una actividad metabólica reducida; valores de PA < 1,8 indican un estado fisiológico pobre.

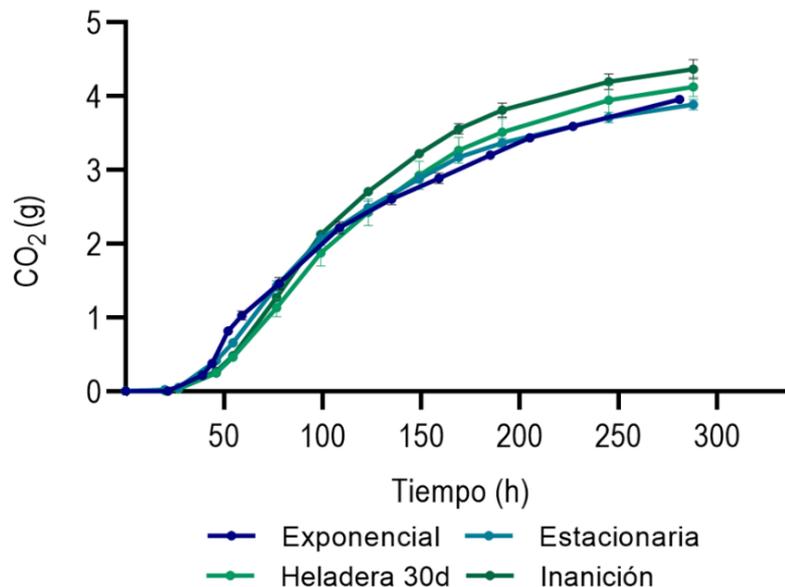


Figura 3.6. Aptitud fermentativa de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en cuatro condiciones fisiológicas distintas.

3.3.4. Medio de cultivo para la propagación de *S. eubayanus*

En el mosto extracto de malta y en el mosto congreso se identificaron los mismos azúcares fermentables (glucosa, maltosa y maltotriosa), sin embargo, la composición de ambos fue

diferente (Tabla 3.6). En el mosto congreso, la maltosa resultó ser el azúcar principal (62,2 % del total), mientras que en el mosto extracto de malta se observó un mayor contenido de glucosa (49,5 %), seguido por maltosa (39,2 %). El mosto congreso presentó una mayor concentración de azúcares totales, relacionado con una mayor densidad inicial medida. El pH inicial resultó menor para el medio extracto de malta (Tabla 3.6).

Tabla 3.6. Composición de azúcares del mosto congreso y del mosto extracto de malta de 12 °Bx medidos por HPLC, y pH de los medios.

| Azúcares (g/L) | Mosto congreso | Mosto extracto |
|------------------|---------------------------|--------------------------|
| Glucosa | 2,19 ± 0,06 ^a | 4,84 ± 0,04 ^b |
| Maltosa | 6,86 ± 0,11 ^a | 3,80 ± 0,07 ^b |
| Maltotriosa | 2,00 ± 0,04 ^a | 1,13 ± 0,09 ^b |
| Azúcares totales | 11,05 ± 0,21 ^a | 9,77 ± 0,20 ^b |
| ° Bx | 12,6 ^a ± 0,06 | 12,2 ± 0,12 ^b |
| pH | 5,41 ± 0,12 ^a | 4,85 ± 0,05 ^b |

Las cinéticas de crecimiento celular, consumo de azúcares y viabilidad a lo largo del tiempo en cada etapa de propagación (ver esquema de propagación en la Sección 3.2.1, Figura 3.2) para los medios evaluados se encuentran graficadas en la Figura 3.7, pudiendo observarse un comportamiento similar en ambos medios para *S. eubayanus* CRUB 1568^T. Vale aclarar que el recuento y la viabilidad en la etapa I a tiempo cero no se calculó debido a que, al partir de tres colonias de placa a tubo, el número de células era muy bajo (< 20 células por cuadrante de recuento de la cámara de Neubauer). En ambos casos, los datos obtenidos por HPLC mostraron que el consumo de glucosa y maltosa de los medios fue total, no se observó consumo de maltotriosa, y se cuantificó una producción de etanol de 2,6 ± 0,2 % v/v.

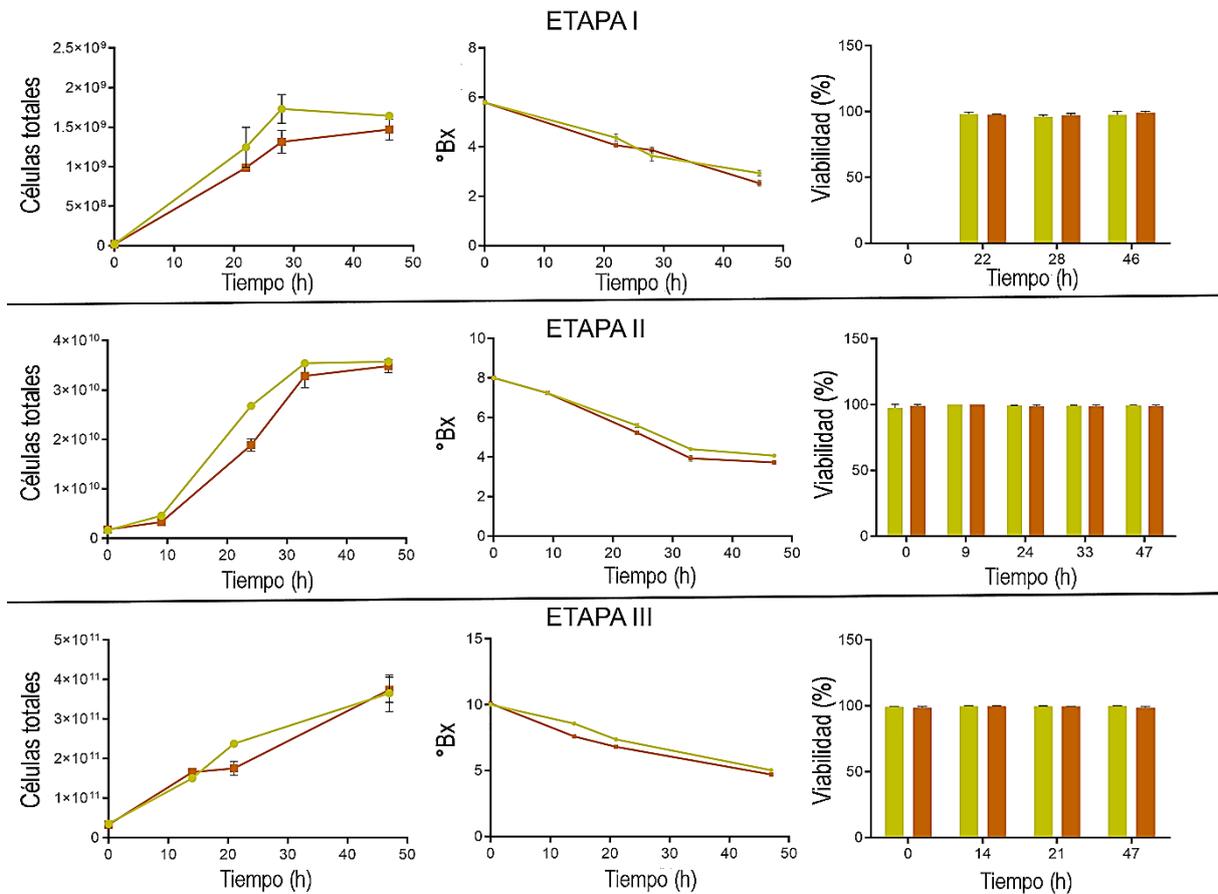


Figura 3.7. Seguimiento del crecimiento celular, consumo de azúcares (°Bx) y viabilidad (%) de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en las distintas etapas del esquema de propagación, para los dos medios de cultivo ensayados. El color amarillo corresponde al mosto congreso y el naranja al mosto extracto de malta.

Cuando se evaluaron los parámetros de la biomasa final obtenida luego de la propagación, se observó que tanto la cantidad (células totales y peso seco), como la calidad (viabilidad y vitalidad, expresada como velocidad de fermentación) de la misma tampoco variaron al utilizar mosto congreso en relación a mosto extracto de malta (Tabla 3.7).

De esta manera, se decidió trabajar con el medio extracto de malta para los ensayos posteriores, tomando como criterio de decisión el costo de formulación de ambos medios (medio extracto de malta 18,7 % más económico, a la fecha de los análisis).

Tabla 3.7. Condiciones finales de la biomasa propagada en mosto congreso vs mosto extracto de malta para *S. eubayanus* CRUB 1568^T.

| | Mosto congreso | Mosto extracto |
|---------------------------------------|---|---|
| Biomasa (células totales) | $3,65 \times 10^{11} \pm 0,27 \times 10^{11} \text{ a}$ | $3,74 \times 10^{11} \pm 0,19 \times 10^{11} \text{ a}$ |
| Biomasa (g/L) | $9,14 \pm 1,16^{\text{a}}$ | $9,35 \pm 0,80^{\text{a}}$ |
| Viabilidad (%) | $99,9 \pm 0,1^{\text{a}}$ | $98,9 \pm 0,6^{\text{a}}$ |
| μ (h ⁻¹) | $0,023 \pm 0,001^{\text{a}}$ | $0,019 \pm 0,003^{\text{a}}$ |
| Rendimiento (células/°P) [‡] | $74,1 \pm 10,5^{\text{a}}$ | $72,1 \pm 6,4^{\text{a}}$ |

Los valores se expresan como la media \pm desviación estándar. En cada fila, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba t de Student ($p < 0,05$). [‡]Según White & Zainasheff (2010).

3.3.5. Factores fisicoquímicos relevantes para la producción de biomasa

A partir de un diseño de Plackett-Burman, se realizaron doce corridas para analizar el efecto de nueve variables sobre la producción de biomasa de levadura, los resultados se muestran en la Tabla 3.8. Se incluyeron dos variables ficticias (*dummy*), debido a que son utilizadas para estimar el error cuando hay menos factores (nueve) que el máximo a estudiar (doce tratamientos). Se ajustó un modelo de primer orden a los resultados obtenidos para los doce experimentos:

Y (g/L) = $10,40 + 0,59X_1 + 0,75X_2 + 0,29X_3 + 1,77X_4 + 1,49X_5 + 0,20X_6 + 0,16X_7 + 0,18X_8 + 0,38X_9$
 El coeficiente R^2 del modelo lineal fue 0,89, lo que indica que el 89% de la variabilidad en la respuesta es explicada por el modelo.

Asimismo, se realizó un análisis de varianza del modelo para identificar el efecto de los factores sobre la biomasa de levadura (Tabla 3.9) y un gráfico de Daniel, utilizado tradicionalmente para identificar efectos activos en experimentos de relevamiento (*screening*) (Figura 3.8). En el gráfico de Daniel puede observarse que la peptona ácida de caseína (X_4) y el extracto de levadura (X_5) resultaron ser los factores relevantes debido a que aparecen alejados de la línea de normalidad; los efectos no significativos tienden a formar una línea recta (distribución normal con media igual a cero y varianza constante). Los estimadores (coeficientes) de ambos factores, presentados en la ecuación del modelo, poseen signo positivo por lo que la influencia que ejercen sobre la producción de biomasa resulta también positiva.

CAPÍTULO 3. OPTIMIZACIÓN DE LA PROPAGACIÓN

Tabla 3.8. Diseño de Plackett-Burman para la detección de los factores fisicoquímicos relevantes para la producción de biomasa de *S. eubayanus*, y los resultados obtenidos para cada tratamiento.

| Tratamiento | X1 | X2 | X3 | X4 | X5 | X6 | X7 | X8 | X9 | X10 | X11 | Biomasa (g/L) |
|-------------|----|-----|----|-----|------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|---------------|
| 1 | 10 | 200 | 20 | 0,3 | 0,25 | 0 | 0,3 | 100 | 0,2 | -1 | -1 | 13,05 ± 0,07 |
| 2 | 70 | 200 | 20 | 0,3 | 0,25 | 0,3 | 0 | 0 | 0 | 1 | -1 | 15,70 ± 0,42 |
| 3 | 10 | 120 | 20 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 | -1 | -1 | 5,10 ± 0,01 |
| 4 | 70 | 120 | 28 | 0,3 | 0 | 0,3 | 0,3 | 100 | 0 | -1 | -1 | 11,50 ± 0,07 |
| 5 | 70 | 120 | 20 | 0 | 0,25 | 0 | 0,3 | 100 | 0 | 1 | 1 | 10,60 ± 0,21 |
| 6 | 70 | 120 | 28 | 0,3 | 0,25 | 0 | 0 | 0 | 0,2 | -1 | 1 | 12,15 ± 0,39 |
| 7 | 10 | 120 | 20 | 0,3 | 0 | 0,3 | 0,3 | 0 | 0,2 | 1 | 1 | 9,05 ± 0,07 |
| 8 | 70 | 200 | 20 | 0 | 0 | 0,3 | 0 | 100 | 0,2 | -1 | 1 | 7,60 ± 0,04 |
| 9 | 10 | 120 | 28 | 0 | 0,25 | 0,3 | 0 | 100 | 0,2 | 1 | -1 | 9,35 ± 0,04 |
| 10 | 70 | 200 | 28 | 0 | 0 | 0 | 0,3 | 0 | 0,2 | 1 | -1 | 8,35 ± 0,42 |
| 11 | 10 | 200 | 28 | 0,3 | 0 | 0 | 0 | 100 | 0 | 1 | 1 | 11,55 ± 0,03 |
| 12 | 10 | 200 | 28 | 0 | 0,25 | 0,3 | 0,3 | 0 | 0 | -1 | 1 | 10,60 ± 0,07 |

*X1: tasa de inóculo (cel/mL); X2: agitación (rpm); X3: temperatura (°C); X4: peptona ácida de caseína (% p/v); X5: extracto de levadura (% p/v); X6: zinc (ppm); X7: K₂PO₄ (% p/v); X8: magnesio (ppm); X9: hierro (ppm); X10, X11: variables *dummy*.

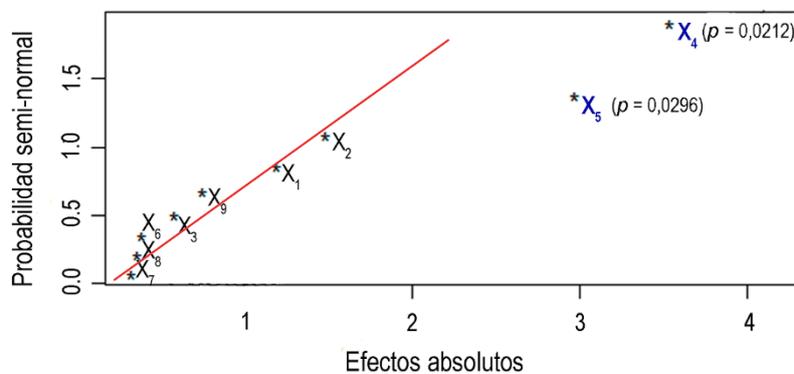


Figura 3.8. Gráfico de Daniel de las variables que afectan la producción de biomasa en *S. eubayanus*. La línea roja representa la línea de normalidad. Las variables significativas se marcan en azul, siendo X₄ = peptona ácida de caseína y X₅ = extracto de levadura.

Por su parte, el análisis estadístico también mostró una influencia significativa del extracto de levadura y la peptona ácida de caseína en el crecimiento de *S. eubayanus* ($p < 0,05$, Tabla 3.9) de modo que fueron seleccionados para su posterior optimización en la producción de biomasa.

Tabla 3.9. Análisis estadístico del modelo lineal aplicado al relevamiento de factores para la producción de biomasa en *S. eubayanus*.

| | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Error cuadrático medio | F-valor | p-valor |
|--------------------------------|-------------------|--------------------|------------------------|---------|----------------|
| Tasa inóculo | 4,26 | 1 | 4,26 | 5,176 | 0,1507 |
| Agitación | 6,68 | 1 | 6,68 | 8,111 | 0,1044 |
| Temperatura | 1,02 | 1 | 1,02 | 1,240 | 0,3813 |
| Peptona caseína | 37,63 | 1 | 37,63 | 45,722 | 0,0212* |
| Extracto levadura | 26,55 | 1 | 26,55 | 32,261 | 0,0296* |
| Zinc | 0,46 | 1 | 0,46 | 0,559 | 0,5326 |
| K ₂ PO ₄ | 0,32 | 1 | 0,32 | 0,385 | 0,5982 |
| Magnesio | 0,40 | 1 | 0,40 | 0,490 | 0,5564 |
| Hierro | 1,69 | 1 | 1,69 | 2,050 | 0,2885 |

*Estadísticamente significativos con un 95 % de nivel de confianza ($\alpha = 0,05$).

3.3.6. Metodología de Superficie Respuesta: optimización del medio de cultivo para propagación

Para optimizar las dos variables que influyeron significativamente en el crecimiento *S. eubayanus* (peptona ácida de caseína y extracto de levadura), se realizó un Diseño Central Compuesto codificando los niveles de ambos factores (Tabla 3.10). Por su parte, en la Tabla 3.11 se encuentran detallados los tratamientos llevados a cabo de acuerdo al diseño experimental y los promedios de los valores de biomasa (variable respuesta) obtenidos, junto a sus respectivos desvíos estándar.

Tabla 3.10. Niveles de los factores del Diseño Central Compuesto.

| Factores | Niveles codificados de los factores | | | | |
|--------------------------|-------------------------------------|------|------|------|--------|
| | -1,414 | -1 | 0 | +1 | +1,414 |
| Extracto de levadura | 0,0086 | 0,05 | 0,15 | 0,25 | 0,291 |
| Peptona ácida de caseína | 0,0086 | 0,05 | 0,15 | 0,25 | 0,291 |

El valor $\alpha = 1,414$ corresponde a los puntos estrella, el valor 1 indica los puntos del diseño factorial, el valor 0 indica el punto central.

El ajuste del modelo en su conjunto resultó significativo (F-valor: 30,49 y p-valor: 0,0003412), presentando una alta bondad de ajuste (R^2 ajustado = 0,9306, mayor a 70%). Tanto el R^2 ajustado (0,9306), como el R^2 (0,9621) están cerca de 1,0, lo que indica que la ecuación es confiable y aumenta la fuerza de la relación entre el modelo y la respuesta. Por su parte, la falta de ajuste (*lack of fit*) resultó no significativa (p-valor = 0,3921), por lo que en conjunto la aproximación de la curvatura en la respuesta por parte del modelo resulta adecuada. Los estimadores estadísticamente significativos ($p < 0,05$) fueron utilizados para obtener la ecuación del modelo (ANEXO N°2):

Biomasa (g/L) = $10,826274 + 0,37482 X_1 + 0,51574 X_2 - 0,34375 X_1X_2 - 0,149422 X_1^2$
 Donde X_1 es la concentración de extracto de levadura (% p/v) y X_2 es la concentración de peptona de caseína (% p/v).

Tabla 3.11. Diseño experimental del (DCC-MSR) para los parámetros a optimizar, la biomasa obtenida para cada tratamiento y la predicha según el modelo.

| Tratamiento | Extracto de levadura (% p/v) | Peptona de caseína (% p/v) | Biomasa (g/L) | Biomasa predicha (g/L) |
|-------------|------------------------------|----------------------------|---------------|------------------------|
| 1 | 0,15 | 0,291 | 11,50 ± 0,39 | 11,42 ± 0,3 |
| 2* | 0,15 | 0,15 | 11,03 ± 0,11 | 10,83 ± 0,2 |
| 3* | 0,15 | 0,15 | 10,83 ± 0,11 | 10,83 ± 0,2 |
| 4 | 0,25 | 0,25 | 11,15 ± 0,28 | 11,16 ± 0,3 |
| 5* | 0,15 | 0,15 | 10,70 ± 0,14 | 10,83 ± 0,2 |
| 6 | 0,2914 | 0,15 | 11,04 ± 0,39 | 11,06 ± 0,3 |
| 7 | 0,15 | 0,0086 | 10,05 ± 0,28 | 9,97 ± 0,3 |
| 8 | 0,05 | 0,25 | 10,95 ± 0,29 | 11,10 ± 0,2 |
| 9 | 0,25 | 0,05 | 10,80 ± 0,07 | 10,81 ± 0,3 |
| 10 | 0,0086 | 0,15 | 10,18 ± 0,03 | 10,00 ± 0,3 |
| 11 | 0,05 | 0,05 | 9,23 ± 0,32 | 9,38 ± 0,3 |
| 12* | 0,15 | 0,15 | 10,75 ± 0,07 | 10,83 ± 0,2 |

*Réplicas de los puntos centrales del Diseño Central Compuesto (DCC-MSR).

La curva de superficie de respuesta se muestra en la Figura 3.9, donde puede verse la interacción de las variables para determinar el nivel óptimo de cada una de ellas con el fin de obtener una máxima respuesta. Las coordenadas del punto estacionario obtenidas según el modelo indican que la combinación extracto de levadura y peptona de caseína que maximizan la producción de biomasa son X1 (extracto) = 0,31 % p/v y X2 (peptona) = 0,12 % p/v. El análisis proporciona también los autovalores de la matriz ($\lambda_i = \text{eigenvalues}$), que en este caso presentan signos positivo y negativo, por lo que la superficie se caracteriza como silla de montar (Cámara et al., 2016). Por su parte, fue posible comparar todos los valores reales de rendimiento obtenidos en el experimento con los predichos por el modelo, junto con el intervalo de confianza (Figura 3.10, Tabla 3.11), observándose que los residuos o diferencia entre los valores reales y predichos es pequeña.

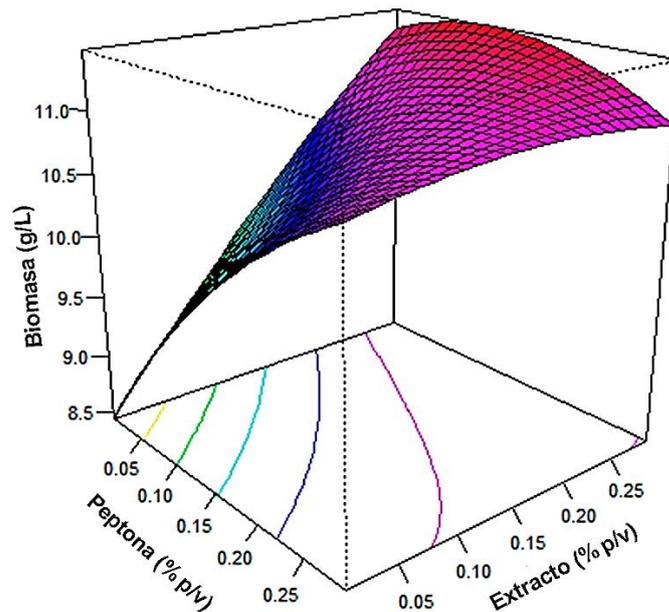


Figura 3.9. Curva de superficie de respuesta para la producción de biomasa de *S. eubayanus* que muestra la interacción entre el extracto de levadura y la peptona de caseína.

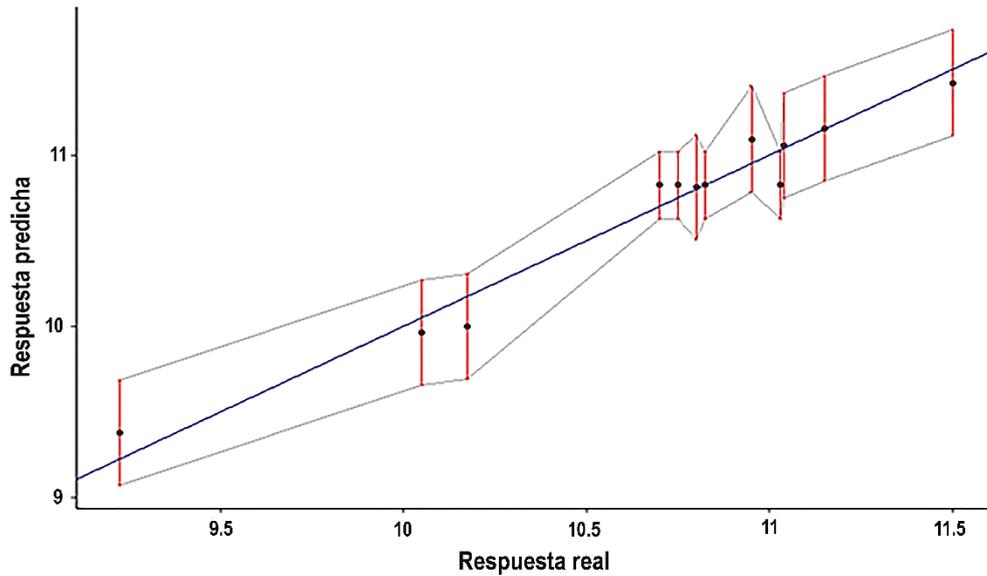


Figura 3.10. Valores de biomasa obtenidos en el experimento (Respuesta real) en comparación con los predichos por el modelo. En gris se marca el intervalo de confianza y en rojo las barras de error

En el ensayo de validación utilizando los valores óptimos de extracto de levadura y peptona ácida de caseína sugeridos por el software, se obtuvo una biomasa final de 11,58 g/L ($\pm 0,23$) (Tabla 3.12); que resultó ser 5 % del valor predicho por el modelo cuadrático (10,98 g/L). Por su parte, al comparar el medio original (control) con el medio optimizado, se obtuvieron valores de biomasa final similares (Tabla 3.12).

Tabla 3.12. Biomasa obtenida para el medio de propagación original (control) y optimizado en *S. eubayanus*.

| | Control | Optimizado |
|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Extracto de levadura (% p/v) | 0,25 | 0,31 |
| Peptona de caseína (% p/v) | 0,3 | 0,12 |
| Biomasa (g/L) | 11,70 \pm 0,13 ^a | 11,58 \pm 0,23 ^a |

Los valores de biomasa se expresan como la media \pm desviación estándar (n = 4). En la fila, letras diferentes indican diferencias estadísticamente significativas mediante la prueba t de Student (p < 0,05).

3.3.7. Escalado

La curva de crecimiento de *S. eubayanus* propagada a escala semi piloto se encuentra graficada en la Figura 3.11. El crecimiento inicialmente fue rápido, sin observarse una fase de latencia (lag) definida. La fase exponencial ($\mu = 0,05 \text{ h}^{-1}$) tuvo una duración de 20 h, a partir de la cual el crecimiento comenzó a reducirse y el cultivo entró en la fase estacionaria. Por su parte, el consumo de azúcares siguió un comportamiento similar (acompañando el crecimiento celular),

observándose la caída de la densidad durante las primeras 20 h, con una disminución paulatina entrando a la fase estacionaria de crecimiento.

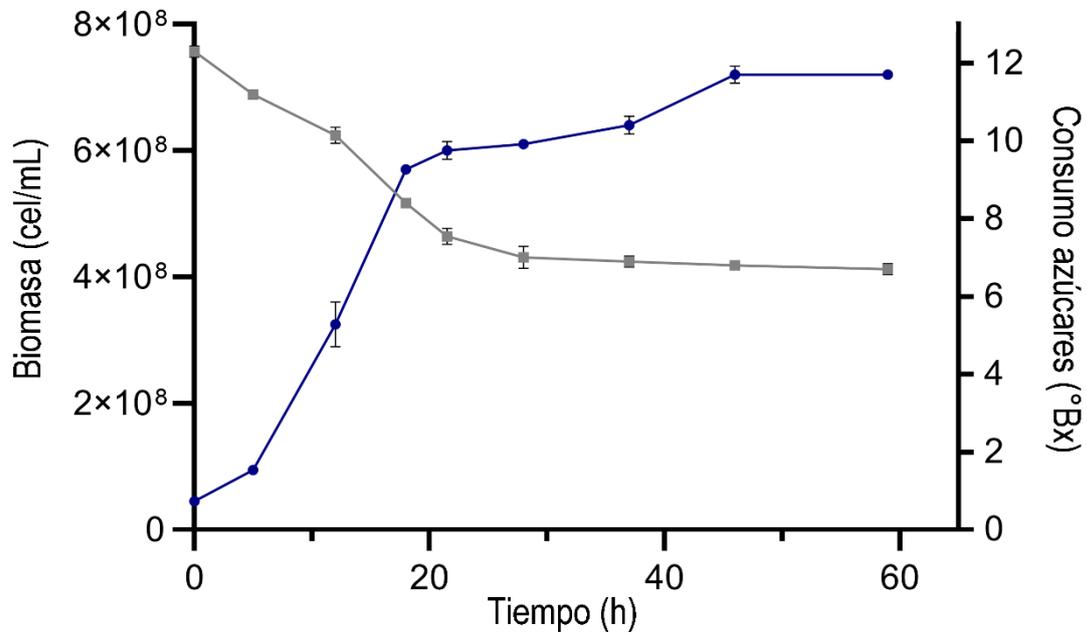


Figura 3.11. Seguimiento del crecimiento de biomasa (azul) y del consumo de azúcares (gris) a lo largo de la propagación de *S. eubayanus* a escala semi piloto de 20 L en propagador de acero inoxidable.

Una vez en fase estacionaria (dos medidas estables consecutivas), la biomasa fue cosechada. Las condiciones de propagación establecidas (Sección 3.2.8) dieron como resultado la obtención, en 48 h, de una biomasa final con una densidad celular de $7,20 \times 10^8 (\pm 0,06 \times 10^8)$ cel/mL y 99,7 % ($\pm 0,1$) de viabilidad, que permitió la inoculación directa de fermentadores de hasta 700 L en un mosto de densidad estándar de 12,4 °P. Para la inoculación de fermentadores de mayor volumen se estableció una estrategia de pie de cuba, que será detallada en el Capítulo 5.



Figura 3.12. Toma de muestra del propagador cilindro-cónico para análisis de la biomasa.

3.4. Discusión

El manejo de levaduras en el marco del proceso de producción de cerveza implica distintos procedimientos: conservación y repique de las cepas de levadura en medios sólidos; propagación en condiciones aeróbicas en medios líquidos a partir de la cepa repicada (involucrando una propagación inicial a escala laboratorio y el escalado en fábrica); inoculación de la levadura en el mosto en fábrica y seguimiento de su comportamiento fermentativo; y, opcionalmente, cosecha y almacenamiento para su reutilización (Boulton & Quain, 2006; Hill, 2015). La correcta ejecución de la primera etapa resulta vital debido a la necesidad de asegurar la identidad de la cepa, su pureza (libre de contaminaciones) y calidad. En este punto, el crecimiento de *S. eubayanus* en distintos medios de cultivo sólidos fue evaluado, buscando seleccionar el adecuado para su repique y conservación de manera de contar con colonias aisladas en buenas condiciones para el comienzo de la propagación. Para ello, se utilizó la técnica de estriado por agotamiento en placa, que es una forma rápida y fácil de aislar levaduras y comprobar la pureza (White & Zainasheff, 2010). Las células de levadura crecen más rápido en presencia de un medio rico conteniendo compuestos como extracto de levadura y peptona, que proporcionan muchos de los metabolitos que las células deberían sintetizar si crecieran en condiciones mínimas (Bergman, 2001). Esto explica que el crecimiento de la cepa CRUB 1568^T

CAPÍTULO 3. OPTIMIZACIÓN DE LA PROPAGACIÓN

en los medios YM, MYP e YPD fuera más rápido que en los medios A. malta, A. mosto y PDA (ver composición en ANEXO N°1). El medio YPD fue seleccionado para la etapa de repique y obtención de colonias para la propagación. Se trata de un medio complejo muy aplicado para el cultivo y mantenimiento de levaduras en condiciones no selectivas (Bergman, 2001; Raines-Casselmann, 2009). Por su parte, el crecimiento de *S. eubayanus* en el mismo no sólo fue rápido, sino que se obtuvieron colonias aisladas definidas de buen tamaño (entre 3-5 mm) (White & Zainasheff, 2010). Cada colonia (o Unidad Formadora de Colonia) contiene al menos 1 millón de células, todas generadas a partir de la misma célula madre; eso significa que cualquier mutación que haya tenido la célula (aberrante o no) existe en todas las células hijas en gemación (White & Zainasheff, 2010). Es por ello que, para evitar seleccionar mutaciones puntuales en la población, se eligieron al menos tres colonias para comenzar los cultivos en cada línea de propagación. Por su parte, la propagación en laboratorio con un escalado de 1:10 es típica y ampliamente utilizada (Annemuller et al., 2011; Boulton & Quain, 2006; Briggs et al., 2004; White & Zainasheff, 2010), así como la implementación de mostos con densidades bajas (menores a 12 °Bx) con el objetivo de disminuir el estrés osmótico y obtener una biomasa de buena calidad (Annemuller et al., 2011; Cahill et al., 2000). Estos criterios fueron los adoptados para la propagación de levaduras a lo largo de este trabajo.

En relación a la etapa de propagación, y como fue señalado en la Sección 3.1, la evaluación de la calidad del cultivo producido (en términos de viabilidad y vitalidad) resulta fundamental. Si bien el azul de metileno es el colorante más aceptado en la industria cervecera para estimar la viabilidad, su uso ha comenzado a cuestionarse ya que puede conducir a una sobreestimación del número de células vivas en suspensiones de baja viabilidad, y no se lo considera válido cuando los valores caen por debajo del 90 %. En parte esto se debe a la inestabilidad química y a las impurezas del colorante, que lo hacen propenso a desarrollar intensidades variables de coloración (de azul pálido a azul oscuro) en células muertas y moribundas, y tornan muy subjetivo su análisis (Briggs et al., 2004; Smart et al., 1999; White & Zainasheff, 2010). En este punto, observamos que con el uso de azul de metileno citrato (AMC) se obtuvieron sobreestimaciones del 15-20 % de la viabilidad en muestras de levaduras tratadas térmicamente (100 % muertas). Similar fue lo observado por Smart et al. (1999), quienes encontraron que el AMC no tuvo una respuesta adecuada para poblaciones de levaduras cerveceras no viables, resultando en sobreestimaciones que llegaron a un 92 % del porcentaje de viabilidad. En relación a la coloración heterogénea y ambigua que dificultó evaluar correctamente la viabilidad

al aplicar el azul de metileno en condiciones alcalinas (AMA), Smart et al. (1999) también encontraron que este colorante no diferenció adecuadamente entre levaduras viables y no viables (con células exhibiendo un citoplasma violeta con una membrana azul), y que la variación en la intensidad del color para células muertas y moribundas observada utilizando el AMC, pareció magnificarse al utilizarlo en condiciones alcalinas. Se sugirió que el aparente aumento en la ambigüedad de tinción resulta de una mayor inestabilidad de la molécula de colorante de azul de metileno como resultado directo de la desmetilación oxidativa inducida por la alcalinidad (Smart et al., 1999). En los últimos años, comenzaron a evaluarse otros colorantes, como el violeta de metileno. El mismo presenta una penetración celular más rápida y exhibe mayor resistencia a la desmetilación oxidativa; esto disminuye la variación de intensidades en la coloración de las células, permitiendo una evaluación más realista y objetiva de la viabilidad y resultando en una alternativa adecuada al azul de metileno (Briggs et al., 2004; Smart et al., 1999; Stewart, 2017; White & Zainasheff, 2010). Smart et al. (1999) observaron que el método de tinción con violeta de metileno, tanto citrato (VMC) como alcalino (VMA), permitió diferenciar sin ambigüedad las células vivas de las muertas demostrando su potencial para evaluar la calidad de la levadura. En nuestro trabajo, el violeta de metileno alcalino (VMA) resultó ser el colorante vital más preciso en el rango de viabilidades ensayadas y fue el seleccionado para evaluar la viabilidad de la biomasa de *S. eubayanus* a lo largo de la tesis.

Por otra parte, el análisis de vitalidad de la levadura es otro punto clave para asegurar un correcto proceso de fermentación. Para evaluarla fue necesario producir suspensiones celulares en diferentes estados fisiológicos. Las células “sanas” incluyeron las poblaciones en fase exponencial y estacionaria; y las levaduras “estresadas” se lograron mediante inanición en agua y conservación en heladera. En el contexto de las microcerveceras, la evaluación de esta característica debe realizarse mediante pruebas que se puedan implementar de manera sencilla, rápida y que no requieran equipos sofisticados. Entre los métodos más comunes se encuentra la prueba del Poder de Acidificación (PA), por lo que fue elegida para ser ensayada en este trabajo, junto con fermentaciones a escala laboratorio que permiten evaluar de manera más completa el desarrollo de la fermentación (Basson, 1996). Por un lado, las levaduras en los distintos estados fisiológicos presentaron viabilidades similares (mayores al 98 %), al igual que lo observado por Kara et al. (1988) para levaduras almacenadas a 4 °C durante 10 y 12 días. Smart et al. (1999) por el contrario, encontraron variaciones en la viabilidad evaluada con violeta de metileno

alcalino para células de levadura en condiciones estresantes y propusieron el uso de este colorante para la evaluación de la vitalidad. Por su parte, analizada de manera individual, la prueba de Poder de Acidificación (PA) parecería correlacionarse bien con el estado fisiológico de las levaduras, ya que se observa que al someter los inóculos a condiciones estresantes (inanición y conservación en heladera por tiempo prolongado) el PA resulta menor, lo que indica una menor capacidad metabólica por parte de *S. eubayanus*. Otros autores también observan una disminución en el PA para levaduras sometidas a inanición y almacenamiento (Kara et al., 1988; Sigler et al., 2006; Smart et al., 1999; White et al., 2003). Sin embargo, en este trabajo fueron las dos condiciones donde a su vez se obtuvo la mayor velocidad de fermentación y la mayor capacidad de consumir los azúcares del mosto (mayor CO₂ liberado); por lo que, para la especie de levadura evaluada, el PA se correlacionó únicamente con la fase de retardo de inicio de la fermentación. Moraes & Bonatto (2017), también observaron una fase lag mayor para levaduras cerveceras (W34/70 y US-05) sometidas a estrés crónico (24 h–39 °C) correlacionada con una disminución del PA; sin embargo, esto fue acompañado también de una disminución de la capacidad fermentativa (Moraes & Bonatto, 2017). Por su parte, Fernández et al. (1991) realizaron una investigación sobre el efecto de diferentes temperaturas de almacenamiento en el rendimiento de fermentación de *S. cerevisiae* utilizando el método de Poder de Acidificación. A pesar de observar diferentes valores de PA a lo largo de 30 días de almacenamiento a 10 °C, 15 °C y 25 °C, el rendimiento fermentativo de estas levaduras fue casi idéntico. Estos resultados, y los obtenidos en este trabajo, sugieren que los valores de PA de forma aislada pueden no ser suficientes para predecir el rendimiento de la fermentación (Basson, 1996; Fernández et al., 1991). Diversos autores señalan que, el hecho mismo de que cada técnica de evaluación de la vitalidad se base en un parámetro o aspecto único de la actividad metabólica, significa que su utilidad para predecir todos los atributos que contribuyen al rendimiento de la fermentación es cuestionable, y hace que la búsqueda de un método adecuado para evaluar la vitalidad en cervecerías aún continúe en investigación (Briggs et al., 2004; Pellettieri, 2015; Smart, 2003; White & Zainasheff, 2010). Como los parámetros más relevantes del estado de la levadura son aquellos que reflejan directamente los cambios que ocurren durante la fermentación (Basson, 1996; Briggs et al., 2004), y como el tiempo de medición no resulta un factor decisivo en este trabajo de investigación, decidimos optar por quedarnos con las fermentaciones a escala laboratorio como técnica para evaluar la vitalidad a lo largo de la tesis.

Por su parte, resulta llamativo de los resultados obtenidos que, en condiciones estresantes (que a priori indicarían menor vitalidad), la levadura presente una mayor velocidad de fermentación y una mayor producción de CO₂ (indicativos de un buen estado metabólico). En condiciones no favorables, las levaduras activan mecanismos adaptativos (activación de la Respuesta General al Estrés; GSR por sus siglas en inglés) que han evolucionado para proteger a las células, permitirles mantener su integridad y ser más robustas a los cambios ambientales (Gibson et al., 2007; Hohmann & Mager, 2003; Ruis & Schüller, 1995). Dentro de los mecanismos asociados a esta respuesta, resultan de particular relevancia en levaduras cerveceras los cambios en el glicerol, el glucógeno intracelular y la trehalosa. Los niveles de ambos carbohidratos intracelulares y su almacenamiento están relacionados con una óptima condición fisiológica de las levaduras antes de la inoculación y con un buen rendimiento fermentativo (Duskova et al., 2015; Gibson et al., 2007; Smart, 2003). Por un lado, la trehalosa (disacárido no reductor) tiene la capacidad de estabilizar las membranas plasmáticas y su producción posee una correlación positiva con la resistencia a distintos tipos de estrés (deshidratación, heladas, calentamiento, inanición, estrés osmótico) y con un buen estado fisiológico celular (Bolat, 2008; Gibson et al., 2007). Jorgensen et al. (2002) observaron que un mayor contenido de trehalosa condujo a una menor pérdida de la capacidad fermentativa para una cepa de panificación de *S. cerevisiae* sometida a inanición y almacenamiento. Por otra parte, el glucógeno (principal polisacárido de reserva, hasta 40 % p/p de las células) posee un impacto directo en la tasa de crecimiento luego de la inoculación y en el rendimiento general de la fermentación; ya que se ha demostrado que existe una relación lineal entre los niveles de glucógeno y los esteroides sintetizados durante la fermentación. La movilización de glucógeno al inicio de la fermentación proporciona carbono y energía para la síntesis de ácidos grasos y esteroides cuando hay oxígeno presente en el mosto. Se ha observado que niveles bajos de glucógeno en las células de levadura dan como resultado una síntesis inadecuada de esteroides, lo que, a su vez, da como resultado un rendimiento deficiente de la fermentación. Un contenido bajo de glucógeno también puede impactar en el tiempo de fermentación y puede inducir una mayor producción de diacetilo, acetaldehído o dióxido de azufre (compuestos de aroma y sabor indeseados) (Bolat, 2008; Briggs et al., 2004; Gibson et al., 2007; Pickerell et al., 1991; Slabý et al., 2010). Una buena reserva de glucógeno y síntesis de trehalosa, permiten a las levaduras no sólo mantener su integridad durante períodos de inanición y almacenamiento, sino poseer una buena capacidad fermentativa una vez inoculadas en el mosto. La síntesis y acumulación

CAPÍTULO 3. OPTIMIZACIÓN DE LA PROPAGACIÓN

de estos compuestos está bajo el control de distintos genes (François & Parrou, 2001) y es cepa dependiente, por lo que resultaría interesante evaluarlos en un futuro en cepas de *S. eubayanus* en distintas condiciones fisiológicas. Asimismo, sería necesario evaluar las características organolépticas de las cervezas producidas ya que la condición fisiológica de la levadura no sólo impacta en la cinética fermentativa, sino que puede influir en los niveles de ácidos orgánicos, ésteres, alcoholes superiores, aldehídos y diacetilo y, en consecuencia, contribuir a la calidad general del producto final (Guido, 2004).

En relación a la selección de un medio adecuado de propagación, se decidió ensayar el mosto congreso y el medio extracto de malta. Ambos son medios que están basados en cebada malteada para su producción. Medios sintéticos, basados en glucosa o azúcares simples, podrían resultar en opciones más económicas y más fáciles de producir; sin embargo, las levaduras cultivadas exclusivamente en azúcares simples dejan de producir las enzimas que les permitirán asimilar la maltosa y maltotriosa, ya que la glucosa reprime la síntesis de sus transportadores y de maltasas e inactiva los transportadores preexistentes (Magalhães et al., 2016; Stewart, 2017). Como el mosto cervecero contiene principalmente maltosa, fermentarlo con una levadura propagada en azúcares simples dará como resultado tiempos largos de fermentación, atenuación incompleta, y aromas y sabores indeseados (Stewart, 2017; White & Zainasheff, 2010). En este punto, Nikulin et al. (2020), encontraron una fase de retardo de fermentación prolongada para la especie *S. paradoxus*, mantenida y propagada en medios con glucosa como única fuente de carbono. En este caso, la represión por glucosa desempeña un papel fuerte y crucial en la capacidad de las cepas para usar maltosa. Sin embargo, al mantener las células sólo con maltosa, la fase de retraso adicional fue evitada. De los dos medios evaluados, se seleccionó el medio extracto de malta por resultar más económico en su producción. Para las etapas iniciales de propagación en laboratorio es común utilizar medios complejos (extracto de malta deshidratado -DME- o medios conteniendo extracto de levadura y peptona) (Boulton & Quain, 2006; White & Zainasheff, 2010). Para etapas posteriores de propagación, en el escalado en fábrica, si se suele utilizar mosto de cebada (producido *in situ*) debido a la practicidad de producción de volúmenes mayores (Annemuller et al., 2011; Boulton & Quain, 2006).

El medio seleccionado fue optimizado para la producción de biomasa de *S. eubayanus* aplicando el diseño de Plackett-Burman seguido de un Diseño Central Compuesto. El diseño de Plackett-Burman permitió la evaluación de la importancia relativa de nueve factores (Tabla 3.2) sobre la biomasa obtenida, resultando la peptona de caseína y el extracto de levadura en

aquellos con un impacto significativo. Li et al. (2009), también observaron que el extracto de levadura fue uno de los parámetros relevantes para la producción de biomasa de *Candida utilis* a partir de residuos caña de bambú. Asimismo, El-Helow et al. (2015) encontraron que el extracto de levadura resultó en uno de los factores más efectivos para la producción de biomasa de *S. cerevisiae* a partir de melaza. De hecho, el extracto de levadura ha sido considerado como una fuente tradicional de nitrógeno para la suplementación del mosto en la elaboración de cerveza (Vu & Le, 2010). Por su parte, Cruz et al. (2002) observaron para cepas de panadería y cepas cerveceras ale y lager, que la suplementación con peptona (una fuente de nitrógeno donde los aminoácidos predominan en forma peptídica) resultó positiva para el metabolismo de la levadura, induciendo una mayor producción de biomasa y preservando la viabilidad, tanto en medios de glucosa, como de maltosa. Hahn-Hägerdal et al. (2005) encontraron que el medio YP (medio complejo compuesto sólo por extracto de levadura y peptona) fue eficiente para promover el crecimiento de una cepa de levadura de panadería comercial incluso en ausencia de una fuente de carbono adicional. Se propone que el medio contiene todos los componentes necesarios para la propagación de células de levadura, ya que presenta una fuente de aminoácidos y otros precursores biosintéticos que pueden canalizarse directamente hacia las vías anabólicas y, por lo tanto, reducir la necesidad de producir precursores biosintéticos y resultar en un ahorro de energía metabólica. El nitrógeno es uno de los principales elementos que se encuentran en muchas macromoléculas de los organismos vivos, desempeñando un papel central en su estructura y función, por lo que resulta esencial para el crecimiento y el metabolismo de las levaduras. Las levaduras en rápido crecimiento, como las de los cultivos iniciadores o *starters*, tienen un requerimiento de nitrógeno superior al normal. Por lo tanto, los medios de cultivo deben complementarse con nutrientes de levadura para que el nitrógeno no sea limitante (Cruz et al., 2002; Raines-Casselman, 2009; Stewart, 2017). Resulta entonces lógico que los factores influyentes en la producción de biomasa, extracto de levadura y peptona de caseína, sean aquellos que son fuente principal de nitrógeno. Por último, estos factores fueron optimizados a través de un Diseño Central Compuesto que permitió la obtención del modelo matemático que explica la producción de biomasa. El mismo fue probado experimentalmente, comparándose el rendimiento de biomasa real con el esperado según el modelo propuesto (Amiri et al., 2017; Anderson & Whitcomb, 2016). El modelo desarrollado en este estudio fue capaz de predecir con precisión la variable respuesta, con un error del 1 %, lo que confirma la adecuación e importancia del mismo. Por su parte, al comparar el medio

original (control) con el medio optimizado, los valores esperados de biomasa para ambas condiciones resultaron similares, rondando los 12 g/L. Los resultados experimentales de confirmación destacaron el hecho de que la cantidad de peptona ácida de caseína puede ser reducida considerablemente (alrededor de 3 veces), obteniéndose una buena producción de biomasa. Esto tiene un impacto directo en los gastos operativos de la propagación, teniendo en cuenta que el costo de peptona ácida de caseína en relación al extracto de levadura es aproximadamente 3 veces superior, implicando una reducción de costos del 40 % (ahorro de \$50 por litro de mosto producido).

Con el medio de cultivo optimizado se realizó el escalado de la propagación en etapa final de laboratorio (20 L), utilizando un propagador de acero inoxidable cilindro-cónico especialmente diseñado (Sección 3.2.8, Figura 3.3). La densidad celular obtenida y su viabilidad ($7,20 \times 10^8$ cel/mL y 99,7 % de viabilidad) coinciden con aquellos reportados en bibliografía, así como el tiempo requerido para obtenerlos (48 h). Young, (1996) y Briggs et al. (2004) describen que el conteo final de levaduras cerveceras luego de una propagación eficiente debe encontrarse en el orden de $2-5 \times 10^8$ cel/mL con viabilidades mayores al 98 %, y un tiempo de propagación de 24-48 h. Por su parte, el crecimiento de la levadura siguió la curva de crecimiento estándar, caracterizada por una pequeña fase de retraso (lag) inmediatamente después de la inoculación en medio fresco, seguida de un crecimiento exponencial o fase de crecimiento logarítmico (crecimiento rápido que se ajusta a una curva exponencial), y finalizando con una fase estacionaria caracterizada por una tasa de crecimiento lenta con poco aumento en la biomasa (Briggs et al., 2004; Hulse, 2003). Una curva de crecimiento similar a la observada en este trabajo para *S. eubayanus*, junto con una fase de latencia casi inexistente relacionada con la adaptación celular, también fue descrita por Young (1996) para levaduras cerveceras.

El sistema de propagación que proponemos para la producción de biomasa de *S. eubayanus* para el sector cervecero, es un sistema de propagación por lotes (o *batch*), donde el crecimiento de la levadura se limita al volumen de medio determinado por el propagador. En general, las industrias dedicadas a la producción de biomasa (producción de levadura seca, levadura de panadería, levadura para necesidades farmacéuticas, entre otras), utilizan el modelo de cultivo alimentado o *fed-batch*. En estos sistemas, se inoculan medios de baja densidad (típicamente 2 °P) con la levadura. La levadura comienza a crecer y el nivel de glucosa es tan bajo que se evita el efecto Crabtree (metabolismo fermentativo incluso en presencia de oxígeno). A medida que la levadura se queda sin carbono (azúcar), el sistema introduce más medio a un ritmo lento para

CAPÍTULO 3. OPTIMIZACIÓN DE LA PROPAGACIÓN

mantener la fase de crecimiento y conservar un metabolismo netamente aeróbico, eficientizando la producción de biomasa (y evitando la producción de etanol) (Cahill et al., 2000; Hulse, 2003; White & Zainasheff, 2010). Como pudimos observar en los resultados de las propagaciones de *S. eubayanus* (Sección 3.3.4), hubo una producción notoria de etanol en los sistemas de propagación aireados continuamente, lo que indica que se trata de una especie Crabtree positiva. En este punto, sería lógico pensar en un sistema de cultivo alimentado para optimizar la propagación de esta levadura. Sin embargo, si bien un objetivo es la producción de biomasa, otro muy importante es que el inóculo se comporte de una manera adecuada y eficiente una vez inoculado en los fermentadores para la producción de cervezas de buena calidad. En los cultivos alimentados, se elimina el metabolismo fermentativo y la levadura se encuentra en un estado metabólico muy diferente al que se requiere para la fermentación posterior, lo que podría provocar anomalías en la fermentación y la producción de metabolitos de aroma y sabor indeseados, poniendo en riesgo la calidad de la cerveza (Hill, 2015; White & Zainasheff, 2010). Aun utilizando el sistema de *batch* simple, a lo largo del trabajo desarrollado en este capítulo, fue posible obtener cultivos de *S. eubayanus* puros y de calidad, de tamaño suficiente como para inocular fermentadores de 700 L y/o proporcionar una cantidad de inóculo adecuada para etapas de propagación posteriores en cervecerías de mayor volumen, cumpliendo así con el objetivo de las etapas de propagación en laboratorio (Boulton & Quain, 2006).

CAPÍTULO 4

S. eubayanus Y SU INTERACCIÓN CON EL LÚPULO

Capítulo 4.

S. eubayanus y su interacción con el lúpulo

4.1. Introducción

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta dioica y perenne, perteneciente a la familia *Cannabaceae*, que cuenta con más de 140 variedades con características fisicoquímicas y organolépticas distintas. El registro más antiguo de su plantación se remonta al año 859 d.C. (en Baviera), con relatos de su uso con fines medicinales (Hazelwood et al., 2010; Hieronymus, 2012; Janish, 2019; Steenackers et al., 2015). Actualmente, la producción mundial de lúpulo (62.366 hectáreas cultivadas y un volumen de lúpulo cosechado de 122.003 toneladas anual) encuentra su mercado casi exclusivamente en la industria cervecera, con su aplicación como agente de amargor, aroma y conservación (Barth Hass, 2021; Steenackers et al., 2015). Dentro de la producción mundial de lúpulo, Argentina cuenta con 181 hectáreas cultivadas y una producción anual de 266 toneladas, localizadas principalmente en la provincia de Río Negro (Fernández Oro y el valle de El Bolsón), y con una producción principal de las variedades Cascade (70 %) y Nugget (20 %) (Barth Hass, 2021; Trochine et al., 2020).

El valor de la planta del lúpulo para la industria cervecera depende principalmente de los compuestos presentes en los conos o inflorescencias femeninas y en las glándulas de lupulina que las constituyen (Figura 4.1). De acuerdo con sus propiedades fisicoquímicas, estos metabolitos secundarios a menudo se clasifican en tres fracciones: las resinas, los aceites esenciales y los polifenoles de lúpulo. Las resinas del lúpulo se caracterizan por su solubilidad en metanol frío y éter dietílico, y se clasifican además según su solubilidad en hexano. Las resinas blandas son solubles en hexano y contienen principalmente los α -ácidos (cohumulona, humulona, adhumulona) y los β -ácidos (colupulona, lupulona, adlupulona) del lúpulo. Las resinas duras se caracterizan por su insolubilidad en hexano y consisten principalmente en chalconas y flavanonas preniladas, siendo el xantohumol el componente principal. Los aceites esenciales (monoterpenos, sesquiterpenos, compuestos oxigenados y azufrados) son la fracción de lúpulo que se puede obtener por destilación al vapor. Junto a las resinas y aceites del lúpulo, se encuentran presentes una mezcla compleja de polifenoles, constituidos por ácidos carboxílicos aromáticos y flavonoides no prenilados (Almaguer et al., 2014; Hieronymus, 2012;

Janish, 2019; Steenackers et al., 2015; Zhang et al., 2021). La composición y cantidad relativa de las distintas fracciones y metabolitos depende de la variedad de lúpulo y de sus condiciones de crecimiento (Hieronymus, 2012; Zhang et al., 2021).

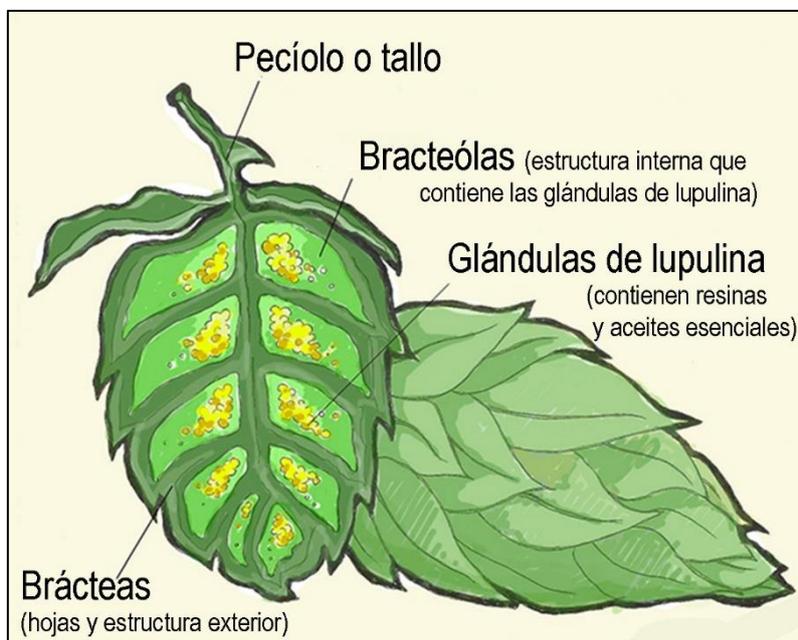


Figura 4.1. Flor de lúpulo y sus componentes.

Las resinas blandas del lúpulo (ácidos amargos) son la fracción que aporta el amargor a la cerveza, mientras que las sustancias volátiles de los aceites esenciales son las que imparten aroma y sabor. La mayor parte del amargor proviene de los iso- α -ácidos (producto de la isomerización térmica de los α -ácidos cuando el lúpulo es adicionado en mosto a altas temperaturas en macerado, hervor y *whirlpool*). Sin embargo, las huluponas, (productos de oxidación de los β -ácidos) y las humulinonas (productos de oxidación de los α -ácidos), también imparten amargor, sobre todo en cervezas con adiciones de lúpulo en fermentación y/o madurado (técnica conocida como *dry-hopping*). Además, incluso algunos polifenoles son amargos o tienen propiedades que modifican el amargor (Janish, 2019; Mikyška et al., 2021; Oladokun et al., 2016). El amargor es un carácter organoléptico muy importante de muchos alimentos y bebidas como el café, las nueces, el chocolate, el vino, el té, las frutas. En la cerveza es uno de los atributos clave utilizados para determinar el estilo y evaluar la calidad sensorial del producto. El amargor sensorial de la cerveza incluye distintos aspectos de la impresión amarga como la intensidad, la calidad (agradable) y su persistencia. La percepción del amargor organoléptico es muy subjetiva y depende de la matriz de la cerveza; incluso la cepa de levadura en algunos casos tiene un impacto en la percepción del lúpulo al interactuar con sus

componentes durante la fermentación. (Kumar, 2019; Mikyška et al., 2021; Oladokun et al., 2016; Popescu et al., 2013). La medición instrumental rutinaria del amargor en cerveza consiste en la determinación espectrofotométrica del contenido de iso- α -ácidos y se expresa como Unidades Internacionales de Amargor (IBU, por sus siglas en inglés) (ASBC Beer-23, 1968). Esta escala proporciona una aproximación del amargor percibido y se puede utilizar para evaluar la calidad y la consistencia. Además, la escala de IBUs se puede usar para agrupar ciertos estilos de cerveza, ya que los mismos tienen rangos específicos para el valor IBU. Por lo general, valores de IBU menores a 30 se consideran estilos de bajo amargor, mientras que cervezas con un valor de IBU mayor a 50 se consideran muy amargas (Papazian, 2003).

Por otra parte, las resinas blandas y sus correspondientes iso- α e iso- β -ácidos, son los que le aportan al lúpulo su cualidad antimicrobiana y de conservación. El lúpulo se ha utilizado para conservar el mosto y la cerveza desde el siglo XII en Alemania y XV en Inglaterra, y sus propiedades antimicrobianas han sido ampliamente estudiadas (Edgerton, 2005; Hazelwood et al., 2010; Srinivasan et al., 2004). Los ácidos amargos han mostrado actividad contra bacterias gram-positivas (especies de *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Clostridium* y *Bacillus*), sólo unas pocas bacterias gram-negativas (*Helicobacter pylori* y especies de *Brucella*), y algunos hongos (*Candida*, *Trichophyton*, *Fusarium* y *Mucor*) (Bartmańska et al., 2018; Hazelwood et al., 2010; Srinivasan et al., 2004). Las levaduras cerveceras son capaces de tolerar los compuestos antimicrobianos de lúpulo; sin embargo, la aplicación de nuevas levaduras para la producción de cerveza requiere que se evalúe la tolerancia de las mismas (Cubillos et al., 2019; Domizio et al., 2016; Methner et al., 2019; Toh et al., 2020).

En este capítulo se buscó evaluar el comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* en presencia de lúpulo adicionado para aportar amargor, así como el impacto de las cepas de levadura en el amargor medido y percibido en el producto final.

4.2. Materiales y métodos

4.2.1. Comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* en presencia de lúpulo

Se evaluó la cepa de *S. eubayanus* CRUB 1568^T seleccionada en el Capítulo 2, perteneciente a la colección de microorganismos del IPATEC. Como control se utilizó la cepa Frohberg comercial de *S. pastorianus* W34/70 (Weihenstephan 34/70). Ambas cepas fueron crio-

CAPÍTULO 4. *S. EUBAYANUS* Y SU INTERACCIÓN CON EL LÚPULO

conservadas a -80 °C en glicerol 20 % v/v. Previo a su uso, se cultivaron y se mantuvieron en agar YPD, y fueron propagadas en las condiciones desarrolladas en el Capítulo 3.

Se llevaron a cabo fermentaciones en mosto congreso de 12,0 °P (ver ANEXO N°1), siguiendo el mismo sistema de fermentación y condiciones que los descriptos en la sección 2.2.2 (Figura 2.1). Se ensayó mosto sin lupular y mostos lupulados. Para esto, se llevó el mosto a ebullición, se adicionó lúpulo Cascade y se dejó en hervor durante 30 min, buscando obtener 20 y 60 IBU finales. La condición sin lupular fue sometida a ebullición de igual manera, pero sin el agregado de lúpulo. El cálculo de la cantidad de lúpulo a adicionar para obtener los IBU teóricos propuestos se realizó siguiendo la siguiente ecuación (Hieronymus, 2012; Palmer, 2006):

$$\text{Peso de lúpulo (g)} = (\text{IBU} \times \text{V}) \div (\text{FU} \times 10 \times \text{AA})$$

Donde IBU son los IBU teóricos a los que se apunta, V es el volumen de mosto (L), FU es el factor de utilización (ver ANEXO N°3) y AA es la concentración de α -ácidos del lúpulo utilizado (% p/p). Se utilizó lúpulo Cascade proveniente de El Bolsón (Río Negro) en formato pellet, conservado a -20 °C. Una vez recibido se realizó el análisis de las resinas del lúpulo (α y β -ácidos) por espectrofotometría (ASBC Hops-6, 1992). Para ello, 2,5 g de pellets molidos (molinillo de café Moulinex) se pusieron en contacto con 50 mL de tolueno. El extracto fue diluido en metanol (dilución 1/20) y posteriormente en metanol alcalino (dilución 1/20). Esta última dilución fue analizada en un espectrofotómetro UV (Shimadzu UV-1800) a 275, 325 y 355 nm. El contenido de α y β -ácidos (% p/p) fue calculado con ecuaciones ternarias (Alderton et al., 1954). El Cascade utilizado presentó valores de α -ácidos = 10,3 % p/p y de β -ácidos = 5,5 % p/p.

La cinética de las fermentaciones fue monitoreada cada 12 h por pérdida de peso del sistema (liberación de CO₂) con balanza de precisión de 0,01 g, hasta peso constante (Lopes et al., 2007). Finalizada la fermentación, se evaluó la concentración de células y su viabilidad en el sobrenadante y en la crema de levaduras por tinción con violeta de metileno alcalino y cámara de Neubauer. El pH inicial y final se determinó mediante medidor de pH (Sartorius PR15). La atenuación (%) se determinó mediante refractómetro (Alla France) como la diferencia entre la densidad inicial del mosto (DI) y la final en el sobrenadante de la fermentación (DF). El consumo de azúcares, el etanol y el glicerol producido fueron evaluados por cromatografía líquida de alta precisión (ver Sección 2.2.3).

Los IBUs fueron medidos por espectrofotometría según el protocolo propuesto por la ASBC (ASBC Beer-23, 1968). Para ello, se realizó la extracción de iso- α -ácidos homogeneizando

CAPÍTULO 4. *S. EUBAYANUS* Y SU INTERACCIÓN CON EL LÚPULO

vigorosamente en vortex 2,5 mL de muestra con 0,25 mL de HCl 3 N y 5 mL de iso-octano (2,2,4-trimetilpentano) como solvente de extracción. La muestra se centrifugó y la absorbancia de la fase superior se midió a 275 nm con cubeta de cuarzo de 500 μ L (1 cm de paso), utilizando un espectrofotómetro UV (Shimadzu UV-1800). Los IBUs fueron calculados mediante la siguiente ecuación:

$$IBU = Absorbancia^{275} \times 50$$

El Amino Nitrógeno Libre (FAN, por sus siglas en inglés) de los mostos fue evaluado con el método de la ninhidrina (ASBC Wort-12, 1975). Para ello, 2 mL de muestra (mosto diluido 1/100) se pusieron en contacto con 1 mL del reactivo ninhidrina y se llevaron a ebullición en baño de agua por 16 min, la reacción se detuvo en un baño a 20 °C por 20 min. A cada tubo de reacción se le adicionó 5 mL del reactivo de dilución (iodato de potasio en etanol 38 % v/v) y se midió la absorbancia a 570 nm en lector de microplacas (Synergy, BioTek). Paralelamente se realizó el blanco y el estándar de la misma manera, pero con agua destilada y con un estándar de glicina. Las lecturas se refirieron a la absorbancia del estándar de glicina que contiene 2 mg/L de FAN. La concentración de amino nitrógeno libre en las muestras se calculó de la siguiente manera:

$$FAN (mg/L) = (Abs^{muestra} - Abs^{blanco}) / (Abs^{estándar} - Abs^{blanco}) \times 2 \times Factor\ de\ dilución$$

Por su parte, los análisis de nitrógeno y carbono total de los mostos fueron tercerizados al laboratorio de Química del CRUB (Universidad Nacional del Comahue); y el análisis de calcio, magnesio y zinc se tercerizó al Laboratorio de Química Analítica-División FQ-DFC de CNEA.

4.2.2. Impacto de *S. eubayanus* en el amargor de la cerveza

Para esta sección, se ensayaron las 5 cepas de *S. eubayanus* representativas de las subpoblaciones genéticas para la especie (Tabla 2.1), junto con 8 cepas de levaduras cerveceras comerciales (Tabla 4.1). Se utilizó mosto estilo Pale Ale proveniente de una cervecería local con una densidad inicial de 10,6 °P y un cálculo de 30 IBUs teóricos.

Se llevaron a cabo fermentaciones a escala laboratorio con 150 mL de mosto oxigenado (12 ppm) (Figura 2.1). Las cepas cerveceras de tipo ale fueron fermentadas a 20 °C, la cepa cerveceras lager y las cepas de *S. eubayanus* fueron fermentadas a 10 °C.

Tabla 4.1. Cepas cerveceras comerciales utilizadas y sus características.

| Cepa | Empresa | Tipo | Floculación | Atenuación (%) |
|------------|------------|---------------------------|--------------|----------------|
| WLP002 | White Labs | Ale inglesa frutal | Muy alta | 63-70 |
| WLP005 | White Labs | Ale británica maltosa | Alta | 67-74 |
| WLP029 | White Labs | Ale alemana/kölsch neutra | Media a baja | 72-78 |
| US-05 | Fermentis | Ale americana neutra | Media | 78-82 |
| S-04 | Fermentis | Ale inglesa frutal | Muy alta | 74-82 |
| Nottingham | Lallemand | Ale inglesa neutra | Alta | 75-85 |
| Windsor | Lallemand | Ale inglesa frutal | Baja | 61 |
| W34/70 | Fermentis | Lager frohberg | Alta | 82-85 |

Se siguió la cinética de fermentación cada 12 h por pérdida de peso del sistema (liberación de CO₂) hasta peso constante. Finalizada la fermentación, se separó el sobrenadante de la levadura por centrifugación a 5000 × g por 10 min en centrífuga refrigerada (Sigma), se filtró (filtro jeringa PES 0,22 μm) y se almacenó la muestra a 4 °C para análisis posteriores.

El pH inicial y final se determinó mediante medidor de pH (Sartorius PR15). La atenuación (%) se determinó mediante refractómetro (Alla France) como la diferencia entre la densidad inicial del mosto (DI) y la final en el sobrenadante de la fermentación (DF). Por otra parte, el consumo de azúcares y el etanol producido fueron evaluados por cromatografía líquida de alta precisión (ver Sección 2.2.3).

Los IBUs fueron determinados de la misma manera que la descrita en la sección previa. Complementariamente se llevó a cabo una evaluación sensorial con un panel de cata entrenado del CRELTEC compuesto por 7 personas (4 mujeres y 3 hombres de 25 a 50 años). Los triplicados de las fermentaciones se mezclaron en partes iguales y se les asignó un código aleatorio. Las evaluaciones se realizaron a ciegas con 30 mL de muestra a temperatura ambiente, asegurando la ventilación del ambiente. Se les solicitó a los panelistas que evalúen el nivel de amargor. 1 = Bajo – 2 = Medio – 3 = Alto, y el tipo de amargor percibido: 1 = Persistencia agradable – 2 = Limpio – 3 = Persistencia no agradable.

4.2.3. Análisis estadísticos

Los parámetros cinéticos en los ensayos a escala de laboratorio se calcularon individualmente a partir de cada fermentación utilizando la pérdida de CO₂ (g) diario del sistema y la ecuación de Gompertz reparametrizada (Zwietering et al., 1990):

$$Y = A * \exp (-\exp (((\mu_{max} * e) / A) * (\lambda - t) + 1))$$

donde Y = Ln (Nt / N0), N0 es el peso inicial del sistema (g) y Nt el peso en el tiempo t; A = Ln (N_∞ / N0) es la producción máxima de CO₂ con N_∞ como máximo asintótico; μ_{max} es la tasa máxima de fermentación (h⁻¹); y λ el período de tiempo necesario para iniciar la fermentación vigorosa (fase lag). El ajuste de datos se realizó utilizando el software GraphPad Prism versión 8.00 (GraphPad Software, La Jolla, CA, EE. UU.).

Se realizaron análisis estadísticos sobre los datos de fermentación utilizando ANOVA de una vía y test de Tukey para la comparación de medias en el software GraphPad Prism versión 8.00. El nivel estadístico de significancia se fijó en p < 0,05.

4.3. Resultados

4.3.1. Comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* en presencia de lúpulo

Las cinéticas de fermentación de la cepa de *S. eubayanus* CRUB 1568^T y la cepa control lager W34/70 en presencia de lúpulo en dos condiciones, 20 y 60 IBUs, pueden observarse en la Figura 4.2, junto con los parámetros cinéticos asociados a las mismas (Tabla 4.2). En todos los casos, la cepa W34/70 superó fermentativamente (μ, atenuación, producción de etanol) a la cepa de *S. eubayanus*, coincidente con lo observado y discutido en el Capítulo 2. Por su parte, en ambas condiciones pudo observarse un incremento de la velocidad de fermentación (μ) y tiempos menores para completar la fermentación (6-8 días en lugar de 12) para las dos cepas en presencia de lúpulo, viéndose este efecto incrementado al aumentarse el contenido de lúpulo (37 % mayor μ para la cepa CRUB 1568^T y 47 % mayor μ para W34/70 al aumentar de 20 a 60 IBUs) (Tabla 4.2, Figura 4.2).

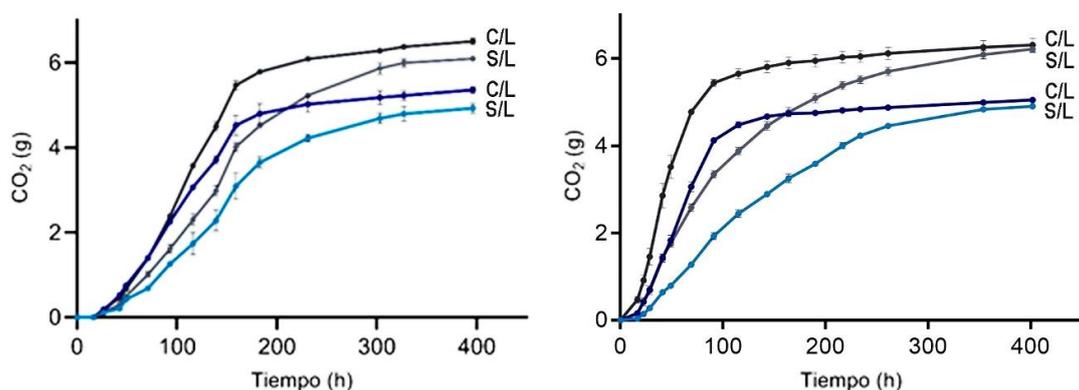


Figura 4.2. Cinéticas de fermentación para *S. eubayanus* CRUB 1568^T (celestine y azul) y la cepa control W34/70 (gris claro y oscuro) en mosto con 20 IBUs (izquierda) y 60 IBUs (derecha). S/L indica mosto sin lupular. C/L indica mosto lupulado.

Tabla 4.2. Parámetros fermentativos para las fermentaciones de *S. eubayanus* CRUB 1568^T y la cepa control W34/70 en las condiciones con 20 IBUs (arriba) y 60 IBUs (abajo).

| 20 IBUs | | | | |
|-----------------------------------|----------------------------|----------------------------|-----------------------------|----------------------------|
| | CRUB 1568 ^T S/L | CRUB 1568 ^T C/L | W34/70 S/L | W34/70 C/L |
| μ (h ⁻¹) | 0,027 ± 0,002 ^c | 0,041 ± 0,003 ^b | 0,035 ± 0,0004 ^b | 0,052 ± 0,002 ^a |
| Producción de CO ₂ (g) | 4,99 ± 0,09 ^b | 5,31 ± 0,10 ^b | 6,19 ± 0,08 ^a | 6,45 ± 0,002 ^a |
| pH | 4,44 ± 0,01 ^{a,b} | 4,42 ± 0,01 ^a | 4,48 ± 0,01 ^b | 4,53 ± 0,01 ^b |
| Atenuación (%) | 66,5 ± 1,3 ^a | 68,6 ± 0,1 ^a | 86,1 ± 0,9 ^b | 87,9 ± 1,7 ^b |
| Etanol (% v/v) | 3,67 ± 0,11 ^c | 4,66 ± 0,15 ^b | 4,46 ± 0,17 ^b | 5,37 ± 0,03 ^a |
| 60 IBUs | | | | |
| | CRUB 1568 ^T S/L | CRUB 1568 ^T C/L | W34/70 S/L | W34/70 C/L |
| μ (h ⁻¹) | 0,025 ± 0,003 ^d | 0,065 ± 0,003 ^b | 0,037 ± 0,001 ^c | 0,098 ± 0,004 ^a |
| Producción de CO ₂ (g) | 4,90 ± 0,03 ^b | 4,94 ± 0,04 ^b | 6,13 ± 0,07 ^a | 6,11 ± 0,15 ^a |
| pH | 4,60 ± 0,03 ^c | 4,59 ± 0,01 ^c | 4,70 ± 0,01 ^a | 4,53 ± 0,01 ^b |
| Atenuación (%) | 67,2 ± 1,5 ^a | 69,0 ± 0,7 ^a | 86,3 ± 0,7 ^b | 87,5 ± 1,4 ^b |
| Etanol (% v/v) | 3,32 ± 0,09 ^c | 3,50 ± 0,01 ^b | 4,17 ± 0,02 ^a | 4,11 ± 0,01 ^a |

Las fermentaciones se realizaron por triplicado (n = 3). S/L indica mosto sin lupular. C/L indica mosto lupulado. Se utilizó el ANOVA de una vía y la prueba de Tukey dentro de cada condición (20 y 60 IBUs) para evaluar estadísticamente las diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias entre las cepas y tratamientos para cada parámetro (p < 0,05).

CAPÍTULO 4. *S. EUBAYANUS* Y SU INTERACCIÓN CON EL LÚPULO

Al evaluarse el contenido de células totales de la crema al final de la fermentación, se observó para ambas cepas un aumento de la misma en presencia de lúpulo (Tabla 4.3). Para la cepa CRUB 1568^T la concentración celular aumentó un 54 % y un 40 % en la condición 20 y 60 IBUs, respectivamente. Para la cepa W34/70 este incremento fue del 116 % (20 IBUs) y 86 % (60 IBUs). Por otra parte, la viabilidad de la biomasa obtenida se vio disminuida en las fermentaciones en presencia de lúpulo, siendo este efecto mayor al aumentarse el contenido de IBUs (viabilidad reducida un 35 % en la condición 20 IBUs y un 56 % en la condición 60 IBUs) (Tabla 4.3).

Tabla 4.3. Recuento de células totales y viabilidad de la crema de levadura al final de la fermentación para *S. eubayanus* CRUB 1568^T y la cepa control W34/70 en las condiciones con 20 IBUs (arriba) y 60 IBUs (abajo)

| 20 IBUs | | | | |
|-----------------|----------------------------------|----------------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | CRUB 1568^T S/L | CRUB 1568^T C/L | W34/70 S/L | W34/70 C/L |
| Células totales | $4,3 \times 10^{10} \pm$ | $6,7 \times 10^{10} \pm$ | $1,5 \times 10^{10} \pm$ | $3,3 \times 10^{10} \pm$ |
| | $0,1 \times 10^{10b}$ | $0,9 \times 10^{10a}$ | $0,2 \times 10^{10c}$ | $0,1 \times 10^{10b}$ |
| Viabilidad (%) | $79,7 \pm 4,4^a$ | $54,1 \pm 5,6^b$ | $72,2 \pm 7,8^a$ | $44,2 \pm 7,6^b$ |
| 60 IBUs | | | | |
| | CRUB 1568^T S/L | CRUB 1568^T C/L | W34/70 S/L | W34/70 C/L |
| Células totales | $2,3 \times 10^{10} \pm$ | $3,2 \times 10^{10} \pm$ | $1,0 \times 10^{10} \pm$ | $1,9 \times 10^{10} \pm$ |
| | $0,2 \times 10^{10b}$ | $0,4 \times 10^{10a}$ | $0,1 \times 10^{10d}$ | $0,2 \times 10^{10c}$ |
| Viabilidad (%) | $75,6 \pm 2,3^a$ | $29,9 \pm 2,8^b$ | $73,4 \pm 6,8^a$ | $36,3 \pm 2,5^b$ |

Las fermentaciones se realizaron por triplicado (n = 3). S/L indica mosto sin lupular. C/L indica mosto lupulado. Se utilizó el ANOVA de una vía y la prueba de Tukey dentro de cada condición (20 y 60 IBUs) para evaluar estadísticamente las diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias entre las cepas y tratamientos para cada parámetro (p < 0,05).

Para ambas condiciones, ninguna de las cepas presentó cambios en la producción de dióxido de carbono total, ni en la atenuación final al comparar la condición sin lupular y lupulada (Tabla 4.2). Sin embargo, para *S. eubayanus* se observó un aumento en el contenido de etanol en presencia de lúpulo, resultando 21 % mayor en presencia de 20 IBUs y 5 % mayor en la condición 60 IBUs. Para la cepa W34/70 sólo se observó un aumento del etanol producido en

presencia de 20 IBUs (17 % mayor), no así en la condición 60 IBUs. La producción de etanol aumentada pudo verse reflejada en el consumo diferencial de maltosa del mosto por parte de las cepas (Figura 4.3). La cepa CRUB 1568^T presentó un consumo aumentado de maltosa en presencia de lúpulo (menor maltosa residual), siendo este mayor en la condición 20 IBUs; por su parte, la cepa W34/70 evidenció un mayor consumo de maltosa sólo en la condición 20 IBUs. La composición de azúcares iniciales y el pH resultaron similares para todos los mostos ensayados (Tabla 4.4).

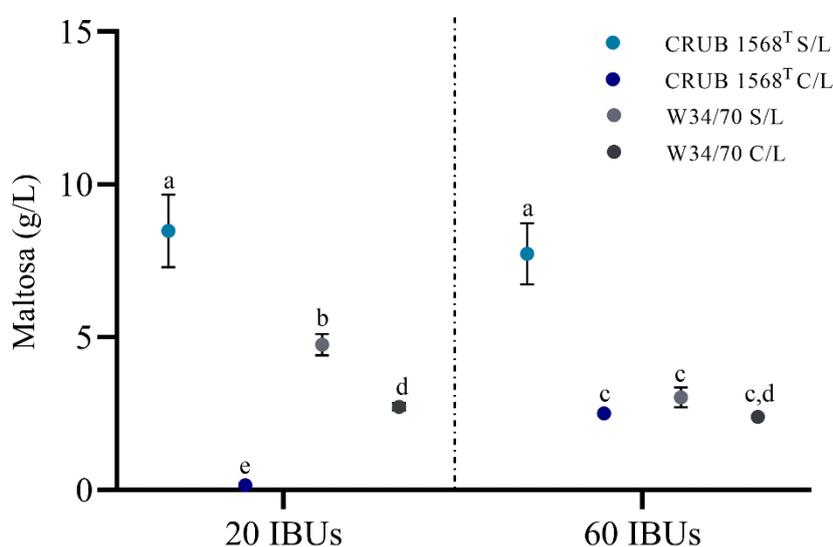


Figura 4.3. Maltosa residual (g/L) para *S. eubayanus* CRUB 1568^T y la cepa control W34/70 en mostos sin lupular (S/L) y lupulados (C/L) para ambas condiciones (20 y 60 IBUs).

Tabla 4.4. Composición inicial de azúcares medidos por HPLC y pH inicial de los mostos.

| | Mosto S/L | Mosto C/L (20 IBUs) | Mosto C/L (60 IBUs) |
|-------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Maltotriosa (g/L) | 20,5 ± 1,1 ^a | 21,4 ± 1,3 ^a | 19,2 ± 1,3 ^a |
| Maltosa (g/L) | 64,9 ± 0,6 ^a | 66,8 ± 0,9 ^a | 65,1 ± 1,0 ^a |
| Glucosa (g/L) | 12,6 ± 0,1 ^a | 12,6 ± 0,2 ^a | 12,8 ± 0,1 ^a |
| pH inicial | 5,41 ± 0,05 ^a | 5,37 ± 0,11 ^a | 5,36 ± 0,08 ^a |

S/L indica mosto sin lupular. C/L indica mosto lupulado. Se utilizó el ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para evaluar estadísticamente las diferencias significativas (n = 3). Letras diferentes en cada fila representan diferencias entre mostos (p < 0,05). No se detectó glicerol en los mostos sin fermentar.

Por otra parte, al evaluar el glicerol producido se evidenció una mayor producción de este compuesto por parte de *S. eubayanus* en presencia de lúpulo. Al aumentar el contenido de lúpulo este efecto se vio magnificado, obteniéndose 12 % más de glicerol en la condición 20 IBUs y 42,9 % en presencia de 60 IBUs. Para la cepa W34/70 la producción de glicerol aumentó sólo en la condición 60 IBUs, con una producción 60 % mayor (Figura 4.4).

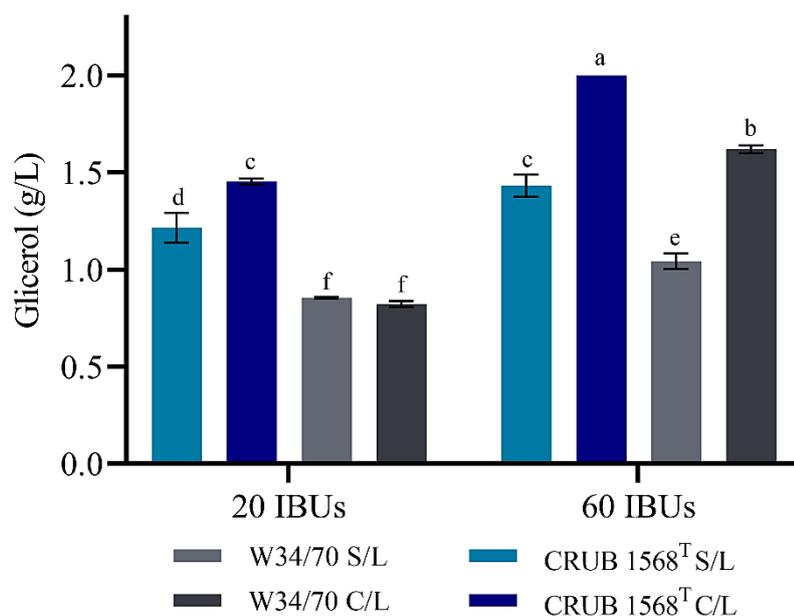


Figura 4.4. Glicerol producido (g/L) por *S. eubayanus* CRUB 1568^T y la cepa control W34/70 en mostos sin lupular (S/L) y lupulados (C/L) para ambas condiciones (20 y 60 IBUs).

Al evaluar los IBUs de las fermentaciones finales, se encontró un mayor valor de IBUs medidos para la cepa CRUB 1568^T en relación a la cepa control W34/70, con una diferencia entre cepas de 21 % para la condición 20 IBUs y 8 % para la condición 60 IBUs (Figura 4.5). Cuando las muestras fueron filtradas (filtro 0,45 μ m), esta diferencia entre cepas se redujo siendo del 12 % en la condición 20 IBUs y casi cero para 60 IBUs. Para ambas condiciones, el efecto del filtrado de la muestra tuvo un mayor impacto en los IBUs medidos para *S. eubayanus* que para el control lager, evaluándose una disminución del 15 % en los IBUs medidos para la cepa CRUB 1568^T luego del filtrado, y de un 5 % para la cepa W34/70. En este punto, se observó un contenido mayor de levaduras en suspensión en las fermentaciones con la cepa CRUB 1568^T, con un valor promedio en el sobrenadante de las fermentaciones de $2,6 \times 10^{10} (\pm 0,4 \times 10^{10})$ células totales para *S. eubayanus* y de $1,0 \times 10^{10} (\pm 0,1 \times 10^{10})$ para la cepa control.

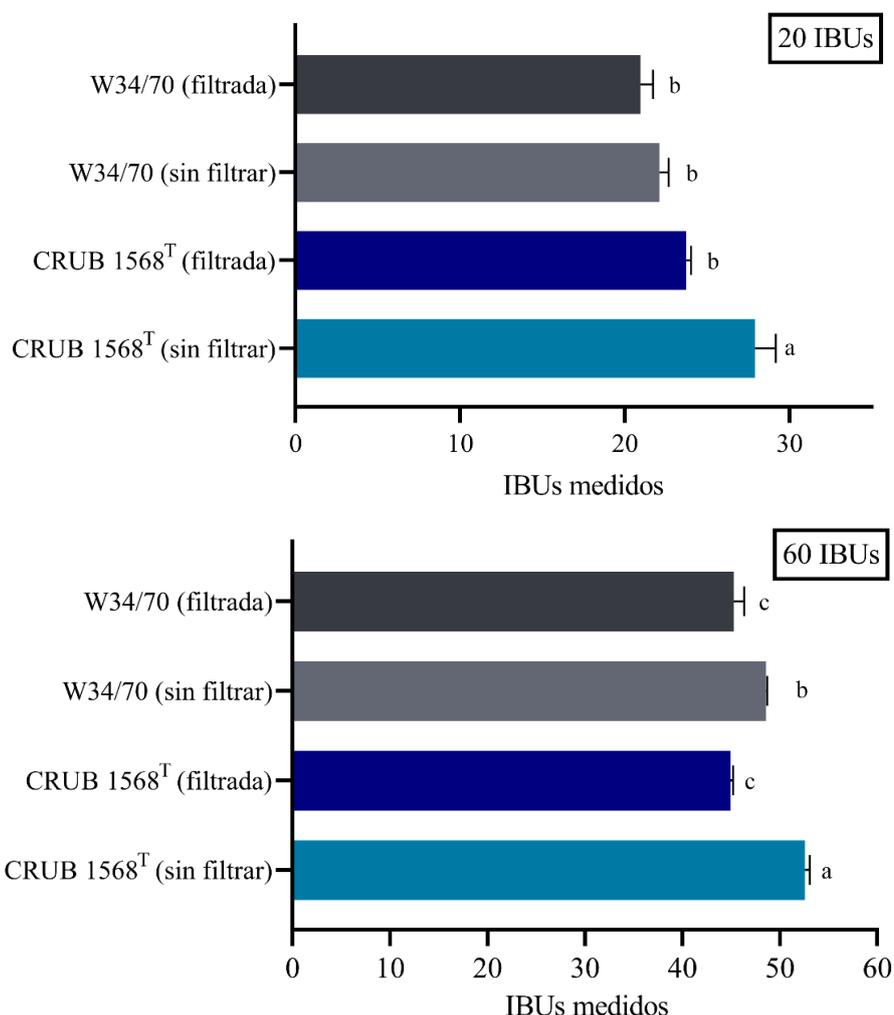


Figura 4.5. IBUs medidos para muestras filtradas y sin filtrar de *S. eubayanus* CRUB 1568^T y la cepa control, en las condiciones 20 IBUs (arriba) y 60 IBUs (abajo). Letras diferentes representan diferencias entre las cepas y tratamientos para cada condición ($p < 0,05$).

4.3.2. Impacto de *S. eubayanus* en el amargor de la cerveza

Al evaluar las características fermentativas de las cepas ensayadas en mosto Pale Ale (IBU teórico de 30) proveniente de una microcervecera local, se observó que todas las levaduras ale comerciales (Tabla 4.1) presentaron un comportamiento similar, excepto la cepa Windsor; esta última presentó una mayor velocidad de fermentación, pero una producción de CO₂, atenuación y producción de etanol 15 % menor al promedio del resto de las cepas cerveceras (Figura 4.6, Tabla 4.5), relacionado con la incapacidad de la cepa Windsor de consumir la maltotriosa presente en el mosto (Figura 4.7, Tabla 4.1). El resto de las cepas cerveceras consumieron la maltotriosa en su totalidad (Figura 4.7).

CAPÍTULO 4. *S. EUBAYANUS* Y SU INTERACCIÓN CON EL LÚPULO

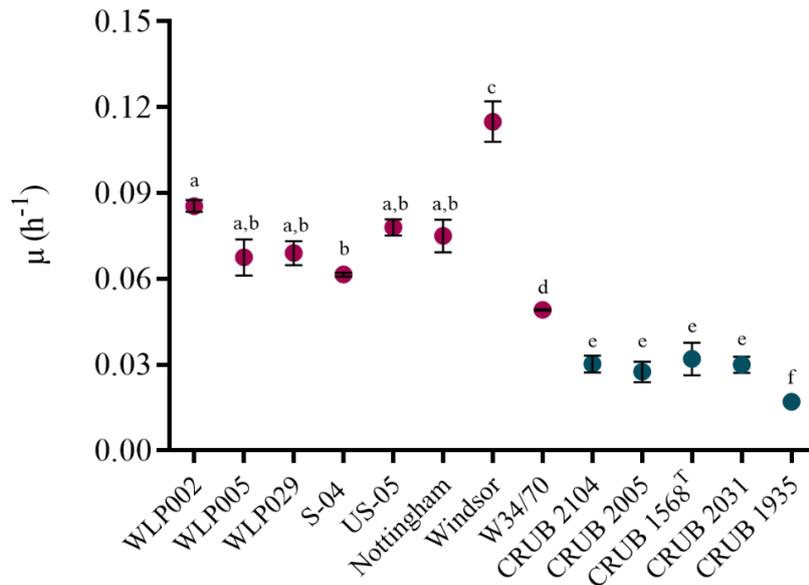


Figura 4.6. Velocidad de fermentación de las cepas cerveceras (rosa) y las cepas de *S. eubayanus* (azul) en mosto cervecerero estilo Pale Ale.

Tabla 4.5. Parámetros fermentativos de las cepas ensayadas en mosto cervecerero estilo Pale Ale a 10 °C (arriba) y 20 °C (abajo).

| Fermentación 10 °C | | | | | | | |
|---------------------|--------------------------|--------------------------|---------------------------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| | CRUB 2104 | CRUB 2031 | CRUB 1568 ^T | CRUB 2005 | CRUB 1935 | W34/70 | |
| CO ₂ (g) | 3,10 ± 0,08 ^c | 3,01 ± 0,20 ^c | 3,07 ± 0,04 ^c | 3,05 ± 0,02 ^c | 1,99 ± 0,01 ^d | 3,91 ± 0,01 ^a | |
| Atenuación (%) | 62,8 ± 0,2 ^c | 62,9 ± 0,1 ^c | 62,9 ± 0,9 ^c | 63,6 ± 1,0 ^{b,c} | 48,3 ± 2,1 ^d | 80,2 ± 0,1 ^a | |
| Etanol (% v/v) | 3,35 ± 0,12 ^b | 3,33 ± 0,15 ^b | 3,35 ± 0,13 ^b | 3,46 ± 0,04 ^b | 2,61 ± 0,19 ^c | 4,17 ± 0,17 ^a | |
| Fermentación 20 °C | | | | | | | |
| | WLP002 | WLP005 | WLP029 | US-05 | S-04 | Nottingham | Windsor |
| CO ₂ (g) | 4,15 ± 0,10 ^a | 4,02 ± 0,15 ^a | 4,21 ± 0,11 ^a | 4,28 ± 0,11 ^a | 4,20 ± 0,08 ^a | 4,04 ± 0,08 ^a | 3,57 ± 0,09 ^b |
| Atenuación (%) | 80,2 ± 0,1 ^a | 79,5 ± 1,1 ^a | 78,7 ± 0,1 ^b | 79,5 ± 1,1 ^a | 77,3 ± 0,1 ^a | 78,7 ± 0,1 ^a | 67,3 ± 2,1 ^b |
| Etanol (% v/v) | 4,09 ± 0,24 ^a | 4,17 ± 0,09 ^a | 4,18 ± 0,017 ^a | 4,21 ± 0,05 ^a | 3,94 ± 0,08 ^a | 4,21 ± 0,16 ^a | 3,50 ± 0,01 ^b |

Las fermentaciones se realizaron por triplicado (n = 3). Se utilizó el ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para evaluar estadísticamente las diferencias significativas. Letras diferentes representan diferencias entre todas las cepas para cada parámetro (p < 0,05).

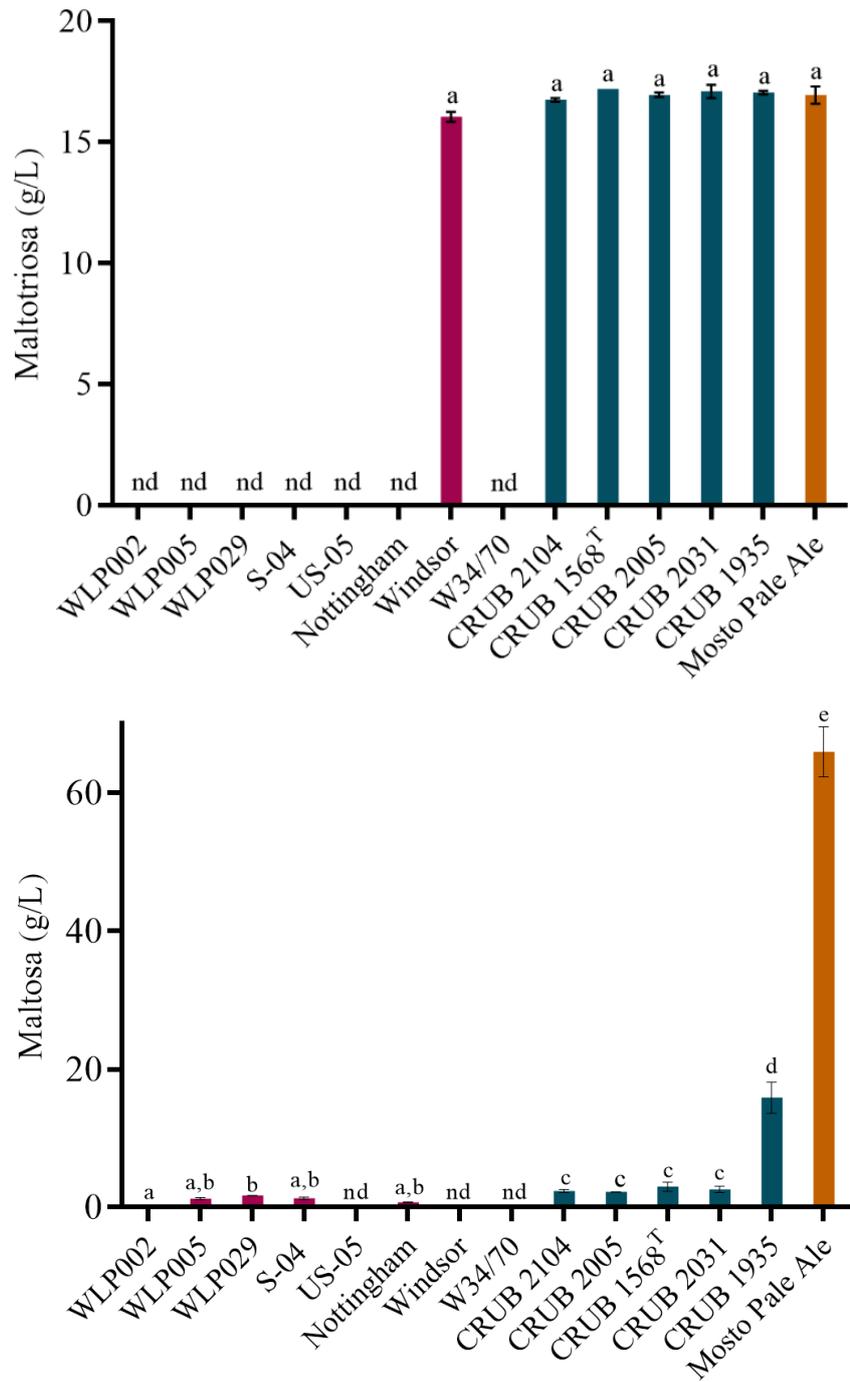


Figura 4.7. Maltotriosa residual (arriba) y maltosa residual (abajo) de las cepas cerveceras (rosa) y las cepas de *S. eubayanus* (azul) en mosto cervecerero estilo Pale Ale.

La cepa lager W34/70 presentó un comportamiento fermentativo similar a las cepas cerveceras ale (Tabla 4.5), excepto en su velocidad de fermentación (45 % menor) (Figura 4.6); sin embargo, hay que tener en cuenta que fue fermentada a 10 °C (temperatura de fermentación lager). Todas las cepas de *S. eubayanus* presentaron un comportamiento fermentativo

disminuido en relación al control lager (10 °C) y a las cepas cerveceras ale, siendo la cepa CRUB 1935 aquella con la menor capacidad fermentativa (Figura 4.6, Tabla 4.5). Ninguna de las cepas de *S. eubayanus* fue capaz de consumir la maltotriosa y la cepa CRUB 1935 fue la que presentó un mayor contenido de maltosa residual, relacionado con una menor atenuación y una producción de etanol reducida (Tabla 4.5, Figura 4.7). Esto mismo fue observado y discutido en el Capítulo 2.

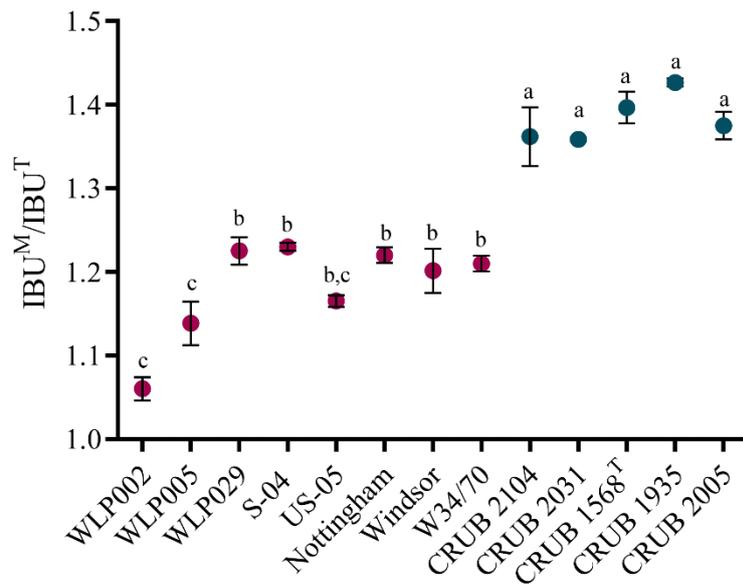


Figura 4.8. Relación entre los IBUs medidos (IBU^M) y los IBUs teóricos (IBU^T) para las cepas cerveceras (rosa) y las cepas de *S. eubayanus* (azul) en mosto cervecero estilo Pale Ale.

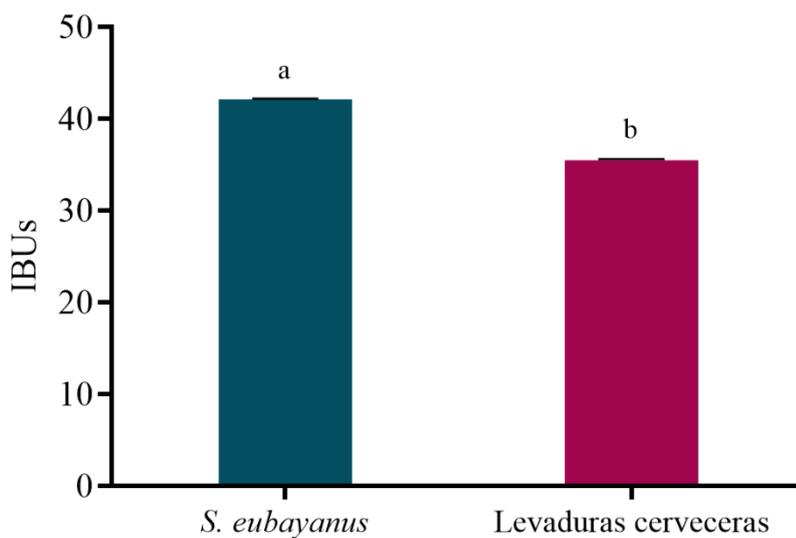


Figura 4.9. Promedio de IBUs medidos para las cepas de *S. eubayanus* (azul) y las cepas cerveceras (rosa).

Con los valores de IBUs obtenidos luego de cada fermentación, se calculó la relación entre los mismos y los IBUs teóricos calculados para el mosto Pale Ale (30 IBUs) (Figura 4.8). Para todas las cepas se observa una relación mayor a 1. Las cepas WLP002 y WLP005 fueron las que presentaron medidas de IBUs más cercanas al teórico (relación $1,06 \pm 0,01$ y $1,14 \pm 0,03$, respectivamente). Por su parte, los IBUs obtenidos para cervezas fermentadas con *S. eubayanus* resultaron mayores en un 18 % que para las cepas cerveceras (Figura 4.8, Figura 4.9), similar a lo observado en la sección 4.3.1.

Cuando los panelistas evaluaron sensorialmente las muestras, en general para las cepas cerveceras se percibió un amargor medio (Figura 4.10) de persistencia agradable (Figura 4.11). Por el contrario, las cervezas producidas por las cepas de *S. eubayanus* presentaron un amargor medio-alto, de persistencia no agradable (Figura 4.10, Figura 4.11), en algunos casos con comentarios de un amargor descripto como áspero.

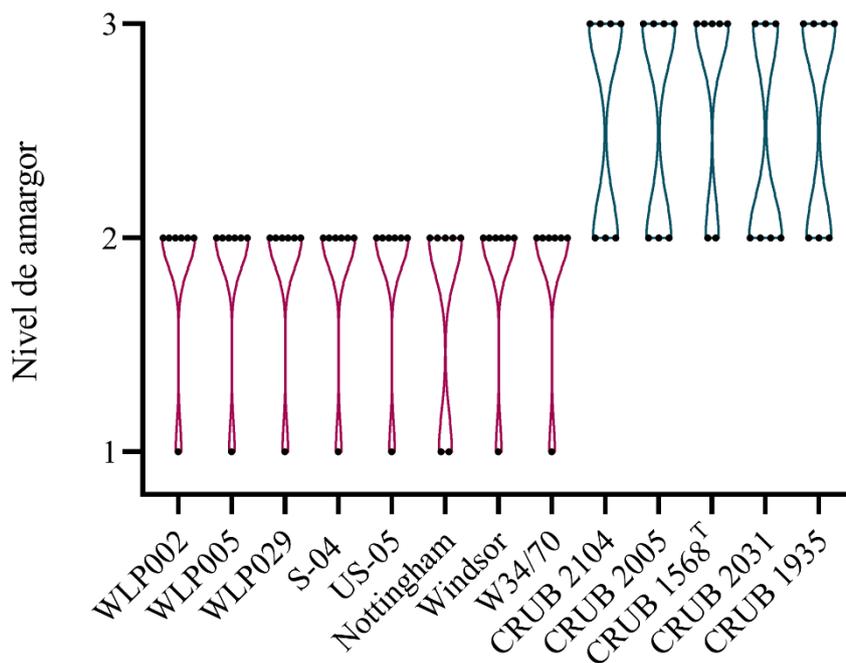


Figura 4.10. Nivel de amargor puntuado por 7 panelistas (puntos negros) en las fermentaciones de mosto Pale Ale, para las levaduras cerveceras evaluadas (rosa) y las cepas de *S. eubayanus* (azul). Niveles de amargor. 1 = Bajo – 2 = Medio – 3 = Alto.

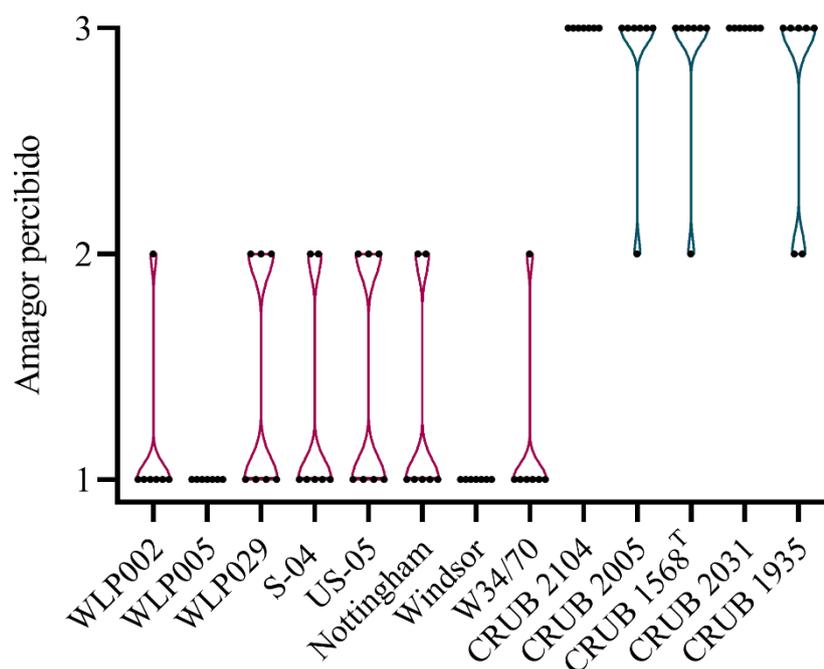


Figura 4.11. Calidad del amargor percibido por 7 panelistas (puntos negros) en fermentaciones de mosto Pale Ale, para las levaduras cerveceras evaluadas (rosa) y las cepas de *S. eubayanus* (azul). Tipo de amargor percibido: 1 = Persistencia agradable – 2 = Limpio – 3 = Persistencia no agradable.

4.4. Discusión

El mosto cervecero (a partir de cebada malteada, lúpulo y agua) contiene todos los nutrientes que la levadura necesita para la fermentación, excepto oxígeno y zinc (que son adicionados) (Priest & Stewart, 2006; White & Zainasheff, 2010). En este punto, el lúpulo parece jugar un rol influyente, ya que cuando evaluamos el mosto congreso (sin lúpulo adicionado) en relación a mostos con lupulado leve (20 IBUs) e intenso (60 IBUs) en hervor, se observó un incremento en la velocidad de fermentación, junto con tiempos más cortos de fermentación tanto para *S. eubayanus*, como para la levadura cervecera lager W34/70. Junto con esta mejora fermentativa se observa un aumento de la biomasa celular luego de finalizadas las fermentaciones. Klindukhova et al. (2009) también observaron un efecto estimulante del lúpulo sobre el crecimiento de una cepa de *S. cerevisiae*. En su trabajo, encontraron que adiciones de 1 % p/v de extracto acuoso de lúpulo granulado y de extracto de lúpulo en CO₂ al medio nutritivo condujeron, respectivamente, a un aumento del 25 y 30 % de la tasa de crecimiento y del 20 y 30 % de producción de biomasa, en relación al control sin lupular. Asimismo, observaron una mejora en el poder leudante de la levadura. Los autores atribuyen el efecto estimulante de los

productos del lúpulo a una contribución de azúcares incluidos en su composición: rafinosa, estaquiosa, fructosa, glucosa, sacarosa; de vitaminas: tiamina, ácidos nicotínico, ascórbico y pantoténico, biotina y piridoxina; y de aminoácidos y minerales; que servirían como fuente adicional de energía necesaria para la reproducción y actividad de la levadura (Klindukhova et al., 2009). En este punto, pudimos evaluar el nitrógeno total y amino libre, el carbono total y los minerales calcio, magnesio y zinc (Tabla 4.6). Si bien se observa una tendencia de los mostos lupulados a presentar un mayor contenido de nitrógeno total y amino libre, este aporte no resulta significativo. Además, tanto el mosto sin lupular, como lupulado, presentan valores de FAN por encima del mínimo requerido (140-160 ppm) para una óptima reproducción y fermentación por parte de las levaduras cerveceras en general (Annemuller et al., 2011; Evans et al., 2011; Layfield, 2016; Schmitt & Budde, 2012), y de *S. eubayanus* en particular (Origone, 2018). Los valores de carbono total, magnesio y zinc tampoco variaron entre mostos. Sólo se observó un aumento del 57 % en el contenido de calcio en los mostos lupulados. En la elaboración de cerveza, el calcio suele ser adicionado (en forma de sales de cloruro, sulfato y/o carbonato) durante el proceso de maceración para regular el pH y para asegurar el óptimo funcionamiento de las enzimas involucradas (sección 1.1.2) (Priest & Stewart, 2006; White & Zainasheff, 2010). Su rol más importante en relación a las levaduras y la fermentación, es el de promover y mejorar la floculación (Priest & Stewart, 2006; Stewart, 2017; White & Zainasheff, 2010); y, si bien se encuentra implicado en la modulación del crecimiento y el progreso a través del ciclo celular, las concentraciones requeridas son pequeñas (típicamente menos de 10 μ M), por lo que normalmente no resulta un factor limitante para el crecimiento de la levadura y la fermentación en mostos a base de malta de cebada (Briggs et al., 2004; White & Zainasheff, 2010). Resultaría interesante entonces evaluar el aporte por parte del lúpulo de otros compuestos (vitaminas, factores de crecimiento), que pudieran promover el crecimiento y la aptitud fermentativa de las levaduras cerveceras (Briggs et al., 2004; Lynes & Norms, 1948; Perli et al., 2020).

Tabla 4.6. Contenido (ppm) de nitrógeno total, nitrógeno amino libre (FAN), carbono total, calcio, magnesio y zinc en los mostos utilizados.

| | Mosto S/L | Mosto C/L (20 IBUs) | Mosto C/L (60 IBUs) |
|------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| Nitrógeno (mg/L) | 1060 ± 71 ^a | 1146 ± 64 ^a | 1158 ± 50 ^a |
| FAN (mg/L) | 210,2 ± 9,1 ^a | 219,0 ± 10,2 ^a | 222,1 ± 9,8 ^a |
| Carbono (mg/L) | 64073 ± 1635 ^a | 64647 ± 2030 ^a | 65142 ± 2120 ^a |
| Calcio (mg/L) | 9,85 ± 0,01 ^b | 16,9 ± 0,1 ^a | 17,5 ± 0,1 ^a |
| Magnesio (mg/L) | 135,1 ± 0,1 ^a | 138,8 ± 0,1 ^a | 136,7 ± 0,1 ^a |
| Zinc (mg/L) | 0,21 ± 0,01 ^a | 0,22 ± 0,01 ^a | 0,22 ± 0,03 ^a |

S/L indica mosto sin lupular. C/L indica mosto lupulado. Se utilizó el ANOVA de una vía y la prueba de Tukey para evaluar estadísticamente las diferencias significativas (n = 3). Letras diferentes en cada fila representan diferencias entre mostos (p < 0,05).

Si bien el crecimiento celular y los parámetros fermentativos se vieron aumentados en presencia de lúpulo, la viabilidad de las células al final de la fermentación resultó afectada de manera negativa, siendo este efecto mayor al aumentar los IBUs. De igual manera, Edgerton (2005) encontró que levaduras cosechadas de cervezas con IBUs altos presentaron viabilidades disminuidas; así como Bryant (2019) que observó una disminución en la viabilidad de *S. cerevisiae* WLP001 a lo largo de 8 reutilizaciones en mostos lupulados. En ambos casos el impacto fue más significativo a medida que se aumentaba el nivel de IBUs. En un estudio de tolerancia de *S. cerevisiae* a los iso- α -ácidos del lúpulo, observaron que la adición de iso- α -ácidos reducía la biodisponibilidad del zinc (Hazelwood et al., 2010). El zinc es un cofactor importante para la estructura y función de diversas enzimas importantes relacionadas con el crecimiento y metabolismo fermentativo (ej. alcohol deshidrogenasa) de las levaduras (Priest & Stewart, 2006; White & Zainasheff, 2010). Hazelwood et al. (2010) también observaron que la integridad de las membranas celulares y las vacuolas se vieron comprometidas, ya que ambas estructuras retenían compuestos del lúpulo, inhibiendo parcialmente el transporte intercelular. Se concluyó que estos factores podrían presentar consecuencias negativas para las cepas de levaduras cerveceras, especialmente aquellas pensadas para su reutilización (Hazelwood et al., 2009). En todos los casos, la presencia de iso- α -ácidos se asoció a un factor de estrés (Bryant, 2019; Edgerton, 2005; Hazelwood et al., 2010). En condiciones desfavorables, las levaduras inducen una respuesta (activación de la Respuesta General al Estrés, discutido en la Sección 3.4) que desencadena distintas reacciones: aumento de la trehalosa de la pared celular, del

CAPÍTULO 4. *S. EUBAYANUS* Y SU INTERACCIÓN CON EL LÚPULO

glucógeno de reserva y/o de la producción de glicerol (Duskova et al., 2015; Gibson et al., 2007; Hohmann & Mager, 2003; Ruis & Schüller, 1995). En este trabajo, se registró un aumento en los valores de glicerol producido por *S. eubayanus* en presencia de lúpulo, que se vio incrementado al aumentar el nivel de IBUs. Para la cepa lager, este efecto fue observado sólo en presencia de 60 IBUs. Al tratarse de una cepa cervecera domesticada, se encuentra adaptada al medio conteniendo iso- α -ácidos; sin embargo, suele tratarse de niveles que no superan los 30 IBUs, por lo que es posible que a valores mayores el efecto negativo de los iso- α -ácidos se haga evidente.

Por su parte, cuando se realizó la medición de IBUs de las cervezas producidas (en ambos ensayos, secciones 4.2.1 y 4.2.2), las cepas de *S. eubayanus* presentaron valores más altos que las levaduras cerveceras, percibido incluso a nivel sensorial. En general, la medición de IBUs es una herramienta fuertemente correlacionada con el amargor percibido sensorialmente (Hahn et al., 2018; Priest & Stewart, 2006); excepto en cervezas lupuladas en fermentación y/o maduración (*dry-hopping*) donde, como se explicó en la sección 4.1, el aporte del amargor no proviene de los α - e iso- α -ácidos, sino de compuestos de oxidación como las humulinonas y huluponas (Algazzali & Shellhammer, 2016; Maye et al., 2016). Los compuestos de amargor presentes en la cerveza pueden resultar mayores o menores dependiendo de las recetas y procesos de producción. Su pérdida o aumento, está relacionado con las diferentes etapas de elaboración, como el hervor, la maduración, el *dry-hopping* y la fermentación (Ganz, 2022; Hall, 1997; Hieronymus, 2012; Jaskula et al., 2009). En particular, durante la fermentación se producen pérdidas de amargor debido a que los iso- α -ácidos, al ser tensioactivos, son llevados a la superficie por burbujas de dióxido de carbono, resultando en una concentración considerable de estos compuestos en la espuma (*krausen*) formada durante la fermentación (Briggs et al., 2004; Dixon, 1967; Hall, 1997; Laws et al., 1972). Asimismo, los iso- α -ácidos se adsorben a la superficie de las células de levaduras y son eliminados del líquido cuando las mismas flocculan y/o sedimentan (Briggs et al., 2004; Hazelwood et al., 2010; Popescu et al., 2013). La pérdida puede depender de la cantidad de levadura inoculada (Montagnana Vicente Leme, 2017), del tipo de levadura (Hough & Hudson, 1961; Kumar, 2019; Montagnana Vicente Leme, 2017; Prahl, 2017) y el tiempo que la misma permanece en suspensión (Garetz, 1994). En este punto, encontramos una mayor cantidad de células en suspensión en las cervezas fermentadas con *S. eubayanus*, incapaz de floccular (Eizaguirre, 2019; Krogerus et al., 2015); cuando las mismas fueron filtradas, los IBUs medidos disminuyeron, lo que podría indicar que

CAPÍTULO 4. *S. EUBAYANUS* Y SU INTERACCIÓN CON EL LÚPULO

las células en suspensión tienen un impacto en el grado de amargor y en el amargor percibido en las fermentaciones llevadas a cabo por *S. eubayanus*. En relación al tipo de levaduras, las distintas cepas cerveceras ensayadas presentaron diferencias en los IBUs medidos partiendo del mismo mosto, coincidente con lo observado en otros estudios (Hough & Hudson, 1961; Kumar, 2019; Montagnana Vicente Leme, 2017; Prahl, 2017).

La selección de la levadura resulta esencial en la elaboración de cerveza ya que determina el tipo de cerveza producida y tiene un gran impacto en el perfil sensorial final. En general, la selección de la cepa que se va a utilizar para la producción de un determinado estilo se basa en características como el perfil de ésteres, la floculación, la tolerancia al alcohol y la atenuación; mientras que los IBUs y la percepción del amargor no son tenidos en cuenta. En este trabajo se muestra que resulta necesario cuantificar el efecto de la cepa de levadura sobre el amargor, sobre todo en cepas nuevas, para predecir con precisión el perfil final de la cerveza. Una adecuada formulación de receta, en el caso de la levadura salvaje *S. eubayanus*, resulta de importancia ya que excesos de lupulado en hervor resultan en una percepción de amargo áspero que disminuye la aceptabilidad y tomabilidad del producto final. La formulación de recetas con bajo lupulado, o con técnicas de lupulado que disminuyan el contenido de compuestos de amargor, pero realcen características de sabor y aroma, resultarían en buenas estrategias para la aplicación de *S. eubayanus* en el sector productivo.

CAPÍTULO 5

ESCALADO DE *S. eubayanus*

Capítulo 5.

Escalado de *S. eubayanus* y su comportamiento fermentativo

5.1. Introducción

Como hemos visto, para lograr la transferencia de una levadura nueva a la industria, resulta necesario transitar un camino previo de pruebas y experimentos de selección de cepas y aptitud para su aplicación. En general, en los estudios dirigidos al uso de levaduras no convencionales para la elaboración de cerveza se evalúan características tales como el uso de azúcares del mosto (glucosa, maltosa y maltotriosa), el desempeño fermentativo (velocidad de fermentación, atenuación, fase de latencia), la osmotolerancia, la tolerancia al etanol, el desempeño a bajas temperaturas, la tolerancia a los compuestos del lúpulo, el metabolismo de los aminoácidos, la producción de fenoles volátiles (fenotipo POF) y la producción de compuestos diferenciales de sabor y aroma, así como la síntesis de enzimas que influyen en las propiedades organolépticas de la cerveza (como las β -glucosidasas y glucoamilasas). Una vez que se ha/n seleccionado la/s cepa/s a escala laboratorio, se requieren estudios posteriores para comprender el comportamiento de estas levaduras no convencionales en el ambiente fermentativo cervecero y conocer sus posibles usos en diferentes estilos de cerveza (Canónico et al., 2020; Cubillos et al., 2019; Johansson, 2020; King & Richard Dickinson, 2000; Michel et al., 2016). Sin embargo, es necesario tener precaución a la hora de predecir o suponer cómo será el comportamiento de la levadura en fábrica, en base a las conclusiones extraídas de experimentos de laboratorio o fermentaciones de mosto a pequeña escala. Durante la fermentación industrial, las cepas de levadura están expuestas a otro tipo de fluctuaciones en la concentración de oxígeno, el potencial osmótico, la presión hidrostática, el pH, la concentración de etanol, la disponibilidad de nutrientes y la temperatura, entre otros. Como organismos unicelulares, las levaduras desarrollan distintos mecanismos para hacer frente a estos cambios ambientales, por lo que diferencias en el comportamiento fisiológico y metabólico en respuesta a la transición de escala deben ser considerados. Es así, que el escalado hasta el nivel de producción industrial resulta en una transición crítica previo a la transferencia exitosa del microorganismo y su tecnología asociada, y al lanzamiento del producto de interés al mercado (Canónico et al., 2020; Fu et al.,

2014; Gibson et al., 2007; Johansson, 2020). Actualmente, los casos de especies de levaduras salvajes para la producción de cerveza son limitados tanto en el segmento industrial, como en el artesanal. Como ejemplos comerciales se mencionan la levadura WildBrew™ Philly Sour (Lallemand), una cepa del género *Lachancea* aislada de la naturaleza por la Universidad de las Ciencias de Filadelfia; la especie *Metschnikowia reukaufii* (The Yeast Bay), aislada de flores en las colinas de Berkeley en California; y cepas de *Lachancea* de Lachancea LLC, que fueron aisladas de avispas y abejas. Por su parte, las cepas de *Torulaspora delbrueckii* Prelude™ (Chr. Hansen) y Biodivia™ (Lallemand Inc), comercializadas para su uso en vino, también están siendo estudiadas para su aplicación en cerveza (Burini et al., 2021a; González Flores et al., 2022). A lo largo de esta tesis, fueron ejecutadas distintas etapas para el estudio y aplicación de *S. eubayanus* en la producción de cerveza, siendo el objetivo de este último capítulo el de evaluar su comportamiento fermentativo a mayor escala en vistas de su transferencia al sector productivo.

5.2. Materiales y métodos

5.2.1. Comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* a escala semi-piloto

Se evaluó el comportamiento fermentativo de la cepa de *S. eubayanus* CRUB 1568^T a escala de 20-50 L. Previo a su uso, se cultivó y se mantuvo en agar YPD, y fue propagada en las condiciones desarrolladas en el Capítulo 3. Para su inoculación, el número de células y la viabilidad fueron determinados mediante tinción con violeta de metileno alcalino con microscopio (Olympus CX22LED) y cámara de Neubauer (Smart et al., 1999). Las fermentaciones fueron realizadas en una microcervecería local, en fermentador cilindro-cónico de 50 L de capacidad, con aislación térmica y control de temperatura. La oxigenación se realizó en el fermentador con piedra oxigenadora de tamaño de poro de 0,45 µm, y se midió con medidor portátil Hach (HQ30D) con sensor de oxígeno disuelto luminiscente (Figura 5.1). Se utilizaron dos estilos de mosto (pilsner y brown) provenientes del bloque de cocción de la misma cervecería. Las características de las fermentaciones se encuentran detalladas en la Tabla 5.1.



Figura 5.1. Fermentador cilindro-cónico utilizado en las fermentaciones a escala semi-piloto.

Tabla 5.1. Condiciones iniciales de las fermentaciones realizadas con *S. eubayanus* CRUB 1568^T a escala semi-piloto.

| Estilo | Volumen (L) | Densidad inicial (°P) | IBUs | pH | Oxígeno (ppm) | Temperatura (°C) | Tasa de inóculo (cel/mL) |
|---------|-------------|-----------------------|------|------|---------------|------------------|--------------------------|
| Pilsner | 20 | 12,4 | 20 | 5,15 | 14 | 10 | 2,0 x 10 ⁶ |
| Brown | 40 | 12,4 | 30 | 5,21 | 16 | 12 | 1,5 x 10 ⁶ |

La cinética de fermentación fue monitoreada a través de mediciones continuas de densidad (densímetro escala simple 0,990-1,100), que fueron expresadas en grados Plato (°P). Los datos se ajustaron a la función de decaimiento exponencial de una fase (*one-phase exponential decay function*, GraphPad Prism) y se obtuvieron los parámetros cinéticos asociados. La atenuación aparente se determinó como la diferencia entre la densidad inicial del mosto (DI) y la final en

el sobrenadante de la fermentación (DF), y fue expresada como porcentaje de atenuación (%) (White & Zainasheff, 2010):

$$[(DI-DF)/(DI-1)] \times 100$$

El alcohol producido (% v/v) se calculó a partir de la ecuación (Papazian, 2003):

$$(DI-DF) \times 105 \times 1.25$$

El pH inicial y final se determinó mediante medidor de pH portátil con compensación de temperatura (Apera, PH60 Premium).

5.2.2. Comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* a escala productiva

La cepa CRUB 1568^T fue utilizada para producir cerveza en tres microcervecerías locales. El cultivo iniciador de levadura se propagó en el laboratorio hasta un volumen de 20 L, siguiendo el protocolo de propagación y condiciones definidas en el Capítulo 3. Para la última etapa de propagación, se llevó a cabo una propagación ‘*in situ*’ en fábrica. Este paso consistió en escalar la propagación dentro del mismo fermentador dónde se producirá la cerveza final. Un 15 % del volumen final de *batch*, utilizando un mosto similar al del lote a producir, fue inoculado con la levadura proveniente de la propagación en laboratorio, y se mantuvo continuamente aireado con aire estéril por 24-48 h. Una vez terminada la propagación, el fermentador fue llenado con el mosto correspondiente a la producción de la cerveza final. El mismo fue oxigenado en línea desde el enfriador hasta el fermentador, midiéndose el oxígeno disuelto (Hach HQ30D). Las características de los mostos y las fermentaciones en cada una de las microcervecerías se presentan en la Tabla 5.2.

Tabla 5.2. Condiciones iniciales de las fermentaciones realizadas con *S. eubayanus* CRUB 1568^T en tres microcervecerías que produjeron cervezas lager basadas en recetas estilo pilsner.

| Cervecería | Volumen (L) | Densidad inicial (°P) | IBUs | Oxígeno (ppm) | Temperatura (°C) | Tasa de inoculación (cel/mL) |
|------------|-------------|-----------------------|------|---------------|------------------|------------------------------|
| A | 1500 | 11,4 | 15 | 8,5 | 10 | 1,56x10 ⁶ |
| B | 1200 | 12,4 | 16 | 10,3 | 11 | 1,52x10 ⁶ |
| C | 1000 | 11,4 | 17 | 10,0 | 11 | 1,46x10 ⁶ |

La cinética de fermentación, la atenuación y el pH fueron evaluados de la misma manera que en la sección anterior (5.2.1). Por su parte, se determinó el consumo de maltotriosa, maltosa, glucosa, y el etanol y glicerol producidos por HPLC (ver sección 2.2.3).

5.2.3. Evaluación de la oxigenación como estrategia de aplicación a escala productiva

Se decidió evaluar el impacto del oxígeno y la aireación sobre la capacidad fermentativa de la cepa CRUB 1568^T a escala laboratorio. Por un lado, se estudió el efecto de la concentración de oxígeno al inicio de la fermentación, evaluándose 3 (sin oxigenar), 8, 16, 20 y 35 ppm de oxígeno (medidos con oxímetro Hach HQ30D, Figura 5.2). Por otro lado, se evaluó el efecto de la aireación en diferentes estadios de la fermentación manteniendo en agitación (160 rpm en agitador orbital Dragonlab) el sistema durante: 0 (estático), 12, 24, 48 y 72 h. En todos los casos, las fermentaciones fueron llevadas a cabo a 10 °C en 150 mL de mosto congreso con agregado de zinc (0.3 ppm). La levadura fue propagada en las condiciones descritas (Capítulo 3) e inoculada a una tasa de $1,5 \times 10^6$ células viables/mL (White & Zainasheff, 2010). La cinética de las fermentaciones fue monitoreada cada 12 h por pérdida de peso del sistema (liberación de CO₂) hasta peso constante, obteniéndose los parámetros cinéticos asociados (Lopes et al., 2007). La atenuación y el pH fueron evaluados de la misma manera que en las secciones anteriores.



Figura 5.2. Medición de oxígeno disuelto (ppm) en los mostos oxigenados ensayados.

En base a estos resultados, cuatro microcervecías locales que querían producir cervezas con *S. eubayanus* fueron asistidas para aplicar distintas estrategias de incorporación de oxígeno durante la fermentación, teniendo en cuenta las capacidades y recursos de cada una de ellas. La

propagación de la cepa CRUB 1568^T se llevó a cabo de acuerdo a lo desarrollado en el Capítulo 3, inoculando a una tasa de $1,5 \times 10^6$ cel viables/mL. La cinética de fermentación, la atenuación y el pH fueron evaluados de la misma manera que en la sección 5.2.1. Las características de las fermentaciones y la estrategia aplicada se detallan en la Tabla 5.3.

Tabla 5.3. Condiciones iniciales de las fermentaciones realizadas con *S. eubayanus* CRUB 1568^T en cuatro microcervecías y las estrategias de oxigenación aplicadas en cada una de ellas.

| Cervecería | Estilo | Volumen (L) | Densidad inicial (°P) | Oxígeno inicial (ppm) | Temperatura (°C) | Estrategia de oxigenación |
|------------|---------|-------------|-----------------------|-----------------------|------------------|---|
| D | Honey | 250 | 13,8 | 9,5 | 14 | Incorporación de 5 % de mosto oxigenado en el día 7 |
| E | Amber | 1000 | 12,4 | 15 | 10 | Doble <i>batch</i> de 500 L, ambos oxigenados |
| F | Pilsner | 500 | 12,4 | 16 | 12 | Pulso de oxígeno (45 min-2 L/min) a las 48 h |
| G | Pilsner | 700 | 11,2 | 12 | 11 | 4 pulsos de oxígeno (45min-2 L/min) cada 12 h |

5.3. Resultados

5.3.1. Comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* a escala semi-piloto

Cuando la cepa de *S. eubayanus* CRUB 1568^T fue evaluada a escala semi-piloto (20 y 40 L) en mostos provenientes de una cervecía, las fermentaciones tardaron 8 días en completarse (Figura 5.3), coincidente con los tiempos observados a escala laboratorio en mostos lupulados (Sección 4.3).

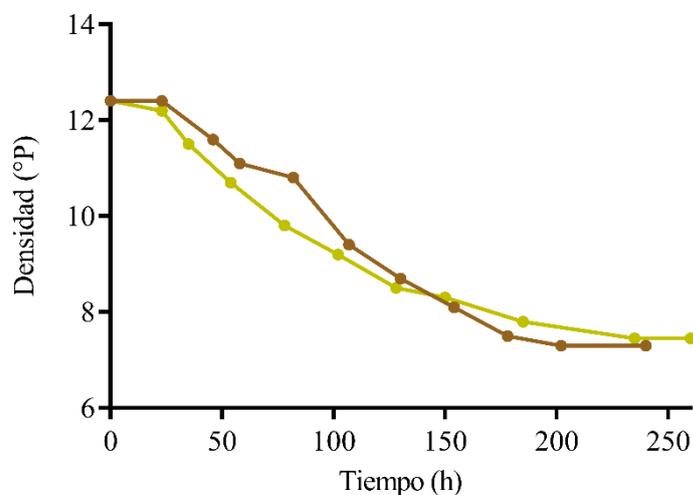


Figura 5.3. Curvas de fermentación de *S. eubayanus* CRUB 1568^T a escala semi-piloto en mosto pilsner (amarillo) y mosto brown (marrón).

Asimismo, los valores de atenuación y alcohol producido coincidieron con los reportados y evaluados previamente en las secciones 2.3 y 4.3 (Tabla 5.4). En el caso de la velocidad de fermentación, no resulta posible comparar los parámetros obtenidos a escala semi-piloto con las fermentaciones a escala laboratorio ya que, al tratarse de sistemas y métodos de medición distintos (caída de la densidad y liberación de CO₂, respectivamente), las ecuaciones de ajuste para la obtención de los parámetros fermentativos también resultan diferentes: ecuación de Gompertz en el caso de las fermentaciones a escala laboratorio y ecuación de decaimiento exponencial para las fermentaciones a mayores escalas.

Tabla 5.4. Parámetros fermentativos de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en fermentaciones a escala semi-piloto.

| | Pilsner (20 L) | Brown (40 L) | Promedio ± SD |
|--|----------------|--------------|----------------|
| Velocidad de fermentación (h ⁻¹) | 0,0075 | 0,0066 | 0,0071± 0,0006 |
| Atenuación (%) | 64,4 | 66,3 | 65,4 ± 1,3 |
| Alcohol (% v/v) | 3,95 | 4,19 | 4,10 ± 0,17 |
| pH | 4,35 | 4,47 | 4,41 ± 0,08 |

Como puede observarse, el comportamiento fermentativo resultó similar en ambos mostos y condiciones ensayadas: mosto pilsner en un volumen de 20 L y mosto brown en un volumen de 40 L.

5.3.2. Comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* a escala productiva

Aplicando la estrategia de propagación *in situ* en los fermentadores de cada microcervecería para la última etapa de propagación, se lograron obtener en 48 h valores de tasa de inóculo cercanos a los recomendados (White & Zainasheff, 2010) pudiéndose inocular volúmenes de 1000-1500 L (Tabla 5.2). En cuanto al comportamiento de la cepa CRUB 1568^T a escala productiva, las velocidades de fermentación obtenidas fueron similares para todos los ensayos, resultando disminuidas en un 57 % al compararlas con los valores de las fermentaciones a escala semi-piloto (Tabla 5.5 y ver Tabla 5.4).

Tabla 5.5. Parámetros de fermentación de las cervezas elaboradas con *S. eubayanus* CRUB 1568^T en tres microcervecerías.

| Cervecería | Velocidad de fermentación (h ⁻¹) | Atenuación (%) | Atenuación 12 días (%) | Maltotriosa residual (g/L) | Maltosa residual (g/L) | Etanol (% v/v) |
|-----------------------------|--|----------------|------------------------|----------------------------|------------------------|----------------|
| A | 0,0034 | 61,4 | 30,2 | 22,1 | 14,2 | 3,70 |
| B | 0,0027 | 52,1 | 28,3 | 23,5 | 34,2 | 3,79 |
| C | 0,0029 | 49,5 | 27,4 | 22,6 | 35,1 | 2,98 |
| Promedio ± SD | 0,0030 ± 0,0003 | 54,3 ± 6,3 | 28,6 ± 1,4 | 22,7 ± 0,7 | 27,8 ± 11,8 | 3,49 ± 0,44 |
| Promedio ± SD ^{SP} | 0,0071 ± 0,0006 | 65,4 ± 1,3 | 65,4 ± 1,3 | na | na | 4,10 ± 0,17 |

SP: Valores promedio y desviación estándar para los ensayos a escala semi-piloto a modo comparativo; na: no analizado. Los valores iniciales de maltosa y maltotriosa (g/L) por cervecería fueron: (A) 66,2 and 21,7; (B) 68,6 and 23,2; (C) 65,8 and 22,5.

Las fermentaciones tardaron más de 20 días en completarse (Figura 5.4), alrededor del doble de tiempo en comparación con las fermentaciones a escala de laboratorio y semi-piloto. Asimismo, la atenuación promedio al día 12 fue de 31,7 %, la mitad de lo obtenido para esta cepa en condiciones de laboratorio y semi-piloto. Los valores de atenuación más bajos son consistentes con un mayor contenido de maltosa residual en la cerveza final, con 2 a 4 veces más maltosa residual encontrada en fermentaciones a mayor escala (Tabla 5.5) en comparación con los ensayos a escala laboratorio (secciones 2.3 y 4.3). Tampoco se evidenció consumo de maltotriosa a escala productiva, similar a lo observado a lo largo de esta tesis para esta especie.

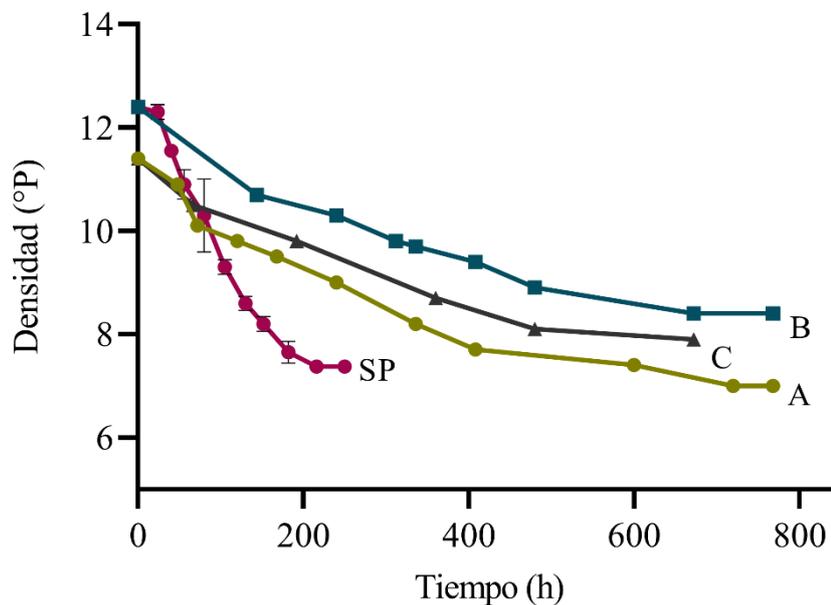


Figura 5.4. Cinética de fermentación de *S. eubayanus* CRUB 1568^T a escala productiva. Las fermentaciones se realizaron en tres microcervecías locales diferentes (A, B y C), que produjeron cervezas lager basadas en recetas estilo pilsner. Se incluyó el promedio de las fermentaciones a escala semi-piloto (sección 5.3.1) a modo comparativo (SP, en rosa).

5.3.3. Evaluación de la oxigenación como estrategia de aplicación a escala productiva

Para evaluar si la oxigenación podría resultar en un factor importante implicado en el rendimiento fermentativo a escala productiva, inicialmente se realizaron ensayos a escala laboratorio. Por un lado, el comportamiento fermentativo de la cepa CRUB 1568^T no se vio modificado por aumentos de la concentración de oxígeno al inicio de la fermentación a partir de los 8 ppm iniciales, observándose valores de μ , CO₂ total, atenuación y etanol producido similares para todos los mostos oxigenados (Tabla 5.6, Figura 5.5).

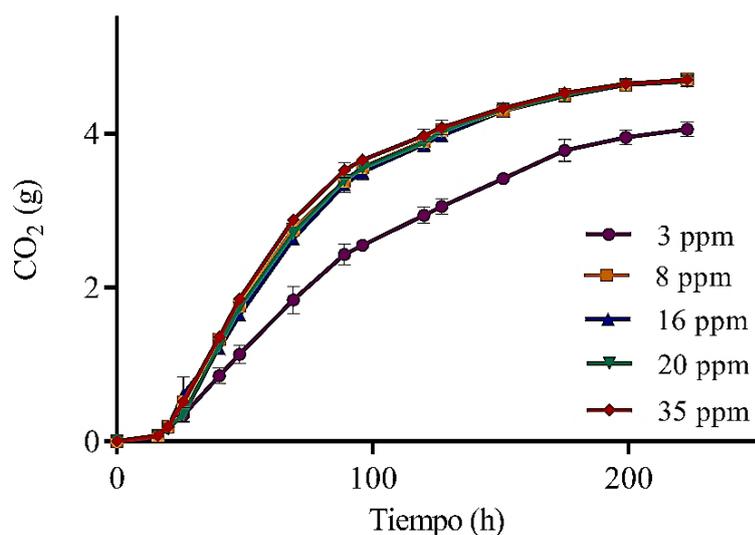


Figura 5.5. Influencia de la concentración inicial de oxígeno en el comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en mosto congreso (12,6 °P).

Por el contrario, la ausencia de oxigenación al inicio de la fermentación (valores de oxígeno \leq 3 ppm) tuvo un impacto negativo en la cinética fermentativa de la levadura, observándose una reducción en la velocidad de fermentación del 38 % en comparación con las condiciones oxigenadas. La atenuación y la producción de CO₂ no se vieron afectadas, pero sí se registró una leve disminución del pH en aquellas fermentaciones oxigenadas inicialmente (Tabla 5.6).

Tabla 5.6. Parámetros fermentativos de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en mosto congreso (12,6 °P) con distintas concentraciones de oxígeno inicial.

| | 3 ppm | 8 ppm | 16 ppm | 20 ppm | 35 ppm |
|--|--------------------------|-------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------------|
| Velocidad de fermentación (h ⁻¹) | 0,031 ± 0 ^b | 0,049 ± 0 ^a | 0,047 ± 0 ^a | 0,050 ± 0 ^a | 0,053 ± 0 ^a |
| Producción de CO ₂ (g) | 4,1 ± 0,1 ^a | 4,7 ± 0 ^a | 4,7 ± 0,1 ^a | 4,7 ± 0 ^a | 4,7 ± 0 ^a |
| Atenuación (%) | 67,1 ± 0,2 ^a | 67,1 ± 0,2 ^a | 67,1 ± 0,4 ^a | 67,2 ± 0,1 ^a | 67,1 ± 0,2 ^a |
| pH final | 4,36 ± 0,01 ^a | 4,28 ± 0 ^b | 4,29 ± 0,01 ^b | 4,29 ± 0,01 ^b | 4,25 ± 0 ^b |

Las fermentaciones se realizaron por triplicado (n = 3). Se utilizó el ANOVA de una vía y test de Tukey para evaluar estadísticamente las diferencias significativas. Letras diferentes en cada fila representan diferencias entre las condiciones para cada parámetro (p < 0,05).

Por su parte, al evaluar la aireación por agitación del sistema durante la fermentación (sección 5.2.3) pudo observarse una mejora en la velocidad de fermentación en las condiciones aireadas en relación a aquella sin airear (Figura 5.6), resultando esta mejora significativa a partir de las 48 h y 72 h de aireación, con un aumento de μ del 24 % y 42 % respectivamente (Tabla 5.7).

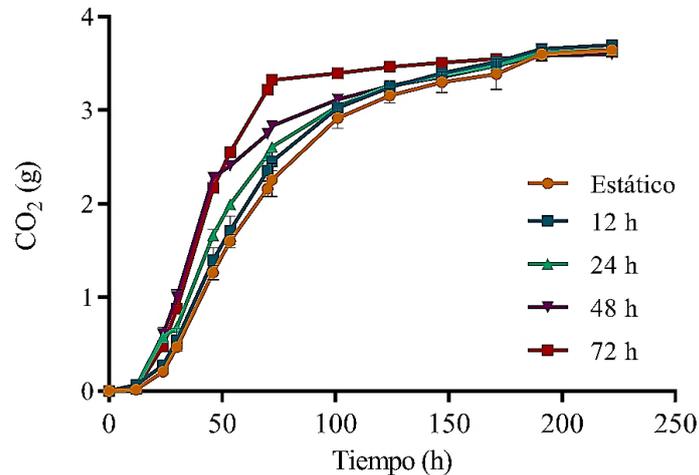


Figura 5.6. Efecto de distintos periodos de aireación por agitación en el comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en mosto congreso (12,2 °P) a escala laboratorio.

Al igual que lo observado para el ensayo de oxigenación inicial, la atenuación y la producción de CO₂ no se vieron afectadas en las distintas condiciones; pero sí se registró una disminución del pH en aquellas fermentaciones aireadas, resultando esta disminución mayor al aumentar el tiempo de aireación del sistema (Tabla 5.7).

Tabla 5.7. Parámetros fermentativos de *S. eubayanus* CRUB 1568^T bajo distintos estadios de aireación.

| | Estático | 12 h | 24 h | 48 h | 72 h |
|--|----------------------------|----------------------------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|
| Velocidad de fermentación (h ⁻¹) | 0,045 ± 0,004 ^c | 0,048 ± 0,001 ^c | 0,050 ± 0 ^c | 0,063 ± 0,003 ^b | 0,083 ± 0,001 ^a |
| Producción de CO ₂ (g) | 3,5 ± 0,1 ^a | 3,6 ± 0 ^a | 3,5 ± 0 ^a | 3,4 ± 0 ^a | 3,5 ± 0 ^a |
| Atenuación (%) | 63,9 ± 0,4 ^a | 63,9 ± 0,6 ^a | 64,2 ± 0,2 ^a | 63,2 ± 0,6 ^a | 63,9 ± 0,1 ^a |
| pH | 4,26 ± 0,01 ^a | 4,23 ± 0 ^a | 4,12 ± 0,01 ^b | 3,98 ± 0 ^c | 3,9 ± 0 ^d |

Las fermentaciones se realizaron por triplicado (n = 3). Se utilizó el ANOVA de una vía y test de Tukey para evaluar estadísticamente las diferencias significativas. Letras diferentes en cada fila representan diferencias entre las condiciones para cada parámetro (p < 0,05).

En base a estos resultados, para las siguientes fermentaciones realizadas con *S. eubayanus* en microcervecías, se resolvieron distintas estrategias de incorporación de oxígeno durante la fermentación teniendo en cuenta las posibilidades tecnológicas y recursos de cada una. La cervecía D fue la primera en realizar la producción y fermentó en un volumen de 250 L (Tabla 5.3); al tratarse de un volumen considerablemente menor al de las primeras microcervecías estudiadas (1000-1500 L, Tabla 5.2) se decidió evaluar el curso de la fermentación sin adiciones previas de oxígeno durante la fermentación. En este punto, se observó que a este volumen la capacidad fermentativa de *S. eubayanus* también se vio comprometida presentando una fermentación detenida a los 7 días en una densidad de 11,4 °P (Figura 5.7) (correspondiente a 31 % de atenuación, muy por debajo de la atenuación final esperada). Al no poder realizarse oxigenación directa en los fermentadores de esta fábrica, se decidió incorporar el oxígeno adicionando un 5 % de mosto (de receta similar al de la cerveza en fermentación) proveniente de otra cocción, previamente saturado de oxígeno por oxigenación en línea. Se logró de esta manera reanudar la fermentación, obteniéndose una atenuación final de 69 % luego de 7 días (Figura 5.7 y Figura 5.8 B). La cervecía E contaba con un bloque de cocción de 500 L, por lo que para llenar sus fermentadores de 1000 L requería de dos cocciones separadas (sistema de *batch* múltiple o *multifilling*). Se decidió entonces, separar ambos *batch* con 24 h de diferencia y que en ambos casos el mosto se incorpore oxigenado (Tabla 5.3). Con esta estrategia, se logró una fermentación completa de 66,3 % de atenuación en 15 días (Figura 5.7 y Figura 5.8 B). Por su parte, las fábricas F y G contaban con la opción de realizar incorporación de oxígeno puro directamente en el fermentador a través de una piedra oxigenadora (poro de 0,5 μm y 2 cm de largo), por lo que se decidió realizar pulsos de oxígeno puro en distintos puntos de la fermentación. En la fábrica F se realizó a las 48 h un único pulso de oxígeno de 45 min con un caudal de 2 L/min, lográndose completar la fermentación en 7 días con una atenuación del 64 %. Por su parte, en la fábrica G se aplicó un régimen de oxigenación de 4 pulsos cada 12 h de 45 min con un caudal de 2 L/min; en este caso, la fermentación se completó en 5 días con una atenuación final de 68 % (Figura 5.7 y Figura 5.8 B).

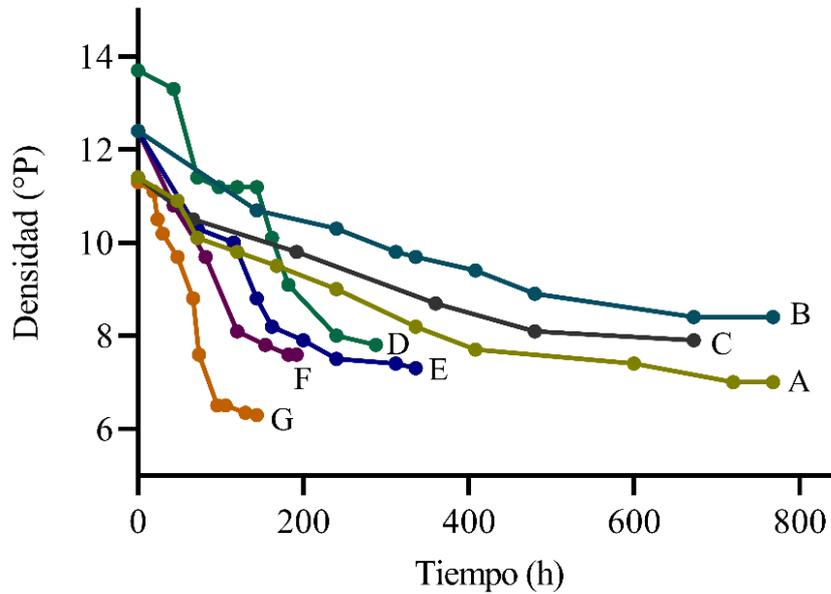


Figura 5.7. Impacto de diferentes estrategias de incorporación de oxígeno en la cinética de fermentación de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en cuatro microcervecías (D, E, F, G). A modo comparativo, se incluyeron las fermentaciones previas sin oxigenación (A, B y C; en sección 5.3.2).

En todos los casos, la velocidad de fermentación a escala productiva donde se aplicó algún tipo de estrategia de oxigenación superó a aquellas no oxigenadas (μ promedio 57 % mayor) (Figura 5.8 A). En este punto, no se consideró la fermentación de la fábrica D donde el μ no pudo ser calculado debido a que la meseta (*plateau*, Figura 5.7) generada por el detenimiento de la fermentación arrojó un error en el ajuste de la ecuación (no detectado, Figura 5.8 A). Asimismo, para las microcervecías donde se aplicaron estrategias de oxigenación fue posible obtener una atenuación 20 % mayor (en promedio) en un tiempo menor (10 días menos, en promedio), en comparación con aquellas dónde ningún tipo de estrategia fue aplicada (Figura 5.7 y Figura 5.8 B).

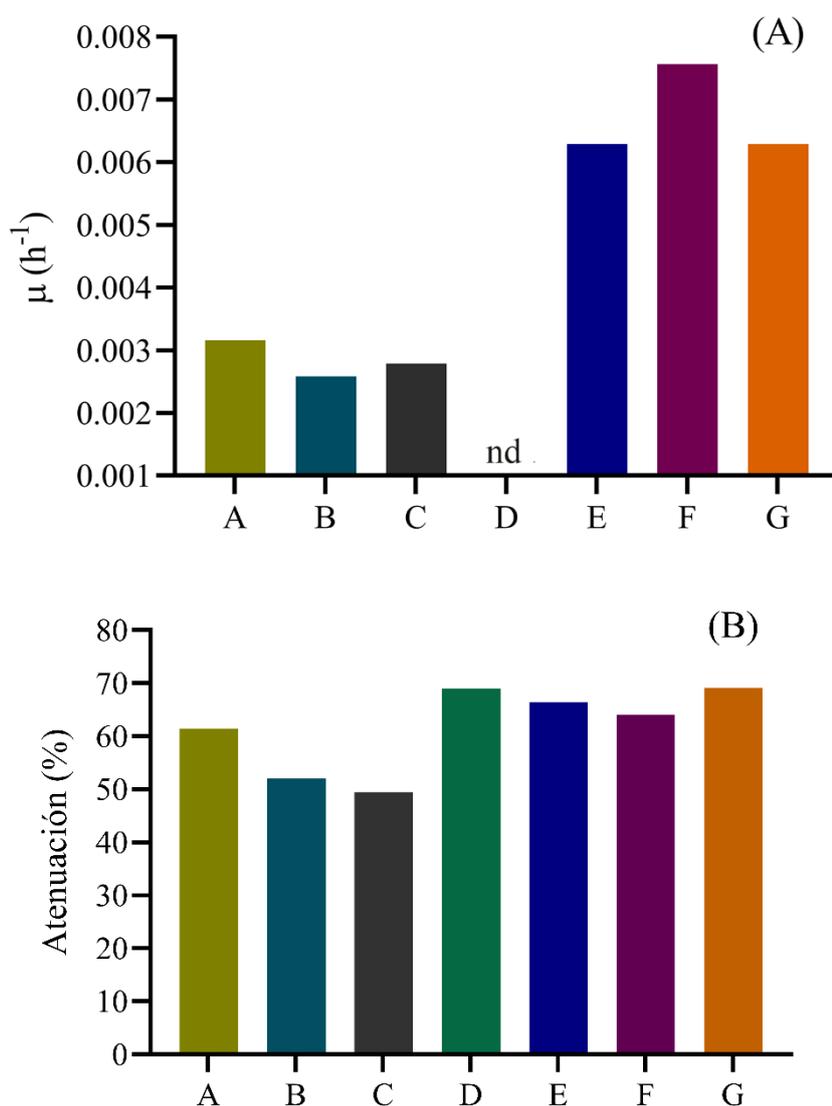


Figura 5.8. Velocidad de fermentación (A) y atenuación (B) de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en fermentaciones a escala productiva, sin (A, B y C) y con incorporación de oxígeno (D, E, F y G). nd: no detectada.

5.4. Discusión

En este trabajo, la cepa CRUB 1568^T fue seleccionada entre los 50 aislamientos de *S. eubayanus* que representan la diversidad genética de especies encontradas en la Patagonia Argentina (Eizaguirre et al., 2018), y fue utilizada para la producción de cerveza a escala productiva debido a su rendimiento fermentativo relativamente bueno, a su producción moderada de fenoles y al aporte de ésteres frutales. La misma fue transferida a tres microcervecías locales que produjeron cervezas lager basadas en recetas estilo pilsner. La obtención de datos consistentes en un entorno industrial resulta rara vez posible (Nienow et al., 2011); sin

embargo, en este caso pudimos observar un comportamiento fermentativo similar entre las diferentes microcervecías. Cuando esta levadura salvaje fue aplicada a escala productiva, mostró un rendimiento de fermentación más bajo en comparación con los ensayos a escala laboratorio y semi-piloto, con tiempos de fermentación prolongados y un consumo de azúcares ineficiente. Diferentes condiciones físicas y químicas que existen en distintos ambientes pueden dar lugar a variaciones en la fisiología celular, la composición, el metabolismo, el crecimiento y, en última instancia, en la aptitud fermentativa de las levaduras (Stewart, 2017). En este punto, los sistemas de fermentación a escala laboratorio pueden no siempre resultar representativos de las operaciones a mayor escala en las cervecías. En el escalado de un bioproceso existen cambios que involucran diferencias en la geometría de los recipientes de fermentación, en su capacidad volumétrica y la condición física del medio de cultivo (Basson, 1996; Fu et al., 2014). A pesar del papel central del escalado de un bioproceso, no se ha establecido una estrategia común y general de aplicación; para cada producto, proceso e instalación individual, se debe elaborar una estrategia de escalado adecuada (Schmidt, 2005). En nuestro caso particular, se decidió evaluar si un aumento en el suministro de oxígeno antes y/o durante la fermentación podría ayudar a mejorar el rendimiento de la fermentación a escala productiva.

En relación a la oxigenación inicial del mosto (previo a la inoculación), la capacidad fermentativa de *S. eubayanus* CRUB 1568^T en el mosto sin oxigenar resultó disminuida en relación a aquellos mostos oxigenados; a partir de un contenido inicial de 8 ppm de oxígeno todas las fermentaciones resultaron similares. Esta observación es consistente con las recomendaciones de oxigenar el mosto previo a la inoculación en las fábricas, y que el nivel de oxígeno ideal para las levaduras cerveceras es 8-10 ppm (Stewart, 2017; White & Zainasheff, 2010). Asimismo, es coincidente con trabajos previos. Jabson (2021) encontró que la adición de oxígeno previo a la inoculación mejoró el rendimiento fermentativo en mostos de alta densidad de la cepa ale WLP001, no encontrando diferencias significativas entre los tratamientos de 8 y 14 ppm de oxígeno, pero sí con el control (no oxigenado). Moonjai et al. (2002) también observaron el efecto positivo de la oxigenación sobre el rendimiento de la fermentación; encontrando mejoras en la producción y viabilidad de la biomasa, en la atenuación, en el tiempo de fermentación y en el etanol producido al compararse un mosto sintético aireado (8 ppm de oxígeno) con un mosto sin airear. Por su parte, el trabajo de Kucharczyk & Tuszyński, (2017) demostró que mostos oxigenados a 12 ppm de oxígeno disuelto resultan en un aumento en la atenuación diaria en fermentaciones a escala de

laboratorio, y una disminución del 10 % en el tiempo de fermentación a escala industrial. Asimismo, la oxigenación (8 ppm) de mostos de densidad estándar (12 °P) y alta (16 y 20 °P) condujeron a una mejora en la fermentación para cepas de levadura ale y lager en comparación con mostos no oxigenados (O'Connor-Cox & Ingledew, 1990; Rees & Stewart, 1999).

En este trabajo se obtuvo además una mejora en el comportamiento fermentativo, tanto en el laboratorio como a mayor escala, al aplicar la aireación durante la fermentación (posterior a la inoculación). La misma no es una práctica muy difundida en las cervecerías al utilizar cepas cerveceras comerciales, excepto para la producción de cervezas de alta densidad. O'Connor-Cox & Ingledew (1990) observaron que el suministro de oxígeno a las 10-14 h de comenzada la fermentación de una cepa comercial lager resultó en un mayor rendimiento de la fermentación de un mosto de 28 °P. Zheng et al. (1994) observaron una mejor asimilación de la maltotriosa por parte de una levadura lager al agitar o suministrar oxígeno a un mosto cervecero de 15 °P. Por su parte, en otro trabajo se observó que, en fermentaciones anaerobias, la agitación redujo el tiempo de consumo de azúcares fermentables en un 25 % y se obtuvieron tiempos de fermentación más consistentes para una amplia gama de diferentes levaduras, mostos y configuraciones. El rendimiento de etanol producido en función de la cantidad de azúcares fermentables también fue mayor y más consistente. Además, cuando 400 consumidores probaron las cervezas de las fermentaciones a escala productiva con y sin agitación, no se detectaron preferencias ni diferencias consistentes (Nienow et al., 2011). Por su parte, Jones et al. (2007) observaron una reducción del 33 % en los tiempos de fermentación al oxigenar el mosto (22 °P) con 25 ppm de oxígeno disuelto a las 12 h de haber inoculado la levadura (Jones et al., 2007). Asimismo, Jabson (2021) evaluó el efecto de la oxigenación del mosto después de la inoculación de la levadura en mostos de alta densidad (22 °P), oxigenando a concentraciones de 0, 8, 10 y 14 ppm después de 12 h. Todos los tratamientos oxigenados mostraron tiempos más bajos de fermentación, una mayor atenuación y mayor producción de etanol en relación a la condición no oxigenada, siendo el tratamiento de pulso de 8 ppm a las 12 h el más favorable. La mejora de las fermentaciones por estrategias de adición de oxígeno también han sido estudiadas en vino (Rosenfeld et al., 2003; Sablayrolles et al., 1996).

El oxígeno es un factor crítico en el crecimiento de las levaduras cerveceras y, a menudo, es el factor limitante. La estimulación del crecimiento, debida a la oxigenación al comienzo de la fermentación, se traduce en fermentaciones más eficientes y en levaduras en condiciones más sanas y viables (Hill, 2015; White & Zainasheff, 2010). El rol principal del oxígeno es el de

promover la biosíntesis de ácidos grasos insaturados (UFAs, por sus siglas en inglés) y esteroides, que contribuyen al aumento de la biomasa total y aumentan la fluidez y la permeabilidad de la membrana; además influyen en la actividad de enzimas ligadas a la membrana y en la respuesta al estrés (Boulton & Quain, 2006; Briggs et al., 2004; Verbelen et al., 2009). La proliferación celular durante la fase anaeróbica de la fermentación diluye las reservas preformadas de esteroides y ácidos grasos insaturados entre las células hijas. En reutilizaciones posteriores, estos lípidos deben reponerse, y las levaduras sólo son capaces de sintetizarlos en condiciones aerobias, de ahí el requisito de suplementar oxígeno al mosto; la falta de un suministro adecuado de oxígeno es una de las principales causas de fermentaciones lentas y detenidas (Briggs et al., 2004; Moonjai et al., 2002).

El requerimiento de oxígeno para una correcta fermentación no sólo es dependiente de la cepa de levadura (relacionado con su metabolismo diferencial de esteroides y ácidos grasos) (Briggs et al., 2004; Jakobsen & Thorne, 1980; Kirsop, 1974; White & Zainasheff, 2010); sino también de las condiciones ambientales y estreses a las que son sometidas. Cuando las fermentaciones se llevan a cabo en fermentadores de gran capacidad (con condiciones geométricas y físicas distintas), las levaduras pueden encontrarse bajo un estrés considerable, especialmente las levaduras salvajes que no están adaptadas a estos ambientes antropogénicos (Bleoanca & Bahrim, 2013; Schmidt, 2005). Entre los factores de estrés, se encuentran la presión hidrostática y presión de dióxido de carbono, que ejercen un efecto negativo sobre las membranas celulares debido a la alta sensibilidad de los lípidos y fosfolípidos (un orden de magnitud más comprimibles que las proteínas) a la alta presión, determinando la compactación de las cadenas de ácidos grasos y reduciendo la fluidez de la membrana (Bleoanca & Bahrim, 2013; Macdonald et al., 1988). En este punto, el efecto positivo del oxígeno sobre los componentes de membrana se hace evidente. Kucharczyk & Tuszyński, (2017), señalan los efectos beneficiosos de la aireación sobre el metabolismo de las células de levadura; donde el aumento de la permeabilidad de la pared celular, debido a la síntesis de UFAs y esteroides, aumenta la tasa de metabolismo de los carbohidratos y otros procesos metabólicos debido a una mayor permeabilidad de la pared celular, que facilita el intercambio de metabolitos. Asimismo, Guimarães et al. (2006) indican que un contenido suficiente de esteroides de membrana facilita la incorporación de transportadores de azúcares a la superficie de la membrana y aportan a la función óptima de los mismos; este efecto puede explicar en parte las bajas tasas de absorción de maltosa (y maltotriosa) tanto en la segunda mitad de las fermentaciones cerveceras, cuando

el contenido de esteroides de la levadura ha disminuido, como cuando la levadura se inocula inicialmente en un mosto deficiente en oxígeno.

Respecto a la disminución del pH observada en las condiciones de aireación, se ha reportado que la formación de ácidos orgánicos, como el acético y cítrico, aumenta con una alta aireación; y que la concentración de oxígeno disuelto también afecta la concentración y el tipo de compuestos orgánicos producidos por las levaduras (Börekçi et al., 2021; Chidi, 2016; Morales et al., 2015; Quirós et al., 2014; Tronchoni et al., 2022; Varela et al., 2021). En este punto, las mejoras fermentativas observadas para *S. eubayanus* en presencia de oxígeno se ven acompañadas de una disminución del pH, que suponen un compromiso entre el incremento de la performance fermentativa y la percepción sensorial del producto final. A priori, la acidez percibida sensorialmente ayudaría a balancear el dulzor residual producto de la maltotriosa presente en las cervezas producidas con *S. eubayanus* (datos preliminares). Sin embargo, resulta necesario que la implementación industrial de esta estrategia de oxigenación esté acompañada de mediciones de compuestos de aroma y sabor, así como de un análisis sensorial para descartar cualquier defecto organoléptico asociado y ayudar a correlacionar los cambios en las concentraciones de compuestos de *flavor* y la aceptabilidad del consumidor.

Transferencia efectiva de *S. eubayanus*

A pesar de las aparentes limitaciones fermentativas con cepas puras de *S. eubayanus*, pocas cepas poseen características tan ventajosas para la elaboración de cerveza como la producción eficiente de biomasa a baja temperatura (hasta 4 °C), la utilización eficiente de maltosa y la producción de compuestos aromáticos diferenciales; ventajas que pueden ser aprovechadas como herramienta de diferenciación productiva, innovación y agregado de valor en el sector cervecero. De hecho, el caso de *S. eubayanus* es uno de los ejemplos del traslado exitoso de una levadura salvaje a la industria. En 2016, Heineken lanzó ‘H41 Wild Lager’ y ‘Wild Lager H71 Patagonia’, que fueron los primeros productos comerciales que utilizaron cepas puras de esta especie. Posteriormente, se lanzaron otras dos cervezas con cepas de *S. eubayanus* aisladas de diferentes localidades: ‘Wild Lager H32 Himalayas’ y ‘Wild Lager H35 Blue Ridge Mountains’. Simultáneamente, en el marco de esta tesis, se inició el trabajo con cerveceros locales de Bariloche (Patagonia, Argentina); y en 2018 las licencias comerciales de cervezas elaboradas con *S. eubayanus* fueron firmadas por la ACAB (Asociación de Cerveceros Artesanales de Bariloche y la Región Andina) bajo el nombre de Proyecto Patagonia Salvaje, donde las cervecerías locales se involucraron en el desarrollo de sus propios estilos. Posteriormente ese

mismo año se llevó a cabo en Bariloche el Taller Internacional de Levaduras Cerveceras (IWOBY) junto con el Simposio Internacional Especializado en Levaduras (ISSY34), donde se organizó el primer tour de cervezas con *S. eubayanus*. Allí se presentaron seis productos locales elaborados por siete cervecerías diferentes: *Wild Mother* de Blest, *EubaKonna* de Konna, *Pan del Indio* de Berlina, *Wild Lager* de Bachmann, *Wild Wild Lager* de Wesley, *Dorada Salvaje* de Duham y *Sauvage Wild Lager* de Manush. En 2019, se desarrolló la primera cerveza 100 % genuina de la Patagonia empleando ingredientes provenientes exclusivamente del noroeste de la Patagonia, incluida *S. eubayanus*. La cerveza tuvo una excelente aceptabilidad entre los consumidores. En encuestas realizadas en eventos y festivales de cerveza a 180 personas del público general, el 75 % calificó a la cerveza patagónica como excelente o muy buena, destacando el sabor como su principal atributo (Claps, 2019). Actualmente, los esfuerzos en curso apuntan a permitir su expansión y producción continua. La industria cervecera está realizando cambios significativos para satisfacer las demandas de los clientes y del mercado de cervezas con ingredientes y sabores innovadores, preferentemente de fuentes regionales y sostenibles. Asimismo, se demuestra que los Andes Patagónicos representan un buen ejemplo de cómo los recursos microbiológicos autóctonos pueden ser explotados en procesos biotecnológicos como la industria cervecera.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

- Las diferentes características fermentativas, junto con una producción diferencial de compuestos volátiles entre las cepas de *S. eubayanus* representantes de cinco subpoblaciones genéticas, demuestra variabilidad fenotípica intraespecífica.
- En este trabajo se confirma la incapacidad de utilización de maltotriosa a nivel de especie para *S. eubayanus*, evidenciada en las cinco cepas representativas de todas las subpoblaciones.
- La cepa CRUB 1568^T fue seleccionada para su aplicación en producción cervecera debido a su buen rendimiento fermentativo relativo, moderada producción de fenoles y su aporte de ésteres frutados.
- Se optimizó el medio de cultivo para la propagación de *S. eubayanus* a partir de extracto de malta, siendo el extracto de levadura y la peptona ácida de caseína los principales factores que influyen en la producción de biomasa, y lográndose una considerable reducción de costos.
- La adición de lúpulo como agente de amargor tiene un impacto positivo en la velocidad y los tiempos de fermentación, tanto para *S. eubayanus* como para la cepa lager W34/70. Sin embargo, adiciones altas de lúpulo van en detrimento de la viabilidad de las levaduras al final de la fermentación.
- El amargor medido en cervezas fermentadas con *S. eubayanus* resultó superior que el de las cepas industriales, siendo esta diferencia notoria sensorialmente e incluso percibida como un amargo áspero (*harsh*). Estos resultados permiten adoptar criterios para su aplicación y predecir adecuadamente el perfil final de las cervezas producidas con esta levadura salvaje.

- Se ensayó por primera vez el comportamiento fermentativo de *S. eubayanus* a escala productiva en el sector cervecero artesanal, encontrándose tiempos largos de fermentación, baja velocidad fermentativa, baja atenuación asociada a un consumo ineficiente de maltosa, y baja producción de etanol.
- El suministro de oxígeno durante la fermentación tuvo un impacto positivo en la capacidad fermentativa de *S. eubayanus* a escala laboratorio, así como a escala productiva; por lo que técnicas que permitan incrementar el aporte de oxígeno podrían ser utilizadas como estrategia para la aplicación de esta levadura salvaje en cervecerías.
- Si bien, los ensayos a escala laboratorio permitieron describir *a priori* las características fermentativas y organolépticas de *S. eubayanus* y realizar una selección de cepas, aquí se demuestra y remarca la relevancia de evaluar las nuevas levaduras a mayores escalas para proporcionar una comprensión más precisa de su capacidad productiva y para el desarrollo posterior de posibles estrategias de aplicación.

REFERENCIAS
BIBLIOGRÁFICAS

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alderton, G., Bailey, G. F., Lewis, J. C., & Stitt, F. (1954). Spectrophotometric Determination of Humulone Complex and Lupulone in Hops. *Analytical Chemistry*, 26, 983–992.
- Algazzali, V., & Shellhammer, T. (2016). Bitterness Intensity of Oxidized Hop Acids: Humulinones and Hulupones. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 74(1), 36–43. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2016-1130-01>
- Almaguer, C., Schönberger, C., Gastl, M., Arendt, E. K., & Becker, T. (2014). *Humulus lupulus*—A story that begs to be told. *Journal of the Institute of Brewing*, 120(4), 289–314. <https://doi.org/10.1002/jib.160>
- Almeida, P., Gonçalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., Durrens, P., Sherman, D. J., Marullo, P., Todd Hittinger, C., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P. (2014). A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nature Communications*, 5(1), 4044. <https://doi.org/10.1038/ncomms5044>
- Alves-Jr, S. L., Herberts, R. A., Hollatz, C., Miletti, L. C., & Stambuk, B. U. (2007). Maltose and Maltotriose Active Transport and Fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65(2), 99–104. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2007-0411-01>
- Amiri, M. M., Fazeli, M. R., Amini, M., Roodbari, N. H., & Samadi, N. (2017). Optimization of Culture Conditions for Enrichment of *Saccharomyces cerevisiae* with D α -Tocopherol by Response Surface Methodology. *Iranian Journal of Pharmaceutical Research*, 16 (4): 1546-1554.
- Anderson, M. J., & Whitcomb, P. J. (2016). *RSM simplified: Optimizing processes using response surface methods for design of experiments* (2nd ed.). Productivity Press. Taylor & Francis Group.
- Annemüller, G., Manger, H. J., & Lietz, P. (2011). *The yeast in the brewery*. VLB Berlin.
- Araújo, T. M., Souza, M. T., Diniz, R. H. S., Yamakawa, C. K., Soares, L. B., Lenczak, J. L., de Castro Oliveira, J. V., Goldman, G. H., Barbosa, E. A., Campos, A. C. S., Castro, I. M., & Brandão, R. L. (2018). Cachaça yeast strains: Alternative starters to produce beer and bioethanol. *Antonie van Leeuwenhoek*, 111(10), 1749–1766. <https://doi.org/10.1007/s10482-018-1063-3>

- ASBC Beer-23. (1968). Beer Bitterness. In *ASBC Methods of Analysis* (14th ed.). American Society of Brewing Chemists. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Beer-23>
- ASBC Hops-6. (1992). α and β -acids in hops and hop pellets by spectrophotometry and by conductometric titration. In *ASBC Methods of Analysis* (14th ed.). American Society of Brewing Chemists. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-WortGlossary>
- ASBC Wort-12. (1975). Free Amino Nitrogen (International Method). In *ASBC Methods of Analysis* (14th ed.). American Society of Brewing Chemists. <https://doi.org/10.1094/ASBCMOA-Wort-12>
- Baker, E. P., & Hittinger, C. T. (2019). Evolution of a novel chimeric maltotriose transporter in *Saccharomyces eubayanus* from parent proteins unable to perform this function. *PLOS Genetics*, *15*(4), e1007786. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007786>
- Baker, E. P., Peris, D., Moriarty, R. V., Li, X. C., Fay, J. C., & Hittinger, C. T. (2019). Mitochondrial DNA and temperature tolerance in lager yeasts. *Science Advances*, *9*.
- Baker, E., Wang, B., Bellora, N., Peris, D., Hulfachor, A. B., Koshalek, J. A., Adams, M., Libkind, D., & Hittinger, C. T. (2015). The Genome Sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the Domestication of Lager-Brewing Yeasts. *Molecular Biology and Evolution*, *32*(11), 2818–2831. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv168>
- Bamforth, C. W. (2007). *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing*. Oxford University Press.
- Barth Hass. (2021). *BarthHaas Report: Hops 2020-2021*. BarthHaas GmbH & Co.
- Barth, R. (2013). *The Chemistry of Beer. The Science in the Suds*. Wiley.
- Bartmańska, A., Wałęcka-Zacharska, E., Tronina, T., Popłoński, J., Sordon, S., Brzezowska, E., Bania, J., & Huszcza, E. (2018). Antimicrobial Properties of Spent Hops Extracts, Flavonoids Isolated Therefrom, and Their Derivatives. *Molecules*, *23*(8), 2059. <https://doi.org/10.3390/molecules23082059>
- Basson, L. (1996). *Loss of yeast quality during mechanical handling in a brewery: An investigation of cropping*. Degree of Master of Science in Engineering. University of Cape Town.
- Belmartino, A., & Liseras, N. (2020). The Craft Beer Market in Argentina: An Exploratory Study of Local Brewers' and Consumers' Perceptions in Mar del Plata. *Papers in Applied Geography*, *6*(3), 190–203. <https://doi.org/10.1080/23754931.2020.1747525>

- Bergman, L. W. (2001). Growth and Maintenance of Yeast. In MacDonald P.N (ed), *Two-Hybrid Systems*, 177, 9–14. Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-210-4:009>
- Bertoli, C., Bruzone, C., Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., & Libkind, D. (2021). *Nuevas capacidades de Microbrew.AR v2.0*. 2nd International Workshop on Brewing Yeasts, Bariloche, Argentina.
- Bertoli, C., Burini, J. A., Bruzone, C., & Libkind, D. (2018). *Recuento automático digital de levaduras para su reutilización en la industria cervecera artesanal*. 5to Congreso Argentino de Microscopía SAMIC, Córdoba, Argentina.
- Bhavsar, S., Dudhagara, P., & Tank, S. (2018). R software package based statistical optimization of process components to simultaneously enhance the bacterial growth, laccase production and textile dye decolorization with cytotoxicity study. *PLOS ONE*, 13(5), e0195795. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0195795>
- Bing, J., Han, P.-J., Liu, W.-Q., Wang, Q.-M., & Bai, F.-Y. (2014). Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Current Biology*, 24(10), R380–R381. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.031>
- Bland, J. M., & Altman, D. (1986). Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *The Lancet*, 327(8476), 307–310.
- Bleoanca, I., & Bahrim, G. (2013). Overview on Brewing Yeast Stress Factors. *Romanian Biotechnological Letters*, 18(5), 15.
- Boekhout, T., Amend, A. S., El Baidouri, F., Gabaldón, T., Geml, J., Mittelbach, M., Robert, V., Tan, C. S., Turchetti, B., Vu, D., Wang, Q.-M., & Yurkov, A. (2021). Trends in yeast diversity discovery. *Fungal Diversity*, 1-47. <https://doi.org/10.1007/s13225-021-00494-6>
- Bokulich, N., & Bamforth, C. (2017). *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology*. Caister Academic Press. <https://doi.org/10.21775/9781910190616>
- Bolat, I. (2008). The importance of trehalose in brewing yeast survival. *Innovative Romanian Food Biotechnology*, 2, 1.
- Börekçi, B. S., Kaban, G., & Kaya, M. (2021). Citric Acid Production of Yeasts: An Overview. *The EuroBiotech Journal*, 5(2), 79–91. <https://doi.org/10.2478/ebtj-2021-0012>
- Borneman, A. R., Desany, B. A., Riches, D., Affourtit, J. P., Forgan, A. H., Pretorius, I. S., Egholm, M., & Chambers, P. J. (2011). Whole-Genome Comparison Reveals Novel Genetic Elements That Characterize the Genome of Industrial Strains of *Saccharomyces*

- cerevisiae*. *PLOS Genetics*, 7(2), e1001287.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1001287>
- Borovkova, A. N., Michailova, Yu. V., & Naumova, E. S. (2020). Molecular Genetic Features of Biological Species of the Genus *Saccharomyces*. *Microbiology*, 89(4), 387–395.
<https://doi.org/10.1134/S0026261720040037>
- Boulton, C. (2019). Fermentation. In Smart C. (ed), *The craft brewing handbook - a practical guide to running a successful craft brewery*. 111–152. Woodhead Publishing.
<https://doi.org/10.1016/B978-0-08-102079-1.00004-7>.
- Boulton, C., & Quain, D. (Eds.). (2006). Yeast management. In *Brewing Yeast and Fermentation*, 468–509. Blackwell Science Ltd.
<https://doi.org/10.1002/9780470999417.ch7>
- Briggs, D., Boulton, C., Brookes, P., & Stevens, R. (2004). *Brewing: Science and Practice*, 108. Woodhead Publishing.
- Brouwers, N., Brickwedde, A., Gorter de Vries, A. R., van den Broek, M., Weening, S. M., van den Eijnden, L., Diderich, J. A., Bai, F.-Y., Pronk, J. T., & Daran, J.-M. G. (2019). Himalayan *Saccharomyces eubayanus* Genome Sequences Reveal Genetic Markers Explaining Heterotic Maltotriose Consumption by *Saccharomyces pastorianus* Hybrids. *Applied and Environmental Microbiology*, 85(22).
<https://doi.org/10.1128/AEM.01516-19>
- Brouwers, N., Gorter de Vries, A. R., van den Broek, M., Weening, S. M., Elink Schuurman, T. D., Kuijpers, N. G. A., Pronk, J. T., & Daran, J.-M. G. (2019). *In vivo* recombination of *Saccharomyces eubayanus* maltose-transporter genes yields a chimeric transporter that enables maltotriose fermentation. *PLOS Genetics*, 15(4), e1007853.
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007853>
- Bryant, N. E. (2019). *The Effect of Alcohol and Bitterness Levels on Brewing Yeast Viability*. Degree of Master of Science in Agriculture, Specialization in Food Science and Nutrition. California Polytechnic State University.
- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021a). Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. *Revista Argentina de Microbiología*, S0325754121000109.
<https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>

- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021b). Selection of *Saccharomyces eubayanus* strains from Patagonia (Argentina) with brewing potential and performance in the craft beer industry. *European Food Research and Technology*, 248(2), 519-531. <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03897-6>
- Buzzini, P., Lachance, M.-A., & Yurkov, A. (Eds.). (2017). *Yeasts in Natural Ecosystems: Diversity*. Springer International Publishing.
- CAA. (2018). Capítulo VIII - Bebidas fermentadas. *Código Alimentario Argentino*.
- Cahill, G., Murray, D. M., Walsh, P. K., & Donnelly, D. (2000). Effect of the Concentration of Propagation Wort on Yeast Cell Volume and Fermentation Performance. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 58(1), 14–20. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-58-0014>
- Cámara, M. S., Zan, M. M. D., Candiotti, L. V., & Goicoechea, H. (2016). Metodología de la superficie de respuesta. *Diseño experimental y optimización de sistemas con respuestas múltiples*, Curso de posgrado, San Luis.
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*, 56, 45–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>
- Canonico, L., Ciani, E., Galli, E., Comitini, F., & Ciani, M. (2020). Evolution of Aromatic Profile of *Torulaspora delbrueckii* Mixed Fermentation at Microbrewery Plant. *Fermentation*, 6(1), 7. <https://doi.org/10.3390/fermentation6010007>
- Castro, R., Díaz, A. B., Durán-Guerrero, E., & Lasanta, C. (2022). Influence of different fermentation conditions on the analytical and sensory properties of craft beers: Hopping, fermentation temperature and yeast strain. *Journal of Food Composition and Analysis*, 106, 104278. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2021.104278>
- Cavaliere, D., McGovern, P. E., Hartl, D. L., Mortimer, R., & Polsinelli, M. (2003). Evidence for *S. cerevisiae* Fermentation in Ancient Wine. *Journal of Molecular Evolution*, 57(0), S226–S232. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-0031-2>
- Chidi, B. S. (2016). *Organic acid metabolism in Saccharomyces cerevisiae: Genetic and metabolic regulation*. Doctoral dissertation for the degree of Doctor of Philosophy (Agricultural Sciences). Stellenbosch University.
- Claps, L. L. (2019). *Reseña del origen y experiencia de elaboración cerveza regional 100% patagónica*. Presentación, Cámara de comercio de Bariloche.

- Coghe, S., Benoot, K., Delvaux, F., Vanderhaegen, B., & Delvaux, F. R. (2004). Ferulic Acid Release and 4-Vinylguaiacol Formation during Brewing and Fermentation: Indications for Feruloyl Esterase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *52*(3), 602–608. <https://doi.org/10.1021/jf0346556>
- Colino, E. (2017). Análisis de la estructura y dinámica del complejo cervecero artesanal de Bariloche, Argentina. *Revista Pilquen*, *20*(2), 79-91.
- Cousseau, F. E. M., Alves, S. L., Trichez, D., & Stambuk, B. U. (2013). Characterization of maltotriose transporters from the *Saccharomyces eubayanus* subgenome of the hybrid *Saccharomyces pastorianus* lager brewing yeast strain Weihenstephan 34/70. *Letters in Applied Microbiology*, *56*(1), 21–29. <https://doi.org/10.1111/lam.12011>
- Cruz, S. H., Cilli, E. M., & Ernandes, J. R. (2002). Structural Complexity of the Nitrogen Source and Influence on Yeast Growth and Fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, *108*(1), 54–61. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00124.x>
- Cubillos, F. A., Gibson, B., Grijalva-Vallejos, N., Krogerus, K., & Nikulin, J. (2019). Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast*, *36*(6), 383–398. <https://doi.org/10.1002/yea.3380>
- Cuevas, T. C. (2020). *Beer Fermentation Tank Module: Yeast Propagation and Validation of the Fermentation Process*. Degree of Environmental Chemistry and Technology. Centria University of Applied Sciences.
- Cui, Y., Wang, A., Zhang, Z., & Speers, R. Alex. (2015). Enhancing the levels of 4-vinylguaiacol and 4-vinylphenol in pilot-scale top-fermented wheat beers by response surface methodology. *Journal of the Institute of Brewing*, *121*(1), 129–136. <https://doi.org/10.1002/jib.189>
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., & Piškur, J. (2014). Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, *14*(6), 826–832. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12161>
- De Francesco, G., Sannino, C., Sileoni, V., Marconi, O., Filippucci, S., Tasselli, G., & Turchetti, B. (2018). *Mrakia gelida* in brewing process: An innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic yeast strain. *Food Microbiology*, *76*, 354–362. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2018.06.018>

- De Francesco, G., Turchetti, B., Sileoni, V., Marconi, O., & Perretti, G. (2015). Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 121(1), 113–121.
- De Keukeleire, D. (2000). Fundamentals of beer and hop chemistry. *Química Nova*, 23(1), 108–112. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422000000100019>
- de Souza Varize, C., Maria Christofoleti-Furlan, R., de Souza Miranda Muynarsk, E., Vinícius de Melo Pereira, G., Dantas Lopes, L., & Carlos Basso, L. (2019). Biotechnological Applications of Nonconventional Yeasts. In Basso T.P. (Ed.), *Yeasts in Biotechnology*. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.83035>
- Díaz, A., Flórez, J., & Cotes, A. M. (2005). Optimización de un medio de cultivo para la producción de la levadura *Pichia onychis* (Lv027). *Revista colombiana de Biotecnología*, 7(1), 51-58.
- Diderich, J. A., Weening, S. M., van den Broek, M., Pronk, J. T., & Daran, J.-M. G. (2018). Selection of Pof- *Saccharomyces eubayanus* Variants for the Construction of *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* Hybrids With Reduced 4-Vinyl Guaiacol Formation. *Frontiers in Microbiology*, 9, 1640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01640>
- Dietvorst, J., Londesborough, J., & Steensma, H. Y. (2005). Maltotriose utilization in lager yeast strains: MTT1 encodes a maltotriose transporter. *Yeast*, 22(10), 775–788. <https://doi.org/10.1002/yea.1279>
- Dixon, I. J. (1967). Hop substances and yeast behaviour. *Journal of the Institute of Brewing*, 73(5), 488–493. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1967.tb03074.x>
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., & Bamforth, C. W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 599–604. <https://doi.org/10.1002/jib.362>
- Dunn, B., & Sherlock, G. (2008). Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Research*, 18(10), 1610–1623. <https://doi.org/10.1101/gr.076075.108>
- Duskova, M., Borovikova, D., Herynkova, P., Rapoport, A., & Sychrova, H. (2015). The role of glycerol transporters in yeast cells in various physiological and stress conditions. *FEMS Microbiology Letters*, 362(3), 1–8. <https://doi.org/10.1093/femsle/fnu041>
- Echeverrigaray, S., Scariot, F. J., Menegotto, M., & Delamare, A. P. L. (2020). Anthocyanin adsorption by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation is associated to the

- loss of yeast cell wall/membrane integrity. *International Journal of Food Microbiology*, 314, 108383. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108383>
- Edgerton, J. (2005). The Impact of Bitterness on the Viability of Harvested Yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 63(1), 28–30. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-63-0028>
- Eizaguirre, J. I. (2019). *Caracterización y domesticación de cepas naturales de Saccharomyces eubayanus para su aplicación en la industria cervecera*. Doctorado en Biología. Universidad Nacional del Comahue. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.19073.89441>
- Eizaguirre, J. I., Peris, D., Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., De Los Ríos, P., Hittinger, C. T., & Libkind, D. (2018). Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environmental Microbiology*, 20(10), 3732–3743. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14375>
- El-Helow, E. R., Elbahloul, Y., El-Sharouny, E. E., Ali, S. R., & Ali, A. A.-M. (2015). Economic production of baker's yeast using a new *Saccharomyces cerevisiae* isolate. *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 29(4), 705–713. <https://doi.org/10.1080/13102818.2015.1038302>
- Engan, S. (1972). Organoleptic threshold values of some alcohols and esters in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 78(1), 33–36. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1972.tb03425.x>
- Evans, D. E., Goldsmith, M., Dambergs, R., & Nischwitz, R. (2011). A Comprehensive Reevaluation of Small-Scale Congress Mash Protocol Parameters for Determining Extract and Fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 69(1), 13–27. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0111-01>
- Fay, J. C., & Benavides, J. A. (2005). Evidence for Domesticated and Wild Populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *PLOS Genetics*, 1(1), e5. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0010005>
- Fernández, S., Gonzalez, G., & Sierra, A. (1991). The acidification power test and the behavior of yeast in brewery fermentations. *Technical Quarterly-Master Brewers Association of the Americas*, 1.
- Ferrer Piquer, M. M. (2018). *Aislamiento, selección e identificación de levaduras Saccharomyces cerevisiae nativas de Alboraya para la producción de cerveza*. Tesina en Ciencia y Tecnología de los Alimentos. Universitat Politècnica de València.

- Ferreira, L. (2014). *Elaboración de cerveza: Historia y evolución, desarrollo de actividades de capacitación e implementación de mejoras tecnológicas para productores artesanales*. Tesina en Ingeniería Agrónoma. Universidad Nacional de La Plata.
- Fleet, G. H. (2006). The Commercial and Community Significance of Yeasts in Food and Beverage Production. In Querol, A. & Fleet, G.H. (Eds.), *Yeasts in food and beverages*. Springer.
- François, J., & Parrou, J. L. (2001). Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 25(1), 125–145. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2001.tb00574.x>
- Fu, Z., Verderame, T. D., Leighton, J. M., Sampey, B. P., Appelbaum, E. R., Patel, P. S., & Aon, J. C. (2014). Exometabolome analysis reveals hypoxia at the up-scaling of a *Saccharomyces cerevisiae* high-cell density fed-batch biopharmaceutical process. *Microbial Cell Factories*, 13(1), 32. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-13-32>
- Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J. L., Maere, S., Verstrepen, K. J., & Steensels, J. (2018). Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*, 49, 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005>
- Gallone, B., Steensels, J., Mertens, S., Dzialo, M. C., Gordon, J. L., Wauters, R., Theßeling, F. A., Bellinazzo, F., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Prah, T., White, C., Hutzler, M., Meußdoerffer, F., Malcorps, P., Souffriau, B., Daenen, L., Baele, G., Maere, S., & Verstrepen, K. J. (2019). Interspecific hybridization facilitates niche adaptation in beer yeast. *Nature Ecology & Evolution*, 3(11), 1562–1575. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0997-9>
- Gallone, B., Steensels, J., Prah, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, 166(6), 1397-1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
- Gamero, A., Quintilla, R., Groenewald, M., Alkema, W., Boekhout, T., & Hazelwood, L. (2016). High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiology*, 60, 147–159. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2016.07.006>

- Ganz, N. (2022). *Investigation of the Hops α -Acids Isomerization and Occurring Losses of Iso- α -Acids During Wort Preparation in the Brewhouse*. Degree of Engineering. Technischen Universität Berlin.
- Garetz, M. (1994). *Using Hops: The Complete Guide to Hops for the Craft Brewer*. HopTech.
- Garret, O. (Ed). (2011). *The Oxford companion to beer*. Oxford University Press.
- Gayevskiy, V., & Goddard, M. R. (2016). *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests: *Saccharomyces* yeasts of native NZ forests. *Environmental Microbiology*, 18(4), 1137–1147. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13107>
- Gibson, B., Geertman, J.-M. A., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D., Louis, E. J., Magalhães, F., & Sampaio, J. P. (2017). New yeasts—new brews: Modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research*, 17(4). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D., & Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiology Reviews*, 31(5), 535–569. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x>
- Gibson, B. R., 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>
- Gonçalves, M., Pontes, A., Almeida, P., Barbosa, R., Serra, M., Libkind, D., Hutzler, M., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P. (2016). Distinct Domestication Trajectories in Top-Fermenting Beer Yeasts and Wine Yeasts. *Current Biology*, 26(20), 2750–2761. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.040>
- Gonzalez Contreras, Y. L. (2019). *Evaluación del potencial para elaboración de sidras de levaduras Patagónicas criotolerantes del género Saccharomyces*. Tesina en Ingeniería Química. Universidad Nacional del Comahue.
- González Flores, M., Bruzone, C., Origone, A., Burini, J. A., Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., & Libkind, D. (2022). Yeasts in the Beverage Industry: Patagonia Gets Wild. In Alves Júnior, S.L., Treichel, H., Basso, T.O. & Stambuk, B.U. (Eds), *Yeasts: From Nature to bioprocesses*, 2, 284–326. Bentham Books.

- González Flores, M., Rodríguez, M. E., Oteiza, J. M., Barbagelata, R. J., & Lopes, C. A. (2017). Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking. *International Journal of Food Microbiology*, 249, 9–17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.018>
- Gorter de Vries, A. R. (2019). *Genome analysis and engineering of industrial lager brewing yeasts*. Doctoral research degree. Delft University of Technology. <https://doi.org/10.4233/UUID:7F6985BB-3383-48F6-BCD3-F2758F35E3C2>
- Grömping, U. (2014). R Package FrF2 for Creating and Analyzing Fractional Factorial 2-Level Designs. *Journal of Statistical Software*, 56(1). <https://doi.org/10.18637/jss.v056.i01>
- Guido, L. (2004). The impact of the physiological condition of the pitching yeast on beer flavour stability: An industrial approach. *Food Chemistry*, 87(2), 187–193. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2003.10.033>
- Guimarães, P. M. R., Virtanen, H., & Londesborough, J. (2006). Direct Evidence That Maltose Transport Activity Is Affected by the Lipid Composition of Brewer's Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 112(3), 203–209. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2006.tb00714.x>
- Gutierrez Pulido, H. G., & de la Vara Salazar, R. (2008). En Cano Carrasco, A. y Osorio Sánchez, M. (rev. técnica), *Análisis y diseño de experimentos* (2nd ed). McGraw-Hill.
- Hahn, C. D., Lafontaine, S. R., Pereira, C. B., & Shellhammer, T. H. (2018). Evaluation of Non-volatile Chemistry Affecting Sensory Bitterness Intensity of Highly Hopped Beers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(13), 3505–3513. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b05784>
- Hahn-Hägerdal, B., Karhumaa, K., Larsson, C. U., Gorwa-Grauslund, M., Görgens, J., & van Zyl, W. H. (2005). Role of cultivation media in the development of yeast strains for large scale industrial use. *Microbial Cell Factories*, 4(1), 31. <https://doi.org/10.1186/1475-2859-4-31>
- Hall, M. L. (1997). *What's your IBU, Calculating bitterness*. 13. <https://www.homebrewersassociation.org/attachments/0000/2501/IBUs.pdf>
- Hazelwood, L. A., Walsh, M. C., Pronk, J. T., & Daran, J.-M. G. (2010). Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso- α -acids. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(1), 318–328.

- Hebly, M., Brickwedde, A., Bolat, I., & Driessen, M. R. M. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. *FEMS Yeast Research*, 15(3), 46. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov005>
- Hewitt, S. K., Donaldson, I. J., Lovell, S. C., & Delneri, D. (2014). Sequencing and Characterisation of Rearrangements in Three *S. pastorianus* Strains Reveals the Presence of Chimeric Genes and Gives Evidence of Breakpoint Reuse. *PLOS ONE*, 9(3), e92203. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0092203>
- Hieronimus, S. (2012). *For the love of hops: The practical guide to aroma, bitterness and the culture of hops*. Brewers publications.
- Hill, A. (Ed.). (2015). *Brewing microbiology: Managing microbes, ensuring quality and valorising waste*. Woodhead Publishing.
- Hohmann, S., & Mager, W. H. (Eds.). (2003). *Yeast stress responses*. Springer.
- Holt, S., Miks, M. H., de Carvalho, B. T., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(3), 193–222. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy041>
- Homan, M. M. (2004). Beer and Its Drinkers: An Ancient Near Eastern Love Story. *Near Eastern Archaeology*, 67(2), 84–95. <https://doi.org/10.2307/4132364>
- Hough, J. S., & Hudson, J. R. (1961). Influence of yeast strain on loss of bittering material during fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 67(3), 241–243. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1961.tb01787.x>
- Hulse, G. A. (Ed.). (2003). Yeast Propagation. In Smart, K. (Ed), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (2nd ed). 249-256. Blackwell Science.
- Hutzler, M., Michel, M., Kunz, O., Kuusisto, T., Magalhães, F., Krogerus, K., & Gibson, B. (2021). Unique Brewing-Relevant Properties of a Strain of *Saccharomyces jurei* Isolated From Ash (*Fraxinus excelsior*). *Frontiers in Microbiology*, 12, 645271. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645271>
- Jabson, B. J. (2021). *The Effects of Wort Oxygenation Scenarios on Fermentation Performance, Volatile Flavor Compound Development, and Flavor Stability in High Gravity Brewing*. Master of Agriculture with a Specialization in Food Science. Faculty of California Polytechnic State University.
- Jakobsen, M., & Thorne, R. S. W. (1980). Oxygen requirements of brewing strains of *Saccharomyces uvarum* (*carlsbergensis*)—Bottom fermentation yeast. *Journal of the*

- Institute of Brewing*, 86(6), 284–287. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1980.tb06882.x>
- Janish, S. (2019). *The New IPA: Scientific Guide to Hop Aroma and Flavor*. Bryan Roth.
- Jaskula, B., Goiris, K., Van Opstaele, F., De Rouck, G., Aerts, G., & De Cooman, L. (2009). Hopping Technology in Relation to α -Acids Isomerization Yield, Final Utilization, and Stability of Beer Bitterness. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 67(1), 44–57. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2009-0106-01>
- Johansson, L. (2020). *Characterization of Sourdough Yeasts and Their Application to Low-Alcohol Brewing* [Bachelor of Engineering]. Metropolia University of Applied Sciences.
- Jones, H. L., Margaritis, A., & Stewart, R. J. (2007). The Combined Effects of Oxygen Supply Strategy, Inoculum Size and Temperature Profile on Very-High-Gravity Beer Fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of the institute of brewing*, 113(2), 18.
- Jorgensen, H., Olsson, L., Ronnow, B., & Palmqvist, E. A. (2002). Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: Effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59(2–3), 310–317. <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1017-5>
- Kara, B. V., Simpson, W. J., & Hammond, J. R. M. (1988). Prediction of the fermentation performance of brewing yeast with the acidification power test. *Journal of the Institute of Brewing*, 94(3), 153–158. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1988.tb04573.x>
- King, A., & Richard Dickinson, J. (2000). Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast*, 16(6), 499–506. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(200004\)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(200004)16:6<499::AID-YEA548>3.0.CO;2-E)
- Kirsop, B. H. (1974). Oxygen in brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 80(3), 252–259. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1974.tb03614.x>
- Klindukhova, Y. O., Karadzhov, G. I., Madzhukov, M. N., & Rosliakov, Y. F. (2009). Influences products of processing hop on biotechnological properties of baking yeast. *Scientific Works of the University of Food Technologies-Plovdiv*, 56(1), 649–652.

- Klopper, W. J., Angelino, S. A. G. F., Tuning, B., & Vermeire, H. A. (1986). Organic acids and glycerol in beer. *Journal of the Institute of Brewing*, 92(3), 225–228. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1986.tb04405.x>
- Kodama, Y., Fukui, N., Ashikari, T., Shibano, Y., Morioka-Fujimoto, K., Hiraki, Y., & Nakatani, K. (1995). Improvement of Maltose Fermentation Efficiency: Constitutive Expression of *MAL* Genes in Brewing Yeasts. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 53(1), 24–29. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-53-0024>
- Kodama, Y., Kielland-Brandt, M. C., & Hansen, J. (2006). Lager brewing yeast. In Sunnerhagen, P. & Piskur, J. (Eds.), *Comparative Genomics*, 15, 145–164. Springer Berlin Heidelberg. <https://doi.org/10.1007/b106370>
- Krogerus, K., Arvas, M., De Chiara, M., Magalhães, F., Mattinen, L., Oja, M., Vidgren, V., Yue, J.-X., Liti, G., & Gibson, B. (2016). Ploidy influences the functional attributes of de novo lager yeast hybrids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(16), 7203–7222. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7588-3>
- Krogerus, K., Magalhães, F., Castillo, S., Peddinti, G., Vidgren, V., De Chiara, M., Yue, J.-X., Liti, G., & Gibson, B. (2021). Lager Yeast Design Through Meiotic Segregation of a *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* Hybrid. *Frontiers in Fungal Biology*, 2, 733655. <https://doi.org/10.3389/ffunb.2021.733655>
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., & Gibson, B. (2015). New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 42(5), 769–778. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1597-6>
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., & Gibson, B. (2016). Novel brewing yeast hybrids: Creation and application. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 101(1), 65–78. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8007-5>
- Krogerus, K., Seppänen-Laakso, T., Castillo, S., & Gibson, B. (2017). Inheritance of brewing-relevant phenotypes in constructed *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. *Microbial Cell Factories*, 16(1), 66. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0679-8>
- Kucharczyk, K., & Tuszyński, T. (2017). The effect of wort aeration on fermentation, maturation and volatile components of beer produced on an industrial scale. *Journal of the Institute of Brewing*, 8.

- Kumar, A. A. (2019). *Impact of Yeast Strain and Fermentation on Perceived Hop Flavour in Beer*. Master of Science. University of Otago, Dunedin.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts, a Taxonomic Study* (5th ed). Elsevier Science.
- Kurz, T., Mieleitner, J., Becker, T., & Delgado, A. (2002). A Model Based Simulation of Brewing Yeast Propagation. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(2), 248–255.
- Kwolek-Mirek, M., & Zadrag-Tecza, R. (2014). Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. *FEMS Yeast Research*, 14(7), 1068-1079. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12202>
- Lafontaine, S., & Shellhammer, T. (2019). How Hoppy Beer Production Has Redefined Hop Quality and a Discussion of Agricultural and Processing Strategies to Promote It. *Technical Quarterly*. <https://doi.org/10.1094/TQ-56-1-0221-01>
- Langdon, Q. K., Peris, D., Baker, E. P., Opulente, D. A., Nguyen, H.-V., Bond, U., Gonçalves, P., Sampaio, J. P., Libkind, D., & Hittinger, C. T. (2019). Fermentation innovation through complex hybridization of wild and domesticated yeasts. *Nature Ecology & Evolution*, 3(11), 1576–1586. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0998-8>
- Langdon, Q. K., Peris, D., Eizaguirre, J. I., Opulente, D. A., Buh, K. V., Sylvester, K., Jarzyna, M., Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Libkind, D., & Hittinger, C. T. (2020). Postglacial migration shaped the genomic diversity and global distribution of the wild ancestor of lager-brewing hybrids. *PLOS Genetics*, 16(4), e1008680. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008680>
- Langstaff, S. A., & Lewis, M. J. (1993). The mouthfeel of beer - a review. *Journal of the Institute of Brewing*, 99(1), 31–37. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1993.tb01143.x>
- Laws, D. R. J., McGuinness, J. D., & Rennie, H. (1972). The losses of bitter substances during fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 78(4), 314–321. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1972.tb03454.x>
- Lawson, J. (2014). *Design and Analysis of Experiments with R*. CRC Press.
- Layfield, J. B. (2016). *Characterization of Synchronous Cultures of Saccharomyces cerevisiae for use in Brewery Fermentation*. Degree of Doctor of Philosophy. North Carolina State University.
- Leducq, J.-B., Charron, G., Samani, P., Dubé, A. K., Sylvester, K., James, B., Almeida, P., Sampaio, J. P., Hittinger, C. T., Bell, G., & Landry, C. R. (2014). Local climatic

- adaptation in a widespread microorganism. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 281(1777), 20132472. <https://doi.org/10.1098/rspb.2013.2472>
- Leducq, J.-B., Nielly-Thibault, L., Charron, G., Eberlein, C., Verta, J.-P., Samani, P., Sylvester, K., Hittinger, C. T., Bell, G., & Landry, C. R. (2016). Speciation driven by hybridization and chromosomal plasticity in a wild yeast. *Nature Microbiology*, 1(1), 15003. <https://doi.org/10.1038/nmicrobiol.2015.3>
- Lei, H., Zhao, H., Yu, Z., & Zhao, M. (2012). Effects of Wort Gravity and Nitrogen Level on Fermentation Performance of Brewer's Yeast and the Formation of Flavor Volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, 166(6), 1562–1574. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9560-8>
- Lemoine, M. L., Fontana, U., Hurtado, J. B., Pintos, F. M., Arena, M. E., Vicente, A. R., & Rodoni, L. M. (2021). Wild barberry fruit (*Berberis microphylla* g. Forst.) as a natural ingredient for beer brewing. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences*, 37(3), 313–324. <https://doi.org/10.29393/CHJAAS37-32WBML70032>
- Lenth, R. V. (2009). Response-Surface Methods in R, using rsm. *Journal of Statistical Software*, 32(7). <https://doi.org/10.18637/jss.v032.i07>
- Lentz, M. (2018). The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. *Fermentation*, 4(1), 20. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010020>
- Li, g, Han, X., Liu, F., Kun-Farkas, G., & Kiss, Z. (2015). Simple HPLC Method for Determining the Glycerol Content of Beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 73(4), 314–317. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2015-0809-01>
- Li, X., Ouyang, J., Xu, Y., Chen, M., Song, X., Yong, Q., & Yu, S. (2009). Optimization of culture conditions for production of yeast biomass using bamboo wastewater by response surface methodology. *Bioresource Technology*, 100(14), 3613–3617. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2009.03.001>
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valerio, E., Goncalves, C., Dover, J., Johnston, M., Goncalves, P., & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35), 14539–14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>
- Libkind, D., Moliné, M., Trochine, A., Bellora, N., & de Garcia, V. (2016). Biotechnologically Relevant Yeasts from Patagonian Natural Environments. In Olivera, N.L., Libkind, D.

- & Donati, E. (Eds.), *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms*, 325–351. Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42801-7_18
- Libkind, D., Peris, D., Cubillos, F. A., Steenwyk, J. L., Opulente, D. A., Langdon, Q. K., Rokas, A., & Hittinger, C. T. (2020). Into the wild: New yeast genomes from natural environments and new tools for their analysis. *FEMS Yeast Research*, 20(2), foaa008. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa008>
- Lodolo, E. J., & Cantrell, I. C. (2007). Yeast Vitality—A Holistic Approach toward an Integrated Solution to Predict Yeast Performance. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 65(4), 202–207. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2007-0809-01>
- Lodolo, E. J., Kock, J. L. F., Axcell, B. C., & Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae* – the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1018–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x>
- Lohrmann, J. (2021). *Caracterización de levaduras no convencionales de la Patagonia para la producción de whisky con características sensoriales distintivas*. Tesina en Biología. Universidad Nacional del Comahue.
- Lopes, C. A., Rodríguez, M. E., Sangorrín, M., Querol, A., & Caballero, A. C. (2007). Patagonian wines: Implantation of an indigenous strain of *Saccharomyces cerevisiae* in fermentations conducted in traditional and modern cellars. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 34(2), 139–149. <https://doi.org/10.1007/s10295-006-0178-0>
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2018). Síntesis y regulación de compuestos del aroma y el sabor derivados de la levadura en la cerveza: Ésteres. *Revista Argentina de Microbiología*, 50(4), 436–446. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2017.11.006>
- Loviso, C. L., & Libkind, D. (2019). Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: Alcoholes superiores. *Revista Argentina de Microbiología*, 51(4), 386–397. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.08.006>
- Luarasi, L., Troja, R., & Pinguli, L. (2017). Yeast vitality monitoring during the fermentation process of beer production. *Hygienic Engineering and Design*, 19, 78–81, 4.
- Lynes, K. J., & Norms, F. W. (1948). Biotin in the materials and process of brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 54(3), 150–157. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1948.tb01369.x>

- Macdonald, A. G., Wahle, K. W. J., Cossins, A. R., & Behan, M. K. (1988). Temperature, pressure and cholesterol effects on bilayer fluidity; a comparison of pyrene excimer/monomer ratios with the steady-state fluorescence polarization of diphenylhexatriene in liposomes and microsomes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, *938*(2), 231–242.
- Magalhães, F., Krogerus, K., Vidgren, V., Sandell, M., & Gibson, B. (2017). Improved cider fermentation performance and quality with newly generated *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *44*(8), 1203–1213. <https://doi.org/10.1007/s10295-017-1947-7>
- Magalhães, F., Vidgren, V., Ruohonen, L., & Gibson, B. (2016). Maltose and maltotriose utilisation by group I strains of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *FEMS Yeast Research*, *16*(5), fow053. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow053>
- Mallett, J. (2014). *Malt: A practical guide from field to brewhouse*. Brewers Publications.
- Mardones, W., Villarroel, C. A., Krogerus, K., Tapia, S. M., Urbina, K., Oporto, C. I., O'Donnell, S., Minebois, R., Nespolo, R., Fischer, G., Querol, A., Gibson, B., & Cubillos, F. A. (2020). Molecular profiling of beer wort fermentation diversity across natural *Saccharomyces eubayanus* isolates. *Microbial Biotechnology*, *13*(4), 1012–1025. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13545>
- 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>
- Maye, J. P., Smith, R., & Leker, J. (2016). Humulinone Formation in Hops and Hop Pellets and Its Implications for Dry Hopped Beers. *Technical Quarterly*. <https://doi.org/10.1094/TQ-53-1-0227-01>
- Mazzucco, M. B., Ganga, M. A., & Sangorrín, M. P. (2019). Production of a novel killer toxin from *Saccharomyces eubayanus* using agro-industrial waste and its application against wine spoilage yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek*, *112*(7), 965–973. <https://doi.org/10.1007/s10482-019-01231-5>
- Meier-Dörnberg, T., Hutzler, M., Michel, M., Methner, F.-J., & Jacob, F. (2017). The Importance of a Comparative Characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* and

- Saccharomyces Pastorianus* Strains for Brewing. *Fermentation*, 3(3), 41.
<https://doi.org/10.3390/fermentation3030041>
- Meilgaard, M. C. (1982). Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30(6), 1009–1017.
<https://doi.org/10.1021/jf00114a002>
- Melewar, T. C., & Skinner, H. (2020). Territorial brand management: Beer, authenticity, and sense of place. *Journal of Business Research*, 116, 680–689.
<https://doi.org/10.1016/j.jbusres.2018.03.038>
- Meneses, F. J. (2007). Characterisation of carbohydrate metabolism by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. Doctoral research degree. University of Adelaide, School of Agriculture and Wine, 243. <http://hdl.handle.net/2440/61950>
- Meneses, F. J., Henschke, P. A., & Jiranek, V. (2002). A Survey of Industrial Strains of *Saccharomyces cerevisiae* Reveals Numerous Altered Patterns of Maltose and Sucrose Utilisation. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(3), 310–321.
<https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00556.x>
- Mertens, S., Steensels, J., Saels, V., De Rouck, G., Aerts, G., & Verstrepen, K. J. (2015). A Large Set of Newly Created Interspecific *Saccharomyces* Hybrids Increases Aromatic Diversity in Lager Beers. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(23), 8202–8214. <https://doi.org/10.1128/AEM.02464-15>
- Methner, Y., Hutzler, M., Matoulková, D., Jacob, F., & Michel, M. (2019). Screening for the Brewing Ability of Different Non-*Saccharomyces* Yeasts. *Fermentation*, 5(4), 101.
<https://doi.org/10.3390/fermentation5040101>
- Meussdoerffer, F., & Zarnkow, M. (2009). Starchy Raw Materials. In Elinger, H.M. (Ed.), *Handbook of Brewing*, 43–83. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
<https://doi.org/10.1002/9783527623488.ch2>
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.-J., Wagner, R. S., & Hutzler, M. (2016). Pure non- *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications: Non-conventional yeast for beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569–587.
<https://doi.org/10.1002/jib.381>
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Schneiderbanger, H., & Hutzler, M. (2020). Optimisation of yeast vitality measurement to better predict fermentation performance:

- Fermentation performance measurement. *Journal of the Institute of Brewing*, 126(2), 161–167. <https://doi.org/10.1002/jib.604>
- Mikyška, A., Štěrbá, K., Slabý, M., Nesvadba, V., & Charvátová, J. (2021). Brewing tests of new fine aroma hop varieties (*Humulus lupulus L.*) Saaz Brilliant, Saaz Comfort and Saaz Shine. *KVASNY PRUMYSL*, 67(4), 464–473. <https://doi.org/10.18832/kp2021.67.464>
- Mochaba, F., O'Connor-Cox, E. S. C., & Axcell, B. C. (1998). Practical Procedures to Measure Yeast Viability and Vitality Prior to Pitching. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 56(1), 1–6. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-57-0001>
- Monerawela, C., & Bond, U. (2017). Brewing up a storm: The genomes of lager yeasts and how they evolved. *Biotechnology Advances*, 35(4), 512–519. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.003>
- Montagnana Vicente Leme, A. (2017). *Efeito de diferentes leveduras e concentrações de inóculo no amargor da cerveja*. Mestre em Tecnologia de Alimentos. Universidade Estadual de Campinas. <https://doi.org/10.47749/T/UNICAMP.2017.990784>
- Moonjai, N., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Derdelinckx, G., & Verachtert, H. (2002). The effects of linoleic acid supplementation of cropped yeast on its subsequent fermentation performance and acetate ester synthesis. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(2), 227–235.
- Moraes, J., & Bonatto, D. (2017). *Development of resazurin assay for evaluation of yeast viability and vitality in microbreweries*. Tesina en Biotecnología. Universidade Federal do Rio Grande do Sul.
- Morales, P., Rojas, V., Quirós, M., & Gonzalez, R. (2015). The impact of oxygen on the final alcohol content of wine fermented by a mixed starter culture. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(9), 3993–4003. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6321-3>
- Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., & Iefuji, H. (2014). Single nucleotide polymorphisms of PAD1 and FDC1 show a positive relationship with ferulic acid decarboxylation ability among industrial yeasts used in alcoholic beverage production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 118(1), 50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.017>
- Müller-Auffermann, K., Silva, W., Hutzler, M., & Jacob, F. (2014). Evaluation and Development of an alternative Analysis Method for rapid Determination of Yeast Vitality. *Brewing Science*, 67, 72-80.

- Myers, R. H. (2016). Response Surface Methodology: Process and product optimization using designed experiments. *Wiley Series in Probability and Statistics*, 855.
- Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M., & Ashikari, T. (2009). Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid. *DNA Research*, 16(2), 115–129. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsp003>
- Naseeb, S., James, S. A., Alsammar, H., Michaels, C. J., Gini, B., Nueno-Palop, C., Bond, C. J., McGhie, H., Roberts, I. N., & Delneri, D. (2017). *Saccharomyces jurei* sp. Nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67(6), 2046–2052. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.002013>
- Nelson, M. (2005). *The Barbarian's Beverage: A History of Beer in Ancient Europe*. Routledge.
- Nespolo, R. F., Villarroel, C. A., Oporto, C. I., Tapia, S. M., Vega-Macaya, F., Urbina, K., De Chiara, M., Mozzachiodi, S., Mikhalev, E., Thompson, D., Larrondo, L. F., Saenz-Agudelo, P., Liti, G., & Cubillos, F. A. (2020). An Out-of-Patagonia migration explains the worldwide diversity and distribution of *Saccharomyces eubayanus* lineages. *PLOS Genetics*, 16(5), e1008777. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008777>
- Nguyen, H.-V., & Boekhout, T. (2017). Characterization of *Saccharomyces uvarum* (Beijerinck, 1898) and related hybrids: Assessment of molecular markers that predict the parent and hybrid genomes and a proposal to name yeast hybrids. *FEMS Yeast Research*, 17(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox014>
- Nguyen, N., McGinley, M., & Mott, J. (2010). *Faster Real-time Response to Bacterial Infection of Bioethanol Fermentation using a Short Rezex™ ROA Column*. 4. <https://phenomenex.blob.core.windows>.
- Nienow, A. W., Nordkvist, M., & Boulton, C. A. (2011). Scale-down/scale-up studies leading to improved commercial beer fermentation. *Biotechnology Journal*, 6(8), 911–925. <https://doi.org/10.1002/biot.201000414>
- Nikulin, J., Krogerus, K., & Gibson, B. (2018). Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation. *Yeast*, 35(1), 113–127. <https://doi.org/10.1002/yea.3246>
- Nikulin, J., Vidgren, V., Krogerus, K., Magalhães, F., Valkeemäki, S., Kangas-Heiska, T., & Gibson, B. (2020). Brewing potential of the wild yeast species *Saccharomyces*

- paradoxus*. *European Food Research and Technology*, 246(11), 2283–2297. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03572-2>
- Nilsson-Tillgren, T., Gjermansen, C., Kielland-Brandt, M. C., Petersen, J. G. L., & Holmberg, S. (1981). Genetic differences between *Saccharomyces carlsbergensis* and *S. cerevisiae*. Analysis of chromosome III by single chromosome transfer. *Carlsberg Research Communications*, 46(1–2), 65–76. <https://doi.org/10.1007/BF02906199>
- Novak, J., Basarova, G., Teixeira, J. A., & Vicente, A. A. (2007). Monitoring of Brewing Yeast Propagation Under Aerobic and Anaerobic Conditions Employing Flow Cytometry. *Journal of the institute of brewing*, 113(3), 7.
- Nykänen, L., & Nykänen, I. (1977). Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 83(1), 30–31. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1975.tb03787.x>
- O'Briant, K. (2017). *The Hymn of Ninkasi*. Beyond Beer Magazine.
- O'Connor-Cox, E. S. C., & Ingledew, W. M. (1990). Effect of the Timing of Oxygenation on Very High Gravity Brewing Fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 48(1), 26–32. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-48-0026>
- Oladokun, O., Tarrega, A., James, S., Smart, K., Hort, J., & Cook, D. (2016). The impact of hop bitter acid and polyphenol profiles on the perceived bitterness of beer. *Food Chemistry*, 205, 212–220. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2016.03.023>
- Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., & Pillay, B. (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: Production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 13–23. <https://doi.org/10.1002/jib.389>
- Opekarová, M., & Sigler, K. (1982). Acidification power: Indicator of metabolic activity and autolytic changes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Folia Microbiologica*, 27(6), 395–403. <https://doi.org/10.1007/BF02876450>
- Origone, A. C. (2018). *Caracterización molecular y fisiológica de cepas patagónicas de S. eubayanus, S. uvarum e híbridos interespecíficos para su uso en enología*. Doctorado en Biología. Universidad Nacional del Comahue.
- Origone, A. C., González Flores, M., Rodríguez, M. E., Querol, A., & Lopes, C. A. (2020). Inheritance of winemaking stress factors tolerance in *Saccharomyces uvarum/S. eubayanus* × *S. cerevisiae* artificial hybrids. *International Journal of Food Microbiology*, 320, 108500. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108500>

- Palmer, J. J. (2006). *How to Brew: Everything you need to know to brew beer right the first time*. Brewers Publications.
- Palmer, J. J., & Kaminski, C. (2013). *Water: A comprehensive guide for brewers*. Brewers Publications.
- Papazian, C. (2003). *The complete joy of homebrewing* (3rd ed). Quill.
- Pasteur, L. (1876). *Etudes sur la bière, ses maladies avec une théorie nouvelle de la fermentation*. Gauthier-Villars.
- Pellettieri, M. (2015). *Quality Management: Essential Planning for Breweries*. Brewers Publication.
- Peris, D., Langdon, Q. K., Moriarty, R. V., Sylvester, K., Bontrager, M., Charron, G., Leducq, J.-B., Landry, C. R., Libkind, D., & Hittinger, C. T. (2016). Complex Ancestries of Lager-Brewing Hybrids Were Shaped by Standing Variation in the Wild Yeast *Saccharomyces eubayanus*. *PLOS Genetics*, *12*(7), e1006155. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006155>
- Peris, D., Sylvester, K., Libkind, D., Gonçalves, P., Sampaio, J. P., Alexander, W. G., & Hittinger, C. T. (2014). Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Molecular Ecology*, *23*(8), 2031–2045. <https://doi.org/10.1111/mec.12702>
- Perli, T., Wronska, A. K., Ortiz-Merino, R. A., Pronk, J. T., & Daran, J. (2020). Vitamin requirements and biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, *37*(4), 283–304. <https://doi.org/10.1002/yea.3461>
- Pfeiffer, T., & Morley, A. (2014). An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Frontiers in Molecular Biosciences*, *1*. <https://doi.org/10.3389/fmolb.2014.00017>
- Pickerell, A. T. W., Hwang, A., & Axcell, B. C. (1991). Impact of Yeast-Handling Procedures on Beer Flavor Development during Fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *49*(2), 87–92. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-49-0087>
- Piddocke, M. P., Kreis, S., Heldt-Hansen, H. P., Nielsen, K. F., & Olsson, L. (2009). Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *84*(3), 453–464. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1930-y>

- Pierce, J. S. (1970). Institute of brewing: analysis committee measurement of yeast viability. *Journal of the Institute of Brewing*, 76(5), 442–443. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1970.tb03325.x>
- 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>
- Piskur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., & Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, 22(4), 183–186. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002>
- Plackett, R. L., & Burman, J. P. (1946). The design of optimum multifactorial experiments. *Biometrika*, 33(4), 305–325. <https://doi.org/10.1093/biomet/33.4.305>
- Pokrivčák, J., Supeková, S. C., Lančarič, D., Savov, R., Tóth, M., & Vašina, R. (2019). Development of beer industry and craft beer expansion. *Journal of Food and Nutrition Research*, 58, 13.
- Popescu, V., Soceanu, A., Dobrinás, S., & Stanciu, G. (2013). A study of beer bitterness loss during the various stages of the Romanian beer production process. *Journal of the Institute of Brewing*, 119(3), 111–115. <https://doi.org/10.1002/jib.82>
- Prahl, T. (2017). *Yeast & Hops, And those magic interactions*. White Labs. Dissertation.
- Priest, F. G., Priest, F. G., & Campbell, I. (Eds). (1996). *Brewing Microbiology*. London: Chapman & Hall. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4684-0038-0>
- Priest, F. G., & Stewart, G. G. (Eds). (2006). *Handbook of Brewing* (2nd Ed). Taylor & Francis Group.
- Quain, D. E. (2006). Yeast supply and propagation in brewing. In Bamforth, C.W. (Ed), *Brewing, New Technologies*, 167–182. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition. <https://doi.org/10.1533/9781845691738.167>
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., & Morales, P. (2014). Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *International Journal of Food Microbiology*, 181, 85–91. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2014.04.024>
- Rabin, D., & Forget, C. (2nd ed). (2013). *The dictionary of beer and brewing*. Routledge.

- Raines-Casselman, M. (2009). Yeast Propagation and Maintenance: Principles and Practices. *Yeast Culturing Workshop Notes*, 25.
- Rautio, J., & Londesborough, J. (2003). Maltose Transport by Brewer's Yeasts in Brewer's Wort. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(3), 251–261. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00166.x>
- 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), 15. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010015>
- Rees, E. M. R., & Stewart, G. G. (1999). Effects of Magnesium, Calcium and Wort Oxygenation on the Fermentative Performance of Ale and Lager Strains Fermenting Normal and High Gravity Worts. *Journal of the Institute of Brewing*, 105(4), 8.
- Rodríguez, M. E., Pérez-Través, L., Sangorrín, M. P., Barrio, E., & Lopes, C. A. (2014). *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS Yeast Research*, 14(6), 948–965. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12183>
- Rosenfeld, E., Beauvoit, B., Blondin, B., & Salmon, J.-M. (2003). Oxygen Consumption by Anaerobic *Saccharomyces cerevisiae* under Enological Conditions: Effect on Fermentation Kinetics. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(1), 113–121. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.1.113-121.2003>
- Ruis, H., & Schüller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *BioEssays*, 17(11), 959–965. <https://doi.org/10.1002/bies.950171109>
- Sablayrolles, J.-M., Dubois, C., Manginot, C., Roustan, J.-L., & Barre, P. (1996). Effectiveness of combined ammoniacal nitrogen and oxygen additions for completion of sluggish and stuck wine fermentations. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 82(4), 377–381. [https://doi.org/10.1016/0922-338X\(96\)89154-9](https://doi.org/10.1016/0922-338X(96)89154-9)
- Saerens, S., & Swiegers, J. H. (2013). WO2013030398: enhancement of beer flavor by a combination of pichia yeast and different hop varieties. <https://patents.google.com/patent/WO2013030398A1/en>.
- Saez, J. S., Lopes, C. A., Kirs, V. E., & Sangorrín, M. (2011). Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiology*, 28(3), 503–509. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.019>

- Salazar, A. N., Gorter de Vries, A. R., van den Broek, M., Brouwers, N., de la Torre Cortès, P., Kuijpers, N. G. A., Daran, J.-M. G., & Abeel, T. (2019). Chromosome level assembly and comparative genome analysis confirm lager-brewing yeasts originated from a single hybridization. *BMC Genomics*, *20*(1), 916. <https://doi.org/10.1186/s12864-019-6263-3>
- Salema-Oom, M., Pinto, V. V., Goncalves, P., & Spencer-Martins, I. (2005). Maltotriose Utilization by Industrial *Saccharomyces* Strains: Characterization of a New Member of the α -Glucoside Transporter Family. *Applied and environmental microbiology*, *71*(9), 5044-5049.
- Saltukoglu, A., & Slaughter, J. C. (1983). The effect of magnesium and calcium on yeast growth. *Journal of the Institute of Brewing*, *89*(2), 81–83. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1983.tb04151.x>
- Schindelin, J., Arganda-Carreras, I., Frise, E., Kaynig, V., Longair, M., Pietzsch, T., Preibisch, S., Rueden, C., Saalfeld, S., Schmid, B., Tinevez, J.-Y., White, D. J., Hartenstein, V., Eliceiri, K., Tomancak, P., & Cardona, A. (2012). Fiji: An open-source platform for biological-image analysis. *Nature Methods*, *9*(7), 676–682. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2019>
- Schmidt, F. R. (2005). Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *68*(4), 425–435. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0003-0>
- Schmitt, M. R., & Budde, A. D. (2012). Wort Free Amino Nitrogen Analysis Adapted to a Microplate Format. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, *70*(2), 95–102.
- Serra Colomer, M., Funch, B., & Forster, J. (2019). The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current Opinion in Biotechnology*, *56*, 30–35. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009>
- Sigler, K., Mikyška, A., Kosař, K., Gabriel, P., & Dienstbier, M. (2006). Factors affecting the outcome of the acidification power test of yeast quality: Critical reappraisal. *Folia Microbiologica*, *51*(6), 525–534. <https://doi.org/10.1007/BF02931616>
- Silva, G. A. da, Augusto, F., & Poppi, R. J. (2008). Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS–SPME–GC. *Food Chemistry*, *111*(4), 1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.022>
- Slabý, M., Škach, J., & Fiala, J. (2010). Evaluation of pitching yeast by advanced methods. *Kvasny Prumysl*, *56*(5), 226–233. <https://doi.org/10.18832/kp2010028>

- Smart, K. (Ed.). (2003). *Brewing yeast fermentation performance* (2nd ed). Blackwell Science.
- Smart, K. A., Chambers, K. M., Lambert, I., Jenkins, C., & Smart, C. A. (1999). Use of Methylene Violet Staining Procedures to Determine Yeast Viability and Vitality. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 57(1), 18–23. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-57-0018>
- Srinivasan, V., Goldberg, D., & Haas, G. J. (2004). Contributions to the Antimicrobial Spectrum of Hop Constituents. *Economic Botany*, 58, S230–S238. [https://doi.org/10.1663/0013-0001\(2004\)58\[S230:CTTASO\]2.0.CO;2](https://doi.org/10.1663/0013-0001(2004)58[S230:CTTASO]2.0.CO;2)
- Steenackers, B., De Cooman, L., & De Vos, D. (2015). Chemical transformations of characteristic hop secondary metabolites in relation to beer properties and the brewing process: A review. *Food Chemistry*, 172, 742–756. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.09.139>
- Steensels, J., Gallone, B., Voordeckers, K., & Verstrepen, K. J. (2019). Domestication of Industrial Microbes. *Current Biology*, 29(10), R381–R393. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.025>
- Steensels, J., Meersman, E., Snoek, T., Saels, V., & Verstrepen, K. J. (2014). Large-Scale Selection and Breeding To Generate Industrial Yeasts with Superior Aroma Production. *Applied and Environmental Microbiology*, 80(22), 6965–6975. <https://doi.org/10.1128/AEM.02235-14>
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
- Stewart, G. G. (2017). *Brewing and Distilling Yeasts*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-69126-8>
- Strong, G., & England, K. (2015). *Beer judge certification program 2015 style guidelines*. Brewers Association.
- Szabo, S. E. (2013). Comparison of the efficacy of various yeast viability stains. *Technical Application Information Bulletin*. Beckman Coulter.
- Toh, D. W. K., Chua, J. Y., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2020). Evaluation of the potential of commercial non- *Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(5), 2049–2059. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14399>

- Trochine, A., Burini, J. A., Cavallini, L., Libkind, D., González, S. B., Sofrás, F. M. S., Gastaldi, B., Reiner, G., van Baren, C. M., Di Leo Lira, P., Retta, D., & Bandoni, A. L. (2020). Chemical characterization of the two major hop varieties produced in Patagonia (Argentina) for the brewing industry. *Brewing Science*, 70(8), 95–102. <https://doi.org/10.23763/BrSc20-08trochine>
- Tronchoni, J., Gonzalez, R., Guindal, A. M., Calleja, E., & Morales, P. (2022). Exploring the suitability of *Saccharomyces cerevisiae* strains for winemaking under aerobic conditions. *Food Microbiology*, 101, 103893. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2021.103893>
- Urbina, K., Villarreal, P., Nespolo, R. F., Salazar, R., Santander, R., & Cubillos, F. A. (2020). Volatile Compound Screening Using HS-SPME-GC/MS on *Saccharomyces eubayanus* Strains under Low-Temperature Pilsner Wort Fermentation. *Microorganisms*, 8(5), 755. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050755>
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107(1), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>
- Varela, C., Cuijvers, K., Van Den Heuvel, S., Rullo, M., Solomon, M., Borneman, A., & Schmidt, S. (2021). Effect of Aeration on Yeast Community Structure and Volatile Composition in Uninoculated Chardonnay Wines. *Fermentation*, 7(2), 97. <https://doi.org/10.3390/fermentation7020097>
- Vaughan Martini, A., & Martini, A. (1987). Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 53(2), 77–84. <https://doi.org/10.1007/BF00419503>
- Velu, S., Velayutham, V., & Manickkam, S. (2016). Optimization of fermentation media for xanthan gum production from *Xanthomonas campestris* using Response Surface Methodology and Artificial Neural Network techniques. *Indian Journal of Chemical Technology*, 9.
- Verbelen, P. J., Saerens, S. M. G., Van Mulders, S. E., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2009). The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 82(6), 1143–1156. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-1909-8>

- Verstrepen, K. J., Chambers, P. J., & Pretorius, I. S. (2006). The Development of Superior Yeast Strains for the Food and Beverage Industries: Challenges, Opportunities and Potential Benefits. In Querol, A. & Fleet, G. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*, 399–444. Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-28398-0_13
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J.-P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., & Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: Adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 110–118. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5)
- Vidgren, V., Huuskonen, A., Virtanen, H., Ruohonen, L., & Londesborough, J. (2009). Improved Fermentation Performance of a Lager Yeast after Repair of Its AGT1 Maltose and Maltotriose Transporter Genes. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(8), 2333–2345. <https://doi.org/10.1128/AEM.01558-08>
- Vidgren, V., Multanen, J.-P., Ruohonen, L., & Londesborough, J. (2010). The temperature dependence of maltose transport in ale and lager strains of brewer's yeast. *FEMS Yeast Research*, 10(4), 402–411. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00627.x>
- Villacreces, S., Blanco, C. A., & Caballero, I. (2022). Developments and characteristics of craft beer production processes. *Food Bioscience*, 45, 101495. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101495>
- Villalba, M. L., Mazzucco, M. B., Lopes, C. A., Ganga, M. A., & Sangorrín, M. P. (2020). Purification and characterization of *Saccharomyces eubayanus* killer toxin: Biocontrol effectiveness against wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 331, 108714. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108714>
- Vu, T. K. L., & Le, V. V. M. (2010). Using fed-batch fermentation in high-gravity brewing: Effects of nutritional supplementation on yeast fermentation performance. *International Food Research Journal*, 17, 117–126.
- Wahid, Z., & Nadir, N. (2013). Improvement of One Factor at a Time Through Design of Experiments. *World Applied Sciences Journal*, 21(1), 56-61.
- Walker, G., & Stewart, G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>
- Walther, A., Hesselbart, A., & Wendland, J. (2014). Genome Sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the World's First Pure Culture Lager Yeast. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(5), 783–793. <https://doi.org/10.1534/g3.113.010090>

- White, C., & Zainasheff, J. (2010). *Yeast: The practical guide to beer fermentation*. Brewers Publications.
- White, L. R., Richardson, K. E., Schiewe, A. J., & White, C. E. (2003). Comparison of yeast viability/vitality methods and their relationship to fermentation performance. In Smart, K. (Ed), *Brewing Yeast Fermentation Performance* (2nd edition). Blackwell Science.
- Winkelman, B., Colino, E., & Civitaresi, M. (2019). El Sistema Agroalimentario Localizado de la cerveza artesanal de San Carlos de Bariloche, Argentina. *Revista Iberoamericana de Viticultura, Agroindustria y Ruralidad*, 6(18), 34–58. <https://doi.org/10.35588/rivar.v6i18.4174>
- Young, T. W. (1996). The biochemistry and physiology of yeast growth. In Priest, F.G. & Campbell, I. (Eds), *Brewing microbiology*. Springer. <https://link.springer.com/book/10.1007/978-1-4684-0038-0>
- Zhang, G., Zhang, N., Yang, A., Huang, J., Ren, X., Xian, M., & Zou, H. (2021). Hop bitter acids: Resources, biosynthesis, and applications. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 105(11), 4343–4356. <https://doi.org/10.1007/s00253-021-11329-4>
- Zhao, X., Procopio, S., & Becker, T. (2015). Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: A review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7588–7598. <https://doi.org/10.1007/s13197-015-1977-y>
- Zheng, X., D'Amore, T., Russell, I., & Stewart, G. G. (1994). Factors Influencing Maltotriose Utilization During Brewery Wort Fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52(2), 41–47. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-52-0041>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & van 't Riet, K. (1990). Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(6), 1875–1881. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.6.1875-1881.1990>

ANEXOS

ANEXO N°1

Medios de cultivo y soluciones de trabajo.

- **Medio YM** (% p/v)

0,3 % extracto de levadura – 0,3 % extracto de malta – 0,5 % peptona de carne - 1 % glucosa.

- **Medio YPD** (% p/v)

1 % extracto de levadura - 2 % peptona de carne - 2% glucosa – 1,5 % agar.

- **Medio MYP** (% p/v)

0,7 % extracto de malta – 0,05 % extracto de levadura – 0,25 % peptona de soja – 1,5 % agar.

- **Medio PDA** (% p/v)

2 % glucosa – 1,5 % agar – 23 % v/v infusión papa.

Infusión papa (300 g papa pelada y cortada) en 900 mL agua destilada.

- **Medio Agar Malta**

2 % extracto de malta – 2 % agar

- **Medio Agar Mosto**

Extracto de malta (Calsa) diluido en agua destilada (3 °Bx) – agregar 2,3 % p/v agar nutritivo.

- **Mosto Extracto de Malta**

Extracto de malta (Calsa) disuelto en agua corriente hasta la densidad requerida (medida con refractómetro - Alla France 0-32 °Bx) – 0,25 % p/v extracto de levadura – 0,3 % p/v peptona ácida de caseína.

- **Mosto Congreso**

Se siguió el método de macerado congreso según Evans *et al.* (2011), con algunas modificaciones (indicadas en *italica*). La preparación del mosto congreso modificado se realizó en un equipo automático Robobrew All Grain (Figura A), y consistió en el macerado de malta de cebada Pilsen molida (molienda ajustada en 0,7 mm) en agua a 70 °C a una relación agua:grano de 3:1. Se adicionó sulfato de calcio dihidratado (0,17 g/kg de malta = 0,3 mM de calcio) y *ácido fosfórico 86 % v/v (0,5 mL/kg de malta para regular el pH en 5,4-5,6)*. La temperatura de macerado se inició en 65 °C y se mantuvo durante 1 hora. Posteriormente se elevó la temperatura con una rampa de 1 °C/min hasta alcanzar los 74 °C y se mantuvo por 10 min. Por último se realizó el filtrado del mosto y lavado de granos con agua a 76 °C *hasta llegar a una densidad de 12 °Bx* (en lugar de terminar con una relación final de agua:grano de 6:1).

Una vez filtrado el mosto, se colectó, se esterilizó en autoclave (121 °C - 15 min) y se trasvasó para eliminar el sedimento (Figura A).



Figura A. A la izquierda, equipo automático Robobrew All Grain en proceso de maceración. A la derecha, filtrado de granos y recolección de mosto en bidón de 20 L para su posterior esterilización.

- Solución de Zinc para fermentaciones

0,13 g de sulfato de zinc heptahidratado disuelto en 10 mL agua destilada y esterilizado con filtro jeringa (0,22 µm). Esta solución stock contiene 3 mg/mL de Zinc.

- Azul de Metileno Citrato (AMC)

Se realizó una solución stock de azul de metileno 0,1 % p/v (Britania) en agua destilada. Esta solución se diluyó en una solución de citrato de sodio (2 % p/v) hasta una concentración final de 0,01 % p/v (solución de trabajo).

- Azul de Metileno Alcalino (AMA)

Se preparó una solución stock de azul de metileno (Britania) en agua destilada hasta una concentración final del 0,1 % p/v. Esta solución se diluyó con una solución buffer glicina 0,1 M (pH 10,6) hasta una concentración final de 0,01 % p/v (solución de trabajo).

- Violeta de Metileno Citrato (VMC)

La preparación fue la misma que la descrita para el AMC; pero utilizando como colorante el violeta de metileno 3 RAX (Sigma).

- Violeta de Metileno Alcalino (VMA)

La preparación fue la misma que la descrita para el AMA; pero utilizando como colorante el violeta de metileno 3 RAX (Sigma).

ANEXO N°2

Análisis de varianza (ANOVA) del Modelo de Superficie Respuesta (CCD-MSR) para la optimización de biomasa de *S. eubayanus*.

| | Estimador | Error estándar | F-valor | p-valor |
|-----------------|-----------|----------------|----------|-------------------------|
| Intercepto | 10,826274 | 0,079717 | 135,8086 | 1,075x10 ⁻¹¹ |
| X1 (Extracto) | 0,374820 | 0,056373 | 6,6490 | 0,0005591 |
| X2 (Peptona) | 0,515740 | 0,056373 | 9,1487 | 9,597x10 ⁻⁰⁵ |
| X1:X2 | -0,343750 | 0,079717 | -4,3121 | 0,0050258 |
| X1 ² | -0,149422 | 0,063035 | -2,3705 | 0,0454865 |
| X2 ² | -0,065647 | 0,063035 | -1,0414 | 0,3378103 |

| | Suma de cuadrados | Grados de libertad | Error cuadrático medio | F-valor | p-valor |
|-----------------|-------------------|--------------------|------------------------|---------|-------------------------|
| FO | 3,2513 | 2 | 1,62567 | 63,9541 | 8,996x10 ⁻⁰⁵ |
| TWI | 0,4727 | 1 | 0,47266 | 18,5944 | 0,005026 |
| SO | 0,1514 | 2 | 0,07568 | 2,9774 | 0,126426 |
| Residual | 0,1525 | 6 | 0,02542 | | |
| Falta de ajuste | 0,0892 | 3 | 0,02975 | 1,4106 | 0,3921 |
| Error puro | 0,0633 | 3 | 0,02109 | | |

R² múltiple: 0,9621 – R² ajustado: 0,9306 - F-valor: 30,49 - p-valor: 0,0003412.

ANEXO N°3**Factor de Utilización (FU) según Tinseth**

| Tiempo hervor (min) | Densidad inicial | | | | | | | | | | |
|---------------------------|------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | 1.030 | 1.040 | 1.050 | 1.060 | 1.070 | 1.080 | 1.090 | 1.100 | 1.110 | 1.120 | 1.130 |
| 0 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 | 0.000 |
| 3 | 0.034 | 0.031 | 0.029 | 0.026 | 0.024 | 0.022 | 0.020 | 0.018 | 0.017 | 0.015 | 0.014 |
| 6 | 0.065 | 0.059 | 0.054 | 0.049 | 0.045 | 0.041 | 0.038 | 0.035 | 0.032 | 0.029 | 0.026 |
| 9 | 0.092 | 0.084 | 0.077 | 0.070 | 0.064 | 0.059 | 0.054 | 0.049 | 0.045 | 0.041 | 0.037 |
| 12 | 0.116 | 0.106 | 0.097 | 0.088 | 0.081 | 0.074 | 0.068 | 0.062 | 0.056 | 0.052 | 0.047 |
| 15 | 0.137 | 0.125 | 0.114 | 0.105 | 0.096 | 0.087 | 0.080 | 0.073 | 0.067 | 0.061 | 0.056 |
| 18 | 0.156 | 0.142 | 0.130 | 0.119 | 0.109 | 0.099 | 0.091 | 0.083 | 0.076 | 0.069 | 0.063 |
| 21 | 0.173 | 0.158 | 0.144 | 0.132 | 0.120 | 0.110 | 0.101 | 0.092 | 0.084 | 0.077 | 0.070 |
| 24 | 0.187 | 0.171 | 0.157 | 0.143 | 0.131 | 0.120 | 0.109 | 0.100 | 0.091 | 0.083 | 0.076 |
| 27 | 0.201 | 0.183 | 0.168 | 0.153 | 0.140 | 0.128 | 0.117 | 0.107 | 0.098 | 0.089 | 0.082 |
| 30 | 0.212 | 0.194 | 0.177 | 0.162 | 0.148 | 0.135 | 0.124 | 0.113 | 0.103 | 0.094 | 0.086 |
| 33 | 0.223 | 0.203 | 0.186 | 0.170 | 0.155 | 0.142 | 0.130 | 0.119 | 0.108 | 0.099 | 0.091 |
| 36 | 0.232 | 0.212 | 0.194 | 0.177 | 0.162 | 0.148 | 0.135 | 0.124 | 0.113 | 0.103 | 0.094 |
| 39 | 0.240 | 0.219 | 0.200 | 0.183 | 0.167 | 0.153 | 0.140 | 0.128 | 0.117 | 0.107 | 0.098 |
| 42 | 0.247 | 0.226 | 0.206 | 0.189 | 0.172 | 0.158 | 0.144 | 0.132 | 0.120 | 0.110 | 0.101 |
| 45 | 0.253 | 0.232 | 0.212 | 0.194 | 0.177 | 0.162 | 0.148 | 0.135 | 0.123 | 0.113 | 0.103 |
| 48 | 0.259 | 0.237 | 0.216 | 0.198 | 0.181 | 0.165 | 0.151 | 0.138 | 0.126 | 0.115 | 0.105 |
| 51 | 0.264 | 0.241 | 0.221 | 0.202 | 0.184 | 0.169 | 0.154 | 0.141 | 0.129 | 0.118 | 0.108 |
| 54 | 0.269 | 0.246 | 0.224 | 0.205 | 0.188 | 0.171 | 0.157 | 0.143 | 0.131 | 0.120 | 0.109 |
| 57 | 0.273 | 0.249 | 0.228 | 0.208 | 0.190 | 0.174 | 0.159 | 0.145 | 0.133 | 0.121 | 0.111 |
| 60 | 0.276 | 0.252 | 0.231 | 0.211 | 0.193 | 0.176 | 0.161 | 0.147 | 0.135 | 0.123 | 0.112 |
| 70 | 0.285 | 0.261 | 0.238 | 0.218 | 0.199 | 0.182 | 0.166 | 0.152 | 0.139 | 0.127 | 0.116 |
| 80 | 0.291 | 0.266 | 0.243 | 0.222 | 0.203 | 0.186 | 0.170 | 0.155 | 0.142 | 0.130 | 0.119 |
| 90 | 0.295 | 0.270 | 0.247 | 0.226 | 0.206 | 0.188 | 0.172 | 0.157 | 0.144 | 0.132 | 0.120 |
| 120 | 0.301 | 0.275 | 0.252 | 0.230 | 0.210 | 0.192 | 0.176 | 0.161 | 0.147 | 0.134 | 0.123 |

El factor de utilización según Tinseth tiene en cuenta el tiempo de hervor desde que se adiciona el lúpulo y la densidad inicial del mosto (Hieronymus, 2012).

ANEXO N°4

Tabla de conversión de la densidad del mosto: Brix (°Bx) - Plato (°P) y SG (g/cm3)

| Brix | Plato | SG | Brix | Plato | SG | Brix | Plato | SG | Brix | Plato | SG |
|------------|------------|---------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|---------------|-------------|-------------|---------------|
| 0.0 | 0.0 | 1000.0 | 8.0 | 8.3 | 1033.1 | 16.0 | 16.6 | 1068.2 | 24.0 | 25.0 | 1105.5 |
| 0.2 | 0.2 | 1000.8 | 8.2 | 8.5 | 1034.0 | 16.2 | 16.8 | 1069.1 | 24.2 | 25.2 | 1106.4 |
| 0.4 | 0.4 | 1001.6 | 8.4 | 8.7 | 1034.8 | 16.4 | 17.1 | 1070.0 | 24.4 | 25.4 | 1107.4 |
| 0.6 | 0.6 | 1002.4 | 8.6 | 8.9 | 1035.7 | 16.6 | 17.3 | 1070.9 | 24.6 | 25.6 | 1108.4 |
| 0.8 | 0.8 | 1003.2 | 8.8 | 9.2 | 1036.5 | 16.8 | 17.5 | 1071.8 | 24.8 | 25.8 | 1109.3 |
| 1.0 | 1.0 | 1004.0 | 9.0 | 9.4 | 1037.4 | 17.0 | 17.7 | 1072.7 | 25.0 | 26.0 | 1110.3 |
| 1.2 | 1.2 | 1004.8 | 9.2 | 9.6 | 1038.2 | 17.2 | 17.9 | 1073.7 | 25.2 | 26.2 | 1111.3 |
| 1.4 | 1.5 | 1005.7 | 9.4 | 9.8 | 1039.1 | 17.4 | 18.1 | 1074.6 | 25.4 | 26.4 | 1112.2 |
| 1.6 | 1.7 | 1006.5 | 9.6 | 10.0 | 1040.0 | 17.6 | 18.3 | 1075.5 | 25.6 | 26.6 | 1113.2 |
| 1.8 | 1.9 | 1007.3 | 9.8 | 10.2 | 1040.8 | 17.8 | 18.5 | 1076.4 | 25.8 | 26.8 | 1114.2 |
| 2.0 | 2.1 | 1008.1 | 10.0 | 10.4 | 1041.7 | 18.0 | 18.7 | 1077.3 | 26.0 | 27.0 | 1115.2 |
| 2.2 | 2.3 | 1008.9 | 10.2 | 10.6 | 1042.6 | 18.2 | 18.9 | 1078.2 | 26.2 | 27.2 | 1116.1 |
| 2.4 | 2.5 | 1009.7 | 10.4 | 10.8 | 1043.4 | 18.4 | 19.1 | 1079.1 | 26.4 | 27.5 | 1117.1 |
| 2.6 | 2.7 | 1010.6 | 10.6 | 11.0 | 1044.3 | 18.6 | 19.3 | 1080.1 | 26.6 | 27.7 | 1118.1 |
| 2.8 | 2.9 | 1011.4 | 10.8 | 11.2 | 1045.2 | 18.8 | 19.6 | 1081.0 | 26.8 | 27.9 | 1119.1 |
| 3.0 | 3.1 | 1012.2 | 11.0 | 11.4 | 1046.0 | 19.0 | 19.8 | 1081.9 | 27.0 | 28.1 | 1120.1 |
| 3.2 | 3.3 | 1013.0 | 11.2 | 11.6 | 1046.9 | 19.2 | 20.0 | 1082.8 | 27.2 | 28.3 | 1121.0 |
| 3.4 | 3.5 | 1013.8 | 11.4 | 11.9 | 1047.8 | 19.4 | 20.2 | 1083.8 | 27.4 | 28.5 | 1122.0 |
| 3.6 | 3.7 | 1014.7 | 11.6 | 12.1 | 1048.6 | 19.6 | 20.4 | 1084.7 | 27.6 | 28.7 | 1123.0 |
| 3.8 | 4.0 | 1015.5 | 11.8 | 12.3 | 1049.5 | 19.8 | 20.6 | 1085.6 | 27.8 | 28.9 | 1124.0 |
| 4.0 | 4.2 | 1016.3 | 12.0 | 12.5 | 1050.4 | 20.0 | 20.8 | 1086.6 | 28.0 | 29.1 | 1125.0 |
| 4.2 | 4.4 | 1017.1 | 12.2 | 12.7 | 1051.3 | 20.2 | 21.0 | 1087.5 | 28.2 | 29.3 | 1126.0 |
| 4.4 | 4.6 | 1018.0 | 12.4 | 12.9 | 1052.2 | 20.4 | 21.2 | 1088.4 | 28.4 | 29.5 | 1127.0 |
| 4.6 | 4.8 | 1018.8 | 12.6 | 13.1 | 1053.0 | 20.6 | 21.4 | 1089.4 | 28.6 | 29.7 | 1128.0 |
| 4.8 | 5.0 | 1019.6 | 12.8 | 13.3 | 1053.9 | 20.8 | 21.6 | 1090.3 | 28.8 | 30.0 | 1129.0 |
| 5.0 | 5.2 | 1020.5 | 13.0 | 13.5 | 1054.8 | 21.0 | 21.8 | 1091.2 | 29.0 | 30.2 | 1130.0 |
| 5.2 | 5.4 | 1021.3 | 13.2 | 13.7 | 1055.7 | 21.2 | 22.0 | 1092.2 | 29.2 | 30.4 | 1131.0 |
| 5.4 | 5.6 | 1022.1 | 13.4 | 13.9 | 1056.6 | 21.4 | 22.3 | 1093.1 | 29.4 | 30.6 | 1132.0 |
| 5.6 | 5.8 | 1023.0 | 13.6 | 14.1 | 1057.5 | 21.6 | 22.5 | 1094.1 | 29.6 | 30.8 | 1133.0 |
| 5.8 | 6.0 | 1023.8 | 13.8 | 14.4 | 1058.3 | 21.8 | 22.7 | 1095.0 | 29.8 | 31.0 | 1134.0 |
| 6.0 | 6.2 | 1024.7 | 14.0 | 14.6 | 1059.2 | 22.0 | 22.9 | 1095.9 | 30.0 | 31.2 | 1135.0 |
| 6.2 | 6.4 | 1025.5 | 14.2 | 14.8 | 1060.1 | 22.2 | 23.1 | 1096.9 | 30.2 | 31.4 | 1136.0 |
| 6.4 | 6.7 | 1026.3 | 14.4 | 15.0 | 1061.0 | 22.4 | 23.3 | 1097.8 | 30.4 | 31.6 | 1137.0 |
| 6.6 | 6.9 | 1027.2 | 14.6 | 15.2 | 1061.9 | 22.6 | 23.5 | 1098.8 | 30.6 | 31.8 | 1138.0 |
| 6.8 | 7.1 | 1028.0 | 14.8 | 15.4 | 1062.8 | 22.8 | 23.7 | 1099.7 | 30.8 | 32.0 | 1139.0 |
| 7.0 | 7.3 | 1028.9 | 15.0 | 15.6 | 1063.7 | 23.0 | 23.9 | 1100.7 | 31.0 | 32.2 | 1140.0 |
| 7.2 | 7.5 | 1029.7 | 15.2 | 15.8 | 1064.6 | 23.2 | 24.1 | 1101.6 | 31.2 | 32.4 | 1141.0 |
| 7.4 | 7.7 | 1030.6 | 15.4 | 16.0 | 1065.5 | 23.4 | 24.3 | 1102.6 | 31.4 | 32.7 | 1142.1 |
| 7.6 | 7.9 | 1031.4 | 15.6 | 16.2 | 1066.4 | 23.6 | 24.5 | 1103.6 | 31.6 | 32.9 | 1143.1 |
| 7.8 | 8.1 | 1032.3 | 15.8 | 16.4 | 1067.3 | 23.8 | 24.8 | 1104.5 | 31.8 | 33.1 | 1144.1 |



Selection of *Saccharomyces eubayanus* strains from Patagonia (Argentina) with brewing potential and performance in the craft beer industry

Julieta Amalia Burini¹ · Juan Ignacio Eizaguirre² · Claudia Loviso³ · Diego Libkind¹

Received: 6 July 2021 / Revised: 21 October 2021 / Accepted: 23 October 2021
© The Author(s), under exclusive licence to Springer-Verlag GmbH Germany, part of Springer Nature 2021

Abstract

Saccharomyces eubayanus is a genetically diverse yeast isolated for the first time in Patagonia (Argentina), which has received special attention in research and brewing applications for being identified as one of the parents of the lager-brewing yeast. In the search for different and innovative products, the beer market has focused part of its efforts on innovation through the application of non-conventional and/or wild yeasts, as is the case of *S. eubayanus*. This study aimed to characterize the brewing potential of *S. eubayanus* and select the most promising strains in terms of beer production. Fifty *S. eubayanus* strains from different Patagonian locations were analyzed in small-scale fermentations. Based on its genetic characteristics and fermentative behavior a candidate from each of the five geographically structured subpopulations of *S. eubayanus* was selected for lab-scale fermentations. Fermentation performance, sugar consumption and production of aroma compounds were evaluated, and one strain was selected to assess for the first time the behavior of this wild yeast at a craft brewing scale. In these conditions, a decrease in fermentation capacity was observed, showing that *S. eubayanus* requires different handling compared to traditional brewing yeasts and set the basis for further fundamental and applied research at larger productive scales. This work supports and encourages the use of native non-conventional yeast in brewing for the production of innovative beers with greater product differentiation, giving rise to the possibility of granting a regional character to the products.

Keywords *Saccharomyces eubayanus* · Wild yeast · Non-conventional yeasts · Organoleptic profile · Brewing innovation · Craft beer

✉ Diego Libkind
libkindfd@comahue-conicet.gob.ar

Julieta Amalia Burini
juliburini@gmail.com

Juan Ignacio Eizaguirre
juani.eizaguirre@gmail.com

Claudia Loviso
claudia.loviso@gmail.com

- ¹ Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC), Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), CONICET—Universidad Nacional del Comahue, Quintral 1250, CP8400 San Carlos de Bariloche, Argentina
- ² Laboratorio de Biología Celular de Membranas (LBCM), Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET), FCEN-UBA, Pabellón IFIByNE, Ciudad Universitaria, CP1428 Buenos Aires, Argentina
- ³ Centro Para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR), CONICET, Bv. Almirante Brown 2915, CP9120 Puerto Madryn, Argentina

Introduction

Yeasts play an important role in brewing. In addition to being responsible for carrying out fermentation, they are also able to produce a plethora of organic compounds and enzymes that have a decisive impact on the organoleptic characteristics of beer. This makes yeasts a brewing tool of special interest in a growing market where consumers demand different and innovative products [1]. In this sense, the use of non-conventional yeasts—other than the traditional domesticated ale (*Saccharomyces cerevisiae*) and lager (*Saccharomyces pastorianus*) yeasts—is being explored; specially to increase flavor diversity, control microbial spoilage and/or alter other key characteristics, such as the final alcohol content [1–6]. Non-conventional yeasts belong to various genera such as *Brettanomyces*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Pichia* and *Wickerhamomyces*, among others [1, 3, 7, 8].

Yeasts of the *Saccharomyces* genus, different from the traditional brewing yeasts, are also being explored for innovation

in brewing [2]. Among these is the species *Saccharomyces eubayanus*, initially found in association with *Nothofagus* (southern beech) trees in Patagonia (Argentina) and identified as one of the parents of the hybrid species *S. pastorianus* (lager yeast) [9]. The lager-brewing yeast arose out of hybridization between domesticated *S. cerevisiae* ale yeast and this cold-tolerant wild yeast, and it is proposed that the mitochondrial genome of *S. eubayanus* conferred the fitness advantage during cold fermentation of the hybrid [10].

Since its discovery, *S. eubayanus* has been intensively studied, both for brewing applications and for understanding the evolution, ecology and population genomics of the *Saccharomyces* genus [11]. More recently, new strains of *S. eubayanus* were isolated from North America, Asia, New Zealand and Patagonia (Argentina and Chile) [12–18], adding complexity to the phylogeography of this species. Meanwhile, it was found that the Patagonian region of South America harbors the highest abundance and diversity of the species and that it is comprised of five subpopulations: PA-1, PA-2, PB-1, PB-2 and PB-3 [13, 15, 16, 19]. Distinct geographic subpopulations can vary in terms of genome content, with this kind of variation having a large effect on phenotypic variability [20].

In lager brewing there is a limited variety of styles, mostly due to the low genetic diversity among *S. pastorianus* strains, with the existence of only two genetically distinct groups (Frohberg and Saaz) available to brewers [21]. Consequently, the identification of new strains able to provide unique organoleptic profiles is an interesting approximation for diversification of lager beers: either directly or through the generation of new *Saccharomyces* hybrids from crosses with *S. cerevisiae*. In this way, the large number of Patagonian isolates belonging to different genetic populations can harbor a phenotypic diversity of great interest for the brewing industry. Only few studies have addressed the fermentative capacity and brewing potential of genetically distinct strains of *S. eubayanus*, and in all of them intraspecies variability was found [12, 13, 22, 23]. Nevertheless, there are no reports on the evaluation of this wild yeast in large-scale breweries.

The aim of this study was to characterize the fermentative and organoleptic behavior of different *S. eubayanus* Patagonian isolates in order to find the most promising in terms of beer production and evaluate their application into the brewing industry for product differentiation.

Materials and methods

Yeast strains

All *S. eubayanus* strains used in this study were isolated from Andean Patagonia [13] and were deposited in the Culture Collection of IPATEC, Río Negro, Argentina. The commercial *S. pastorianus* Frohberg strain W34/70

(Weihenstephan 34/70) was used as control. Prior to use, the cryopreserved strains were grown and maintained on YM agar (0.3% yeast extract, 0.3% malt extract, 0.5% peptone, 1% glucose, 1.5% agar).

PCA analysis and selection of *S. eubayanus* strains

Principal component analysis (PCA) was performed using the attenuation values and kinetic parameters previously obtained for 50 isolates of *S. eubayanus* in small-scale fermentation tests (10 mL) [13]. The main components were analyzed in two main dimensions from which a candidate from each of the five geographically structured subpopulations of *S. eubayanus* was selected for laboratory scale fermentations. Analysis was performed in R statistical software (R Development Core Team, 2015), using the FactoMineR package.

Laboratory-scale fermentations

The experimental fermentations were carried out in 250 mL flasks containing 150 mL of 12.0 °P congress wort [24], fitted with airlocks filled with sterile water. The wort was produced in a Robobrew All Grain Brewing System with Pilsen barley malt. After lautering, the wort was collected, sterilized (121 °C–20 min) and stored at 4 °C until use. Precultures were propagated aerobically in malt extract medium (supplemented with 0.25% yeast extract and 0.3% casein peptone) at 20 °C with orbital shaking (140 rpm). When the precultures reached the exponential growth phase, flasks were individually inoculated at a rate of 1.5×10^6 viable cells/mL [25]. Cell number and viability were determined through alkaline methylene violet staining with a microscope (Olympus CX22LED) and Neubauer chamber [26]. Prior to pitching the wort was oxygenated to 16 ppm and zinc (0.3 ppm) was added. Three independent fermentations at 10 °C were carried out for each strain. The evolution was followed daily (every 12 h) by weight loss (CO₂ release) until constant weight. Fermented media were separated from yeasts by centrifugation (5000×g, 10 min, 4 °C), filtered (0.22 μm) and stored at 4 °C prior to analysis.

Microbrewery beer production with *S. eubayanus*

One strain of *S. eubayanus* (CRUB 1568^T) was selected to produce beer at three local microbreweries. Yeast starter was aerobically propagated in the laboratory (140 rpm–20 °C) up to a volume of 20 L, using malt extract medium supplemented with 0.25% yeast extract and 0.3% casein peptone. For the last stage of propagation, a ‘yeast step up’ was carried out in each brewery; it consisted of growing yeast in 15% of the fermenters final volume, in a wort similar to that of the batch to be produced. Oxygenation was performed

inline from wort chiller to fermenter. Wort and fermentation conditions in each of the breweries are listed in Table 1.

Analytical procedures

For HPLC analysis, a Waters 600E HPLC System controlled with Empower 2 software and coupled to a 2414 RI Detector (sugars) or 2998 photodiode array detector (phenols) was used.

Ethanol, glycerol and fermentable sugars (glucose, maltose and maltotriose) were measured according to Nguyen et al. (2010) [27]. A Rezex™ ROA-Organic Acid H⁺ (8%) column (300 × 7.8 mm) was heated at 60 °C and equilibrated with 0.005 N H₂SO₄ in ultrapure water. Samples and standards were filtered through 0.45 μm nylon filters and directly injected (10 μL) onto the chromatographic column. Elution was performed with isocratic gradient (100% 0.005 N H₂SO₄) at 0.6 mL/min flow rate. The RI detector was set at 40 °C. Identification and quantification were performed by comparison against external standards.

Volatile phenols (4-vinylphenol, 4-vinylguaiacol, 4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol) were determined by HPLC according to Saez et al. (2011) [28]. Samples and standards were filtered through 0.45 μm nylon filters and directly injected (100 μL) onto a Luna™ 5 μm C18(2) 100 Å column (250 × 4.6 mm). The mobile phase was composed of acetonitrile and water with formic acid (0.12 g/L, pH at 3.5). An acetonitrile gradient elution was performed (10 min-75% acetonitrile, 5 min-60%, 5 min-50%, 15 min-40%, 5 min-75%), with a 10-min re-equilibration of the column after running time finishes. The flow was fixed at 0.9 mL/min. The online spectra were acquired in the 220–700 wavelength range with resolution of 1.2 nm and the eluted substances were monitored at 230 and 280 nm. Identification and quantification were performed by comparison against external standards.

Esters and higher alcohols were determined using solid-phase microextraction coupled to gas chromatography with a flame ionization detector (SPME-GC-FID) (da Silva et al. 2008) [29]. To pre-equilibrate the samples, 3.5 g of NaCl was added to 10 mL of filtered beer (0.45 μm) and shaken for 50 min at 40 °C, after which an SPME 85 μm CAR/PDMS fiber was exposed in the sample headspace during 50 min. The fiber was desorbed into the injection port of a Thermo Scientific FOCUS gas chromatograph and analytes were

separated on a DB5 Column (30 m × 0.25 mm ID × 0.25 μm) using the following conditions: splitless injection system (2 min), injector temperature of 250 °C and constant flow (1.5 mL/min) of nitrogen as carrier gas. Temperature program: 5 min at 35 °C with ramp from 15 °C/min up to 250 °C; holding 5 min at 250 °C. Flame ionization temperature: 270°C. Compounds were identified by comparison with standards and were quantified using standard curves. 1-Butanol (Sigma) was used as an internal standard. Radar charts and a principal component analysis were performed using the fmsb and the FactoMineR packages, respectively (R statistical software).

The contribution of each volatile compound was also quantitatively evaluated using Odor Activity Values (OAVs). OAVs were calculated by dividing the mean concentrations of aroma compounds found in beer by their sensory thresholds from the literature [30, 31]. Only the compounds with an OAV greater than 1 were accepted to contribute individually to the aroma.

Attenuation was calculated as the difference between the Original Gravity and Final Gravity, as described by White and Zainasheff (2010) [25].

Maltose gene analyses

De novo assemblies for strains CRUB 1568^T and CRUB 1935 [32] were used to search for genes responsible for the consumption of maltose. For this, the sequences of *MALT*, *MALR* and *MALS* genes proposed by Baker et al. (2015) [33] were used as queries (Supplementary material). The search was carried out using the blaststandalone (BLASTN 2.2.31+), and the genes were extracted using text editing scripts. Once the sequences for each strain were obtained, the alignments and the translation into proteins were performed in MEGA (v. 6.0) according to the alternative yeast nuclear model. Changes in amino acid sequences were visually recorded (Table 3).

Kinetic parameters estimation and statistical analysis

Kinetic parameters in laboratory-scale experiments were calculated from each fermentation individually using the amount of daily CO₂ lost by the system and the reparameterized Gompertz equation [34]. Data fitting was performed

Table 1 Brewing conditions at the microbreweries

| Brewery | Volume (L) | Original gravity (°P) | IBU | Oxygen (ppm) | Fermentation temperature (°C) | Pitching rate (cel/mL) |
|---------|------------|-----------------------|-----|--------------|-------------------------------|------------------------|
| A | 1500 | 11.4 | 15 | 8.5 | 10 | 1.56 × 10 ⁶ |
| B | 1200 | 12.4 | 16 | 10.3 | 11 | 1.52 × 10 ⁶ |
| C | 1000 | 11.4 | 17 | 10.0 | 11 | 1.46 × 10 ⁶ |

using GraphPad Prism software (GraphPad Software, La Jolla, CA, USA). For the microbrewery scale fermentations, continuous measurements of density ($^{\circ}\text{P}$) were carried out to monitor the fermentation kinetics. Data were fitted to the one-phase exponential decay function (GraphPad Prism) and kinetic parameters were obtained.

Statistical analyses were performed on the fermentation data with one-way ANOVA and Tukey's test using GraphPad Prism. The statistical level of significance was set at a $p < 0.05$.

Results

Screening and selection of *S. eubayanus* isolates

The principal component analysis results for the fermentation parameters of the 50 *S. eubayanus* strains tested are shown in Fig. 1, where the representation of the active variables in the first two axes explain 76% of the total variability. Regarding the correlation of variables, a negative correlation is evident between the production of CO_2 and the lag phase. On the contrary, fermentation rate and attenuation do not have a correlation with each other, at least not of the linear type. No clustering of strains according to populations was observed. The strains of the PB-1 subpopulation were mostly located in the maximum ranges of the variables attenuation, CO_2 production and fermentation rate and, at the same time, the lowest values of lag phase times. It is noteworthy that most of the strains of the PA-2 subpopulation showed a pronounced lag phase. The best strains in terms of fermentation

performance within each of the five subpopulations were selected for subsequent experiments: CRUB 2104 (PA-1), CRUB 2031 (PA-2), CRUB 1568^T (PB-1), CRUB 2005 (PB-2) and CRUB 1935 (PB-3) (highlighted in Fig. 1). The geographical characteristics of their isolation can be found in Table S1 (please see Supplementary Material).

Fermentative capability across *S. eubayanus* subpopulations

To evaluate the fermentation potential of the selected *S. eubayanus* strains we performed a laboratory scale fermentation assay in all-malt wort. All the selected *S. eubayanus* strains showed similar fermentation rates and CO_2 production with the exception of strain CRUB 1935 that exhibited a lower fermentation capacity (33% lower fermentation rate and 21% lower CO_2 production, $p < 0.0001$) (Table 2). The industrial strain W34/70 outperformed all strains in terms of the fermentation parameters assessed (30% higher CO_2 production and 35% higher fermentation rate, $p < 0.0001$) (Fig. 2, Table 2). For all strains, fermentation at 10 $^{\circ}\text{C}$ was completed in 12 days after pitching (Fig. 2). Regarding sugar consumption (Fig. 3), none of the *S. eubayanus* strains were able to use maltotriose, associated with an average attenuation 22% lower and a mean ethanol production 25% lower, in relation to *S. pastorianus* control strain ($p < 0.0001$). Maltose was consumed by all *S. eubayanus* strains yet not as efficiently as by the lager yeast (20% lower average consumption, $p = 0.006$). Strain CRUB 1935 not only exhibited poor fermentation kinetics relative to other *S. eubayanus* strains, but also showed an 11% decrease in attenuation, along with

Fig. 1 Principal component analysis (PCA) of the fermentation parameters assayed in the small-scale fermentations of the 50 *S. eubayanus* strains isolated in Patagonia (Argentina). The vectors designate the fermentation parameters analyzed: lag phase (h), attenuation (%), CO_2 production (g) and fermentation rate (h^{-1}). The labeled strains represent the best strains in terms of fermentation performance within each of the five subpopulations

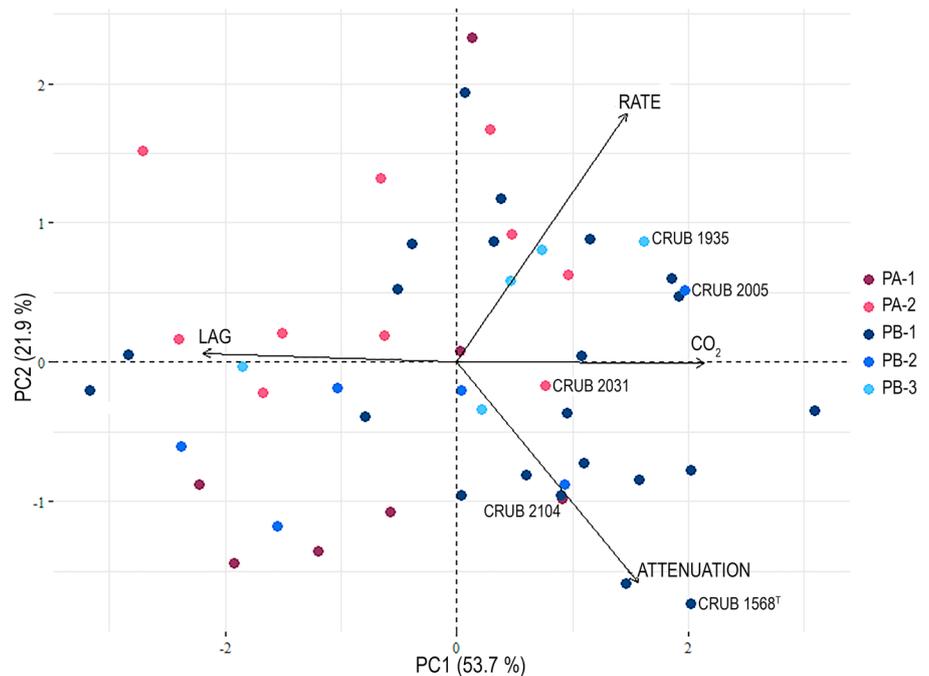


Table 2 Fermentation characteristics of *S. eubayanus* strains in lab-scale fermentations

| | CRUB 2104 | CRUB 2031 | CRUB 1568 ^T | CRUB 2005 | CRUB 1935 | W34/70 |
|--------------------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| Fermentation rate (h ⁻¹) | 0.028 ± 0 ^b | 0.026 ± 0 ^b | 0.028 ± 0 ^b | 0.031 ± 0 ^b | 0.019 ± 0 ^c | 0.041 ± 0 ^a |
| CO ₂ production (g) | 3.9 ± 0.2 ^b | 3.7 ± 0 ^b | 3.7 ± 0.1 ^b | 3.9 ± 0.1 ^b | 3.0 ± 0.1 ^c | 5.2 ± 0.1 ^a |
| Attenuation (%) | 66.1 ± 1.6 ^b | 64.8 ± 1.3 ^b | 65.7 ± 0.8 ^b | 66.1 ± 1.3 ^b | 54.4 ± 1.7 ^c | 85.8 ± 0 ^a |
| Ethanol (% v/v) | 3.85 ± 0.15 ^b | 3.93 ± 0.10 ^b | 3.86 ± 0.07 ^b | 3.87 ± 0.05 ^b | 3.07 ± 0.09 ^c | 4.97 ± 0.04 ^a |
| Final pH | 4.64 ± 0.03 ^b | 4.69 ± 0.02 ^a | 4.59 ± 0.02 ^c | 4.59 ± 0.01 ^c | 4.68 ± 0.02 ^a | 4.59 ± 0.01 ^c |

Fermentations were performed in triplicate ($n=3$), and a one-way ANOVA test was carried out to evaluate for statistically significant differences. Different letters represent differences between the strains for each parameter ($p < 0.05$)

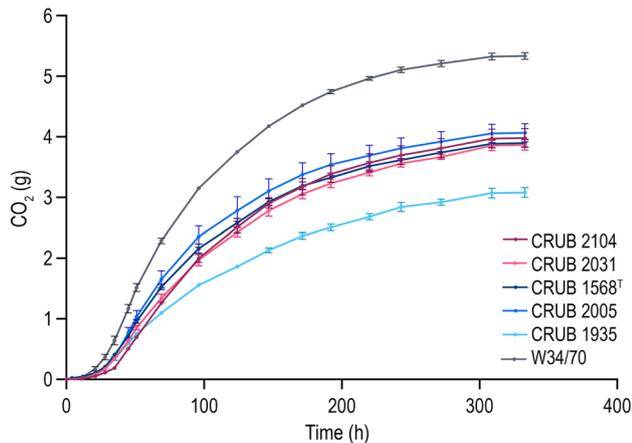


Fig. 2 Fermentation kinetics at lab-scale of the selected *S. eubayanus* strains and the commercial *S. pastorianus* strain (W34/70), represented as CO₂ production over time. Fermentations were performed in congress wort in triplicate ($n=3$), and mean with respective error bars plotted

a 20% lower maltose consumption ($p < 0.0001$) and a 21% lower ethanol production ($p < 0.0001$) (Table 2, Fig. 3).

A comparison of the predicted proteins associated with maltose utilization between CRUB 1935 and CRUB 1568^T showed amino acid changes in all the proteins studied, except for SeubMALT1 (transporter), SeubIMA-D (maltase) and SeubMAL33A (regulator) (Table 3). The bulk of the modifications was observed for enzymes associated with maltose cleavage (maltases), finding changes in 1–1.5% of their aminoacidic sequence. Of these changes, 76% involved modifications in amino acids' polarity.

Flavor compounds profile of *S. eubayanus* subpopulations

In order to characterize the production of compounds that could affect the flavor profile of beers produced by *S. eubayanus* strains, we analyzed the volatile phenols, esters and higher alcohols after wort fermentation; the results are shown in Fig. 4, Table S2 and Table S3. The production of phenols by *S. eubayanus* strains was evident, and

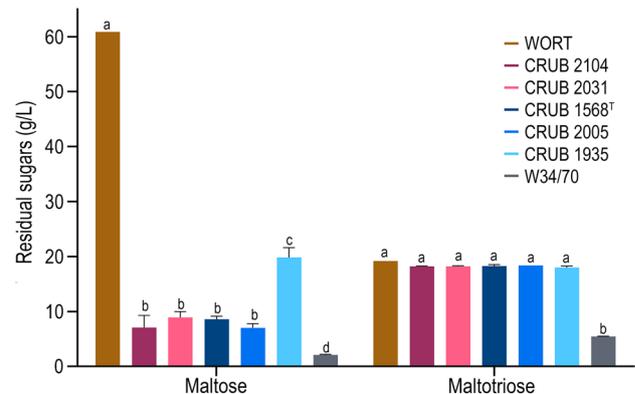


Fig. 3 Residual sugars in lab-scale fermentations in congress wort for the five select *S. eubayanus* strains and the commercial *S. pastorianus* strain (W34/70). Fermentations were performed in triplicate ($n=3$), and a one-way ANOVA test was carried out to evaluate for statistically significant differences. Different letters represent differences between the strains for the consumption of each sugar ($p < 0.05$)

these phenols were identified as 4-vinylguaiacol (4-VG) and 4-vinylphenol (4-VP). In all strains both compounds were found above their perception threshold in beer with OAVs > 1 (Table S2; Table S3). Strains CRUB 2005 and CRUB 1935 exhibited the greatest levels of 4-VG and 4-VP. Volatile phenols were not detected after fermentation for the control strain W34/70. The presence of phenols in fermentations carried out with *S. eubayanus* strains, and their absence in those carried out with the lager strain, were corroborated by sensory analysis.

Regarding esters and higher alcohols, we found that all strains were capable of producing the volatile compounds analyzed, but only few produced them at levels that exceed their perception thresholds in beer (Table S2; Table S3; Fig. 4). Strains CRUB 2104 and CRUB 1568^T produced ethyl hexanoate and ethyl octanoate at levels above thresholds; and strain CRUB 2031 produced only ethyl octanoate above the perception threshold. *S. eubayanus* strains CRUB 2005 and CRUB 1935 did not show significant ester production (OAVs < 1, Table S3). On the other hand, the lager control strain exhibited the highest production levels of

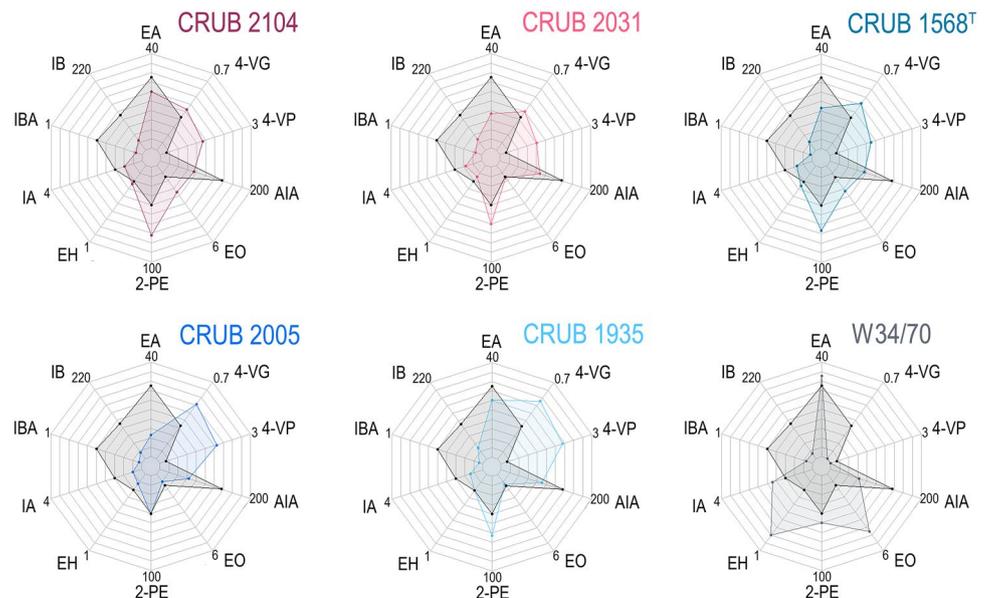
Table 3 Amino acid changes between *S. eubayanus* CRUB 1935 and the type strain CRUB 1568^T in proteins associated with maltose utilization

| Proteins | CRUB 1935 vs CRUB 1568 ^T | | | |
|-----------------------------------|-------------------------------------|------------------------|--------------------|--|
| | Protein length (aa) | Variable site position | Amino acid changes | Amino acid polarity changes ^A |
| Transporters (<i>MALT</i>) | | | | |
| SeubMALT1 (MAL21 ^H) | 614 | – | No changes | No changes |
| SeubMALT2n4 (MAL31 ^H) | 614 | #83 | K → E | PP → PN |
| SeubMALT3 (MAL31 ^H) | 615 | #343 | E → K | PN → PP |
| | | #611 | V → M | NP → NP |
| Maltases (<i>MALS</i>) | | | | |
| SeubIMA-B (IMA1n4 ^H) | 590 | #145 | V → A | NP → NP |
| | | #232 | T → I | PU → NP |
| | | #240 | P → A | PU → NP |
| | | #262 | I → M | NP → NP |
| | | #267 | T → K | PU → PP |
| | | #461 | C → S | PU → PU |
| | | #492 | L → S | NP → PU |
| | | #547 | A → N | NP → PU |
| | | #557 | S → T | PU → PU |
| | | SeubIMA-D (IMA1) | 590 | – |
| MALS (MAL32 ^H) | 586 | #32 | D → N | PN → PU |
| | | #125 | F → S | NP → PU |
| | | #386 | V → I | NP → NP |
| | | #415 | R → G | PP → PU |
| | | #484 | K → E | PP → PN |
| | | #519 | G → D | PU → PN |
| Regulators (<i>MALR</i>) | | | | |
| SeubMAL63A (MAL63 ^H) | 472 | #68 | I → T | NP → PU |
| | | #73 | E → G | PN → PU |
| | | #450 | S → L | PU → NP |
| SeubMAL63B (MAL63 ^H) | 471 | #264 | T → A | PU → NP |
| SeubMAL33A (MAL33 ^H) | 462 | – | No changes | No changes |
| SeubMAL33B (MAL33 ^H) | 469 | #72 | P → S | PU → PU |

^ANP non-polar (hydrophobic) side chains, PU polar uncharged side chains, PN polar with negative charged side chains, PP polar with positive charged side chains

^HClosest *S. cerevisiae* homolog

Fig. 4 Graphic representation of the volatile compounds quantified for the strains tested in congress wort at lab-scale. For each spider chart, the perception thresholds of the compounds are represented in black [30, 31, 57, 61, 62]. EA ethyl acetate, 4-VG 4-vinylguaiaicol, 4-VP 4-vinylphenol, AIA amyl/isoamyl alcohol, EO ethyl octanoate. 2-PE 2-phenylethanol, EH ethyl hexanoate, IA isoamyl acetate, IBA isobutyl acetate, IB isobutanol



ethyl acetate, isoamyl acetate, ethyl hexanoate and ethyl octanoate. Regarding higher alcohols, only 2-phenylethanol was produced in concentrations above the threshold (OAVs > 1, Table S3) for all strains, except strain CRUB 2005. To determine whether organoleptic profiles correlated with phylogenetic characteristics, we performed a global principal component analysis (PCA) using ten selected volatile compounds (Fig. 5). The representation of the active variables in the first two axes explain 90.9% of the total variability. The strains were genetically grouped and three clusters were observed in this analysis: Cluster I contains the strains belonging to population A (grouped close to higher alcohols), Cluster II contains the strains belonging to population B (grouped close to phenols and ethyl esters) and Cluster III contains the lager strain (grouped close to ethyl and acetate esters).

Strain CRUB 1935 turned out to have the worst fermentative performance. In addition, CRUB 1935 and CRUB 2005 strains presented the highest production of volatile phenols and a low contribution to the fruity/floral organoleptic character (OAVs of esters and higher alcohols < 1). Strain CRUB 2031 presented a moderate production of active aroma compounds; however, in the sensory analysis a high production of hydrogen sulfide (described as rotten eggs) was perceived, with a negative impact on flavor. Mardones et al. (2020) [22] also observed a high production of sulfides in some Chilean strains of *S. eubayanus* and found that they were able to overexpress the assimilatory sulfate reduction (H₂S) pathway. Therefore, the most promising strains for its application in the brewing industry turned out to be strains CRUB 2104 (PA-1) and CRUB 1568^T (PB-1), also described in the sensory analysis to be the most pleasant in terms of phenols, with sweet-like

aromas. From the PCA for volatile compounds (Fig. 5), strain CRUB 1568^T was positioned close to the center, indicating a moderate production of all the compounds analyzed, and therefore being the first one selected for large-scale brewing trials.

Fermentative performance of *S. eubayanus* in craft microbreweries

Starter cultures of CRUB 1568^T were transferred to three microbreweries in Bariloche (Patagonia, Argentina). The last stage of yeast propagation was carried out at the microbreweries. In all breweries, pitching rate values close to those recommended [25] were achieved after 48 h (Table 1). Batch volumes were in the range of 1000–1500 L, initial oxygen levels were between 8 and 11 ppm and fermentation temperatures were set up at 10–12 °C. The observed fermentation rates were similar for all microbreweries (Table 4). Fermentations took more than 20 days to complete (Fig. 6), almost twice the time compared to the lab-scale fermentations. Likewise, average attenuation at day 12 was 31.7%, half of what was obtained for this strain at laboratory conditions. The lower attenuation values are consistent with a higher residual maltose content in the final beer, with 2 to 4 times more residual maltose found in large-scale fermentations (Table 4). There was no consumption of maltotriose, according to what was previously observed.

Fig. 5 Principal component analysis (PCA) of volatile compound production across strains. The vectors designate the volatile compound analyzed, colored according to the type: esters, higher alcohols and volatile phenols

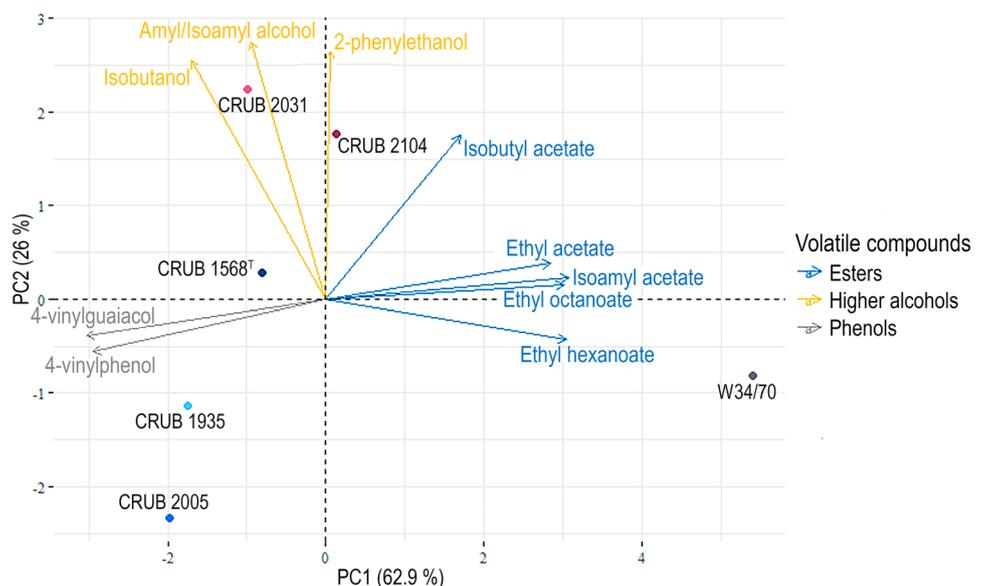


Table 4 Fermentation parameters of beers made with *S.eubayanus* CRUB 1568^T in microbreweries

| Brewery | Fermentation rate (h ⁻¹) | Final gravity (°P) | Attenuation (%) | Attenuation 12 days (%) | Residual maltotriose (g/L)* | Residual maltose (g/L)* | Ethanol (% v/v) |
|-----------|--------------------------------------|--------------------|-----------------|-------------------------|-----------------------------|-------------------------|-----------------|
| A | 0.0034 | 4.6 | 61.4 | 30.2 | 22.1 | 14.2 | 3.70 |
| B | 0.0027 | 6.1 | 52.1 | 28.3 | 23.5 | 34.2 | 3.79 |
| C | 0.0029 | 5.8 | 49.5 | 27.4 | 22.6 | 35.1 | 2.98 |
| Mean ± SD | 0.0030 ± 0.0003 | 5.5 ± 0.8 | 54.3 ± 6.3 | 28.6 ± 1.4 | 22.7 ± 0.7 | 27.8 ± 11.8 | 3.49 ± 0.44 |

*Initial values of maltose and maltotriose (g/L) by brewery: (A) 66.2 and 21.7—(B) 68.6 and 23.2—(C) 65.8 and 22.5

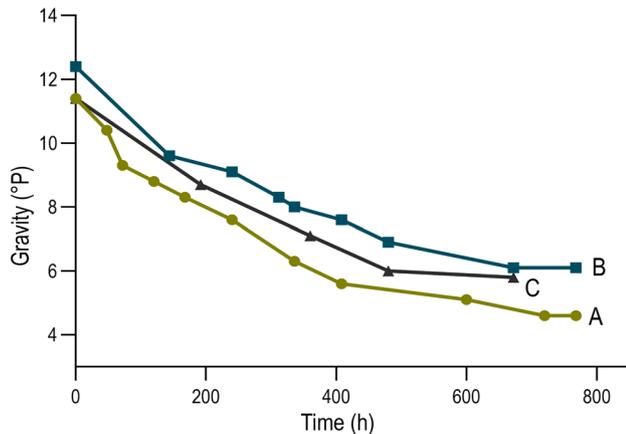


Fig. 6 Fermentation kinetics of *S. eubayanus* CRUB 1568^T at large-scale (represented as density decrease over time). Fermentations were performed at three different local microbreweries (A, B and C) that produced lager beers based on pilsner-style recipes

Discussion

Currently, the production of diverse and novelty beers is a trend in the brewing industry, and focus is being made on the selection and application of alternative yeast strains as a source of biodiversity for innovation [2, 8, 35]. Yeast isolation from the wild is one strategy available for providing new strains for the fermentation industry [3]. In this way, the wild species *S. eubayanus*, parent of the lager yeast *S. pastorianus*, represents a potential source of strains for brewing applications [3, 13, 22]. In this study, we analyzed for the first time the fermentation performance and organoleptic profile of strains from different genetic populations of *S. eubayanus* isolated from Patagonia (Argentina), for the selection and application in the brewing industry. The low attenuation observed for the studied *S. eubayanus* strains compared to the lager yeast W34/70 is mostly the result of the inability of *S. eubayanus* to consume maltotriose, which agrees with previous reports [12, 22, 33, 36–40]. In this work we confirmed the lack of maltotriose utilization for *S. eubayanus* strains, representative of all

subpopulations, and for the type strain at different fermentative scales. The use of maltotriose is one of the examples of domestication traits in brewing yeasts [41], and most wild species of *Saccharomyces* are incapable of its use which is consistent with the fact that this sugar is not common in nature [42]. *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. arboricola* and *S. uvarum* are other wild *Saccharomyces* species that report to have an inability to consume maltotriose [36, 43–45]. Surprisingly, a recent study reported fermentation of maltotriose by the wild species *S. jurei*; the associated mechanism seemed to involve transmembrane transporters but is still unclear and requires further investigation [36]. Although the consumption of all the wort sugars is an objective in terms of productivity, in some styles of beer the presence of a proportion of residual sugars highlights characteristics such as body, mouthfeel and maltiness [46]. Therefore, despite its lack of ability to assimilate maltotriose, *S. eubayanus* still has brewing potential.

Within the *S. eubayanus* studied strains, CRUB 1935 (PB-3, Tierra del Fuego) presented a reduced fermentative performance and a low maltose consumption and ethanol production. Nespola et al. (2020) [12] also found differences in the fermentation capacity of different isolates of *S. eubayanus* belonging to different subpopulations throughout South America; but, contrary to what was observed in this and previous studies [32], strains found at lower latitudes showed greater fermentative rates and maltose consumption. The positive correlation between fermentative kinetics and maltose consumption has already been reported, both for *S. cerevisiae* and for *S. eubayanus* [12, 47]; thus differences in fermentation performance between yeast strains could be partly related with the differential ability to utilize the maltose present in wort during fermentation [33, 48, 49]. In this context, we made a first approximation by analyzing differences between strain CRUB 1935 and the type strain of *S. eubayanus* in the main proteins associated with maltose consumption. Of the ten proteins studied, changes were observed at the amino acid level in seven of them, being maltase the one for which the greatest amount of modifications was found. Even though some of the observed changes could be responsible for the lower fermentation capacity

of CRUB 1935, it should only be conceived as a working hypothesis given the overall fermentation rate of maltose was previously correlated with the transport activity (*MALT* genes) rather than its hydrolysis (maltase activity), being the former the rate limiting step in the utilization of this sugar [50–52]. In addition—unlike *S. cerevisiae* where maltose metabolism and the responsible *MAL* genes are well characterized in terms of sequence, genetics, regulation and biochemistry—knowledge on maltose transport in *S. eubayanus* is limited; therefore, additional analyzes (including transcriptional studies) would be necessary to evaluate if the amino acid changes found in this work have any relationship with the lower fermentative capacity of the CRUB 1935 strain.

Regarding beer flavor and aroma, we found that one of the most distinctive flavor compounds produced by all *S. eubayanus* strains were volatile phenols, in particular 4-vinylphenol (4-VP) and 4-vinylguaiacol (4-VG). The production of 4-VG was previously reported for *S. eubayanus* strains [23, 53–55], although to our knowledge this is the first time that the production of 4-VP has been reported for *S. eubayanus* (exceeding 8 times on average its perception threshold, OAV = 8). The different concentration of 4-VP and 4-VG produced by the different strains reveals intraspecific variability. 4-VP and 4-VG are the decarboxylation products of the phenolic acids p-coumaric acid and ferulic acid present in wort. The genetic underpinnings of this phenotype are well-described, and involve the action of *FDC1* and *PAD1* genes [56, 57]. In wild yeast, *PAD1* and *FDC1* enzymes help to detoxify phenylacrylic acids found in plant cell walls. Therefore, it would be expected that, unless there is counterselection, activity of these genes is retained [58]. Lager beers are known for their crisp flavor profiles that lack appreciable phenols, in accordance with the absence of this compound for the control strain W34/70. In most industrial ale and lager yeasts these genes have been inactivated or eliminated by multiple types of mutations that led to their loss of function. Nevertheless, they have been retained in some brewing yeasts (like Belgian and wheat strains) that ferment products where phenolic off-flavor is prized [10, 58, 59], and are considered signs of domestication in the beer industry. 4-VP and 4-VG are perceived as medicinal, phenolic, clove-like, spicy or smoky and are considered off flavors in many beer styles (being referred to as “phenolic off flavor” or POF), limiting their wider usability in brewing. However, in some special beer styles, like wheat beers and saisons, these phenolic flavors are an essential part of the organoleptic profile [57, 60–62].

Moreover, volatile esters and higher alcohols constitute important groups of aromatic compounds as they are responsible for imparting floral and fruity aromas, and contribute to the overall beer flavor character of beer [63–65].

We evaluated the presence of acetate esters (ethyl, isobutyl and isoamyl acetate), ethyl esters (ethyl hexanoate and ethyl octanoate) and higher alcohols (isobutanol, amyl and isoamyl alcohol, 2-phenylethanol), and found that all were produced by the *S. eubayanus* strains analyzed, in agreement with previous reports [22, 23, 36, 40, 54, 55, 66]. Nevertheless, only some of them exceeded the perception thresholds thus contributing to the overall organoleptic profile (Fig. 4, Table S2). Strains CRUB 2104 and CRUB 1568^T produced the greatest levels of the pleasant fruity-esters ethyl hexanoate and ethyl octanoate (perceived as fruity, apple, pineapple, brandy) and the rose-like 2-phenylethanol. The different production of volatile compounds among *S. eubayanus* strains demonstrate intraspecific phenotypic variability, and is in accordance with other reports [22, 23]. Mardones et al. (2020) [22] proposed that these phenotypic variabilities could be influenced by differences in the uptake and accumulation of precursor amino acids. The control strain W34/70 greatly outperformed the wild strains in the production of fruit esters, according to the sensory analysis where a strong pear and apple aroma was perceived. Steensels et al. (2014) [67] found that production of certain desirable aroma compounds, such as esters, might have been selected for industrial yeasts and could therefore be a domestication phenotype.

Furthermore, we could observe that regarding the production of volatile compounds, the strains were grouped according to their population structure. On the contrary, Mardones et al. (2020) [22] did not observe evidence of clustering based on geographic origin or genetics for the production of volatile compounds, although they only studied strains belonging to population PB of *S. eubayanus*. Our results should be considered as a tendency, since the analysis was performed with one strain from each subpopulation and only one lager control. Future analyzes should be carried out with a greater number of strains.

The strain CRUB 1568^T was selected among 50 isolates of *S. eubayanus* representing all the species genetic diversity found in Argentine Patagonia, and was used in large-scale beer production due to its relatively good fermentation performance, moderate phenol production and contribution of fruity esters; the greatest fermentation capacity was also observed for this strain compared to the Chilean isolates [22]. CRUB 1568^T was transferred to three local microbreweries that produced lager beers based on pilsner-style recipes. Obtaining consistent data in an industrial environment is rarely possible [68]; however, we were able to observe a similar fermentative behavior between different microbreweries. When this wild yeast was applied at a large-scale it showed poorer fermentation performance compared with lab-scale trials, with long fermentation times and inefficient sugars consumption. Changes in physical conditions can have a negative effect on yeast behavior since they involve

considerable additional stress, especially for wild yeasts that are not adapted to these anthropic environments [69, 70]. Stress factors, like hydrostatic and gas pressure, exert a negative effect on cell membranes partly due to the high sensitivity of lipids and phospholipids to high pressure, determining the compaction of the fatty acid chains and reducing the fluidity of the membrane [69, 71]. The consumption of sugars during fermentation could be affected by the impact of these stress factors on the plasma membranes. Ongoing studies are focused on the understanding of the determinant biotic and abiotic factors for an acceptable performance of *S. eubayanus* at the craft and industrial scale. This information is vital to ensure a wide and long-standing application of *S. eubayanus* as an innovation and differentiation tool in the beer industry.

Conclusions

In this work, we provided further evidence that the large intraspecific genetic variability of *S. eubayanus* in nature provides strains with very distinct behavior in terms of fermentation kinetics and organoleptic traits for beer production. Furthermore, we evaluate for the first time the fermentative behavior of this wild strain on a craft brewing scale, providing a more accurate assessment of its brewing capacity. It was certainly found that the application of this yeast in the industry requires different handling than traditional brewing yeasts, and opens a starting point for research and experimentation.

Different strategies can be approached for an efficient implementation of non-conventional yeast in microbreweries in order to achieve the desired characteristics in the product. The correct management of these alternative yeasts could be different from that of brewing yeasts in terms of technical conditions such as inoculation rate, fermentation temperatures, oxygenation regime and nutrition; so, its implementation may require important changes in the process conditions. Simultaneous or sequential inoculation strategies with traditional ale or lager yeasts may be another way to enhance fermentation in a controlled manner and improve different characteristics involved in the quality of the final products [72]. This has been explored widely for wine fermentations [7, 73–75] and it has been extended to the brewing sector [76, 77]. Another approach that is being explored is the improvement of non-domesticated strains either by accelerated adaptation to brewer's wort through methods of experimental evolution [78], or through selective hybridization between strains with complementary desirable characteristics [54, 66, 79].

This work encourages the use of non-conventional yeast in brewing. The selection of native yeasts from the environment represents a valuable resource not only for the

development of innovative beers with greater productive differentiation, but also gives rise to the possibility of granting a regional character to the product, resulting in greater added value and a consequent competitive improvement for the sector.

Supplementary Information The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1007/s00217-021-03897-6>.

Acknowledgements The authors wish to thank the local microbreweries Berlina, Diuka and Duham (Bariloche, Argentina) for the availability and support in the design and execution of the large-scale trials. Also thank Dra. Andrea Trochine and Dr. Martín Moline for their contributions. This work was supported by the Fund for Scientific and Technological Research [PICT 3677 project], the National Scientific and Technical Research Council [PIP424 project] and the National University of Comahue [Project B199].

Author contributions JAB conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, writing—original draft, writing—review and editing, visualization. JIE conceptualization, methodology, validation, formal analysis, investigation, data curation, writing—review and editing. CL methodology, validation, investigation, writing—review and editing. DL conceptualization, resources, writing—review and editing, supervision, project administration, funding acquisition.

Funding This work was supported by the Fund for Scientific and Technological Research [PICT 3677 project], the National Scientific and Technical Research Council [PIP424 project] and the National University of Comahue [Project B199].

Availability of data and material Data available on request to the authors.

Code availability Not applicable.

Declarations

Conflict of interest The authors have no conflicts of interest to declare that are relevant to the content of this article.

Compliance with ethics requirements Ethics approval was not required. This research does not contain any studies with human participants or animals.

Consent to participate Not applicable.

Consent for publication Not applicable.

References

1. de Souza VC, Christofoleti-Furlan RM, Muynarsk EDSM et al (2019) Biotechnological applications of nonconventional yeasts. In: Basso TP (ed) Yeasts in biotechnology. IntechOpen
2. Burini JA, Eizaguirre JI, Loviso C, Libkind D (2021) Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. Rev Argent Microbiol. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>

3. Cubillos FA, Gibson B, Grijalva-Vallejos N et al (2019) Bio-prospecting for brewers: exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast* 36:383–398. <https://doi.org/10.1002/yea.3380>
4. Gibson B, Geertman JMA, Hittinger CT et al (2017) New yeasts—new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Res*. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>
5. Olaniran AO, Hiralal L, Mokoena MP, Pillay B (2017) Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *J Inst Brew* 123:13–23. <https://doi.org/10.1002/jib.389>
6. Steensels J, Verstrepen KJ (2014) Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu Rev Microbiol* 68:61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
7. Holt S, Mukherjee V, Lievens B et al (2018) Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiol* 72:55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
8. Budroni M, Zara G, Ciani M, Comitini F (2017) *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* Starter Yeasts. In: Kanauchi M (ed) *Brewing Technology*. IntechOpen
9. Libkind D, Hittinger CT, Valerio E et al (2011) Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci* 108:14539–14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>
10. Langdon QK, Peris D, Baker EP et al (2019) Fermentation innovation through complex hybridization of wild and domesticated yeasts. *Nat Ecol Evol* 3:1576–1586. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0998-8>
11. Sampaio JP (2018) Microbe profile: *Saccharomyces eubayanus*, the missing link to lager beer yeasts. *Microbiology* 164:1069–1071. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000677>
12. Nespolo RF, Villarreal CA, Oporto CI et al (2020) An out-of-Patagonia migration explains the worldwide diversity and distribution of *Saccharomyces eubayanus* lineages. *PLoS Genet* 16:e1008777. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008777>
13. Eizaguirre JI, Peris D, Rodríguez ME et al (2018) Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environ Microbiol* 20:3732–3743. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14375>
14. Gayevskiy V, Goddard MR (2016) *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests. *Environ Microbiol* 18:1137–1147. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13107>
15. Peris D, Langdon QK, Moriarty RV et al (2016) Complex ancestries of lager-brewing hybrids were shaped by standing variation in the wild yeast *Saccharomyces eubayanus*. *PLoS Genet* 12:e1006155. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006155>
16. Peris D, Sylvester K, Libkind D et al (2014) Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Mol Ecol* 23:2031–2045. <https://doi.org/10.1111/mec.12702>
17. Bing J, Han PJ, Liu WQ et al (2014) Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Curr Biol* 24:R380–R381. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.031>
18. Rodríguez ME, Pérez-Través L, Sangorrín MP et al (2014) *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS Yeast Res* 14:948–965. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12183>
19. Langdon QK, Peris D, Eizaguirre JI et al (2020) Postglacial migration shaped the genomic diversity and global distribution of the wild ancestor of lager-brewing hybrids. *PLoS Genet* 16:e1008680. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008680>
20. Bergström A, Simpson JT, Salinas F et al (2014) A high-definition view of functional genetic variation from natural yeast genomes. *Mol Biol Evol* 31:872–888. <https://doi.org/10.1093/molbev/msu037>
21. Dunn B, Sherlock G (2008) Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res* 18:1610–1623. <https://doi.org/10.1101/gr.076075.108>
22. Mardones W, Villarreal CA, Krogerus K et al (2020) Molecular profiling of beer wort fermentation diversity across natural *Saccharomyces eubayanus* isolates. *Microb Biotechnol* 13:1012–1025. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.13545>
23. Urbina K, Villarreal P, Nespolo RF et al (2020) Volatile compound screening using HS-SPME-GC/MS on *Saccharomyces eubayanus* strains under low-temperature pilsner wort fermentation. *Microorganisms* 8:755. <https://doi.org/10.3390/microorgan8ms8050755>
24. Evans DE, Goldsmith M, Damberg R, Nischwitz R (2011) A Comprehensive reevaluation of small-scale congress mash protocol parameters for determining extract and fermentability. *J Am Soc Brew Chem* 69:13–27. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0111-01>
25. White C, Zainasheff J (2010) *Yeast: the practical guide to beer fermentation*. Brewers Publications, Boulder
26. Smart KA, Chambers KM, Lambert I et al (1999) Use of methylene violet staining procedures to determine yeast viability and vitality. *J Am Soc Brew Chem* 57:18–23. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-57-0018>
27. Nguyen N, McGinley M, Mott J (2010) Faster real-time response to bacterial infection of bioethanol fermentation using a short Rezex™ ROA column. <https://phenomenex.blob.core.windows.net/documents/580f8ca3-e532-46a9-b841-3e1439d1876b.pdf>
28. Saez JS, Lopes CA, Kirs VE, Sangorrín M (2011) Production of volatile phenols by *Pichia manshurica* and *Pichia membranifaciens* isolated from spoiled wines and cellar environment in Patagonia. *Food Microbiol* 28:503–509. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2010.10.019>
29. da Silva GA, Augusto F, Poppi RJ (2008) Exploratory analysis of the volatile profile of beers by HS-SPME-GC. *Food Chem* 111:1057–1063. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2008.05.022>
30. Engan S (1972) Organoleptic threshold values of some alcohols and esters in beer. *J Inst Brew* 78:33–36. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1972.tb03425.x>
31. Meilgaard MC (1982) Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. *J Agric Food Chem* 30:1009–1017. <https://doi.org/10.1021/jf00114a002>
32. Eizaguirre JI (2019) Caracterización y domesticación de cepas naturales de *Saccharomyces eubayanus* para su aplicación en la industria cervecera. Ph.D Thesis—National University of Comahue
33. Baker E, Wang B, Bellora N et al (2015) The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. *Mol Biol Evol* 32:2818–2831. <https://doi.org/10.1093/molbev/msv168>
34. Zwietering MH, Jongenburger I, Rombouts FM, van't Riet K (1990) Modeling of the bacterial growth curve. *Appl Environ Microbiol* 56:1875–1881. <https://doi.org/10.1128/AEM.56.6.1875-1881.1990>
35. Michel M, Meier-Dörnberg T, Jacob F et al (2016) Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *J Inst Brew* 122:569–587. <https://doi.org/10.1002/jib.381>
36. Hutzler M, Michel M, Kunz O et al (2021) Unique brewing-relevant properties of a strain of *Saccharomyces jurei* isolated from ash (*Fraxinus excelsior*). *Front Microbiol* 12:645271. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.645271>
37. Brouwers N, Gorter de Vries AR, van den Broek M et al (2019) *In vivo* recombination of *Saccharomyces eubayanus*

- maltose-transporter genes yields a chimeric transporter that enables maltotriose fermentation. *PLoS Genet* 15:e1007853. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007853>
38. Baker EP, Hittinger CT (2019) Evolution of a novel chimeric maltotriose transporter in *Saccharomyces eubayanus* from parent proteins unable to perform this function. *PLoS Genet* 15:e1007786. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007786>
 39. Magalhães F, Vidgren V, Ruohonen L, Gibson B (2016) Maltose and maltotriose utilisation by group I strains of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *FEMS Yeast Res* 16:fow053. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow053>
 40. Gibson BR, 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* 30:255–266. <https://doi.org/10.1002/yea.2960>
 41. Gallone B, Mertens S, Gordon JL et al (2018) Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Curr Opin Biotechnol* 49:148–155. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005>
 42. Salema-Oom M, Pinto VV, Goncalves P, Spencer-Martins I (2005) Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* strains: characterization of a new member of the α -glucoside transporter family. *Appl Environ Microbiol* 71:6. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.9.5044-5049.2005>
 43. Nikulin J, Krogerus K, Gibson B (2018) Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation. *Yeast* 35:113–127. <https://doi.org/10.1002/yea.3246>
 44. Nikulin J, Vidgren V, Krogerus K et al (2020) Brewing potential of the wild yeast species *Saccharomyces paradoxus*. *Eur Food Res Technol* 246:2283–2297. <https://doi.org/10.1007/s00217-020-03572-2>
 45. Lohrmann J (2021) Caracterización de levaduras no convencionales de la Patagonia para la producción de whisky con características sensoriales distintivas. National University of Comahue
 46. Garret O (2011) *The Oxford companion to beer*. Oxford University Press, New York
 47. Meneses FJ, Henschke PA, Jiranek V (2002) A survey of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals numerous altered patterns of maltose and sucrose utilisation. *J Inst Brew* 108:310–321. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00556.x>
 48. Vidgren V, Huuskonen A, Virtanen H et al (2009) Improved fermentation performance of a lager yeast after repair of its AGT1 maltose and maltotriose transporter genes. *Appl Environ Microbiol* 75:2333–2345. <https://doi.org/10.1128/AEM.01558-08>
 49. Meneses FJ (2007) Characterisation of carbohydrate metabolism by industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* yeast. PhD Thesis—University of Adelaide, School of Agriculture and Wine.
 50. Alves-Jr SL, Herberts RA, Hollatz C et al (2007) Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces Cerevisiae*. *J Am Soc Brew Chem* 65:99–104. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2007-0411-01>
 51. Rautio J, Londesborough J (2003) Maltose transport by Brewer's Yeasts in Brewer's Wort. *J Inst Brew* 109:251–261. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2003.tb00166.x>
 52. Kodama Y, Fukui N, Ashikari T et al (1995) improvement of maltose fermentation efficiency: constitutive expression of *MAL* genes in brewing yeasts. *J Am Soc Brew Chem* 53:24–29. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-53-0024>
 53. Diderich JA, Weening SM, van den Broek M et al (2018) Selection of Pof-*Saccharomyces eubayanus* variants for the construction of *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* hybrids with reduced 4-Vinyl guaiacol formation. *Front Microbiol* 9:1640. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01640>
 54. Krogerus K, Magalhães F, Vidgren V, Gibson B (2015) New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *J Ind Microbiol Biotechnol* 42:769–778. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1597-6>
 55. Mertens S, Steensels J, Saelens V et al (2015) A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Appl Environ Microbiol* 81:8202–8214. <https://doi.org/10.1128/AEM.02464-15>
 56. Mukai N, Masaki K, Fujii T, Iefuji H (2014) Single nucleotide polymorphisms of *PAD1* and *FDC1* show a positive relationship with ferulic acid decarboxylation ability among industrial yeasts used in alcoholic beverage production. *J Biosci Bioeng* 118:50–55. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2013.12.017>
 57. Vanbeneden N, Gils F, Delvaux F, Delvaux FR (2008) Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of *Pad1*-activity among brewing yeasts. *Food Chem* 107:221–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>
 58. Gallone B, Steensels J, Prahel T et al (2016) Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell* 166:1397–1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
 59. Gonçalves M, Pontes A, Almeida P et al (2016) Distinct domestication trajectories in top-fermenting beer yeasts and wine yeasts. *Curr Biol* 26:2750–2761. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.040>
 60. Lentz M (2018) The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. *Fermentation* 4:20. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010020>
 61. Cui Y, Wang A, ZhangSpeers ZRA (2015) Enhancing the levels of 4-vinylguaiacol and 4-vinylphenol in pilot-scale top-fermented wheat beers by response surface methodology. *J Inst Brew* 121:129–136. <https://doi.org/10.1002/jib.189>
 62. Coghe S, Benoot K, Delvaux F et al (2004) Ferulic acid release and 4-vinylguaiacol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* 52:602–608. <https://doi.org/10.1021/jf0346556>
 63. Holt S, Miks MH, de Carvalho BT et al (2019) The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS Microbiol Rev* 43:193–222. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy041>
 64. Lodolo EJ, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M (2008) The yeast *Saccharomyces cerevisiae*—the main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res* 8:1018–1036. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2008.00433.x>
 65. Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour J-P et al (2003) Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J Biosci Bioeng* 96:110–118. [https://doi.org/10.1016/S1389-1723\(03\)90112-5](https://doi.org/10.1016/S1389-1723(03)90112-5)
 66. Krogerus K, Seppänen-Laakso T, Castillo S, Gibson B (2017) Inheritance of brewing-relevant phenotypes in constructed *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. *Microb Cell Fact* 16:66. <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0679-8>
 67. Steensels J, Meersman E, Snoek T et al (2014) Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. *Appl Environ Microbiol* 80:6965–6975. <https://doi.org/10.1128/AEM.02235-14>
 68. Nienow AW, Nordkvist M, Boulton CA (2011) Scale-down/scale-up studies leading to improved commercial beer fermentation. *Biotechnol J* 6:911–925. <https://doi.org/10.1002/biot.201000414>
 69. Bleoanca I, Bahrim G (2013) Overview on brewing yeast stress factors. *Rom Biotechnol Lett* 18:8559–8572
 70. Schmidt FR (2005) Optimization and scale up of industrial fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* 68:425–435. <https://doi.org/10.1007/s00253-005-0003-0>

71. Beney L, Gervais P (2001) Influence of the fluidity of the membrane on the response of microorganisms to environmental stresses. *Appl Microbiol Biotechnol* 57:34–42. <https://doi.org/10.1007/s002530100754>
72. Rijswijk IMH, Wolkers-Rooijackers JCM, Abee T, Smid EJ (2017) Performance of non-conventional yeasts in co-culture with brewers yeast for steering ethanol and aroma production. *Microb Biotechnol* 10:1591–1602. <https://doi.org/10.1111/1751-7915.12717>
73. Canonico L, Comitini F, Oro L, Ciani M (2016) Sequential fermentation with selected immobilized Non-*Saccharomyces* yeast for reduction of ethanol content in wine. *Front Microbiol* 7:278. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00278>
74. Ciani M, Comitini F (2011) Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Ann Microbiol* 61:25–32. <https://doi.org/10.1007/s13213-010-0069-5>
75. Ciani M, Comitini F, Mannazzu I, Domizio P (2010) Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Res* 10:123–133. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00579.x>
76. Canonico L, Agarbati A, Comitini F, Ciani M (2016) *Torulasporea delbrueckii* in the brewing process: a new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiol* 56:45–51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>
77. Saerens S, Swiegers JH (2013) WO2013030398: enhancement of beer flavor by a combination of pichia yeast and different hop varieties. <https://patents.google.com/patent/WO2013030398A1/en>
78. Gibson B, Dahabieh M, Krogerus K et al (2020) adaptive laboratory evolution of ale and lager yeasts for improved brewing efficiency and beer quality. *Annu Rev Food Sci Technol* 11:23–44. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-032519-051715>
79. Hebly M, Brickwedde A, Bolat I, Driessen MRM (2015) *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. *FEMS Yeast Res* 15(3):46. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov005>

Publisher's Note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.