

TESIS DOCTORAL
Nubia Jimena Grijalva Vallejos

VNIVERSITAT
® VALÈNCIA

Facultad de Ciencias Biológicas



$\text{f}^2\text{sys}^{\text{bto}}$

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y TECNOLÓGICA DE
LEVADURAS AISLADAS EN BEBIDAS FERMENTADAS
TRADICIONALES DE ECUADOR**

Directora:
Dra. Emilia Matallana
Tutor:
Dr. Agustín Aranda



Valencia, Diciembre 2019

**CARACTERIZACIÓN BIOQUÍMICA Y TECNOLÓGICA DE
LEVADURAS AISLADAS EN BEBIDAS FERMENTADAS
TRADICIONALES DE ECUADOR**

VNIVERSITAT
E VALÈNCIA



Universitat de València
Instituto de Biología Integrativa de Sistemas (I²SysBio)

TESIS DOCTORAL

Programa de Doctorado en Biomedicina y Biotecnología

Presenta:

Nubia Jimena Grijalva Vallejos

Directora:

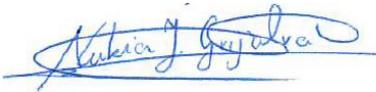
Dra. Emilia Matallana Redondo

Tutor:

Dr. Agustín Aranda Fernández

Valencia, diciembre de 2019

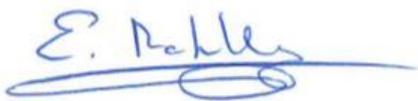
Trabajo realizado por Nubia Jimena Grijalva Vallejos en el Department de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València y en el Instituto de Biología Integrativa de Sistemas, CSIC, para optar al grado de Doctora por la Universitat de València

A handwritten signature in blue ink, reading "Nubia J. Grijalva", is written over a horizontal blue line.

EMILIA MATAALLANA REDONDO, doctora en Ciencias Biológicas y Catedrática del Departament de Bioquímica i Biología Molecular de la Universitat de València.

CERTIFICAN que la presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización bioquímica y tecnológica de levaduras aisladas en bebidas fermentadas tradicionales de Ecuador” ha sido realizada por la Ingeniera en Biotecnología Sra. Nubia Jimena Grijalva Vallejos, bajo su dirección en su laboratorio del Instituto de Biología Integrativa de Sistemas.

Valencia, diciembre de 2019

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'E. Matallana Redondo', with a long horizontal flourish underneath.

Fdo: Emilia Matallana Redondo

**A las mujeres más
importantes de mi vida,
mi madre, mis hermanas,
mis sobrinas, mis
abuelitas**

Quiero agradecer a todas las personas que han hecho posible la culminación de esta tesis, no ha sido un camino fácil, pero con la compañía y apoyo adecuados todo ha valido la pena.

A Emilia y Agustín por darme la oportunidad de trabajar en el tema de mi interés y abrirme las puertas de su grupo de investigación, por su apoyo, ayuda, confianza y las eternas correcciones.

A Brian por permitirme trabajar durante la corta estancia en su grupo, por todas las oportunidades y enseñanzas que me ha dado, mi estancia en Finlandia en el VTT, fue una de las mejores experiencias de mi vida.

A la gente que he conocido en la Universidad de Valencia que han enriquecido esta experiencia brindándome su apoyo y amistad. A Ceci por su afecto y cariño sincero, por siempre estar pendiente y ayudarme en los momentos difíciles, por el abrazo, las palabras y la sonrisa cuando hacía falta. A Marta por su fortaleza y apoyo, por su practicidad y positivismo, por ser tan buena y generosa. A Ying por su cariño, alegría y compañía, a Max por ser el mejor compañero de bancada y de trabajo además de ser el mejor profe cuando lo he necesitado, a María por su espontaneidad y positivismo, a Bea por su preocupación y apoyo cuando ha hecho falta.

A Merja, Sayuri, Juha, Sari, Annu y Sirpa por todo el afecto y amistad pese al poco tiempo de conocernos, por todos los hermosos momentos compartidos en Helsinki, por abrirme las puertas de sus casas y su corazón, por cada detalle.

A mis amigas de siempre, las que ni el tiempo ni la distancia han logrado separarnos, las que pese a todo siempre han estado y estarán ahí, a las que admiro y quiero mucho, las que con un mensaje alegran y acompañan mi vida. A Gaby, Dianita, Danny, Karlita, mis amigas “las Nubias”, gracias por seguir compartiendo su vida conmigo, por cada mensaje compartido por siempre estar ahí. A Kary mi arquitecta favorita y futura comadre, son casi 20 años de amistad y seguimos juntas celebrando la vida. A Monny mi parvularia luchadora, gracias por ser mi ejemplo y por llenar de paz mi corazón. A Gaby Cabas por el cariño, y el afecto de siempre.

A mis guambritos, Bea, Jerson, Mario, Andrés y ahora la pequeña Clarita por ser mi familia madrileña y Tica en España, por estos casi 10 años de amistad intercontinental.

A mis padres, mi mayor ejemplo, mi apoyo, mi inspiración, quienes bajo todas las circunstancias han estado conmigo, gracias por llenar mi vida de fuerza y perseverancia, por todas las oportunidades que me han dado, por su amor incondicional. A mis hermanas Rosy y Gaby por ser las amigas de sangre que me regaló la vida, por ser quienes llenan de alegría mis días con sus dos retoños Pau y Sofy, por las conversaciones profundas, por su compañía y por esperarme siempre. Gracias por apoyarme en estos más de cuatro años lejos de casa y por extrañarme tanto, por perdonar el alejarme tanto tiempo de ustedes.

A Jorge, el mejor compañero de viaje y de vida que pueda tener, mi mejor amigo, mi soporte, mi compañero de aventuras. Gracias por cada instante compartido, por toda la paciencia y apoyo durante estos más de cuatro años en donde solo nos hemos tenido el uno al otro, gracias por amarme tal y como soy, por nunca dejarme rendir y siempre tener las palabras adecuadas en el momento justo, gracias por estar ahí.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una beca predoctoral de la Secretaría de Educación Superior, Ciencia, Tecnología e Innovación de Ecuador SENESCYT.

ÍNDICE

ÍNDICE	XIII
ABREVIATURAS.....	V
INTRODUCCIÓN	1
1. Fermentaciones alimentarias	1
1.1. Bebidas fermentadas.....	3
1.2. Microorganismos fermentadores.....	8
2. Levaduras.....	13
2.1. Clasificación e identificación molecular de levaduras	14
2.2. Levaduras en fermentaciones.....	17
2.3. Domesticación de levaduras en bebidas fermentadas.....	20
3. Metabolismo de las levaduras.....	24
4. Producción industrial de levadura activa seca (ADY)	31
5. Adaptación a estrés en levaduras	33
OBJETIVOS	39
MATERIALES Y MÉTODOS	43
1. Materiales.....	45
1.1. Cepas de levaduras	45
1.2. Oligonucleótidos.....	49
1.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento	49
1.3.1. Condiciones industriales de producción de biomasa.....	50
2. Aislamiento de cepas de levaduras a partir de chichas ecuatorianas	51
3. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos.....	52
3.1. Obtención de DNA total	52
3.2. Obtención rápida de DNA genómico	53
3.3. Análisis de la región del DNA ribosomal.....	53
3.4. Análisis del DNA mitocondrial	54
3.5. Análisis interdelta de los aislados de <i>S. cerevisiae</i>	54
3.6. Análisis fingerprinting de los aislados de <i>T. delbrueckii</i>	55
3.7. Análisis de la presencia del gen <i>STA1</i>	55
3.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	55
3.9. Secuenciación del genoma de la cepa de <i>S. cerevisiae</i> EYS5.....	55
4. Análisis de la respuesta a estrés	56

4.1. Análisis de la tolerancia a la deshidratación	56
5. Determinación de actividades enzimáticas	57
5.1. Actividad amilasa.....	57
5.2. Actividad invertasa	57
6. Determinación de parámetros relacionados con el potencial fermentativo	59
6.1. Capacidad fermentativa	59
6.2. Crecimiento a baja temperatura	59
6.3. Floculación y producción de compuestos fenólicos.....	59
6.4. Asimilación de azúcares.....	60
7. Fermentaciones.....	60
7.1. Fermentaciones a escala de laboratorio.....	60
7.1.1. Iniciales en volumen final 30 mL en MCS.....	60
7.1.2. Volumen final 100 mL en MCS y mosto de cerveza.....	61
7.1.2.1. Preparación de inóculos	61
7.1.2.3. Fermentaciones con cultivos puros	61
7.1.2.4. Fermentaciones mixtas	61
7.2. Fermentaciones a escala piloto 1.5 L.....	62
7.3. Análisis de parámetros de fermentación	63
7.3.1. Determinación de azúcares reductores.....	63
7.3.2. Determinación de glucosa por el método enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa	63
7.3.3. Determinación de sacarosa	63
7.3.4. Determinación de etanol	63
7.3.5. Análisis de viabilidad y rendimiento en biomasa.....	64
7.3.6. Análisis de parámetros de fermentación	64
7.3.7. Análisis de compuestos aromáticos	65
8. Análisis de parámetros redox celulares.....	65
8.1. Cuantificación de glutatión	65
8.2. Cuantificación de la peroxidación de lípidos.....	66
8.3. Cuantificación de trehalosa	66
9. Análisis estadístico.....	67

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	69
1. Identificación y caracterización de levaduras de la microbiota natural presente en chichas ecuatorianas	71
1.1. Biodiversidad de levaduras.....	71
1.2. Tolerancia a estrés de las distintas especies y cepas	85
1.3. Análisis de la actividad amilasa	91
1.4. Estudio de la actividad invertasa.....	94
1.5. Habilidad para crecer en medio melaza	96
1.6. Estudio de la capacidad fermentativa en un medio rico en monosacáridos.....	101
1.7. Tolerancia a la deshidratación de levaduras seleccionadas para su posible uso como ADY.....	103
1.8. Análisis de parámetros redox en levaduras seleccionadas tras el proceso de deshidratación.....	108
1.8.1. Niveles de trehalosa.....	108
1.8.2. Niveles de glutatión.....	111
1.8.3. Peroxidación de lípidos	114
1.9. Análisis de rasgos de domesticación de las levaduras seleccionadas	117
1.9.1. Morfología celular y de colonia de las cepas ecuatorianas de la especie <i>S. cerevisiae</i>	117
1.9.2. Floculación y producción de compuestos fenólicos (<i>POF behavior</i>)	119
1.9.3. Asimilación de diferentes azúcares típicos de sustratos industriales	121
1.9.4. Crecimiento a bajas temperaturas (12°C).....	124
1.9.5 Análisis de la presencia del gen <i>STA1</i>	126
1.10 Discusión general.....	128
2. Caracterización tecnológica de levaduras seleccionadas aisladas a partir de chichas ecuatorianas	132
2.1. Estudio del desempeño fermentativo de las cepas ecuatorianas.....	133
2.1.1. Análisis de fermentaciones en el sustrato modelo tipo chicha (<i>Model Chicha Substrate, MCS</i>).....	134

2.1.1.1. Estandarización de la formulación y estrategia de elaboración del MCS.....	134
2.1.1.2. Fermentaciones con cultivos puros	142
2.1.1.3. Fermentaciones con cultivos mixtos de las cepas EYS5 y EGT1	158
2.1.2. Análisis de fermentaciones en mosto de cerveza.....	160
2.1.2.1. Fermentaciones con cultivos puros	161
2.1.2.2. Fermentaciones con cultivos mixtos de las cepas EYS5 y EGT1	175
2.2. Adecuación de la cepa EYS5 para su producción como inóculo seco activo	179
2.3. Análisis del genoma de la cepa ecuatoriana <i>S. cerevisiae</i> EYS5.....	184
2.4. Discusión general.....	194
CONCLUSIONES.....	197
LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS	201
Listado de tablas.....	203
Listado de figuras	206
BIBLIOGRAFÍA	211

ABREVIATURAS

ABV	Alcohol by volumen (Alcohol por volumen)
ADHS	Enzimas alcohol deshidrogenasas
ADY	Active dried yeast (levadura seca activa)
AFLPs	Amplified fragment length polymorphism (Polimorfismos en la longitud de los fragmentos amplificados)
ANOVA	Analysis of Variance (Análisis de varianza)
ATP	Adenosina trifosfato
BLAST	Basic Local Alignment Search Tool (Herramienta básica de búsqueda de Alineamientos)
CoA	Coenzima A
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
DO	Densidad óptica
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico
EDTA	Sal sódica del ácido etilen diamino tetraacético
GC	Grape Chicha (Chicha de uva)
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HPLC	High performance liquid chromatography (cromatografía líquida de alta resolución)
HS-GC-FID	Cromatografía de gases con detector de ionización de llama
kDa	kilodalton
Mb	Mega pares de bases o un millón de pares de bases
MCS	Model Chicha Substrate (sustrato modelo tipo chicha)
MDA	Malondialdehído
MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfúrico
NCBI	National Center for Biotechnology Information (Centro Nacional para la Información Biotecnológica)
OC	Oat Chicha (Chicha de avena)
ORF	Open Reading frame (Pauta abierta de lectura)
p/v	Peso/volumen
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
PFGE	Electroforesis en gel en campo pulsante
PDH	Piruvato deshidrogenasa
PI	Yoduro de propidio
POF	Phenolic-off flavors, sabores fenólicos
PYCC	Portuguese Yeast Culture Collection (Colección de cultivos de levaduras de Portugal)
RC	Rice Chicha (Chicha de arroz)
RNA	Ácido ribonucleico

RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
tRNA	RNA de transferencia
SDS	Dodecil sulfato sódico
SDG	<i>Saccharomyces</i> Genome Database (Base de datos del genoma de <i>Saccharomyces cerevesiae</i>)
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
UFC	Unidades formadoras de colonia
v/v	Volumen/volumen
YC	Yamor chicha (chicha del Yamor)

INTRODUCCIÓN

1. Fermentaciones alimentarias

En el contexto de la industria alimentaria, la palabra “fermentación” se refiere al proceso biológico, generalmente microbiano, que da como resultado cambios deseables en las materias primas utilizadas para la elaboración de ciertos alimentos. En dicho contexto, la fermentación puede ser consecuencia del metabolismo anaeróbico pero también del metabolismo aeróbico de algunos microorganismos, como por ejemplo la fermentación alcohólica y la fermentación acética, respectivamente. Algunos procesos de transformación enzimática son también reconocidos con este término, por ejemplo la fermentación de hojas de té (Nout, 2014). La revolución industrial y el avance de la microbiología, fueron dos eventos que ocurrieron a mediados del siglo XIX y que dieron lugar a un mayor entendimiento y mejora de los procesos fermentativos (Caplice y Fitzgerald, 1999), que ya eran utilizados por el ser humano desde la más remota antigüedad debido a sus efectos beneficiosos para la preservación de alimentos. Durante las fermentaciones se forman metabolitos inhibidores del crecimiento de microbios patógenos (ácidos orgánicos, etanol, bacteriocinas, etc), con la consiguiente mejora de la seguridad alimentaria. Además se pueden eliminar compuestos tóxicos, mejorar el valor nutricional y la calidad organoléptica de los alimentos y reducir costos energéticos para la preparación de alimentos (Bourdichon et al., 2012; Anagnostopoulos y Tsalts, 2019). En la actualidad, el interés creciente del consumidor por todo aquello que se percibe como natural o saludable, además del redescubrimiento de la posibilidad de crear características únicas de sabor, textura, perfil nutricional, entre otras múltiples aplicaciones en los alimentos, abre una amplia gama de oportunidades y ofrece un futuro prometedor al campo de las fermentaciones alimentarias (Terefe, 2016).

Los alimentos fermentados se definen como "sustratos alimenticios colonizados o con un crecimiento masivo de microorganismos no perjudiciales para la salud, cuyas enzimas y procesos metabólicos modifican el sustrato produciendo sabores, aromas y texturas no tóxicos atractivos para el consumidor humano" (Steinkraus, 2002; Taylor, 2015). Además de agua y microorganismos, sus ingredientes pueden ser prácticamente todos los alimentos agrícolas primarios, tanto derivados de plantas (cereales, raíces, tubérculos, frutas, etc), como productos derivados de animales (carnes, mariscos, huevos, leche, etc) (Nout, 2014). Estos productos alimentarios juegan un rol muy importante en la identidad cultural, la economía local y en el deleite gastronómico de cada pueblo o región (Hui y Evranuz, 2012).

Al existir una amplia variedad de alimentos producidos a nivel mundial, la clasificación de los mismos puede variar de un autor a otro, sin embargo todas ellas coinciden con el establecimiento de categorías en función de los

microorganismos responsables del proceso fermentativo y de los cambios bioquímicos que se producen (Nout, 2014). Steinkraus, (2002) propone una clasificación en ocho categorías en función de las clases de alimentos fermentados que se producen alrededor del mundo (Figura I.1).

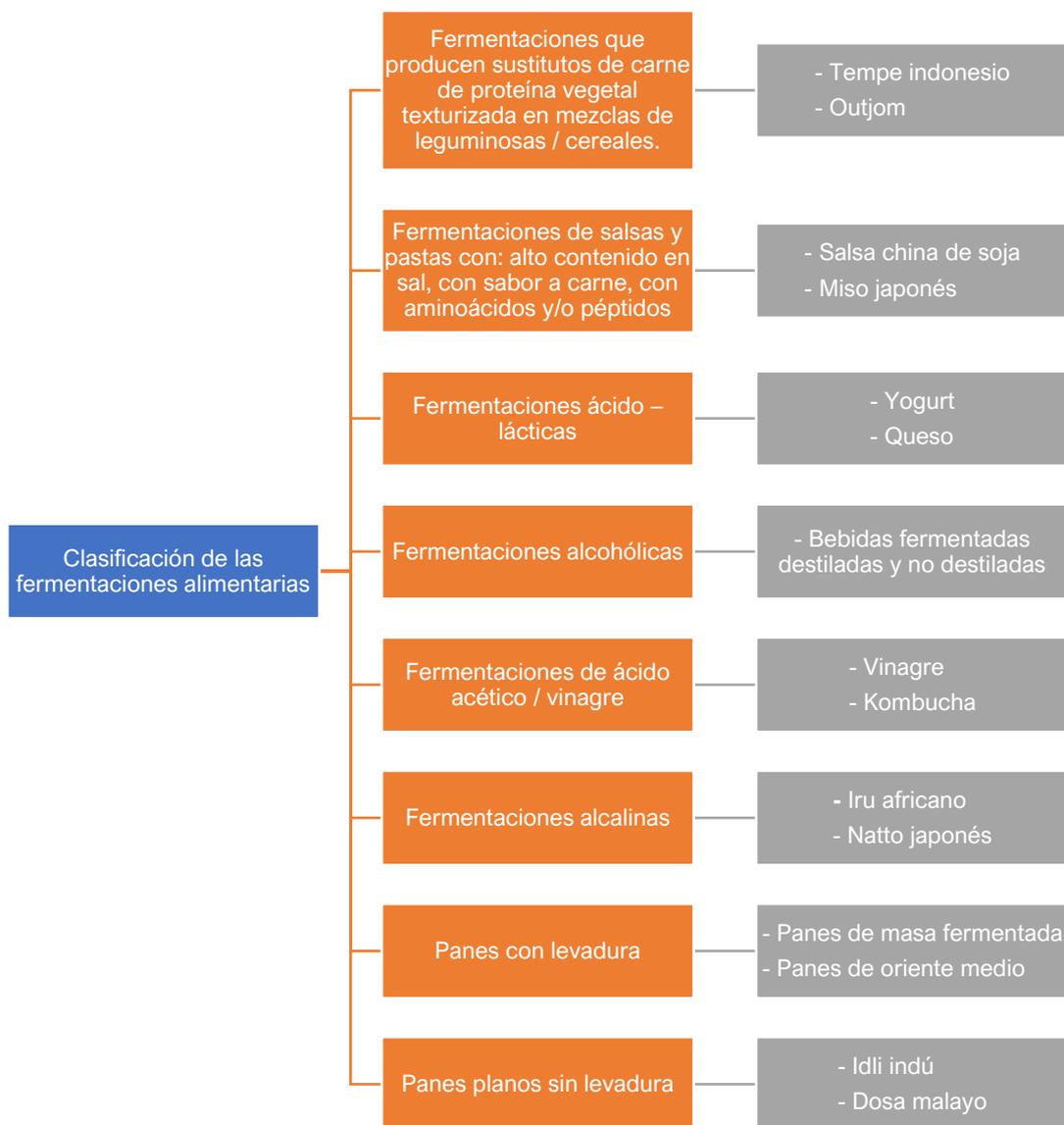


Figura I.1 Clasificación de las fermentaciones alimentarias. Adaptado de: Steinkraus, (2002).

Entre los sustratos más comunes en muchos alimentos y bebidas fermentados se encuentran los cereales, que constituyen una fuente muy importante de nutrientes en todo el mundo; arroz, trigo, centeno, cebada, sorgo y maíz son los cereales más comunes en la mayoría de alimentos y bebidas fermentadas (Tamang et al., 2016). La fermentación natural de los cereales es una estrategia simple y económica que ha permitido mejorar el valor nutricional, las propiedades sensoriales y las cualidades funcionales de los productos elaborados a partir de

este tipo de materias primas (Blandino et al., 2003). A nivel mundial existen tres culturas con hábitos tradicionales basados en alimentos fermentados a base de cereales: a) la cultura oriental, consumidores de arroz cocido, b) las culturas occidental y australiana, consumidores de panes y hogazas a base de trigo y cebada y c) las culturas latinoamericana y africana, consumidores de bebidas y panes a base de maíz y sorgo, respectivamente (Anagnostopoulos y Tsaltas, 2019).

1.1. Bebidas fermentadas

Las bebidas fermentadas son soluciones complejas de miles de compuestos químicos que se originan del sustrato, de los metabolismos microbianos producidos durante la fermentación y, en su caso, de los pasos post fermentativos (Polášková et al., 2008). La fermentación de leche, cereales y otros sustratos para producir bebidas con mejores características organolépticas es propia de muchas regiones de Asia, África, Europa, Medio Oriente y América (Marsh et al., 2014). De todas ellas, África es el continente con el mayor consumo y producción de bebidas fermentadas tanto por tradición como por la necesidad de métodos de conservación y almacenamiento de los alimentos de bajo costo. Sin embargo en los últimos años, especialmente en Europa y Asia, el interés en las bebidas fermentadas, ya sean tradicionales o nuevas, ha ido aumentando (Carballo Marrero et al., 2019). En la Tabla I.1 se aprecian los datos de consumo y producción de bebidas fermentadas por continentes, donde se observa que los valores más altos para los dos indicadores corresponden a África seguida por Europa.

Tabla I.1 Datos de consumo y producción de bebidas fermentadas en los cinco continentes en el año 2013. Procedente de: Food and agriculture organization of the United Nations FAOSTAT statistics database (disponible en: www.fao.org/faostat/en/#data/FBS).

Continente	Consumo Kg / persona / año	Producción *1000 Toneladas
África	22.6	23786
América	0.6	550
Europa	1.6	5147
Asia	1.2	1366
Oceanía	1.6	14

De forma general, las bebidas fermentadas pueden clasificarse en dos grupos definidos, lácteas y no lácteas (Figura I.2). Las bebidas lácteas son las más conocidas y difundidas a nivel mundial por su alto consumo en la cultura

occidental y su relación con la salud, especialmente aquellas producidas con bacterias ácido lácticas. Entre los beneficios que se atribuyen a su consumo están la actividad microbiana y antitumoral, además de la estimulación del sistema inmune (Carballo Marrero et al., 2019). Por otro lado, las bebidas no lácteas son una amplia variedad de productos elaborados, en algunos casos a nivel artesanal, en todas las regiones del mundo principalmente a partir de cereales y frutas.

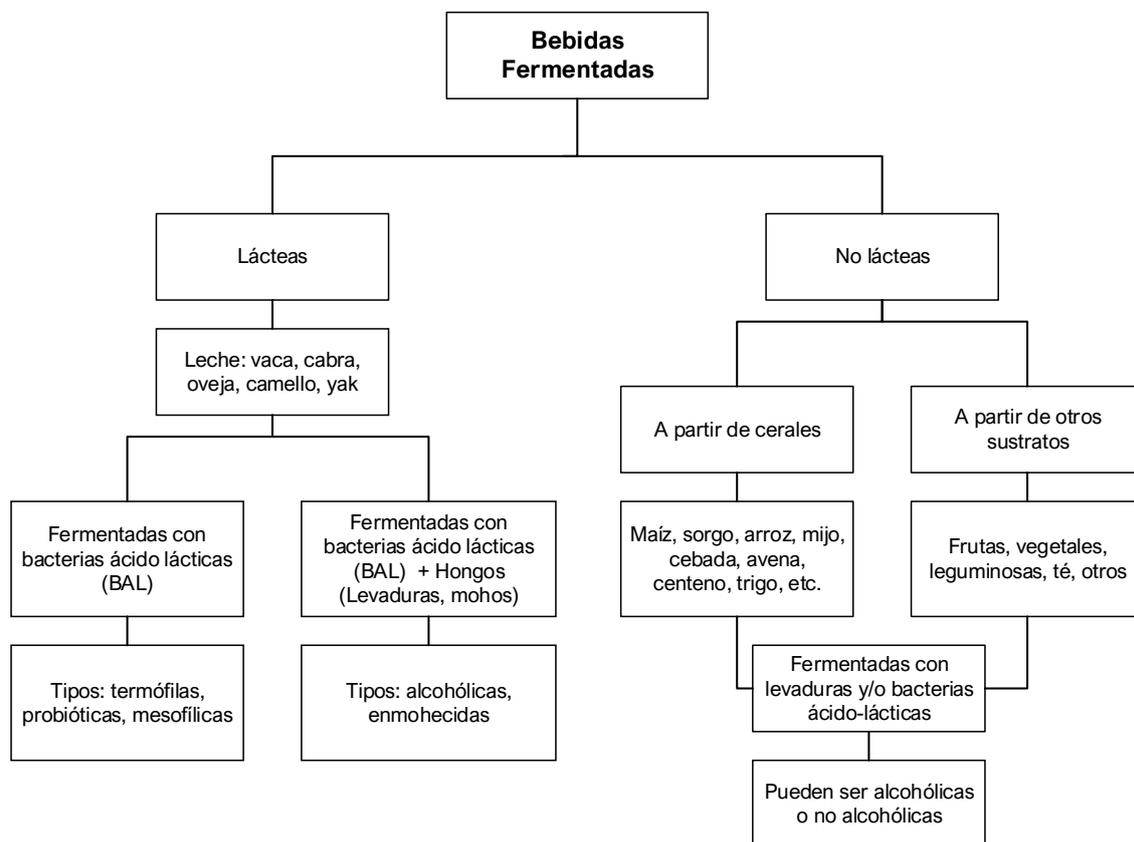


Figura I.2 Clasificación de las bebidas fermentadas. Adaptado de: Anagnostopoulos y Tsaltas, (2019); Marsh et al., (2014).

Los progresos en las ciencias microbiológicas han dado lugar a que algunas de estas bebidas, las más populares, sean industrializadas y comercializadas mientras que otras todavía se producen a nivel artesanal, comunitario, doméstico o en pequeñas industrias usando métodos tradicionales (Hui y Evranuz, 2012). Las bebidas fermentadas tradicionales son consideradas un patrimonio cultural muy importante en la mayoría de regiones (Tamang et al., 2016) y tienen una estrecha relación con las raíces e historia de cada pueblo. La mayoría de ellas son producidas con ingredientes accesibles y baratos y se usan técnicas simples; contribuyen significativamente en la dieta, especialmente en zonas y pueblos rurales en la mayoría de regiones del mundo y las recetas y procesos de elaboración son transmitidas de generación en generación (Hui y Evranuz, 2012). La mayoría de las fermentaciones a pequeña escala en estos países son procesos espontáneos en los que no se usan cultivos iniciadores (Holzapfel, 2002). Sin

embargo, está ampliamente demostrado que la bebida resultante de un proceso fermentativo depende enormemente del uso de cepas iniciadoras definidas que sean inócuas para los humanos y que garanticen la calidad y la seguridad del producto final (Carballo Marrero et al., 2019) por lo que su estudio, además de la obtención de este tipo de inóculos, es de gran importancia.

Bebidas fermentadas no lácteas

El creciente interés por dietas saludables que ayuden a prevenir enfermedades va relacionado con un incremento en el número de estudios y el creciente desarrollo de alimentos funcionales. En este grupo, las bebidas no lácteas obtenidas a partir de cereales, frutas y vegetales han surgido como una buena opción al no estar relacionadas con ciertas alergias o intolerancia a la lactosa y por su bajo o casi nulo contenido graso (Prado et al., 2008). Existe una amplia variedad de este tipo de bebidas tradicionales alrededor del mundo, varias de ellas no alcohólicas y elaboradas a partir de cereales y frutas. Además, estudios recientes han demostrado las características probióticas de algunos microorganismos involucrados en la fermentación tradicional de estas bebidas (Vasudha y Mishra, 2013).

Actualmente se están desarrollando nuevas bebidas basadas en formulaciones de bebidas tradicionales con cultivos mixtos de cepas nativas, con la idea de ofrecer nuevos productos funcionales no lácteos asociados a la cultura de los pueblos y poblaciones aborígenes (Freire et al., 2017; Menezes et al., 2018). La idea general es desarrollar nuevos productos y además mejorar y mantener los tradicionales (Prado et al., 2008). Existe una amplia diversidad de bebidas tradicionales, habiéndose descrito más de 90 tipos (Blandino et al., 2003). En Sudamérica, el maíz (*Zea mays*), el cacao (*Theobroma cacao*), y la yuca o cassava (*Manihot esculenta*) son los sustratos más comunes usados desde tiempos prehispánicos por las poblaciones indígenas de países como Colombia, Ecuador, Perú y Bolivia (Faria-Oliveira et al., 2015). Estos productos son generalmente obtenidos bajo condiciones climáticas locales y mediante procesos de producción artesanales por lo que las características sensoriales y la calidad son variables (Chaves-López et al., 2014). Generalmente el proceso de elaboración de estas bebidas consiste en la cocción inicial de los granos seguida de la trituración mientras que la filtración final suele ser opcional (Marsh et al., 2014).

La fermentación tiene múltiples efectos en el valor nutricional de los alimentos elaborados a partir de cereales: reducción del nivel de carbohidratos y de algunos poli y oligosacáridos no digeribles, síntesis de nuevos aminoácidos, mayor disponibilidad de vitaminas del grupo B, aumento leve del contenido proteico, entre otros. Todo ello se ve reflejado en una mejora del sabor, digestibilidad y valor nutritivo del producto final (Anagnostopoulos y Tsaltas, 2019). Asimismo, estas bebidas de cereales fermentados suelen tener un alto

contenido de minerales, un bajo porcentaje de grasas y pueden ser una fuente natural de fibra, vitaminas, minerales, flavonoides y compuestos fenólicos.

Existen varios tipos de bebidas fermentadas tradicionales a base de cereales, las principales diferencias se establecen por el tipo de materia prima y la estrategia de fermentación. Las más importantes y reconocidas a nivel científico se detallan en la Tabla I.2.

Tabla I.2 Bebidas tradicionales fermentadas más comunes elaboradas a partir de cereales. Adaptado de: Blandino et al., (2003).

Producto	Sustrato	Región
Cervezas tradicionales	Mijo, sorgo, arroz	África
Sake	Arroz	Asia
Boza o Bouza	Arroz	China y Japón
Chicha	Trigo, centeno, mijo, maíz, otros	Egipto, Turquía, Europa del este
Mahewu	Maíz	Sudamérica
	Maíz	África, países del Golfo árabe

Chichas

La chicha es considerada la bebida tradicional más importante y antigua en Sudamérica y es producida en varios países de la región Andina, principalmente en Ecuador, Perú y Bolivia, y en regiones bajas de Brasil, Colombia, Venezuela, Chile y Argentina. Está asociada principalmente con comunidades aborígenes de estas zonas, su producción y consumo ha sido y es un elemento clave en las celebraciones sociales, políticas y religiosas de estos pueblos. Son bebidas no destiladas que pueden o no ser fermentadas, en el caso de serlo la fermentación es totalmente espontánea por lo que generalmente tienen un contenido alcohólico por debajo del 5 %, aunque puede variar entre el 1 y el 12 %, dependiendo del método de producción (Chaves-López et al., 2014; Faria-Oliveira et al., 2015).

Hasta mediados del siglo XV, esta bebida era elaborada principalmente con maíz, su preparación era una actividad primariamente femenina, con una amplia variedad de recetas, ingredientes y métodos de elaboración. Tradicionalmente se elaboraba en vasijas de barro que se enterraban durante un tiempo definido para lograr la fermentación de los granos de maíz que, en ocasiones, las mujeres masticaban previamente para acelerar la conversión del almidón en azúcares fermentables gracias a la acción de las amilasas y posteriormente cocinaban la bebida; la germinación de los granos es otra estrategia que era utilizada con ese fin (Jennings, 2005). La chicha fue considerada en la conquista española como

una bebida nutritiva por lo que era distribuida a los indígenas en las jornadas de trabajo para proporcionarles energía (Gomes et al., 2009).

De todas ellas, la chicha de Jora que es elaborada a partir de maíz germinado, es la más conocida y estudiada en el entorno científico, es conocida también como cerveza indígena andina por la similitud en la forma de preparación con la cerveza y por ser elaborada en todos los países andinos (Hayashida, 2008). La chicha del Yamor es una variante de esta bebida, se prepara exclusivamente en Otavalo – Ecuador en el mes de septiembre y se considera una bebida sagrada preparada como ofrenda por la fertilidad de la tierra. Se elabora a partir de siete tipos de variedades de maíz, uno de ellos incluye el maíz germinado (Narváez-Rivadeneira, 2006). En la Figura I.3 se detalla el proceso de elaboración de la chicha de Jora además de las variantes del mismo.

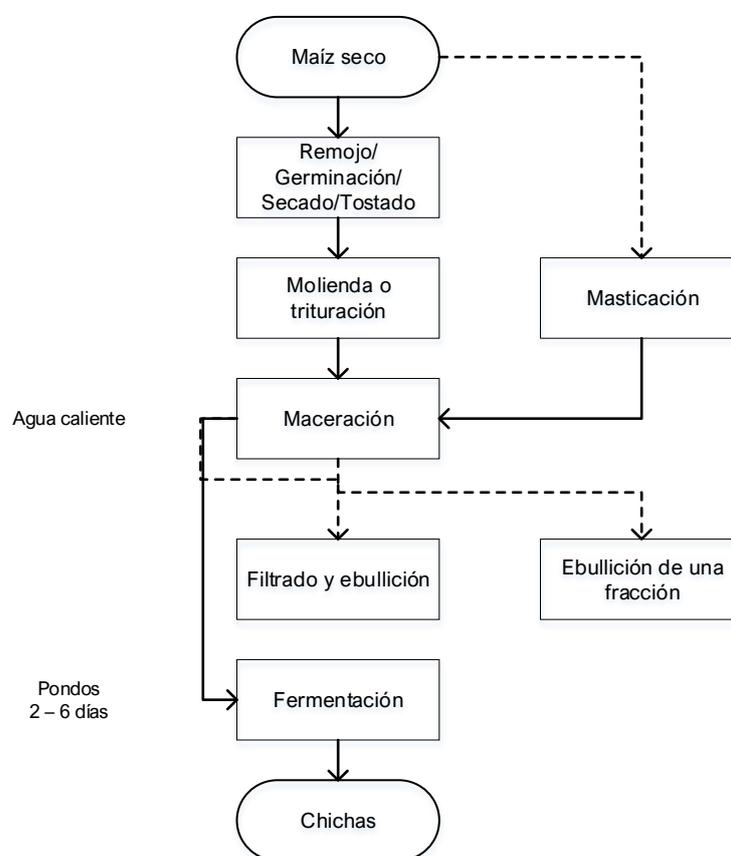


Figura I.3 Proceso de elaboración ancestral de la chicha de Jora. Procedente de: Gomes et al., (2009). Las líneas entrecortadas representan variantes del proceso de elaboración de esta bebida.

Varias modificaciones han ocurrido en el proceso de la preparación de chichas desde entonces y actualmente incluye tres pasos básicos: ebullición, enfriamiento y fermentación (Figura I.4); la masticación de los granos ha sido reemplazada por la germinación y el uso de residuos de elaboraciones previas de la bebida, ya que en la mayoría de países esta ha sido prohibida por temas de

salubridad. Se utilizan diversos cereales además del maíz como arroz, cebada, avena, quinoa, algunos tubérculos como la yuca, y en algunos casos se añaden zumos de frutas. La variedad de chichas es muy amplia, algunas de ellas incluso son elaboradas exclusivamente con zumos de frutas o con masas previamente fermentadas (Chaves-López et al., 2014; Mendoza et al., 2017), además puede añadirse azúcar o panela (caña de azúcar no centrifugada), así como hierbas y especias (Faria-Oliveira et al., 2015). Un ejemplo de ello es la chicha de uva preparada a partir del zumo fresco de la fruta al que se puede añadir ingredientes pero que no pasan por un proceso de cocción. Las características finales del producto no suelen ser estándares y dependen mucho del productor y del proceso utilizado (Figura I.4), actualmente esta bebida también es elaborada por la población mestiza latinoamericana y se sirve en restaurantes de comida típica.

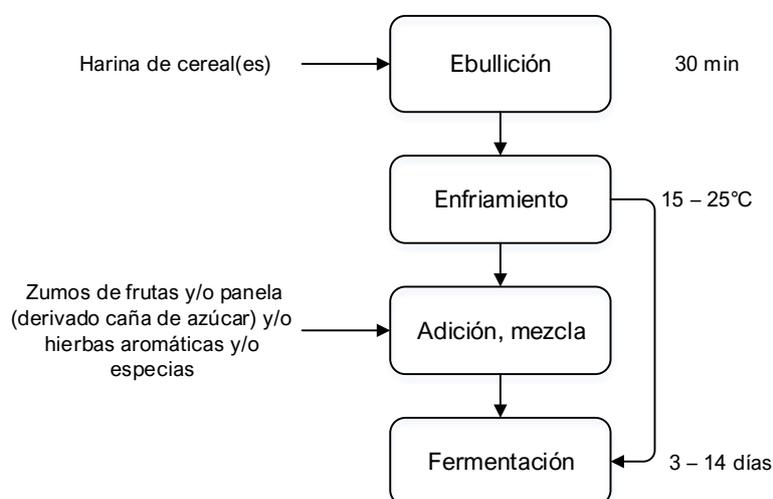


Figura I.4 Proceso básico de preparación de chichas en la actualidad.

Desde el punto de vista microbiológico, la fermentación de la chicha es llevada a cabo por la microbiota natural a temperatura ambiente (Chaves-López et al., 2014). Las bacterias ácido lácticas (BAL), *Bacillus* sp, levaduras y mohos son las poblaciones nativas dominantes presentes en la fermentación de una amplia variedad de chichas, principalmente preparadas con maíz (Blandino et al., 2003; Ramos y Schwan, 2017). En este tipo de bebidas fermentadas las levaduras generalmente coexisten con otros microorganismos y suelen darse sucesiones microbianas además de relaciones mutualistas entre ellos (Romano et al., 2006).

1.2. Microorganismos fermentadores

Se conocen como microorganismos fermentadores a aquellos microorganismos cultivables y no cultivables que fermentan de forma natural la mayoría de los alimentos y bebidas fermentadas (Tamang et al., 2016). Los ingredientes, utensilios, contenedores y el ambiente son la fuente más importante de microorganismos en fermentaciones espontáneas. En procesos de fermentación

a nivel industrial la presencia microbiana es, normalmente, el resultado de la adición intencional de microorganismos seleccionados como cultivos iniciadores (Anagnostopoulos y Tsaltas, 2019). Bacterias, levaduras y hongos son los principales microorganismos responsables de la fermentación de los alimentos, existiendo una amplia diversidad de géneros y especies (Tabla I.3).

Tabla I.3 Microorganismos presentes en alimentos fermentados. Procedente de: Tamang et al., (2016).

Microorganismo	Géneros y especies
Bacterias ácidolácticas (BAL)	<i>Alkalibacterium, Carnobacterium, Enterococcus, Lactobacillus, Lactococcus, Leuconostoc, Oenococcus, Pediococcus, Streptococcus, Tetragenococcus, Vagococcus, Weissella</i>
Bacterias	<i>Bacillus amyloliquefaciens, Bacillus circulans, Bacillus coagulans, Bacillus firmus, Bacillus licheniformis, Bacillus megaterium, Bacillus pumilus, Bacillus subtilis, Bacillus subtilis variety natto, Bacillus thuringiensis</i>
Actinobacteria	<i>Kocuria, Micrococcus</i>
Otros	<i>Acetobacter, Gluconobacter, Staphylococcus, Bifidobacterium, Brachybacterium, Brevibacterium, Propionibacterium, Arthrobacter y Hafnia</i>
Levaduras	<i>Brettanomyces, Candida, Cryptococcus, Debaryomyces, Dekkera, Galactomyces, Geotrichum, Hansenula, Hanseniaspora, Hyphopichia, Issatchenkia, Kazachstania, Kluyveromyces, Metschnikowia, Pichia, Rhodotorula, Rhodosporidium, Saccharomyces, Saccharomycodes, Saccharomycopsis, Schizosaccharomyces, Sporobolomyces, Torulaspora, Torulopsis, Trichosporon, Yarrowia, Zygosaccharomyces</i>
Hongos filamentosos	<i>Actinomucor, Amylomyces, Aspergillus, Monascus, Mucor, Neurospora, Parcilomyces, Penicillium, Rhizopus, Ustilago</i>

Actualmente existe una tendencia al empleo de cultivos de microorganismos fermentadores patentados con propósito comercial que sean seguros para el ser humano. A nivel industrial, estos cultivos microbianos para alimentos (MFC por su siglas en inglés, *microbial food cultures*) consisten en formulaciones de una o más especies y/o cepas (bacterias, levaduras y hongos) que incluyen componentes necesarios para su supervivencia, almacenamiento, estandarización y que facilitan su aplicación (Bourdichon et al., 2012).

De acuerdo a los microorganismos empleados para el proceso, las fermentaciones se clasifican en tres grupos (Wang y Fung, 1996; Carballo Marrero et al., 2019):

- a) Fermentación alcohólica: es un proceso bioquímico complejo cuyos principales productos son el etanol y el dióxido de carbono (Buratti y Benedetti, 2016), obtenidos a partir de azúcares. Es llevada a cabo por levaduras, principalmente del género *Saccharomyces*, pero también por algunos hongos filamentosos y bacterias ácido lácticas heterofermentativas. Es el proceso fermentativo más conocido y está involucrado en varias transformaciones importantes, así como en procesos de estabilización y conservación de sustratos ricos en azúcares (Ciani et al., 2013).
- b) Fermentación ácida: Se generan ácidos que producen una bajada del pH. Se divide en dos grupos:
 - i. Fermentación ácido-láctica: Conversión de los carbohidratos en ácido láctico y otras sustancias en ausencia de oxígeno; es producida por bacterias ácido lácticas (BAL), principalmente de los géneros *Lactobacillus* y *Leuconostoc*. De acuerdo al tipo de BAL pueden ocurrir dos tipos de rutas catabólicas (homofermentativas o heterofermentativas).
 - ii. Fermentación acética: se da por la oxidación del etanol a ácido acético en presencia de oxígeno y es producida por bacterias del género *Acetobacter*.
- c) Fermentación alcalina: las proteínas de la materia prima son hidrolizadas a aminoácidos y péptidos, se libera amonio lo que incrementa el pH; es producida por bacterias de género *Bacillus sp.*

El etanol, producto de la fermentación alcohólica, es el principal producto biotecnológico a nivel mundial tanto en términos volumétricos como económicos (100 mil millones de litros/año), sus principales aplicaciones son el consumo humano en las bebidas alcohólicas y su uso como combustible renovable para transporte (Walker y Walker, 2018). En el caso de las bebidas alcohólicas, la selección de levaduras adecuadas es importante no solamente para garantizar una adecuada producción de alcohol sino también para mantener la calidad sensorial del producto final (Anagnostopoulos y Tsaltas, 2019).

Microorganismos no convencionales en fermentaciones alcohólicas

La actividad microbiana durante la fermentación alcohólica va mucho más allá de la producción de etanol. La complejidad de los productos obtenidos, reflejada en sus características organolépticas, está directamente relacionada con la acción de una gran diversidad de microorganismos, principalmente bacterias y levaduras (Varela, 2016). Existe un redescubrimiento del valor del uso de cultivos mixtos o de fermentaciones espontáneas para incrementar la complejidad de aromas, además múltiples estudios recientes han destacado el potencial de las levaduras no convencionales, en la producción de bebidas fermentadas, en especial vino y cerveza.

Todo esto ha desencadenado un creciente interés en la búsqueda y descubrimiento de nuevas especies, cepas o híbridos de levaduras, para ello se realizan nuevas investigaciones en los entornos naturales e industriales de diferentes tipos de fermentaciones con la idea de contar con una mayor diversidad para ser usada en beneficio de la industria (Carrau et al., 2015; Cubillos et al., 2019) y que además pueda contribuir al mejor entendimiento de la biología e historia evolutiva de este grupo microbiano (Gibson et al., 2017). Está ya demostrada la amplia variabilidad que existe entre especies y cepas en relación a la utilización de azúcares, potencial fermentativo, producción de aromas y sabores, entre otros, por lo que la posibilidad de encontrar nuevos microorganismos con aplicaciones industriales es ilimitada (Michel et al., 2016b). Algunas de estas levaduras alternativas han demostrado también una eficiencia fermentativa similar o mejor que la de algunas cepas industriales en presencia de ciertas condiciones de estrés, como por ejemplo altas concentraciones de etanol (Mukherjee et al., 2017). Nuevos sistemas y estrategias para facilitar la búsqueda y selección de nuevas levaduras con potencial aplicación en bebidas alcohólicas están siendo desarrollados. Técnicas como mutagénesis, fusión de protoplastos, hibridación, reproducción y evolución dirigida, son usadas con la idea de generar diversidad artificial y seleccionar levaduras industriales superiores (Steensels et al., 2014). Una integración del conocimiento proveniente de la diversidad natural, la experiencia en análisis sensoriales además de la aplicación de ingeniería evolutiva podría revolucionar el descubrimiento y mejora de estos microorganismos (Carrau et al., 2015).

Entre las nuevas aplicaciones y tendencias del uso de levaduras no convencionales se encuentran la generación de bebidas con bajo contenido alcohólico y/o bajo contenido calórico, bebidas funcionales además de varios enfoques de bio-saborización con la idea de obtener productos nuevos y originales (Gschaedler, 2017; Basso et al., 2016). Asimismo, la selección de cultivos nativos iniciadores adaptados a ciertos entornos, podría ser una

estrategia para reproducir a nivel industrial productos tradicionales y regionales (Marsh et al., 2014). En producción de cerveza existe un crecimiento a nivel mundial de micro cervecías y cervecías artesanales que en su mayoría usan levaduras no convencionales, retomando estrategias tradicionales y ancestrales de fermentación, varias cepas de estas levaduras son ya usadas en la producción de cervezas con bajo contenido alcohólico (0.5 – 1.2 %) y cervezas libres de alcohol (< 0.5 % v/v) (Michel et al., 2016a).

Diversas cepas de la especie *S. cerevisiae* aisladas de chichas han mostrado perfiles genotípicos y fenotípicos diferentes comparados con cepas comerciales. En chichas argentinas se determinaron 42 patrones diferentes de elementos delta (Mendoza et al., 2017) y en chichas ecuatorianas se identificaron 68 perfiles diferentes de DNA mitocondrial (Piló et al., 2018) lo que demuestra un gran número de cepas diferentes durante la fermentación de estas bebidas tradicionales. Asimismo, cepas aisladas a partir de chichas de maíz de Perú fueron capaces de asimilar fuentes inusuales de carbono como sorbosa, glucosamina, ribosa, arabinosa, ramnosa, melobiosa, celobiosa y almidón, por lo que podrían ser utilizadas en la fermentación de sustratos ricos en estos azúcares (Vallejo et al., 2013). De igual forma, varias cepas del género *Saccharomyces* que han sido aisladas a partir de la bebida brasileña *cachaça* y algunos híbridos naturales generados a partir de estas cepas, han sido propuestas como posibles alternativas adecuadas para la producción de cerveza tipo lager y ale (Araújo et al., 2018; Figueiredo et al., 2017).

En relación a levaduras *no-Saccharomyces*, varias cepas de los géneros *Dekkera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Wickerhamomyces*, entre otras, han demostrado habilidades de bioconversión interesantes relacionadas con un aparato enzimático diversificado (Basso et al., 2016). Algunas cepas de levaduras originarias de bebidas fermentadas tradicionales han sido propuestas como buenas alternativas para la producción de cerveza. Varias cepas *no-Saccharomyces* aisladas a partir de kombucha, un té fermentado de Asia, han sido exitosamente utilizadas en la producción de cerveza sin alcohol (Bellut et al., 2018). De igual forma nuevas especies y cepas de este grupo han sido identificadas en chichas y muestran características fisiológicas muy interesantes. *Candida theae*, una nueva especie fue recuperada en Ecuador de vasijas de barro muy antiguas donde se preparaba esta bebida (Chang et al., 2012) y cepas de *Pichia kluyveri* aisladas en varias chichas colombianas demostraron tolerancia a concentraciones de etanol de 15 % (López et al., 2010).

Sin embargo, es muy importante tomar en cuenta que el uso y aplicación de estas levaduras no convencionales requiere el estudio detallado de las interacciones entre microorganismos. Es necesario entender su relación incluso a nivel molecular, considerando además la especificidad de cada cepa, ya que la mayoría de ellas son usadas en co-fermentaciones (Gschaedler, 2017). La introducción de nuevas levaduras en un sustrato debe además ser analizada y calculada ya que el desempeño de cada microorganismo podría variar considerablemente de acuerdo al sustrato y condiciones de la fermentación (Basso et al., 2016). Además es necesario en la práctica estudiar y encontrar condiciones adecuadas de conservación de estas cepas con la idea de obtener biomasa deshidratada o liofilizada que pueda ser usada fácilmente en la industria (Gschaedler, 2017). Cabe resaltar además la importancia de tomar en cuenta la bioseguridad y aprobación del uso de estos microorganismos en los organismos nacionales e internacionales competentes (Michel et al., 2016b).

2. Levaduras

Las levaduras son hongos unicelulares distribuidos en una gran cantidad de ambientes que se reproducen asexualmente por gemación o fisión binaria y sexualmente mediante producción de esporas (ascosporas o basidiosporas) que no se forman dentro o sobre un cuerpo fructífero (Kurtzman et al., 2011). Las células son generalmente esféricas, ovales o cilíndricas y no suelen formar filamentos o micelio (Madigan et al., 1997). Son organismos heterótrofos capaces de utilizar una amplia gama de fuentes de carbono en función del entorno en el que se encuentren. Los sustratos más comunes para su crecimiento son las hexosas, como la glucosa, fructosa, galactosa o manosa, sin embargo existen varias especies que también pueden utilizar pentosas, como la xilosa o la arabinosa, y muchas cepas industriales son capaces de metabolizar disacáridos, como la sacarosa y otros poco comunes en los ambientes naturales, como la maltosa y la lactosa; algunas de estas cepas pueden incluso metabolizar dextrinas (Faria-Oliveira et al., 2015).

Las levaduras cumplen un rol clave en la biotecnología alimentaria, especialmente en productos fermentados. Ya sea en monocultivos, cultivos mixtos o en ingesta directa, este grupo de microorganismos es uno de los más estudiados no solo por sus aplicaciones sino también porque varias de ellas, especialmente las levaduras del género *Saccharomyces*, son inocuas para los seres humanos (Hittinger et al., 2018). La importancia, potencial y aplicaciones de las levaduras como cultivos iniciadores en la fermentación de bebidas tradicionales fueron las razones por las que se eligió estudiarlas en el presente trabajo.

2.1. Clasificación e identificación molecular de levaduras

Las levaduras pueden ser clasificadas en dos grupos filogenéticos, ascomicetos (teleomórficos y anamórficos) y basidiomicetos (teleomórficos y anamórficos) (Kurtzman et al., 2011). Las levaduras del grupo de los ascomicetos son especialmente importantes en la producción de alimentos para humanos y animales, proteína unicelular, producción heteróloga de proteínas y enzimas, además algunas de ellas son utilizadas como organismos modelo en estudios genéticos y metabólicos (Johnson, 2013). Pocas especies de este grupo son patógenas de plantas y humanos mientras que varias de ellas, especialmente aquellas del género *Saccharomyces*, son responsables de varios procesos biotecnológicos e industriales (Suh et al., 2006). En relación a las levaduras del grupo de los basidiomicetos, recientemente se ha evaluado su utilidad industrial siendo la producción de metabolitos primarios y secundarios únicos, así como la producción de ciertas enzimas usadas en síntesis química y farmacéutica, su principal aplicación (Johnson, 2013). Las principales características y diferencias entre estos dos grupos se detallan en la Tabla I.4.

Tabla I.4 Principales diferencias entre levaduras de los grupos ascomicetos y basidiomicetos. Adaptado de: Suh et al., (2006).

Parámetro	Ascomicetos	Basidiomicetos
Formación de esporas sexuales	En el interior de sacos cerrados llamados ascos	En estructuras claviformes llamadas basidios
Polisacárido mayoritario en la pared celular	β -glucanos	Quitina
% G + C en el ADN nuclear	< 50 %	> 50 %
Gemación	Holoblástica	Enteroblástica
Nutrición	Copiótrofos y especializados nutricionalmente	Usan un amplio rango de compuestos orgánicos (bajas concentraciones, alta eficiencia)
Color	Mayoritariamente hialinos	Producen pigmentos intensos carotenoides
Ecología	Viven en nichos especializados (interacciones, plantas, insectos, animales invertebrados)	Se adaptan a nichos pobres en nutrientes, superficies sólidas
Fragantes	Si	No
Colonias mucoides	No	Si
Requieren vectores para dispersarse	Si	No

Las subdivisiones taxonómicas inferiores (familias, subfamilias, género, especie y cepa), son determinadas por sus características morfológicas, fisiológicas y genéticas (Kurtzman y Robnett, 1998). Entre los principales géneros de levaduras funcionales de alimentos y bebidas fermentadas se encuentra del grupo de los ascomicetes: *Brettanomyces* (*Dekkera*), *Candida*, *Debaryomyces*, *Galactomyces*, *Geotrichum*, *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Torulaspora*, *Saccharomycopsis*, *Schizosaccharomyces*, *Torulopsis*, *Yarrowia* y *Zygosaccharomyces* y del grupo de los basidiomicetes: *Cryptococcus*, *Rhodotorula* y *Trichosporon* (Aidoo y Nout, 2010).

Tradicionalmente, la identificación y clasificación de las levaduras se ha basado en características morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, sin embargo en las últimas décadas se han desarrollado técnicas moleculares que se han convertido en la mejor herramienta para ello (Esteve-Zarzoso et al., 1999). Para la identificación de especies y cepas la mayoría de laboratorios utiliza como estrategia la secuenciación de uno o más genes diagnósticos como la forma más útil y rápida para descubrir nuevas especies. Las técnicas moleculares permiten el análisis directo del genoma sin considerar el estado fisiológico de la célula por lo que los resultados son mucho más prácticos y veraces (Fernández-Espinar et al., 2011). Sin embargo, el análisis genético debe ir complementado con el análisis fisiológico y metabólico si lo que se desea es estudiar la biología o ecología del microorganismo además de su posible aplicación industrial (Kurtzman et al., 2011). Los principales métodos y técnicas moleculares usados en la identificación de levaduras a nivel de especie y cepa se describen en la Tabla I.5.

Tabla I.5 Métodos y técnicas para la identificación y diferenciación de levaduras y cepas. Adaptado de: Fernández-Espinar et al., (2011); Hutzler et al., (2015).

Métodos	Técnicas	Grado de diferenciación
Basados en el análisis del DNA ribosomal (rDNA)	Secuenciación del rDNA	especie
	Análisis de restricción del rDNA	especie
Basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	PCR a tiempo real	especie
	PCR y electroforesis en gel con gradiente desnaturalizante (PCR-DGGE)	especie
	Amplificación aleatoria de DNA polimórfico (RAPD-PCR)	cepa
	Análisis PCR de DNA genómico repetitivo (micro y mini satélites)	cepa
	Amplificación de secuencias δ	cepa
	SAPD-PCR (Specifically Amplified Polymorphic DNA-PCR)	cepa
	PCR-DHPLC (PCR-Denaturing High Performance Liquid Chromatography)	cepa
Otros	Polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs)	cepa
	Hibridación	cepa
	Electroforesis en gel en campo pulsante (PFGE) de cromosomas	cepa
	Análisis de restricción del DNA mitocondrial	cepa

Los métodos basados en el análisis de regiones ribosomales se fundamentan en la existencia de secuencias conservadas, así como en la evolución concertada de los genes ribosomales 5.8S, 18S, 26S, y de los espaciadores internos (ITS) y externos (ETS). Se ha usado la información de estas regiones para desarrollar distintos métodos para la identificación de levaduras; entre estos destacan la secuenciación de la región correspondiente a los dominios D1 y D2 situados en el extremo 5' del gen del rDNA 26S así como también el análisis de restricción de la región ribosomal que incluye el gen el rDNA 5.8S y las regiones intergénicas adyacentes ITS1 e ITS2. Estos métodos son una herramienta importante para la identificación de especies de levaduras y el establecimiento de relaciones filogenéticas (Fernández-Espinar et al., 2011).

En cuanto a los métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la identificación de levaduras, estos permiten la diferenciación de género, especie y en algunos casos también cepa, además la mayoría de ellos son sencillos, rápidos y simples (Hierro et al., 2004). Todos estos métodos usan oligonucleótidos que se unen a secuencias diana de cada cadena de DNA; la secuencia de los oligonucleótidos, así como las condiciones de amplificación varían de acuerdo a la técnica que se use. Las técnicas usadas con mayor frecuencia para diferenciar entre cepas de levaduras son RAPDs, microsátélites y secuencias δ . Por otro lado, el alto grado de polimorfismo que se obtiene mediante el análisis de restricción del DNA mitocondrial ha hecho que esta sea también una de las técnicas muy usadas para la caracterización de cepas de levaduras, principalmente en aquellas de la especie *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar et al., 2011). Otra herramienta muy usada actualmente es la secuenciación de genomas completos de cepas de levaduras de interés que permite la identificación de genes específicos para una especie o cepa determinada y además contribuye al entendimiento de su origen e historia evolutiva (duplicación y/o eventos de transferencia horizontal) (Piškur y Langkjær, 2004).

2.2. Levaduras en fermentaciones

De las 1500 especies de levaduras reconocidas, entre 100 y 150 han sido aisladas en alimentos y bebidas (Kurtzman et al., 2011). Las levaduras productoras de etanol son el grupo de microorganismos más importante y más usado con fines comerciales en la producción de alimentos fermentados (Romano et al., 2006). El impacto que estas levaduras ejercen en la producción, calidad y seguridad de los alimentos y bebidas fermentados está estrechamente ligada con su actividad biológica y ecología (Fleet, 2007). Las especies de levaduras dominantes en la producción de alimentos y bebidas fermentadas se resumen en la Tabla I.6.

Tabla I.6 Distribución y funciones principales de las levaduras fermentativas dominantes en alimentos y bebidas fermentadas. Procedente de: Romano et al., (2006); Benito, (2018).

Especie	Origen (alimento o bebida)	Funciones principales
Especies de <i>Saccharomyces</i>	Vino, cerveza, masas fermentadas, sidra, jerez, queso, bebidas y alimentos fermentados indígenas	Fermentación de azúcares
		Producción de metabolitos secundarios
		Actividad pectinasa y glucosidasa
		Efecto inhibitorio en el crecimiento de hongos productores de micotoxinas
		Degradación de fracciones de caseína con producción de CO ₂
		Actividades lipolítica, proteolítica y ureasa
<i>Debaryomyces hansenii</i>	Queso, salami	Incremento del pH Producción de factores de crecimiento de importancia para bacterias
Especies de <i>Hanseniaspora</i> (<i>Kloeckera</i>)	Vino, sidra, bebidas y alimentos fermentados indígenas	Actividades proteolíticas, glicosidasa y pectinolítica Producción de metabolitos secundarios
Especies fermentadoras de <i>Candida</i>	Vino, masas fermentadas, bebidas y alimentos fermentados indígenas	Actividades proteolíticas, glicosidasa y pectinolítica Producción de compuestos secundarios Efecto inhibitorio en el crecimiento de mohos productores de micotoxinas
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Queso, salami	Actividades lipolítica, proteolítica y ureasa Reducción de la rancidez de las grasas
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Bebidas fermentadas (frutas, Agave, cereales)	Producción de compuestos aromáticos Reducción de la producción de etanol

Las levaduras del género *Saccharomyces* son las más importantes en fermentaciones alcohólicas, actualmente se reconocen siete especies naturales y tres híbridos claves en la industria (Figura 1.5) (Hittinger, 2013). *S. cerevisiae* es la especie más importante (Dussap y Poughon, 2017), considerada además organismo modelo de eucariotas por los cortos tiempos de replicación, cultivo simple, eficiencia en esporulación, rara patogenicidad y un genoma relativamente pequeño (6000 genes) (Gibson et al., 2017).

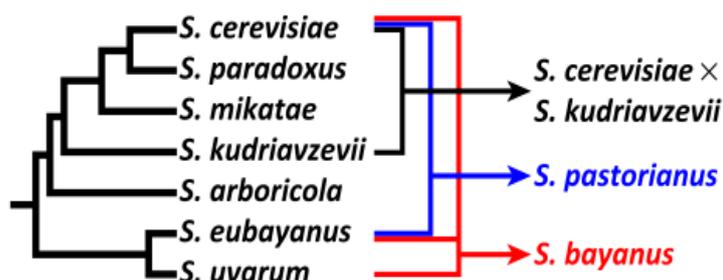


Figura I.5 Especies del género *Saccharomyces* y principales híbridos claves en la industria. Procedente de: Hittinger, (2013).

En relación a otras especies e híbridos del género *Saccharomyces*, *S. pastorianus* y recientemente *S. eubayanus* son usadas en la producción de cerveza tipo lager (Gibson et al., 2017), *S. uvarum* y *S. bayanus* en vinos elaborados en regiones de clima continental y *S. paradoxus* en vinos croatas (Fernández-Espinar et al., 2011).

Existen también otras levaduras productoras de etanol que no pertenecen al género *Saccharomyces*. Levaduras del género *Kluyveromyces*, *Dekkera*, *Candida*, *Pichia*, entre otras (Tabla I.7), son capaces de producir etanol y son posibles alternativas para varios procesos de fermentación alcohólica, no solo para la producción de bebidas sino también para la producción industrial de etanol (Choudhary et al., 2017; Walker y Walker, 2018).

Tabla I.7 Especies de levaduras no-*Saccharomyces* productoras de etanol.

Especie	Origen	Referencia
<i>Kluyveromyces marxianus</i>	Mezcal	(Flores et al., 2013)
<i>Dekkera bruxellensis</i>	Destilerías de trigo	(Passoth et al., 2007)
<i>Candida tropicalis</i>	Moras en descomposición	(Choudhary et al., 2017)
<i>Pichia kudriavzevii</i>	Moras en descomposición	(Choudhary et al., 2017)
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Residuo de destilerías	(Choudhary et al., 2017)
<i>Kluyveromyces fragilis</i>	Fermentación de cacao	(Farooq et al., 2018)
<i>Pichia fermentans</i>	Estiércol y tierra de bosque	(Farooq et al., 2018)
<i>Candida sorbosivorans</i>	Estiércol y tierra de bosque	(Farooq et al., 2018)
<i>Lindnera jadinii</i>	Estiércol y tierra de bosque	(Farooq et al., 2018)
<i>Candida zemplinina</i>	Estiércol y tierra de bosque	(Farooq et al., 2018)
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Superficie de las uvas	(Ramírez y Velázquez, 2018)

Algunas de estas levaduras pueden incluso presentar un mejor potencial fermentativo que las cepas industriales, como la cepa silvestre *Pichia kudriavzevii* (VMU139), que en fermentaciones de hidrolizados de lignocelulosa es capaz de obtener mejores rendimientos de etanol que las cepas de referencia, incluso a altas temperaturas y en presencia de altas concentraciones de ácido acético (Mukherjee et al., 2017).

2.3. Domesticación de levaduras en bebidas fermentadas

La domesticación de microorganismos como bacterias, levaduras y hongos filamentosos ha jugado un rol esencial en la mejora de la estabilidad, calidad, sabor y textura de los productos alimentarios obtenidos gracias a su metabolismo, como es el caso de las bebidas fermentadas. Las continuas prácticas de producción que involucraban el reciclaje de comunidades microbianas son posiblemente las que originaron estos eventos de domesticación que luego fueron estandarizándose y perfeccionándose hasta dar como resultado cepas domesticadas con un mejor desempeño fermentativo. Muchas bebidas fermentadas tradicionales son todavía el producto de fermentaciones espontáneas, aunque algunas de ellas, como es el caso de ciertas chichas, suelen prepararse con un residuo de la fermentación anterior con la idea de acelerar y mejorar el proceso fermentativo. Se conoce muy poco sobre eventos de domesticación en bebidas fermentadas tradicionales por lo que su estudio, no solo podría proporcionar muchos conocimientos etno-microbiológicos y evolutivos, sino que también abre otras opciones de nuevas aplicaciones industriales (Gibbons y Rinker, 2015).

La domesticación en levaduras, se refiere a la selección artificial y reproducción de especies silvestres para obtener variantes cultivadas con características deseables y mejoradas que prosperen en ambientes creados por el hombre (Gallone et al., 2018). A nivel industrial se usa generalmente cultivos puros de cepas de levaduras domesticadas y un control estricto de factores bióticos y abióticos para la mejora de la estabilidad, calidad, sabor y textura de las bebidas fermentadas (Gibbons y Rinker, 2015). Se han dividido a las levaduras industriales domesticadas de la especie *S. cerevisiae* en cinco sublinajes genética y fenotípicamente separados de las levaduras silvestres y que están originados por pocos ancestros a través de patrones de domesticación complejos y divergencia local (Figura I.6) (Gallone et al., 2016).

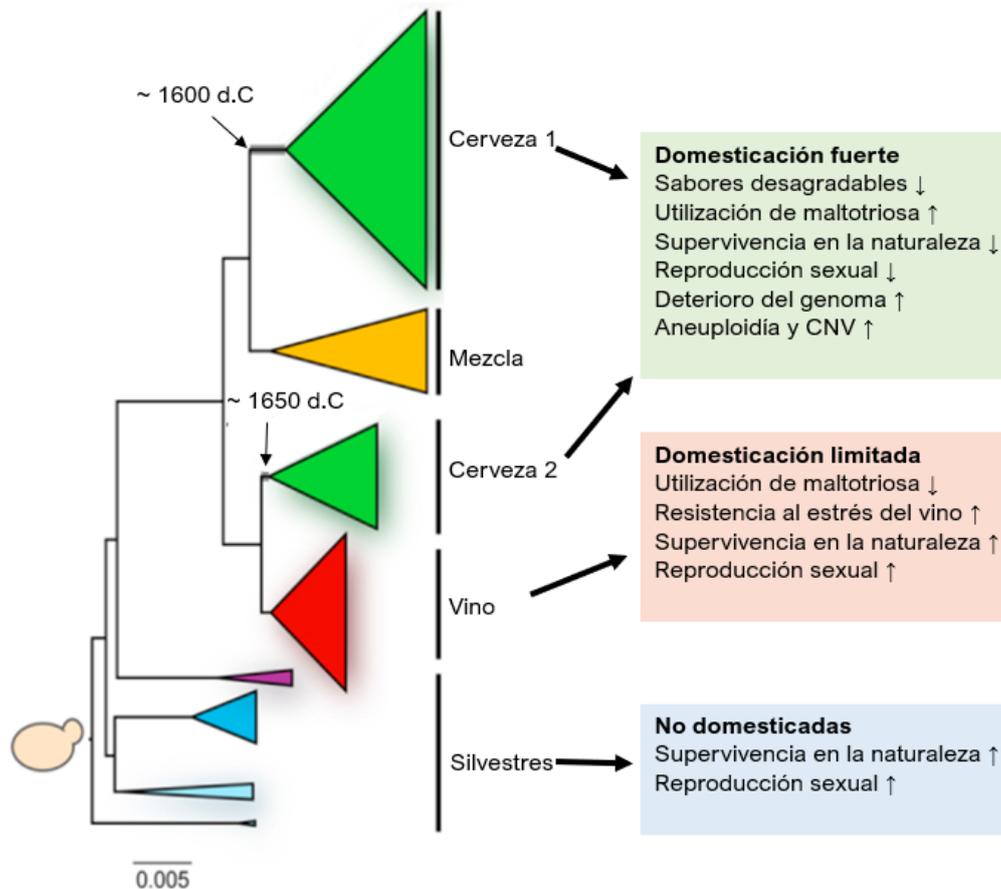


Figura I.6 Sublinajes de la domesticación de las levaduras industriales de la especie *S. cerevisiae* en función de sus características fenotípicas y genotípicas. Procedente de: Gallone et al., (2016).

La domesticación ha dado lugar a la evolución de nuevas formas de levaduras y especies por medio de mecanismos como hibridación, poliploidización, duplicación génica, mutaciones y transferencia genética, lo que se ha reflejado en nuevas propiedades fisiológicas y metabólicas de estos microorganismos (Sicard y Legras, 2011). De forma general, los fenotipos de cepas domesticadas en la especie *S. cerevisiae* son una combinación de características seleccionables como la adaptación a sustratos ricos en azúcares, ambientes limitados de oxígeno y/o alta tolerancia al etanol, y características adquiridas durante su uso en procesos de interés humano, como el uso de la maltotriosa o la producción de bajas concentraciones de sulfito, entre otras (Gallone et al., 2018). En el género *Saccharomyces*, la domesticación es más pronunciada en cepas cerveceras, ya que estas son continuamente recicladas después de cada lote de fermentación, lo que significa que viven continuamente en su nicho industrial, permitiendo únicamente una mezcla genética limitada con stocks silvestres y un contacto mínimo con ambientes naturales, por lo que los genomas de las levaduras cerveceras muestran patrones complejos de domesticación y divergencia. Por el contrario, las levaduras vínicas crecen en el mosto por un

corto periodo cada año, propagándose alrededor de los viñedos o en el intestino de insectos. Estudios genéticos han propuesto que los eventos de domesticación de levaduras en cerveza son distintos a los determinados para vino y sake (Gonçalves et al., 2016; Gallone et al., 2018).

En relación a la producción de cerveza, la mayoría de las cepas industriales de la especie *S. cerevisiae* son incapaces de fermentar azúcares complejos, como la maltotriosa y otras dextrinas presentes en el mosto cervecero, por lo que el descubrimiento de cepas que sí puedan hacerlo sin alterar las propiedades organolépticas de la bebida final, sería interesante para la industria cervecera. *S. cerevisiae* var. *diastaticus* es considerada un microorganismo alterante en cervecería que se caracteriza por su capacidad súper atenuante, atribuida a la producción de glucoamilasas, que produce un aumento en las concentraciones de dióxido de carbono junto con cambios en el sabor, sedimentación y turbidez (Meier-Dörnberg et al., 2018). Su genoma contiene tres genes *STA* (*STA1*, *STA2*, y *STA3*) codificantes de glucoamilasas que facilitan la hidrólisis de azúcares complejos como las dextrinas (Adam et al., 2004). Actualmente, además de la búsqueda de nuevas especies y cepas, se están utilizando varias estrategias, que incluyen ingeniería genética y selección, para construir levaduras capaces de asimilar la mayoría de azúcares presentes en el mosto de cerveza (Steensels y Verstrepen, 2014). Recientemente se ha caracterizado un nuevo híbrido de *S. cerevisiae*, aislado en una cervecería tradicional noruega, que posee este gen y por ende utiliza las dextrinas presentes en el mosto de cerveza, presentando además una tolerancia alta a condiciones de estrés por lo que podría ser usada en producción de bioalcohol o bebidas destiladas (Krogerus et al., 2018). Existe una alta posibilidad de encontrar híbridos naturales en ambientes fermentativos que posean ciertas características interesantes para la industria. Se ha determinado que la presencia de este gen no tiene correlación con el potencial alterante de un microorganismo (Meier-Dörnberg et al., 2018), por lo que todavía hacen falta más investigaciones al respecto.

El ambiente natural es típicamente más variable que el ambiente alimentario, en fermentaciones espontáneas los microorganismos preadaptados al sustrato y al ambiente de fermentación dominan la comunidad microbiana por lo que la reutilización continua de estos microorganismos en ambientes controlados favorece su adaptación y especialización (Gallone et al., 2016). En la Figura 1.7 se presenta un modelo de progresión de la domesticación desde un ambiente natural hasta condiciones de industrialización de alimentos.

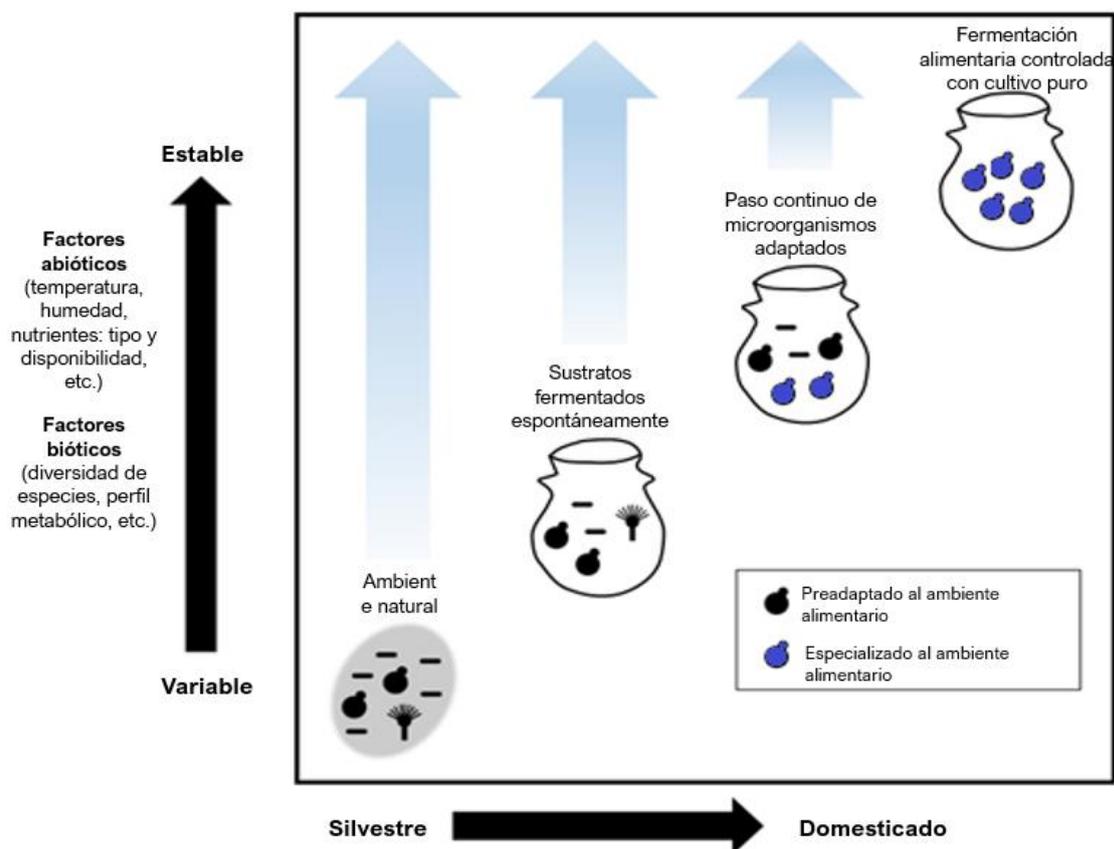


Figura I.7 Modelo de la progresión hacia la domesticación microbiana. Adaptado de: Gibbons y Rinker, (2015).

Muchas veces el costo de la domesticación es una reducción en el desempeño en su ambiente natural original y se ha determinado que diferentes linajes de la misma especie se adaptaron a nichos muy diversos, dando como resultado cepas genética y fenotípicamente distintas (Steensels et al., 2019). Es por ello que existe un creciente interés en la búsqueda de cepas no domesticadas con una mayor tolerancia a estrés y que puedan adaptarse a nuevos sustratos de fermentación.

Aunque todavía no está muy claro cuántos y cuáles de los cambios moleculares que ocurren durante la domesticación son realmente adaptativos y cuales son meramente el resultado de deriva génica (Steensels et al., 2019), existen hipótesis alternativas de escenarios intermedios de domesticación, donde además de la domesticación independiente de ciertos linajes pueden existir casos de rondas múltiples de domesticación de un solo linaje. Se ha demostrado que levaduras aisladas en cachaça, una bebida tradicional brasileña elaborada a partir de la destilación del jugo de caña de azúcar fermentado, derivan de levaduras vínicas que han pasado por una ronda adicional de domesticación definida como domesticación secundaria (Barbosa et al., 2018). Las cepas de

cachaça combinan características de levaduras vínicas, como la presencia de genes importantes como la Región B (adquirida por transferencia horizontal, típica de levaduras vínicas e implicada en la tolerancia a estrés osmótico) (Novo et al., 2009) y la inactivación de otros genes (genes inactivos de aquaporinas *AQY*) necesarias en vinificación, con características de resistencia tipo levaduras cerveceras como la presencia del gen *RTM1* implicado en la resistencia a compuestos tóxicos presentes en melaza (Barbosa et al., 2018). En relación a las chichas todavía no está claro si las levaduras encontradas en estas bebidas fueron domesticadas o simplemente fueron dispersadas por insectos u otros vectores hacia los recipientes de fermentación por lo que se sugiere una mezcla de ambos eventos (Gomes et al., 2009).

3. Metabolismo de las levaduras

Las levaduras son microorganismos heterótrofos que obtienen energía química en forma de ATP a partir de compuestos orgánicos, pero existen diferencias en la forma de metabolizarlos, así como en los sustratos que pueden utilizar. La composición del medio y la disponibilidad de oxígeno son las dos condiciones ambientales más importantes que tienen un fuerte impacto en la fisiología metabólica de las levaduras. Las rutas del metabolismo central del carbono son básicamente idénticas entre las distintas especies de levaduras, sin embargo, los mecanismos de consumo de nutrientes, el número y tipo de isoenzimas y la regulación de la fermentación y respiración, difieren sustancialmente entre especies lo que convierte a las levaduras en un grupo altamente heterogéneo y metabólicamente complejo. En su entorno natural, las levaduras tienen una amplia serie de fuentes de carbono (polioles, alcoholes, ácidos orgánicos y aminoácidos) sin embargo tienen preferencia por los azúcares, y particularmente por la glucosa aunque ciertas especies pueden utilizar fuentes de carbono no convencionales (Feldmann, 2012; Rodrigues et al., 2006).

Las levaduras poseen un metabolismo flexible que responde a los cambios ambientales y eso ha convertido a estos microorganismos en una excelente herramienta para la industria (Zymánczyk-Duda et al., 2017). La mayoría de los sustratos usados a nivel industrial no contienen glucosa libre por lo que requieren un proceso enzimático previo (Walker y Walker, 2018). En muchos sustratos alimentarios existe una concentración muy alta de disacáridos que pueden ser fácilmente utilizados como nutrientes por parte de las levaduras mediante la acción de las hidrolasas correspondientes (Tabla I.8) que debe ir acoplado con el transporte del azúcar (Feldmann, 2012).

Tabla I.8 Disacáridos como sustratos para el crecimiento de levaduras. Adaptada de: Feldmann, (2012).

Disacárido	Sustrato	Enzima hidrolítica	Producto
Maltosa	Mosto de cerveza, masas de pan	maltasa	2 glucosas
Sacarosa	Melaza, bebidas fermentadas	invertasa	glucosa + fructosa
Melibiosa	Mosto de cerveza	α -galactopiranosidasa	glucosa + galactosa
Lactosa	Productos lácteos	β -galactosidasa	glucosa + galactosa
Celobiosa	Hidrolizados de celulosa	β -glucosidasa	2 glucosas

En el caso de sustratos ricos en almidones, la hidrólisis enzimática consiste en dos etapas, la licuefacción y la sacarificación. La licuefacción consiste en la hidrólisis parcial del almidón a dextrinas mediante la enzima α -amilasa, que se caracteriza por su termoestabilidad, mientras que para la sacarificación se usan glucoamilasas que inician la hidrólisis de las dextrinas originando inicialmente dextrinas y maltosa, y avanzan progresivamente hasta liberar glucosa (Walker y Walker, 2018; Morales y Molina Córdoba, 2015).

Las levaduras tienen dos opciones metabólicas para producir ATP a partir de glucosa, la respiración y la fermentación; las dos rutas empiezan con la glucólisis que genera piruvato. En el metabolismo respiratorio, el piruvato puede ser convertido en dos intermediarios del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA): acetil coenzima A mediante el complejo piruvato deshidrogenasa (PDH) y/o oxalacetato mediante la enzima piruvato carboxilasa (Pyc1/2p en *S. cerevisiae*), que pueden ser transportados hacia la mitocondria. En la fermentación alcohólica se produce la descarboxilación del piruvato a acetaldehído mediante la enzima piruvato descarboxilasa (Pdc1/5/6p), y este dará lugar finalmente al etanol por acción de la alcohol deshidrogenasa (Adhp) (Faria-Oliveira et al., 2015) (Figura I.8). A nivel energético, existen importantes diferencias entre ambos procesos en el rendimiento de ATP por molécula de glucosa, en la respiración se generan aproximadamente 16 moléculas de ATP mientras que en la fermentación solo se generan dos (van Maris et al., 2006)

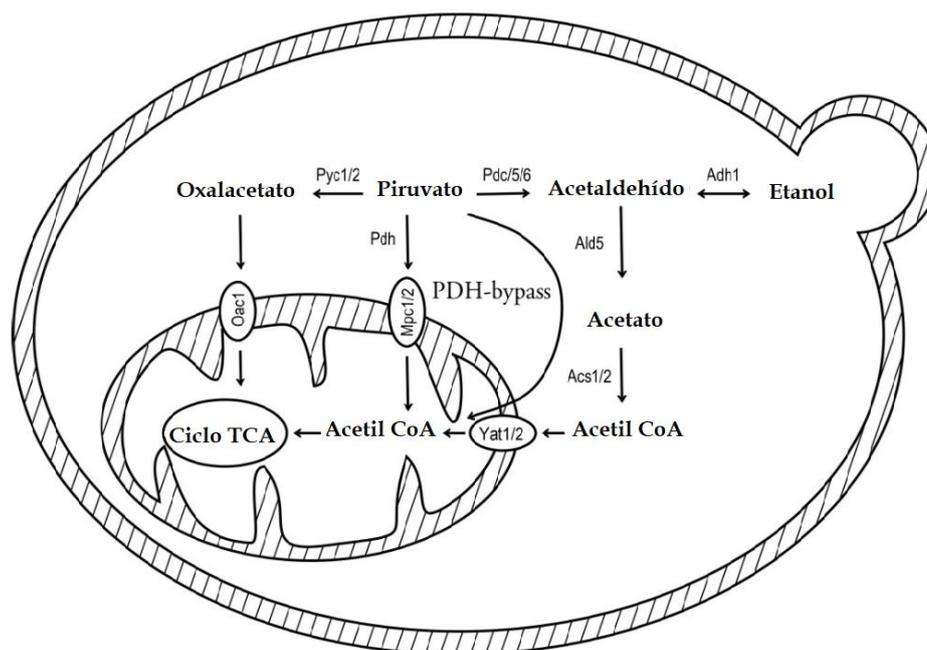


Figura I.8 Destinos metabólicos del piruvato generado en la glucólisis en la respiración y en la fermentación alcohólica en *S. cerevisiae*. Procedente de: Faria-Oliveira et al., (2015) Mpc1p o Mpc2p – transportadores del piruvato; Oac1p – transportador del oxalacetato; Adh1p - alcohol deshidrogenasa; Ald5p - acetaldehído deshidrogenasa; Acs1/2p -acetil-CoA sintasa; Yat1/2p -carnitina acetiltransferasa.

De acuerdo a su estrategia de producción de energía, las levaduras han sido categorizadas en tres grupos: no fermentadoras, fermentadoras obligadas y fermentadoras facultativas siendo este último grupo al que pertenecen la mayoría de ellas (Rodrigues et al., 2006). En la tabla I.9 se detallan varios ejemplos para cada grupo.

Tabla I.9 Ejemplos de levaduras de acuerdo a su estrategia de producción de energía. Adaptado de: Feldmann, (2012); Rodrigues et al., (2006).

Tipo	Respiración	Fermentación	Ejemplos
No fermentadoras	Si	No	<i>Rhodotorula</i> sp., <i>Cryptococcus</i> sp.
Fermentadoras obligadas	No	Si	<i>Torulopsis</i> , <i>Candida slooffiae</i>
Fermentadoras facultativas	Si	Si	<i>S. cerevisiae</i> , <i>T. delbrueckii</i> , <i>C. utilis</i>

La fermentación alcohólica es una ruta metabólica por la cual las levaduras obtienen energía y mantienen el balance redox cuando consumen azúcares. La ruta tiene lugar en el citoplasma y participan un total de 12 enzimas: 10 correspondientes a la ruta glucolítica y dos enzimas adicionales que convierten

el piruvato en los productos finales de la fermentación, etanol y CO₂, para mantener equilibradas la formación de NADH y su reoxidación a NAD⁺. La ruta glucolítica proporciona además metabolitos que pueden utilizarse como puntos de partida para la biosíntesis de moléculas asociadas al aumento de biomasa (Aranda et al., 2011). El rendimiento máximo teórico de etanol es del 51.1 % respecto de la glucosa consumida, sin embargo a nivel industrial se trabaja con rendimientos menores (< 90 % del rendimiento teórico) (Walker y Walker, 2018).

Bajo **condiciones respiratorias**, los genes relacionados con los ciclos del glicoxilato y de los ácidos tricarbóxicos (TCA), respiración, gluconeogénesis, y producción de energía son activados (Dueñas-Sánchez et al., 2012). El TCA genera CO₂ y poder reductor, fundamentalmente NADH, siendo este último reoxidado en la cadena respiratoria mitocondrial, donde se genera el gradiente electroquímico de protones que dirige la síntesis de ATP, y el oxígeno, aceptor final de electrones, es reducido a agua (Compagno et al., 2014). Las levaduras estrictamente aeróbicas desvían el flujo de piruvato predominantemente a través de la piruvato deshidrogenasa hacia la respiración, siempre que exista oxígeno disponible (Rodicio y Heinisch, 2009). Determinadas levaduras no convencionales que actualmente son de mucho interés en la industria, utilizan la respiración en presencia de oxígeno como mecanismo principal para el uso de azúcares (Flores et al., 2000), alternativa que ha sido propuesta como estrategia para bajar los niveles de alcohol en el vino. Fermentaciones con aireación controlada con una cepa de *Metschnikowia pulcherrima* permitió bajar los niveles de etanol y preservar los componentes del mosto de la oxidación excesiva. Esto abre nuevas opciones en la aplicación de nuevas cepas capaces de crecer y respirar en las condiciones de vinificación (Quirós et al., 2014).

Sin embargo, muchas de las levaduras de principal interés industrial, entre ellas *S. cerevisiae*, son fermentadoras facultativas, es decir, pueden sufrir transiciones entre metabolismo fermentativo y respiratorio. Existen tres formas de comportamiento en estas levaduras en cuanto al tipo de proceso de generación de energía a partir de fuentes de carbono y en relación con la disponibilidad de oxígeno, que se relacionan con los denominados efectos Pasteur, Crabtree y Custer (Rodrigues et al., 2006). El efecto Pasteur se refiere a la supresión de la fermentación alcohólica y activación del metabolismo respiratorio, energéticamente más eficiente, en presencia de oxígeno que, en ciertas levaduras, se observa únicamente cuando las concentraciones de glucosa son muy bajas (< 5mM) o en condiciones de limitación de otros nutrientes. En muchas levaduras fermentadoras facultativas, el efecto Pasteur solo se observa en cultivos en condiciones de reposo o con una baja tasa de crecimiento. El efecto Crabtree se refiere a que, independientemente de la disponibilidad de oxígeno en el medio, en presencia de glucosa la fermentación es el modo predominante para el

catabolismo de los azúcares, este efecto se observa en cultivos en crecimiento activo. Estos dos efectos se producen en el género *Saccharomyces*. El efecto Custer es la inhibición de la fermentación alcohólica en ausencia de oxígeno en levaduras de los géneros *Brettanomyces* y *Dekkera* que, en condiciones aeróbicas, llevan a cabo una fermentación mixta de la glucosa produciendo etanol, CO₂ y ácido acético (Feldmann, 2012; Rodrigues et al., 2006).

El efecto Crabtree ha sido ampliamente estudiado en el género *Saccharomyces* y se ha determinado que una mayor tasa de producción de ATP (cantidad de ATP producida por unidad de tiempo), es probablemente el factor más importante que subyace a la aparición de este comportamiento metabólico. Las especies que presentan este efecto se denominan Crabtree - positivas mientras que las que no lo presentan se denominan Crabtree - negativas (Tabla I.10) (Pfeiffer y Morley, 2014). En presencia de oxígeno, el metabolismo de las levaduras Crabtree positivas cambia a respiratorio solo una vez que la glucosa se agota y se ha acumulado etanol, que se convierte en sustrato respirable. La regulación de las alcohol deshidrogenasas juega un papel importante, puesto que Adh1p es principalmente responsable de la producción del etanol a partir del acetaldehído, mientras que Adh2p usa preferentemente etanol como sustrato y su expresión está reprimida por glucosa (Sicard y Legras, 2011). Se han descrito dos tipos de efecto Crabtree de corto y largo plazo. El efecto Crabtree de largo plazo aparece cuando la tasa de asimilación de glucosa excede un valor límite específico de cada cepa y el etanol se acumula, se observa comúnmente en cultivos tipo *batch*. El efecto Crabtree de corto plazo se refiere a la transición inmediata a fermentación alcohólica, en condiciones aerobias, tras la adición de azúcar en exceso a cultivos puramente respiratorios y limitados de azúcar, condición que se observa en cultivos tipo *fed-batch* (Hagman y Piškur, 2015).

Tabla I.10 Ejemplos de especies de levaduras Crabtree positivas y negativas. Procedente de: Rodicio y Heinisch, (2009).

Crabtree-positivas	Crabtree-negativas
<i>S. cerevisiae</i>	<i>Hanseniaspora uvarum</i>
<i>Zygosaccharomyces bailli</i>	<i>Pichia anomala</i>
<i>Brettanomyces intermedius</i>	<i>Candida utilis</i>
<i>Torulopsis glabrata</i>	<i>Hansenula neofermentans</i>
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	<i>Kluyveromyces marxianus</i>
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	
<i>Candida stellata</i>	

La represión por catabolito de carbono, o represión por glucosa, se refiere a un mecanismo regulador complejo producido por el metabolismo de azúcares

simples, como la glucosa, y que causa la represión de la transcripción de genes y la inactivación de enzimas necesarios para el uso de fuentes de carbono alternativas y para el metabolismo respiratorio y la gluconeogénesis. La mayoría de estudios se han realizado en la especie *S. cerevisiae*, sin embargo se sabe que muestra algunas diferencias entre las distintas especies de levaduras, relacionadas con el papel de las hexoquinasas o la expresión de algunos genes (Flores et al., 2000). Este fenómeno involucra diferentes rutas de transducción de señales activadas por los niveles extra e intracelulares de glucosa y por metabolitos relacionados; algunos de los genes claves que han sido identificados operan a nivel de la regulación de la transcripción o directamente sobre las enzimas involucradas y sus reguladores (Hagman y Piškur, 2015). La desrepresión después del agotamiento de los azúcares depende de la actividad del complejo de la proteinquinasa Snf1p, que también controla la activación de la respiración y la gluconeogénesis (Rodicio y Heinisch, 2009).

Durante el metabolismo fermentativo se generan además una multitud de productos intermedios conocidos como **metabolitos secundarios** (Stewart, 2017). Estos son compuestos orgánicos que no forman parte del metabolismo energético fundamental de la célula pero que tienen otras funciones, como mejorar el potencial del organismo para tolerar ciertas condiciones (Dwivedi et al., 2018), o posibilitar la interacción del organismo con su entorno y con otros organismos (Krause et al., 2018) (Figura I.9). Además, en levaduras conductoras de fermentaciones alimentarias muchos de estos metabolitos secundarios son relevantes para las características organolépticas del producto, como por ejemplos alcoholes superiores, ésteres, aldehídos y cetonas, y compuestos de azufre, estos últimos generalmente indeseables (Stewart, 2017).

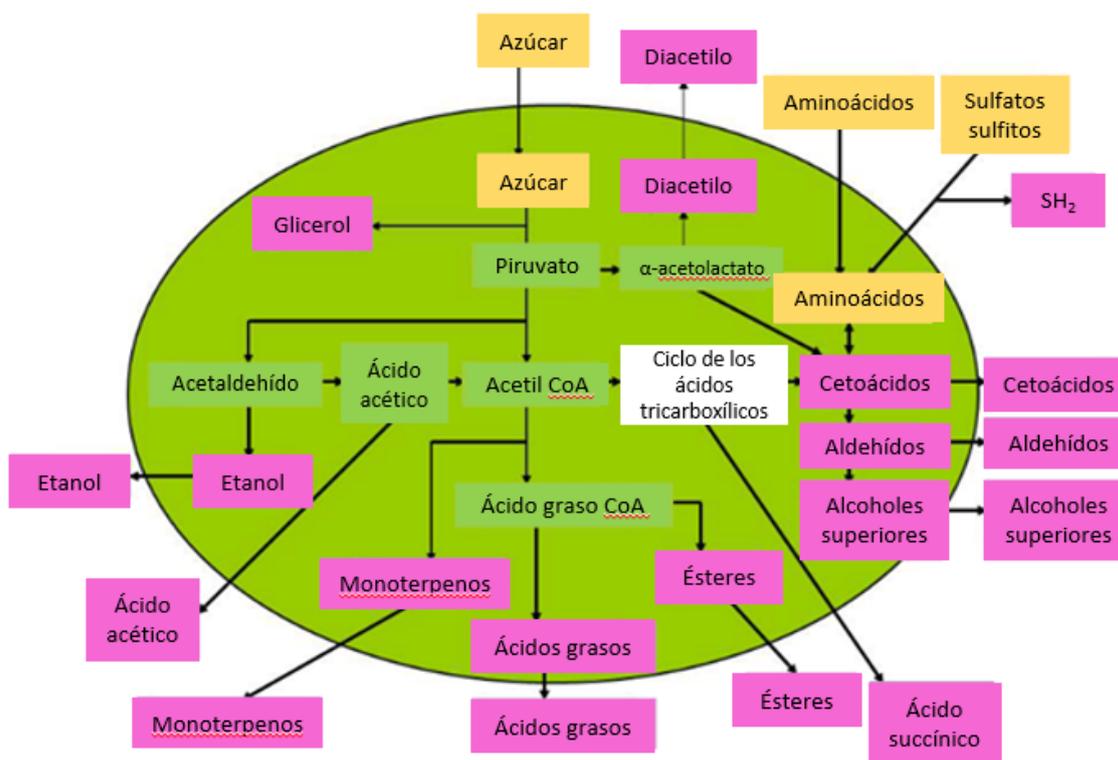


Figura I.9 Síntesis de compuestos aromáticos a partir del metabolismo de *S. cerevisiae*. Procedente de: Zumárraga y Barbero, (2014) que cita a Pretorius, (2000).

La síntesis de alcoholes superiores involucra la captación inicial de aminoácidos, su posterior transaminación y descarboxilación del α -ceto ácido para dar lugar a la formación de un aldehído, y finalmente a la reducción al alcohol superior. Los ésteres del acetato son sintetizados a partir de alcoholes superiores o etanol y acetil-CoA mientras que los ésteres etílicos son sintetizados por etanol y un acil-coA. Todos estos compuestos se exportan por difusión a través de la membrana. Los alcoholes superiores y los ésteres son los de mayor interés a nivel industrial por su contribución al aroma de las bebidas fermentadas, aunque la cantidad absoluta de estos compuestos no es lo más relevante sino la relación entre los distintos compuestos volátiles, debido a efectos sinérgicos de los aromas activos (Procopio et al., 2011).

El sabor y aroma de las bebidas fermentadas están determinados en gran parte por los productos metabólicos secundarios de las cepas de levaduras empleadas, junto con la composición del sustrato y las condiciones de fermentación usada (Stewart, 2017). Actualmente existe una amplia diversidad de moléculas industrialmente importantes para las cuales se han demostrado experimentalmente rutas de producción microbiana, por lo que existen varios estudios con la idea de desarrollar factorías celulares productoras económicamente viables, y se han propuesto enfoques de modelado a escala genómica mediante estrategias de ingeniería metabólica (Jouhten et al., 2016).

4. Producción industrial de levadura activa seca (ADY)

La mayoría de las fermentaciones de bebidas a escala industrial se basan en el uso de inóculos de levaduras seleccionados, producidos previamente mediante un proceso de propagación de biomasa a gran escala y que posteriormente se someten a tratamientos de concentración y conservación, normalmente por deshidratación. De forma general, la producción de biomasa a nivel industrial involucra los siguientes pasos: propagación, recolección, concentración y/o secado, empaquetado y almacenamiento (Bekatorou et al., 2006). Para muchos propósitos industriales, la producción de iniciadores comerciales como levadura activa seca (*active dried yeast* -ADY) es una práctica común que da como resultado biomasa con una capacidad fermentativa aceptable y altamente estable durante el almacenamiento (Gómez-Pastor et al., 2011).

Propagación de biomasa

Aunque pueden existir diferencias metabólicas y de crecimiento entre levaduras de diferentes especies o cepas, el proceso de propagación de biomasa de levaduras a escala industrial se basa en el utilizado para levaduras de panificación. En el caso de las levaduras vínicas el proceso consta de una secuencia de 5 a 6 fermentaciones con fermentadores de mayor volumen a cada paso. El sustrato más usado para producción de levaduras es la melaza de caña o de remolacha, sustrato en el que la sacarosa es la fuente de carbono; antes de ser usada como sustrato, suelen mezclarse diferentes lotes, diluirse, esterilizarse y enriquecerse con suplementos para garantizar el mejor crecimiento de la levadura. La primera fase implica la producción del inóculo que se realiza en sucesivas fermentaciones tipo *batch* a partir del cultivo puro, cuyo rendimiento en biomasa es relativamente bajo, mientras que la segunda fase son cultivos sucesivos en *fed-batch* donde la alimentación con baja concentración de azúcares fermentables, por debajo de los niveles de represión por glucosa, consigue un elevado rendimiento de biomasa (Pérez-Torrado et al., 2015).

La producción industrial tiene como objetivo la conversión eficiente del carbono de los azúcares de la materia prima en biomasa de levadura, para lo se requiere que la producción de los metabolitos principales del metabolismo fermentativo como el etanol y el acetaldehído se minimice (Bauer et al., 2000), es decir, que el metabolismo del azúcar se desvíe a la vía oxidativa para lograr el máximo rendimiento energético y la máxima formación de biomasa (Van Hoek et al., 1998).

En el proceso de propagación de biomasa de cepas de *S. cerevisiae*, uno de los problemas es la fuerte tendencia de esta especie de metabolizar los azúcares fermentativamente en condiciones aerobias, dado su carácter Crabtree positivo, dando lugar a rendimientos de biomasa bajos. Es por ello que la estrategia usual

para controlar este problema tecnológico es, como se había mencionado anteriormente, el uso de un ajuste de alimentación por lotes en la segunda fase del proceso (Vieira et al., 2013). La optimización de la productividad de biomasa requiere un incremento tanto en la tasa de crecimiento específica, así como en el rendimiento de biomasa durante la fase de alimentación por lo que la velocidad de alimentación del sustrato y el control del oxígeno disuelto son factores claves para ello. En condiciones de limitación de azúcares y presencia de oxígeno se consigue un crecimiento totalmente respiratorio de *S. cerevisiae* dando lugar a una mucho mayor cantidad de biomasa, comparado a lo obtenido en la fase de *batch* (Gomez-Pastor et al., 2011).

Dependiendo de la cepa de levadura con la que se esté trabajando, en algunos casos es necesario llegar a tasas de crecimiento cercanas al valor crítico y evitar la formación de etanol y acetato. Deben controlarse los principales parámetros que tengan impacto en las actividades metabólicas de las levaduras, como el pH y la temperatura, además se debe permitir un proceso final de maduración que permita que las células sean más estables y se evite la autólisis (Pérez-Torrado et al., 2015).

Deshidratación

La deshidratación o secado se lleva a cabo por aplicación de calor bajo condiciones controladas para eliminar la mayoría del agua presente y su principal propósito es extender la vida útil de un producto mediante la reducción de la actividad de agua (Fellows, 2017). Uno de los pasos más importantes durante el proceso de producción industrial de ADY es el secado en un deshidratador de lecho fluidizado, dando como resultado la levadura seca activa, con aproximadamente el 90 – 95 % de peso seco (Jenkins et al., 2010), que puede ser envasada al vacío o en atmósferas inertes. Existe una pérdida anual de viabilidad entre el 10 – 25 %, dependiendo de las temperaturas y condiciones de almacenamiento (Pérez-Torrado et al., 2015) y se ha demostrado que la constitución genética de las levaduras deshidratadas no se altera durante el almacenamiento, mostrando incluso una mayor tolerancia a mutaciones (Jenkins et al., 2010) lo que ha ampliado su rango de aplicación.

Tanto en el proceso de producción como en el de deshidratación las células se enfrentan a una variedad de estreses entre los que se destacan el estrés oxidativo, osmótico y térmico (Figura I.10) (Pérez-Torrado et al., 2015). La deshidratación final de la biomasa de levaduras causa un impacto diferente en la viabilidad y vitalidad de distintas cepas, principalmente relacionado con su resistencia al estrés oxidativo, por lo que levaduras con una mayor tolerancia a este tipo de estrés podrían tener una mejor capacidad fermentativa (Pérez-Torrado et al., 2015; Matallana y Aranda, 2017).

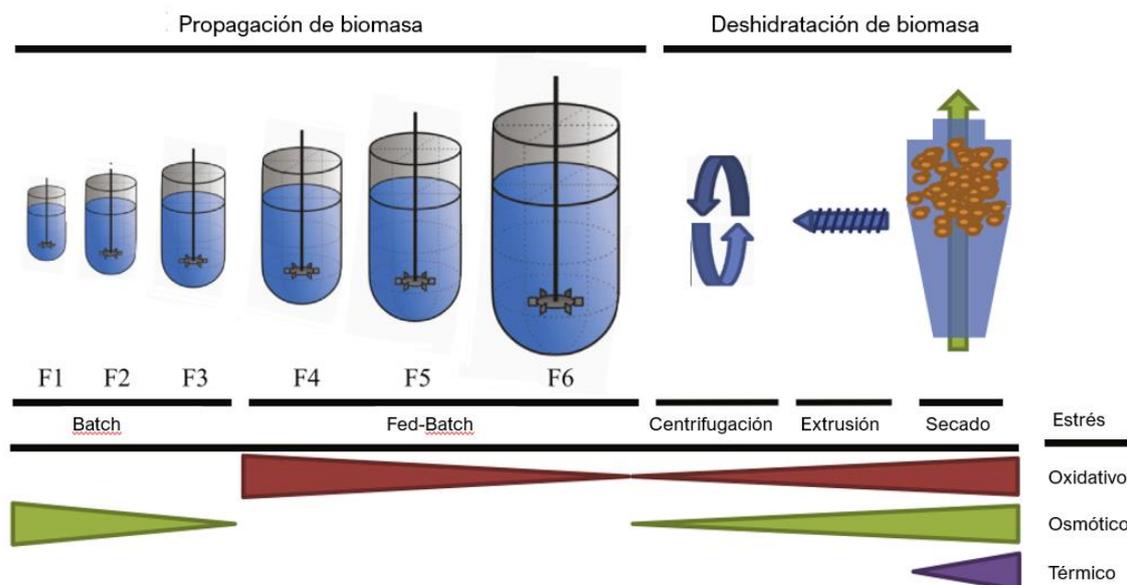


Figura I.10 Diagrama de las distintas etapas de producción de ADY y los principales tipos de estrés relacionado con cada fase. Procedente de: Pérez-Torrado et al., (2015).

Las particularidades de cada cepa, el medio de crecimiento y las condiciones empleadas para la producción de biomasa necesitan ser específicamente consideradas y estudiadas (Matallana y Aranda, 2017). Para su uso en posteriores procesos fermentativos, la ADY ha de rehidratarse, proceso que genera un estrés osmótico en la célula que puede llegar a ser crítico por su impacto en la viabilidad (Simonin et al., 2007). Varios estudios se han enfocado a la estandarización de condiciones de producción de biomasa en levaduras no convencionales (Schmierda et al., 2014), en la obtención de metabolitos de interés (Libkind y Van Broock, 2006) y, además, en el análisis de varios tratamientos protectores, como el uso de antioxidantes naturales, ácidos orgánicos (ascórbico, cafeico u oleico) así como aceites naturales, como el aceite de argán, para obtener una mejora tanto en el rendimiento en biomasa como en su desempeño fermentativo (Gamero-Sandemetro et al., 2015, 2018, 2019).

5. Adaptación a estrés en levaduras

Las levaduras presentes en ambientes fermentativos industriales o utilizadas en la obtención de productos de interés viven en ambientes cambiantes y complejos, alejados de las condiciones óptimas de crecimiento del organismo, y por ello se han estudiado los mecanismos moleculares relacionados con la respuesta a estrés en esas condiciones (Gibson et al., 2007; Matallana y Aranda, 2017; Orozco et al., 2019). De forma general, los factores de estrés que afectan a la fisiología de las levaduras durante la fermentación alcohólica pueden agruparse en tres tipos físicos, químicos y biológicos, y muchos de ellos pueden perjudicar el crecimiento y metabolismo de las levaduras y, por ende, a su

capacidad fermentativa (Walker y Walker, 2018). Las cepas de levaduras que generalmente son usadas en la industria, destacándose las de la especie *S. cerevisiae*, tienen como principal atributo una mejor adaptación a las condiciones cambiantes y muchas veces hostiles de este ambiente debido a su habilidad de sentir, reaccionar y adaptar su fisiología a las condiciones secuenciales de estrés con las que las células se encuentran a lo largo del proceso (Matallana y Aranda, 2017) (Figura I.11).

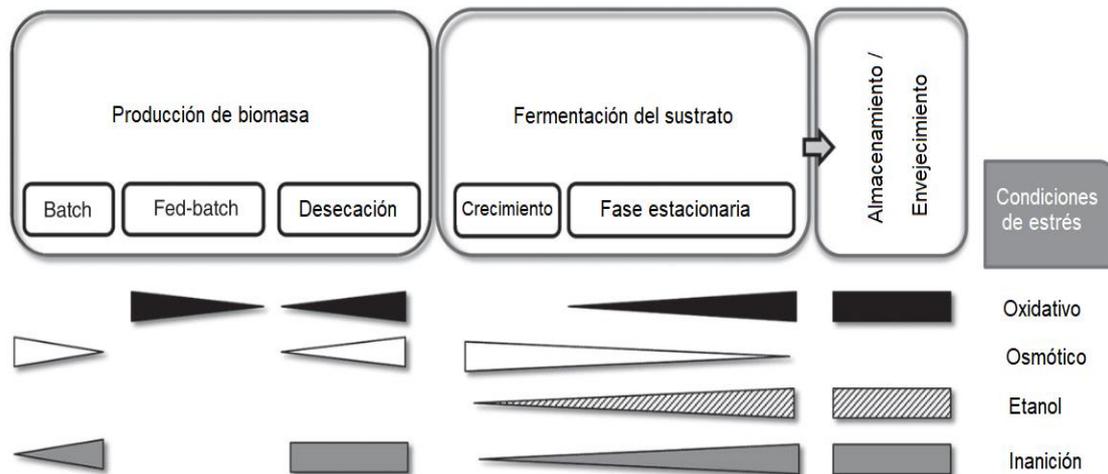


Figura I.11 Respuesta a estrés durante el uso biotecnológico de levaduras en fermentaciones alcohólicas. Las principales etapas van desde la producción de biomasa, la fermentación del sustrato hasta el almacenamiento o envejecimiento (cuando se requiere). Adaptado de: Matallana y Aranda, (2017).

La respuesta al estrés ambiental es el mecanismo que la célula utiliza para proteger su sistema interno de los efectos de las variaciones ambientales y consiste en el inicio de un programa de expresión génica común que incluye la expresión de aproximadamente 900 genes. La regulación de estos cambios de expresión es específica de cada gen y de cada condición por lo que el inicio del programa está precisamente controlado en respuesta a cada nuevo ambiente (Gasch, 2003). El daño provocado por el estrés y la respuesta de la levadura al mismo dependen del tipo y grado de estrés y del estado de desarrollo de la levadura en el momento que ocurre el estímulo. De forma general las estructuras celulares más afectadas son las membranas y las diferentes macromoléculas especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos. Las levaduras poseen mecanismos generales de respuesta a estrés que permite una protección cruzada, es decir, que la tolerancia a un tipo de estrés determinado conlleva a la tolerancia a otros tipos de estrés (Folch-Mallo, 2004, Matallana y Aranda, 2017). La respuesta al estrés ambiental es compleja y se basa en múltiples rutas, la mayoría de ellas se basan en quinasas que remodelan la transcripción a través

de factores de transcripción específicos del estrés. Mecanismos de expresión génica relacionados con la estabilidad del mRNA también están relacionados (Matallana y Aranda, 2017), y recientemente se ha demostrado que la regulación de procesos de modificación de bases en los tRNAs juegan un rol importante en la respuesta de las células a fluctuaciones ambientales y exposición a xenobióticos (Huber et al., 2019).

Estrés durante la producción de biomasa

Tanto en el proceso de propagación de biomasa como en la deshidratación se producen condiciones de estrés para la célula, principalmente estrés oxidativo, que afecta de una forma negativa el desempeño fermentativo de las levaduras (Pérez-Torrado et al., 2015). Durante las fases de crecimiento tipo *batch*, el estrés hiperosmótico causado por altas concentraciones de sacarosa de las melazas y, sobre todo, el estrés oxidativo característico de la transición metabólica de fermentación de la sacarosa a respiración del etanol, son las principales condiciones dañinas para las células. En las etapas de *fed-batch* se mantiene un cierto nivel de estrés oxidativo derivado de la aparición de ROS consecuencia del metabolismo respiratorio, y posteriormente un agotamiento de nutrientes, una vez finalizada la alimentación e iniciada la fase de maduración, en la que se persigue que las células entran a fase estacionaria y acumulan carbohidratos de reserva como la trehalosa y el glucógeno, rasgos que incrementan su resistencia a estrés. En el proceso de deshidratación posterior se produce un cierto estrés térmico por el flujo de aire caliente y la pérdida de agua que, además de causar efectos osmóticos genera daño oxidativo (Garre et al, 2010), mientras que, cuando se rehidrata para ser usada como iniciador de la fermentación, se produce un choque hipoosmótico (Simonin et al., 2007).

La supervivencia de las células en estado de deshidratación, es un fenómeno complejo que involucra un grupo de mecanismos coordinados (França et al., 2007). Durante la producción de ADY, los sistemas antioxidantes juegan un rol esencial en la supervivencia y vitalidad de la célula (Gamero-Sandemetrio et al., 2015, 2018). El estrés oxidativo afecta los componentes celulares macromoleculares, como los lípidos y las proteínas deteriorando varios procesos celulares diferentes. Este efecto detrimental es prevenido y controlado por sistemas complejos de señalización, desintoxicación y sistemas protectores de proteínas que pueden ser inducidos por tratamientos antioxidantes. Mecanismos post-traduccionales que durante la propagación de biomasa afectan la estabilidad de varias proteínas como las proteínas glicolíticas y fermentativas, del ciclo del ácido tricarboxílico, proteínas de choque térmico, carabinas moleculares y proteínas relacionadas con la respuesta al estrés oxidativo, juegan un rol muy importante en la capacidad fermentativa de la biomasa producida (Gómez-Pastor et al., 2010).

Con el objeto de seleccionar cepas de levaduras de interés para la producción de ADY, se han establecido varios parámetros biomarcadores cuyo análisis es sencillo, como la determinación de la peroxidación de lípidos, los niveles de trehalosa, glutatión, glutatión reductasa y actividades enzimáticas de la catalasa (Gamero-Sandemetrio et al., 2014). Bajo circunstancias de estrés durante la propagación de biomasa, la estructura y función de la membrana se ven afectadas por la peroxidación lipídica (Garre et al., 2010). En las levaduras de la especie *S. cerevisiae*, el estrés oxidativo causado por la deficiencia de agua durante la deshidratación, da lugar a un incremento en los niveles de malonaldehído (MDA) que es un producto de la peroxidación lipídica (Pereira et al., 2003). Otro de los aspectos involucrados en la tolerancia a la deshidratación en levaduras es la acumulación y el transporte activo del disacárido trehalosa (França et al., 2007). La trehalosa es un protector de estrés muy importante que confiere estabilidad a la membrana plasmática y a las enzimas, asegura el plegamiento adecuado y reparación de proteínas. La trehalosa es acumulada en respuesta a estrés por calor, por exposición a compuestos químicos tóxicos, por etanol, estrés osmótico y oxidativo (Gibson et al., 2007). Por otro lado, el glutatión (GSH) juega un rol central en la defensa contra el daño oxidativo y en las rutas de señalización; tras su oxidación se transforma en glutatión disulfuro (glutatión oxidado - GSSG). Las concentraciones de GSH y GSSG, además de su ratio molar son indicadores de la funcionalidad de la célula y el estrés oxidativo (Monostori et al., 2009). Se ha determinado que la regulación no canónica de la biosíntesis del glutatión y la trehalosa podrían causar un desempeño fermentativo pobre de levaduras no-*Saccharomyces* en forma de ADY (Gamero-Sandemetrio et al., 2018).

Estrés durante la fermentación

Los principales tipos de estrés a los que se enfrentan las levaduras en la fermentación alcohólica son el choque hiperosmótico y pH, fluctuaciones de la concentración del oxígeno, concentraciones altas de etanol, cambios en la disponibilidad de nutrientes, presencia de especies reactivas de oxígeno derivadas del metabolismo respiratorio y temperaturas elevadas (Auesukaree, 2017; Gibson et al., 2007).

Estas condiciones de estrés varían a través del proceso junto con la transformación química del sustrato. Al inicio del proceso, los inóculos de células rehidratadas o frescas se enfrentan a un aumento repentino de la presión osmótica debido a la alta concentración de azúcares en el sustrato, pH bajo, así como en algunos casos a la presencia de compuestos tóxicos para la célula (Pérez-Torrado et al 2002). En el transcurso de la fermentación cambios en la temperatura, así como en la concentración del oxígeno disuelto pueden también afectar el desempeño de las levaduras, al final del proceso las altas

concentraciones de etanol y el agotamiento de nutrientes son la principal fuente de estrés para la célula. En fermentaciones tradicionales en donde suelen guardarse residuos de la fermentación anterior las levaduras pueden permanecer en un estado dormiente pero viable, e incluso algunas de ellas pueden encontrarse en el intestino de vectores como los insectos (Orozco et al., 2019). En la tabla I.11 se describen los principales genes involucrados en la respuesta a estrés osmótico, por etanol, oxidativo y por calor durante la fermentación.

Tabla I.11 Principales genes responsables de la respuesta a los principales tipos de estrés durante la fermentación alcohólica. Adaptado de: Auesukaree, (2017).

Estrés	Genes involucrados	
Osmótico	Metabolismo del glicerol	<i>GPD1/2, GPP1/D</i>
	Biosíntesis de osmolitos (trehalosa / glucógeno)	<i>TPS1, TPS2, NTH1 / PHO85, GDB1, GPH1</i>
	Genes HSP (Heat shock proteins)	<i>HSP12, HSP26, HSP42, HSP104</i>
	Genes antioxidantes	<i>CTT1, GRE3, TRX2, TTR1</i>
	Genes que codifican chaperonas	<i>HSP82, HSC82</i>
Por etanol	Genes HSP	<i>HSP12, HSP26, HSP30, HSP78, HSP82, HSP104, SSA3, SSA4</i>
	Genes del metabolismo de la trehalosa	<i>TPS1, TPS2, NTH1</i>
	Genes transportadores de Pro, Trp, Arg	<i>PUT1, TRP1, TRP2, TRP3, TRP4, TRP5, TAT2</i>
Oxidativo	Genes superóxido dismutasa (SOD)	<i>SOD1, SOD2</i>
	Genes que codifican catalasas	<i>CTA1, CTA2, CTT1</i>
	Genes que codifican glutatión peroxidadas	<i>GPX1, GPX2, GPX3</i>
	Genes que codifican peroxiredoxinas	<i>TSA1, TSA2, AHP1, DOT5, PRX1</i>
	Genes que codifican tioredoxinas	<i>TRX1, TRX2, TRX3</i>
	Genes que codifican tioredoxinreductasas	<i>TRR1, TRR2</i>
	Genes que codifican glutaredoxinas	<i>GRX1/8, GRX2, GRX3/4, GRX5, GRX6/7</i>
	Genes de síntesis de glutatión	<i>GSH1, GSH2, GLR1</i>
Por calor	Genes HSP	<i>HSP104, HSP90, HSP70, HSPs (HSP pequeñas)</i>
	Genes del metabolismo de la trehalosa	<i>TPS1, TPS2, NTH1</i>

Estas condiciones de estrés pueden afectar considerablemente la población de levaduras viables y su eficiencia fermentativa ya que existe una correlación directa entre la resistencia a estrés y su desempeño fermentativo (Ivorra et al., 1999). Recientemente, se han realizado varios estudios en búsqueda de nuevas

cepas tolerantes a condiciones de estrés que puedan ser utilizadas en fermentaciones industriales, que tengan la habilidad de utilizar una amplia variedad de sustratos y que produzcan cantidades adecuadas de productos (Saini et al., 2018). Cepas nativas de la especie *S. cerevisiae* aisladas de fermentaciones de frutas y destilerías en Brasil demostraron una mayor tolerancia a condiciones altamente estresantes como concentraciones de NaCl 1 M, sulfito 0.04 %, etanol 12 % y 42 °C (Ramos et al., 2013).

OBJETIVOS

El objetivo general de este trabajo es la caracterización del comportamiento fisiológico, bioquímico y tecnológico de levaduras aisladas de bebidas fermentadas tradicionales (chichas) de Ecuador.

Los objetivos específicos son:

1. Identificación a nivel molecular y caracterización fisiológica de las diferentes especies de levaduras presentes en la microbiota natural de cuatro chichas ecuatorianas (*chicha del Yamor*, *chicha de arroz*, *chicha de avena* y *chicha de uva*).
2. Caracterización de la resistencia a estreses típicos de los procesos de producción de biomasa y fermentación, y análisis de actividades enzimáticas relacionadas con la utilización de fuentes de carbono.
3. Selección y caracterización del desempeño fermentativo de levaduras con las mejores propiedades metabólicas para la fermentación de chichas y bebidas alcohólicas en general en sustratos naturales simulados y en sustratos industriales.
4. Estudio preliminar de la adecuación para la producción como cultivo puro iniciador en forma de levadura seca activa de levaduras seleccionadas.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. Materiales

1.1. Cepas de levaduras

Se utilizaron cepas procedentes de diferentes colecciones como cepas de referencia para los diferentes experimentos, cuatro de la especie *S. cerevisiae*, dos de la especie *T. delbrueckii* y una de la especie *S. pastorianus* (Tabla M.1). La elección se justifica en cada experimento y se realizó en función del tipo de análisis y de las características de las cepas de referencia.

Tabla M.1 Especies y cepas de levaduras usadas en este estudio.

Cepa	Especie	Origen
Cinta Roja	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Panificación, comercial (Burns Philip)
BY4742	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Cepa de laboratorio (Euroscarf)
L2056	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Vinificación, comercial (Lallemand)
A-81062	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	VTT Culture Collection
A-63015	<i>Saccharomyces pastorianus</i>	VTT Culture Collection
PYCC 5321	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Panificación, PYCC (Portuguese Yeast Culture Collection)
D291	<i>Torulaspota delbrueckii</i>	Vinificación, comercial (Lallemand)

Se obtuvieron 254 cepas de origen ecuatoriano a partir de fermentaciones controladas de cuatro tipos de chichas (Tabla M.2).

Tabla M.2 Cepas de levaduras aisladas en este trabajo, fuente de aislamiento y tiempo de fermentación del que proceden.

Cepa	Fuente	Tiempo de fermentación (días)	Cepa	Fuente	Tiempo de fermentación (días)
1	Ch. Avena (OC)	3	2	Ch. Avena (OC)	3
3	Ch. Avena (OC)	3	4	Ch. Avena (OC)	3
5	Ch. Avena (OC)	3	6	Ch. Avena (OC)	3
7	Ch. Avena (OC)	3	8	Ch. Avena (OC)	3
9	Ch. Avena (OC)	3	10	Ch. Avena (OC)	3
11	Ch. Avena (OC)	3	12	Ch. Avena (OC)	3
13	Ch. Avena (OC)	3	14	Ch. Avena (OC)	3

Cepa	Fuente	Tiempo de fermentación (días)	Cepa	Fuente	Tiempo de fermentación (días)
15	Ch. Avena (OC)	3	16	Ch. Avena (OC)	3
17	Ch. Avena (OC)	3	18	Ch. Avena (OC)	3
19	Ch. arroz (RC)	3	20	Ch. arroz (RC)	3
21	Ch. arroz (RC)	3	22	Ch. arroz (RC)	3
23	Ch. arroz (RC)	3	24	Ch. arroz (RC)	3
25	Ch. arroz (RC)	3	26	Ch. arroz (RC)	3
27	Ch. arroz (RC)	3	28	Ch. arroz (RC)	3
29	Ch. arroz (RC)	3	30	Ch. arroz (RC)	3
31	Ch. arroz (RC)	3	32	Ch. arroz (RC)	3
33	Ch. arroz (RC)	14	34	Ch. arroz (RC)	14
35	Ch. arroz (RC)	14	36	Ch. arroz (RC)	14
37	Ch. arroz (RC)	14	38	Ch. arroz (RC)	14
39	Ch. arroz (RC)	14	40	Ch. arroz (RC)	14
41	Ch. arroz (RC)	14	42	Ch. arroz (RC)	14
43	Ch. arroz (RC)	14	44	Ch. arroz (RC)	14
45	Ch. arroz (RC)	14	46	Ch. arroz (RC)	14
47	Ch. arroz (RC)	14	48	Ch. arroz (RC)	14
49	Ch. arroz (RC)	14	50	Ch. arroz (RC)	14
51	Ch. arroz (RC)	14	52	Ch. arroz (RC)	14
53	Ch. arroz (RC)	14	54	Ch. arroz (RC)	14
55	Ch. arroz (RC)	14	56	Ch. arroz (RC)	14
57	Ch. arroz (RC)	14	58	Ch. arroz (RC)	14
59	Ch. arroz (RC)	14	60	Ch. arroz (RC)	14
61	Ch. arroz (RC)	14	62	Ch. uva (GC)	3
63	Ch. uva (GC)	3	64	Ch. uva (GC)	3
65	Ch. uva (GC)	3	66	Ch. uva (GC)	3
67	Ch. uva (GC)	3	68	Ch. uva (GC)	3
69	Ch. uva (GC)	3	70	Ch. uva (GC)	3
71	Ch. uva (GC)	3	72	Ch. uva (GC)	3
73	Ch. uva (GC)	3	74	Ch. uva (GC)	3
75	Ch. uva (GC)	3	76	Ch. uva (GC)	3
77	Ch. uva (GC)	3	78	Ch. uva (GC)	3
79	Ch. uva (GC)	3	80	Ch. uva (GC)	3
81	Ch. uva (GC)	3	82	Ch. uva (GC)	3
83	Ch. uva (GC)	3	84	Ch. uva (GC)	3
85	Ch. uva (GC)	3	86	Ch. uva (GC)	3
87	Ch. uva (GC)	3	88	Ch. uva (GC)	3
89	Ch. uva (GC)	3	90	Ch. uva (GC)	3
91	Ch. uva (GC)	3	92	Ch. uva (GC)	3
93	Ch. uva (GC)	3	94	Ch. uva (GC)	3
95	Ch. uva (GC)	3	96	Ch. uva (GC)	3
97	Ch. uva (GC)	7	98	Ch. uva (GC)	7
99	Ch. uva (GC)	7	100	Ch. uva (GC)	7
101	Ch. uva (GC)	7	102	Ch. uva (GC)	7

Cepa	Fuente	Tiempo de fermentación (días)	Cepa	Fuente	Tiempo de fermentación (días)
103	Ch. uva (GC)	7	104	Ch. uva (GC)	7
105	Ch. uva (GC)	7	106	Ch. uva (GC)	7
107	Ch. uva (GC)	7	108	Ch. uva (GC)	7
109	Ch. uva (GC)	7	110	Ch. uva (GC)	7
111	Ch. uva (GC)	7	112	Ch. uva (GC)	7
113	Ch. uva (GC)	7	114	Ch. uva (GC)	7
115	Ch. uva (GC)	7	116	Ch. uva (GC)	7
117	Ch. uva (GC)	7	118	Ch. uva (GC)	7
119	Ch. uva (GC)	7	121	Ch. Yamor (YC)	14
122	Ch. Yamor (YC)	14	123	Ch. Yamor (YC)	14
124	Ch. Yamor (YC)	14	125	Ch. Yamor (YC)	14
126	Ch. Yamor (YC)	14	127	Ch. Yamor (YC)	14
128	Ch. Yamor (YC)	14	129	Ch. Yamor (YC)	14
130	Ch. Yamor (YC)	14	131	Ch. Yamor (YC)	14
132	Ch. Yamor (YC)	14	133	Ch. Yamor (YC)	14
134	Ch. Yamor (YC)	14	135	Ch. Yamor (YC)	14
136	Ch. Yamor (YC)	14	137	Ch. Yamor (YC)	14
138	Ch. Yamor (YC)	14	139	Ch. Yamor (YC)	14
140	Ch. Yamor (YC)	14	141	Ch. Yamor (YC)	14
142	Ch. Yamor (YC)	14	143	Ch. Yamor (YC)	7
144	Ch. Yamor (YC)	7	145	Ch. Yamor (YC)	7
146	Ch. arroz (RC)	7	147	Ch. arroz (RC)	7
148	Ch. arroz (RC)	7	149	Ch. arroz (RC)	7
150	Ch. arroz (RC)	7	151	Ch. Avena (OC)	7
152	Ch. Avena (OC)	7	153	Ch. Avena (OC)	7
154	Ch. Avena (OC)	7	155	Ch. Avena (OC)	7
156	Ch. Avena (OC)	7	159	Ch. arroz (RC)	7
160	Ch. Yamor (YC)	14	161	Ch. Yamor (YC)	14
162	Ch. Yamor (YC)	14	163	Ch. Yamor (YC)	14
164	Ch. Yamor (YC)	14	165	Ch. Yamor (YC)	14
166	Ch. arroz (RC)	14	167	Ch. arroz (RC)	14
168	Ch. arroz (RC)	14	169	Ch. arroz (RC)	14
170	Ch. arroz (RC)	14	171	Ch. arroz (RC)	14
172	Ch. arroz (RC)	14	173	Ch. arroz (RC)	14
174	Ch. uva (GC)	3	175	Ch. uva (GC)	3
176	Ch. uva (GC)	3	177	Ch. uva (GC)	3
178	Ch. uva (GC)	3	179	Ch. uva (GC)	3
180	Ch. uva (GC)	3	181	Ch. uva (GC)	3
182	Ch. uva (GC)	3	183	Ch. uva (GC)	3
184	Ch. uva (GC)	3	185	Ch. uva (GC)	3
186	Ch. uva (GC)	3	187	Ch. uva (GC)	3
188	Ch. uva (GC)	3	189	Ch. uva (GC)	3
190	Ch. uva (GC)	7	191	Ch. uva (GC)	7
192	Ch. arroz (RC)	3	193	Ch. arroz (RC)	3

Cepa	Fuente	Tiempo de fermentación (días)	Cepa	Fuente	Tiempo de fermentación (días)
194	Ch. arroz (RC)	3	195	Ch. arroz (RC)	7
196	Ch. Avena (OC)	7	197	Ch. Yamor (YC)	7
198	Ch. uva (GC)	3	199	Ch. uva (GC)	3
200	Ch. uva (GC)	3	201	Ch. uva (GC)	3
202	Ch. uva (GC)	3	203	Ch. uva (GC)	3
204	Ch. uva (GC)	3	205	Ch. uva (GC)	3
206	Ch. uva (GC)	3	207	Ch. uva (GC)	3
208	Ch. uva (GC)	3	209	Ch. uva (GC)	3
210	Ch. uva (GC)	3	211	Ch. uva (GC)	3
212	Ch. uva (GC)	3	213	Ch. uva (GC)	3
214	Ch. uva (GC)	3	215	Ch. uva (GC)	3
216	Ch. uva (GC)	3	217	Ch. uva (GC)	3
218	Ch. uva (GC)	3	219	Ch. uva (GC)	3
220	Ch. uva (GC)	3	221	Ch. uva (GC)	3
222	Ch. uva (GC)	3	223	Ch. uva (GC)	3
224	Ch. uva (GC)	3	225	Ch. uva (GC)	3
226	Ch. uva (GC)	3	227	Ch. uva (GC)	3
228	Ch. uva (GC)	3	229	Ch. uva (GC)	3
230	Ch. uva (GC)	3	231	Ch. uva (GC)	3
232	Ch. uva (GC)	3	233	Ch. uva (GC)	3
234	Ch. uva (GC)	3	235	Ch. uva (GC)	3
236	Ch. uva (GC)	3	237	Ch. Avena (OC)	3
238	Ch. Avena (OC)	3	239	Ch. uva (GC)	3
240	Ch. uva (GC)	3	241	Ch. uva (GC)	3
242	Ch. uva (GC)	3	243	Ch. uva (GC)	3
244	Ch. uva (GC)	3	245	Ch. uva (GC)	3
246	Ch. uva (GC)	3	247	Ch. uva (GC)	3
248	Ch. uva (GC)	3	249	Ch. uva (GC)	3
250	Ch. uva (GC)	3	251	Ch. uva (GC)	3
252	Ch. uva (GC)	3	253	Ch. Avena (OC)	3
254	Ch. Avena (OC)	3	255	Ch. Avena (OC)	3
256	Ch. Avena (OC)	3	257	Ch. Avena (OC)	3

1.2. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo se detallan en la tabla M.3.

Tabla M.3 Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

Oligo-nucleótidos	Secuencia (5' - 3')	Uso	Referencia
ITS1	TCCGTAGGTGAACCTGCGG	Amplificación región	(Esteve-Zarzoso et al., 1999)
ITS4	TCCTCGCTTATTGATATGC	ITS1-5.8S rDNA-ITS2	
NL-1	GCATATCAATAAGCGGAGGAAA AG	Amplificación del dominio D1/D2 26S rDNA	(Kurtzman y Robnett, 1998)
NL-4	GGTCCGTGTTTCAAGACGG		
delta 12	TCAACAATGGAATCCCAAC	Análisis interdelta	(Legras y Karst, 2003)
delta 21	CATCTTAACACCGTATATGA	cepas <i>S. cerevisiae</i>	
TdPIR3Fw	TCCTCCGTCGCCTCATCTAA	Análisis fingerprinting	(Canónico et al., 2015)
TdPIR3Rv	GGCACTGAGAACCAATGTGC	cepas <i>T. delbrueckii</i>	
STA1-SD-5A	CAACTACGACTTCTGTCATA	Amplificación gen	(Yamauchi et al., 1998)
STA1-SD-6B	GATGGTGACGCAATCACGA	STA1 (glucoamilasa)	

1.3. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento

Se usaron los siguientes medios de cultivo para levaduras: GPY (extracto de levadura 0.5 % (p/v), bactopectona 0.5 % (p/v), glucosa 4.0 % (p/v)), YPD (extracto de levadura 1.0 % (p/v), bactopectona 2.0 % (p/v), glucosa 2.0 % (p/v)), YPGF (extracto de levadura 1.0 % (p/v), bactopectona 2.0 % (p/v) glucosa 10 % (p/v), fructosa 10 % (p/v)), YPM (extracto de levadura 1.0 % (p/v), bactopectona 2.0 % (p/v), maltosa 2.0 % (p/v)), YNB w AS wo AA (*Yeast nitrogen base* con sulfato amónico y sin aminoácidos). Los cultivos en medios líquidos se incubaron a 30 °C, con agitación orbital (200 rpm); el crecimiento del cultivo se estimó midiendo su densidad óptica a 600 nm (DO_{600}). La concentración de biomasa en g/L se calculó previa elaboración de curvas patrón, en algunos casos el crecimiento fue medido mediante conteo del número de células/mL en cámara de Neubauer. Para los cultivos en medio sólido se añadió agar al 2 % antes de la esterilización.

Los experimentos realizados en los medios ricos GYP e YPD en condiciones estándar de laboratorio, se llevaron a cabo a partir de un precultivo (o/n) en el mismo medio con el que se inoculó el medio fresco a una DO_{600} de 0.1. Se

recogieron células cuando el cultivo alcanzó el final de la fase exponencial (DO_{600} 10-12). Para usos posteriores de la biomasa, las células se centrifugaron a 4000 rpm durante 2 min y se lavaron varias veces con agua destilada.

El cultivo de levaduras en medio melaza se realizó en matraces de 100 mL con un volumen de 25 mL de jarabe de melaza a una concentración de sacarosa de 6.1 % (p/v) suplementada con las siguientes soluciones: $(NH_4)_2SO_4$ 0.75 % (p/v), KH_2PO_4 0.35 % (p/v), $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.075 % (p/v), vitaminas (biotina 0.5 mg/L, pantotenato cálcico 1.0 mg/L e hidroclorehidrato de tiamina 1.0 mg/L). La melaza y las sales se autoclavarón por separado y las vitaminas se esterilizaron con filtros de 0.45 μ M. El pH del medio de crecimiento se ajustó a 4.5 con H_3PO_4 al 42 % (v/v) (Gamero-Sandemtrio et al., 2013). El medio melaza se inoculó con células provenientes de un precultivo de 24 h en YPD a una OD_{600} de 0.1. El crecimiento celular fue examinado después de 24 y 48 h a 30 °C al determinar la OD_{600} y las unidades formadoras de colonia (UFC) después de realizar diluciones seriadas.

Para llevar a cabo las fermentaciones en un medio natural similar al usado en la preparación de chichas ecuatorianas, se desarrolló y estandarizó una formulación denominada sustrato modelo tipo chicha (MCS) que se describe en el apartado de Resultados y discusión 2.1.1.1.

1.3.1. Condiciones industriales de producción de biomasa

La simulación de la producción industrial de levaduras se realizó en medio melaza según lo descrito por Pérez-Torrado et al. (2005). Se utilizó el jarabe de melaza a una concentración de sacarosa de 6.1 % (p/v) para el medio *batch* y 10 % (p/v) para el medio de alimentación (*fed-batch*), ambos suplementados y preparados como se ha indicado en el apartado anterior. El crecimiento se realizó en un biorreactor APPLIKON Biotechnology (USA) de 5.0 L de capacidad máxima. La agitación varió entre 300-500 rpm automáticamente para mantener la concentración de O_2 siempre superior al 20 %, determinada por un electrodo de oxígeno (Metler, España). La temperatura de crecimiento se mantuvo a 30 °C mediante una camisa de agua refrigerada, la variación de pH a lo largo del proceso fue medida con el electrodo de pH. El condensador se mantuvo a 4 °C con agua refrigerada. Se añadió antiespumante (antifoam 204, Sigma, USA) hasta una concentración final de 0.05 % (v/v). Se obtuvieron muestras a lo largo del proceso de producción.

Fase batch

Se inoculó 2.0 L de medio melaza con células frescas provenientes de un cultivo de 24 h en YPD a una concentración OD_{600} de 0.1. Se tomaron muestras a lo

largo del proceso y se midió viabilidad celular mediante recuento en placa, y concentraciones de etanol, azúcares reductores y sacarosa en el medio.

Fase fed-batch

A los 2.0 L de medio de cultivo en la fase de batch se añadieron con una velocidad de alimentación de 100 mg de sacarosa/min otros 2.0 L de solución de melaza. El pH se mantuvo constante a 4.5 añadiendo NaOH 1.0 M. Se administró un caudal de aire de 1 Kg/min. Se tomaron muestras a lo largo del proceso y se midió viabilidad celular mediante recuento en placa, y concentraciones de etanol, azúcares reductores y sacarosa en el medio.

2. Aislamiento de cepas de levaduras a partir de chichas ecuatorianas

Las levaduras ecuatorianas fueron aisladas de cuatro chichas elaboradas a partir de cuatro materias primas diferentes: arroz (que abreviaremos con sus siglas en inglés RC), avena (OC), uva (GC) y una mezcla de siete variedades de maíz llamada chicha del Yamor (YC). Ninguna de estas bebidas fue pasteurizada y ninguna de ellas tenía aditivos comerciales o preservantes (Tabla M.4).

Tabla M.4 Fórmula básica de preparación de las cuatro chichas ecuatorianas usadas en este trabajo.

Bebida	Materia prima principal	Otros ingredientes
Chicha de arroz (RC)	Arroz	Zumos de frutas (piña (<i>Ananas comosus</i>), maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>), naranjilla (<i>Solanum quitoense</i>)), panela (derivado de la caña de azúcar), canela, hierbas aromáticas
Chicha de avena (OC)	Avena	Zumo de piña, panela, canela, hierbas aromáticas
Chicha de uva (GC)	Uvas ecuatorianas	Panela, canela, hierbas aromáticas
Chicha del Yamor (YC)	Siete variedades de maíz	Maíz de jora (maíz malteado), maíz amarillo, maíz blanco, maíz negro, chulpi, morocho y canguil

Los sustratos para la elaboración de las 4 chichas fueron preparados mediante un proceso controlado. El proceso básico para la preparación de las bebidas RC y OC consistió inicialmente en la ebullición de una solución con 3 % de harina

(arroz /avena) por 30 min, una vez fría se añadió panela (12 %), zumos de fruta (10 %), hierbas aromáticas y especias y finalmente se llevó a cabo la fermentación por 14 días. La preparación de la bebida GC siguió el mismo proceso con excepción del proceso de ebullición ya que se utilizó como sustrato de fermentación el zumo fresco de uva. Para la elaboración de la chicha del Yamor o chicha de los siete granos (YC) los únicos ingredientes usados fueron las harinas de las siete variedades de maíz.

Se tomaron muestras de cada bebida en cuatro tiempos de fermentación distintos (días 0, 3, 7 y 14). Alícuotas de 1 mL de cada muestra fueron enriquecidas en medio GPY (0.5 % extracto de levadura, 0.5 % de peptona y 4 % de glucosa) a 30 °C por 24 h. Discos de papel filtro estériles fueron sumergidos en los cultivos, una vez secos (en condiciones de esterilidad), fueron colocados en sobres de papel aluminio estériles que posteriormente fueron almacenados a 4 °C, cada muestreo fue realizado en triplicado. Las muestras fueron transportadas desde Quito – Ecuador hasta Valencia – España.

Para aislar las distintas levaduras de las muestras secas enriquecidas, los discos de papel fueron colocados en 10 mL de medio GPY e incubados por 24 h a 30 °C. Se hicieron diluciones seriadas de las muestras y se tomaron alícuotas de cada dilución, se inocularon en placas de agar GPY con cloranfenicol (50 µg/L) para inhibir el crecimiento de bacterias, se incubaron a 30 °C por 48 h. Diez colonias de cada placa fueron escogidas al azar, el grupo de colonias que presentaban características morfológicas de levadura, por tinción simple con azul de metileno, fueron seleccionadas para la caracterización molecular. Los aislados fueron purificados por estría en placa y almacenados a -80 °C en medio GPY con glicerol 20 % (v/v).

3. Manipulación y análisis de ácidos nucleicos

3.1. Obtención de DNA total

Se siguió el protocolo para obtención de DNA total descrito por López et al., (2001), con algunas modificaciones, para el análisis de DNA mitocondrial. A partir de un precultivo de 5 mL en YPD (24 h), se recogieron células por centrifugación y se lavaron con agua estéril, luego fueron resuspendidas en 500 µL de una solución compuesta por sorbitol 1 M, EDTA 0.1 M, pH 7.5. Se añadió 30 µL de liticasa (Sigma) (1mg/mL) para levaduras del género *Saccharomyces* y 60 µL para levaduras no *Saccharomyces*. Se incubaron a 37 °C durante 1 h. Se centrifugó por 5 min a 7000 rpm y se resuspendió en 500 µL de una solución compuesta por Tris– HCl 50 mM, EDTA 20 mM pH 7.4, luego se añadió 13 µL de SDS 10 % y la mezcla fue incubada a 65 °C durante 5 min. Se añadió

inmediatamente 200 μ L de acetato potásico 5 M, pH 4.8 y se colocaron los tubos en hielo durante 10 min. Luego, fueron centrifugados a velocidad máxima a 4 °C durante 15 min. Los sobrenadantes fueron transferidos a un nuevo microtubo, y el DNA fue precipitado al añadir 1 volumen de isopropanol, incubándolo a temperatura ambiente por 10 min y centrifugándolo posteriormente a 12000 rpm 10 min. Se lavó el DNA con etanol 70 %, se secó por vacío y se disolvió en 20 μ L de agua estéril.

3.2. Obtención rápida de DNA genómico

Se utilizó el método de aislamiento de DNA genómico para el posterior análisis por PCR (Legras y Karst, 2003) con ligeras modificaciones. Se recogieron células a partir de un precultivo de 5 mL (24 h) en YPD. Las células se rompieron en 400 μ L de tampón de lisis (Triton X-100 2 % (p/v), SDS 1 % (p/v), NaCl 100 mM, Tris-HCl 10 mM pH 7.6, EDTA 1 mM) con 400 μ L de una mezcla fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y 600 μ L de perlas de vidrio. La rotura se realizó por agitación en un aparato FastPrep®-24 a 5.5 de intensidad, durante 30 segundos con 3 repeticiones. Tras centrifugar, se añadió 200 μ L de tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM), se volvió a centrifugar, se añadió 500 μ L de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico a la fase acuosa y luego se centrifugó. La fase acuosa se pasó a un nuevo tubo, los ácidos nucleicos se precipitaron con etanol, y finalmente se resuspendieron en tampón TE (Tris 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8.0).

3.3. Análisis de la región del DNA ribosomal

La identificación de los aislados de levaduras a nivel de especie fue realizada mediante PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2, como se describe en Esteve-Zaroso et al., (1999) con ligeras modificaciones. Para cada reacción se utilizó como molde una colonia procedente de un cultivo puro en placas de YPD (48 h), que se resuspendió en 3 μ L de NaOH 0.01 M, se congeló a -80 °C durante 45 s y luego fue calentada a 95 °C durante 10 min para provocar la lisis celular. Para la amplificación de esta región se utilizaron los oligonucleótidos ITS1 y ITS4. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador automático (Eppendorf AG 22331, Hamburgo, Alemania) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 5 min; 40 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 55.5 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 1 min 30 s; extensión final a 72 °C por 10 min; enfriamiento a 4 °C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis. Una vez hecha la comprobación de que el fragmento fue amplificado por electroforesis, estos fueron digeridos con 1 U de las endonucleasas *HaeIII*, *HinfI* y *CfoI* (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany), por separado, a 37 °C durante 2 h. Los fragmentos de restricción fueron

analizados en geles de agarosa según lo descrito en el apartado 3.3. Los resultados fueron comparados con la base de datos <https://www.yeast-id.org/>.

Una vez que los datos anteriores fueron procesados y se agrupó a todos los aislados por especie, se procedió a la secuenciación del dominio D1/D2 de la subunidad grande (26 S) del DNA ribosomal de, al menos, dos aislados de cada especie. El análisis se realizó de acuerdo con lo descrito por Kurtzman y Robnett (1998). Para la amplificación de los dominios D1/D2 se usaron los oligonucleótidos NL-1 y NL-4. Las reacciones fueron realizadas en las mismas condiciones usadas para la amplificación por PCR-RFLP de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2. Los productos de PCR fueron analizados en geles de agarosa (apartado 3.8). Se realizó además la purificación de los productos de PCR mediante el Kit de Purificación *mi*-PCR (Metabion, Alemania), siguiendo las instrucciones del fabricante, y las muestras fueron enviadas al Servei Central de Suport a la Investigació Experimental (SCSIE, Universitat de València, España) para su secuenciación por el método de Sanger. Las secuencias fueron ensambladas y comparadas con las secuencias del GenBank usando el algoritmo básico de la herramienta de búsqueda de alineación local (BLAST).

3.4. Análisis del DNA mitocondrial

El análisis del DNA mitocondrial a partir del DNA total fue realizado de acuerdo al protocolo descrito por López et al., (2001). Para la digestión se preparó una mezcla que contenía 2.5 μ L de tampón de restricción 10 X (Roche, Germany), 1 μ L of RNasa A (Thermo Fisher Scientific, USA), 1 μ L de *Hinfl* (Roche, Germany), y 20 μ L de DNA (aproximadamente 3500 ng). Las muestras fueron incubadas a 37 °C por 2 h. Los fragmentos de restricción fueron analizados en geles de agarosa según lo descrito en el apartado 3.8.

3.5. Análisis interdelta de los aislados de *S. cerevisiae*

Para la diferenciación de cepas entre los diferentes aislados de la especie *S. cerevisiae*, se llevaron a cabo amplificaciones por PCR a partir de DNA genómico como se describe en Legras y Karst, (2003). Los oligonucleótidos usados para la amplificación de elementos δ fueron delta 12 y delta 21. Las reacciones fueron realizadas en un termociclador automático (Eppendorf AG 22331, Hamburgo, Alemania) bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 95 °C por 4 min; 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 30 s, alineamiento a 46 °C por 30 s, extensión a 72 °C por 1 min 30 s; extensión final a 72 °C por 10 min; enfriamiento a 4 °C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis (apartado 3.8).

3.6. Análisis fingerprinting de los aislados de *T. delbrueckii*

Para la diferenciación de cepas entre los diferentes aislados de la especie *T. delbrueckii*, se llevaron a cabo amplificaciones por PCR a partir de DNA genómico como se describe en Canonico et al. (2015). Los oligonucleótidos usados para la amplificación de minisatélites fueron TdPIR3Fw y TdPIR3Rv. Las reacciones de amplificación fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 56.5 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2 min; extensión final a 72 °C por 7 min; enfriamiento a 4 °C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis (apartado 3.8).

3.7. Análisis de la presencia del gen *STA1*

Para detectar la presencia del gen *STA1*, se utilizaron los oligonucleótidos STA1-SD-5A y STA1-SD-6B. Las reacciones de PCR fueron realizadas bajo las siguientes condiciones: desnaturalización inicial a 94 °C por 5 min; 35 ciclos de desnaturalización a 94 °C por 1 min, alineamiento a 56 °C por 1 min, extensión a 72 °C por 2 min; extensión final a 72 °C por 7 min; enfriamiento a 4 °C. Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis (apartado 3.8).

3.8. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración variable (1-3 % (p/v)) según los tamaños a separar. Para la mayoría de ellos, los geles se prepararon en tampón TBE (Tris-HCl 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1.25 mM), que también fue utilizado como tampón de electroforesis a 100 V por 1 h. Para el análisis de los fragmentos de restricción de DNA mitocondrial, las muestras se cargaron en geles de agarosa al 1.5 % en tampón TAE 1 X (40 mM Tris-acetate, 1 mM EDTA, pH 8.0) a 100 V por aproximadamente 3 h. Todas las muestras se disolvieron en tampón de carga (azul de bromofenol 0.25 % (p/v), xilencianol 0.25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)).

3.9. Secuenciación del genoma de la cepa de *S. cerevisiae* EYS5

El análisis del genoma completo de la cepa EYS5 fue llevado a cabo por la empresa LifeSequencing S.L. Se recogieron células de un cultivo de 24 h en medio YPD, se extrajo el DNA de las muestras con el kit QIAamp DNA mini kit (Qiagen) y se midió su calidad y concentración mediante un Nanodrop. Luego se procedió a la síntesis de librerías de secuenciación con el kit NexteraXT Library Prep Kit de la casa Illumina para producir insertos de 500 pb aproximadamente. Una vez preparada la librería de secuenciación esta se cargó en la plataforma

MiSeq de la marca Illumina siguiendo un diseño *paired end* de 300x2. El análisis bioinformático fue llevado a cabo también por LifeSequencing S.L.

4. Análisis de la respuesta a estrés

El crecimiento de cada especie y cepa fue registrado y comparado con la cepa vínica de *S. cerevisiae* L2056 (Lallemand Inc, Canadá), utilizada como referencia. Inicialmente se hizo un análisis de respuesta a estrés con cepas seleccionadas de todas las especies cuya identificación se confirmó por secuenciación del dominio D1/D2 del 26 S rDNA. Las células fueron cultivadas en medio GPY a 30 °C por 24 h. Se realizaron 5 diluciones seriadas (1:4) de todos los cultivos con agua estéril. Para el análisis de tolerancia al estrés por temperatura, se realizaron goteos (5 µL) con las diferentes diluciones de cada cultivo en placas de GPY y el crecimiento fue examinado después de 24 h a 30 °C como referencia y a 37 °C para estrés por calor y a 12 °C durante 6 días para estrés por frío. Para el análisis de osmotolerancia y resistencia al estrés por etanol, se hicieron goteos de las mismas diluciones seriadas en placas de GPY que contenían KCl 1 M y diferentes porcentajes de etanol al 2, 5 y 10 %. El crecimiento celular fue examinado diariamente por tres días. Los experimentos se hicieron por triplicado.

Como segunda parte de este análisis, se evaluó en detalle la respuesta a estrés de las cepas identificadas de las especies *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Las levaduras cultivaron en medio YPD a 30 °C por 24 h. Se prepararon 7 diluciones seriadas de los cultivos (1×10^{-2} , 5×10^{-3} , 2.5×10^{-3} , 1.25×10^{-3} , 6.25×10^{-4} , 3.125×10^{-4} , 1.56×10^{-4}) y se realizaron goteos (5 µL) en placas para probar la resistencia al estrés osmótico (sorbitol 0.9 y 1.5 M), estrés iónico (NaCl 0.7 y 1.2 M), estrés oxidativo (H₂O₂ 2.5, 3.5 y 5 mM) y estrés por etanol (5, 10, 12% v/v) en medio YPD/GPY. El crecimiento celular fue examinado diariamente durante tres días. Los experimentos se hicieron en triplicado.

4.1. Análisis de la tolerancia a la deshidratación

La biomasa obtenida a las 24 h proveniente de un cultivo de 100 mL en medio melaza (en matraces de 500 mL), fue separada del medio mediante centrifugación y se realizaron varios lavados con agua destilada estéril. La biomasa concentrada (aproximadamente 2 – 3 g) fue inicialmente colocada en discos de papel de filtro estériles de 6 cm de diámetro para eliminar el exceso de agua e inmediatamente se colocó en una jeringuilla estéril de 10 mL para introducir finos filamentos de la misma en un secador de lecho fluidizado (Tornado Model 501, Sherwood Ltd, UK). Se deshidrató con un flujo de aire de 2.5 m³/min a una temperatura de 37 °C. Para cada cepa se evaluó el tiempo de secado hasta alcanzar el 10 % de humedad. Para la rehidratación, se usó agua

destilada para resuspender la biomasa seca a 37 °C durante 10 min bajo condiciones estáticas, seguido de 10 min de agitación a 120 rpm (Gamero-Sandemetro et al., 2014).

Para determinar la viabilidad celular después de la deshidratación se contaron las unidades formadoras de colonias (UFC) después de 24h a 30 °C obtenidas tras rehidratar a una $DO_{600}=0.001$, y se calculó el porcentaje de supervivencia tomando como 100% de supervivencia el número de UFC obtenido a partir de un cultivo fresco de la misma cepa a la misma DO. Los experimentos se realizaron en triplicado.

5. Determinación de actividades enzimáticas

5.1. Actividad amilasa

Para seleccionar las levaduras productoras de amilasa se usaron dos medios sólidos con diferentes concentraciones de almidón. El medio de actividad amilasa (AAM) que contiene almidón soluble 5 g/L, peptona 5 g/L, extracto de levadura 5g/L, $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.5 g/L, $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0.01 g/L, NaCl 0.01 g/L, agar 15 g/L, pH 5 (Yalcin y Corbaci, 2013) y el medio YPS que contiene extracto de levadura 1 % (w/v), peptona 2 % (w/v), histidina 0.002 % (w/v) y almidón 1 % (w/v), pH 5.2 (Ülgen et al., 2002). Después de 3 días de crecimiento a 30 °C, se realizó una tinción de las placas con vapores de yodo (durante 3 min) y se seleccionaron las colonias que mostraron un halo amilolítico blanco.

Para comprobar la posible actividad glucoamilasa de las cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas se realizó el test en placas de medio sólido con almidón (almidón 15 g/L, YNB (yeast nitrogen base) 6.78 g/L, agar 15 g/L, pH 5.2) descrito por (Meier-Dörnberg et al., 2018). Se centrifugó a 3000 rpm por 5 min una suspensión de 10 mL de cultivo provenientes de un precultivo de 24 h en YPD. Se lavó el sedimento dos veces con solución salina estéril y centrifugación, y las células fueron resuspendidas en 5 mL de la misma solución salina estéril y almacenadas por 24 h. Se ajustó a una concentración final de 5×10^6 células/mL y se sembró en placas que contenían almidón 15 g/L con y sin azul de bromofenol 40 mg/L. Las placas fueron incubadas a temperatura ambiente (aproximadamente 25 °C) en condiciones aeróbicas y anaeróbicas por un periodo de 37 días. Si el pH cambia de 5.2 a 4.6 - 3.0, el color del medio cambia de azul / violeta a amarillo como resultado de los metabolitos celulares.

5.2. Actividad invertasa

La actividad invertasa de las cepas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* fue medida de acuerdo con lo descrito por Harkness y Arnason (2014). Se prepararon

cultivos celulares en crecimiento logarítmico inicial (OD_{600} 0.2 – 0.3) en YPD (glucosa 2%). Una vez que el cultivo alcanzó la OD requerida, se recogieron 10^6 células para evaluar la actividad invertasa en represión. Las células restantes fueron lavadas y resuspendidas a una OD_{600} de 0.2 – 0.3 en YPD con glucosa 0.05 % e incubadas a 30 °C por 2 h. Pasado ese tiempo, se recogieron 10^6 células para evaluar la actividad invertasa en condiciones de desrepresión; la actividad invertasa en glucosa 2 % fue considerada actividad a tiempo cero. Cada alícuota de 10^6 células fue lavada dos veces con 200 μ L de azida de sodio 10mM estéril, y los sedimentos celulares fueron dejados en hielo hasta su ensayo.

Se prepararon los tres controles descritos a continuación.

- Células sin sacarosa: sedimento celular + 50 μ L acetato sódico 50 mM pH 5.1 + 12.5 μ L H_2O .
- Solo sacarosa: 12.5 μ L sacarosa 0.5 M + 50 μ L acetato sódico 50 mM pH 5.1.
- Glucosa 250 μ M: 25 μ L glucosa 1 mM + 37.5 μ L H_2O .

Para empezar la reacción, todas las muestras fueron resuspendidas en 50 μ L de acetato de sodio 50 mM pH 5.1. Tanto las muestras como los controles una vez añadida la sacarosa (o agua en su caso), inmediatamente fueron incubados a 37 °C. Después de 10 min, las reacciones fueron detenidas añadiendo 75 μ L de K_2HPO_4 0.2 M y las muestras fueron colocadas en hielo durante 1 min, colocadas en ebullición por 3 min y luego nuevamente en hielo 1 min. La liberación de glucosa fue determinada mediante el experimento glucosa/oxidasa (apartado 7.3.1.2). El control a de cada muestra se utilizó como blanco mientras que la DO_{540} del control b fue restada para descontar la hidrólisis no enzimática. La actividad invertasa se expresó como μ M de glucosa/min/ 10^6 células mediante el cálculo con las siguientes fórmulas.

Cálculo de la cantidad de glucosa convertida (μ M glucosa).

$$\mu M \text{ de glucosa} = \frac{DO_{540} \text{ muestra}}{DO_{540} \text{ control C (250}\mu M \text{ glucosa)}} * 250$$

Cálculo de actividad invertasa (10^6 células cantidad de inóculo inicial).

$$\text{actividad invertasa} = \frac{\mu M \text{ de glucosa}}{\text{tiempo de reacción (10min)}}$$

6. Determinación de parámetros relacionados con el potencial fermentativo

6.1. Capacidad fermentativa

La capacidad fermentativa de cepas seleccionadas fue medida en un medio rico en azúcares fermentables, según lo descrito por Gamero-Sandemetro et al. (2014). Células frescas provenientes de un cultivo de 24 h en YPD fueron inoculadas a una concentración de 10^7 células/mL en 100 mL de medio YPGF. Los cultivos fueron colocados en un baño de agua a 30 °C con agitación a 65 rpm. La producción de CO₂ fue medida en intervalos de 10 min por 6 h en un sistema de medida de producción de Gas Ankom Technology (Macedon, New York, USA). La capacidad fermentativa fue expresada como mL de CO₂ producidos por 10^7 células. Los experimentos se realizaron por triplicado.

6.2. Crecimiento a baja temperatura

El crecimiento a baja temperatura (12 °C) de cepas seleccionadas se determinó según lo descrito por Gibson et al., (2013). Se prepararon precultivos de las cepas seleccionadas en matraces de 100 mL que contenían 20 mL de YPD o YPM a una DO₆₀₀ de 0.1. Después de 24 h, fueron inoculados a la misma DO en 100 mL del mismo medio (en matraces de 250 mL) e incubados a 12 °C con agitación (120 rpm). Se midió la densidad óptica (OD₆₀₀) de estos cultivos durante el periodo de incubación además de la biomasa fresca y seca al final del experimento. Los experimentos se hicieron por triplicado.

6.3. Floculación y producción de compuestos fenólicos

La floculación de cepas seleccionadas se evaluó usando el método de Helm (Helm et al., 1953) con modificaciones, como se describe en Krogerus et al. (2015). Se recogieron células procedentes de precultivos de 24 h en YPD e YPM, se lavaron dos veces con EDTA 0.5 M (pH 7) para disgregar los agregados celulares y luego se diluyó a una DO₆₀₀ de 0.4. Se analizó la floculación primero lavando los sedimentos con una solución de CaCl₂ 4 mM y resuspendiendo en 1 mL de la solución de floculación que contenía CaCl₂ 4 mM, acetato de sodio 6.8 g/L, ácido acético 4.05 g/L, y etanol 4 % (v/v) (pH 4.5). Se hicieron controles con muestras de células resuspendidas en EDTA 0.5 M (pH 7). Después del periodo de sedimentación de 10 min, se tomaron muestras (200 µL) justo bajo el menisco y se colocó en una solución de EDTA 10 mM (800 µL). Se midió la DO₆₀₀, el porcentaje de floculación fue calculado al tomar como 100 % el valor de DO de cada control y calcular el porcentaje correspondiente a la diferencia en DO entre los tubos control y de floculación.

La producción de compuestos fenólicos (*phenolic off-flavors, POF*) de cepas seleccionadas, se determinó cualitativamente mediante un análisis sensorial (percepción del olor) de los cultivos después de la incubación en presencia de ácido ferúlico. Las cepas procedentes de placas de YPD fueron inoculadas en crioviales que contenían medio YPD suplementado con 0.02% (p/v) de ácido ferúlico. Después de tres días de incubación a temperatura ambiente los tubos fueron evaluados mediante percepción del olor para detectar un aroma a clavo de olor. Los experimentos se hicieron por triplicado.

6.4. Asimilación de azúcares

La capacidad de asimilación de diferentes tipos de azúcares en levaduras seleccionadas se analizó de acuerdo a lo descrito por Gibson et al., (2013). Precultivos en matraces de 100 mL con un volumen final de 20 mL de YPD, se incubaron a 20 °C y 120 rpm, durante 48 h. Se recogieron y lavaron las células y se prepararon microcultivos en placas multipocillo (96) colocando en cada pocillo 30 µl de medio YNB 0.67 % suplementado con 1 % de cada azúcar (maltosa, maltotriosa, glucosa, sucrosa, melibiosa, fructosa, celobiosa y rafinosa), que fueron inoculados a OD₆₀₀ de 0.1, incubados a 25 °C con agitación continua. La dinámica de crecimiento fue monitorizada con un incubador Bioscreen C MBR, Finland y un lector de placas Oy Growth Curves Ab, Finland.

7. Fermentaciones

Las fermentaciones iniciales a escala de laboratorio (30 mL) se realizaron en el I2SysBio (Valencia – España) en el sustrato de chicha modelo (MCS) descrito en el apartado 1.3.1, mientras que las posteriores fermentaciones también a escala de laboratorio (100 mL) y a escala de planta piloto (1.5 L) se realizaron en el VTT Technical Research Centre of Finland (Espoo – Finlandia) en dos sustratos: MCS y en mosto de cerveza de 15 °P (*brewer's all-malt wort*) preparado con agua de la ciudad de Espoo en el VTT, recogidos mientras estaban calientes (>90 °C) y almacenados a 0 °C hasta su uso.

7.1. Fermentaciones a escala de laboratorio

7.1.1. Iniciales en volumen final 30 mL en MCS

Se prepararon precultivos líquidos en YPD procedentes de colonias aisladas y cultivados durante 48 h. Las fermentaciones se llevaron a cabo en 30 mL de MCS inoculado con 10⁶ células/mL, a 24 °C en agitación muy suave (50 rpm) en tubos cónicos de centrifuga desechables de 30 mL. El crecimiento del cultivo se siguió mediante el recuento de células viables en placas de YPD, tras efectuar la correspondiente dilución en agua con el fin de sembrar entre 200 y 500 colonias

por placa. Los experimentos se realizaron por triplicado. Con todas las muestras se analizó los parámetros de fermentación (ver más adelante, apartado 7.3.1).

7.1.2. Volumen final 100 mL en MCS y mosto de cerveza

7.1.2.1. Preparación de inóculos

El inóculo fue preparado según lo descrito por Nikulin et al (2018). Levaduras procedentes de colonias en placas (48 h) fueron inoculadas en 25 mL de medio líquido YPD en matraces de 100 mL. Los precultivos fueron incubados durante la noche a 20 °C con agitación (120 rpm) y luego fueron transferidos a 500 mL de medio YPD a una OD₆₀₀ de 0.1. Estos cultivos fueron incubados a 20 °C con agitación durante 48 h. Se recolectaron las levaduras y se prepararon concentrados de levaduras (*yeast slurries*) al 20 % (w/w). Se inocularon 2.25×10^7 células/mL de sustrato (cerveza o MCS) para las fermentaciones a 12 °C y 1.5×10^7 células/mL para fermentaciones a 20 °C.

7.1.2.3. Fermentaciones con cultivos puros

Las fermentaciones a escala de laboratorio fueron realizadas en matraces de 250 mL con un volumen final de 100 mL cerrados con tapones de caucho y trampas de aire llenas de glicerol, a dos temperaturas diferentes (12 °C y 20 °C), sin agitación. Se inoculó cada matraz de fermentación con los concentrados de levaduras mencionados anteriormente. El tiempo de fermentación fue variable en función de cada especie y cepa. La pérdida de peso fue medida diariamente para determinar la cinética de fermentación. Al inicio y final del experimento se tomaron muestras en frío (4 °C) para realizar el análisis de parámetros de fermentación (Apartados 7.3.2.1 y 7.3.2.2) y para el análisis de aromas (7.3.2.3). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

7.1.2.4. Fermentaciones mixtas

Se realizaron fermentaciones mixtas a escala de laboratorio (100 mL) con dos cepas seleccionadas EYS5 y EGT2 en los dos sustratos, a 20 °C, en estático. Se evaluaron dos tipos de estrategias de inoculación, secuencial y por coinoculación. La concentración final (másica) de cada especie en los dos casos fue 1:15 (*S. cerevisiae* : *T. delbrueckii*) siendo la concentración total de microorganismos 1.5×10^7 células/mL. Para la inoculación secuencial inicialmente solo se inoculó *T. delbrueckii* y a las 24 h se inoculó *S. cerevisiae*. Para las coinoculaciones las dos especies fueron colocadas al inicio de la fermentación. Al inicio y final del experimento se tomaron muestras en frío para realizar el análisis de parámetros de fermentación (Apartados 7.3.2.1 y 7.3.2.2) y para el análisis de aromas (7.3.2.3). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.

7.2. Fermentaciones a escala piloto 1.5 L

Para imitar las fermentaciones de cerveza a escala industrial se realizaron fermentaciones estáticas (con 1.5 L de sustrato) en recipientes de fermentación cilíndricos de acero inoxidable de 2 L (Figura M.1) a 20 °C con los dos sustratos (15 °P *all-malt wort* y MCS) según lo descrito por Gibson et al., (2013). Para la preparación del inóculo se siguió el mismo proceso detallado en el apartado 7.1.2.1. Las fermentaciones experimentales fueron llevadas a cabo hasta que no se observó ningún cambio en el extracto residual durante 24 h. Las muestras del mosto fueron tomadas regularmente de los recipientes de fermentación de forma aséptica y fueron colocadas directamente en hielo, luego las levaduras fueron separadas del mosto fermentado mediante centrifugación (7000 rpm, 10 min, 1 °C). En cada muestreo se determinó las densidades del mosto, contenido de alcohol, pH, concentraciones de azúcares, masa fresca y seca. Al inicio y final del experimento se tomaron muestras en frío para realizar el análisis de parámetros de fermentación (Apartados 7.3.2.1 y 7.3.2.2) y para el análisis de aromas (Apartado 7.3.2.3). Todos los experimentos se realizaron por duplicado.



Figura M.1 Recipientes de fermentación cilíndricos de acero inoxidable de 2 L donde se llevaron a cabo las fermentaciones a escala piloto (1.5 L).

7.3. Análisis de parámetros de fermentación

7.3.1. Determinación de azúcares reductores

Para determinar la concentración de azúcares reductores se siguió la metodología descrita por Robyt y Whelan (1972). Se realizaron diluciones sucesivas de las muestras en un volumen final de 100 μL y se añadieron 100 μL de reactivo DNS (ácido 3.5-dinitrosalicílico 1.0 % (p/v), NaOH 1.6 % (p/v), tartrato doble sódico-potásico 30 % (p/v)). Se llevaron las muestras a ebullición, luego a hielo, se añadió 1 mL de agua y finalmente se midió la absorbancia a 540 nm. Se realizó una recta patrón con concentraciones de glucosa entre 0 y 2 g/L. La concentración de azúcares reductores se calculó por interpolación en la recta patrón.

7.3.2. Determinación de glucosa por el método enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa

Se prepararon diluciones de las muestras de glucosa a valorar, se tomó un volumen de 100 μL y se añadieron 400 μL de reactivo GOX/P (glucosa oxidasa 7.8 U, peroxidasa 0.4 U, o-dianisidina 0.9 mM, en tampón fosfato potásico 100 mM pH 7.0). La reacción se llevó a cabo a 30 °C durante 15 min, y se detuvo la reacción por adición de 500 μL de HCl 6.0 N. Se realizó para cada ensayo una recta patrón con cantidades de glucosa entre 0 y 10 μg . Se midió la absorbancia a 540 nm, y la cantidad de glucosa presente en cada muestra se calculó por interpolación en la recta patrón.

7.3.3. Determinación de sacarosa

Se realizaron diluciones de las muestras problema en agua y se mezclaron con tampón acetato sódico 50 mM pH 5.0, invertasa 2.5 U (Sigma, USA) en un volumen final de 200 μL . Se prepararon muestras para la recta patrón con concentraciones de sacarosa entre 0 y 0.875 mg/mL. Se incubaron 10 min a 30 °C, se añadieron 100 μL de K_2HPO_4 0.4 M y se hirvió la mezcla 3 min para detener la reacción. Parte de la muestra se utilizó para valorar glucosa mediante el ensayo enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa (apartado 7.3.1.2). La concentración de sacarosa presente en cada muestra se calculó interpolando en la recta patrón a partir de su absorbancia a 540 nm.

7.3.4. Determinación de etanol

La cuantificación enzimática de etanol se realizó mediante la detección espectrofotométrica a 340 nm del NADH formado durante la oxidación del etanol a acetaldehído por acción del enzima alcohol deshidrogenasa. El ensayo se realizó en tampón glicina 0.2 M – Tris 0.3 M (pH 9.7), con NAD^+ 2 mM y alcohol deshidrogenasa de levadura 20 U/mL, en un volumen final de 1 mL al cual se

añaden 200 μL de muestra (dilución adecuada) o de una muestra de la recta patrón de etanol (0 – 0.9 mM). Se midió la absorbancia a 340 nm tras 15 min de incubación y se interpoló en la recta patrón.

7.3.5. Análisis de viabilidad y rendimiento en biomasa

La viabilidad fue medida con el equipo NucleoCounter YC-100™ (Chemometec, Denmark) que detecta señales del yoduro de propidio unido al DNA. Se usó para cada lectura un nucleocassette (dispositivo de muestreo desechable recubierto internamente con yoduro de propidio (PI), que tiñe los núcleos de las células) de la misma casa comercial (carga aproximada de 50 μl de muestra). Se realizaron diluciones sucesivas de las muestras y se determinó el número de células muertas. Luego se colocó para cada dilución de la muestra una cantidad suficiente de tampón de lisis y se determinó el número total de células presentes en la muestra. Finalmente se calculó el número de viables.

Para determinar la masa fresca y seca, las muestras fueron centrifugadas (9000 rpm, 4 °C por 10 min para muestras de cerveza y por 20 min para muestras de chicha), se realizó dos lavados con agua destilada y se usaron los sedimentos. Para determinar la masa fresca se tomó en cuenta los pesos de la muestra y del sedimento mientras que para determinar la masa seca se secaron los pellets a 105 °C en cápsulas de porcelana durante 24 h, se pesaron y se calculó el valor final en función del peso seco de la cápsula sola y de la cápsula con el sedimento.

7.3.6. Análisis de parámetros de fermentación

El análisis de parámetros relevantes para las fermentaciones a escala 100 mL y 1.5 L fue realizado de acuerdo a lo descrito por Krogerus et al., (2018).

La densidad del mosto, contenido de alcohol, pH y concentraciones de azúcares, fueron determinados usando un equipo automatizado que consta de un densímetro Anton Paar DMA 5000 M, el módulo de medida Alcoalyzer Beer ME, el módulo de pH y el cambiador de muestras Xsample 122 (Anton Paar GmbH, Austria).

Las concentraciones de azúcares fermentables (maltosa, maltotriosa, glucosa y fructosa) fueron medidos mediante HPLC usando un módulo de separación 2695 y un módulo de cromatografía líquida (System Interphase) acoplado con el refractómetro diferencial 2414 (Waters Co., Milford, MA, USA). Una columna (100 \times 7.8 mm, Phenomenex, USA) Rezex RFQ-Fast Acid H+ (8 %) LC fue equilibrada con 5 mM H_2SO_4 (Titrisol, Merck, Germany) en agua a 80 °C y las muestras fueron eluidas con H_2SO_4 5 mM en agua a una tasa de flujo de 0.8 mL/min.

7.3.7. Análisis de compuestos aromáticos

Los alcoholes superiores y ésteres producidos por las levaduras fueron determinados por cromatografía de gases (*headspace gas chromatography*) con un detector de ionización de llama (HS-GC-FID). Las muestras (4 mL) fueron filtradas (0.45 μm), incubadas a 60 °C por 30 min y luego 1 mL de la fase gaseosa fue introducido (modo dividido; 225 °C; flujo dividido de 30 mL/min) en un cromatógrafo de gas equipado con un detector FID y un muestreador automático (*headspace autosampler*) (Agilent 7890 Series; Palo Alto, CA, USA). Los analitos fueron separados en una columna capilar HP-5 (columna 50m \times 320 μm \times 1.05 μm , Agilent, USA). El gas portador fue helio (flujo constante de 1.4 485 mL/min). El programa de temperatura fue 50 °C durante 3 min, 10 °C/min a 100 °C, 5 °C/min a 140 °C, 15 °C/min a 260 °C y luego isotérmico 1 min. Los compuestos fueron identificados por comparación con estándares y fueron cuantificados usando curvas estándares. El 1-butanol fue usado como estándar interno.

8. Análisis de parámetros redox celulares

8.1. Cuantificación de glutatión

Para la determinación de glutatión se utilizó el método colorimétrico basado en su reacción con el ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB), descrito por Tietze (1969) y Griffith (1980) con algunas modificaciones. Se recogieron 100 mg de células y se resuspendieron en 1 mL de HCl 8 mM y ácido 5-sulfosalicílico 1.3 % (p/v) a 4 °C. Las células se rompieron con 0.6 g de perlas de vidrio en un aparato FastPrep®-24 a 5.5 de intensidad, durante 30 segundos con 3 repeticiones. Tras la rotura se mantuvieron en hielo 15 min más y finalmente se recuperó el sobrenadante mediante una centrifugación de 15 min a 4 °C y 13000 rpm.

La valoración de glutatión total se realizó mezclando 200 μL de muestra con 120 μL de cóctel enzimático que contenía NADP 0.4 mg/mL (Sigma, USA), glucosa-6-fosfato 0.16 mg/mL (Sigma, USA), glucosa-6-fosfato deshidrogenasa 3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (Sigma, USA), glutatión reductasa 1 mU (Sigma), MES 0.2 M y EDTA 2 mM disueltos en tampón fosfato sódico 0.1 M pH 6.0. Se añadieron 480 μL de ditiotrisnitrobenzoico (DTNB) 200 μM , se incubó 20 min en agitación y oscuridad y se midió la absorbancia a 412 nm. Para la valoración de glutatión oxidado (GSSG), los 200 μL de muestra se incubaron previamente (1 h) con 4 μL de una solución de 2-vinilpiridina 1 M (Sigma) que acompleja el glutatión en su forma reducida impidiendo su reacción con el DTNB. Para cada ensayo se realizó una recta patrón con glutatión desde 0 hasta 16 μM que fue procesada de la misma forma que los sobrenadantes obtenidos. Las muestras de la recta patrón fueron sometidas a los mismos tratamientos que las muestras. La cantidad de glutatión

reducido (GSH) se calculó por diferencia entre el glutatión total y el glutatión oxidado. Los resultados se expresaron en nmoles de glutatión por mg de células.

8.2. Cuantificación de la peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos se determinó mediante el ensayo colorimétrico de medida de malondialdehído (MDA) descrito por Buege y Aust (1978) con algunas modificaciones, que se basa en la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído producto de la rotura de los ácidos grasos poliinsaturados. Se preparó el extracto celular a partir de 50 mg de células, tampón fosfato sódico 50 mM pH 6.0 y ácido tricloroacético 10 % (v/v). Las células se rompieron con 0.3 g de perlas de vidrio, en un aparato FastPrep®-24 a 5.5 de intensidad, durante 30 segundos con 3 repeticiones. Se centrifugó y se recogió el sobrenadante. Se mezcló 300 µL de extracto con 700 µL de la mezcla de reacción (ácido tiobarbitúrico 1 % (p/v) y ácido tricloroacético 15 %). Esta mezcla se incubó 30 min a 100 °C, se dejó enfriar en hielo durante 5 min y se centrifugó para eliminar los posibles precipitados. Para cada ensayo se realizó una recta patrón con MDA desde 0 hasta 30 mM que fue procesada de la misma forma que los sobrenadantes obtenidos. La reacción del ácido tiobarbitúrico con las moléculas de MDA generan especies rojas detectables a 535 nm, se midió la absorbancia y los resultados se expresaron en pmoles de MDA por mg de células.

8.3. Cuantificación de trehalosa

Los extractos celulares para la cuantificación de trehalosa se obtuvieron siguiendo el protocolo descrito por Parrou y François (1997) con algunas modificaciones. La preparación del extracto celular consistió en suspender 100 mg de células en 0.25 mL de Na₂CO₃ 250 mM, incubar a 95 °C durante 4 h, añadir 0.15 mL de ácido acético 1 M y 0.6 mL de acetato sódico 0.2 M pH 5.2. Luego se centrifugó y se recogió el sobrenadante. Se separaron las muestras en dos alícuotas (blanco de 150 µL (extracto sin trehalosa comercial), a las muestras problema se añadió 8.4 mU de trehalasa (Sigma)), se incubó a 37 °C durante 12-16 h con agitación, se llevó a ebullición por 5 min y luego se centrifugó. Se prepararon diluciones de las muestras del experimento, y se determinó la concentración de glucosa mediante el ensayo enzimático glucosa/oxidasa/peroxidasa. Para cada ensayo, se realizó una recta patrón de glucosa entre 0 y 10 µg que fue procesada de la misma forma que los sobrenadantes obtenidos (Apartado 7.3.1.2). Se determinó la cantidad de glucosa intracelular y luego se calculó la cantidad de trehalosa intracelular al dividir ese valor para 2 (la trehalosa es un disacárido formado por dos glucosas), finalmente se expresó este valor en µg de trehalosa por mg de células.

9. Análisis estadístico

En todos los resultados de carácter cuantitativo en los que se muestra un análisis estadístico de los datos, la significatividad estadística se obtuvo mediante un análisis de varianza ANOVA, la comparación entre medias se realizó mediante test de Tukey. Se ha considerado significativo aquellos valores con un valor de p (p-value) menor o igual a 0.05, que corresponde con un intervalo de confianza del 95 %.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1. Identificación y caracterización de levaduras de la microbiota natural presente en chichas ecuatorianas

Existen escasos estudios sobre microorganismos procedentes de chichas y su aplicación en fermentaciones controladas de estas bebidas o en otro tipo de fermentaciones alcohólicas, y la mayoría de ellos se enfoca en el análisis de su biodiversidad microbiológica (Piló et al., 2018; Mendoza et al., 2017; Elizaquível et al., 2015), sin centrarse en su utilidad tecnológica. Es por ello que, como objetivo inicial de nuestro trabajo, se estableció el aislamiento, identificación y caracterización de levaduras presentes en la microbiota natural involucrada en la fermentación espontánea de las chichas ecuatorianas, con la meta de explotar esta diversidad para seleccionar nuevos microorganismos por sus beneficios potenciales e idoneidad para ser usados como iniciadores puros para fermentaciones alcohólicas en la industria alimentaria.

1.1. Biodiversidad de levaduras

La elaboración artesanal y no estandarizada de la mayoría de las chichas ecuatorianas es una de las principales razones por las que la calidad microbiológica y sensorial de las mismas es altamente variable y muchas veces inadecuada. Se ha comprobado que muchas de ellas poseen de forma natural una población bacteriana dominante del género *Lactobacillus* y *Streptococcus* (Freire et al., 2017), pero en algunos casos, existe una importante contaminación de enterobacterias (Pazmiño et al., 2014). Es por ello que se decidió preparar los cuatro tipos de chichas objeto de este estudio, arroz, avena, uva y Yamor, bajo condiciones vigiladas de fermentación. Las cuatro bebidas fueron preparadas en Quito – Ecuador con ingredientes adquiridos en mercados de la ciudad y las fermentaciones fueron llevadas a cabo en matraces estériles de vidrio con trampas de aire (Figura R1.1). Nuestro estudio buscó el aislar levaduras presentes en la fermentación espontánea de los ingredientes y evitar la presencia de alterantes y contaminantes.



Figura R1.1 Fermentación controlada de cuatro chichas ecuatorianas: chicha de uva (A), chicha del Yamor (B), chicha de avena (C) y chicha de arroz (D) (día 3 de fermentación).

Para el aislamiento de levaduras de las muestras obtenidas desde Ecuador, se usaron técnicas microbiológicas tradicionales basadas en el uso de medios selectivos y técnicas de tinción simple hasta obtener cultivos puros. Aunque en nuestro trabajo no se investigó las poblaciones bacterianas en estas bebidas, es necesario mencionar que durante el aislamiento se pudo notar una presencia general e importante de bacterias, especialmente en la Chicha del Yamor (YC). Estudios similares en chichas ecuatorianas elaboradas a partir de maíz o yuca (*Manihot esculenta*) han demostrado que las bacterias ácido lácticas son muy abundantes en estos sustratos (Cox et al., 1987; Freire et al., 2016), lo que concuerda con lo descrito anteriormente en la YC elaborada a partir de siete variedades de maíz.

Se decidió mantener la fermentación hasta 14 días ya que las chichas en Ecuador suelen ser preparadas con este tiempo de fermentación, especialmente aquellas elaboradas con cereales. Se aislaron más de 300 colonias de levadura y finalmente se obtuvieron un total de 254 aislados de levaduras cultivables a partir de las cuatro chichas a 3, 7 y 14 días de fermentación, como se describe en Materiales y Métodos. En las chichas de avena y uva la mayoría de levaduras aisladas procedían del inicio de la fermentación (3 días), y no se pudieron obtener aislados del día 14 (Figura R1.2). Al contrario, la mayoría de aislados de las chichas de arroz y Yamor fueron obtenidos en los tiempos de fermentación más tardíos. En la chicha del Yamor no se obtuvieron aislados de levaduras en los tiempos iniciales de fermentación mientras que la chicha de arroz, fue la única en la que se pudieron obtener aislados en los tres tiempos de fermentación.

Es importante mencionar que debido a que se esperaba tener un gran número de aislados del género *Saccharomyces* y *Torulaspota*, se realizó un segundo aislamiento en chicha de uva sabiendo que este podría ser un sustrato rico en estas especies, por ello se tiene un mayor número de aislados de levaduras de esta chicha.

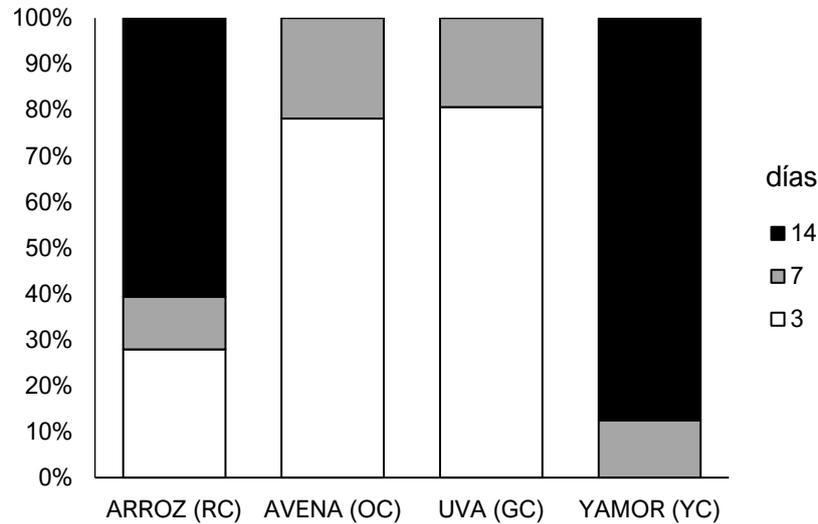


Figura R1.2 Abundancia relativa de los aislados de levaduras en los tres tiempos de muestreo (días 3, 7 y 14) en cuatro chichas diferentes (RC, GC, OC y YC).

La chicha está lista para su consumo cuando su sabor dulce desaparece y adquiere un aroma más fuerte, el tiempo de fermentación es variable pero generalmente a partir del día 7 suele avinagrarse (Faria-Oliveira et al., 2015). Posiblemente en las bebidas OC y GC la imposibilidad de obtener aislados cultivables de levaduras pueda atribuirse a este motivo y a la presencia masiva de bacterias aerobias.

Inicialmente todos los aislados fueron agrupados por el análisis por PCR-RFLP de la región ITS-5.8S rDNA (Figura R1.3). Basados en la comparación de nuestros resultados con la base de datos Yeast.ID, encontramos un total de 23 perfiles de restricción diferentes, dos de ellos correspondientes a patrones desconocidos (1 y 10) (Tabla R1.1).

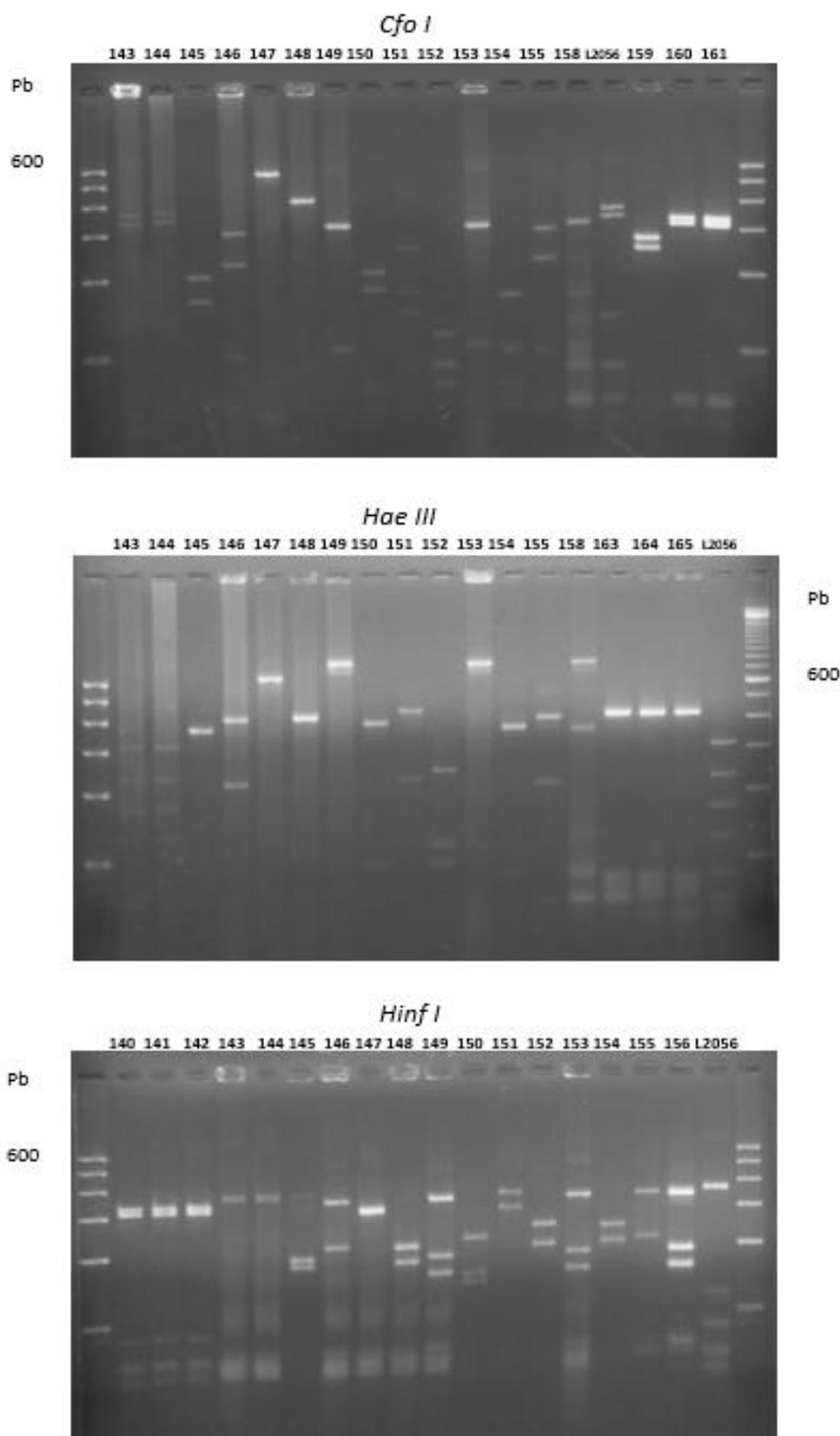


Figura R1.3 Análisis de restricción de la región ITS-5.8S rDNA de varios aislados de levaduras a partir de chichas ecuatorianas obtenidos con tres enzimas de restricción: *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*.

Tabla R1.1 Perfil de fragmentos de restricción de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 con varias enzimas de restricción de aislados de levaduras de cuatro chichas ecuatorianas.

Patrón de restricción	Número de aislados	Producto amplificado (pb)	Fragmentos de restricción (pb)		
			<i>CfoI</i>	<i>HaeIII</i>	<i>HinI</i>
1	1	700	160+190+290	450	300+340
2	1	500	180+220	410	170+185+250
3	7	620	300	420	320+315
4	1	630	590	630	320
5	1	450	410	420	190+230
6	1	600	250+305	110+420	270+290
7	8	700	300+305	420	320+310
8	1	600	650	610	280+350
9	37	780	330	780	160+200+360
10	8	750	110+320	760	190+230+350
11	1	650	330+350	540	340+360
12	67	760	320	760	170+200+350
13	23	760	320	760	170+200+350
14	1	750	180+320	750	250+350
15	1	450	100+150	90+130+250	200+250
16	8	450	70+110+170	80+380	210+240
17	1	700	250+320	210+430	210+240
18	1	625	220+300	210+410	220+350
19	23	850	365+375	150+180+230+320	140+370
20	1	700	330+350	500	300+380
21	13	650	300	90+430	310+320
22	47	800	150+220+330	800	380+410
23	1	390	170+210	380	180+190

Los valores en color azul representan los dos patrones de restricción desconocidos

Dichos perfiles, de acuerdo a los resultados del análisis de la secuencia genética de la región D1/D2 26S rDNA, se reagruparon en once géneros y 16 especies (Tabla R1.2). En base a esos resultados, los aislados correspondientes a los patrones de restricción desconocidos 1 y 10, correspondieron a los géneros *Candida* sp. y *Hanseniaspora* sp., respectivamente.

Tabla R1.2 Especie, número de aislados y perfil de restricción de aislados de levaduras de cuatro chichas ecuatorianas identificadas por secuenciación de la región D1/D2 26S rDNA.

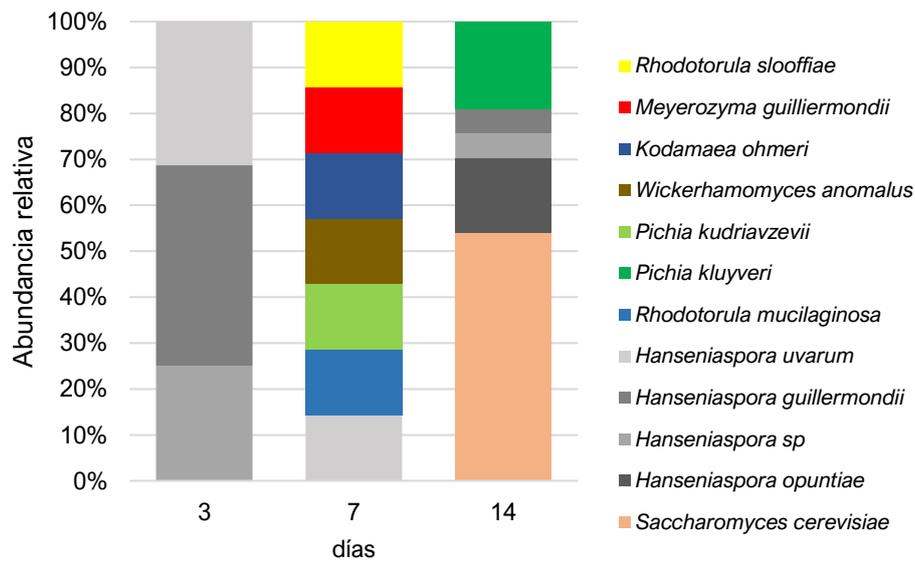
Especie	Número de aislados	Patrón de restricción
<i>Candida sp.</i>	30	1, 3, 7, 15, 21
<i>Cryptococcus sp.</i>	1	20
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	68	12, 11
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	37	9
<i>Hanseniaspora sp</i>	8	10
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	23	13
<i>Kodamaea ohmeri</i>	1	5
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	1	6
<i>Pichia kluyveri</i>	8	16
<i>Pichia kudriavzevii</i>	1	2
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	2	17, 18
<i>Rhodotorula slooffiae</i>	2	8, 14
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	23	19
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	47	22
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	1	4
<i>Yarrowia lipolytica</i>	1	23

De forma general, los géneros *Hanseniaspora*, *Torulaspora*, *Candida*, *Saccharomyces*, *Pichia* y *Rhodotorula* fueron más representativos en las cuatro chichas estudiadas, que concuerda con previos estudios en chichas de Colombia (López et al., 2010) y Argentina (Mendoza et al., 2017).

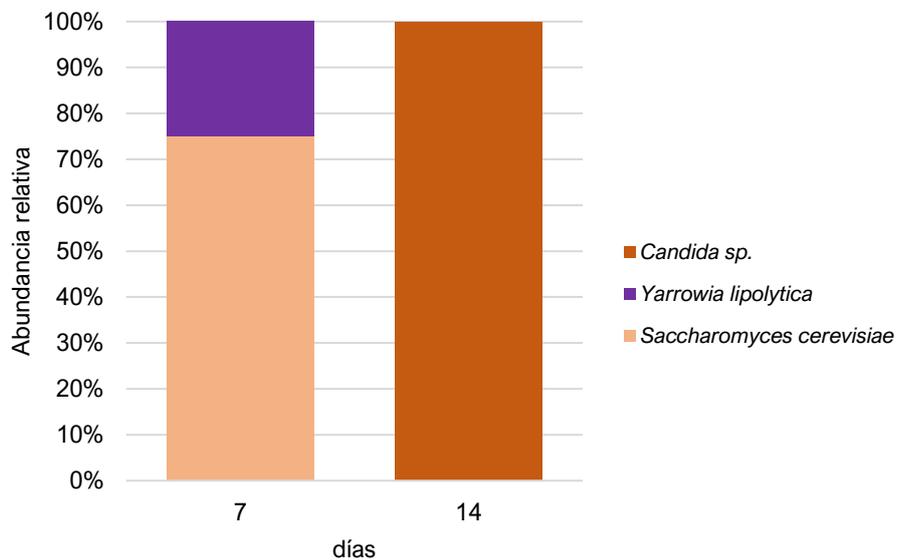
Anteriormente se consideraban a las levaduras no-*Saccharomyces* como alterantes o no deseables en las fermentaciones, sin embargo, actualmente múltiples estudios han demostrado que varias de ellas (dependiendo de la especie y cepa) pueden mejorar la composición analítica y el perfil aromático de la bebida final. Esta contribución está relacionada con la habilidad de ciertas levaduras de secretar enzimas, producir metabolitos secundarios, liberar manoproteínas o incluso contribuir a la estabilidad del color del producto final (Padilla et al., 2016). En cuanto a las levaduras de este grupo, los aislados del género *Hanseniaspora* fueron dominantes al inicio de la fermentación en todas las bebidas excepto en la chicha del Yamor (YC), incluso el mayor número de aislados totales fueron de este género (53.8 %) (Figura R1.4). Las levaduras que pertenecen al género *Hanseniaspora* han ganado interés recientemente por su

contribución positiva al perfil aromático de vino, sidra (Moreira et al., 2011; Pietrowski et al., 2012) y cachaça (Portugal et al., 2017). La notoria abundancia de aislados de *Hanseniaspora* en casi todas las chichas podría atribuirse al uso de diferentes zumos de frutas, un nicho muy común de esta especie (Kurtzman et al., 2011).

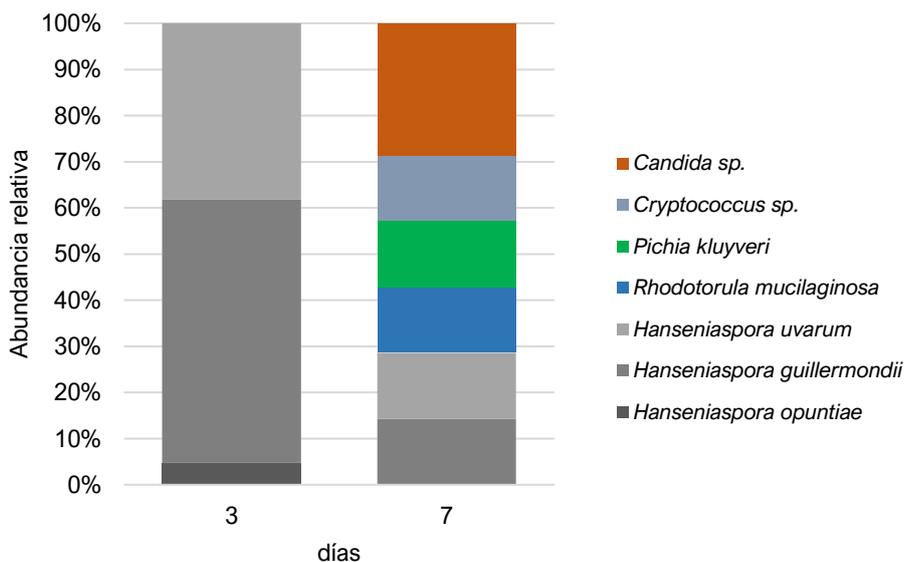
A



B



C



D

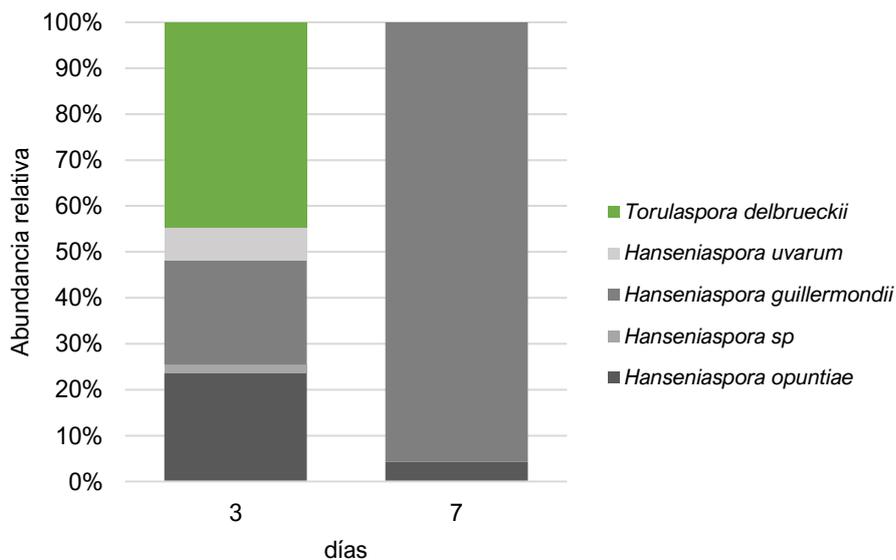


Figura R1.4 Abundancia relativa de especies de levaduras en los tres tiempos de muestreo (días 3, 7 y 14) en chicha de arroz (A), chicha del Yamor (B), chicha de avena (C) y chicha de uva (D).

También se encontraron aislados de los géneros *Candida* (11.46 %) y *Rhodotorula* (1.58 %), aunque sería necesaria una caracterización más profunda por la amplia diversidad de estos géneros y la patogenicidad de algunas de sus especies. Aislados de los dos géneros fueron también encontrados en chichas de maíz artesanales de Brasil, que al igual que las chichas ecuatorianas, son de bajo contenido alcohólico (Resende et al., 2018). En cuanto a los aislados del género *Candida*, algunas de sus especies son muy comunes en chichas de diferentes orígenes, siendo en algunos casos el género de levaduras dominante (Chaves-López et al., 2014). Las especies de *Pichia* (*P. kudriavzevii* y *P. kluyveri*) encontradas en este estudio fueron también descritas en otras bebidas fermentadas como cachaça, tequila, mezcal, vino y cerveza, y están muy bien establecidas sus aplicaciones interesantes desde la perspectiva del *bioflavouring* (Varela, 2016). En algunos casos incluso se ha patentado ya su uso en fermentaciones industriales (Cubillos et al., 2019).

Se encontró un número relativamente bajo de aislados de *S. cerevisiae* (23) y *T. delbrueckii* (47) que representa abundancias del 9.1 % y 18.6 %, respectivamente. Este resultado difiere de otros estudios donde eran las especies prevalentes. En estudios previos en bebidas ecuatorianas (Piló et al., 2018), muestras de varios productores fueron recolectadas en diferentes lugares, por lo que posiblemente la abundancia de aislados de *Saccharomyces* podría estar relacionada con los recipientes de fermentación y/o el uso de un residuo del lote anterior, que es una estrategia común en la forma de elaboración de estos productos (Carvajal, 2012).

Respecto a la diversidad de especies y la abundancia de cada especie por bebida (Figura R1.5), la chicha de arroz resultó ser el sustrato más rico. Doce de las dieciséis especies identificadas y la mayoría de los aislados de *S. cerevisiae* fueron encontrados en esta bebida. Fue la única bebida en la cual *S. cerevisiae* fue la especie más abundante. Aunque la chicha de avena y la chicha de arroz fueron elaboradas bajo procesos similares, la presencia de una mayor diversidad de especies en RC puede ser atribuida a que, durante la preparación de la bebida, se añadió dos zumos de frutas diferentes que pudieron contribuir notablemente en la riqueza de especies del producto final. OC fue la bebida más rica en aislados del género *Hanseniaspora*.

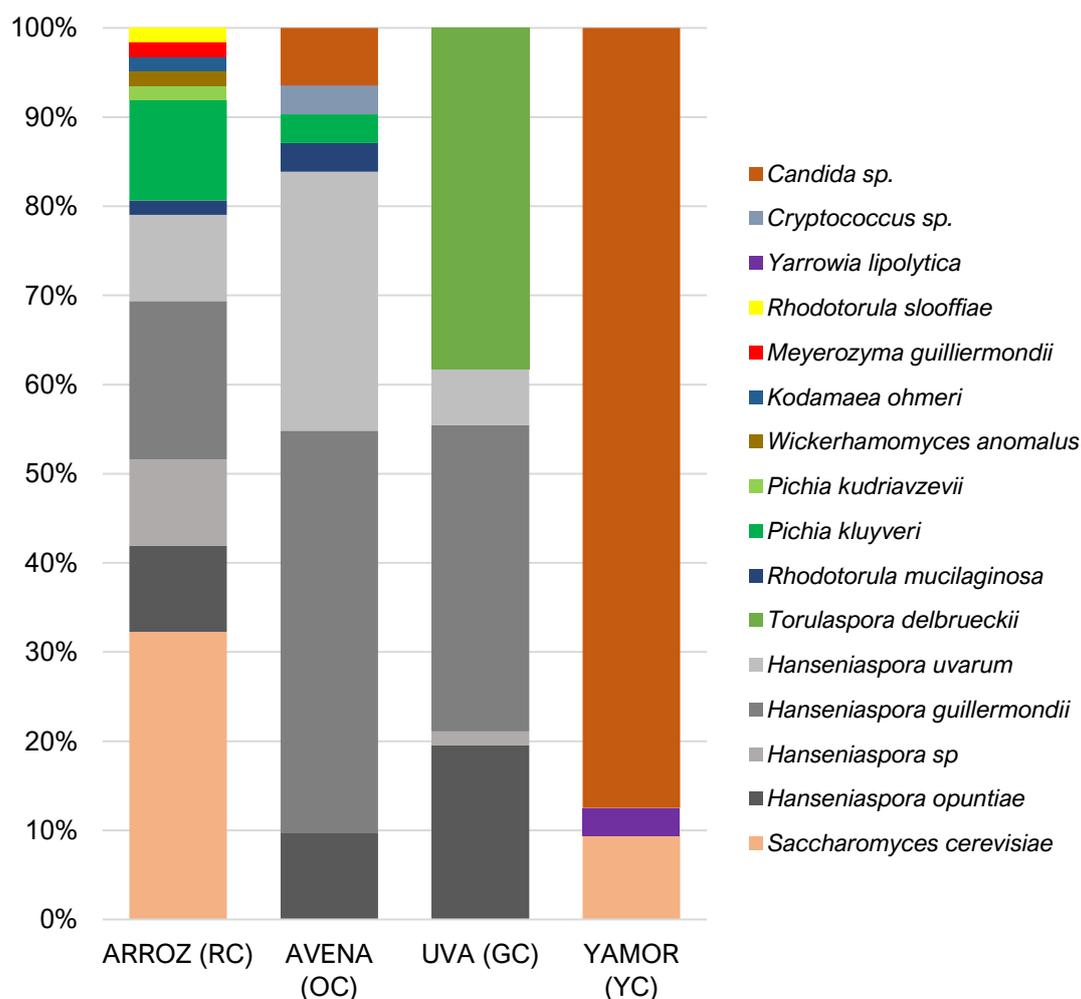


Figura R1.5 Abundancia relativa de especies de levaduras en cuatro chichas diferentes (arroz, avena, uva y Yamor) identificadas por secuenciación de la región D1/D2 del gen que codifica el rDNA.

La chicha de uva fue la única donde *T. delbrueckii* estuvo presente, siendo la población dominante una combinación de especies de los géneros *Hanseniaspora* y *Torulaspora*. La chicha de uva es una bebida tradicional de Chile, y también se produce en otros países de Sudamérica como un vino de bajo contenido alcohólico principalmente a partir de la fermentación incompleta de la uva "País" (uva común negra, más pequeña y menos dulce que la uva europea) (Crowley, 2000). La preparación de la chicha de uva para este estudio siguió el mismo proceso y también se le añadió panela para mejorar la fermentación y el sabor. Aunque esperábamos encontrar una mayor población de aislados de *S. cerevisiae*, encontramos que los aislados de *T. delbrueckii* fueron dominantes en la chicha de uva. *T. delbrueckii* es un clásico representante de la microbiota natural de la superficie de la uva (van Breda et al., 2013), por lo que la presencia masiva de aislados de esta especie podría explicarse por el corto tiempo de fermentación.

Las especies dominantes en la chicha del Yamor fueron aislados del género *Candida*, en concordancia con resultados previos en una chicha brasileña de maíz (Resende et al., 2018). Chaves-López et al., (2014) describen a este género como el más abundante, heterogéneo y común en chichas de maíz colombianas elaboradas con métodos ancestrales, donde se encontraron 7 especies distintas. El género *Candida* agrupa a más de 200 especies, se caracterizan por ser oxidativas y algunas especies son débilmente fermentativas, además algunas de ellas producen metabolitos extracelulares como ácido cítrico, etanol, xilitol, eritritol, biosurfactantes y exopolisacáridos (Kieliszek et al., 2017). De igual forma el único aislado de la especie *Yarrowia lipolytica* que obtuvimos en las chichas ecuatorianas fue en la bebida Chicha del Yamor, en chichas colombianas ya se había descrito la presencia de esta especie (López et al., 2010). *Yarrowia lipolytica* es una levadura aeróbica dimórfica no patógena que destaca por su capacidad de crecer en entornos hidrófobos. Levaduras de esta especie eran consideradas microorganismos alterantes de alimentos y bebidas (Howell, 2015), sin embargo, su capacidad de crecer en entornos hidrófobos y de metabolizar triglicéridos y ácidos grasos como fuentes de carbono, han proyectado su uso a varias aplicaciones biotecnológicas (Gonçalves et al., 2014).

Debido a su potencial fermentativo, se llevó a cabo un análisis molecular más profundo (DNA mitocondrial, elementos delta, *fingerprinting*) de los aislados de las especies *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* para caracterizarlos a nivel de cepa. Las cepas fueron nombradas por un código de tres letras, la letra “E” establecida por su lugar de origen (Ecuador), la segunda letra representa el origen de la chicha por sus siglas en inglés (R (Rice-Arroz), O (Oat-avena), G (Grape-uva) o Y (Yamor)) y la tercera letra se refiere el género (S, T, C).

De los análisis moleculares realizados, el análisis de elementos delta probó ser el método más exacto para diferenciar las cepas de *S. cerevisiae*. Se encontraron e identificaron seis cepas (ERS1, ERS2, ERS3, EYS4, EYS5, EYS6) mientras que, con el análisis del DNA mitocondrial, solo se distinguieron cinco cepas. La mayoría de los aislados de *S. cerevisiae* encontradas (18 de los 23) son del tipo ERS1, siendo las otras cepas corresponden a aislados únicos. Como su código indica, las cepas ERS1, ERS2, ERS3 fueron encontradas en la bebida chicha de arroz (RC), la diferencia en los patrones electroforéticos entre estas tres cepas es de un fragmento (la cepa ERS1 presenta un fragmento adicional de ~ 300 pb mientras que la cepa ERS3 carece de un fragmento de ~ 600 pb). Los patrones electroforéticos para las cepas encontradas en la chicha del Yamor (YC) eran muy distintos entre ellos lo que sugería una mayor diferencia entre las cepas encontradas. El patrón electroforético de la cepa EYS6 fue el más parecido al de la cepa control vínica L2056 (Figura R1.6).

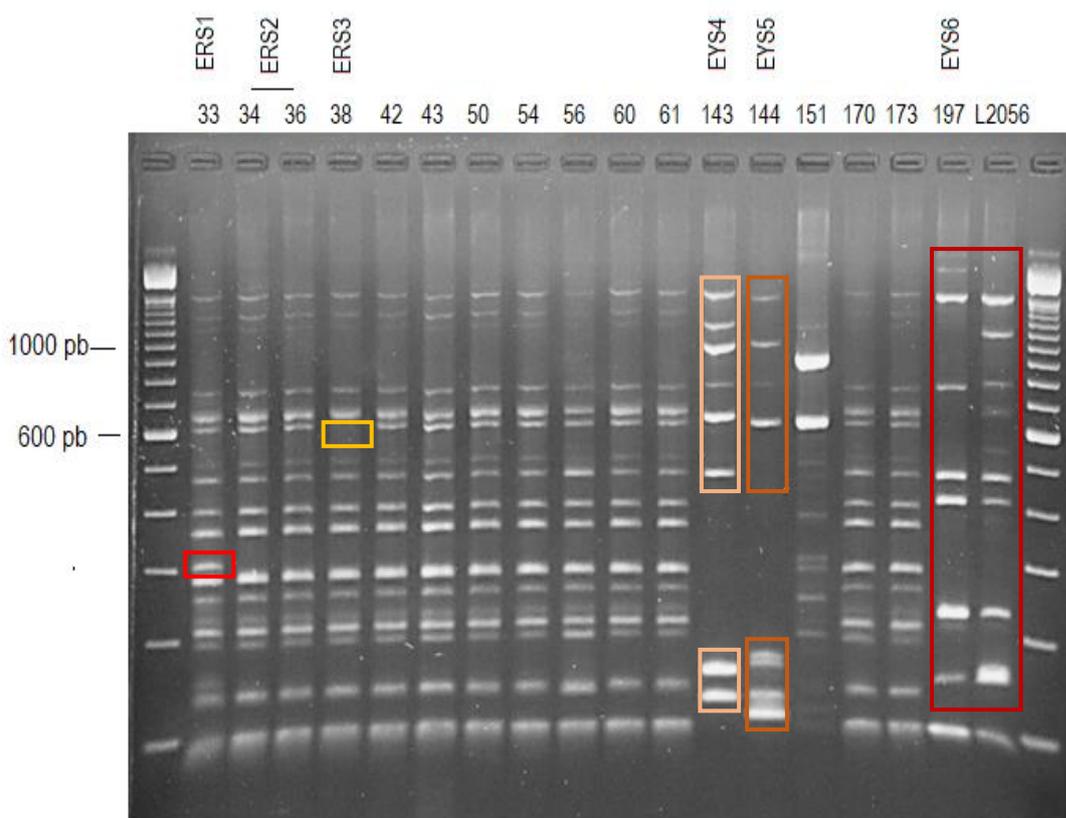
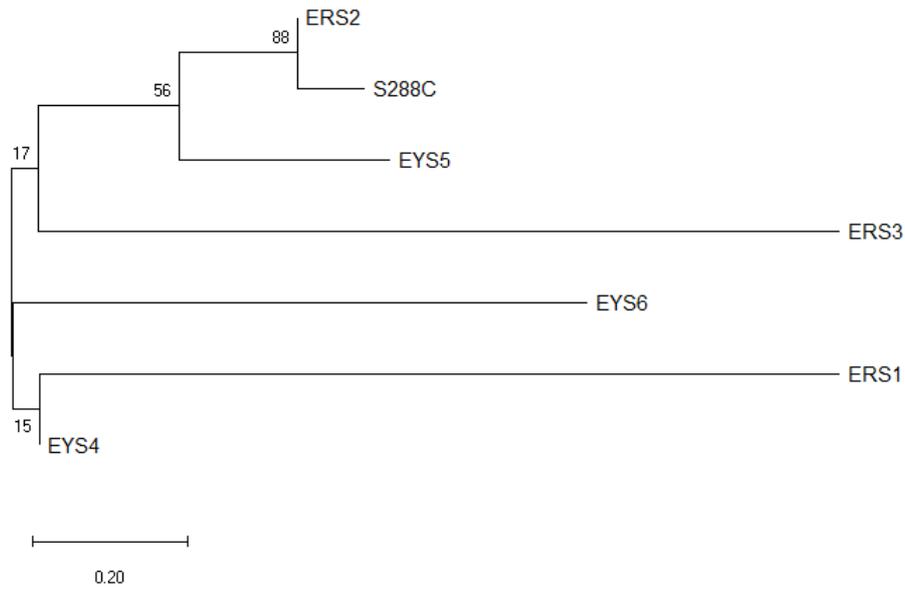


Figura R1.6 Patrones electroforéticos obtenidos mediante el análisis de elementos delta de las diferentes cepas de *S. cerevisiae* aisladas a partir de chichas ecuatorianas. Los recuadros en colores señalan las principales diferencias entre las cepas analizadas.

Estas diferencias entre cepas también pudieron ser apreciadas en los árboles filogenéticos construidos con las secuencias de las regiones ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (Figura R1.6A) y D1/D2 26S rDNA (Figura R1.7B). Se usó como referencia las secuencias de la cepa *S. cerevisiae* S288c obtenidas en las bases de datos NCBI y SGD. Se encontraron diferencias entre los dos tipos de árboles filogenéticos siendo el obtenido en base a la región D1/D2 26S rDNA el que muestra un patrón de similitud entre secuencias muy parecido al obtenido mediante el análisis de elementos delta. Generalmente se utiliza la región D1/D2 26S rDNA para la construcción de árboles filogenéticos (Farooq et al., 2018) ya que esta ha sido secuenciada para casi todas las levaduras conocidas como una herramienta para la identificación y para la estimación de relaciones filogenéticas (Kurtzman y Robnett, 1998). Las cepas cuyo origen era el mismo (chicha de arroz o chicha del Yamor) tienen un mayor grado de similitud entre ellas. Las cepas provenientes de la chicha del Yamor (EYS4, EYS4, EYS6) son más cercanas filogenéticamente a la cepa de referencia S288c.

A



B

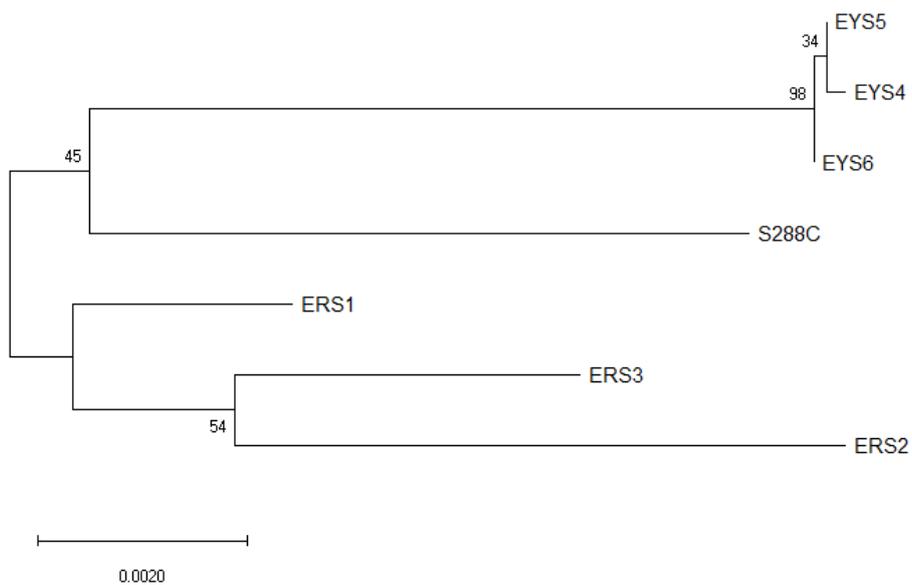


Figura R1.7 Árboles filogenéticos (Neighbour-joining) basados en (A) Secuencias de los fragmentos de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (aproximadamente 850 pb) (B) Secuencias de los fragmentos de la región D1/D2 26S rDNA (aproximadamente 600pb). Se muestra la posición de las cepas aisladas a partir de las chichas ecuatorianas y la cepa de referencia *S. cerevisiae* S288c mediante el programa Mega 5.2.

En relación a las cepas de la especie *T. delbrueckii*, pese a tener un número importante de aislados (47), solo se pudo distinguir dos cepas (EGT1 y EGT2), siendo único el aislado correspondiente a la cepa EGT2, es decir la mayoría de

los aislados correspondieron a la cepa EGT1 (Figura R1.8). El análisis del DNA mitocondrial fue el más adecuado en este caso y en el que mejor se pudieron distinguir las cepas de esta especie. El perfil de restricción de EGT1 resultó ser más similar al de la cepa vínica de referencia D291.

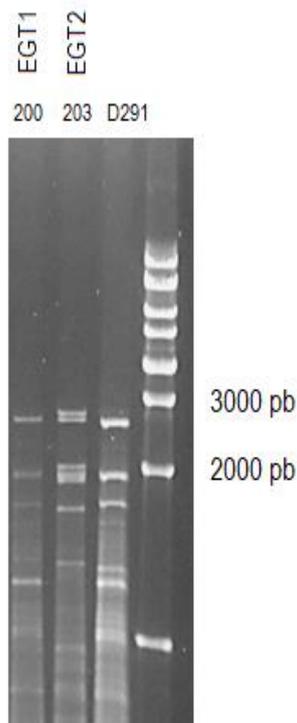


Figura R1.8 Perfil de restricción con la enzima *HinfI* del DNA mitocondrial de las cepas de *T. delbrueckii* aisladas a partir de chichas ecuatorianas.

En la Figura R1.9 se muestra el árbol filogenético construido en base a las secuencias de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 de las dos cepas *T. delbrueckii* ecuatorianas y una nueva cepa control *T. delbrueckii* CBS:1090.

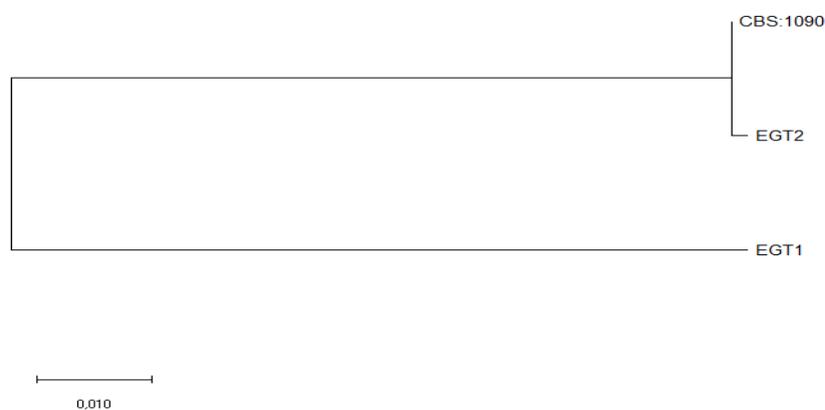


Figura R1.9 Árbol filogenético (Neighbour-joining) basados en las secuencias de los fragmentos de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (aproximadamente 850 pb). Se muestra

la posición de las cepas aisladas a partir de las chichas ecuatorianas y la cepa de referencia *T. delbrueckii* CBS:1090 mediante el programa Mega 5.2.

Al igual que en la especie *S. cerevisiae* existen variaciones intraespecíficas en la especie *T. delbrueckii* que dan lugar a diferencias importantes entre cepas, es por ello que nuevas cepas con una capacidad fermentativa mejorada podrían ser aisladas y seleccionadas (Ramírez y Velázquez, 2018). Podemos observar que entre las dos cepas ecuatorianas de esta especie existen diferencias en su perfil de restricción del DNA mitocondrial que podría estar relacionado además con características metabólicas y fisiológicas distintas.

El presente estudio se enfocó en el análisis de levaduras en las chichas ecuatorianas sin embargo se notó durante el aislamiento una presencia masiva de bacterias. La microbiota de la chicha proviene generalmente del sustrato y el ambiente de fermentación y por ello es muy variable además de diversa; en la mayoría de ellas se han identificado poblaciones de levaduras y bacterias ácido lácticas (BAL) (Faria-Oliveira et al., 2015). Estudios a partir de chichas elaboradas por comunidades indígenas han demostrado una presencia masiva y dominante de bacterias ácido lácticas (Puerari et al., 2015). En un estudio reciente se analizaron chichas de maíz argentinas mediante pirosecuenciación que reveló la presencia de especies minoritarias de BAL no detectadas por técnicas de cultivo (Elizaquível et al., 2015). Estudios metagenómicos y metatranscriptómicos podrían también ser muy útiles para analizar la biodiversidad en este tipo de bebidas tradicionales conocidas como sustratos complejos de consorcios microbianos (De Filippis et al., 2017). Si bien es cierto que actualmente muchos estudios de biodiversidad van acompañados de un análisis metagenómico, en nuestro trabajo nos enfocamos principalmente en la búsqueda y selección de levaduras con potencial aplicación en la producción de bebidas alcohólicas y para ello requerimos del aislamiento y obtención de cultivos puros. El análisis metagenómico de estas bebidas se considera un asunto pendiente para posteriores estudios.

1.2. Tolerancia a estrés de las distintas especies y cepas

Como se ha comentado en la Introducción, el desempeño fermentativo de una cepa específica en ciertas condiciones está relacionado con numerosos factores como los parámetros de crecimiento, utilización de azúcares, tolerancia a estrés y expresión génica (Dussap y Poughon, 2017). Las fluctuaciones en la temperatura, osmolaridad, acidez, la presencia de químicos tóxicos, entre otros, son condiciones a las que las levaduras deben enfrentarse (Kvitek et al., 2008). La tolerancia a estrés es un buen criterio para seleccionar cepas silvestres para ser usadas como iniciadores para fermentaciones industriales (Ivorra et al., 1999;

Gamero-Sandemetro et al., 2014). Con la idea de evaluar la idoneidad de las especies de levaduras aisladas para su uso industrial en fermentaciones alcohólicas, se realizó un análisis inicial de tolerancia a estrés en varias condiciones, usando como cepa de referencia la levadura comercial vínica *S. cerevisiae* L2056.

En este análisis inicial, se evaluó la resistencia de uno o dos aislados representativos de cada especie identificada (Tabla R1.2) en diferentes concentraciones de etanol (1, 5 y 10 %), temperatura (12, 30 y 37 °C) y estrés osmótico (KCl 1M). Como se puede ver en la tabla R1.3, la cepa control L2056 creció relativamente bien en todas las condiciones analizadas, como se esperaba en una cepa comercial industrial.

Tabla R1.3 Crecimiento de especies de levaduras aisladas en chichas ecuatorianas bajo estrés por etanol, temperatura y osmótico.

Especies de levaduras	Crecimiento en						
	Etanol %			Temperatura °C			KCl 1M
	2	5	10	12	30	37	
<i>Candida sp.</i>	+	+	-	+	+	0	+
<i>Cryptococcus sp.</i>	-	0	0	+	+	0	-
<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora opuntiae</i>	+	+	0	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora sp</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	+	+	0	+	+	0	+
<i>Kodamaea ohmeri</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Meyerozyma guilliermondii</i>	+	+	0	+	+	+	+
<i>Pichia kluyveri</i>	+	+	-	+	+	+	+
<i>Pichia kudriavzevii</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Rhodotorula mucilaginosa</i>	+	+	0	+	+	0	+
<i>Rhodotorula slooffiae</i>	-	0	0	+	+	0	0
<i>S. cerevisiae</i>	+	+	+	+/-	+	+	+/-
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	+	+	+	+	+	0	+
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	+	+	+	+	+	+	+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	-	0	0	-	-	-	-
L2056	+	+	+	+	+	+	+

+ igual que el control; ++ más que el control; - menos que el control; 0 sin crecimiento; (c) cepas control

La concentración más alta de etanol (10 %) y la de temperatura a 37 °C fueron los factores que más afectaron el crecimiento (Figura R1.10). Esto puede ser debido a la baja concentración de etanol alcanzada en la fermentación de las chichas y a que éstas no se fermentan a altas temperaturas.

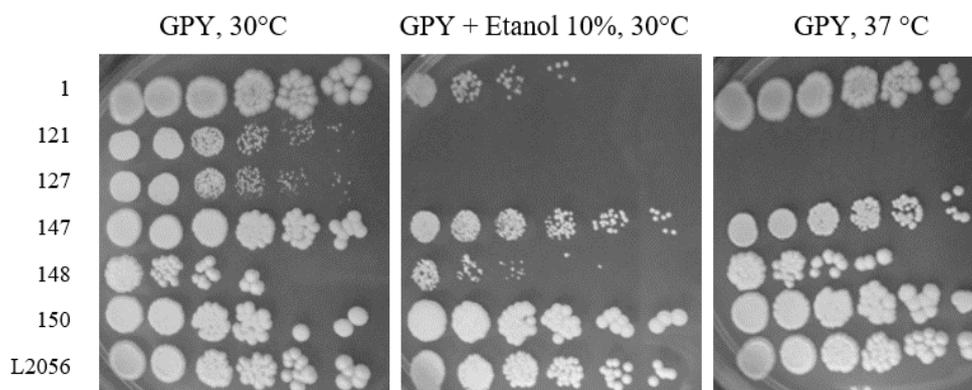


Figura R1.10 Ejemplo del crecimiento de varios aislados de levaduras de chichas ecuatorianas de diferentes especies en condiciones de estrés por etanol (10 %) y estrés por temperatura (37 °C).

Cryptococcus sp., *Rhodotorula slooffiae* y *Yarrowia lipolytica* fueron las especies más sensibles a la mayoría de las condiciones de estrés analizadas. Patrones de tolerancia similares a los reportados en este trabajo fueron descritos por Mukherjee et al., (2017) para estas especies. Al contrario, los aislados de *Kodamae ohmeri*, *Pichia kudriavzevii*, y *Wickerhamomyces anomalus* mostraron una tolerancia al estrés similar a la cepa control *S. cerevisiae* L2056. Resultados similares fueron determinados en un estudio reciente sobre la aplicación de levaduras no convencionales para fermentación de bioetanol, donde los aislados de *W. anomalus* y *P. kudriavzevii* mostraron una alta tolerancia a concentraciones de etanol de 11 % y 13 % v/v respectivamente, además de termotolerancia (37 °C y > 41 °C respectivamente) (Mukherjee et al., 2017).

Se encontraron importantes diferencias entre los aislados pertenecientes a las cuatro especies identificadas de *Hanseniaspora*, siendo justamente la que no pudo ser identificada a nivel de especie, clasificada como *Hanseniaspora sp.*, la más tolerante (a nivel de cepa), mientras que *H. uvarum* fue la más sensible a concentraciones de etanol altas y a 37 °C. Tanto en el análisis del perfil de restricción de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 así como en el análisis de la secuencia, se encontraron resultados “atípicos” para las cepas clasificadas como *Hanseniaspora sp.* (8 aislados correspondientes al patrón de restricción 10 (Tabla R1.2)) por lo que sería necesario un estudio molecular y fisiológico más profundo para estos aislados, al detectar que su comportamiento a nivel de tolerancia a estrés es interesante (similar al de la cepa control). Pina et al., (2004) describen

el uso en vinificación de un aislado de la especie *H. guillermondii* con tolerancia a concentraciones de etanol de 25 % v/v, por lo que el descubrimiento de nuevos aislados resistentes de este género puede tener un alto potencial para su aplicación en diferentes fermentaciones alcohólicas.

De forma general los aislados de chichas ecuatorianas de la especie *S. cerevisiae* mostraron una buena tolerancia a estrés, aunque no igual que la cepa comercial, con una baja tolerancia a frío y a estrés hiperosmótico. Sin embargo, los aislados de la especie *T. delbrueckii* mostraron un crecimiento menor a la cepa control en todas las concentraciones de etanol. *S. cerevisiae*, y más recientemente *T. delbrueckii*, son ampliamente estudiadas para la fermentación de bebidas alcohólicas como cerveza y vino (Kurtzman et al., 2011; Canonico et al., 2016; Benito, 2018). *T. delbrueckii* es conocida por ser una especie de levadura altamente osmo y criotolerante (Alves-Araújo et al., 2007) y diferentes cepas son consideradas particularmente interesantes para las industrias de panificación, cerveza y vino (Benito, 2018; Canonico et al., 2016). Estudios diferentes en chichas han demostrado una considerable diversidad fenotípica y genotípica entre cepas de *S. cerevisiae* y también una presencia importante de aislados de *T. delbrueckii* (Piló et al., 2018; Vallejo et al., 2013). Varias cepas de las dos especies han sido también identificadas en la parte continental y en las Islas Galápagos del Ecuador (Carvajal et al., 2014).

Debido a su amplio uso en diferentes aplicaciones industriales basados en la fermentación alcohólica, la tolerancia a estrés de las cepas aisladas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* fue caracterizada más a fondo, se incluyó también los análisis de estrés oxidativo y estrés salino, y se usaron como cepas control *S. cerevisiae* L2056 y *T. delbrueckii* D291. Aislados de *Candida* sp. fueron también incluidos en este nuevo análisis debido a su presencia masiva en las chichas del Yamor. Los resultados de este estudio más detallado se muestran en la tabla R1.4.

Tabla R1.4 Crecimiento de las cepas de las especies *Candida* sp., *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii* bajo diferentes condiciones de estrés.

Cepa de levadura	Crecimiento											
	H ₂ O ₂ [mM]		Temperatura °C			NaCl [M]		Sorbitol [M]		Etanol %		
	2.5	3.5	12	30	37	0.7	1.2	0.9	1.5	5	10	12
<i>S. cerevisiae</i>												
ERS1	+	-	-	+	-	++	++	-	-	-	-	-
ERS2	+	-	-	+	-	++	++	-	-	-	-	-
ERS3	-	-	-	-	-	++	++	-	-	-	-	-
EYS4	+	+	+	+	+	++	++	+	+	+	+	+
EYS5	-	-	-	+	+	++	++	+	-	+	-	-
EYS6	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-
L2056	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>T. delbrueckii</i>												
EGT1	-	-	+	-	0	-	-	-	-	-	-	-
EGT2	+	+	-	+	0	+	+	-	-	-	-	-
D291	+	+	+	+	0	+	+	+	+	+	-	-
<i>Candida</i> sp.												
EOC1	+	+	+	+	-	++	++	+	-	-	-	-
EOC2	++	++	++	++	-	0	0	+	-	+	-	-

+ igual que el control; ++ más que el control; - menos que el control; 0 sin crecimiento; (c) cepas control

Como se puede ver en la tabla R1.4 se encontraron importantes diferencias entre especies y también entre cepas que pertenecían a la misma especie. La cepa L2056 fue usada como control para las cepas de la especie *S. cerevisiae* mientras que la cepa *T. delbrueckii* D291 fue usada como cepa control para el grupo de levaduras no-*Saccharomyces*. Enfocándonos en las cepas de *S. cerevisiae*, la variabilidad fenotípica fue menor para las cepas aisladas de la chicha de arroz (ERS1, ERS2, ERS3) mientras que se encontraron importantes diferencias en resistencia a estrés a nivel de cepa para aquellas aisladas a partir de la chicha del Yamor (EYS4, EYS5, EYS6). EYS6 fue la cepa más sensible para la mayoría de condiciones de estrés mientras que EYS4 fue la más resistente, incluso más que la cepa control L2056 en lo que respecta a estrés salino (Figura R1.11). Las cepas aisladas de chicha parecen ser más tolerantes a condiciones de estrés por altas concentraciones de NaCl, mientras que la mayoría de ellas no mostraron alta tolerancia al sorbitol, lo que indica que no tienen una mayor tolerancia

general a estrés osmótico, pero si a una buena habilidad para crecer en altas concentraciones salinas. Esto podría indicar que las chichas son ambientes ricos en sales, y que estas cepas podrían ser útiles para fermentaciones donde las altas concentraciones de sal son relevantes.

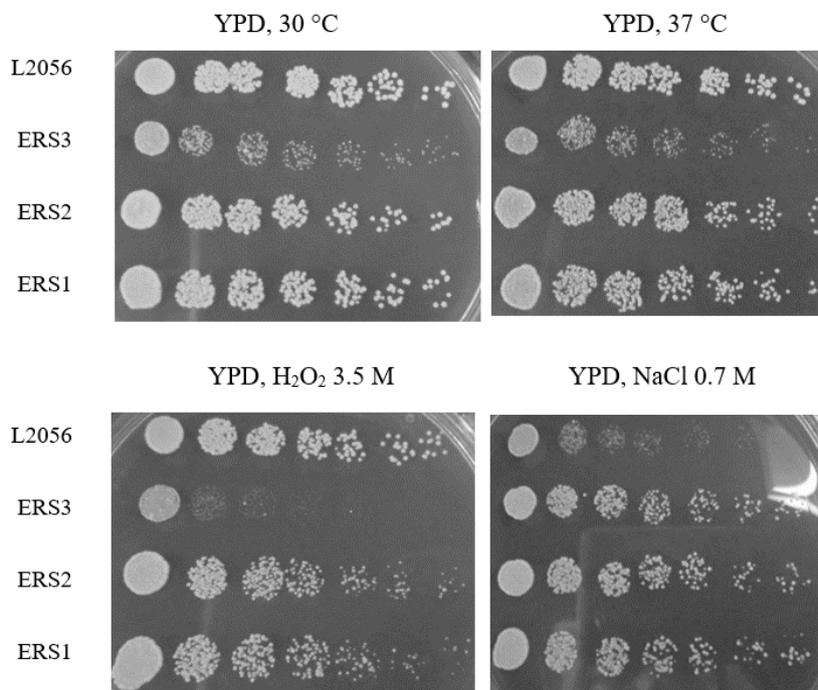


Figura R1.11 Crecimiento de algunas cepas de *S. cerevisiae* aisladas en chichas ecuatorianas (ERS1, ERS2 y ERS3) en medio YPD y varias condiciones de estrés (37 °C, H₂O₂ 3.5M, NaCl 0.7 M).

En el caso de las cepas de *T. delbrueckii*, tanto EGT1 como EGT2 fueron muy sensibles a todas las concentraciones de etanol y sorbitol evaluadas, mientras que la cepa única control D291 creció a 5 % etanol y 1.5 M sorbitol. La cepa EGT2 mostró una mayor tolerancia al estrés salino y oxidativo que la cepa EGT1, mientras que EGT1 creció mejor a bajas temperaturas. Por su relevancia en usos industriales, cabe destacar que EGT2 mostró características de floculación similares a la de la cepa control D291, mientras que EGT1 no era floculante. A concentraciones de etanol superiores al 5%, todas las cepas de la especie *T. delbrueckii*, incluida la cepa control, mostraron un crecimiento disminuido similar.

Aunque encontramos solo seis cepas de *S. cerevisiae* y dos cepas de *T. delbrueckii* en las chichas ecuatorianas analizadas, estas mostraron diferencias fisiológicas entre ellas, reflejadas particularmente en sus perfiles de tolerancia a estrés. Una combinación de los eventos de domesticación y dispersión son probablemente el origen de las levaduras de las chichas (Gomes et al., 2009), por lo que la variabilidad de nuestros aislados de levaduras podría ser

consecuencia de ello. En ambientes naturales, las levaduras están continuamente sujetas a cambios en la osmolaridad externa y a la exposición a ambientes con altas concentraciones de solutos, como los sustratos de chicha, que podrían dar lugar a un estrés hiperosmótico (Gibson et al., 2007). Aunque la mayoría de cepas ecuatorianas *S. cerevisiae* mostraron una baja tolerancia a altas concentraciones de sorbitol, la mayoría de ellas mostró una mejor tolerancia a concentraciones altas de NaCl. El contenido de NaCl de chichas latinoamericanas se desconoce, sin embargo, se ha determinado que la panela tiene un alto contenido de minerales que podría ser el origen de estos compuestos en las chichas (Jaffé, 2015).

El estrés iónico tiene características comunes con el estrés hiperosmótico, pero también involucra sistemas fisiológicos comprometidos con la homeostasis iónica (Hohmann y Mager, 2003). García et al., (1997) sugiere que la tolerancia relativa de las levaduras al efecto osmótico y a la toxicidad por cationes de Na⁺, están moduladas por el control general de catabolito ejercido por la glucosa. Esta habilidad podría determinar el éxito de la fermentación en matrices alimentarias de alta osmolaridad, como la chicha. La regulación de los flujos de Na⁺ y K⁺ a través de la membrana plasmática, la modulación de las propiedades de la pared celular, producción y acumulación de osmolitos compatibles y rutas de señalización de estrés han sido estudiadas para la levadura alimentaria osmotolerante y halotolerante *Zygosaccharomyces rouxii* (Dakal et al., 2014), por lo que estudios similares podrían ser desarrollados en un futuro para las levaduras aisladas en este trabajo.

En cuanto a las cepas de *Candida* sp., EOC1 mostró una resistencia al estrés similar a algunas cepas de *S. cerevisiae* (particularmente a estrés por NaCl), mientras que EOC2 mostró una tolerancia a estrés oxidativo y bajas temperaturas mejor que cualquier otra levadura analizada, incluyendo los dos controles, aunque nuevamente fueron bastante sensibles al etanol. Este género incluye principalmente levaduras con metabolismo respiratorio, lo que podría justificar esa mayor tolerancia a estrés oxidativo (Kieliszek et al., 2017).

1.3. Análisis de la actividad amilasa

Los carbohidratos, principalmente el almidón y los azúcares solubles, son la principal fuente energética presente en las materias primas usadas para producir chichas. Históricamente la saliva era añadida como una fuente de amilasa (Ramos y Schwan, 2017) pero actualmente la mayoría de las chichas son preparadas con un residuo de un lote previo o solo por fermentación espontánea (Piló et al., 2018). Debido al potencial interés de las levaduras aisladas como iniciadores en la producción de chicha y otras fermentaciones de interés biotecnológico, se

decidió realizar un rastreo general en medios sólidos para determinar posibles aislados con actividad amilasa, ya que ésta es requerida para la asimilación de almidón típicamente presente en casi todas las chichas tradicionales. Se incluyó como referencia una cepa con buena actividad amilasa, la levadura panadera *S. cerevisiae* Cinta Roja.

Es importante destacar la dificultad de la puesta a punto de este experimento ya que generalmente la actividad amilasa en levaduras es muy débil y no es muy común. La mayoría de las cepas aisladas no mostraron actividad amilasa en el ensayo de formación de halo de hidrólisis en las dos concentraciones de almidón analizadas por lo que en la Tabla R1.5 solo se muestran las levaduras que presentaron actividad amilasa detectable.

Tabla R1.5 Diámetro del halo de hidrólisis (mm) de cada cepa en dos medios ricos en almidón. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Especie	Código	Contenido de almidón	
		YPS (1 %)	AAM (0.5 %)
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ERS1	0.95 ± 0.05	1.00 ± 0.00 ^{ab}
	ERS2	0.95 ± 0.05	1.00 ± 0.00 ^{ab}
	ERS3	0.85 ± 0.05	0.80 ± 0.00 ^a
	EYS4	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.10 ^{ab}
	EYS5	0.95 ± 0.05	0.95 ± 0.05 ^{ab}
	EYS6	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	Cinta Roja(c)	1.53 ± 0.15	1.43 ± 0.13 ^c
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	L2056	1.20 ± 0.07	1.00 ± 0.07 ^{ab}
	EGT1	0.95 ± 0.05	1.00 ± 0.00 ^{ab}
<i>Candida sp.</i>	EGT2	1.10 ± 0.30	0.75 ± 0.05 ^a
	EOC1	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
<i>Cryptococcus sp.</i>	EOC2	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
	EOR	2.50 ± 0.40 *	2.00 ± 0.00 ^d
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	ERW	1.25 ± 0.05	1.25 ± 0.15 ^{bc}
<i>Kodamaea ohmeri</i>	ERK	1.20 ± 0.00	1.10 ± 0.00 ^{abc}

El diámetro del halo está expresado en mm; (c) cepas control

Respecto a las cepas ecuatorianas de *S. cerevisiae*, EYS6 no mostró ninguna actividad, y las otras mostraron nuevamente una baja actividad en el rango de levaduras vínicas, como es usual en esta especie, sin alcanzar nunca a la levadura panadera especializada utilizada como control. Sin embargo en otro estudio similar, algunas cepas naturales del género *Saccharomyces* aisladas de chichas peruanas mostraron la capacidad de asimilar almidón (Vallejo et al., 2013), por lo que sí es posible encontrar en estos sustratos algunas cepas que posean esta característica metabólica.

Las levaduras del género *Candida* tampoco mostraron ninguna actividad, mientras que los aislados de las especies *Torulaspota*, *Wickerhamomyces* y *Kodamaea* mostraron una actividad amilasa sustancial en el rango de la cepa vínica *S. cerevisiae* L2056, aunque menor a la de la levadura panadera Cinta Roja.

Como se puede observar en la Figura R1.12 el aislado de la especie *Cryptococcus* sp. procedente de chicha de avena mostró una actividad amilasa mucho mayor a la detectada para Cinta Roja, se puede apreciar un mayor crecimiento en este medio y una mayor actividad amilolítica. En el control positivo (Cinta Roja) se observa un halo más definido, sin embargo, el halo que se visualiza para el aislado de *Cryptococcus* es más extenso y mucho más claro alrededor de la colonia. Esto sugiere que existen diferencias moleculares en cantidad y/o actividad de esta enzima entre estos dos tipos de células.

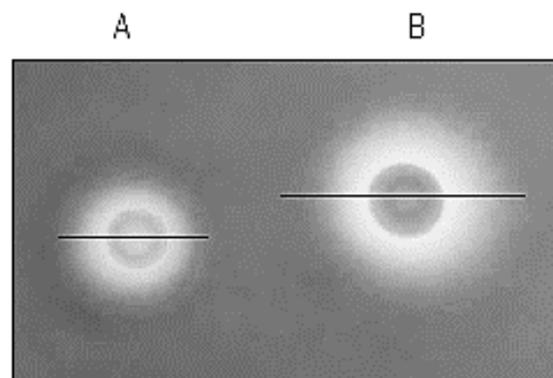


Figura R1.12 Imagen de la cepa de la especie *Cryptococcus* sp. (B) comparada con la cepa panadera de referencia *S. cerevisiae* Cinta Roja (A) en placas con medio AAM (0.5 % de almidón) teñida con vapores de yodo. La línea central representa el diámetro total del halo.

Una glicoproteína con una masa molecular aparente entre 75 - 84.5 kDa fue purificada de una cepa de *Cryptococcus flavus* aislado de frutas brasileñas (Wanderley et al., 2004). Las especies de levaduras de este género pueden ser una fuente importante de amilasa, por lo que un análisis adicional debería ser llevado a cabo para evaluar la posibilidad de usarlo como coinóculo con una levadura fermentativa, una vez descartada la presencia de rasgos de patogenicidad, o como organismo productor para la obtención y posterior purificación de la citada enzima.

Las levaduras más comunes y estudiadas capaces de metabolizar el almidón son las de la especie *S. cerevisiae* var. *diastaticus* y *Saccharomyces fibuligera*, que producen tres y dos formas diferentes de glucoamilasas, respectivamente; además se ha descrito a la levadura amilolítica *Pichia subpelliculosa* ABWF-64 (Mohan y Satyanarayana, 2018). Estudios más detallados a nivel de actividad glucoamilasa podrían llevarse a cabo luego de un *screening* inicial como el desarrollado en este trabajo. Especies del género *Bacillus*, microorganismos comunes de las chichas, han sido encontrados como beneficiosos para el proceso fermentativo debido a la producción de enzimas hidrolíticas como amilasas y proteasas (Resende et al., 2018). Probablemente, la hidrólisis del almidón en las chichas es principalmente llevada a cabo por bacterias antes que por levaduras.

1.4. Estudio de la actividad invertasa

Como se mencionó anteriormente, las melazas son usadas para la propagación de levaduras en producción de biomasa industrial, donde la sacarosa es la principal fuente de carbono por lo que las levaduras seleccionadas como iniciadoras deben metabolizar de forma eficiente este disacárido (Bekatorou et al., 2006). La actividad invertasa se requiere para el uso metabólico de la sacarosa, el carbohidrato más común en melazas (Marques et al., 2015) y también un azúcar abundante presente en la mayoría de chichas debido a la adición de panela como agente endulzante de la bebida. La producción de invertasa es altamente variable en levaduras y muy dependiente de cepa. En la cepa de referencia de *S. cerevisiae*, la invertasa está codificada por el gen *SUC2*, uno de los más regulados en función de la disponibilidad de fuentes de carbono (Del Castillo-Agudo et al., 1992); por todo se ello, se consideró importante determinar las diferencias entre las distintas cepas seleccionadas. Se llevó a cabo la determinación de esta actividad enzimática tanto en condiciones de represión como de desrepresión en las levaduras seleccionadas con mejor capacidad fermentativa, y se incluyó para este experimento una segunda cepa control, la cepa de laboratorio BY4742 ya que se deseaba analizar la actividad invertasa en

condiciones de represión en altas concentraciones de glucosa, represión que suele ser completa en cepas de laboratorio.

Los resultados de las medidas de actividad invertasa en las cepas representativas ERS1, EYS4, EYS5 y EGT1 y sus controles, se muestran en la Figura R1.13. Se puede observar que las tres cepas *S. cerevisiae* ERS1, EYS4, EYS5 mostraron una actividad invertasa mayor a su control L2056, tanto en condiciones de represión como de desrepresión. Resultados similares fueron reportados por Bozdog y Greig (2014) en un estudio realizado con levaduras aisladas de distintos ambientes domésticos y silvestres, se encontraron diferencias significativas en la producción de invertasa en once cepas distintas que posiblemente está relacionada con diferencias en la regulación del gen *SUC2*. El fondo genético y la estructura de los genes son las principales razones por las que se presentan diferencias en la producción de esta enzima en distintas especies y cepas (Del Castillo-Agudo et al., 1992), por ello un estudio más detallado de esta secuencia en las cepas ecuatorianas podría ser de interés.

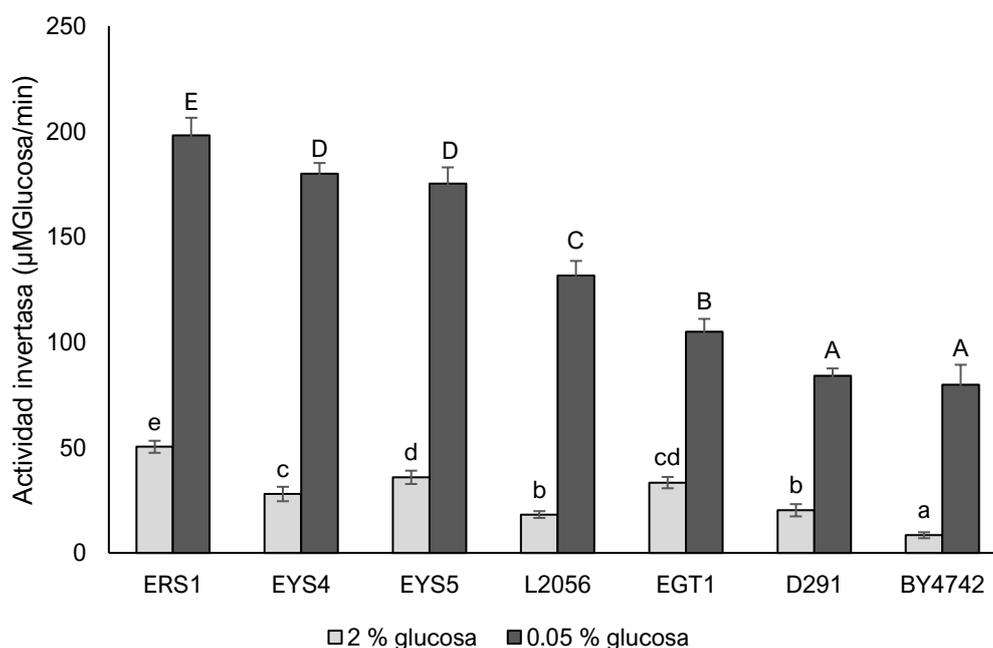


Figura R1.13 Actividad invertasa de cepas de levaduras seleccionadas en condiciones de represión (2 % glucosa) y desrepresión (0.05 % glucosa). Las cepas usadas como control fueron *S. cerevisiae* L2056 y BY4742, y *T. delbrueckii* D291. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

La actividad invertasa de las cepas de *T. delbrueckii* estudiadas en este trabajo, fue menor y significativamente diferente comparado con los valores obtenidos para las cepas de *S. cerevisiae*. No obstante, la actividad de EGT1 es mayor que la cepa de referencia. Estos resultados difieren de los obtenidos en otros estudios con una cepa panadera de *T. delbrueckii* en un medio YP rico, donde la actividad invertasa fue similar a la observada para las cepas *S. cerevisiae* (Alves-Araújo et al., 2007).

De forma general, la actividad invertasa fue de aproximadamente 3 a 5 veces mayor en una concentración baja de glucosa (0.05 %) que en concentraciones altas de glucosa (2 %), debido a la desrepresión del gen *SUC2* (Marques et al., 2015), pero a diferencia de la cepa de laboratorio, no se observó una represión casi completa de la actividad invertasa en 2 % de glucosa, lo que sugiere una regulación más flexible de la utilización de fuentes alternativas de carbono, que también fue observada para la cepa vínica industrial *S. cerevisiae* L2056. Así pues, todas las cepas de chicha de *S. cerevisiae*, así como también la cepa control vínica L2056, mostraron una represión incompleta cuando las células crecieron en glucosa 2 % ya que la actividad invertasa es mayor que en la cepa de laboratorio BY4742 en estas condiciones.

Se ha descrito que la producción de invertasa en cepas de *S. cerevisiae* aisladas a partir de bebidas tradicionales de la India fue variable en función del sustrato utilizado y las condiciones de cultivo, la estandarización de estos dos factores fue determinante para lograr una producción mayor de esta enzima (Chand Bhalla et al., 2017). Estudios similares podrían realizarse con las levaduras ecuatorianas en sustratos asequibles y comunes en Ecuador. Levaduras de la especie *Candida utilis* son también una fuente muy importante de invertasa (Kulshrestha et al., 2013), por lo que resultaría de interés evaluar esta actividad también para todas las cepas de la especie *Candida* aisladas en este trabajo.

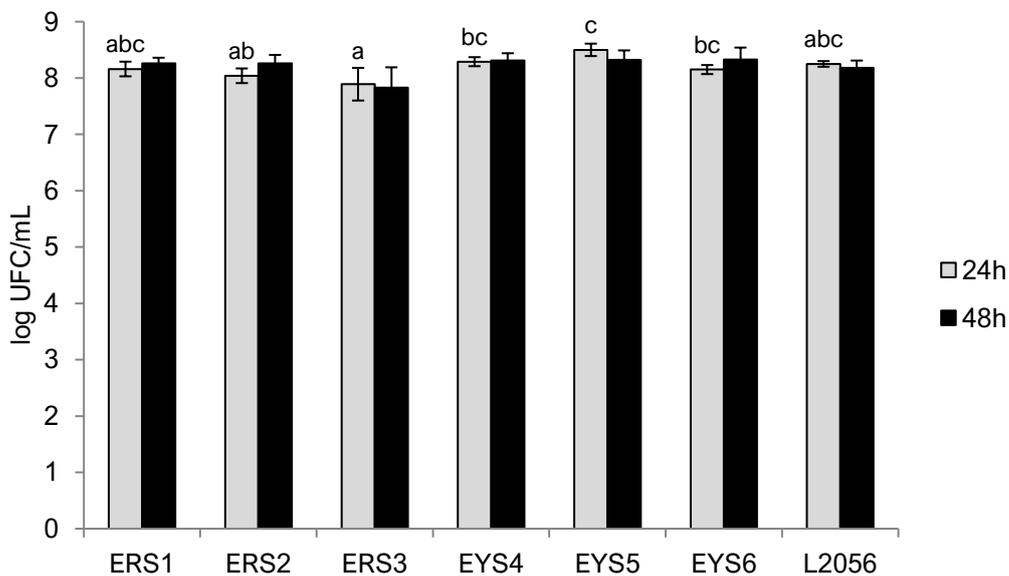
1.5. Habilidad para crecer en medio melaza

La propagación de biomasa a gran escala es requerida para la producción de cultivos iniciadores de levaduras como paso previo para su uso en las fermentaciones industriales. Las condiciones a las que se exponen las levaduras durante el proceso de propagación de biomasa pueden afectar dramáticamente a parámetros económicamente muy importantes del proceso de fermentación, como el rendimiento obtenido, y a sus habilidades tecnológicas, como la capacidad fermentativa (Pérez-Torrado et al., 2005). El sustrato más ampliamente usado para la producción de biomasa de levaduras es la melaza de

caña de azúcar o de remolacha, debido a su disponibilidad y bajo costo, su composición nutricional y la ausencia de sustancias tóxicas e inhibidores de la fermentación (Bekatorou et al., 2006). Por esta razón se decidió evaluar el crecimiento en melaza de remolacha a escala de laboratorio de aislados seleccionados, de las doce cepas previamente seleccionadas en el análisis de tolerancia a estrés de la tabla R1.4, 6 cepas de la especie *Saccharomyces* y 6 levaduras no-*Saccharomyces* (2 cepas de *T. delbrueckii*, 2 cepas de *Candida sp.*, además una cepa de las especies *Wickerhamomyces anomalus* y *Kodamaea ohmeri*). El crecimiento fue seguido por determinación de unidades formadoras de colonias (UFC) y DO_{600} después de 24 y 48 horas de cultivo a 30 °C, usándose como cepas control las cepas vínicas *S. cerevisiae* L2056 y *T. delbrueckii* D291.

Todas las cepas fueron capaces de crecer en este medio. Respecto a la medida de UFC, se observó un crecimiento significativamente diferente entre las seis cepas ecuatorianas de *S. cerevisiae* a las 24 h siendo EYS5 la cepa que presentó el mejor desempeño y ERS3 el peor. En general, se observó poco crecimiento entre las 24 y 48 h, aunque no se observó pérdida de viabilidad a lo largo de este periodo (Figura R1.14).

A



B

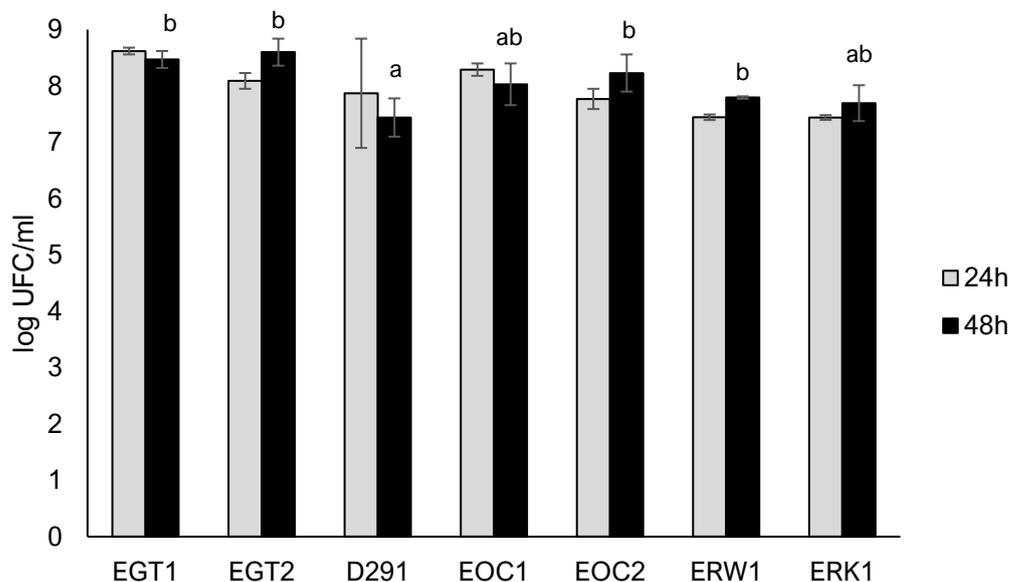


Figura R1.14 Crecimiento en melaza (UFC/mL) de cepas de levaduras seleccionadas *S. cerevisiae* (A) y no-*Saccharomyces* (B). Se usó como cepas control *S. cerevisiae* L0256 y *T. delbrueckii* D291. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Respecto a la medición de absorbancia, no se encontraron grandes diferencias de crecimiento al compararlas con la cepa de referencia, excepto para las cepas ERS3 y EYS6, que crecieron menos (Tabla R1.6). Las cepas *T. delbrueckii* procedentes de chicha alcanzaron por lo general mayores DO que la cepa de referencia, indicando un buen crecimiento en dicho medio.

Tabla R1.6 Crecimiento en melaza (DO_{600}) de cepas de levaduras seleccionadas *S. cerevisiae* y no-*Saccharomyces*. Se usaron *S. cerevisiae* L0256 y *T. delbrueckii* D291 como cepas control. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Especie	Cepa	DO_{600}							
		24 h			48 h				
<i>S. cerevisiae</i>	ERS1	17.65	±	0.55	^b	22.19	±	0.69	^c
	ERS2	17.27	±	0.30	^b	21.08	±	0.78	^c
	ERS3	12.33	±	0.30	^a	19.03	±	0.59	^{bc}
	EYS4	18.33	±	0.48	^b	21.12	±	1.79	^c
	EYS5	15.76	±	0.52	^b	15.21	±	0.38	^{ab}
	EYS6	10.90	±	0.62	^a	10.75	±	0.49	^a
	L2056	16.17	±	0.58	^b	18.55	±	0.37	^{bc}
<i>T. delbrueckii</i>	EGT1	22.03	±	0.89	^C	22.34	±	0.73	^B
	EGT2	18.49	±	0.97	^{BC}	12.63	±	1.46	^{AB}
	D291	10.89	±	1.00	^A	9.62	±	1.03	^A
<i>Candida sp.</i>	EOC1	18.01	±	0.31	^{BC}	17.18	±	0.53	^{AB}
	EOC2	11.55	±	0.48	^A	15.19	±	0.39	^{AB}
<i>W. anomalus</i>	ERW1	15.06	±	1.07	^{AB}	20.25	±	2.33	^{AB}
<i>K. ohmeri</i>	ERK1	14.81	±	0.66	^{AB}	23.08	±	5.09	^B

Los medios preparados a partir de melaza son ricos en sacarosa, generalmente cuentan con la cantidad necesaria de nutrientes para el crecimiento de levaduras (especialmente aquellas del género *Saccharomyces*) por lo que se convierte en un sustrato adecuado para la producción de biomasa (Marques et al., 2015). A la mayoría de chichas ecuatorianas suele añadirse como agente endulzante “panela” que es un derivado de la caña de azúcar y por ende una fuente rica de sacarosa. El crecimiento adecuado de los aislados de levaduras ecuatorianas refleja que estas están adaptadas a sustratos similares.

La producción industrial está diseñada para lograr una conversión eficiente de materias primas azucaradas en biomasa de levaduras (Vieira et al., 2013), por lo que un crecimiento eficiente de levaduras en sustratos usuales de melaza es un indicador de la posibilidad o superioridad de una cepa para ser producida como iniciador. Todas las cepas ecuatorianas mostraron un buen crecimiento en medio melaza, con algunas diferencias entre cepas y especies. Las cepas ecuatorianas *S. cerevisiae* EYS4 y EYS5 mostraron un buen crecimiento en el medio melaza y

también una tolerancia al estrés (ver apartado 1.2 de Resultados y Discusión) similar a la cepa vínica comercial L2056 que fue usada como control.

La producción industrial de biomasa de levaduras no-*Saccharomyces* como iniciadores de cultivos involucra la caracterización de su fisiología y requerimientos nutricionales ya que en la mayoría de los casos estos son específicos de la especie e incluso de la cepa. Existen varios estudios en relación a *S. cerevisiae* pero se conoce poco sobre el resto de levaduras no convencionales (Schnierda et al., 2014). El estudiar el crecimiento de estas cepas en melaza permite obtener una idea más clara de su posible aplicación como iniciadores de fermentación ya sea en coinoculaciones o en cultivos puros.

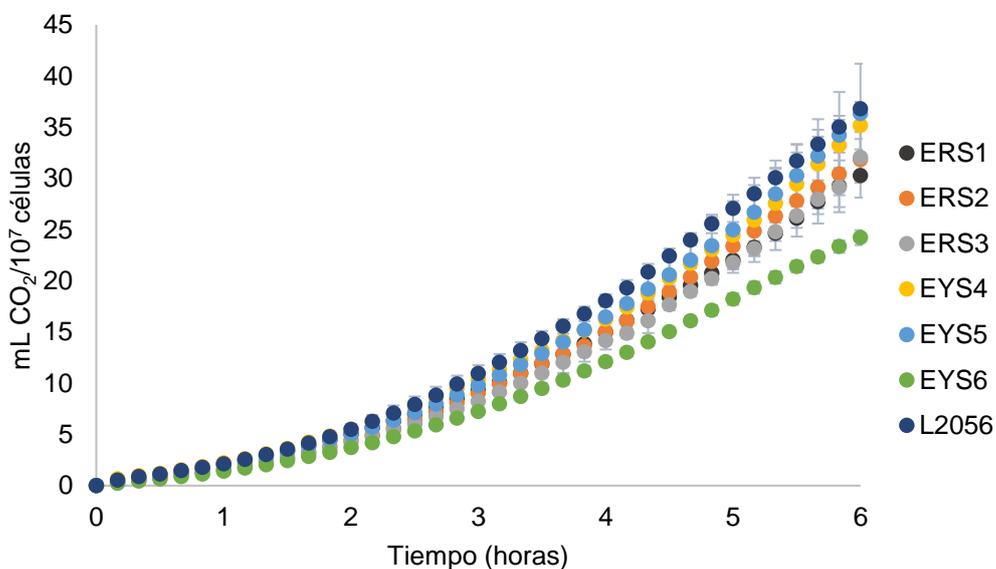
Las cepas ecuatorianas de la especie *T. delbrueckii* mostraron un buen crecimiento en el medio melaza, incluso mejor al de algunas cepas de *S. cerevisiae*. (Figura R1.14B) e incluso los valores finales de viabilidad son similares (y hasta más altos) que los encontrados con las cepas de *S. cerevisiae*. En un estudio sobre patrones de utilización de azúcares de *T. delbrueckii* se encontró que en medios ricos en sacarosa la cepa panadera *T. delbrueckii* PYCC 5321 mostró un crecimiento más lento al de *S. cerevisiae* PYCC 5325 aunque los rendimientos de biomasa fueron equivalentes (Alves-Araújo et al., 2007); estos resultados concuerdan con los obtenidos en nuestra investigación. Las cepas de *Candida sp* también crecieron a una densidad celular similar, siendo EOC1 más rápida que EOC2. Las especies y cepas del género *Candida* presentan muchas diferencias metabólicas entre ellas por lo que la capacidad de asimilar y fermentar azúcares, debido a ser la mayoría de ellas débilmente fermentativas y aerobias, es muy difícil de predecir (Kieliszek et al., 2017); en este trabajo las dos cepas presentan un buen crecimiento en este medio. Las cepas de las especies *Wickerhamomyces anomalus* y *Kodamaea ohmeri* presentaron un crecimiento inferior, aunque no estadísticamente diferente, al de las cepas de *Candida* y *Torulaspota* en cuanto a células viables, pero con mayores DO finales, lo que puede ser debido a un tamaño celular mayor.

1.6. Estudio de la capacidad fermentativa en un medio rico en monosacáridos

Como los diferentes usos industriales de las levaduras requieren de su habilidad para fermentar azúcares de forma eficiente, se realizó un ensayo para determinar la capacidad fermentativa, medida como producción de CO₂, usando un medio rico en monosacáridos fácilmente fermentables (una mezcla equimolar de fructosa y glucosa en cantidad similar al mosto de uva), YPGF. Se usó como cepas control *S. cerevisiae* L2056 y *T. delbrueckii* D291.

Las cepas de *S. cerevisiae* EYS4 y EYS5 mostraron una capacidad fermentativa similar a su cepa control L2056, mientras que el resto mostró una capacidad fermentativa menor, particularmente EYS6 que fue la que peor eficiencia mostró (Figura R1.15A). Valores similares a los obtenidos para las cepas EYS4 y EYS5 se han descrito para la cepa comercial vínica T73 (Gamero-Sandemetro et al., 2014).

A



B

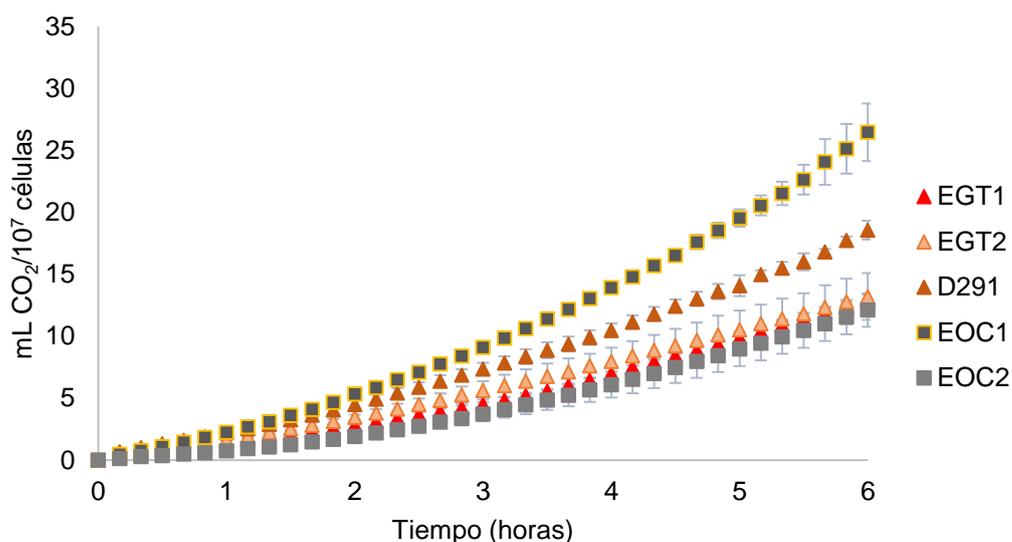


Figura R1.15 Capacidad fermentativa (mL CO₂/10⁷ células) en medio YPGF a partir de biomasa fresca (A) Cepas del género *Saccharomyces* (B) Cepas no-*Saccharomyces*. Las barras de error corresponden a DT de tres experimentos independientes.

Todas las cepas no-*Saccharomyces* mostraron claramente una capacidad fermentativa menor a la de las cepas de *S. cerevisiae* (Figura R1.15B, Tabla R1.7). Esto tiene mucho sentido ya que se ha demostrado en varias investigaciones que el consumo de azúcares es más rápido con levaduras de la especie *S. cerevisiae* que con otras levaduras que no pertenecen a este género (Segura-García et al., 2015). EGT1 y EGT2 mostraron una capacidad fermentativa menor que su cepa de referencia D291. *Candida* EOC2 fue la cepa con la peor capacidad fermentativa, mientras que *Candida* EOC1 fermentó mejor que cualquiera de las cepas de *T. delbrueckii*, esto podría tener relación con su mayor tolerancia al estrés osmótico. Las cepas ecuatorianas estudiadas de la especie *T. delbrueckii* y las cepas de género *Candida* mostraron valores de capacidad fermentativa ligeramente mayor (Tabla R1.7) a las reportadas para cepas vínicas de *T. delbrueckii* y de *C. stellata* (Gamero-Sandemetrio et al., 2018).

Tabla R1.7 Capacidad fermentativa final de biomasa fresca de las cepas de *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *Candida* sp. medida como mililitros de CO₂ producidos por 10⁷ células después de 6 h de crecimiento en medio YPGF. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Especie	Cepa	mL CO ₂ /10 ⁷ células		
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	ERS1	30.01	± 1.74	de
	ERS2	31.83	± 1.66	ef
	ERS3	32.06	± 2.03	ef
	EYS4	36.24	± 0.84	fg
	EYS5	38.98	± 1.18	g
	EYS6	24.22	± 0.59	c
	L2056	36.81	± 0.48	g
<i>Torulaspota delbrueckii</i>	EGT1	13.02	± 0.27	a
	EGT2	12.56	± 1.55	a
	D291	18.56	± 0.62	b
<i>Candida</i> sp.	EOC1	26.46	± 1.90	cd
	EOC2	12.11	± 1.10	a

Se ha determinado que las levaduras domesticadas generalmente tienen, comparadas con las cepas silvestres, una habilidad superior para usar ciertos azúcares típicos de sustratos industriales (como la maltosa en las masas de pan), sin embargo la capacidad de llevar a cabo una fermentación vigorosa, bajo condiciones de estrés osmótico, es muy variable y no depende únicamente de que pueda metabolizar estos azúcares (Bell et al., 2001). Se puede observar que esto se cumple con las cepas silvestres ecuatorianas ya que algunas de ellas poseen una capacidad fermentativa comparable a la de la cepa industrial de referencia.

1.7. Tolerancia a la deshidratación de levaduras seleccionadas para su posible uso como ADY

Solo en ocasiones se utilizan cultivos iniciadores en la obtención de bebidas fermentadas tradicionales a partir de cereales y, en esos casos, son residuos de un proceso de fermentación previo que contiene un concentrado de microorganismos y otros precipitados. Sin embargo, se ha comprobado que en este tipo de “iniciadores”, los microorganismos tienen una actividad fisiológica reducida además de un tiempo de vida muy corto, de días a semanas (Brandt,

2014), por lo que el desarrollo de inóculos estandarizados en forma de levadura seca activa (ADY) sería una solución muy deseable para controlar y mejorar su producción. Para la obtención de este tipo de inóculos, la tolerancia a la deshidratación es una propiedad altamente apreciada, sin embargo dicho proceso es muy dañino para la estructura y funcionalidad de la célula por lo que las levaduras que presentan una mayor tolerancia muestran un mejor desempeño fermentativo cuando se obtienen como ADY (Gamero-Sandemetrio et al., 2014).

Basándonos en los resultados obtenidos en los apartados anteriores, se seleccionaron las cepas *S. cerevisiae* ERS1, EYS4, EYS5 y la cepa *T. delbrueckii* EGT1 como mejores fermentadoras para continuar con los posteriores análisis. Estas cuatro cepas y sus correspondientes controles *S. cerevisiae* L2056 y *T. delbrueckii* PYCC 5321 fueron cultivados en medio melaza y se sometieron a deshidratación. Se seleccionó como control adecuado para estos experimentos la cepa *T. delbrueckii* PYCC 5321 debido a su fenotipo no floculante, más adecuado para la comparación en condiciones de deshidratación.

Como parte inicial de este estudio se planteó la estandarización de las condiciones de deshidratación a escala de laboratorio, para lo que se ensayaron varias estrategias con el fin de obtener un concentrado de levaduras con la consistencia adecuada para poder ser finalmente secado en el equipo de deshidratación. Se estableció como indispensable para poder empezar el proceso un paso previo de secado en discos de papel filtro. El resultado de este trabajo es el proceso detallado en el apartado 4.1 de Materiales y Métodos.

Tras la deshidratación a diferentes tiempos de la biomasa procedente de cultivos en medio melaza se determinó la viabilidad y se comparó con la viabilidad de las células frescas originales (Figura R1.16). Se observó que la tolerancia a la deshidratación es dependiente de cepa, siendo las cepas ERS1 y EYS4 más sensibles, mientras que la cepa EYS5 mostró una mayor resistencia a lo largo de todo el proceso de deshidratación, incluso mayor a la de la cepa control L2056. La cepa *T. delbrueckii* EGT1 mostró también una alta tolerancia a la deshidratación comparada con su cepa de referencia e incluso mayor que L2056 a largos tiempos de secado. Estos resultados están de acuerdo con trabajos previos del grupo de investigación, donde se establecen diferencias entre cepas en relación a la resistencia de las levaduras a los procesos de deshidratación-rehidratación (Gamero-Sandemetrio et al., 2014).

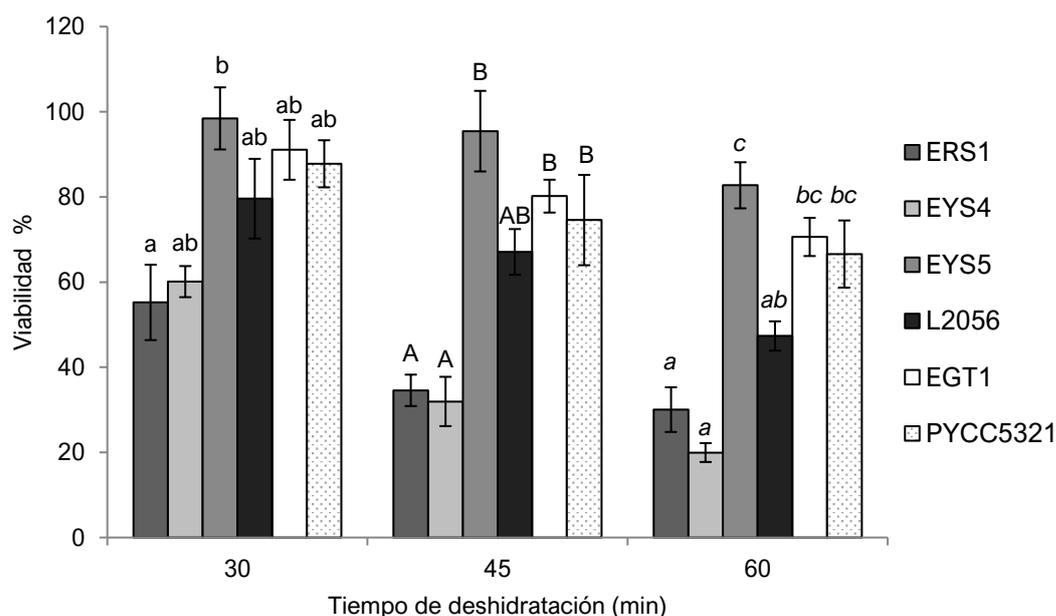


Figura R1.16 Viabilidad de las cepas de levaduras seleccionadas, después de diferentes tiempos de deshidratación (30, 45 y 60 min) en un deshidratador de lecho fluidizado. Se usaron como cepas control *S. cerevisiae* L2056 y *T. delbrueckii* PYCC5321. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

La cepa EYS5 mostró una viabilidad de 82.7 % después de 60 min de deshidratación, similar a la tolerancia reportada para la cepa vínica comercial T73 (79.7 %) (Gamero-Sandemetrio et al., 2014). En un estudio reciente, una buena resistencia a diferentes condiciones de deshidratación fue reportada para la cepa CBS4865 *T. delbrueckii*, su viabilidad fue ≥ 65 % (Câmara et al., 2019). La cepa ecuatoriana de *T. delbrueckii* EGT1 también mostró una fuerte tolerancia a la deshidratación, en el rango de la cepa comercial vínica L2056.

Se llevaron a cabo a continuación cinéticas de deshidratación con el fin de estandarizar el tiempo de secado de cada cepa para obtener aproximadamente un 10% de humedad relativa. Como se puede observar en la figura R1.17, existieron diferencias entre cepas y especies.

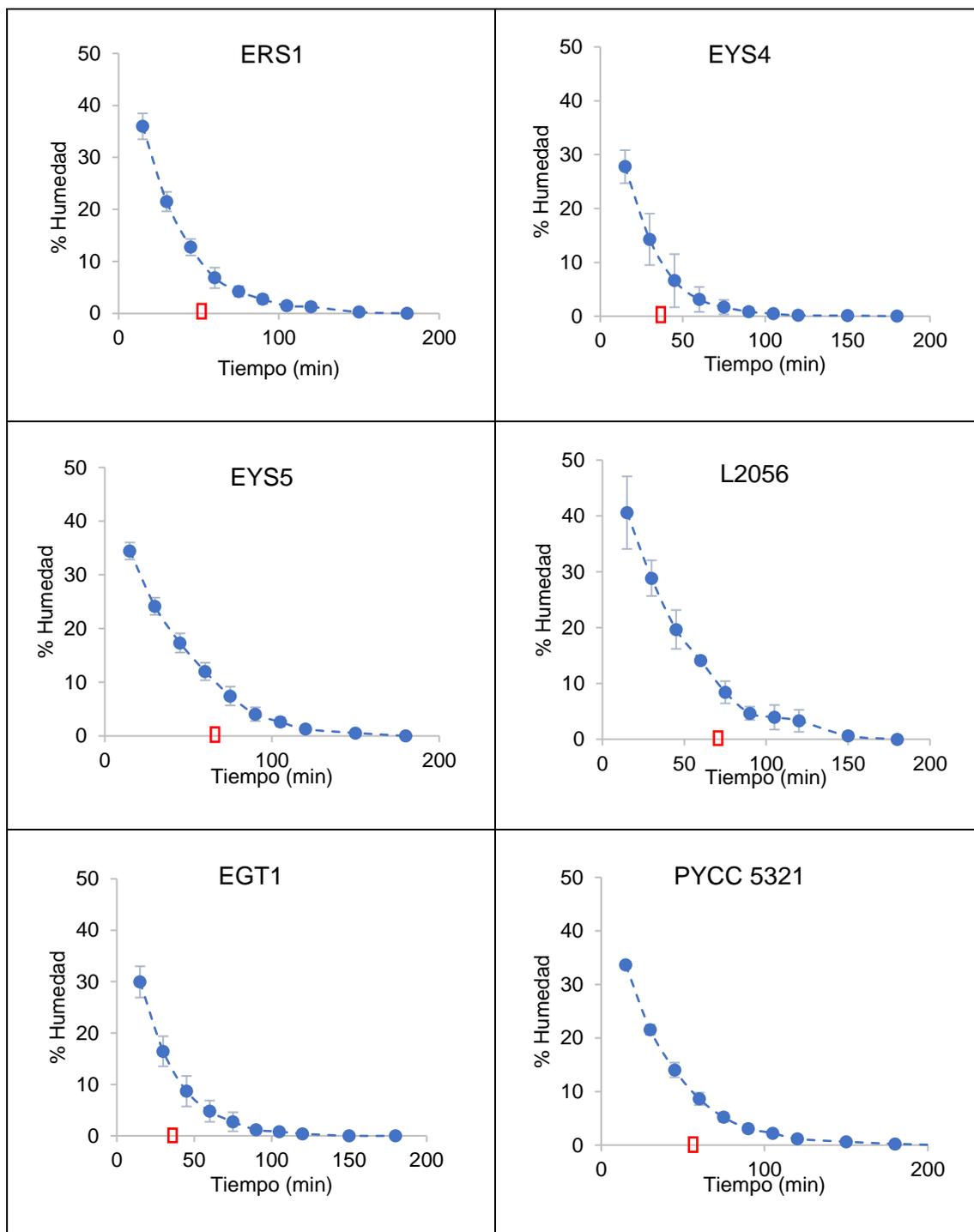


Figura R1.17 Cinética de deshidratación de las levaduras seleccionadas en un deshidratador de lecho fluidizado. El recuadro en rojo señala el tiempo teórico correspondiente a una humedad relativa del 10%.

El cálculo del tiempo teórico se realizó por interpolación lineal entre los dos puntos de la curva (Figura R1.17) entre los que se encontraban valores de humedad relativa de 10 %. Basándonos en el valor teórico y las correspondientes desviaciones estándar, se decidió establecer tres tiempos distintos de deshidratación para las 6 cepas (Tabla R1.8). Es importante aclarar que se notó

una variabilidad importante de un lote a otro (desviación estándar cercana a 5% en algunos casos).

Tabla R1.8 Tiempos de deshidratación (teórico y experimental) en cada cepa seleccionada para obtener un 10 % de humedad relativa.

Cepa	Tiempo (min)	
	Teórico	Experimental
ERS1	52.15 ± 3.56	53
EYS4	42.2 ± 5.94	40
EYS5	68.41 ± 2.23	68
L2056	70.23 ± 2.99	68
EGT1	42.48 ± 4.78	40
PYCC 5321	56.13 ± 2.85	53

Una vez estandarizados los tiempos de deshidratación, se midió la viabilidad y la capacidad fermentativa de la biomasa secada en estas condiciones. En la tabla R1.9 se detallan los valores obtenidos para cada cepa seleccionada.

Tabla R1.9 Porcentaje de viabilidad y capacidad fermentativa final de la biomasa deshidratada (HR ~ 10 %) de las cepas de *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, medida como mililitros de CO₂ producidos por 10⁷ células después de 6 h de crecimiento en medio YPGF. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí (p < 0.05), están indicados con letras distintas.

Cepa	Tiempo de	% Viabilidad	Capacidad
	deshidratación (min)		fermentativa mL CO ₂ /10 ⁷ células
ERS1	53	29.09 ± 1.55 ^a	8.78 ± 0.94 ^a
EYS4	40	44.91 ± 1.15 ^b	19.13 ± 0.87 ^b
EYS5	68	63.68 ± 1.44 ^c	14.94 ± 0.83 ^b
L2056	68	27.80 ± 1.14 ^a	17.12 ± 0.79 ^b
EGT1	40	83.35 ± 1.08 ^e	6.61 ± 0.75 ^a
PYCC5321	53	74.55 ± 1.27 ^d	5.43 ± 0.58 ^a

Es importante aclarar que, pese a que los tiempos de deshidratación no eran iguales para todas las cepas, se compararon los valores obtenidos al tener como factor común la humedad relativa del 10 %. Como se puede ver en la tabla R1.9,

en la mayoría de las cepas *S. cerevisiae* ensayadas, excepto la cepa EYS5, un mayor tiempo de deshidratación supone menor viabilidad. En el caso de las cepas *T. delbrueckii* los valores de viabilidad fueron los más altos pese al tratamiento de secado, la cepa EGT1 presentó la viabilidad más alta de todas las cepas evaluadas.

En cuanto a capacidad fermentativa, la cepa *S. cerevisiae* ERS1 y las dos cepas de la especie *T. delbrueckii* mostraron una capacidad fermentativa más baja. No se encontraron diferencias estadísticas en los valores finales de capacidad fermentativa entre las cepas EYS4, EYS5 y la cepa vínica de referencia L2056 pese a que existía una diferencia importante en la viabilidad de las mismas. Los valores de capacidad fermentativa encontrados para las tres cepas de *S. cerevisiae* ERS4, ERS5 y L2056 son superiores a los descritos para la cepa industrial vínica T73 (10.52 ± 0.30) (Gamero-Sandemetro et al., 2018), posiblemente las diferencias en la técnica de deshidratación usadas permitió que además de que se logre una mayor viabilidad también se tenga una mayor capacidad fermentativa. En relación a las cepas de la especie *T. delbrueckii*, las dos presentaron valores de capacidad fermentativa muy inferiores a las encontradas para las cepas de *S. cerevisiae*, a diferencia de lo descrito por Gamero-Sandemetro et al., (2018) para otras cepas distintas de esta especie.

1.8. Análisis de parámetros redox en levaduras seleccionadas tras el proceso de deshidratación

Durante la producción de levadura activa seca, los sistemas antioxidantes juegan un papel esencial en la supervivencia y vitalidad de la célula ya que tanto la propagación de biomasa como la deshidratación causan estrés oxidativo y afectan negativamente su desempeño tecnológico. Los mecanismos de defensa antioxidante mejorados naturalmente en ciertas cepas, previenen este daño oxidativo y mejoran su capacidad fermentativa (Gamero-Sandemetro et al., 2014). Es por ello que existe un creciente interés en la búsqueda de cepas de levaduras que presenten además de características fisiológicas favorables para el proceso fermentativo, una mayor tolerancia a condiciones de estrés típicas del proceso de producción de ADY. En esta investigación se decidió analizar tres de los parámetros redox descritos como indicadores de la tolerancia de las cepas seleccionadas a la deshidratación: niveles de trehalosa, niveles de glutatión y peroxidación de lípidos.

1.8.1. Niveles de trehalosa

Se analizaron los niveles de trehalosa de las cuatro cepas ecuatorianas seleccionadas y sus correspondientes controles *S. cerevisiae* L2056 y *T. delbrueckii* PYCC 5321, tanto en células frescas tras cultivo en medio melaza

durante 24 h, como en células deshidratadas durante los tiempos detallados en la tabla R1.8. Es importante notar que hay una importante variabilidad en los niveles de trehalosa basales en las diferentes cepas, característica que ha sido descrita en *S. cerevisiae*, siendo la cepa EYS4 la que presenta mayor acumulación de trehalosa en fresco y EYS5 menor. Como se puede observar en la figura R1.18, la cepa *S. cerevisiae* EYS4 muestra también los niveles más altos de trehalosa tanto en células frescas como en células deshidratadas, mientras que la cepa ERS1 muestra niveles bajos en condiciones de deshidratación. En relación a las cepas de la especie *T. delbrueckii*, la cepa ecuatoriana EGT1 muestra valores más altos y significativamente diferentes a los encontrados para la cepa panadera de referencia PYCC 5321, particularmente en condiciones de deshidratación. Los niveles de trehalosa obtenidos para la cepa EYS4 fueron los más altos de todas las cepas evaluadas, incluso mayor que el de la cepa de referencia L2056, esta cepa también mostró una capacidad fermentativa alta similar al de su cepa control (Tabla R1.7).

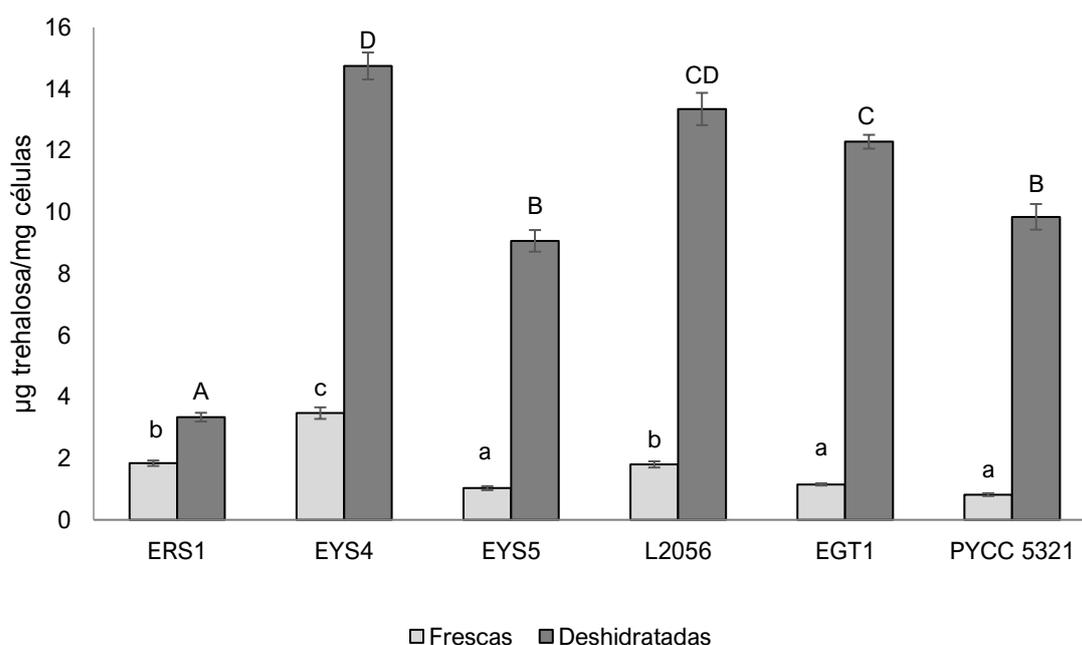


Figura R1.18 Niveles de trehalosa en las células frescas y deshidratadas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Dada la heterogeneidad en la acumulación basal de trehalosa en células frescas, es difícil obtener conclusiones respecto de la relación entre la acumulación de trehalosa y la capacidad fermentativa de las células tras la deshidratación, por ello se calculó el incremento en el nivel de trehalosa en células deshidratadas tomando como base el obtenido en células frescas, dado que ese dato refleja mejor la respuesta de adaptación de las diferentes cepas. Como puede

observarse en la Tabla R1.10, los valores más altos corresponden a las dos cepas de la especie *T. delbrueckii* seguido por la cepa *S. cerevisiae* EYS5 mientras que los valores más bajos corresponden a las cepas ERS1, EYS4 y EGT1 que presentan una menor inducción de la acumulación de trehalosa respecto a sus cepas control, indicando que las cepas ecuatorianas, excepto EYS5, presentan un grado de inducción de trehalosa menor. El mayor incremento en el nivel de trehalosa al deshidratar, observado para las cepas EYS5 y EGT1, podría también estar relacionado con la mejor respuesta al proceso de deshidratación.

Tabla R1.10 Incremento en el nivel de trehalosa en células deshidratadas tomando como base los valores obtenidos en células frescas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Especie	CEPA	Factor de incremento
<i>S. cerevisiae</i>	ERS1	0.81 ± 0.01 ^a
	EYS4	3.26 ± 0.14 ^b
	EYS5	7.82 ± 0.30 ^d
	L2056	6.41 ± 0.17 ^c
<i>T. delbrueckii</i>	EGT1	9.66 ± 0.19 ^e
	PYCC 5321	11.01 ± 0.24 ^f

En células deshidratadas una mayor acumulación de trehalosa suele estar relacionada con una mayor viabilidad y supervivencia en los posteriores procesos. Al ser la trehalosa un carbohidrato de reserva, este puede ser la fuente de carbono y energía necesaria para que la célula pueda adaptarse rápidamente a un nuevo medio de crecimiento que se refleja en una movilización rápida de trehalosa durante las primeras horas de inoculación de ADY (Novo et al., 2009). En las cepas deshidratadas de la especie *T. delbrueckii* el nivel de trehalosa fue 10 veces más alto que el obtenido en células frescas y en el caso de la cepa *S. cerevisiae* EYS5 fue 8 veces mayor.

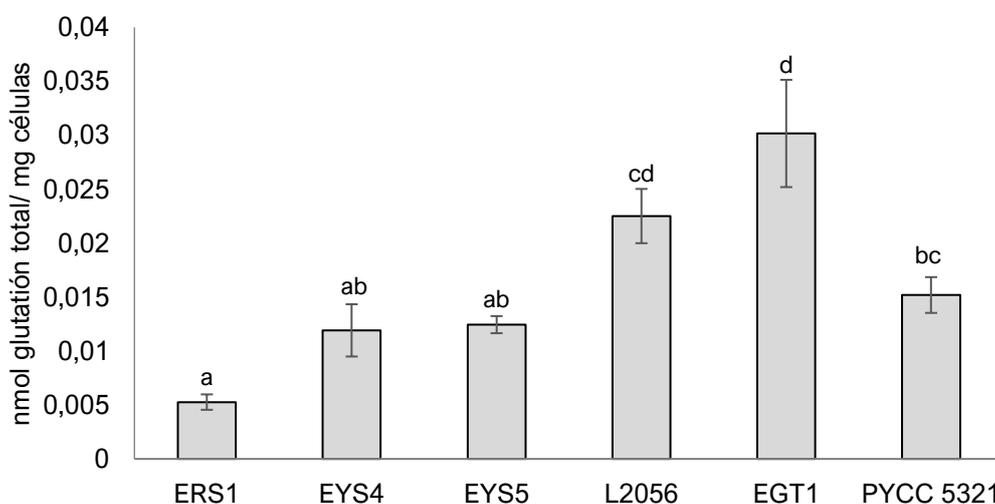
Se ha encontrado que las levaduras pueden acumular niveles de trehalosa hasta 13 % de su masa seca bajo condiciones de ayuno de carbono y nitrógeno (Aranda et al., 2004). Experimentos similares podrían realizarse con las cepas ecuatorianas para analizar su comportamiento y posible mejora bajo esas condiciones. Según Ratnakumar y Tunnacliffe, (2006), la trehalosa es necesaria pero no suficiente para mejorar cuantitativamente la supervivencia a la desecación en algunas cepas silvestres y pueden existir otras adaptaciones que sean más importantes es por ello que se analizan parámetros adicionales.

Resultados similares a los obtenidos en este trabajo fueron descritos por Gamero-Sandemetro et al., (2014) en cepas vínicas de la especie *S. cerevisiae* donde las cepas seleccionadas tolerantes a la deshidratación y que además mostraban una capacidad fermentativa más alta mostraban también altos niveles de trehalosa.

1.8.2. Niveles de glutatión

En relación a la cantidad de glutatión total en células frescas y en células deshidratadas, se observó de forma generalizada un incremento notable en las células deshidratadas; los valores más altos los presentaron la cepa ecuatoriana EGT1 y la cepa control PYCC 5321 de la especie *T. delbrueckii* (Figura R1.18B). En el grupo de cepas de la especie *S. cerevisiae* se encontraron valores similares en todas las cepas deshidratadas. Sin embargo, en su estado fresco se encontraron importantes diferencias, la cepa de referencia L2056 presentó los valores más altos de este grupo (Figura R1.19A). El valor más alto de glutatión total de todas las cepas evaluadas en su estado fresco correspondió a la cepa ecuatoriana *T. delbrueckii* EGT1.

A



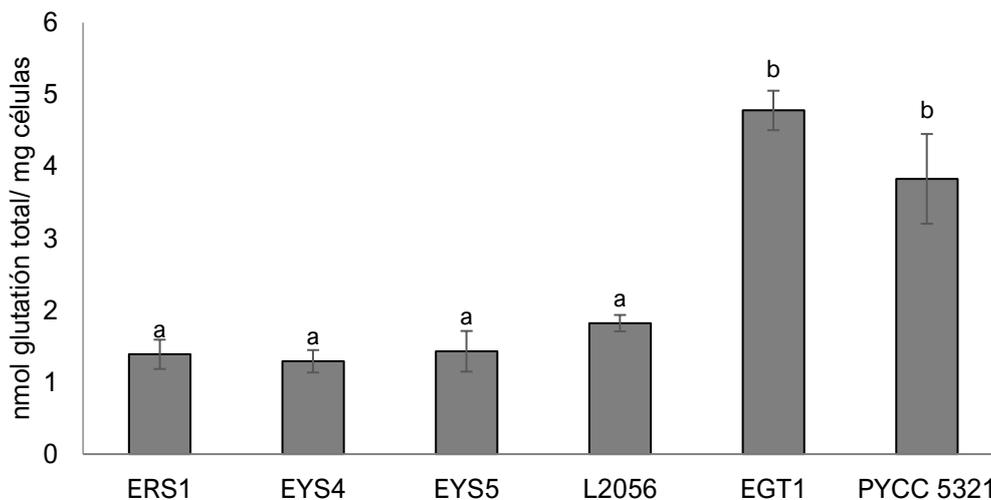
B

Figura R1.19 Niveles de glutatión total en células frescas (A) y en células deshidratadas (B). Las escalas son diferentes para cada figura. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Al analizar los niveles de glutatión oxidado encontramos que los valores más altos lo presentaron las dos cepas de la especie *T. delbrueckii* (EGT1 y PYCC 5321) lo que sugiere un mayor estrés oxidativo. En general, los niveles de GSSG aumentaron significativamente en las células deshidratadas (Figura R1.20), lo que indica nuevamente el aumento de estrés oxidativo en estas condiciones experimentales, no se encontraron diferencias estadísticas entre los valores de glutatión oxidado en células frescas. En cuanto a las cepas de la especie *S. cerevisiae*, la cepa EYS5 presentó los menores niveles de GSSG tras la deshidratación que podría correlacionarse con su mayor viabilidad tras la deshidratación (Tabla R1.9).

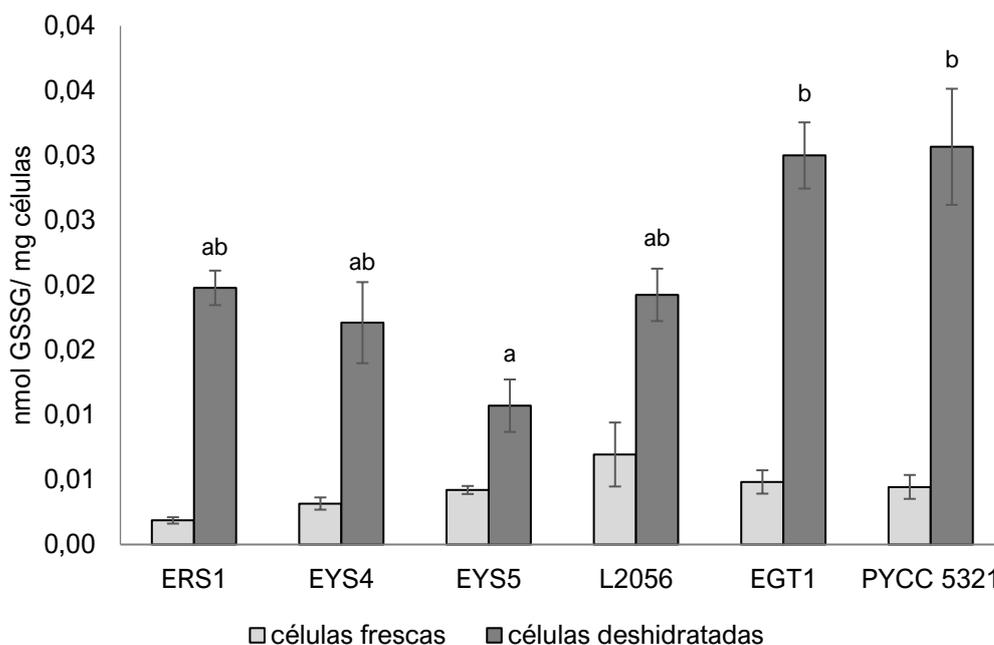


Figura R1.20 Niveles de glutatión oxidado (GSSG) en células frescas y deshidratadas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

En cuanto a los valores encontrados para la relación entre el glutatión reducido y el glutatión oxidado (relación GSH/GSSG), parámetro que mejor indica el estado redox celular, las dos cepas ecuatorianas *S. cerevisiae* EYS5 (132.25 ± 1.21) y *T. delbrueckii* EGT1 (158.61 ± 4.44) presentaron los valores más altos en células deshidratadas (Figura R1.21) lo cual podría estar relacionado con su mayor tolerancia a la deshidratación reflejada en una mayor viabilidad celular (Figura R1.16). Estos son mucho mayores a los de las cepas de referencia y también a los descritos por Gamero-Sandemetro et al., (2018) para las dos cepas vónicas *S. cerevisiae* T73 (98.18 ± 5.12) y *T. delbrueckii* (37.56 ± 5.78), pero deshidratadas en condiciones diferentes. Estas dos cepas además presentaron valores de viabilidad muy altos después de la deshidratación que podrían estar relacionados con este parámetro.

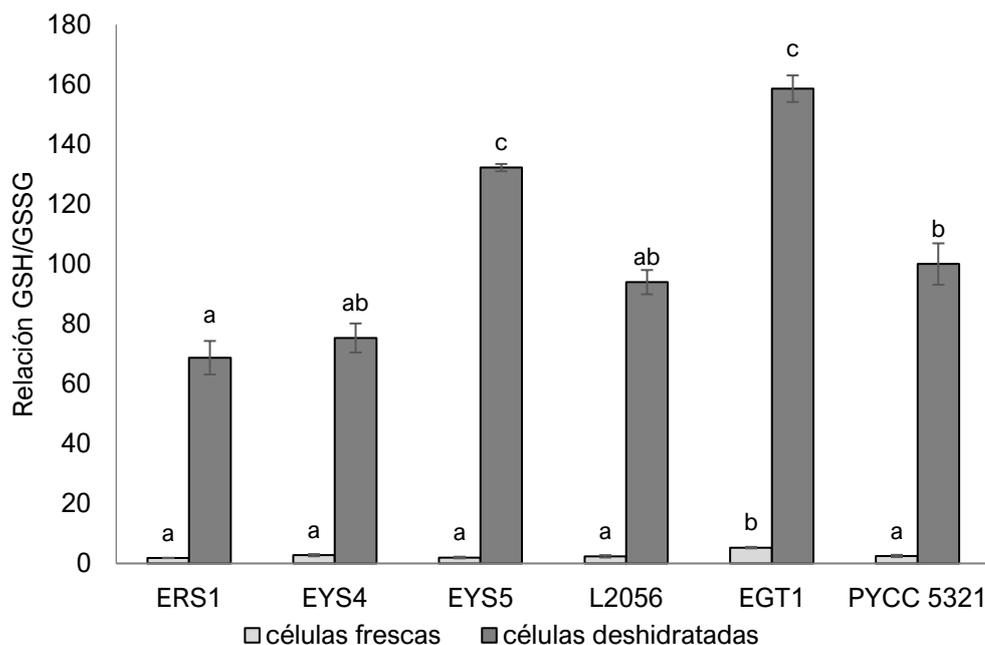


Figura R1.21 Relación GSH/GSSG en células frescas y deshidratadas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

1.8.3. Peroxidación de lípidos

La peroxidación de lípidos es un indicador del daño oxidativo. Como se puede observar en la Figura R1.22, en células deshidratadas existe un mayor grado de peroxidación de lípidos y, por tanto, mayor daño oxidativo, en concordancia con lo observado en los dos análisis anteriores de parámetros redox (niveles de glutatión oxidado y de trehalosa). Como ya se ha comentado en los parámetros redox analizados anteriormente, hay gran heterogeneidad en los niveles basales entre las distintas cepas. En células frescas el valor más bajo correspondió a la cepa EYS4 y en células deshidratadas ERS1 y EYS4 son las que muestran los valores más bajos incluso que la cepa control. Los niveles más altos de peroxidación de lípidos en células deshidratadas se obtuvieron en las cepas EYS5 y L2056, mientras que el valor más bajo lo obtuvimos para la cepa *T. delbrueckii* EGT1 tanto en células frescas como en células deshidratadas.

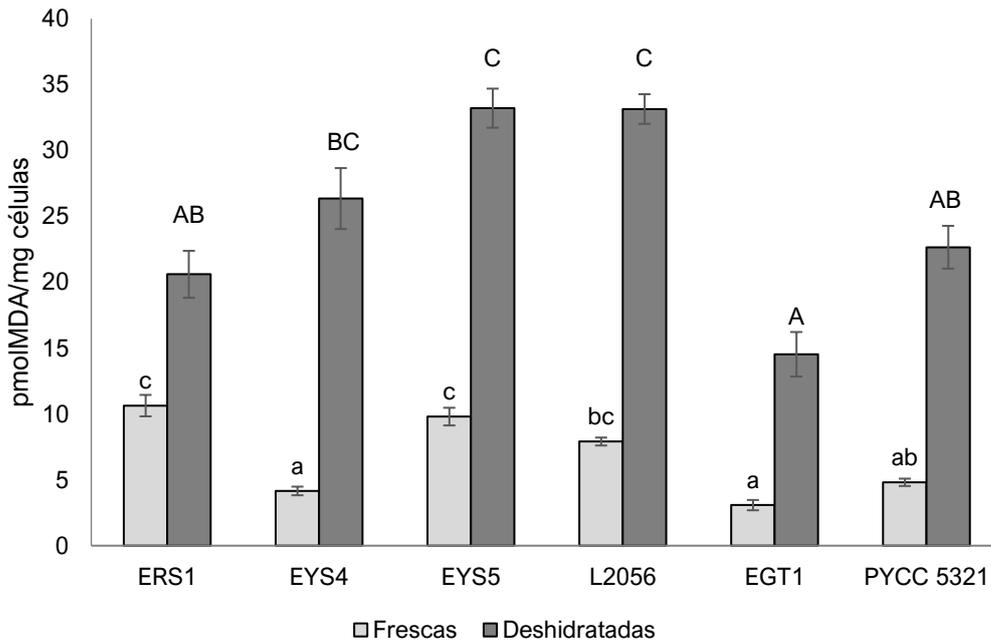


Figura R1.22 Niveles de peroxidación de lípidos en células frescas y deshidratadas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Para poder comparar mejor entre cepas con niveles basales de peroxidación lipídica diferentes, se calculó el incremento en el nivel de peroxidación de lípidos en células deshidratadas tomando como base el obtenido en células frescas. En la Tabla R1.11 puede observarse que los valores más altos corresponden a la cepa *S. cerevisiae* EYS4 seguida por las dos cepas de la especie *T. delbrueckii* mientras que los valores más bajos corresponden a las cepas ERS1 y EYS5. Un menor incremento en el nivel de peroxidación estaría relacionado con un menor daño celular tras el proceso de deshidratación, la cepa EYS5 mostró una alta tolerancia a la deshidratación y además muestra un menor incremento que la cepa control en este parámetro que podría estar relacionado con ello.

Tabla R1.11 Incremento en el nivel de peroxidación de lípidos tomando como base los valores obtenidos en células frescas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Especie	Cepa	Factor de incremento
<i>S. cerevisiae</i>	ERS1	0.94 ± 0.02^a
	EYS4	5.34 ± 0.06^e
	EYS5	2.39 ± 0.08^b
	L2056	3.19 ± 0.02^c
<i>T. delbrueckii</i>	EGT1	3.72 ± 0.05^d
	PYCC 5321	3.70 ± 0.06^d

Según Saini et al., (2018) uno de los mecanismos de la trehalosa como protector ante el estrés está relacionado con la reducción en la peroxidación de lípidos. La cepa EYS5 es la que presenta el incremento mas alto en niveles de trehalosa en condiciones de deshidratación (Figura R1.18) que podrían estar relacionados con el bajo incremento en los niveles de peroxidación de lípidos bajo estas condiciones.

Considerando de forma global los resultados del análisis de los parámetros redox estudiados, se observa que las dos cepas *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1, cuya tolerancia a la deshidratación fue mucho mayor incluso que sus respectivos controles, mostraron los niveles más bajos de glutatión oxidado y los valores más altos del ratio GSH/GSSG lo que podría estar estrechamente relacionado con su mayor resistencia a la deshidratación y corrobora la utilidad de este parámetro como indicador de tolerancia a este tratamiento ya que juega un rol significativo en el mantenimiento del balance redox intracelular durante la deshidratación (Espindola et al., 2003). Aunque, consistentemente, las cepas EGT1 y EYS5 mostraron los valores más bajos de incremento en la peroxidación de lípidos.

Para complementar esta información se podrían analizar otros genes biomarcadores relevantes en la tolerancia al estrés del proceso de deshidratación, como *GSH1* y *GPD1* implicados en la síntesis de glutatión y de glicerol, respectivamente (Pérez-Torrado et al., 2015). Además se ha determinado en investigaciones previas que el efecto perjudicial del estrés oxidativo inducido en el proceso de producción de ADY puede ser prevenido y aliviado mediante sistemas complejos de señalización, desintoxicación y protección de proteínas, que pueden ser inducidos por tratamientos antioxidantes, como el tratamiento con aceite de argán, que mejora el

rendimiento de biomasa y la capacidad fermentativa de las levaduras (Gamero-Sandemetro et al., 2015, 2019), por lo que futuras investigaciones con las dos cepas ecuatorianas podrían realizarse con la aplicación de estos tratamientos.

1.9. Análisis de rasgos de domesticación de las levaduras seleccionadas

La domesticación de levaduras es una estrategia muy usada a nivel industrial para asegurar la calidad del producto final, así como para estandarizar los procesos de interés. A nivel artesanal una posible estrategia inicial de domesticación de los inóculos microbianos es el uso de residuos de fermentaciones anteriores como suele hacerse en la preparación de ciertas chichas. Existen escasos estudios que analicen el origen de las levaduras de la especie *S. cerevisiae* de chichas latinoamericanas y se conoce muy poco sobre posibles eventos de domesticación en las cepas asociadas a estas bebidas. Una pregunta todavía abierta es si los eventos de domesticación hasta el momento descritos, involucran la selección artificial de linajes locales de *S. cerevisiae* silvestres o, están relacionados con la utilización de un linaje domesticado disperso globalmente (Barbosa et al., 2016). Es por ello que estudios como este podrían contribuir a un mejor entendimiento sobre el origen de las cepas asociadas a estas bebidas tradicionales, además de describir los rasgos de domesticación que estas suelen presentar.

1.9.1. Morfología celular y de colonia de las cepas ecuatorianas de la especie *S. cerevisiae*

En relación a la morfología celular de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas a partir de chichas ecuatorianas, se encontraron algunas diferencias, especialmente con aquellas aisladas a partir de la chicha de arroz (RC) como se puede observar en la Figura R1.23. Las cepas ERS1, ERS2 y ERS3 mostraron una morfología caracterizada por células grandes y alargadas mientras que las células de la cepa EYS6 eran mucho más pequeñas y redondas, y aparecían siempre en agregados. Las cepas EYS4 y EYS5 mostraron una morfología más parecida a la de la cepa de referencia L2056.

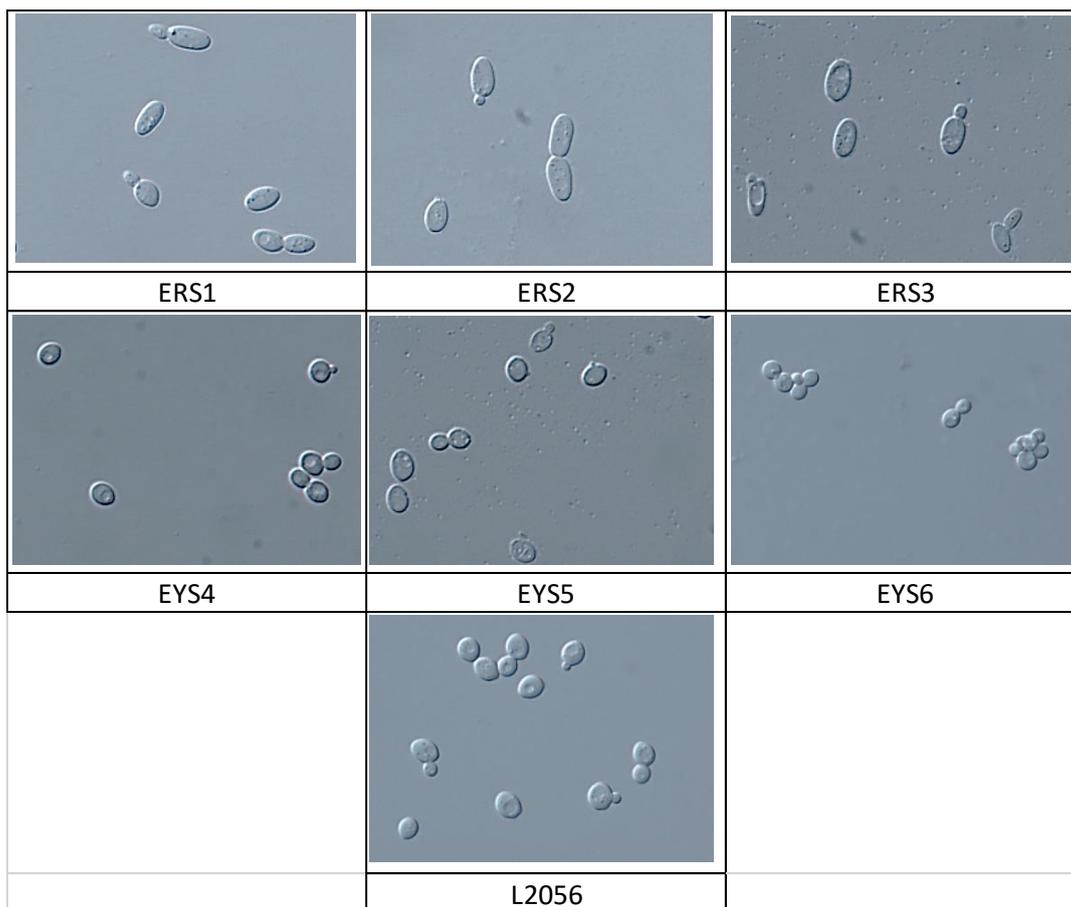


Figura R1.23 Imágenes microscópicas (Nikon eclipse 90i) de las cepas de *S. cerevisiae* estudiadas tras 24 h de crecimiento en medio YPD.

Una morfología celular alargada muy similar a las de las cepas ERS1, ERS2 y ERS3 ha sido descrita para una cepa *S. cerevisiae* silvestre aislada en cerveza de jengibre en Costa de Marfil. Además se ha determinado que la variación natural en un único gen esencial, *CDC28*, produce cambios importantes en la forma de la célula en la división meiótica y mitótica (Lee et al., 2011).

Por otro lado, se encontraron también diferencias en la morfología de las colonias de las seis cepas luego de 6 días de incubación en YPD a 30°C, como se puede observar en la Figura R1.24. Las cepas aisladas a partir de chicha de arroz (ERS1, ERS2, ERS3) presentan una morfología similar, colonias esponjosas de tipo encaje, mientras que las cepas EYS4 y EYS5 tienen una morfología lisa más parecida a la de la cepa de referencia L2056. Así pues, hay una manifestación macroscópica de la forma celular diferencialmente alargada de estas cepas. La cepa EYS6 presenta una morfología distinta a las demás, aunque más parecida a la de las cepas con morfología tipo lisa.

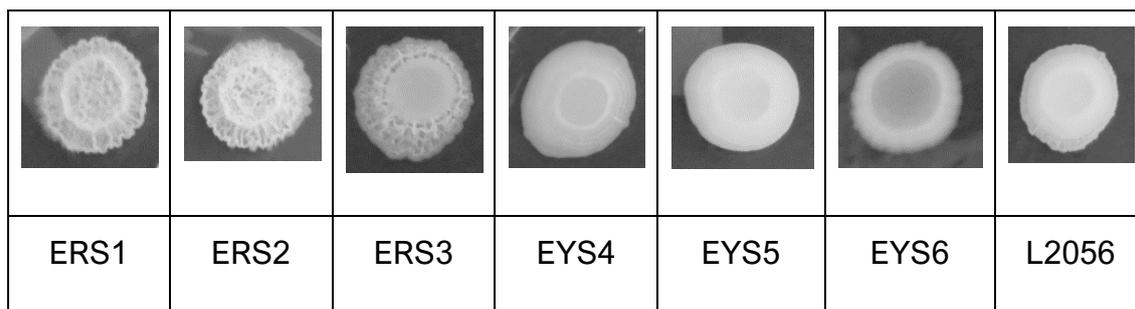


Figura R1.24 Imágenes de las colonias de las cepas de *S. cerevisiae* estudiadas tras 6 días de crecimiento en medio YPD a 30°C.

Según Granek y Magwene (2010), estas diferencias en la morfología de las colonias de la especie *S. cerevisiae* es muy compleja y se atribuyen a varios factores, como la respuesta a la limitación de fuentes de carbono fermentables y de nitrógeno, diferencias en la ploidía, tipo de reproducción, etc. Las colonias complejas se han relacionado con una actividad alta de la ruta PKA. Esto implicaría una termosensibilidad baja, que es precisamente lo observado para las cepas ERS1, ERS2 y ERS3 a 37 °C (Tabla R1.4). Se ha determinado que el cambio de una morfología de colonia esponjosa tipo encaje, como lo observado en las cepas ERS1, ERS2, ERS3, a un tipo liso (L2056, EYS5 y EYS6), es reflejo de un proceso de domesticación. Según Kuthan et al., (2003) el crecimiento en colonias esponjosas, determinado en algunas cepas silvestres de la especie *S. cerevisiae*, se debe a que las células dentro de estas colonias están conectadas con un material de matriz extracelular (ECM) que contiene una proteína de aproximadamente 200 kDa involucrada en la adhesión célula a célula en medios líquidos. Una vez que es cultivada en condiciones de laboratorio en medios sólidos, la producción de ECM se pierde, ya que todas las cepas domesticadas presentan una morfología de colonia tipo lisa. Este cambio fenotípico de morfología de la colonia está asociado con cambios importantes en la expresión de más de 320 genes asociados con el metabolismo de carbohidratos, pared celular, canales de agua, transposones Ty, genes subteloméricos, homeostasis del hierro, metabolismo de las vitaminas, ciclo celular y polaridad por lo que posiblemente esta morfología podrían representar una estrategia metabólica para la supervivencia de las levaduras a condiciones desfavorables en su ambiente natural (Kuthan et al., 2003).

1.9.2. Floculación y producción de compuestos fenólicos (*POF behavior*)

Dos rasgos de domesticación bien documentados en levaduras cerveceras son la producción de 4-vinil guayacol (compuesto activo de aroma desagradable derivado del ácido ferúlico) (Gallone et al., 2018) y la floculación en el momento exacto en el que los azúcares fermentables han sido convertidos a CO₂ y etanol (Steensels y Verstrepen, 2014). Se analizaron estos parámetros tanto en un

medio rico en glucosa como en maltosa, usando la cepa cervecera floculante y POF (+) A-81062 como referencia. Los resultados se detallan en la tabla R1.12.

Tabla R1.12 Floculación y producción de compuestos fenólicos (POF) de las levaduras estudiadas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Atributo	ERS1	EYS4	EYS5	L2056	A-81062	A-63015	EGT1	D291
	<i>S. cerevisiae</i>				<i>S. pastorianus</i>		<i>T. delbrueckii</i>	
POF	(+)	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)	(-)
Floculación	0.88 ±	6.28 ±	6.02 ±	6.96 ±	86.54 ±	2.54 ±	11.64 ±	52.88 ±
YPD (%)	0.06 ^a	1.34 ^b	0.75 ^{ab}	0.36 ^{bc}	3.87 ^e	0.82 ^{ab}	1.26 ^c	3.4 ^d
Floculación	18.46 ±	12.87 ±	3.95 ±	5.02 ±	95.03 ±	16.23 ±	3.63 ±	4.51 ±
YPM (%)	1.01 ^b	2.19 ^b	0.18 ^a	0.47 ^a	1.51 ^c	2.71 ^b	0.81 ^a	0.17 ^a

Como se observa, ninguna de las cepas ecuatorianas fue floculante y la cepa EYS5 fue la única POF negativa. Una floculación leve (18.46 %) se observó en YPM para la cepa ecuatoriana *S. cerevisiae* ERS1 sin embargo, según Bellut et al., (2018) un porcentaje de floculación menor al 20 % corresponde al fenotipo “no floculante” por lo que ERS1 muestra nuevamente características de una cepa no domesticada.

La cepa EYS5 es la única con un comportamiento POF negativo, aunque no fue floculante. Es necesario mencionar que, pese a que en este experimento la floculación fue negativa para esta cepa, se observó (visualmente) en todos los ensayos realizados una sedimentación rápida en todos los medios usados (YPD, YPM, Melaza), por lo que valdría la pena analizar este factor con mayor profundidad. Según Verstrepen et al., (2003) la floculación en levaduras es un fenómeno muy complejo y específico de cada cepa que está controlado por varios factores que afectan la composición y morfología de la pared celular como condiciones nutricionales, oxígeno disuelto, pH, entre otros. El perfil floculante de una misma cepa puede cambiar de acuerdo a las condiciones de su crecimiento por lo que se podría intentar utilizar métodos alternativos para determinar el perfil de sedimentación de esta cepa como el mencionado por Reis et al., (2017) que fue usado para determinar el perfil floculante de levaduras silvestres aisladas en Brasil.

En relación a la cepa ecuatoriana EGT1 de la especie *T. delbrueckii*, se encontró que esta muestra rasgos de un fenotipo no domesticado, sin embargo se podría analizar la cepa EGT2 que mostró un fenotipo inicial floculante para determinar

si en las chichas ecuatorianas existen también cepas domesticadas de esta especie. Según Albertin et al., (2014), la especie *T. delbrueckii* es la única levadura no-*Saccharomyces* de la que se han encontrado muchas cepas que muestran varios rasgos de domesticación, tanto en fermentaciones vínicas como en otros bioprocesos.

1.9.3. Asimilación de diferentes azúcares típicos de sustratos industriales

Uno de los rasgos de domesticación más frecuente en levaduras es la fermentación de azúcares no comunes en la naturaleza pero si en sustratos industriales, como maltosa, maltotriosa y xilosa (Steensels y Verstrepen, 2014). Es por ello que se realizó un análisis de asimilación de diferentes azúcares presentes en mostos de cerveza y vino. Para la comparación de resultados se usaron como cepas de referencia las levaduras vínicas *S. cerevisiae* L2056, *T. delbrueckii* D291 y las levaduras cerveceras de la colección del VTT, *S. cerevisiae* A-81062 y *S. pastorianus* A-63015.

Todas las cepas ecuatorianas investigadas en este trabajo, excepto EYS5, fueron incapaces de fermentar maltosa y maltotriosa (Tabla R1.13). Sin embargo, todas las cepas fueron capaces de fermentar glucosa, fructosa y sacarosa que son azúcares comunes en vino, melazas y chichas.

Tabla R1.13 Perfil general de utilización de azúcares de las levaduras estudiadas.

Azúcares	ERS1	EYS4	EYS5	L2056	A-81062	A-63015	EGT1	D291
	<i>S. cerevisiae</i>				<i>S. pastorianus</i>		<i>T. delbrueckii</i>	
Glucosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Fructosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Sacarosa	+	+	+	+	+	+	+	+
Maltosa	-	-	+	+	+	+	-	-
Maltotriosa	-	-	+	+	+	+	-	-
Melobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Celobiosa	-	-	-	-	-	-	-	-
Rafinosa	+	+	+	+	+	+	+	+

La maltosa y maltotriosa son las fuentes de carbono más abundantes y específicas en el mosto de cerveza por lo que la fermentación eficiente de los dos azúcares es parte del comportamiento fenotípico de cepas domesticadas en ambientes cerveceros (Gallone et al., 2016), por lo tanto la mayoría de las cepas ecuatorianas muestran un fenotipo no domesticado, siendo EYS5 la excepción.

Steensels y Verstrepen, (2014) encontraron que solo el 12 % de las cepas no domesticadas categorizadas en este estudio como silvestres y el 36% de las cepas de la especie *S. cerevisiae* cuyo origen eran nichos industriales, fueron capaces de fermentar al menos el 50% de todos los azúcares disponibles en el mosto de cerveza. El hecho de que la mayoría de las cepas ecuatorianas seleccionadas muestre un fenotipo no domesticado coincide con estos resultados.

En la tabla R1.14 se encuentran detallados el tiempo de latencia (λ) en el medio suplementado con cada azúcar analizado y la velocidad máxima de crecimiento (μ).

Tabla R1.14 Tiempo de latencia (λ) y velocidad máxima de crecimiento (μ) en medios con diferentes azúcares para las levaduras seleccionadas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Cepa	Glucosa		Fructosa		Sacarosa	
	μ (max OD)	λ (horas)	μ (max OD)	λ (horas)	μ (max OD)	λ (horas)
ERS1	1.28 ± 0.05 ^b	3.96 ± 0.20 ^a	1.37 ± 0.02 ^b	4.27 ± 0.14 ^b	1.32 ± 0.04 ^b	5.11 ± 0.24 ^{cd}
EYS4	1.23 ± 0.06 ^b	4.63 ± 0.36 ^b	1.43 ± 0.02 ^{bc}	5.04 ± 0.07 ^c	1.46 ± 0.02 ^{cd}	4.01 ± 0.08 ^{ab}
EYS5	1.27 ± 0.04 ^b	4.38 ± 0.26 ^{ab}	1.41 ± 0.01 ^{bc}	5.05 ± 0.11 ^c	1.36 ± 0.05 ^{bc}	4.25 ± 0.21 ^{ab}
L2056	1.24 ± 0.02 ^b	4.45 ± 0.20 ^{ab}	1.40 ± 0.02 ^{bc}	5.03 ± 0.12 ^c	1.37 ± 0.02 ^{bc}	4.01 ± 0.12 ^{ab}
EGT1	1.46 ± 0.02 ^c	5.45 ± 0.31 ^c	1.43 ± 0.03 ^{bc}	2.94 ± 0.32 ^a	1.48 ± 0.03 ^d	5.18 ± 0.39 ^{cd}
D291	1.35 ± 0.05 ^{bc}	4.84 ± 0.22 ^{bc}	1.21 ± 0.05 ^a	2.83 ± 0.55 ^a	1.38 ± 0.05 ^{bcd}	3.56 ± 0.32 ^{ab}
A-83015	1.04 ± 0.07 ^a	4.29 ± 0.17 ^{ab}	1.22 ± 0.03 ^a	4.43 ± 0.37 ^{bc}	1.17 ± 0.05 ^a	4.49 ± 0.15 ^{bc}
A-81062	1.25 ± 0.05 ^b	4.76 ± 0.13 ^b	1.46 ± 0.01 ^c	4.54 ± 0.25 ^{bc}	1.39 ± 0.04 ^{bcd}	5.21 ± 0.44 ^d

Cepa	Maltosa		Maltotriosa		Melibiosa	
	μ (max OD)	λ (horas)	μ (max OD)	λ (horas)	μ (max OD)	λ (horas)
ERS1	0.49 ± 0.02 ^{ab}	12.47 ± 1.12 ^c	0.45 ± 0.01 ^a	4.82 ± 0.34 ^b	0.46 ± 0.01 ^{ab}	15.88 ± 0.14
EYS4	0.46 ± 0.02 ^{ab}	6.30 ± 1.08 ^b	0.43 ± 0.02 ^a	5.08 ± 0.27 ^b	0.50 ± 0.07 ^{abc}	15.62 ± 1.16
EYS5	1.39 ± 0.01 ^f	5.94 ± 0.70 ^{ab}	1.22 ± 0.01 ^e	8.08 ± 0.11 ^c	0.51 ± 0.03 ^{abc}	16.35 ± 0.38
L2056	1.33 ± 0.01 ^{ef}	7.45 ± 0.10 ^b	0.96 ± 0.02 ^c	9.72 ± 1.18 ^d	0.50 ± 0.04 ^{abc}	15.76 ± 0.73
EGT1	0.63 ± 0.04 ^c	6.67 ± 1.25 ^b	0.57 ± 0.02 ^b	4.02 ± 0.30 ^{ab}	0.55 ± 0.04 ^{bc}	16.44 ± 0.19
D291	0.55 ± 0.01 ^b	7.53 ± 0.19 ^b	0.58 ± 0.02 ^b	3.04 ± 0.74 ^a	0.57 ± 0.03 ^c	15.45 ± 0.99
A-83015	1.09 ± 0.05 ^d	3.75 ± 0.06 ^a	1.11 ± 0.06 ^d	3.88 ± 0.72 ^{ab}	0.43 ± 0.03 ^a	15.83 ± 0.99
A-81062	1.27 ± 0.04 ^{ef}	6.91 ± 0.21 ^b	1.30 ± 0.03 ^e	8.79 ± 0.33 ^{cd}	0.53 ± 0.03 ^{abc}	16.11 ± 0.20

Cepa	Rafinosa	
	μ (max OD)	λ (horas)
ERS1	1.05 \pm 0.01 ^c	14.36 \pm 0.12 ^d
EYS4	1.01 \pm 0.02 ^c	11.74 \pm 0.06 ^c
EYS5	1.02 \pm 0.01 ^c	13.47 \pm 1.11 ^d
L2056	0.96 \pm 0.02 ^b	6.34 \pm 0.07 ^b
EGT1	1.02 \pm 0.01 ^c	5.92 \pm 0.07 ^b
D291	0.82 \pm 0.02 ^a	3.01 \pm 0.45 ^a
A-83015	0.80 \pm 0.04 ^a	3.57 \pm 0.24 ^a
A-81062	1.02 \pm 0.01 ^c	5.73 \pm 0.07 ^b

Como se puede observar en la tabla R1.14 para casi todos los azúcares analizados, se encontraron diferencias significativas entre cepas y especies tanto en el tiempo de latencia (λ) como en la velocidad máxima de crecimiento (μ). Del grupo de levaduras ecuatorianas, la cepa EYS5 presentó los valores más altos de asimilación de maltotriosa (μ) incluso muy similares y estadísticamente iguales a los obtenidos con la cepa cervecera A-81062. La cepa EYS5 presentó además el valor más alto en asimilación de maltosa de todas las cepas evaluadas. Las cepas EGT1 y EYS4 presentaron los promedios más altos de todo el grupo en asimilación de sacarosa, incluso superiores a los obtenidos con las cepas industriales vínicas y cerveceras. La mayoría de cepas ecuatorianas (EYS4, EYS5 y EGT1) presentaron los promedios más altos en asimilación de fructosa. De forma general, los valores en asimilación de azúcares obtenidos para la cepa EYS5 fueron muy parecidos a los obtenidos con la cepa cervecera A-81062.

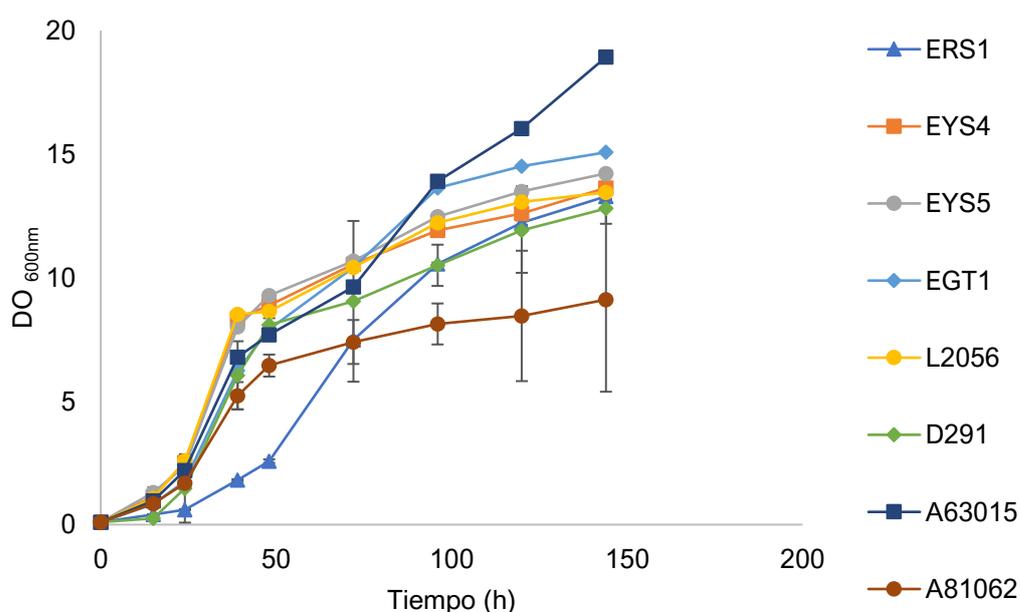
Como se ha comentado en la Introducción, aunque la chicha más conocida y estudiada en Sudamérica es la chicha de Jora, preparada a partir de maíz malteado, existe una amplia variedad de bebidas preparadas con diferentes ingredientes, recetas y estrategias (Faria-Oliveira et al., 2015). Varios cereales malteados o no, tubérculos, frutas, hierbas y especias han sido usadas de acuerdo a la región y disponibilidad de nutrientes (Piló et al., 2018; Rodríguez et al., 2016). El contenido de maltosa y maltotriosa en chichas es generalmente bajo, comparado al de sacarosa, fructosa y glucosa (Chaves-López et al., 2014), lo que podría explicar que las cepas ecuatorianas no puedan usar estos azúcares. En fermentaciones espontáneas, los microorganismos preadaptados al sustrato y ambiente de fermentación son los que dominan la comunidad microbiana (Gibbons y Rinker, 2015), la mayoría de las cepas ecuatorianas aisladas de chichas mostraron un fenotipo relacionado con la adaptación a su sustrato de origen.

1.9.4. Crecimiento a bajas temperaturas (12°C)

El estudio del crecimiento de levaduras en medios ricos en maltosa o glucosa a bajas temperaturas permite determinar el posible uso de estas cepas en sustratos ricos en estos azúcares y en frío, condiciones que son muy comunes en producción de cerveza. La habilidad de las levaduras de crecer en condiciones de frío en mostos de cerveza es una característica definida de las cepas de levaduras tipo lager (Gibson et al., 2013).

Todas las cepas estudiadas mostraron un buen crecimiento en condiciones de frío en el medio YPD sin embargo se observaron diferencias entre especies y cepas (Figura R1.25). En el grupo de levaduras ecuatorianas *S. cerevisiae*, ERS1 mostró la fase más larga de latencia (aproximadamente 24 h) y un crecimiento más lento, mientras que EYS4 y EYS5 mostraron un crecimiento similar en estas condiciones. La densidad óptica al final del periodo de incubación de la cepa ecuatoriana *T. delbrueckii* EGT1 fue el valor más alto del grupo de levaduras ecuatorianas, incluidas las cepas vínicas. Esta cepa creció en estas condiciones incluso mejor que las de la especie *S. cerevisiae*. La tolerancia al frío es un atributo importante de la especie *T. delbrueckii* (Hernández-López et al., 2007), que también fue confirmada en este experimento. La cepa cervecera *S. pastorianus* A-63015 mostró el crecimiento más rápido y la DO más alta de todas las cepas analizadas, atributo muy común en cepas industriales.

A



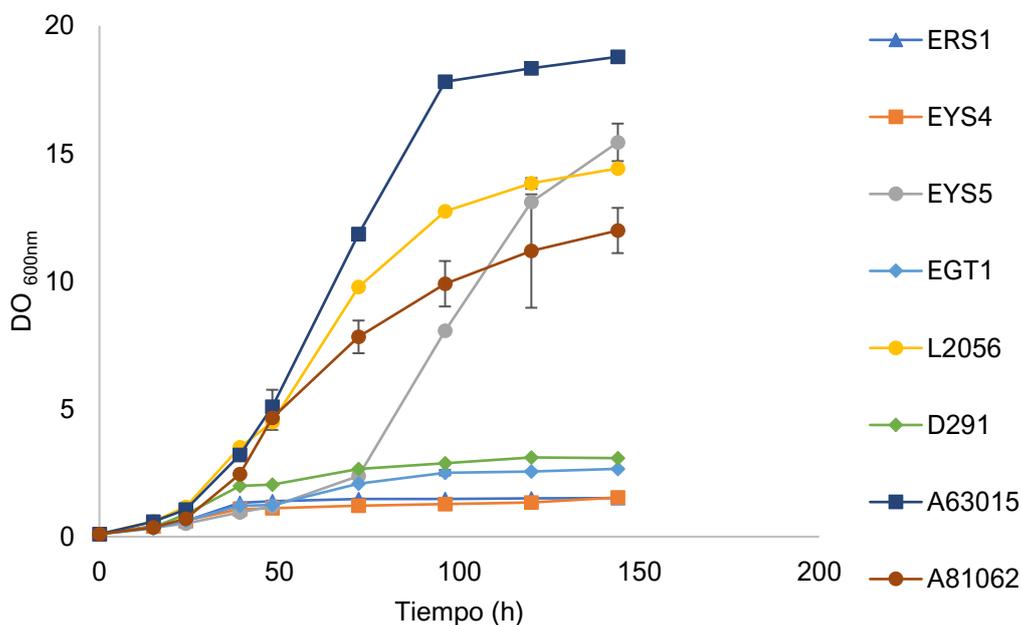
B

Figura R1.25 Crecimiento de levaduras a baja temperatura (12 °C) en medio YP suplementado con A) glucosa o B) maltosa (2 % w/v) como única fuente de carbono. Los valores son las medias de dos medidas independientes y las barras de error visibles representan el rango.

El crecimiento de las cepas ecuatorianas en maltosa a 12°C, fue muy diferente al observado en glucosa (Figura R1.25). Las cepas incapaces de metabolizar la maltosa (categorizadas como maltosa negativas) no pudieron crecer en este medio y mostraron los valores de OD más bajos (0 – 2) al final del tiempo de incubación. La cepa EYS5 mostró la fase más larga de latencia (aproximadamente 48 h). Esta cepa tuvo un crecimiento lento en esta condición de cultivo, mostrando características similares a las de las cepas cerveceras tipo ale (Gibson et al., 2017). La levadura cervecera *S. pastorianus* A-63015 fue, como se esperaba, la que mostró la mayor habilidad para crecer bajo estas condiciones.

Respecto a la masa seca obtenida de los crecimientos en frío, los valores más altos del grupo de levaduras de la especie *S. cerevisiae* se obtuvieron para la cepa vínica L2056 tanto en YPD como en YPM (Figura R1.26). Todas las cepas ecuatorianas mostraron valores altos de masa seca en YPD mientras que en YPM la cepa EYS5 (la única capaz de metabolizar la maltosa) mostró valores de masa seca similares a los de la cepa cervecera control A-81062. En relación a las cepas de la especie *T. delbrueckii* el promedio alcanzado por la cepa ecuatoriana EGT1 es mucho mayor al obtenido para su cepa control en YPD.

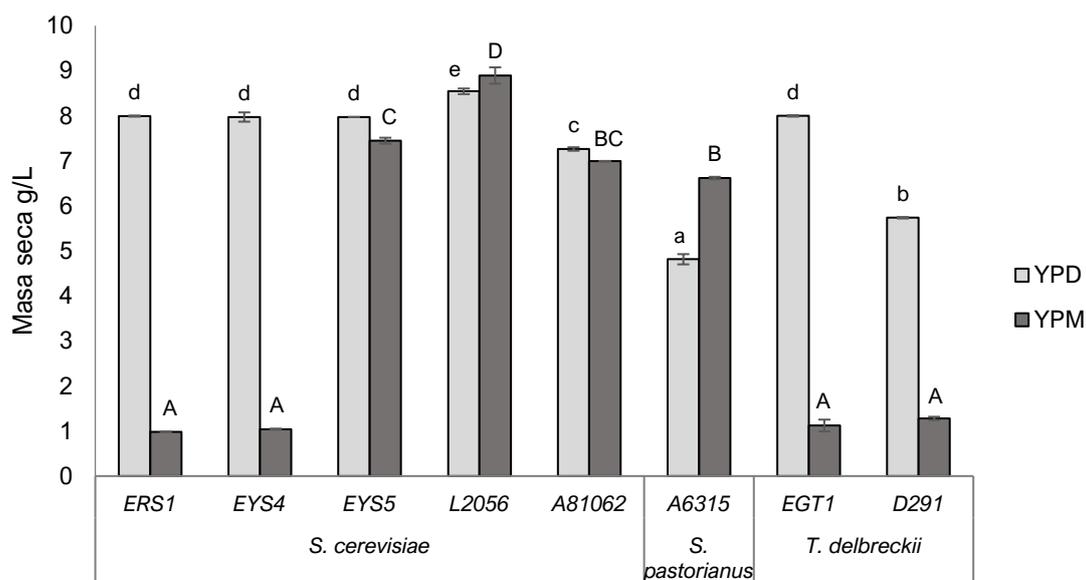


Figura R1.26 Masa seca final después de 6 días de crecimiento en los medios YPD y YPM a 12°C. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

1.9.5 Análisis de la presencia del gen *STA1*

Como se ha comentado en la introducción, *S. cerevisiae* var *diastaticus* produce glucoamilasas extracelulares codificadas por los genes *STA*, que no son producidas normalmente por *S. cerevisiae* (Meier-Dörnberg et al., 2018). Recientemente se han descubierto y desarrollado nuevas cepas de esta especie que son capaces de producir glucoamilasas extracelulares pero que, a la vez, no presentan las características de alterantes del proceso de producción de cerveza. Para detectar la presencia de estos genes, se han perfeccionado varios métodos sencillos basados en la técnica de PCR, de entre los cuales, en este trabajo se usó el protocolo recomendado por Yamauchi et al., (1998) para la detección del gen *STA1*. La presencia de este gen fue analizada en las cepas ecuatorianas de la especie *S. cerevisiae* y en la cepa *T. delbrueckii* EGT1. Se usó como control negativo la cepa vínica industrial L2056 y como control positivo la cepa cervecera A-81062 ya que esta posee dicho gen (Krogerus et al., 2019). El resultado obtenido mostró un fragmento amplificado para la cepa EYS5 de aproximadamente 800pb y un fragmento de aproximadamente 900 pb para la cepa EGT1, de tamaño muy similar al de la cepa control positivo A-81062 (Figura R1.27).

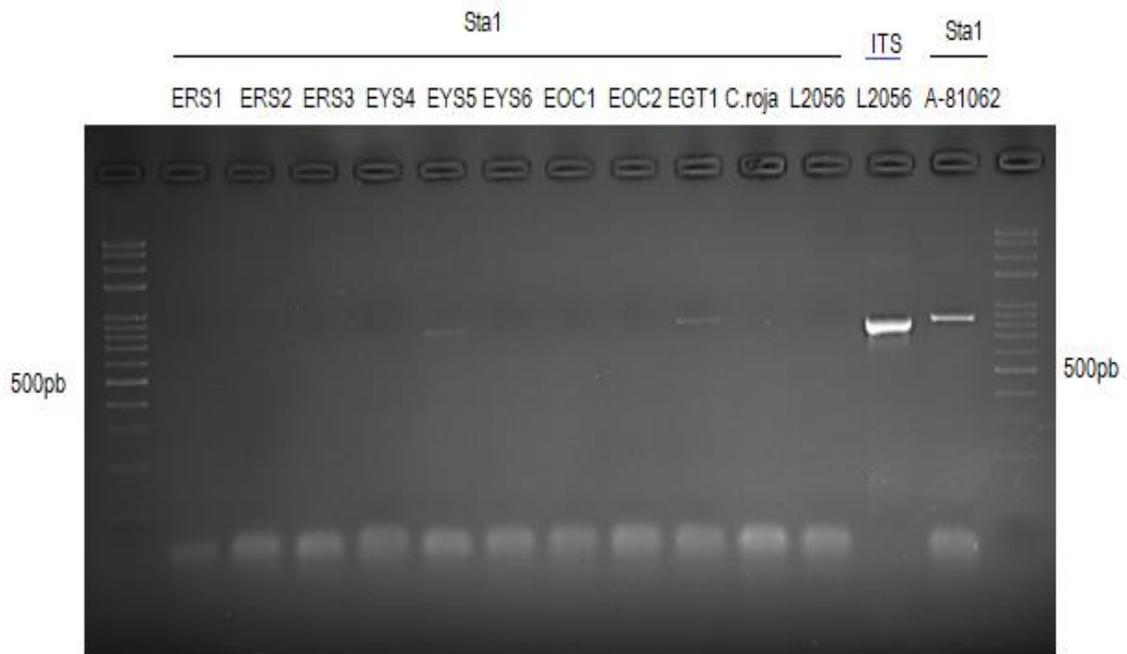


Figura R1.27 Amplificación del gen *STA1* en varias cepas ecuatorianas de la especie *S. cerevisiae* (ERS1, ERS2, ERS3, EYS4, EYS5, EYS6), *Candida* sp. (EOC1, EOC2), *T. delbrueckii* (EGT1) además de las cepas *S. cerevisiae* Cinta Roja, L2056 (control negativo) y A-81062 (control positivo). Se muestra además el control de la PCR con la amplificación de la región ITS–5.8S rDNA con la cepa L2056.

Para comprobar si los fragmentos amplificados tenían algún tipo de similitud con el gen *STA1* se aisló y purificó el DNA de las bandas obtenidas en las amplificaciones del DNA de las cepas EYS5 y EGT1, y se secuenció. Se determinó que ninguna de las dos secuencias tiene similitud con la del gen *STA1*. Se realizó además un análisis bioinformático básico de las secuencias obtenidas para las dos cepas con la secuencia de referencia del gen *STA1* y con otras secuencias en los genomas de referencia, los resultados se detallan en la Tabla R1.15.

Tabla R1.15 Análisis de alineamientos y similitud para las secuencias obtenidas con los con los oligonucleótidos SD-5A y SD-6B.

Análisis	Programa	EYS5	EGT1
Alineamiento de secuencias nucleotídicas con gen <i>STA1</i>	Clustal W	44.74 %	46.08 %
Alineamiento de secuencias proteicas con gen <i>STA1</i>	Clustal W	20 %	20.09 %
Similitud con otras secuencias de proteínas	Blastx NCBI	37 % YER156c <i>S. cerevisiae</i> S288c	47.49 % TDEL_0A04870 <i>T. delbrueckii</i>

El porcentaje de identidad con el gen *STA1* obtenido para las secuencias proteicas en ambos casos es menor al 25 % por lo que podemos decir que son secuencias altamente divergentes (~ 25 – 30 % de identidad) (Thompson et al., 1994).

En relación al análisis de similitud con otras proteínas se encontró, para la secuencia obtenida en EYS5, un 37 % de similitud con la proteína YER156c de *S. cerevisiae* S288c. El gen que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma V y pertenece a una familia de proteínas no caracterizadas (UPF0160) cuya expresión es sensible a cobre y tiene similitud a la proteína MYG1 de mamíferos (Dietrich et al., 1997). Al parecer esta secuencia no tiene ninguna relación con la actividad glucoamilasa de esta cepa. Con respecto a la secuencia obtenida en la cepa EGT1, encontramos un 47.49 % de similitud con la proteína TDEL_0A04870 de *T. delbrueckii*. El gen que codifica para esta proteína se encuentra en el cromosoma I, en la región BglC, pertenece a la familia 1 de glucosil-hidrolasas involucradas en el transporte y metabolismo de carbohidratos y además es similar a la proteína codificada por el gen *EXG2* de *S. cerevisiae* (Gordon et al., 2011). Posiblemente esta secuencia está relacionada con el metabolismo de carbohidratos en esta cepa.

1.10 Discusión general

Las levaduras involucradas en la fermentación de bebidas tradicionales como las chichas, llamadas también cervezas indígenas andinas, podrían tener el potencial de ser usadas como cultivos iniciadores para mejorar la calidad y seguridad microbiológica de estos productos, pero también como alternativas no convencionales en otras fermentaciones alcohólicas como en la producción de cerveza y vino, entre otras. A lo largo de este capítulo se detalla la caracterización molecular y fisiológica de aislados de levaduras obtenidos a partir de cuatro

chichas ecuatorianas elaboradas con cuatro materias primas diferentes: arroz, avena, uva y una mezcla de siete variedades de maíz o Yamor.

Se obtuvo un total de 254 aislados de levaduras que fueron agrupados, una vez realizada la identificación molecular mediante el análisis de la región ribosomal, en once géneros y dieciséis especies. Se encontró un número relativamente bajo de aislados de las especies fermentadoras *S. cerevisiae* (9.1 %) y *T. delbrueckii* (18.6 %) mientras que la mayoría de ellos fueron del género *Hanseniaspora* (53.8 %). Debido a su potencial fermentativo además se caracterizó a nivel de cepa los aislados de las especies *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*. Los análisis del DNA mitocondrial y elementos delta fueron las técnicas más adecuadas, permitiendo la identificación de seis y dos cepas, respectivamente (Grijalva-Vallejos et al., 2019)

Con el objetivo de seleccionar levaduras adecuadas para la producción de iniciadores fermentativos, se desarrollaron diferentes análisis. En el estudio de respuesta a estrés térmico, osmótico y oxidativo, se encontró una amplia variabilidad de comportamientos entre especies y cepas, algunas de ellas mostraron un perfil de tolerancia a estrés muy similar al de la cepa vínica de referencia *S. cerevisiae* L2056, destacándose las dos levaduras de las especies *W. anomalus* y *P. kudriavzevii*. La mayoría de las cepas ecuatorianas de la especie *S. cerevisiae* mostraron una mejor tolerancia a altas concentraciones de NaCl y una de ellas, la cepa EYS4, incluso mostró un perfil de tolerancia a estrés mayor al de su cepa control. Estos perfiles de tolerancia a estrés, podrían estar relacionados con la habilidad de estas cepas en fermentar sustratos con alta osmolaridad como las chichas.

Varias de las cepas aisladas a partir de bebidas fermentadas tradicionales pueden ser potencialmente utilizadas en cultivos mixtos y por ello la producción de ciertas enzimas, necesarias para el uso de algunos sustratos, es un parámetro que debía ser evaluado. La producción de amilasa indica la capacidad de un microorganismo para degradar sustratos ricos en almidón, azúcar muy común en bebidas tradicionales, y también en mostos de cerveza y sustratos para la obtención de bebidas destiladas. Por ello se realizó un rastreo inicial de esta actividad en placas con medios sólidos ricos en almidón y se encontró un aislado de la especie *Cryptococcus* sp. que presentó una alta actividad amilasa, mucho mayor que la cepa panadera de referencia *S. cerevisiae* Cinta Roja. Algunas especies no patógenas del género *Cryptococcus* aisladas a partir de frutas han demostrado ser una importante fuente de esta enzima por lo que sería interesante llevar a cabo análisis adicionales.

Para la producción industrial de un cultivo iniciador, se requiere que las levaduras realicen la conversión eficiente de los azúcares del sustrato en biomasa. Soluciones enriquecidas de melaza son los sustratos más comunes usados para la propagación de biomasa de levaduras siendo la sacarosa el azúcar más abundante. Se estudió el crecimiento y la capacidad fermentativa en medio melaza para las cepas de las especies *S. cerevisiae*, *T. delbrueckii* y *Candida* sp. Todas las cepas ecuatorianas fueron capaces de crecer en este sustrato, las dos cepas de la especie *T. delbrueckii* presentaron un crecimiento incluso mejor a las de la especie *S. cerevisiae*. En cuanto a la capacidad fermentativa, todas las cepas ecuatorianas de la especie *S. cerevisiae* presentaron valores comparables a los de las cepas industriales destacándose las cepas EYS4 y EYS5.

En base a los mejores resultados obtenidos en los análisis previos, se seleccionó un total de cuatro cepas ecuatorianas, tres cepas de la especie *S. cerevisiae* (ERS1, EYS4, EYS5) y una cepa de la especie *T. delbrueckii* (EGT1) y se estudió su actividad invertasa, necesaria para el metabolismo de sacarosa, un disacárido muy común en melazas, chichas, y otros sustratos de bebidas alcohólicas. Todas las cepas ecuatorianas de la especie *S. cerevisiae* mostraron una mayor actividad invertasa que las cepas control, así como una represión incompleta en condiciones de alta concentración de glucosa, característica de cepas aisladas en fermentaciones industriales mientras que en la cepa EGT1 la actividad invertasa fue inferior en aproximadamente un 50%. Los posteriores análisis se realizaron únicamente con estas cuatro cepas, y sus respectivos controles.

Debido al interés de evaluar a las levaduras seleccionadas como posibles iniciadores deshidratados para fermentación, se determinó su tolerancia a la deshidratación, proceso necesario para la producción de levadura activa seca (ADY) a nivel industrial. Tras estandarizar los tiempos de deshidratación necesarios para obtener biomasa deshidratada con un 10% de humedad con cada una de las cepas se anañizó la tolerancia y se encontró que las cepas ecuatorianas *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1, mostraron una alta resistencia a este tratamiento reflejada en valores altos de viabilidad, mayores a los encontrados para sus respectivos controles.

Durante la deshidratación, el estrés oxidativo que se genera en la célula es la principal causa de pérdidas de viabilidad y desempeño tecnológico en los posteriores procesos. Por ello se decidió evaluar tres parámetros redox, descritos como buenos indicadores del comportamiento de *S. cerevisiae* en la producción de levadura activa: niveles de trehalosa, de glutatión, y de peroxidación de lípidos. Encontramos que las cepas más resistentes a la deshidratación, las cepas EYS5 y EGT1, mostraron los niveles más bajos de glutatión oxidado, GSSG, y la mayor relación GSH/GSSG, y en el caso de la cepa

EGT1 también los niveles más bajos de peroxidación de lípidos. La cepa EYS5 mostró además el incremento más alto en concentración de trehalosa y el más bajo en peroxidación de lípidos al tomar como base lo obtenido en células frescas, lo cual indica que la capacidad de adaptación al cambio es más relevante que los niveles totales de partida y finales de dichos marcadores.

El posible uso de estas cepas seleccionadas como alternativas no convencionales en otras fermentaciones alcohólicas ha incluido también su estudio a nivel de domesticación. De las cuatro cepas seleccionadas solo una de ellas, la cepa EYS5, mostró rasgos de domesticación similares a los encontrados en cepas de cerveza, como el uso de maltotriosa y maltosa, además de un comportamiento negativo en la producción de compuestos fenólicos (POF -). Evaluamos además el crecimiento de estas cepas a bajas temperaturas en medios ricos en glucosa o maltosa y encontramos que la única cepa capaz de metabolizar la maltosa, EYS5, no podía crecer adecuadamente en estas condiciones lo que podría atribuirse a su adaptación a temperaturas altas típicas del ambiente en el que fue aislada.

En base a los resultados obtenidos en este capítulo se puede sugerir que las levaduras seleccionadas en este estudio ERS1, EYS4, EYS5 y EGT1, son adecuadas para ser usadas como iniciadores deshidratados para la producción controlada de bebidas tradicionales e incluso podrían ser usadas en otros procesos de fermentación alcohólica. Hemos encontrado diferencias importantes entre cepas que podrían estar asociadas también a un comportamiento tecnológico diferente e interesante en fermentaciones alcohólicas. La cepa ecuatoriana *S. cerevisiae* EYS5, ha mostrado un excelente desempeño fermentativo, superando a la cepa de *S. cerevisiae* L2056 utilizada como control en actividad invertasa y mostrando una alta viabilidad después de la deshidratación; además ha mostrado interesantes rasgos de domesticación. La cepa *T. delbrueckii* EGT1 mostró también un alto potencial como levadura no-*Saccharomyces* tanto por su tolerancia a condiciones de deshidratación, reflejada en valores adecuados en parámetros redox, así como una capacidad fermentativa aceptable para convertirse en una buena alternativa para las fermentaciones alcohólicas.

2. Caracterización tecnológica de levaduras seleccionadas aisladas a partir de chichas ecuatorianas

Además del objetivo inicial de caracterización molecular y fisiológica de los aislados de levaduras seleccionados, nuestro segundo objetivo principal ha sido la caracterización tecnológica de dichas cepas con vistas a su potencial aplicación. La selección de especies y cepas de levaduras con características tecnológicas adecuadas es muy necesaria para la mejora de la productividad de la mayoría de procesos biotecnológicos relacionados con estos microorganismos (Saini et al., 2018). Por ejemplo, en el caso de los vinos, la utilización de cepas de levaduras autóctonas seleccionadas es una herramienta eficaz para mejorar las propiedades organolépticas y sensoriales de los vinos típicos regionales (Tristezza et al., 2014; Pérez-Torrado et al., 2018). Las levaduras producen una amplia variedad de compuestos volátiles, como los alcoholes, ésteres, aldehídos y cetonas que contribuyen a las características sensoriales de las bebidas fermentadas (Ramos y Schwan, 2017), por lo que la aplicación de nuevas cepas para la producción de bebidas novedosas, originales, diferentes o mejoradas, es de mucho interés. Entre las principales características tecnológicas que se buscan en cepas usadas en fermentaciones industriales están el vigor fermentativo, la resistencia a condiciones de estrés, un buen perfil enzimático, la ausencia de sabores y aromas desagradables en el producto final, además de la producción de subproductos de fermentación deseados como alcoholes superiores, ésteres, entre otros (Di Gianvito et al., 2019).

Existen alimentos fermentados tradicionales que han sido consumidos durante siglos, como las chichas, pero sobre los que todavía se tiene muy poca información. La mayoría de investigaciones se han enfocado a determinar su biodiversidad microbiológica por lo que la mayoría de las especies y cepas encontradas no tienen roles definidos y se conoce muy poco de su potencial aplicación tecnológica (Bourdichon et al., 2012). La producción de metabolitos secundarios en las levaduras de la especie *S. cerevisiae* incluye alcoholes superiores, polioles, ésteres, ácidos orgánicos, dicetonas vecinales y aldehídos que suelen producirse en concentraciones relativamente bajas comparadas con las de etanol o dióxido de carbono pero que ejercen una influencia muy importante en el sabor y aroma de las bebidas fermentadas (Walker y Stewart, 2016). Tres de las cepas ecuatorianas seleccionadas son de esta especie por lo que su aplicación como inóculos es posible. En relación a las levaduras de la especie *T. delbrueckii*, varias cepas han sido utilizadas para optimizar varios parámetros en la fermentación de vino, como la reducción de la concentración de ácido acético y de ciertos alcoholes superiores no deseables, además se ha descrito un incremento en la cantidad de compuestos aromáticos interesantes como ésteres, lactonas, tioles y terpenos (Ramírez y Velázquez, 2018). En

cerveza también se han realizado recientemente varios estudios con fermentaciones mixtas de esta especie con cepas de *S. cerevisiae*, dando como resultado cervezas con un perfil analítico y aromático general distintivo (Canonico et al., 2016). La cepa EGT1 representa al grupo mayoritario de cepas de esta especie encontradas en las chichas ecuatorianas descritas en el apartado anterior, por lo que su posible aplicación en fermentaciones mixtas, tanto de chicha como de cerveza podría ser de mucho interés.

Por ello, la determinación de varias de las características tecnológicas relevantes para el uso industrial de las cepas seleccionadas, tanto en fermentaciones en un sustrato similar al utilizado para la elaboración de chicha, como en otros mostos usados a nivel industrial nos ha permitido una más completa evaluación de su potencial como iniciadores comerciales.

2.1. Estudio del desempeño fermentativo de las cepas ecuatorianas

El uso de cultivos puros y mixtos de cepas de levaduras nativas de bebidas tradicionales se puede convertir en una herramienta importante para la diferenciación, diversificación y protección de bebidas regionales como las chichas (Rodríguez et al., 2016). Además, debido a la similitud entre chichas y cerveza, existe una clara posibilidad de que las levaduras originarias de esta bebida puedan ser aplicadas de forma favorable en la producción industrial de cerveza. Nada se conoce sobre el potencial fermentativo de cepas nativas de chichas como iniciadores de fermentación de cerveza o incluso en fermentaciones controladas de esta misma bebida. En este apartado se ha estudiado de forma detallada la aplicación de estas cepas seleccionadas en la producción de estas dos bebidas. Los resultados obtenidos para las cepas ecuatorianas fueron comparados con aquellos determinados para cepas de levaduras comerciales, tanto vínicas como cerveceras.

Las fermentaciones a escala 100 mL y escala piloto (1.5 L) tanto en MCS como en mosto de cerveza se llevaron a cabo en las instalaciones del VTT Technical Research Centre of Finland en los laboratorios y en la planta piloto del área de Fermentaciones, bajo la supervisión del Dr. Brian Gibson, Científico principal y gerente de proyectos en el área de Soluciones para recursos naturales y medio ambiente del VTT. Para estos experimentos se utilizaron como cepas control dos cepas cerveceras de la colección del VTT, la cepa *S. cerevisiae* A-81062 y la cepa *S. pastorianus* A-63015.

2.1.1. Análisis de fermentaciones en el sustrato modelo tipo chicha (*Model Chicha Substrate, MCS*)

2.1.1.1. Estandarización de la formulación y estrategia de elaboración del MCS

En una investigación realizada con cepas nativas de la bebida tradicional colombiana “Champús”, elaborada a partir de granos enteros de maíz cocidos a los que se le añade jugos de frutas, hierbas y especias de la región, se analizó el desempeño fermentativo de estas cepas en un *Sistema Modelo tipo Champús (Model Champús system)* que simulaba a este sustrato (Osorio-Cadavid et al., 2008). Basándonos en esta investigación y en el trabajo de Vallejo et al., (2013), en el que analizó el desempeño fermentativo también de cepas nativas de chichas de Jora peruanas con un sustrato elaborado a partir de maíz malteado, se decidió probar varias opciones de sustratos tipo chicha que simulen al generalmente usado en la elaboración de las chichas ecuatorianas y en el que se pueda evaluar el desempeño fermentativo de cepas nativas y comerciales.

Para ello fue necesario establecer una formulación estándar, similar a la que generalmente se usa para preparar las chichas ecuatorianas, como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos 1.3.1. Dos sustratos fueron seleccionados: la chicha de arroz por la facilidad de adquisición de los ingredientes, además de ser la que presentó una mayor diversidad de levaduras de todas las evaluadas, y la chicha de Jora por la historia, conocimiento e información que se tiene de esta bebida.

Chicha de arroz

La chicha de arroz es una bebida de sabor dulce y suave que, dependiendo del tiempo de fermentación (3 – 15 días), puede constituir desde un refresco hasta una especie de vino embriagante. Su preparación en el Ecuador posiblemente se remonta a la llegada de este cereal al país en el siglo XVIII, actualmente es consumida como una bebida refrescante tanto en la costa como en la sierra del país (Pazmiño et al., 2014). En un estudio llevado a cabo con muestras de chichas de arroz producidas por una comunidad indígena brasileña no se encontraron aislados de levaduras solo bacterias ácido lácticas y del género *Bacillus* (Puerari et al., 2015), mientras que en otros trabajos de análisis de calidad microbiológica de chichas de arroz elaboradas de forma artesanal tanto de Venezuela (Arroyo et al., 2011) como de Ecuador (Pazmiño et al., 2014), se encontraron importantes poblaciones de levaduras. Los resultados obtenidos en el análisis de biodiversidad en el capítulo anterior de esta tesis, mostraron que la chicha de arroz es un buen sustrato para el crecimiento de levaduras, incluso fue la bebida

en la que se encontró una mayor diversidad y número de aislados de la especie *S. cerevisiae*.

Para evaluar la posibilidad de usar un sustrato estandarizado similar al utilizado para la preparación de la chicha de arroz, se analizó la fórmula tradicional (Tabla R2.1).

Tabla R2.1 Formulación original para la preparación de chicha de arroz en Ecuador.

Ingredientes	%	Tiempo de ebullición (min)
Harina de arroz	3	30
Hierbas y especias,	0.28	30
Panela	12	
Frutas de la región	7	20
Zumo de piña	3	0

Se decidió simplificar esta formulación a tres ingredientes básicos: zumo de piña, harina de arroz y panela. Tanto la harina de arroz como la panela se prepararon en dos soluciones concentradas disueltas en agua. Se realizaron varios experimentos para determinar:

- *Tipo de zumo de piña a utilizarse:* natural (extraído a partir de piña fresca) o “natural – comercial” (Marca Hacendado). El zumo de piña natural se esterilizó por tratamiento con 0.2 % de dimetil dicarbonato (48 h a 4 °C), sin embargo, por ser poco uniforme y tener una gran cantidad de sólidos suspendidos se decidió no utilizarlo para los experimentos y usar el zumo de piña natural comercial (marca Hacendado).
- *Estrategias de esterilización de las soluciones de panela y harina de arroz:* En la forma de preparación tradicional de la chicha de arroz las dos soluciones se prepararon por separado (ebullición 30 min) y una vez frías se mezclaron. Se valoró la posibilidad de preparar una única solución de harina de arroz con panela para su esterilización en autoclave y facilitar el proceso. Por ello se analizó si existían diferencias entre separar las soluciones y unir las después de esterilizarlas o prepararlas y esterilizarlas juntas.

- *Concentración final del zumo de piña:* La bebida original contiene un 3 % de zumo de piña y un 7 % de zumo de otras frutas de la región. Por ello se analizó si existían diferencias entre añadir 3 % o 10 % de zumo de piña.

Se ensayaron cuatro formulaciones diferentes:

- M3: Esterilización en conjunto (mismo recipiente) de las soluciones de panela y arroz a las que una vez frías se les adicionó 3 % de zumo de piña.
- M10: Esterilización en conjunto (mismo recipiente) de las soluciones de panela y arroz a las que una vez frías se les adicionó 10 % de zumo de piña.
- S3: Esterilización por separado (recipientes diferentes) de las soluciones de panela y arroz a las que una vez frías se les adicionó 3 % de zumo de piña.
- S10: Esterilización por separado (recipientes diferentes) de las soluciones de panela y arroz a las que una vez frías se les adicionó 10 % de zumo de piña.

Para determinar cuál era la formulación más idónea, se usaron dos cepas de la especie *S. cerevisiae*, la cepa ecuatoriana EYS5 y la cepa industrial vínica usada como referencia L2056. Se obtuvieron cinéticas de consumo de azúcares diferentes para todas las formulaciones evaluadas (Figura R2.1).

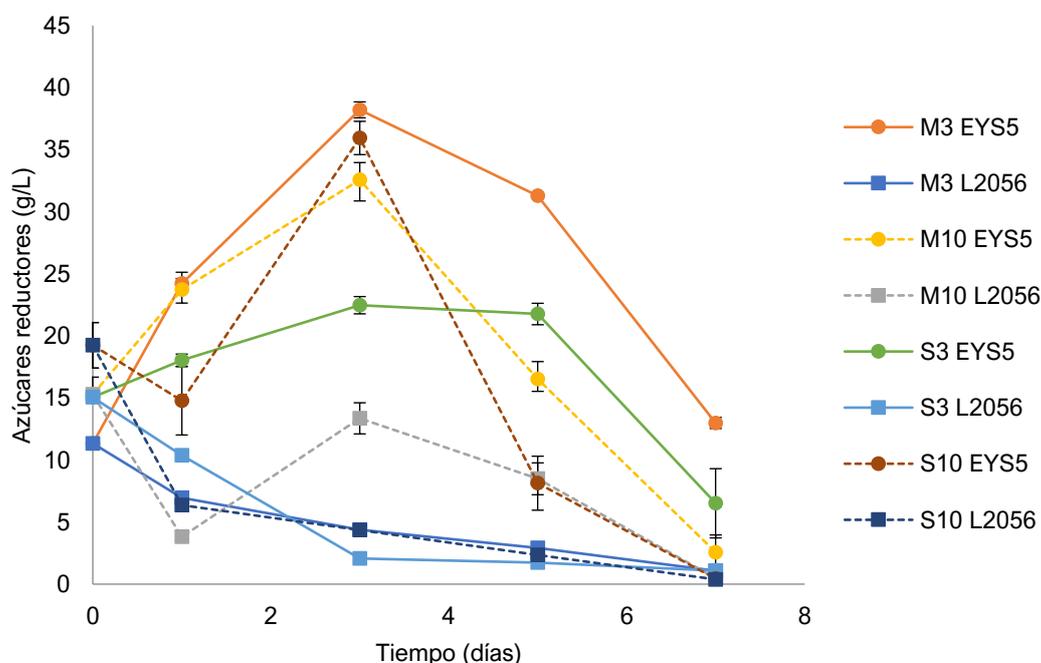


Figura R2.1 Cinética del consumo de azúcares reductores de las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y L2056 en distintas formulaciones y estrategias de esterilización del MSC.

Las muestras con un 10 % de zumo de piña presentan niveles iniciales superiores de azúcares libres que las muestras con 3 %, indicando que es una fuente de monosacáridos, pero no la única. La esterilización por separado de los componentes también eleva la concentración inicial de azúcares, probablemente por la hidrólisis de la panela. Las cinéticas obtenidas con la cepa EYS5 fueron atípicas ya que se observó un aumento de la concentración de azúcares reductores en los primeros días de la fermentación, obteniéndose el valor más alto en el día 3, sugiriendo un defecto en la utilización de los monosacáridos procedentes de la hidrólisis de la sacarosa. Además, la actividad invertasa inusual de la cepa EYS5, ya descrita en el capítulo anterior (Figura R1.13), en la que se observó una represión incompleta en condiciones de disponibilidad de glucosa, podría estar relacionada con estas cinéticas, aunque no se pueden descartar otras actividades enzimáticas adicionales que liberen monosacáridos a partir del sustrato inicial. El comportamiento de la cepa de referencia L2056 es diferente, su actividad invertasa parece más firmemente ligada al transporte de monosacáridos al interior celular, ya que nunca hay acumulación de los mismos. Estos datos refuerzan el interés en estudiar fermentaciones mixtas de estas cepas. Según van Dijken et al., (1993) las cinéticas de crecimiento y de consumo de azúcares en levaduras depende cualitativa y cuantitativamente de la especie, cepa, naturaleza y concentración del azúcar, disponibilidad de oxígeno además de otros parámetros ambientales.

Los parámetros de fermentación se compararon entre formulaciones (Tabla R2.2), la formulación en la que se encontró una mayor cantidad final de azúcares reductores en las fermentaciones llevadas a cabo con la cepa ecuatoriana EYS5 fue la M3 seguida por S3 mientras que en las chichas fermentadas con la cepa vínica L2056 se obtuvieron en todas las formulaciones valores de azúcares fermentables finales inferiores e iguales estadísticamente lo que demostraba un distinto desempeño fermentativo de las dos cepas en este sustrato. EYS5 muestra más rapidez en consumir mostos que poseen más zumo de piña, a pesar de que puedan aportar más azúcares. Ello indica que el zumo de piña aporta nutrientes adicionales para los que EYS5 tiene más necesidad. Los valores de pH iniciales para los cuatro sustratos fueron 5.06 en M3, 4.77 en M10, 5.07 en S3 y 4.87 en S10, mientras que el pH final de todas las formulaciones fue inferior a 3.8, indicando que a ese respecto la cepa ecuatoriana es capaz de acidificar el medio de manera tan efectiva como la cepa vínica comercial. No se encontraron diferencias significativas en las concentraciones finales de etanol entre formulaciones sin embargo los valores más altos se encontraron en el sustrato S10 con las dos cepas. La viabilidad más alta se observó con la cepa ecuatoriana EYS5 en el sustrato M10, siendo similares en el resto.

Tabla R2.2 Parámetros de fermentación finales en chichas obtenidas a partir de cuatro formulaciones diferentes inoculadas con las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y L2056, luego de 7 días de fermentación. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	L2056			
	M3	M10	S3	S10
[] azúcares reductores (g/L)	1.07 ± 0.11 ^a	0.48 ± 0.01 ^a	1.09 ± 0.03 ^a	0.38 ± 0.03 ^a
Células viables (log UFC/mL)	7.67 ± 0.08 ^a	7.72 ± 0.03 ^a	7.70 ± 0.01 ^a	7.94 ± 0.09 ^{bc}
pH	3.75 ± 0.01 ^d	3.82 ± 0.01 ^e	3.82 ± 0.01 ^e	3.83 ± 0.01 ^e
Etanol (g/100 mL)	6.12 ± 0.18	6.14 ± 0.07	6.09 ± 0.11	6.71 ± 0.01

Análisis	EYS5			
	M3	M10	S3	S10
[] azúcares reductores (g/L)	12,98 ± 0,45 ^c	2,57 ± 1,39 ^{ab}	6,51 ± 2,79 ^b	0,44 ± 0,06 ^a
Células viables (log UFC/mL)	7,80 ± 0,02 ^{abc}	7,99 ± 0,03 ^c	7,85 ± 0,06 ^{abc}	7,77 ± 0,02 ^{ab}
pH	3,74 ± 0,01 ^a	3,63 ± 0,01 ^c	3,53 ± 0,14 ^b	3,64 ± 0,01 ^c
Etanol (g/100mL)	5,99 ± 0,39	6,39 ± 1,16	6,24 ± 0,18	6,96 ± 0,18

De todas estas formulaciones se seleccionó como mejor sustrato al preparado con 10 % de zumo de piña y con soluciones de harina de arroz y panela esterilizadas por separado (S10). Esta forma de preparación se asemeja a la original y es la formulación en la que se obtuvieron los valores más altos en relación a concentración de etanol y un consumo final de azúcares similar para las dos cepas analizadas.

Chicha de Jora

La chicha de Jora es quizá la más conocida y estudiada hasta el momento, el nombre de “cerveza indígena andina” tiene relación directa con la forma de elaboración de esta bebida. La bebida ancestral se preparaba únicamente con maíz de Jora y se usaba como inóculo el precipitado de una chicha anterior, llamada “chicha madre”, o granos de maíz masticados para acelerar el proceso de fermentación (Gomes et al., 2009). Sin embargo, actualmente la chicha de Jora que se prepara para la mayoría mestiza en el Ecuador, suele tener como ingrediente adicional la panela y se usa como inóculo el residuo de una fermentación anterior.

Se decidió evaluar la posibilidad de que el sustrato natural sea elaborado con harina de maíz germinado conocida en Ecuador como “harina de Jora”, este ingrediente fue adquirido en el mercado central de Otavalo (Imbabura – Ecuador), donde se expende esta harina ya preparada por mujeres indígenas de la zona. Previo a su uso la harina fue tamizada y se decidió usar para los ensayos

preliminares únicamente a la cepa *S. cerevisiae* EYS5 aislada en la chicha del yamor por la cierta similitud en el sustrato de fermentación entre estas dos chichas. Se evaluaron cuatro formulaciones con diferentes concentraciones de harina de Jora: 3 % (J3), 5 % (J5), 10 % (J10) y una cuarta formulación correspondiente a Harina de Jora al 3 % con un 3 % de panela adicional (JP3).

La cinética de fermentación correspondiente al sustrato al que se le adicionó panela (JP3) fue muy diferente a las de las otras tres formulaciones (Figura R2.2). Al igual que lo ocurrido con las formulaciones basadas en la chicha de arroz, se observó para este caso una cantidad de azúcares reductores más alta a la inicial el día después de iniciada la fermentación (día 1), para llegar a niveles similares al resto de chichas, indicando que dicha variación en monosacáridos procede de la panela. No se detectó un consumo completo de azúcares reductores libres en ningún caso (Figura R2.2).

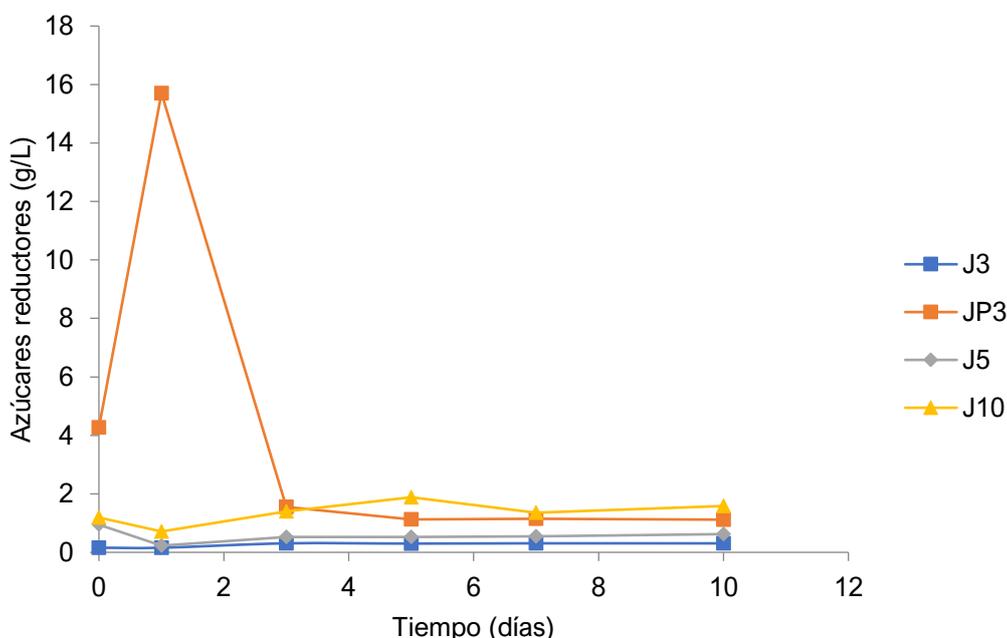


Figura R2.2 Cinética del consumo de azúcares reductores de la cepa *S. cerevisiae* EYS5 en distintas formulaciones y estrategias de esterilización de un sustrato similar al usado en la elaboración de chicha de Jora.

El sustrato elaborado con panela (JP3) fue el único en el que se observó una reducción del pH importante luego de 14 días de fermentación (Figura R2.3 B) y en el que se obtuvo una concentración de etanol superior a 1 g/100 mL (Figura R2.3A). La viabilidad a lo largo de la fermentación fue mayor en este sustrato que en los otros tres analizados (Figura R2.3C). En J10 se produjo un crecimiento a tiempos cortos mayor que en otras formulaciones, quizás debido a la presencia de algún compuesto asimilable cuya concentración aumenta con el porcentaje

de harina. Al parecer la concentración de harina de Jora no influye en el potencial fermentativo de las levaduras ya que ninguna de ellas tiene actividad amilasa capaz de convertir los almidones típicos de las harinas en azúcares fermentables mientras que la adición de panela (rica en sacarosa, glucosa y fructosa), contribuye de forma determinante al crecimiento y fermentación. Además, en relación a la preparación de cada una de las formulaciones, una mayor concentración de harina hacía más espeso y menos manejable al sustrato.

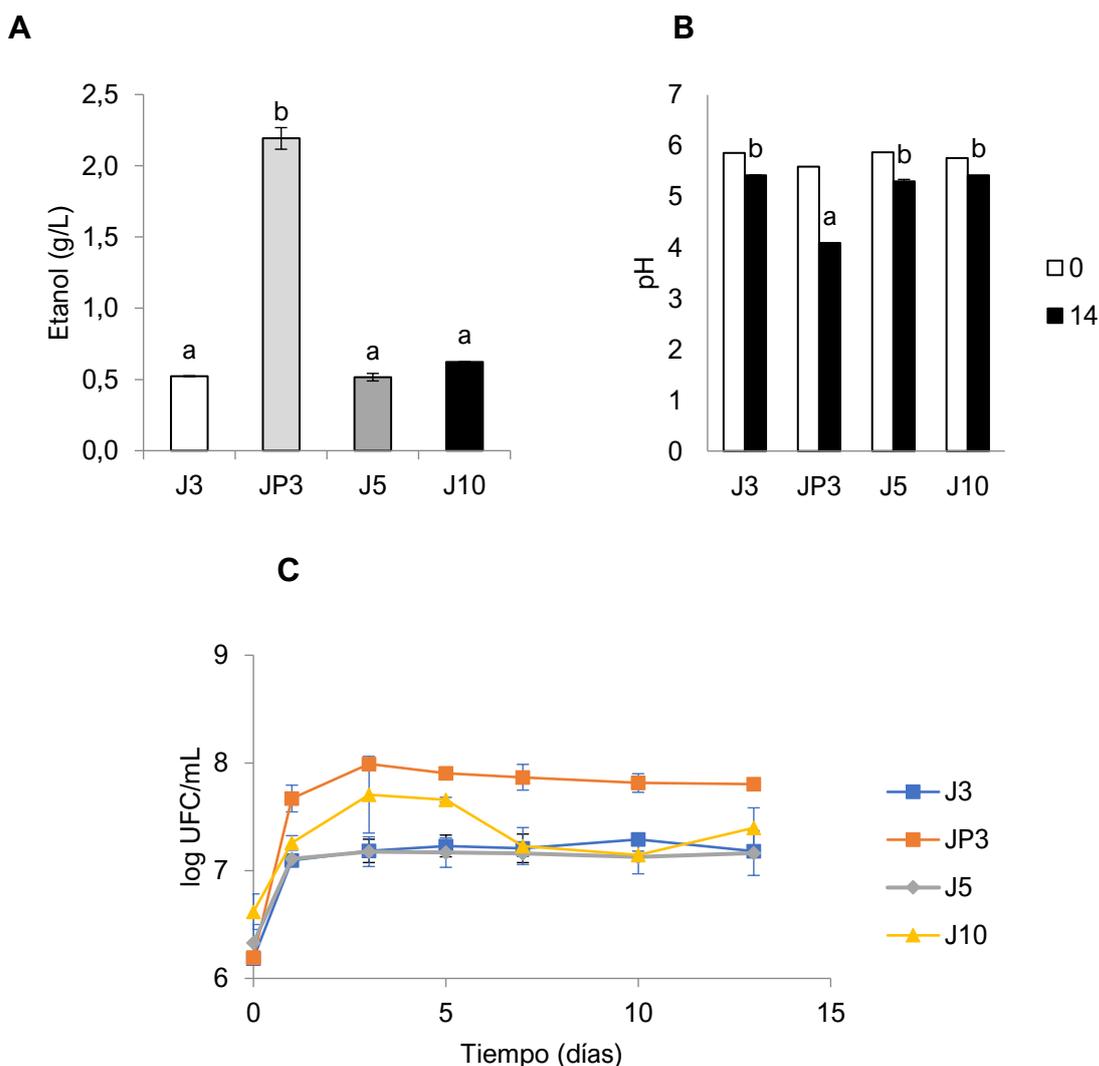


Figura R2.3 Gráficas de cambios de parámetros de fermentación en un sustrato similar al usado en la fermentación de chicha de Jora (A) Concentraciones de etanol g/L, (B) pH, (C) viabilidad (log UFC/mL). Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Debido a la gran cantidad de sólidos presentes en este sustrato y al bajo poder fermentativo de la cepa EYS5 en todas las formulaciones evaluadas se decidió que este sustrato no podría ser usado como Sustrato Modelo de Chicha para la evaluación de las cepas seleccionadas. Se ha demostrado que durante la

fermentación de la chicha de Jora actúa un consorcio de microorganismos (bacterias, mohos y levaduras) (Faria-Oliveira et al., 2015) y que incluso pueden existir algunas cepas del género *S. cerevisiae* capaces de producir amilasas (Vallejo et al., 2013). Sin embargo, ninguna de las cepas seleccionadas tiene actividad amilasa (Tabla R1.5) y posiblemente el uso de cultivos puros no sea una estrategia adecuada para la fermentación de sustratos de este tipo.

Análisis del Sustrato MCS (S10)

Como ya se ha comentado, finalmente se decidió utilizar la formulación S10, basada en el sustrato de preparación de la chicha de Arroz (RC), por ser el más representativo y en el que se obtuvo un buen crecimiento de las cepas (tanto de la cepa ecuatoriana como de la cepa vínica control). Su constitución final fue 3 % de harina de arroz, 10 % de zumo de piña y 12 % de panela.

Se determinó su composición mediante análisis por HPLC (Tabla R2.3).

Tabla R2.3 Composición del sustrato modelo tipo chicha (MCS).

Composición	Unidades	MCS
Extracto	°P	13.62 ± 0.57
pH	-	4.83 ± 0.06
Maltosa	g/L	5.42 ± 0.02
Maltotriosa	g/L	0.69 ± 0.01
Glucosa	g/L	75.15 ± 0.34
Fructosa	g/L	35.73 ± 0.16

El contenido total de maltosa y maltotriosa de este sustrato es bajo comparado con mostos cerveceros, mientras que la concentración de glucosa y fructosa es alta (aunque sin llegar a lo que sería un mosto de uva). Una concentración de maltosa similar a la obtenida en nuestra bebida (5.7 g/L) se describió en una chicha elaborada a base de maíz por una comunidad indígena de Brasil (Resende et al., 2018), sin embargo en estas bebidas la maltosa era el único azúcar presente en el sustrato lo que se reflejó en chichas con una concentración de etanol muy baja (0.3 g/L).

La panela es un derivado de la caña de azúcar conocido en el mundo científico, como azúcar de caña no centrifugada y cuya composición de azúcares es de aproximadamente 92 %, siendo la sacarosa el azúcar mayoritario (~ 84 %). Es utilizado como un endulzante tradicional (Jaffé, 2015) y suele ser añadido en la preparación de diversos tipos de chichas y otras bebidas de Latinoamérica (López y Ramírez, 2010; Chaves-López et al., 2014). Al tener la formulación

propuesta como MCS un 13 % de panela, es esta la que contribuye a la concentración de glucosa y fructosa (productos de su hidrólisis) del sustrato inicial que se convierten en la principal fuente de carbono usada por las levaduras. El paso clave en el metabolismo de la sacarosa en *S. cerevisiae* es su hidrólisis mediante la enzima invertasa en glucosa y fructosa para luego ingresar a la célula por difusión facilitada y donde los monosacáridos son fosforilados y metabolizados (Marques et al., 2015).

Al contrario de un mosto de cerveza donde los azúcares predominantes son la maltosa y la maltotriosa (He et al., 2014), en este sustrato la concentración de esos dos azúcares es menor a 6 g/L. Como se puede notar existe una importante diferencia en la composición final de este sustrato y el mosto de cerveza en relación a azúcares fermentables.

2.1.1.2. Fermentaciones con cultivos puros

Fermentaciones a escala 30mL

Una vez estandarizada la formulación para llevar a cabo las fermentaciones en MCS, se procedió a realizar microfermentaciones con el mismo para obtener un primer análisis de su funcionalidad. Se inocularon 30 mL de este sustrato con cada una de las cepas seleccionadas como las más prometedoras de entre las cepas de *S.cerevisiae* y de *T. delbrueckii* identificadas en el apartado anterior, siguiendo la metodología que se detalla en el apartado de Materiales y Métodos 7.1.1.

Se encontraron diferencias en la cinética de consumo de azúcares reductores tanto entre especies como entre cepas (Figura R2.4), algunas de ellas correspondieron a las que ya se habían visto con la cepa EYS5 durante la estandarización del sustrato. Debido al volumen tan pequeño de muestra con la que se contaba (30 mL) se realizaron experimentos diferentes con tiempos de recogida de muestras distintos (ya que no se podían tomar todos los días). Se observaron concentraciones de azúcares más altas a la inicial en el día 3 para las cepas *S. cerevisiae* ERS1 y EYS5, mientras que la concentración se reducía para EYS4 y L2056. Las cepas *T.delbrueckii* D291 y EGT1 presentan un pico similar, aunque el consumo de azúcares es más rápido en la cepa de referencia.

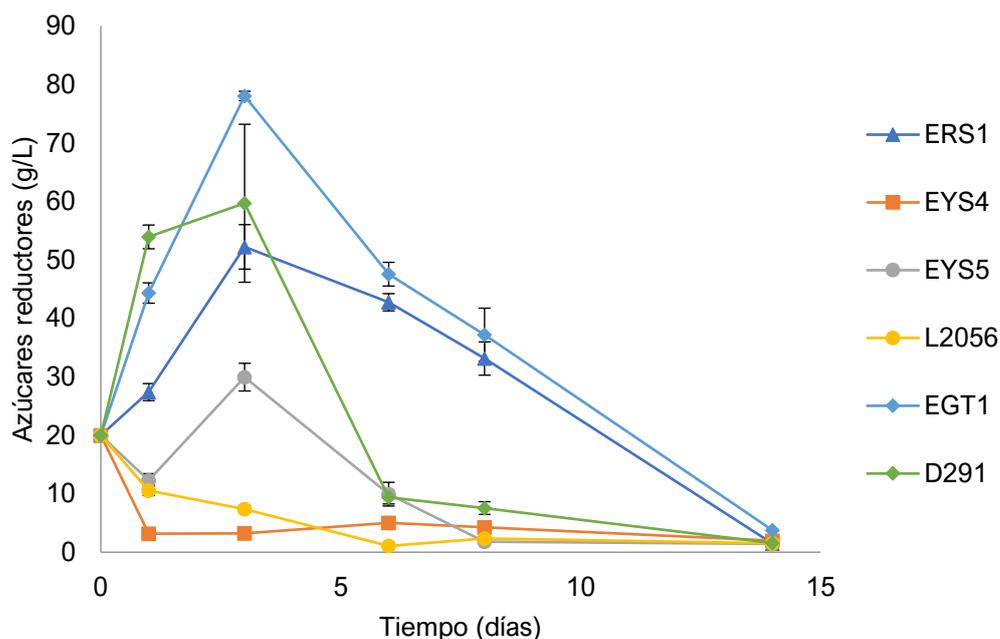


Figura R2.4 Cinética de consumo de azúcares en fermentaciones a escala de laboratorio (30 mL) en MCS durante 14 días.

La cinética de consumo de azúcares reductores fue muy similar entre las cepas de *T. delbrueckii* (EGT1 y D291) mientras que para las cepas de la especie *S. cerevisiae* se observaron importantes diferencias entre ellas. La cantidad de azúcares reductores fue cuatro veces mayor a la inicial para las cepas de *S. cerevisiae* ERS1 y EYS5 entre los días 2 y 3; se encontró cierta similitud a las de la especie *T. delbrueckii* ya que la concentración de azúcares reductores presente en el sustrato aumentaba entre los días 3 y 5. La cepa de *S. cerevisiae* ERS4 presentó una cinética muy parecida a la cepa control L2056, incluso se observó una disminución de azúcares reductores más rápida que para la cepa vínica de referencia. Para la cepa ERS1 se observó una disminución muy lenta de los azúcares presentes mientras que en la cepa ERS5 se determinó un consumo total de azúcares en el día 7. La actividad invertasa per se (ver anteriormente) no varía lo suficiente entre cepas como para justificar estas diferencias. Los azúcares reductores disminuyeron para todas las cepas al final de la fermentación, siendo consumidos completamente en dos semanas.

En relación a los parámetros de fermentación, no se encontraron diferencias significativas entre cepas para los parámetros concentración de azúcares y etanol. La cepa EYS5 presentó los promedios más altos de viabilidad al final de la fermentación mientras que se observó una importante reducción en el crecimiento de la cepa vínica de referencia *T. delbrueckii* D291 (Tabla R2.4), respecto a la cepa autóctona.

Tabla R2.4 Parámetros de fermentación de chichas inoculadas con las cepas seleccionadas luego de 14 días. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	ERS1	EYS4	EYS5	L2056
	<i>S. cerevisiae</i>			
[] azúcares (g/L)	1.68 ± 0.02	1.78 ± 0.10	1.65 ± 0.01	1.67 ± 0.03
etanol (g/100mL)	7.75 ± 0.14	8.31 ± 1.14	8.47 ± 0.32	8.41 ± 0.42
pH	3.83 ± 0.04 ^{bc}	3.65 ± 0.03 ^a	3.81 ± 0.05 ^b	3.93 ± 0.01 ^d
Viabilidad (log UFC/mL)	7.49 ± 0.05 ^b	7.72 ± 0.03 ^{bc}	7.93 ± 0.01 ^c	7.71 ± 0.02 ^{bc}

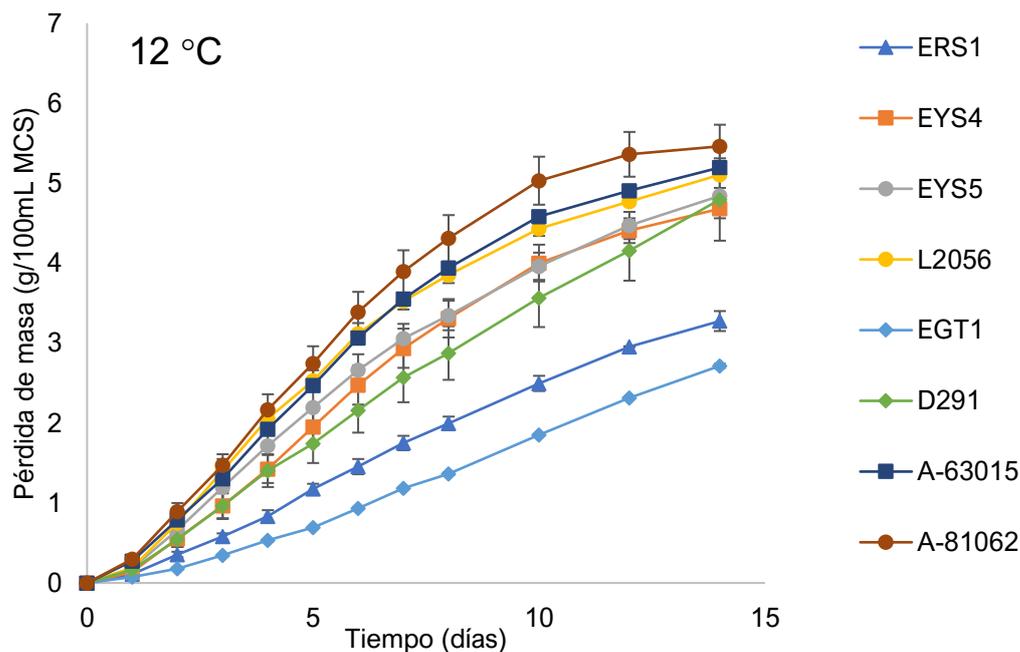
Análisis	EGT1	D291
	<i>T. delbrueckii</i>	
[] azúcares (g/L)	1.72 ± 0.05	1.71 ± 0.03
etanol (g/100 mL)	8.08 ± 0.05	8.36 ± 0.43
pH	3.81 ± 0.04 ^d	3.91 ± 0.02 ^{cd}
Viabilidad (log UFC/mL)	7.71 ± 0.05 ^{bc}	7.14 ± 0.25 ^a

En todas las chichas obtenidas en este estudio se encontraron concentraciones de etanol altas ($> 7.8\%$); los promedios más altos se encontraron en los sustratos inoculados con las cepas EYS5 y L2056. Se determinó además altas concentraciones finales de etanol en las chichas fermentadas con las dos cepas de la especie *T. delbrueckii* EGT1 y D291, que confirma su potencial fermentativo. Al existir una amplia variedad de chichas, además de que los tiempos de fermentación son muy variables de un tipo a otro, la concentración de etanol puede ser del 1 al 12 % (Chaves-López et al., 2014). En varias muestras de chichas de jora ecuatorianas se describen concentraciones de etanol muy bajas, desde niveles no detectables hasta un máximo de 6 % mientras que en chichas del Yamor se muestran valores entre 6.6 – 6.9 % v/v de etanol (Piló et al., 2018). Las chichas ecuatorianas mencionadas del estudio anterior fueron producto de una fermentación espontánea y por ello se observan niveles muy variables y bajos de etanol mientras que se observa que en las fermentaciones inoculadas con cultivos puros de las cepas ecuatorianas seleccionadas hay mayor homogeneidad y mayores concentraciones de etanol. El pH en todas las chichas se redujo a lo largo del proceso fermentativo, de 4.35 a 3.8 aproximadamente, siendo el valor más bajo para EYS4, posiblemente por su más rápido consumo de azúcares. Valores similares a estos fueron descritos en chichas ecuatorianas de Jora (pH 3 – 4) y en chichas del Yamor (pH 3.3 – 3.7) (Piló et al., 2018).

Fermentaciones a escala 100 mL

Una vez comprobado que las cepas analizadas eran capaces de completar la fermentación en MCS se probó un volumen mayor de fermentación, en el que se estudió el efecto de la temperatura. El desempeño fermentativo de las cepas seleccionadas se estudió a escala de laboratorio (100 mL) a dos temperaturas 12 °C y 20 °C con el objeto de determinar si existe algún tipo de variación en su capacidad fermentativa en función de cambios en este parámetro. Como se ha comentado, estos experimentos se llevaron a cabo en las instalaciones y con los protocolos analíticos del VTT, en Finlandia. El proceso fermentativo se llevó a cabo hasta no observar cambios en la pérdida de masa, el tiempo de fermentación fue de 14 días.

Como se esperaba, a altas temperaturas (20 °C), todas las cepas mostraron una cinética de fermentación más rápida, especialmente al inicio de la fermentación (Figura R2.5A). En el caso de las cepas comerciales los valores más altos de pérdida de masa a 20 °C se alcanzaron en el día 7 mientras que a 12 °C, la cepa *S. cerevisiae* A-81062 fue la que mostró una cinética más rápida de fermentación, con valores de pérdida de masa más altos en el día 14 (Figura R2.5B). Las diferencias más drásticas en pérdida de masa entre las dos temperaturas fueron observadas para la cepa *T. delbrueckii* EGT1, seguida por la cepa *S. cerevisiae* ERS1. Estas dos cepas en las dos temperaturas mostraron cinéticas de fermentación más lentas, sin embargo, a 20 °C en el día 14, alcanzaron valores de pérdida de masa similares al resto de cepas mientras que a 12 °C, en ese mismo periodo de tiempo, los valores de pérdida de masa fueron casi la mitad. Las cepas ecuatorianas EYS4 y EYS5 y la cepa *T. delbrueckii* control D291 mostraron cinéticas de fermentación muy parecidas a la cepa cervecera *S. pastorianus* A-63015 aunque inferiores al resto de cepas de *S. cerevisiae* industriales. Las cepas industriales de la especie *S. cerevisiae* tanto vínicas como cerveceras (L2056 y A-81062, respectivamente) fueron las que presentaron una fermentación más rápida reflejada en valores de pérdidas de masa más altos en las dos temperaturas.



B

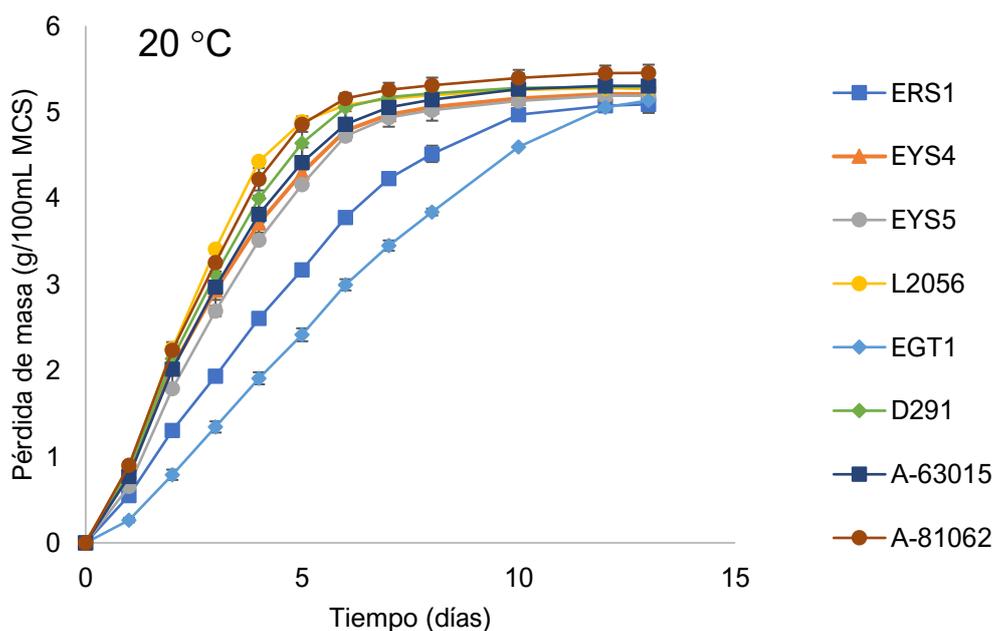


Figura R2.5 Pérdida de masa durante la fermentación a escala de laboratorio (100 mL), en sustrato modelo tipo chicha (MCS) (13 – 14 °P) en dos temperaturas diferentes (A) 12 °C y (B) 20 °C.

Los parámetros finales de fermentación en las dos temperaturas, se detallan en la Tabla R2.5.

Tabla R2.5 Parámetros finales de fermentación de las chichas fermentadas con las cepas seleccionadas a escala de laboratorio (100 mL). Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	<i>S. cerevisiae</i>					
	ERS1		EYS4		EYS5	
	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C
Alcohol (%v/v)	5.07 ± 0.08 ^b	6.94 ± 0.14 ^{ab}	6.76 ± 0.04 ^c	6.80 ± 0.08 ^a	6.93 ± 0.05 ^c	7.07 ± 0.04 ^{abc}
[] azúcares (°P)	3.84 ± 0.16 ^b	-	0.11 ± 0.04 ^a	-	-	-
pH	4.13 ± 0.05	3.96 ± 0.02 ^{ab}	4.19 ± 0.04	3.95 ± 0.03 ^a	4.18 ± 0.06	3.99 ± 0.02 ^{ab}
Masa seca (g /L MCS)	36.60 ± 0.84 ^d	26.81 ± 0.65	31.37 ± 0.40 ^c	29.94 ± 0.23	30.51 ± 0.19 ^{bc}	28.39 ± 0.85
Viabilidad (%)	97.16 ± 0.07 ^c	98.13 ± 0.32 ^b	97.74 ± 0.04 ^c	98.79 ± 0.16 ^b	96.26 ± 0.26 ^c	98.18 ± 0.2 ^b

Análisis	<i>S. cerevisiae</i>				<i>S. pastorianus</i>	
	L2056		A-81062		A-83015	
	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C
Alcohol (%v/v)	7.18 ± 0.15 ^c	7.26 ± 0.01 ^{bc}	7.32 ± 0.02 ^c	7.2 ± 0.01 ^{bc}	7.33 ± 0.01 ^c	7.38 ± 0.01 ^c
[] azúcares (°P)	-	-	-	-	-	-
pH	4.29 ± 0.01	4.13 ± 0.01 ^c	4.15 ± 0.02	4.12 ± 0.03 ^c	4.29 ± 0.01	4.05 ± 0.01 ^{bc}
Masa seca (mg / g MCS)	26.71 ± 0.08 ^a	30.92 ± 0.45	28.56 ± 0.3 ^{ab}	27.26 ± 0.46	27.41 ± 0.03 ^a	28.02 ± 0.78
Viabilidad (%)	75.31 ± 0.58 ^a	97.28 ± 0.51 ^b	97.57 ± 0.07 ^c	97.11 ± 0.39 ^b	91.12 ± 1.17 ^b	91.54 ± 0.41 ^a

Análisis	<i>T. delbrueckii</i>			
	EGT1		D291	
	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C
Alcohol (%v/v)	4.28 ± 0.01 ^a	7.14 ± 0.04 ^{abc}	6.76 ± 0.36 ^c	7.38 ± 0.08 ^{abc}
[] azúcares (°P)	5.64 ± 0.01 ^c	-	-	-
pH	4.21 ± 0.02	3.99 ± 0.02 ^{ab}	4.20 ± 0.04	4.1 ± 0.01 ^c
Masa seca (mg / g MCS)	40.59 ± 0.88 ^e	29.67 ± 0.39	30.41 ± 0.45 ^{bc}	27.55 ± 0.28
Viabilidad (%)	96.86 ± 0.02 ^c	97.51 ± 1.33 ^b	96.91 ± 0.45 ^c	95.75 ± 0.33 ^b

En relación a las fermentaciones en MCS a 12 °C, los valores más bajos en concentración de etanol (< 5 %) se encontraron en las chichas fermentadas con las cepas ERS1 y EGT1, reflejada también en concentraciones finales apreciables de azúcares mientras que para el resto de bebidas no se detectaron azúcares reflejando una conversión completa de los mismos. De manera interesante, los valores de masa seca más altos correspondieron también a las bebidas fermentadas con las dos cepas que presentaron los niveles más bajo de etanol (ERS1 y EGT1) lo que sugiere un desvío de la fuente de carbono para la creación de biomasa. En relación a la viabilidad de las cepas al final de la fermentación se encontró que la cepa L2056 es la que presentó los valores más bajos (75.3 %) a la temperatura más baja, mientras que el resto de cepas presentaron una viabilidad final superior al 90 %, indicando una mejor adaptación al medio.

En cuanto a las fermentaciones llevadas a cabo en este sustrato a 20 °C, todas las chichas presentaron concentraciones de alcohol superiores al 6.8 %, los valores más altos las presentaron las bebidas inoculadas con las cepas industriales tanto cerveceras (A-81062 y A-63015) como vínicas (L2056 y D291). No se encontraron diferencias estadísticamente significativas entre cepas en relación al pH a la misma temperatura, los valores oscilaron entre 3.95 – 4.23, mayores a los encontrados en las fermentaciones descritas anteriormente en un volumen de 30 mL. El aumento de la temperatura supone una acidificación mayor en todas las cepas, reflejo quizás de un metabolismo más vigoroso. Las fermentaciones en 30 mL se realizaron a 24 °C, lo que podría justificar esas diferencias de pH. La viabilidad más baja a esta temperatura, se encontró en la cepa cervecera *S. pastorianus* A-83015, posiblemente relacionada con la baja supervivencia que esta muestra a temperaturas superiores a los 14 °C. La especie *S. pastorianus* pertenece al grupo de levaduras cerveceras tipo lager que fermentan más rápido a temperaturas más bajas (Vidgren et al., 2010), sin embargo se puede observar que, pese a que la viabilidad es baja, esta muestra en buen desempeño fermentativo en el MCS.

En el caso de las chichas obtenidas como producto de la fermentación con las cepas ecuatorianas EYS4 y EYS5 y las cepas industriales L2046, A-81062 y A-83015, no se encontraron diferencias en relación a niveles finales de etanol en función de la temperatura de fermentación. Aunque a mayor temperatura la fermentación fue rápida, a los 13 días los parámetros de fermentación fueron muy similares lo que posiblemente sugiere que en este sustrato el cambio de temperatura para estas cepas no afecta su desempeño fermentativo, pero sí lo vuelve más lento.

La variable masa seca, usada muy comúnmente en cervecería para determinar la cantidad de biomasa de levadura presente en el mosto, representa en el caso de la chicha mayoritariamente la cantidad de sólidos disueltos (cuyo origen son

los ingredientes) y en forma minoritaria al inóculo. Encontramos valores más altos en las chichas fermentadas a 12 °C, incluso se observan diferencias significativas entre cepas, pero no existe una relación directa entre la capacidad fermentativa de una cepa y este parámetro. Por ello este parámetro solo se usó con fin informativo más no referencial.

La temperatura es uno de los factores que más afecta al desempeño fermentativo de las levaduras en procesos de fermentación alcohólica (Gibson et al., 2007), sin embargo en relación a las cepas de la especie *S. cerevisiae* se ha determinado que su desempeño fermentativo a bajas o altas temperaturas es muy variable entre cepas (Torija et al., 2003) lo que también se ha comprobado con nuestras cepas seleccionadas. La temperatura ambiental en la Sierra Ecuatoriana puede oscilar entre los 12 a 20 °C (Hofstede et al., 1998) por lo que se observa una adaptación de las cepas a este rango.

Según Navarrete-Bolaños, (2012) la temperatura a la cual una fermentación alcohólica se lleva a cabo no solo afecta a la tasa de crecimiento de la levadura sino también a las reacciones bioquímicas que dan lugar a la composición química y sensorial del producto final, por ello la temperatura óptima debe ser determinada incluso de acuerdo a la cepa. La cepa iniciadora está intrínsecamente relacionada con el sustrato de fermentación por lo cual se debe profundizar los factores que influyen en esta relación y su efecto final en el producto con la idea de producir una bebida a escala industrial.

Fermentaciones a escala piloto (1.5 L)

La fermentación de las chichas en Latinoamérica, al ser un proceso muy artesanal, generalmente es llevada a cabo a temperaturas no controladas (ambiente) por lo que pueden ser muy variables dependiendo del lugar y en el momento en el que son elaboradas. Antiguamente se usaban vasijas de arcilla de diferentes volúmenes llamadas “pondos” que eran enterradas, dejando únicamente la boca en la superficie para evitar cambios drásticos de temperatura y mantener el proceso más uniforme; en algunos casos se sigue usando esta estrategia pero en otros no (Gomes et al., 2009).

Se decidió realizar fermentaciones en MCS a escala piloto con la idea de comparar los resultados obtenidos a escala de laboratorio. Existen varios parámetros y variaciones que deben ser medidos, controlados y experimentados para determinar las condiciones óptimas de fermentación que prueben la consistencia al seguir un escalado de un proceso fermentativo (Marsh et al., 2014), por ello se decidió realizar este escalamiento a 20 °C ya que fue la temperatura a la que se obtuvo a escala de laboratorio una fermentación más rápida para todas las cepas evaluadas (Figura R2.5), siendo una temperatura común en los ambientes en que se elaboran las chichas.

Se midieron dos variables muy usadas en estudios de fermentaciones de mosto de cerveza que son el extracto y la atenuación. El extracto se refiere a la fracción de las sustancias disueltas en el sustrato y este puede ser aparente y real, la diferencia entre estos dos es que el extracto real toma en cuenta el etanol presente mientras que el extracto aparente no lo hace. Esta variable expresa la concentración de sólidos disueltos (principalmente azúcares) en el tiempo, y se expresa como grados Plato °P en cada punto de la fermentación. La atenuación es el porcentaje de azúcares usados por los microorganismos, por lo que un valor de atenuación de 100 % indica que todos los azúcares han sido consumidos. En bebidas como la cerveza esto nunca ocurre ya que en el mosto cervecero están presentes dextrinas que suelen no ser usadas por las levaduras mientras que, en vino y sidra esto si puede ocurrir. Existen dos tipos de atenuación aparente y real calculadas en función del extracto aparente y real.

Igual que lo observado en las fermentaciones a escala de laboratorio, todas las cepas fueron capaces de fermentar este sustrato (Figura R2.6). La cepa *S. cerevisiae* A-81062 cervecera, mostró la disminución más rápida en extracto seguida por las cepas ecuatorianas *S. cerevisiae* EYS4 y EYS5. La cepa *T. delbrueckii* EGT1 alcanzó su extracto final luego de 13 días de fermentación demostrando el metabolismo más lento, seguida por su cepa de referencia D291. En relación a las cepas de la especie *S. cerevisiae*, la cepa ERS1 es la que mostró el metabolismo más lento de este grupo que se reflejó en su cinética de consumo de azúcares.

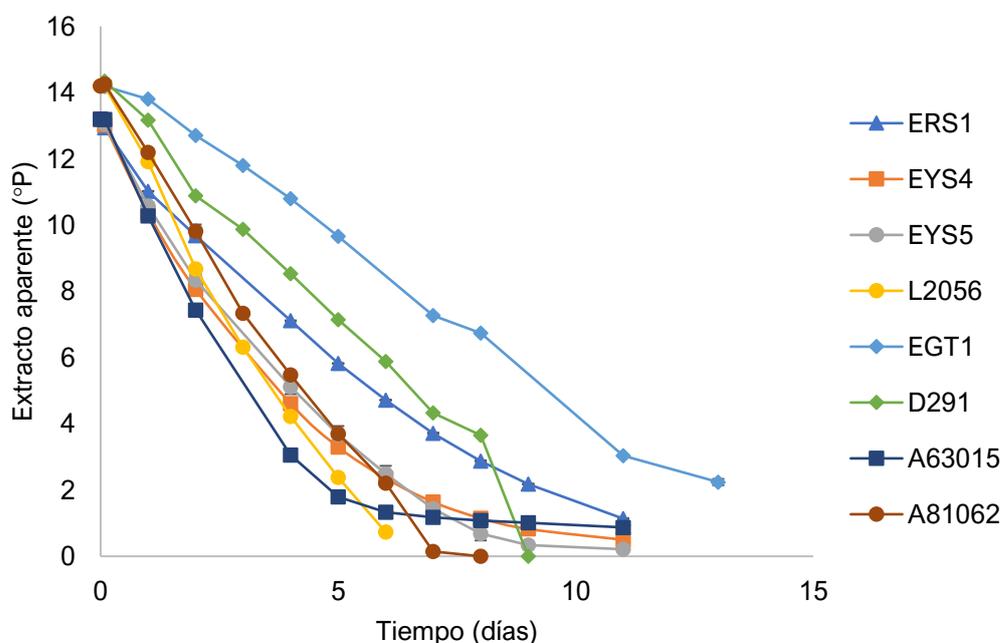


Figura R2.6 Disminución del extracto aparente para todas las cepas investigadas durante la fermentación (20 °C) en 1.5 L MCS (13 – 14 °P). Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

En relación a los valores de atenuación aparente obtenidos, como se puede observar en la Figura R2.7 se obtuvieron con la mayoría de las cepas estudiadas, valores de atenuación aparente superiores al 90 %, incluso con tres de ellas (L2056, A-81062 y D291) se obtuvieron valores de 100 % que reflejaba un consumo total de los azúcares presentes en el MCS. El valor de atenuación más bajo se obtuvo con la cepa *T. delbrueckii* EGT1.

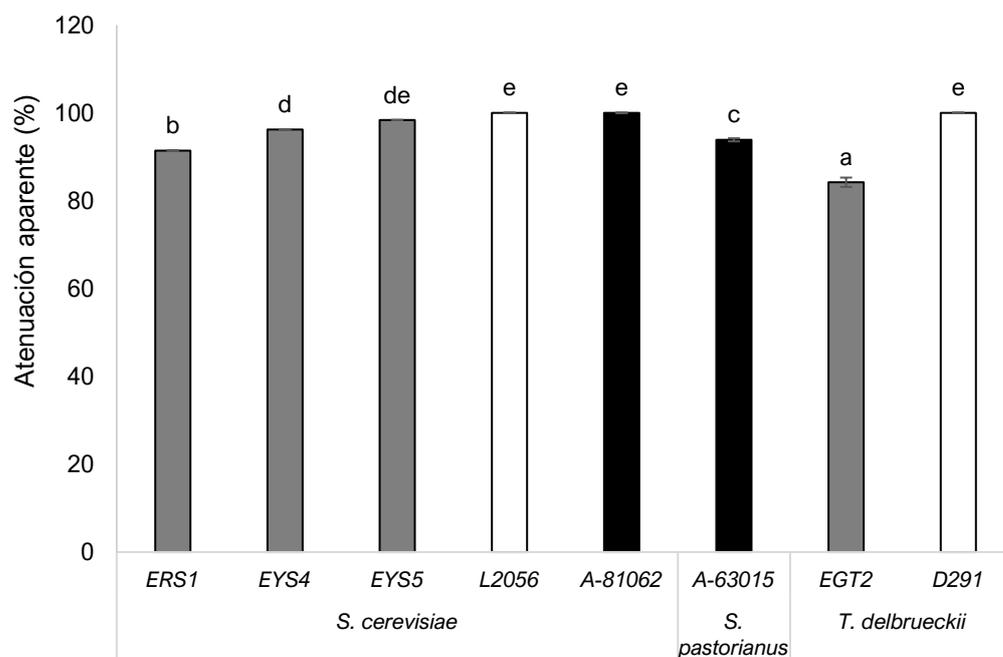


Figura R2.7 Atenuación final aparente del sustrato modelo tipo Chicha (MCS) fermentado con las cepas seleccionadas y sus controles. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Todas las chichas alcanzaron una concentración de alcohol igual o mayor al 6.35 % (v/v) después de 8 - 13 días de fermentación (Tabla R2.6). Los valores más bajos correspondieron a la cepa *T. delbrueckii* EGT1 seguida por la cepa *S. cerevisiae* ERS1 mientras que los valores más altos correspondieron a las cepas comerciales de *S. cerevisiae*. La cepa EYS5 produjo más alcohol que la cepa de *S. pastorianus*. El análisis de la concentración final de azúcares reveló el uso preferencial de la glucosa y fructosa frente a la maltosa y maltotriosa en casi todas las cepas. La concentración más alta de glicerol la presentó la chicha fermentada con la cepa ecuatoriana EYS4. El valor de pH final de las chichas fue inferior a 4.01. La viabilidad final de casi todas las cepas estudiadas fue superior al 90 %, excepto para la cepa *T. delbrueckii* EGT1 (~ 65 %).

Tabla R2.6 Análisis de las chichas fermentadas por las cepas investigadas, los valores están expresados en g/L. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	ERS1	EYS4	EYS5	A81062	L2056
	<i>S. cerevisiae</i>				
Alcohol (%v/v)	6.42 ± 0.02 ^{ab}	6.70 ± 0.01 ^c	6.95 ± 0.02 ^d	7.88 ± 0.01 ^f	7.71 ± 0.01 ^{ef}
[] azúcares (°P)	1.14 ± 0.01 ^d	0.5 ± 0.01 ^b	0.21 ± 0.01 ^a	-	-
Maltotriosa	0.48 ± 0.02 ^b	0.47 ± 0.01 ^b	0.52 ± 0.01 ^b	0.1 ± 0.01 ^a	0.49 ± 0.04 ^a
Maltosa	1.22 ± 0.02 ^c	1.29 ± 0.01 ^c	1.15 ± 0.03 ^c	-	0.96 ± 0.02 ^b
Glucosa	-	-	-	0.48 ± 0.01 ^a	-
Fructosa	8.7 ± 0.27 ^a	-	-	0.92 ± 0.06 ^a	2.66 ± 0.20 ^a
Glicerol	4.39 ± 0.12 ^{abc}	5.86 ± 0.19 ^d	4.7 ± 0.02 ^{bcd}	4.95 ± 0.05 ^{cd}	5.39 ± 0.06 ^{cd}
Etanol	47.74 ± 1.03 ^b	50.15 ± 2.15 ^{bc}	54.00 ± 0.07 ^{bc}	60.18 ± 0.85 ^c	51.20 ± 0.42 ^{bc}
pH	3.74 ± 0.01 ^a	3.82 ± 0.01 ^{bc}	3.79 ± 0.01 ^{ab}	3.78 ± 0.01 ^{ab}	3.88 ± 0.01 ^{cd}
Viabilidad (%)	97.61 ± 0.25 ^c	98.80 ± 0.09 ^c	98.09 ± 0.09 ^c	91.63 ± 0.17 ^{bc}	80.95 ± 3.45 ^{ab}

Análisis	A63015	EGT1	D291
	<i>S. pastorianus</i>	<i>T. delbrueckii</i>	
Alcohol (%v/v)	6.60 ± 0.01 ^{bc}	6.35 ± 0.10 ^a	7.67 ± 0.01 ^e
[] azúcares (°P)	0.87 ± 0.05 ^c	2.24 ± 0.15 ^d	-
Maltotriosa	0.49 ± 0.04 ^b	-	0.11 ± 0.01 ^a
Maltosa	0.96 ± 0.02 ^b	0.75 ± 0.05 ^a	0.78 ± 0.06 ^{ab}
Glucosa	0.55 ± 0.01 ^a	12.71 ± 1.64 ^b	1.04 ± 0.01 ^a
Fructosa	6.56 ± 0.13 ^a	27.4 ± 3.53 ^b	4.33 ± 0.42 ^a
Glicerol	5.40 ± 0.06 ^{cd}	3.25 ± 0.47 ^a	3.66 ± 0.17 ^{ab}
Etanol	51.20 ± 0.42 ^{bc}	33.33 ± 4.71 ^a	60.15 ± 1.87 ^c
pH	4.01 ± 0.02 ^e	3.94 ± 0.03 ^d	3.88 ± 0.01 ^{cd}
Viabilidad (%)	90.68 ± 2.103 ^{bc}	64.74 ± 1.13 ^a	78.18 ± 1.42 ^{ab}

Se decidió analizar las chichas como un tipo de cerveza para lo cual se usaron como referencia los límites organolépticos de cada uno de los compuestos de aroma analizados ya establecidos para esta bebida (Tabla R2.7).

Tabla R2.7 Límites organolépticos de los compuestos que contribuyen al aroma relacionados con el metabolismo de levaduras presentes en cervezas y sabor que producen en la bebida final (procedente de (Meilgaard, 1975; Blanco et al., 2016).

Compuesto	Límite organoléptico (ppm)	Sabor en cerveza
Acetaldehído	25	hierbas, hojas verdes, afrutado
2-Feniletanol	125	rosas, dulce, perfumado
Propanol	800	alcohol
2-Me-Propanol (Isobutanol)	200	alcohol
3-Me-Butanol (Isoamylalcohol)	70	alcohol, banano, dulce, aromático
2-Me-Butanol (amilalcohol activo)	65	alcohol, banana, medicinal, solvente, frutal
Acetato de etilo	21	solvente, frutal, dulce
3-Me-Butilacetato (Isoamilacetato)	1,4	banana, manzana, solvente, pera
Caproato de etilo	0,17	manzana ácida, anisado
Caprilato de etilo	0,3	manzana ácida
2-feniletilacetato	3,8	rosas, miel, manzana, dulce
Decanoato de etilo	10	ácidos grasos, frutal, manzana, solvente
Alcoholes Superiores: Ésteres (HA:Ésteres)	4:1 – 4.7:1	balance adecuado

Se analizaron las concentraciones de alcoholes superiores y ésteres ya que estos son los compuestos determinantes del perfil sensorial de las bebidas alcohólicas (Walker y Stewart, 2016). Las concentraciones de estos compuestos en las chichas fue variable entre especies y cepas. Para todos los parámetros analizados se encontraron diferencias significativas entre ellas (Tabla R2.8).

Tabla R2.8 Concentración de acetaldehído, alcoholes superiores y ésteres en el sustrato modelo tipo chicha (MCS) fermentado con las cepas seleccionadas. Todos los valores están dados como mg/L y fueron normalizados a 5% ABV (alcohol por volumen - *alcohol by volumen*). Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	ERS1	EYS4	S. cerevisiae		
			EYS5	L2056	A81062
Acetaldehído	24.19 ± 2.81 ^d	11.34 ± 1.42 ^a	24.50 ± 1.14 ^d	14.18 ± 0.81 ^{ab}	22.79 ± 2.01 ^d
2-Feniletanol	46.01 ± 6.56 ^d	28.31 ± 2.05 ^c	21.58 ± 3.39 ^{bc}	4.81 ± 1.28 ^a	6.53 ± 1.44 ^a
Propanol	18.42 ± 0.40 ^e	14.79 ± 0.60 ^c	10.95 ± 0.15 ^b	16.95 ± 0.18 ^d	11.65 ± 0.20 ^b
2-Metil Propanol	16.02 ± 0.19 ^b	36.80 ± 1.46 ^f	28.18 ± 1.28 ^e	26.34 ± 0.33 ^{de}	13.76 ± 0.10 ^a
3-Metil-Butanol	81.80 ± 1.77^a	150.67 ± 7.70^d	126.45 ± 4.23^c	131.13 ± 2.24^c	101.45 ± 1.16^b
2-Metil Butanol	38.79 ± 0.59 ^f	35.52 ± 1.92 ^e	29.53 ± 0.74 ^c	32.29 ± 0.53 ^d	18.75 ± 0.33 ^a
Acetato de etilo	20.35 ± 1.09 ^d	17.61 ± 1.85 ^c	19.78 ± 0.91 ^{cd}	14.82 ± 0.42 ^b	13.86 ± 0.35 ^b
3-Metil-Butilacetato	0.14 ± 0.01 ^c	0.18 ± 0.02 ^d	0.12 ± 0.01 ^c	0.14 ± 0.01 ^c	0.08 ± 0.01 ^b
Caproato de etilo	0.29 ± 0.02 ^e	0.28 ± 0.02 ^e	0.16 ± 0.02 ^c	0.061 ± 0.01 ^{ab}	0.06 ± 0.01 ^{ab}
Caprilato de etilo	0.35 ± 0.07 ^c	0.38 ± 0.06 ^c	0.23 ± 0.02 ^b	0.02 ± 0.0 ^a	0.02 ± 0.00 ^a
2-Feniletilacetato	-	-	-	-	-
Decanoato de etilo	0.26 ± 0.04 ^b	0.21 ± 0.03 ^b	0.12 ± 0.01 ^a	-	-
HA: ESTERES	7.27 ± 0.41 ^c	12.82 ± 0.81 ^e	9.57 ± 0.23 ^d	13.75 ± 0.26 ^e	10.40 ± 0.28 ^d

Análisis	A63015	EGT1	D291
	S. pastorianus	T. delbrueckii	
Acetaldehído	21.10 ± 2.41 ^{cd}	16.71 ± 1.49 ^{bc}	24.23 ± 2.34 ^d
2-Feniletanol	27.55 ± 0.94 ^{bc}	20.49 ± 0.95 ^b	27.86 ± 1.27 ^{bc}
Propanol	6.72 ± 0.10 ^a	14.01 ± 0.22 ^c	21.73 ± 0.75 ^f
2-Metil Propanol	25.32 ± 0.55 ^d	21.61 ± 0.08 ^c	47.44 ± 0.50 ^g
3-Metil-Butanol	107.60 ± 2.52^b	84.45 ± 1.01^a	127.98 ± 2.31^c
2-Metil Butanol	33.17 ± 0.84 ^{de}	16.95 ± 0.24 ^a	26.63 ± 0.87 ^b
Acetato de etilo	9.21 ± 0.12 ^a	48.33 ± 0.59^f	44.85 ± 0.85^e
3-Metil-Butilacetato	0.24 ± 0.01 ^e	0.05 ± 0.01 ^a	0.05 ± 0.0 ^a
Caproato de etilo	0.20 ± 0.01 ^d	0.04 ± 0.00 ^a	0.08 ± 0.01 ^b
Caprilato de etilo	0.26 ± 0.03 ^b	0.02 ± 0.00 ^a	0.024 ± 0.01 ^a
2-Feniletilacetato	0.10 ± 0.01 ^a	0.14 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.03 ^a
Decanoato de etilo	0.11 ± 0.02 ^a	-	-
HA: ESTERES	17.08 ± 0.64 ^f	2.82 ± 0.05 ^a	4.96 ± 0.09 ^b

Los valores en cursiva y negrilla son mayores a los límites establecidos para cerveza (Tabla R2.7)

Las chichas fermentadas con las cepas ERS1, EYS5, A-81062 y D291 presentaron altas concentraciones de acetaldehído, las dos primeras muy cercanas al límite establecido para cerveza (25 ppm). En relación al 2-feniletanol,

un compuesto importante de sabor y aroma en bebidas fermentadas especialmente en cerveza lager y sidra (Etschmann et al., 2002), la concentración más alta la presentó la chicha fermentada con la cepa ERS1, mientras que los valores más bajos correspondieron a las chichas inoculadas con las cepas A-81062 y L2056.

Los niveles de alcoholes superiores en las bebidas están asociados a los niveles correspondientes de los aminoácidos presentes en el medio de fermentación (Walker y Stewart, 2016). En relación a producción de alcoholes superiores en la fermentación del MCS, se encontró que las cepas ecuatorianas *S. cerevisiae* ERS1 y EYS4 son las que destacan por presentar los valores más altos de producción de estos compuestos. ERS1 corresponde a los promedios más altos de producción de propanol y 2-metilbutanol mientras que EYS4 presenta los valores más altos de concentraciones finales de 2-metilpropanol, 3-metilbutanol y también de 2-metil butanol. De las cepas utilizadas como referencia de las dos especies analizadas, la única en la que se observan promedios altos es la cepa *T. delbrueckii* D291 tanto en concentraciones de propanol como de 2-metilpropanol, mientras que para el resto de cepas se encontraron concentraciones relativamente bajas de estos compuestos. Es importante destacar que todas las chichas presentaron concentraciones de 3-methyl-butanol superiores al límite establecido en cerveza ($\geq 70 \text{ g L}^{-1}$) (Meilgaard, 1975). Esto podría indicar que este es un compuesto característico de este tipo de bebidas.

En cuanto a la concentración de ésteres, nuevamente son las chichas fermentadas con las cepas ERS1 y EYS4 las que destacan por la alta concentración en algunos de estos compuestos (caproato de etilo, caprilato de etilo, decanoato de etilo). En relación a la producción de acetato de etilo, las dos cepas de la especie *T. delbrueckii* son las que corresponden a las concentraciones más altas seguidas por las cepas ecuatorianas *S. cerevisiae* ERS1 y EYS5. En relación al 2-feniletilacetato, ninguna de chichas fermentadas con las cepas de la especie *S. cerevisiae* presenta concentraciones detectables de este compuesto mientras que los valores más altos corresponden a la cepa ecuatoriana EGT1. De igual forma no se encontraron niveles detectables de decanoato de etilo en las chichas fermentadas con las cepas L2056, A-81062 y A-63015.

En relación al sumatorio de las concentraciones tanto de alcoholes superiores (propanol, 2-metil propanol, 3-metil butanol, 2-metilbutanol) como de ésteres (acetato de etilo, 3-metil-butylacetato, caproato de etilo, caprilato de etilo, decanoato de etilo), las chichas fermentadas con las cepas EYS4 y D291 presentaron los promedios más altos de alcoholes superiores mientras que en relación a la concentración total de ésteres el valor más alto corresponde a la cepa ERS1 seguida por las cepas EYS5 y EYS4 (Figura R2.8). Todas las chichas

mostraron concentraciones de alcoholes superiores mayores a 135 g/L. En cerveza, las concentraciones altas de alcoholes superiores (>300 mg/l), en especial de alcohol isoamílico (3-metil butanol), generan un “*flavor*” (características organolépticas) fuerte a solvente y pungente, lo que crea una sensación de calentamiento en la boca (Loviso y Libkind, 2019). En el caso de las chichas pese a que la sumatoria de las concentraciones de alcoholes superiores no sobrepasaba los 300 g/L, en todas las bebidas se encontraron concentraciones de 3-metil butanol que si excedían los límites establecidos para cerveza.

La relación entre el sumatorio de alcoholes superiores y el sumatorio de ésteres (HA:ésteres) es utilizado en cerveza como un indicador del balance adecuado de aromas, en el caso de las chichas elaboradas en este trabajo se observa que un valor cercano al óptimo (4:1 - 4.7:1) se encontró para la cepa vínica *T. delbrueckii* D291 (4.96: 1) (Tabla R2.8). El resto mostró una tendencia a una elevada cantidad de HA.

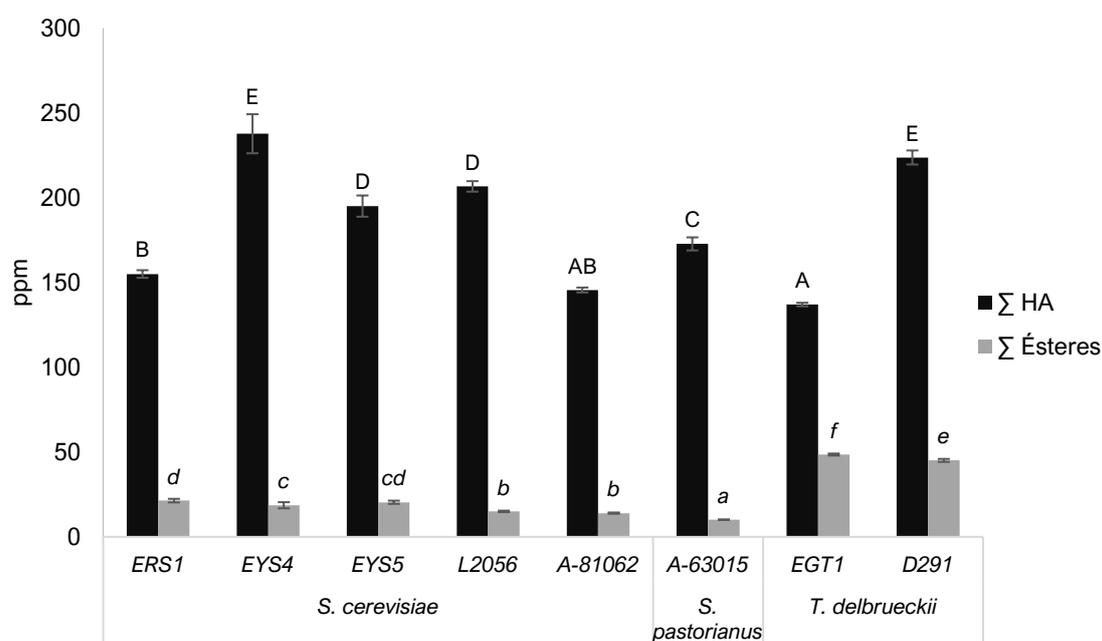


Figura R2.8 Concentraciones totales de alcoholes superiores y ésteres presentes en las chichas fermentadas con las cepas seleccionadas y sus respectivos controles. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

El perfil aromático de los alimentos y bebidas fermentadas involucra cientos de compuestos, muchos de los cuales tienen límites sensoriales que corresponden a concentraciones muy bajas (mg/L) (Carrau et al., 2015), en el caso de las chichas estos umbrales no están determinados por lo que se compararon los valores obtenidos en MCS con aquellos establecidos para cerveza. En muestras

de chichas de maíz producidas de forma artesanal por una comunidad indígena brasileña se encontraron al final de la fermentación once compuestos volátiles siendo los más abundantes (60 %) el ácido butanoico y el 3-heptanol mientras que las concentraciones de 2-propanol y etanol encontradas en esas chichas (Resende et al., 2018), son inferiores a las descritas en esta investigación.

De forma general podemos observar que la cepa ERS1 es la que produce una chicha con un mejor balance aromático y de sabor (en base a los resultados químicos) pese a que en los anteriores análisis era la que presentaba una peor capacidad fermentativa y tolerancia al estrés de las cepas seleccionadas. Esta cepa es la única de todas las cepas seleccionadas que tiene como origen la chicha de arroz, y esta podría ser la razón de su diferente perfil aromático. De igual forma todas las cepas ecuatorianas seleccionadas (EGT1, ERS1, EYS4 y EYS5) muestran una mayor producción de ésteres comparadas a sus controles, lo que confirma la importancia de que cepas nativas de las bebidas tradicionales deban ser utilizadas para mantener el perfil sensorial de estos productos. Si bien es cierto que las cepas comerciales fermentan bien el MCS y los rendimientos de etanol incluso llegan a ser mejores que las cepas nativas, al revisar el perfil de aromas se observan importantes diferencias.

La fermentación del MCS mediante todas las cepas estudiadas refleja un buen desempeño fermentativo de la cepa *S. cerevisiae* A-81062, incluso mayor en rendimiento de etanol que las cepas nativas. Esto abre la posibilidad de que algunas cepas comerciales puedan ser aplicadas en la producción de chicha. La introducción de cultivos iniciadores en fermentaciones tradicionales de pequeña escala podría ser una herramienta importante para mejorar las condiciones de procesamiento y la calidad de los productos (Holzapfel, 2002), aunque la mejor opción sería el uso de cepas nativas, la posibilidad de usar también cepas comerciales en pequeñas proporciones o de manera secuencial podría ser práctico e interesante para garantizar que se complete la fermentación.

En relación al perfil aromático de las chichas obtenidas en este trabajo, se encontraron diferencias significativas entre cepas en el contenido de alcoholes superiores y ésteres. Comparando estos resultados con los de un estudio similar realizado en la bebida tradicional colombiana Champús, incluso con las cepas categorizadas como maltosa-negativas, se obtuvieron mayores concentraciones de ésteres y alcoholes superiores que las reportadas en ese trabajo (Osorio-Cadavid et al., 2008). La composición del sustrato así como los parámetros del proceso ejercen una influencia directa sobre la producción de metabolitos en las levaduras, ya que pueden influir en la expresión de ciertos genes involucrados en el metabolismo de aromas, dando como resultado concentraciones diferentes de ésteres y alcoholes superiores (Procopio et al., 2011). Las diferencias encontradas en la producción de estos compuestos entre las cepas

seleccionadas, podría reflejar la influencia distinta que ejercen tanto del sustrato como las condiciones de fermentación sobre la capacidad fermentativa de cada cepa.

Al contrario de las cervezas europeas, donde el sabor y aroma deseados están críticamente afectados por la presencia de levaduras silvestres y otros microorganismos, en el caso de las cervezas africanas estas presentan una amplia variación de aromas y sabores que son aceptados por los consumidores (Lyumugabe et al., 2012). Como parte complementaria de este trabajo se podría realizar un análisis sensorial de las chichas obtenidas con las cepas seleccionadas con cultivos puros y mixtos para conocer la aceptabilidad de las mismas tanto en España como en Ecuador.

2.1.1.3. Fermentaciones con cultivos mixtos de las cepas EYS5 y EGT1

En los últimos años, el uso de cultivos mixtos ha sido de mucho interés en fermentaciones alcohólicas, especialmente para la producción de vino y cerveza. En relación al vino, varios estudios han demostrado que cultivos mixtos de cepas nativas son capaces de exaltar las peculiaridades (aroma, estructura y color) y preservar la autenticidad y unicidad de las bebidas finales (Navarrete-Bolaños, 2012). En las bebidas tradicionales, especialmente en aquellas preparadas en Sudamérica, es muy común la presencia de bacterias ácido lácticas y levaduras por lo que varias investigaciones se han realizado con cultivos mixtos de estos dos grupos microbianos (Faria-Oliveira et al., 2015). Un sustrato basado en maíz fue fermentado exitosamente con un cultivo mixto de una cepa de levadura de la especie *S. cerevisiae* y otra cepa bacteriana de la especie *Lactobacillus paracasei* dando lugar a una bebida probiótica con una concentración de etanol inferior al 5 % (Menezes et al., 2018).

Se decidió estudiar las fermentaciones mixtas en el sustrato tipo chicha propuesto MCS, a escala de laboratorio, con las cepas ecuatorianas *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1, ya que en el caso de la cepa EYS5 esta había demostrado en análisis anteriores un mejor desempeño fermentativo, una mayor tolerancia a la deshidratación y ciertos rasgos de domesticación, mientras que la cepa EGT1 producía una concentración alta de ésteres en las bebidas finales. Las fermentaciones mixtas se diseñaron con dos estrategias de inoculación, coinoculación e inoculación secuencial en 100 mL a 20 °C, como se detalla en el apartado de Materiales y Métodos 7.1.2.4, obteniéndose los resultados mostrados en la Figura R2.9. La cinética de fermentación en MCS mediante coinoculación fue más rápida que mediante inoculación secuencial, aunque sin llegar a ser equivalente la del cultivo puro de la cepa *S. cerevisiae* EYS5. Esto podría estar relacionado con la competencia de *Torulaspota* por los recursos

presentes en MCS. Se decidió finalizar las fermentaciones a los 13 días, momento en el cual las dos fermentaciones mixtas alcanzan una pérdida de masa similar.

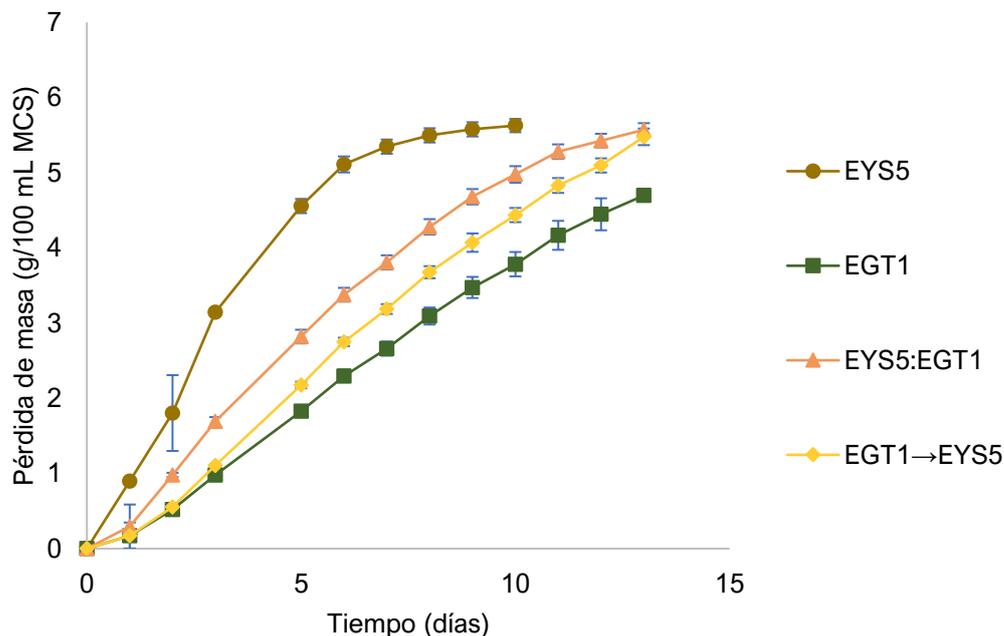


Figura R2.9 Pérdida de masa durante la fermentación en MCS (13 – 14 °P) con las cepas EYS5, EGT1 y cultivos mixtos por inoculación secuencial (EGT1 → EYS5) y coinoculación (EYS5:EGT1).

En relación a los parámetros finales de fermentación se encontró que la concentración de etanol de las chichas fermentadas con los cultivos mixtos era similar a las de las chichas fermentadas con el cultivo puro de la cepa *S. cerevisiae* EYS5. Para las chichas fermentadas con el cultivo puro de la cepa *T. delbrueckii* EGT1 se encontraron concentraciones residuales de glucosa en el sustrato final. En las fermentaciones mixtas se determinó el consumo total de la maltosa a diferencia del cultivo de EYS5 puro, y la coinoculación fue la única en la que se consumió totalmente la maltotriosa, de manera que la cooperación de las cepas puede resultar útil para consumir este tipo de hidratos de carbono. La inoculación secuencial mejora el glicerol frente a *S. cerevisiae* sola, sin llegar a los niveles de *T. delbrueckii*. La presencia de *T. delbrueckii* disminuye la cantidad de biomasa final en cualquier caso. No se encontraron diferencias significativas en relación a la viabilidad final (Tabla R2.9).

Tabla R2.9 Parámetros de fermentación de las chichas preparadas con cultivos puros y mixtos de las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1.

Análisis	Cultivos puros		Co-inoculación EYS5:EGT1	Inoculación secuencial EGT1→EYS5
	<i>S. cerevisiae</i> EYS5	<i>T. delbrueckii</i> EGT1		
Alcohol (%v/v)	7.58 ± 0.05 ^b	6.97 ± 0.31 ^a	7.71 ± 0.05 ^b	7.66 ± 0.06 ^b
[] azúcares (°P)	-	0.68 ± 0.05	-	-
pH	3.78 ± 0.09	3.81 ± 0.02	3.8 ± 0.01	3.84 ± 0.01 ^d
Maltotriosa (g/L)	0.48 ± 0.0 ^a	0.52 ± 0.01 ^b	-	0.50 ± 0.0 ^{ab}
Maltosa (g/L)	0.93 ± 0.04	-	-	-
Glucosa (g/L)	-	3.00 ± 0.34 ^b	-	0.93 ± 0.19 ^a
Fructosa (g/L)	-	13.10 ± 0.75 ^c	1.88 ± 0.01 ^a	5.69 ± 0.67 ^b
Glicerol (g/L)	3.96 ± 0.04 ^a	4.70 ± 0.03 ^c	3.97 ± 0.03 ^a	4.22 ± 0.05 ^b
Etanol (g/L)	59.36 ± 0.97 ^b	52.32 ± 0.88 ^a	59.17 ± 0.36 ^b	57.22 ± 0.23 ^b
Masa seca (g /L)	28.3 ± 0.98 ^b	22.3 ± 0.64 ^a	19.9 ± 0.79 ^a	20.3 ± 0.69 ^a
Viabilidad (%)	98.94 ± 0.10	96.27 ± 0.95	98.61 ± 0.33	97.33 ± 1.45

Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas

En producción de vinos dulces se encontró que un cultivo mixto de *T. delbrueckii* y *S. cerevisiae* (ratio 20:1), mejoraba el perfil analítico particularmente en la acidez volátil (53 % menos) y en la producción de acetaldehído (60 % menos) que lo que se obtenía con un cultivo puro de *S. cerevisiae* (Bely et al., 2008). El análisis del perfil aromático de estas bebidas inoculadas con cultivos mixtos podría ser útil para determinar si existe una influencia del inóculo en la bebida final.

2.1.2. Análisis de fermentaciones en mosto de cerveza

Un mejor conocimiento y una mayor apreciación del rol de las levaduras en la producción de cerveza ha dado lugar a una búsqueda intensiva de nuevas cepas que puedan ser usadas en dicha industria. Se ha demostrado que las bebidas fermentadas tradicionales pueden ser una fuente muy importante de microorganismos que pueden ser exitosamente aplicados en la producción de esta bebida (Cubillos et al., 2019), por lo que se decidió evaluar el desempeño fermentativo de las cepas seleccionadas en mosto cervecero, tanto a escala de laboratorio como a escala piloto.

De forma general el mosto de cerveza es un sustrato rico en los azúcares maltosa, maltotriosa y glucosa, cuenta con fuentes adecuadas de nitrógeno y vitaminas para favorecer la fermentación y además tiene, como componente minoritario, las maltodextrinas (Walker y Stewart, 2016). La composición del mosto de cerveza usado en las fermentaciones tanto a escala de laboratorio como a escala

piloto se detalla en la Tabla R2.10. El contenido de maltosa y maltotriosa en este tipo de sustratos es mayoritario comparado con el contenido de glucosa y fructosa.

Tabla R2.10 Composición del mosto de cerveza utilizado en esta investigación (*all-malt wort VTT*).

Composición	Unidades	Mosto
Extracto	°P	15.01 ± 0.01
pH	-	5.19 ± 0.02
Maltosa	g/L	63.65 ± 0.01
Maltotriosa	g/L	24.04 ± 0.01
Glucosa	g/L	17.16 ± 0.01
Fructosa	g/L	4.52 ± 0.01

La concentración de azúcares de este mosto (15 °P) es superior a la determinada en el MCS.

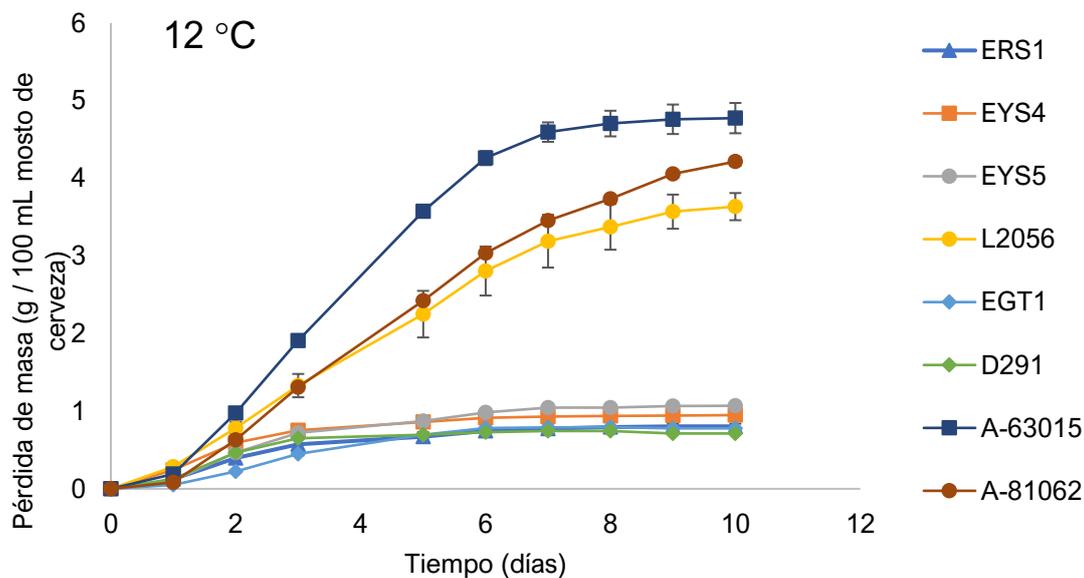
2.1.2.1. Fermentaciones con cultivos puros

Fermentaciones a escala de laboratorio (100 mL)

El desempeño fermentativo de las cepas seleccionadas se estudió inicialmente a escala de laboratorio (100 mL) a dos temperaturas 12 °C y 20 °C, como se hizo para el MCS, con el objeto de determinar posibles diferencias entre cepas en estas condiciones, en un tiempo de fermentación de 8 días. Como ya se determinó en el apartado 1.9.3, de las cepas ecuatorianas seleccionadas solo una de ellas es capaz de fermentar la maltosa (EYS5), sin embargo, se quiso evaluar el comportamiento en este mosto y la producción de compuestos aromáticos con todas las cepas ya que podrían tener alguna aplicación en producción de cerveza de bajo contenido alcohólico.

Se encontraron algunas diferencias en las cinéticas de fermentación, expresada como pérdida de masa, a las dos temperaturas específicamente con las cepas capaces de metabolizar la maltosa (Figura R2.10).

A



B

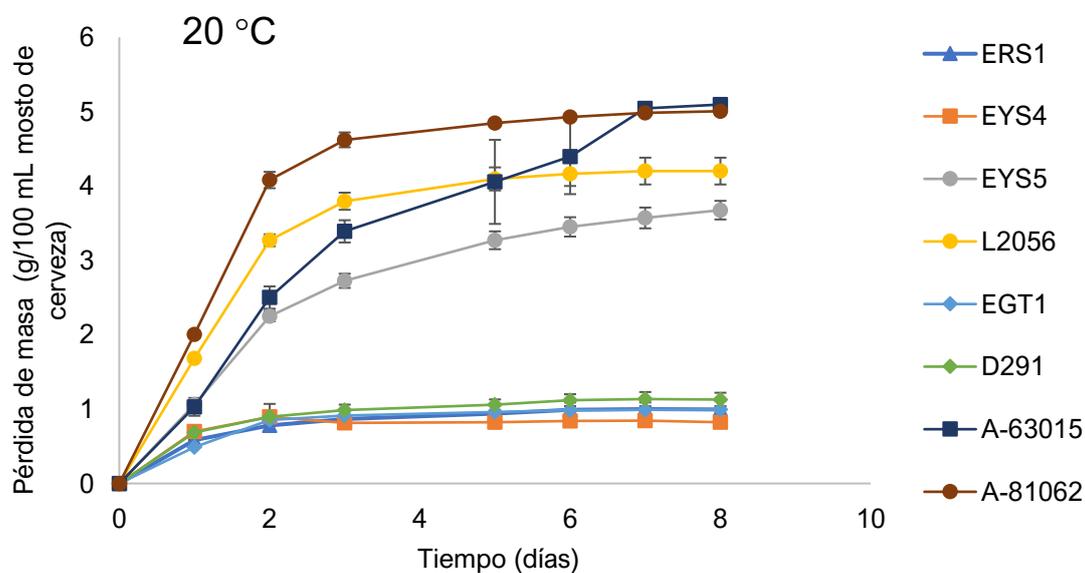


Figura R2.10 Pérdida de masa durante la fermentación en mosto de cerveza (15 °P) a dos temperaturas 12 °C y 20 °C.

A 12 °C todas las cepas ecuatorianas mostraron una baja eficiencia fermentativa (Figura R2.10A), los valores de pérdida de peso (g/100 mL mosto de cerveza) fueron menores a 1 con una cinética muy similar a la de las cepas maltosa negativas. Esto indica que las levaduras aisladas de chichas son incapaces de fermentar mosto de cerveza a bajas temperaturas. La cinética de fermentación más rápida a 12 °C se observó para la cepa cervecera *S. pastorianus* A-63015 seguida por las cepas industriales de la especie *S. cerevisiae* tanto cervecera como vínica (A-81062 y L2056, respectivamente).

Sin embargo, a 20 °C la cepa EYS5 sí fue capaz de fermentar el mosto, mientras que el resto de las cepas ecuatorianas no, y después de 24 h de fermentación ya superó el valor de pérdida de masa alcanzado a 12 °C. Aún así, la cepa ecuatoriana EYS5 presentó una cinética de fermentación mucho más lenta que la de las cepas industriales (Figura R2.10B), siendo la cepa cervecera de *S. cerevisiae* A-81062 la que mostró la cinética más rápida a estas condiciones. Las cepas de *Torulaspora* no se encuentran adaptadas a este ambiente, independientemente de su origen.

En relación a los parámetros de fermentación de las cervezas finales, en todos los casos los valores de concentración de etanol fueron consistentes con los reportados para concentración final de azúcares (Figura R2.11).

Tabla R2.11 Parámetros finales de las cervezas fermentadas con las cepas seleccionadas en fermentaciones a escala de laboratorio (100 mL) a 12 °C y 20 °C. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	<i>S. cerevisiae</i>					
	ERS1		EYS4		EYS5	
	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C
Alcohol (%v/v)	1.27 ± 0.02 ^a	1.34 ± 0.03 ^a	1.40 ± 0.02 ^a	1.36 ± 0.01 ^a	1.93 ± 0.02 ^b	4.96 ± 0.09 ^b
[] azúcares (°P)	12.26 ± 0.02 ^d	12.25 ± 0.02 ^e	12.08 ± 0.01 ^{cd}	12.19 ± 0.05 ^e	11.27 ± 0.02 ^c	5.8 ± 0.18 ^d
pH	4.66 ± 0.01 ^e	4.70 ± 0.02 ^d	4.74 ± 0.01 ^f	4.68 ± 0.01 ^{cd}	4.62 ± 0.01 ^{de}	4.38 ± 0.04 ^b
Masa seca (g / L)	5.75 ± 0.12 ^{abc}	4.94 ± 0.01 ^c	6.47 ± 0.06 ^{bc}	5.19 ± 0.04 ^c	5.33 ± 0.17 ^{ab}	6.11 ± 0.09 ^d
Viabilidad (%)	95.82 ± 0.14 ^c	99.07 ± 0.04 ^b	97.79 ± 0.16 ^c	98.74 ± 0.56 ^b	95.09 ± 0.38 ^c	97.46 ± 1.22 ^b

Análisis	<i>S. cerevisiae</i>				<i>S. pastorianus</i>	
	L2056		A- 81062		A- 63015	
	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C
Alcohol (%v/v)	5.59 ± 0.15 ^c	5.88 ± 0.03 ^c	6.54 ± 0.07 ^d	7.29 ± 0.01 ^e	6.90 ± 0.01 ^e	7.06 ± 0.01 ^d
[] azúcares (°P)	4.56 ± 0.38 ^b	3.85 ± 0.02 ^c	2.78 ± 0.12 ^a	1.25 ± 0.01 ^a	2.05 ± 0.04 ^a	1.8 ± 0.01 ^b
pH	4.37 ± 0.01 ^b	4.34 ± 0.02 ^b	4.32 ± 0.01 ^a	4.21 ± 0.02 ^a	4.55 ± 0.02 ^c	4.60 ± 0.02 ^c
Masa seca (g / L)	6.59 ± 0.49 ^c	6.99 ± 0.02 ^f	6.66 ± 0.02 ^c	8.13 ± 0.12 ^g	6.42 ± 0.015 ^{bc}	6.62 ± 0.04 ^e
Viabilidad (%)	86.42 ± 0.51 ^a	97.33 ± 1.97 ^b	92.81 ± 0.84 ^{bc}	98.23 ± 0.32 ^b	88.81 ± 2.77 ^{ab}	92.30 ± 0.34 ^a

Análisis	<i>T. delbrueckii</i>			
	EGT1		D291	
	12 °C	20 °C	12 °C	20 °C
Alcohol (%v/v)	1.38 ± 0.02 ^a	1.39 ± 0.04 ^a	1.41 ± 0.02 ^a	1.40 ± 0.01 ^a
[] azúcares (°P)	12.30 ± 0.01 ^d	12.30 ± 0.02 ^e	12.04 ± 0.07 ^{cd}	12.10 ± 0.01 ^e
pH	4.63 ± 0.01 ^{de}	4.63 ± 0.01 ^{cd}	4.61 ± 0.01 ^d	4.61 ± 0.01 ^{cd}
Masa seca (g / L)	4.77 ± 0.25 ^a	3.78 ± 0.03 ^a	4.79 ± 0.16 ^a	4.47 ± 0.08 ^b
Viabilidad (%)	97.37 ± 0.51 ^c	99.87 ± 0.02 ^b	95.72 ± 0.15 ^c	99.12 ± 0.35 ^b

En las cervezas fermentadas a 12 °C, las concentraciones de alcohol más altas las presentaron aquellas inoculadas con las cepas cerveceras (A-6315 y A-81062), seguidas por la cepa vínica L2056. Las cervezas fermentadas con las cepas maltosa negativas (ERS1, EYS4, EGT1, y D291) presentaron concentraciones de etanol inferiores al 1.41 % v/v, incluso la cerveza fermentada con la cepa EYS5, presentó una concentración de alcohol de tan solo 1.93 %, ligeramente superior a las otras cepas ecuatorianas. Todas las cervezas inoculadas con cepas incapaces de fermentar el mosto a esta temperatura, mostraron valores de pH mayores a 4.61, mientras que todas aquellas en las que se observó fermentación del mosto presentaron valores de pH menores. Los valores más altos de viabilidad correspondieron a las cervezas inoculadas con las cepas maltosa negativas (en este caso, incluida la cepa EYS5), probablemente debido a la baja exposición a toxicidad del etanol, mientras que se encontró valores de viabilidad menores al 92 % para las cepas del género *Saccharomyces* en las que se observó fermentación. Los promedios de masa seca más altos los presentaron las cepas industriales tanto vínica como cervecera de la especie *S. cerevisiae* (L2056 y A-81062, respectivamente).

En cuanto a las fermentaciones llevadas a cabo a 20 °C en mosto de cerveza, los valores más altos de concentración de alcohol lo presentaron las cervezas inoculadas con las cepas cerveceras, seguidas por aquellas fermentadas con la cepa vínica *S. cerevisiae* L2056. Las cervezas obtenidas mediante fermentación con la cepa ecuatoriana *S. cerevisiae* EYS5 presentaron concentraciones medias de etanol (4.96 %), siendo el valor más bajo de todas las cepas maltosa positivas del género *Saccharomyces* que fueron evaluadas. En relación al pH, el valor más bajo se encontró en las cervezas fermentadas con la cepa *S. cerevisiae* A-81062, mientras que valores de pH altos se encontraron en las cervezas fermentadas con las cepas maltosa negativas. La viabilidad más baja a estas condiciones la presentó la cepa *S. pastorianus* A-63015 que es muy sensible a temperaturas altas. En relación al indicador masa seca el valor más alto fue para la cepa cervecera *S. cerevisiae* A-81062 seguida por la cepa vínica L2056.

Se realizó además un análisis de aromas de las cervezas obtenidas a escala de laboratorio a una temperatura de 20 °C, ya que a esta temperatura la cepa EYS5 fue capaz de fermentar este sustrato (Tabla R2.12). Las concentraciones más altas de acetaldehído (incluso superiores al límite), las presentaron las cervezas fermentadas con las cepas industriales tanto vínicas como cerveceras, no así EYS5. Las cepas ecuatorianas maltosa-negativas *S. cerevisiae* ERS1 y EYS4 presentaron promedios similares en varios de los parámetros analizados.

Tabla R2.12 Concentración de acetaldehído, alcoholes superiores y ésteres en mosto de cerveza fermentado con las cepas seleccionadas. Todos los valores se expresan en mg/L y fueron normalizados a 5 % ABV (alcohol por volumen - *alcohol by volume*). Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	ERS1	EYS4	EYS5	L2056	A81062
	<i>S. cerevisiae</i>				
Acetaldehído	21.94 ± 0.8b ^{cd}	6.49 ± 0.15 ^a	17.05 ± 2.31 ^{abc}	31.8 ± 1.15^{de}	42.23 ± 3.75^e
2-Feniletanol	7.41 ± 0.54 ^a	5.37 ± 0.65 ^a	13.21 ± 0.70 ^b	23.29 ± 1.60 ^c	22.32 ± 1.38 ^c
Propanol	7.23 ± 0.03 ^a	7.04 ± 0.10 ^a	17.09 ± 0.93 ^b	28.97 ± 0.78 ^d	29.76 ± 0.36 ^c
2-Metil Propanol	14.96 ± 0.17 ^b	16.98 ± 0.14 ^{bc}	20.36 ± 0.25 ^d	22.94 ± 0.57 ^e	20.77 ± 0.99 ^{de}
3-Metil-Butanol	35.00 ± 0.61 ^a	32.85 ± 0.30 ^a	52.67 ± 1.21 ^b	64.78 ± 1.46 ^c	61.15 ± 2.18 ^c
2-Metil Butanol	10.78 ± 0.15 ^b	10.80 ± 0.09 ^b	17.23 ± 0.31 ^c	20.46 ± 0.48 ^d	17.12 ± 0.54 ^c
Acetato de etilo	3.36 ± 0.16 ^a	2.63 ± 0.04 ^a	19.69 ± 0.87 ^b	26.63 ± 0.97 ^c	32.16 ± 0.36 ^d
3-Metil-Butilacetato	0.12 ± 0.03 ^a	0.07 ± 0.01 ^a	0.57 ± 0.03 ^b	0.74 ± 0.09 ^b	0.51 ± 0.03 ^b
Caproato de etilo	0.01 ± 0.0 ^a	-	0.08 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0.01 ^b	0.26 ± 0.01 ^c
Caprilato de etilo	0.04 ± 0.0 ^a	0.02 ± 0.0 ^a	0.11 ± 0.03 ^a	0.19 ± 0.05 ^b	0.16 ± 0.03 ^a
2-Feniletilacetato	-	0.21 ± 0.08	0.13 ± 0.01	0.28 ± 0.03	0.21 ± 0.02
Decanoato de etilo	0.02 ± 0.0 ^a	0.01 ± 0.0 ^a	0.02 ± 0.0 ^a	0.15 ± 0.03 ^b	0.06 ± 0.01 ^a
HA: ESTERES	19.19 ± 1.03^d	23.08 ± 1.15^e	5.22 ± 0.16 ^a	4.89 ± 0.12 ^a	3.59 ± 0.10 ^a

Análisis	A63015	EGT1	D291
	<i>S. pastorianus</i>	<i>T. delbrueckii</i>	
Acetaldehído	35.88 ± 4.26^e	8.54 ± 2.59 ^{ab}	30.34 ± 1.71^{cde}
2-Feniletanol	30.74 ± 1.27 ^d	6.93 ± 0.32 ^a	6.12 ± 0.47 ^a
Propanol	17.33 ± 0.67 ^b	4.78 ± 0.06 ^a	4.66 ± 0.25 ^a
2-Metil Propanol	18.77 ± 0.40 ^{cd}	3.42 ± 0.05 ^a	5.84 ± 0.27 ^a
3-Metil-Butanol	73.69 ± 1.10^d	29.46 ± 0.40 ^a	28.99 ± 0.38 ^a
2-Metil Butanol	21.36 ± 0.27 ^d	4.18 ± 0.06 ^a	5.55 ± 0.27 ^a
Acetato de etilo	28.57 ± 1.40 ^{cd}	4.81 ± 0.22 ^a	3.42 ± 0.07 ^a
3-Metil-Butilacetato	0.66 ± 0.06 ^b	-	0.01 ± 0.0 ^a
Etilcaprotato	0.10 ± 0.02 ^b	-	-
Etilcaprilato	0.44 ± 0.11 ^c	-	-
2-Feniletilacetato	0.28 ± 0.02	-	-
Etildecanoato	0.27 ± 0.01 ^c	0.01 ± 0.0 ^a	-
HA: ESTERES	4.33 ± 0.21 ^a	8.65 ± 0.39^b	13.09 ± 0.10^c

Los valores en cursiva son mayores a los límites establecidos para cerveza (Tabla R2.7)

En relación a las concentraciones totales de alcoholes superiores y de ésteres de las bebidas finales, las concentraciones más bajas las presentaron las cepas de la especie *T. delbrueckii* (Figura R2.11). La concentración más alta de alcoholes superiores la presentaron las cervezas fermentadas con la cepa vínica *S. cerevisiae* L2056 seguidas por las dos cepas cerveceras mientras que la concentración de ésteres más alta la presentaron las cervezas fermentadas con la cepa *S. cerevisiae* A-81062. Del grupo de cepas ecuatorianas la que presentó las concentraciones más altas de los dos compuestos fue la única maltosa-positiva, la cepa *S. cerevisiae* EYS5. En relación a las cepas maltosa-negativas, aquellas de la especie *S. cerevisiae* presentaron concentraciones más altas de alcoholes superiores que las de la especie *T. delbrueckii*. En cuanto a la relación de la concentración total de alcoholes superiores y ésteres totales, se encontraron valores cercanos al recomendado en las cervezas fermentadas con las cepas A-81062, A-63015, L2056 y EYS5.

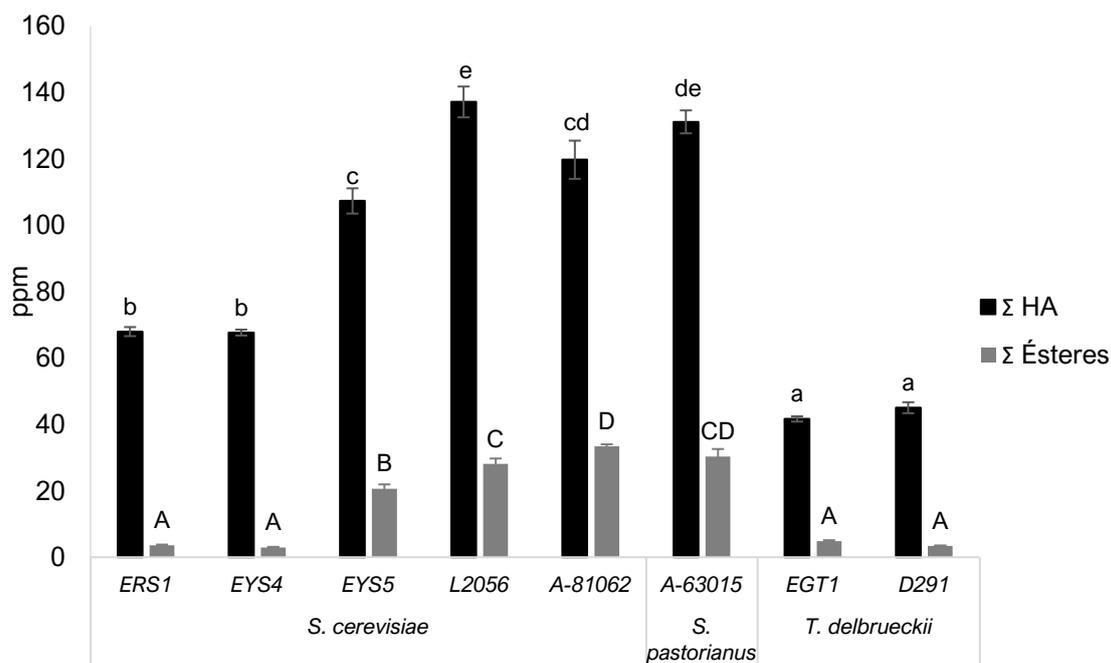


Figura R2.11 Concentraciones totales de alcoholes superiores (HA) y ésteres presentes en las cervezas fermentadas con las cepas seleccionadas y sus respectivos controles. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

El uso de levaduras débilmente fermentadoras (maltosa-negativas) es parte de la estrategia biológica para producir cervezas con bajo contenido de alcohol que todavía mantengan algo de la complejidad aromática de la cerveza estándar. La mayoría de las cepas maltosa negativas descritas en patentes y artículos científicos son principalmente levaduras no convencionales de los géneros *Candida* o *Kluyveromyces* en panadería (Struyf et al., 2017) y *Zigosaccharomyces*, *Brettanomyces*, *Saccharomycode* y *Candida* en cervecería (Michel et al., 2016b), por lo que el descubrimiento de cepas *S. cerevisiae* maltosa negativas, como las estudiadas en este trabajo, podría ser una alternativa interesante para la producción de cervezas con bajo contenido de alcohol.

Se ha demostrado que algunas cepas vínicas *S. cerevisiae* no están adaptadas al consumo de maltosa ya que el mosto del vino contiene altas cantidades de fructosa y glucosa (Struyf et al., 2017), probablemente la mayoría de las cepas ecuatorianas no están adaptadas tampoco a usar este azúcar debido a las altas concentraciones de sacarosa, fructosa y glucosa presente en el sustrato de chicha. La cepa ecuatoriana *T. delbrueckii* EGT1 es incapaz de fermentar la maltosa, sin embargo en previos trabajos se ha demostrado que la habilidad para consumir este azúcar y la maltotriosa en esta especie depende principalmente de la cepa empleada (Basso et al., 2016).

Fermentaciones a escala piloto (1.5 L)

En fermentaciones de mosto de cerveza se usan comúnmente dos indicadores indispensables del desempeño fermentativo de las levaduras, el extracto real que es la fracción de sustancias disueltas en el sustrato sin tomar en cuenta el etanol y el porcentaje de atenuación real que se refiere al consumo de azúcares por parte de los microorganismos y que está basado en los valores de extracto real. Para el cálculo matemático de estos dos indicadores se elimina la influencia del etanol, en este trabajo se utilizaron las fórmulas descritas por Hackbarth (2011).

En cuanto a las fermentaciones a escala piloto en mosto de cerveza a 20 °C, al igual que lo que sucedió a escala de laboratorio, las fermentaciones se pararon a los tres días para todas las cepas maltosa negativas ERS1, EYS4, EGT1 y D291. La cepa cervecera *S. pastorianus* A-63015 seguida por la cepa vínica *S. cerevisiae* L2056 mostraron la disminución más pronunciada en extracto en las primeras 48 h (Figura R2.12).

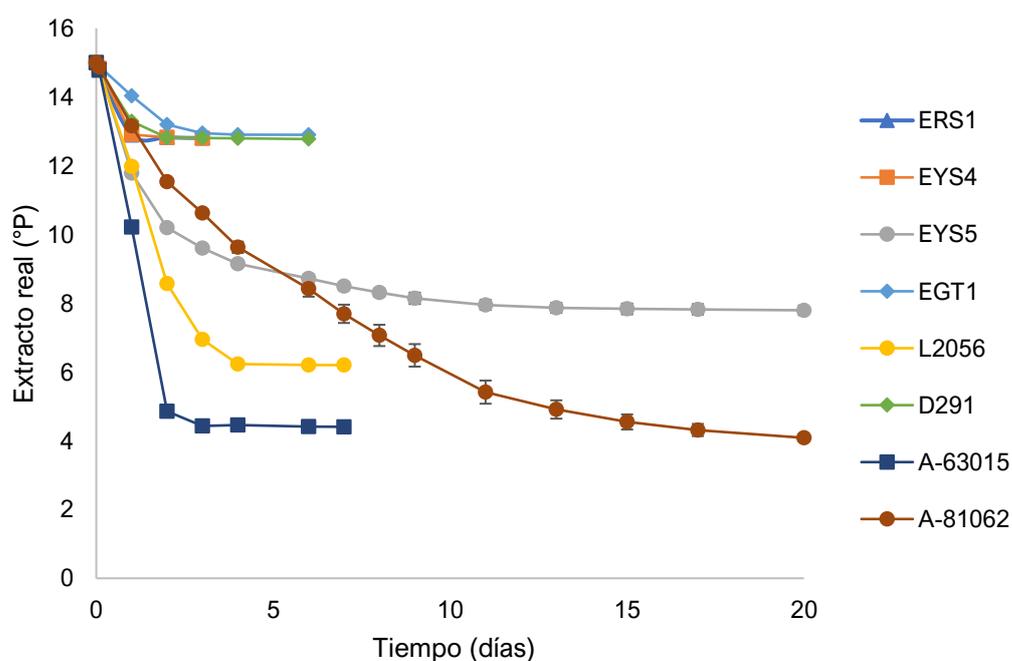


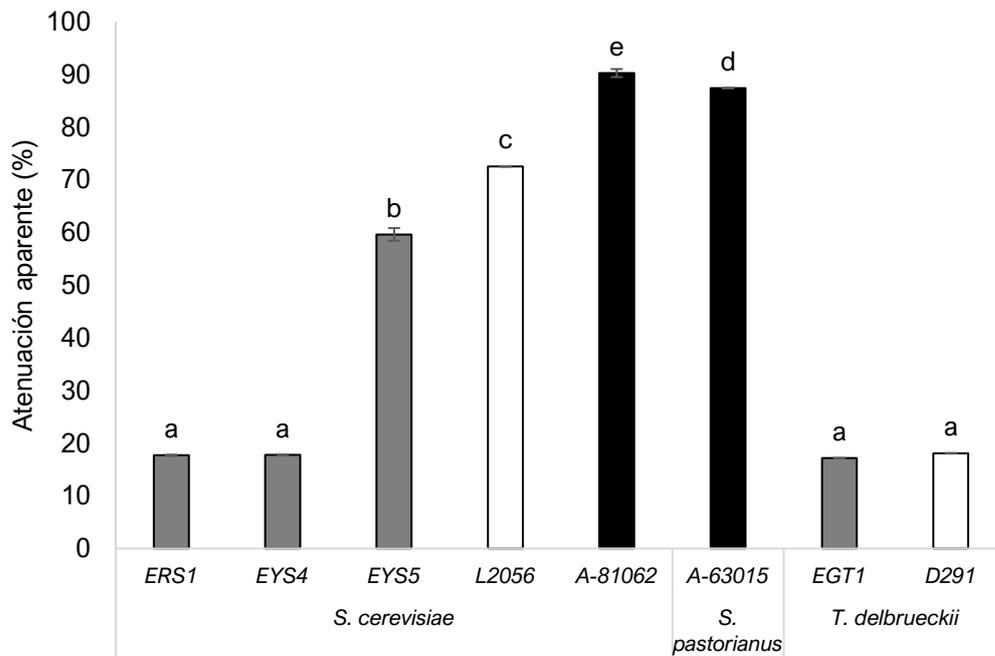
Figura R2.12 Disminución del extracto real para todas las cepas investigadas durante las fermentaciones a escala 1.5 L en mosto de cerveza (15 °P, 20 °C).

Las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y A-81062 alcanzaron el extracto final luego de 20 días (a partir del día 15 los cambios eran mínimos) demostrando el metabolismo más lento. Estas dos cepas fermentaron el mosto hasta un extracto final (real) de 7.8 °P para EYS5 y 4.09 °P para A-81062. El valor más alto de la cepa EYS5 comparado con las dos cepas cerveceras podría reflejar una fermentación

incompleta del mosto que también fue observada a escala de laboratorio y que refleja que la cepa EYS5 no es capaz de fermentar de forma similar a las cepas cerveceras de referencia, es decir que su desempeño fermentativo en este sustrato es menor.

Los valores finales de atenuación aparente y real difieren de forma importante, pero ambos reflejan que las cepas industriales del género *Saccharomyces* (A-81062, A-63015 y L2056) fermentan de una forma más eficiente el mosto de cerveza (Figura R2.13). Con el uso de inóculos industriales se suelen obtener porcentajes finales de atenuación real del mosto cercanos al 70 %, con la ecuatoriana *S. cerevisiae* EYS5 se obtuvo una atenuación real inferior, de aproximadamente 47 %.

A



B

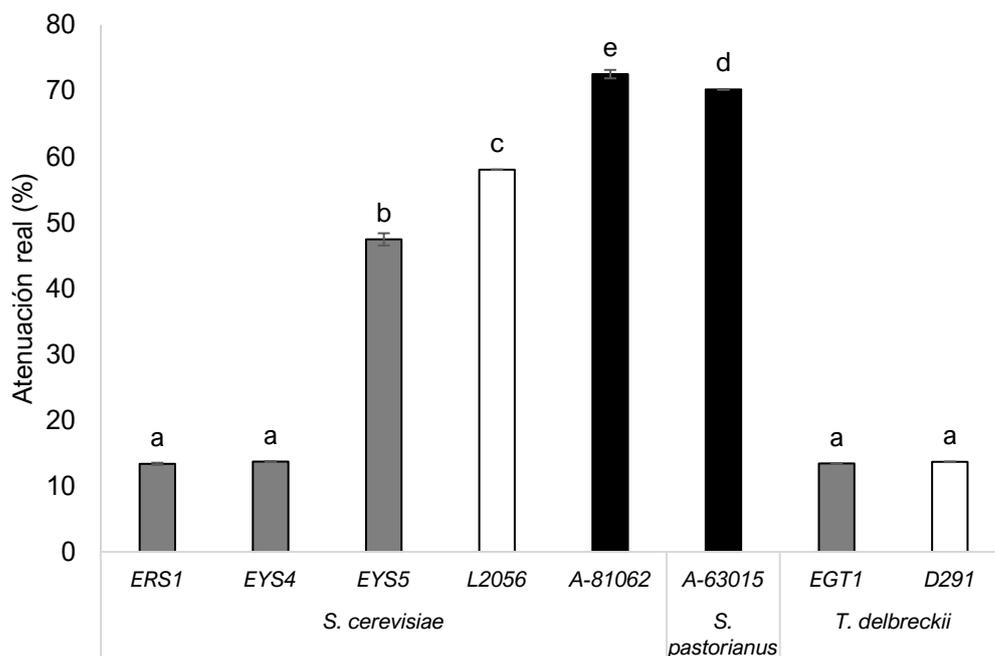


Figura R2.13 Atenuación aparente y real de los mostos de cerveza fermentados con las cepas seleccionadas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

En relación a los parámetros finales de fermentación, las cervezas fermentadas con las cepas maltosa negativas (*S. cerevisiae* ERS1, EYS4 y *T. delbrueckii* EGT12, D291) mostraron resultados similares en casi todos los parámetros analizados (Tabla R2.13). Estas alcanzaron concentraciones de etanol menores o iguales a 1.35 % (v/v) después de 3 días de fermentación. El análisis de concentración final de azúcares reveló el consumo completo de glucosa y fructosa mientras que la maltosa y maltotriosa casi no fueron utilizadas, el pH final de estas cervezas fue cercano a 4.6.

Tabla R2.13 Análisis de las cervezas después de ser fermentadas con las levaduras investigadas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	ERS1	EYS4	EYS5	A81062	L2056
	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>				
Alcohol (%v/v)	1.28 ± 0.01 ^a	1.29 ± 0.01 ^a	4.85 ± 0.11 ^b	7.38 ± 0.06 ^e	5.81 ± 0.01 ^c
[] azúcares (°P)	12.35 ± 0.02 ^e	12.34 ± 0.01 ^e	6.06 ± 0.18 ^c	1.46 ± 0.01 ^a	4.13 ± 0.01 ^c
Maltotriosa (g/L)	20.20 ± 1.48 ^b	15.98 ± 1.43 ^b	1.72 ± 0.06 ^a	3.29 ± 0.06 ^a	21.30 ± 0.54 ^b
Maltosa (g/L)	62.64 ± 3.6 ^c	51.88 ± 3.45 ^c	25.75 ± 0.45 ^b	3.17 ± 0.48 ^a	2.30 ± 0.02 ^a
Glucosa (g/L)	0.21 ± 0.01	-	-	0.11 ± 0.05	0.23 ± 0.01
Glicerol (g/L)	0.93 ± 0.02 ^{ab}	0.92 ± 0.01 ^a	1.72 ± 0.04 ^c	2.88 ± 0.20 ^e	2.53 ± 0.02 ^{de}
Etanol (g/L)	10.23 ± 0.22 ^{ab}	9.78 ± 0.01 ^a	35.96 ± 1.06 ^b	56.69 ± 0.09 ^d	45.18 ± 0.19 ^c
pH	4.60 ± 0.01 ^{ef}	4.58 ± 0.01 ^e	4.49 ± 0.02 ^d	4.25 ± 0.01 ^b	4.2 ± 0.01 ^a
Masa seca (g /L)	4.94 ± 0.27 ^d	4.48 ± 0.34 ^{cd}	4.58 ± 0.11 ^{cd}	1.89 ± 0.07 ^a	6.30 ± 0.01 ^e
Viabilidad (%)	99.05 ± 0.11 ^d	99.62 ± 0.03 ^d	78.37 ± 0.73 ^a	89.72 ± 0.72 ^b	95.31 ± 0.46 ^{cd}

Análisis	A63015	D291	EGT1
	<i>S. pastorianus</i>	<i>T. delbrueckii</i>	
Alcohol (%v/v)	7.05 ± 0.01 ^d	1.35 ± 0.01 ^a	1.32 ± 0.01 ^a
[] de azúcares (°P)	1.89 ± 0.01 ^b	12.29 ± 0.01 ^e	12.43 ± 0.01 ^e
Maltotriosa (g/L)	2.59 ± 0.02 ^a	20.59 ± 1.77 ^b	17.72 ± 0.39 ^b
Maltosa (g/L)	1.94 ± 0.02 ^a	64.41 ± 4.50 ^c	56.96 ± 0.96 ^c
Glucosa (g/L)	-	0.20 ± 0.01	-
Glicerol (g/L)	2.22 ± 0.02 ^d	1.26 ± 0.02 ^{ab}	1.51 ± 0.01 ^{bc}
Etanol (g/L)	55.45 ± 0.56 ^d	10.92 ± 0.09 ^a	10.52 ± 0.02 ^a
pH	4.42 ± 0.01 ^c	4.62 ± 0.01 ^f	4.65 ± 0.01 ^{ef}
Masa seca (g /L)	6.73 ± 0.08 ^e	3.08 ± 0.40 ^{bc}	3.36 ± 0.07 ^{ab}
Viabilidad (%)	95.92 ± 0.08 ^{cd}	94.45 ± 1.87 ^d	99.49 ± 0.13 ^c

En relación a las cepas capaces de fermentar maltosa, la concentración de azúcares residuales más alta la presentó la cepa EYS5 seguida por la cepa vínica L2056, mientras que para las dos cepas cerveceras se encontraron concentraciones de azúcares residuales inferiores a 2 °P. En el análisis por HPLC de las cervezas finales se encontró que las fermentadas con la cepa ecuatoriana EYS5 presentaban niveles altos de maltosa residual (25.75 g/L), hasta 10 veces más alta que las encontradas para las cepas industriales de referencia, tanto cerveceras como vínicas del género *Saccharomyces*. En relación a la concentración final de maltotriosa los resultados fueron muy distintos, la cepa EYS5 presentó la concentración más baja, similar a la obtenida para las cepas cerveceras A-81062 y A-63015 mientras que la cepa vínica de referencia S.

cerevisiae L2056 presentó la concentración más alta de este azúcar, muy similar a las de las cepas maltosa negativas. En las cervezas obtenidas mediante fermentación con las cepas industriales del género *Saccharomyces* se encontraron las concentraciones más altas de glicerol y de masa seca.

Los resultados obtenidos para la cepa ecuatoriana EYS5, igual que los obtenidos a escala de laboratorio, indican un consumo incompleto de los azúcares fermentables del mosto de cerveza, específicamente de la maltosa. Es posible que esta cepa pueda usar de forma eficiente la maltotriosa pero de forma muy pobre la maltosa, el porcentaje de atenuación real y los análisis de azúcares residuales por HPLC de las cervezas finales sugieren este resultado.

Las concentraciones de los compuestos aromáticos derivados del metabolismo de las levaduras en las cervezas obtenidas fueron distintas entre especies y cepas (Tabla R2.14).

Tabla R2.14 Concentraciones de acetaldehído, alcoholes superiores y ésteres en cervezas fermentadas con las cepas seleccionadas. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	ERS1	EYS4	EYS5	A81062	L2056
	<i>S. cerevisiae</i>				
Acetaldehído	16.04 ± 1.60 ^{bc}	23.59 ± 1.71 ^{cd}	41.13 ± 5.04^f	42.26 ± 6.64^f	29.93 ± 2.71^{de}
2-Feniletanol	5.78 ± 0.31 ^{ab}	3.69 ± 0.60 ^a	9.86 ± 0.24 ^c	8.93 ± 1.05 ^{bc}	9.88 ± 0.21 ^c
Propanol	6.68 ± 0.16 ^b	6.50 ± 0.15 ^b	14.84 ± 0.35 ^c	22.35 ± 0.84 ^e	27.99 ± 0.99 ^f
2-Metil Propanol	15.28 ± 0.30 ^d	13.86 ± 0.09 ^c	22.99 ± 0.37 ^f	18.45 ± 0.42 ^e	22.99 ± 0.22 ^f
3-Metil-Butanol	33.63 ± 1.11 ^c	24.79 ± 0.25 ^b	47.33 ± 1.41 ^d	45.22 ± 1.14 ^d	55.13 ± 1.20 ^e
2-Metil Butanol	11.01 ± 0.36 ^b	10.41 ± 0.09 ^b	18.19 ± 0.45 ^d	14.79 ± 0.20 ^c	21.27 ± 0.39 ^f
Acetato de etilo	4.76 ± 0.26 ^a	3.27 ± 0.14 ^a	31.11 ± 1.02 ^c	49.34 ± 1.63^e	40.36 ± 2.13^d
3-Metil-Butilacetato	0.67 ± 0.06 ^b	0.30 ± 0.02 ^a	1.54 ± 0.08 ^d	0.95 ± 0.03 ^c	2.51 ± 0.21 ^e
Caproato de etilo	0.18 ± 0.03 ^c	0.14 ± 0.02 ^{bc}	0.34 ± 0.03^d	0.65 ± 0.03^f	0.44 ± 0.05^e
Caprilato de etilo	0.27 ± 0.09 ^a	0.31 ± 0.08 ^a	0.67 ± 0.12 ^b	0.61 ± 0.04 ^b	0.81 ± 0.16 ^b
2-Feniletilacetato	0.20 ± 0.01 ^b	0.10 ± 0.01 ^a	0.21 ± 0.02 ^b	0.19 ± 0.02 ^b	0.42 ± 0.02 ^c
Decanoato de etilo	0.06 ± 0.01 ^a	0.09 ± 0.02 ^a	0.17 ± 0.03 ^{ab}	0.13 ± 0.01 ^{ab}	0.52 ± 0.02 ^{bc}
HA: ESTERES	10.90 ± 0.99 ^d	13.23 ± 0.90 ^e	3.04 ± 0.16 ^{ab}	1.94 ± 0.05 ^a	2.85 ± 0.17 ^{ab}

Análisis	A63015	EGT1	D291
	<i>S. pastorianus</i>	<i>T. delbrueckii</i>	
Acetaldehído	36.14 ± 3.96^{ef}	13.05 ± 3.90 ^{ab}	4,24 ± 0.73 ^a
2-Feniletanol	30.59 ± 2.95 ^d	2.66 ± 0.42 ^a	3.61 ± 0.60 ^a
Propanol	17.58 ± 0.38 ^d	4.47 ± 0.15 ^a	4.97 ± 0.10 ^a
2-Metil Propanol	13.95 ± 0.17 ^c	2.95 ± 0.01 ^a	3.80 ± 0.11 ^b
3-Metil-Butanol	68.92 ± 2.28 ^e	21.00 ± 0.29 ^a	20.25 ± 0.62 ^a
2-Metil Butanol	19.38 ± 0.64 ^e	2.78 ± 0.03 ^a	3.47 ± 0.05 ^a
Acetato de etilo	42.94 ± 1.47^d	8.58 ± 0.47 ^b	4.61 ± 0.33 ^a
3-Metil-Butilacetato	2.51 ± 0.14 ^e	-	-
Caproato de etilo	0.44 ± 0.05^e	0.08 ± 0.01 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^{ab}
Caprilato de etilo	0.88 ± 0.19 ^b	0.10 ± 0.02 ^a	0.09 ± 0.03 ^a
2-Feniletilacetato	0.70 ± 0.02 ^d	0.07 ± 0.02 ^a	-
Decanoato de etilo	0.36 ± 0.04 ^c	0.23 ± 0.05 ^b	0.25 ± 0.1 ^{bc}
HA: ESTERES	2.54 ± 0.15 ^{ab}	3.46 ± 0.22 ^b	6.53 ± 0.69 ^c

Los valores en cursiva y negrilla son mayores a los límites establecidos para cerveza (Tabla R2.7)

Todas las cervezas fermentadas con las cepas capaces de metabolizar la maltosa y maltotriosa (EYS5, A-81062, L2046, A-63015) presentaron concentraciones de acetaldehído muy altas, incluso superiores al límite establecido en cerveza (20 – 25 ppm). Las concentraciones más altas de 2-feniletanol se encontraron en las cervezas fermentadas con la cepa cervecera *S. pastorianus* A-63015, seguidas por aquellas fermentadas por las cepas *S. cerevisiae* L2056 y EYS5. Las concentraciones más altas de alcoholes superiores, en la mayoría de ellos, se encontraron en las cervezas fermentadas con la cepa vínica *S. cerevisiae* L2056 y la cepa cervecera *S. pastorianus* A-63015, mientras que los valores más bajos los presentaron las dos cepas de la especie *T. delbrueckii*. Las cervezas fermentadas con las cepas *S. cerevisiae* A-81062 y EYS5 presentaron valores intermedios de alcoholes superiores y bastante similares. En cuanto a la producción de ésteres, nuevamente los valores más altos correspondieron a las cervezas fermentadas con las cepas capaces de metabolizar la maltosa y maltotriosas mientras que los promedios más bajos los presentaron las cepas *S. cerevisiae* EYS4 y *T. delbrueckii* D291.

La producción de alcoholes superiores y ésteres por parte de las cepas *S. cerevisiae* maltosa-negativas ERS1 y EYS4 fue inferior a lo obtenido con la cepa de referencia A-81062. Resultados similares se obtuvieron con una cepa aislada de Kombucha *Zygosaccharomyces bailii* KBI 25.2, que mostró características adecuadas para ser aplicada en la producción de cervezas libres de alcohol (Bellut et al., 2018).

En relación a las cantidades totales de alcoholes superiores y ésteres en las cervezas analizadas, se encontró que aquellas fermentadas con las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y A-81062 presentaron concentraciones totales de alcoholes superiores muy similares pero que la producción de ésteres de la levadura ecuatoriana fue menor a las de todas las cepas industriales del género *Saccharomyces* usadas como referencia (Figura R2.14), lo que posiblemente está relacionada con la fermentación incompleta del mosto. Del grupo de levaduras categorizadas como maltosa-negativas se encontró que las cervezas fermentadas con las cepas de la especie *S. cerevisiae* ERS1 y EYS4 presentaron concentraciones de alcoholes superiores mucho mayores y estadísticamente distintas a las presentadas por las cepas de la especie *T. delbrueckii* (D291 y EGT1). Las cervezas fermentadas con la cepa *S. cerevisiae* ERS1 fueron las que presentaron los promedios más altos de alcoholes superiores mientras que aquellas fermentadas con la cepa *T. delbrueckii* EGT1 presentaron los niveles de ésteres más altos de este grupo.

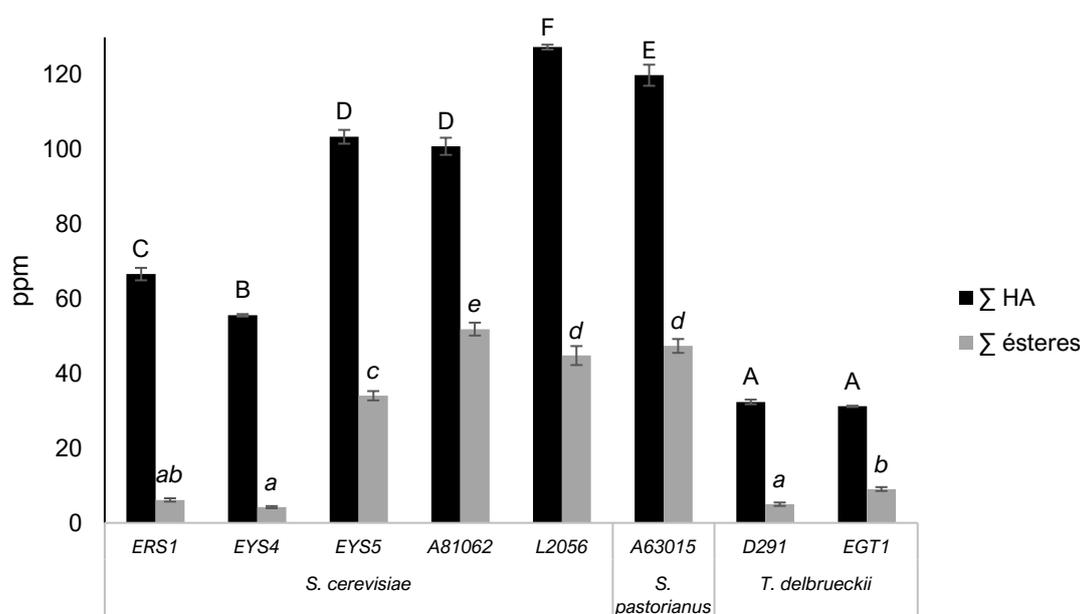


Figura R2.14 Concentraciones totales de alcoholes superiores (HA) y ésteres presentes en las chichas fermentadas con las cepas seleccionadas y sus respectivos controles. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

La relación entre las concentraciones de alcoholes superiores (HA) y ésteres de las cervezas fermentadas con las cepas ERS1 y EYS4 excedieron lo recomendado (4 – 4.7 : 1) (Blanco et al., 2016), mientras que con el resto de cepas se obtuvieron valores menores. La relación más cercana a la recomendada se obtuvo en las cervezas fermentadas con la cepa *T. delbrueckii* EGT1 seguido por aquellas fermentadas con la cepa ecuatoriana *S. cerevisiae* EYS5 (Tabla R2.14).

Al analizar el desempeño de la única levadura ecuatoriana capaz de metabolizar la maltosa y maltotriosa, la cepa *S. cerevisiae* EYS5, se encontraron importantes diferencias en el uso de la maltosa y de la maltotriosa presente en el mosto de cerveza. Una mejor capacidad de metabolizar la maltotriosa es una característica metabólica de las cepas de levaduras con una fuerte domesticación (Gallone et al., 2016) mientras que la fermentación incompleta de la maltosa podría estar relacionada con la no expresión genética de permeasas específicas. Alves et al., (2007) describieron una cepa de *S. cerevisiae* con la permeasa *AGT1* como único transportador de α -glucósidos que fermentaba la maltotriosa de forma más eficiente que la maltosa debido a una mayor expresión de esta permeasa. Sería interesante el analizar de una forma más profunda el transporte de maltosa y maltotriosa en esta cepa.

Se han analizado poblaciones de bacterias ácido lácticas presentes en chichas elaboradas a partir de yuca en comunidades indígenas Shuar de Ecuador y se encontraron poblaciones distintas (con alta divergencia filogenética) entre pueblos, incluso en aquellos separados por cortas distancias geográficas mientras que se encontró una gran similitud (baja divergencia filogenética), entre cepas aisladas a partir de chichas producidas por diferentes pobladores de un mismo pueblo, lo que sugiere que existen inóculos específicos en cada población creados localmente. Aunque todavía se requiere un estudio más profundo para llegar a una conclusión definitiva, se sugiere que las fermentaciones tradicionales pueden ser una forma de domesticación que da lugar a inóculos endémicos de cada población (Colehour et al., 2014). La chicha del Yamor de la cual proviene la cepa EYS5, al ser elaborada únicamente por harinas de diferentes variedades de maíz, suele ser inoculada con residuos del lote anterior de preparación. Si bien es cierto nuestra bebida no fue preparada con un residuo previo, las harinas fueron conseguidas en una población indígena y posiblemente esta fue la fuente de nuestra cepa con signos aparentes de domesticación (apartado 1.9). Un análisis más detallado podría realizarse con varias muestras de chichas elaboradas a partir de maíz en poblaciones indígenas ecuatorianas.

2.1.2.2. Fermentaciones con cultivos mixtos de las cepas EYS5 y EGT1

Como ya se ha comentado, los cultivos mixtos de levaduras *Saccharomyces* y no-*Saccharomyces*, son una opción interesante para combinar la eficiencia fermentativa con características específicas de las levaduras no *Saccharomyces* (Steensels y Verstrepen, 2014). *T. delbrueckii* ha sido evaluada recientemente en cultivos mixtos con cepas de la especie *S. cerevisiae* en fermentaciones de mosto de cerveza y algunas cepas han sido exitosamente aplicadas para la producción de cervezas de bajo contenido alcohólico y la mejora del perfil organoléptico en las bebidas obtenidas (Canonico et al., 2016). Los perfiles sensoriales diferentes

que se han obtenido con el uso de cepas de esta especie se caracterizan por atributos como notas “frutales/cítricas”, atributos de “cuerpo”, mejora del carácter frutal y de lúpulo, entre otros, además en algunos casos algunas cervezas muestran una claridad mejorada, una espuma persistente y constante y rasgos claves de calidad en cerveza (Varela, 2016; Michel et al., 2016).

Tal como se hizo con el sustrato MCS, se decidió estudiar fermentaciones mixtas en mosto de cerveza con las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1. Al analizar la cinética de pérdida de peso que refleja la cinética de fermentación, se encontró el mismo resultado que en los experimentos en MCS, la fermentación mixta más rápida fue la que se coinoculó, aunque no se alcanzó la eficiencia de la fermentación con la cepa EYS5 en ningún caso. El tiempo de fermentación fue de 10 días (Tabla R2.15).

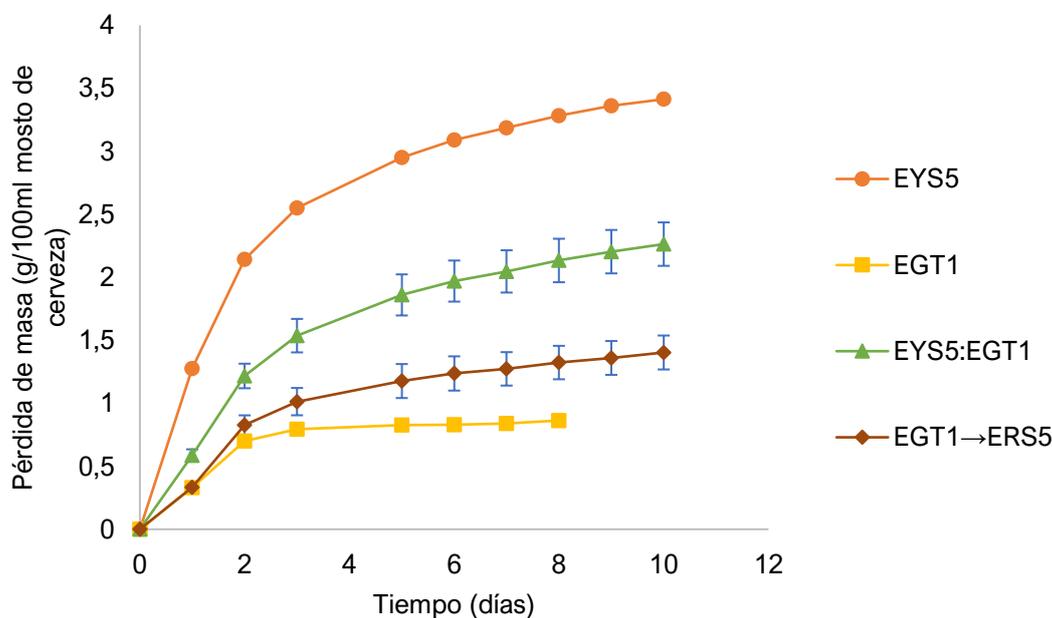


Figura R2.15 Pérdida de masa durante la fermentación en mosto de cerveza (15 °P – 20 °C) con las cepas EYS5, EGT1 y cultivos mixtos por inoculación secuencial (EGT1 → EYS5) y coinoculación (EYS5:EGT1).

Con ninguna de las dos estrategias de inoculación de cultivos mixtos se llegó a igualar los parámetros de fermentación obtenidos con el cultivo puro de la cepa *S. cerevisiae* EYS5, mediante coinoculación se obtuvo una concentración de alcohol de 2.8 % v/v que fue correspondiente a la concentración final de azúcares en el mosto. Los valores más bajos de pH se obtuvieron en las cervezas fermentadas mediante inoculación secuencial y la viabilidad más baja se obtuvo en aquellas producidas mediante coinoculación (Tabla R2.15). La fermentación mixta en cualquiera de sus dos variantes fue capaz de aumentar la concentración final de glicerol respecto a las fermentaciones puras.

Tabla R2.15 Parámetros de fermentación de las cervezas preparadas con cultivos puros y mixtos (coinoculación (EYS5:EGT1) e inoculación secuencial (EGT1 → EYS5)) de las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	Cultivos puros		Co-inoculación	Inoculación secuencial
	<i>S. cerevisiae</i> EYS5	<i>T. delbrueckii</i> EGT1	EYS5:EGT1	EGT1→EYS5
Alcohol (%v/v)	4,9 ± 0,03 ^d	1,37 ± 0,02 ^a	2,81 ± 0,06 ^c	1,84 ± 0,02 ^b
[] azúcares (°P)	5,65 ± 0,04 ^a	12,2 ± 0,13 ^d	9,55 ± 0,14 ^b	11,3 ± 0,04 ^c
Maltotriosa (g/L)	2.87 ± 0.01 ^a	23.85 ± 0.13 ^d	6.22 ± 0.0 ^b	18.19 ± 0.10 ^c
Maltosa (g/L)	27.73 ± 0.26 ^a	62.92 ± 0.35 ^d	54.82 ± 0.28 ^b	61.00 ± 0.01 ^c
Glucosa (g/L)	-	-	-	-
Fructosa (g/L)	-	-	-	-
Glicerol (g/L)	1.74 ± 0.01 ^b	1.57 ± 0.02 ^a	1.91 ± 0.01 ^c	2.00 ± 0.01 ^d
Ethanol (g/L)	37.90 ± 0.19 ^d	10.97 ± 0.04 ^a	22.09 ± 0.17 ^c	14.55 ± 0.13 ^b
pH	4,31 ± 0,01 ^b	4,53 ± 0,02 ^c	4,55 ± 0,01 ^c	3,78 ± 0,09 ^a
Masa seca (g /L)	6,25 ± 0,19 ^c	3,97 ± 0,15 ^a	4,28 ± 0,04 ^{ab}	4,65 ± 0,31 ^b
Viabilidad (%)	96,52 ± 0,15 ^b	99,63 ± 0,12 ^c	94,76 ± 0,54 ^a	99,33 ± 0,18 ^c

En cuanto a la presencia de azúcares residuales en las cervezas finales, de las dos estrategias de inoculación analizadas las obtenidas por coinoculación son las que presentaron las concentraciones más bajas de maltosa y maltotriosa, aunque estas seguían siendo superiores a los promedios que se obtuvieron en cervezas inoculadas con cultivos puros de la cepa *S. cerevisiae* EYS5. La producción de glicerol sin embargo aumenta sinérgicamente con la coinoculación frente a los cultivos puros.

En relación al perfil aromático final de las cervezas obtenidas mediante esta estrategia se encontraron diferencias significativas entre estrategias de inoculación de los cultivos mixtos en la mayoría de compuestos analizados (Tabla R2.16). Las concentraciones de acetaldehído, alcoholes superiores y ésteres más altas correspondieron en la mayoría de los casos a las cervezas inoculadas con cultivos puros de la cepa *S. cerevisiae* EYS5 mientras que las concentraciones más bajas se encontraron en aquellas fermentadas con la cepa *T. delbrueckii* EGT1.

En todas las cervezas obtenidas mediante cultivos mixtos las concentraciones de acetaldehído fueron inferiores (~50 % menos) a las obtenidas en cervezas inoculadas con cultivos puros, resultados similares se han descrito en otras investigaciones tanto en vino como en cerveza (Bely et al., 2008; Varela, 2016) y reflejan el beneficio del uso de este tipo de fermentaciones. En relación a las dos estrategias de inoculación, fue en las cervezas obtenidas por coinoculación en

las que se obtuvo en casi todos los compuestos de aroma analizados, mayores concentraciones a las obtenidas por inoculación secuencial.

Tabla R2.16 Concentraciones de acetaldehído, alcoholes superiores y ésteres en cervezas fermentadas con cultivos puros y mixtos (coinoculación (EYS5:EGT1) e inoculación secuencial (EGT1 → EYS5)) de las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Análisis	Cultivos puros		Coinoculación EYS5:EGT1	Inoculación secuencial EGT1 → EYS5
	EYS5	EGT1		
Acetaldehído	29.17 ± 0.21^b	24.28 ± 0.08 ^b	9.43 ± 2.16 ^a	11.40 ± 0.66 ^a
2-Feniletanol	15.59 ± 0.58 ^c	6.96 ± 0.12 ^a	8.99 ± 0.01 ^b	8.01 ± 0.09 ^{ab}
Propanol	17.58 ± 0.17 ^d	5.02 ± 0.03 ^a	8.55 ± 0.54 ^c	6.81 ± 0.07 ^b
2-Metil Propanol	20.39 ± 0.30 ^d	3.32 ± 0.01 ^a	13.91 ± 0.83 ^c	5.96 ± 0.21 ^b
3-Metil-Butanol	57.34 ± 0.95 ^c	29.22 ± 0.01 ^a	37.74 ± 0.91 ^b	34.29 ± 0.08 ^b
2-Metil Butanol	17.35 ± 0.24 ^d	3.89 ± 0.02 ^a	10.02 ± 0.36 ^c	5.47 ± 0.02 ^b
Acetato de etilo	23.13 ± 0.30 ^d	6.58 ± 0.13 ^a	12.27 ± 0.12 ^c	8.14 ± 0.20 ^b
3-Metil- Butilacetato	0.52 ± 0.01 ^c	0.01 ± 0.0 ^a	0.22 ± 0.02 ^b	0.05 ± 0.0 ^a
Caproato de etilo	0.21 ± 0.0 ^d	0.04 ± 0.0 ^a	0.18 ± 0.0 ^c	0.07 ± 0.0 ^b
Caprilato de etilo	0.22 ± 0.0 ^b	0.03 ± 0.0 ^a	0.23 ± 0.02 ^b	0.06 ± 0.01 ^a
2-Feniletilacetato	0.17 ± 0.01 ^b	-	0.15 ± 0.01 ^b	0.07 ± 0 ^a
Decanoato de etilo	0.09 ± 0.0 ^b	0.06 ± 0.0 ^{ab}	0.05 ± 0.01 ^a	0.04 ± 0.01 ^a
HA: ESTERES	4.63 ± 0.01 ^a	6.17 ± 0.12^b	5.36 ± 0.15^a	6.24 ± 0.20 ^b

Los valores en cursiva y negrilla son mayores a los límites establecidos para cerveza (Tabla R2.7)

En relación a las concentraciones totales de alcoholes superiores y ésteres, los promedios más altos en los dos parámetros correspondieron a las cervezas fermentadas con la cepa EYS5 seguidos por aquellas fermentadas por coinoculación (EYS5:EGT1). Las cervezas obtenidas mediante cultivos mixtos presentaron concentraciones más altas (en los dos parámetros) que las obtenidas mediante fermentación con cultivos puros de la cepa *T. delbrueckii* EGT1.

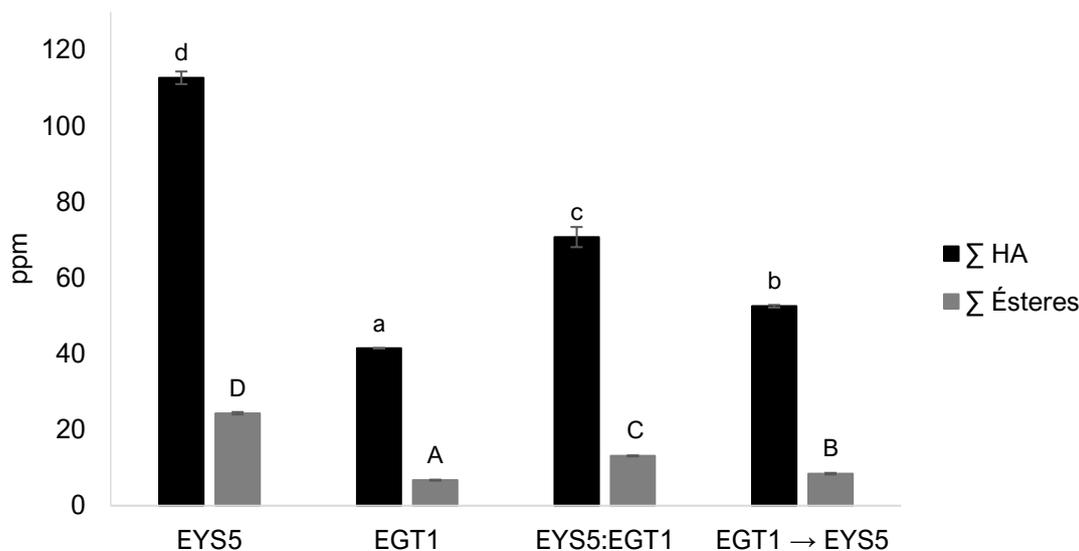


Figura R2.16 Concentraciones totales de alcoholes superiores y ésteres en cervezas fermentadas con cultivos puros y mixtos (coinculación (EYS5:EGT1) e inoculación secuencial (EGT1 → EYS5)) de las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1. Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

En cuanto a la relación entre las concentraciones de alcoholes superiores y ésteres obtenidas en este análisis (Tabla R2.16), los valores más cercanos a los recomendados fueron obtenidos con la cepa EYS5. En una investigación similar se determinó que el usar una relación de inóculo *T. delbrueckii*: *S. cerevisiae* de 20:1 daba lugar a una mayor producción de decanoato de etilo pero que iba acompañada de concentraciones altas de acetaldehído (Toh et al., 2018). En esta investigación los niveles de decanoato de etilo fueron iguales a los presentados en cervezas inoculadas con cultivos puros mientras que los niveles de acetaldehído fueron bajos.

2.2. Adecuación de la cepa EYS5 para su producción como inóculo seco activo

De todas las cepas ecuatorianas seleccionadas, la cepa *S. cerevisiae* EYS5 fue la que mostró un mayor potencial para ser usada como cultivo iniciador. En la caracterización molecular y fisiológica inicial, se encontró que esta cepa mostraba ciertos rasgos interesantes de domesticación como una morfología celular y de colonia similar a las cepas industriales (Figuras R1.23 y R1.24), un comportamiento negativo en la producción de compuestos fenólicos (Tabla R1.12), además de ser la única de las cepas ecuatorianas que presenta capacidad de asimilación de maltosa y maltotriosa (Tabla R1.13). Otra de las características que la hacía idónea para ser utilizada como inóculo seco activo es una buena capacidad fermentativa (Figura R1.15A) y su alta tolerancia a la

deshidratación, ya que presentó una viabilidad incluso superior a la de la cepa vínica industrial de referencia L2056 (Figura R1.16).

En el estudio de su desempeño fermentativo en los dos sustratos evaluados se observó una producción alta de ésteres y alcoholes superiores, especialmente en el sustrato natural. El contenido de ésteres de las chichas fermentadas con esta cepa fue mucho mayor al obtenido con las cepas de referencia tanto cerveceras como vínicas (Figura R2.8) mientras que, en las fermentaciones de mosto de cerveza, aunque la concentración de ésteres y alcoholes superiores fue inferior a las cepas industriales, el balance final obtenido fue aceptable (Figura R2.11). De igual forma se determinó que al actuar en fermentaciones mixtas junto con la cepa *T. delbrueckii* EGT1 en mosto de cerveza, se reduce la cantidad de acetaldehído del producto final que es una característica muy favorable (Tabla R2.16). Por todos estos atributos, se decidió analizar el comportamiento de esta cepa en las condiciones que se utilizan para la producción industrial de biomasa de levaduras, con la idea de proyectar su uso como iniciador de procesos fermentativos, especialmente bebidas.

Como ya se describió en la introducción, el proceso industrial de producción de biomasa se inicia con una serie de cultivos en fase *batch* de los cuales se consigue el inóculo para las fermentaciones en fase *fed-batch*, que es donde se obtiene la mayor cantidad de biomasa (Gomez-Pastor et al., 2011). Se decidió analizar el crecimiento de la cepa EYS5 bajo estas condiciones en simulaciones a escala de laboratorio que constan de dos fases, una de *batch* y una de *fed batch*. El crecimiento de esta cepa se evaluó en un fermentador de 5 L de capacidad y el sustrato utilizado fue el medio preparado a base de melaza de remolacha, como se detalla en el apartado 1.3.1. de Materiales y Métodos. Las condiciones de crecimiento para las dos fases fueron una temperatura de 30°C, saturación de oxígeno 20%, agitación 500 rpm, pH 4.5 (Pérez-Torrado et al., 2005). Es importante destacar que la propagación de levaduras típicamente implica la aireación u oxigenación continua, condiciones que anteriormente no habían sido evaluadas para esta cepa.

Cuando anteriormente se analizó la habilidad de la cepa EYS5 para crecer en medio melaza a escala de laboratorio en cultivo tipo *batch* en matraces en un volumen de 100 mL, se encontró que esta cepa crecía muy bien en este sustrato superando incluso a su cepa control *S. cerevisiae* L2056 (Figura R1.14), sin embargo las condiciones de cultivo industriales son completamente diferentes desde el punto de vista de los requerimientos de flexibilidad metabólica de la levadura.

Se analizó el comportamiento de la cepa EYS5 en cultivo en *batch* durante 72 h y con dos opciones de inicio del *fed batch*, a las 24 y a las 48 h. En la figura R2.17

se muestran las cinéticas de crecimiento, medido como DO_{600} , de la cepa EYS5 en las tres condiciones estudiadas.

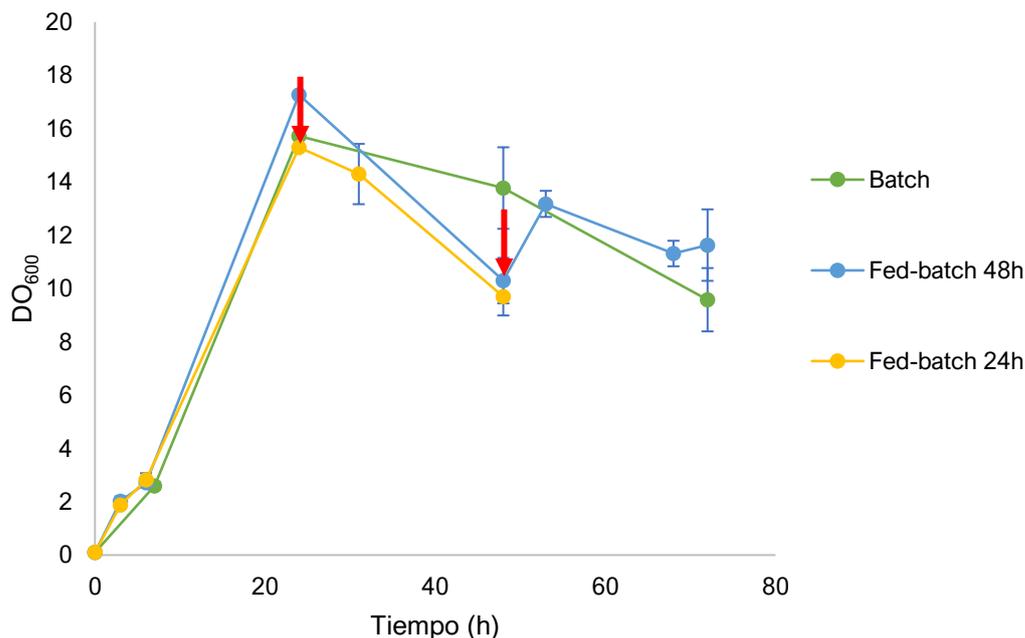


Figura R2.17 Crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* EYS5 durante la simulación del proceso de producción de biomasa en medio melaza a 30 °C en las tres estrategias de cultivo analizadas: discontinuo (batch), con alimentación a partir de las 24 h (fed-batch 24h), con alimentación a partir de las 48 h (fed-batch 48h). Las flechas de color rojo señalan los momentos de inicio de la alimentación.

Como se puede observar, las levaduras crecen hasta alcanzar un valor de crecimiento máximo similar en las tres condiciones en la fase de batch (Figura R2.17), pero contrariamente a lo que se había descrito para otras cepas vínicas de *S. cerevisiae*, el inicio de la alimentación con una concentración de sacarosa que no impone represión por glucosa en la fase de fed-batch, no produce un aumento progresivo del crecimiento. En el cultivo que se mantuvo sin alimentar hasta las 72h (curva verde), se observa una disminución de la DO_{600} , normal en un cultivo estacionado tras el agotamiento de la fuente de carbono, sin embargo en los otros dos cultivos, el inicio de la alimentación a las 24 h (curva amarilla) o a las 48 h (curva azul) debería conducir a un aumento de la DO_{600} si la cepa es capaz de metabolizar la sacarosa respiratoriamente que solo se observó y de forma muy ligera cuando la alimentación se inició a las 48 h.

Como se puede ver en la Tabla R2.17 el rendimiento de biomasa (masa seca) obtenido expresado como g de biomasa/ g sacarosa es estadísticamente igual en las tres condiciones. El rendimiento de producción de biomasa suele ser mayor en la fase fed-batch ya que el rendimiento energético del metabolismo respiratorio es mucho mayor al que se obtiene durante la fermentación alcohólica

sin embargo en este caso, el incremento conseguido después de la fase fed-batch es mínimo.

Tabla R2.17 Parámetros finales de crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* EYS5 en las tres estrategias de cultivo analizadas: discontinuo (*batch*), con alimentación a partir de las 24 horas (*fed-batch 24h*), con alimentación a partir de las 48 h (*fed-batch 48h*). Grupos de medias que son estadísticamente diferentes entre sí ($p < 0.05$), están indicados con letras distintas.

Parámetro	Batch	Fed-batch 48h	Fed-batch 24h
Tiempo de cultivo total (h)	72	72	48
Masa fresca (g/L)	15.83 ± 0.25	18.68 ± 0.81	13.06 ± 1.75
Rendimiento (g biomasa/g sacarosa)	0.048 ± 0.006	0.057 ± 0.003	0.053 ± 0.008
Viabilidad (UFC/mL)	6.04 ± 0.11 ^a	6.82 ± 0.14 ^b	6.50 ± 0.11 ^{ab}

Con el fin de analizar las causas del comportamiento de la cepa EYS5 en estas condiciones de cultivo se estudiaron las cinéticas de consumo de sacarosa en la fase de batch encontrándose un consumo completo a las 24 h de la inoculación (Figura R2.18), como había sido previamente descrito para otras cepas de *S. cerevisiae* (Pérez-Torrado et al., 2005). Este dato indica que, como ya se había comprobado anteriormente en condiciones de laboratorio, la cepa no presenta defectos en la fermentación de la sacarosa, ya que se consume eficientemente en la duración estándar de la fase de batch.

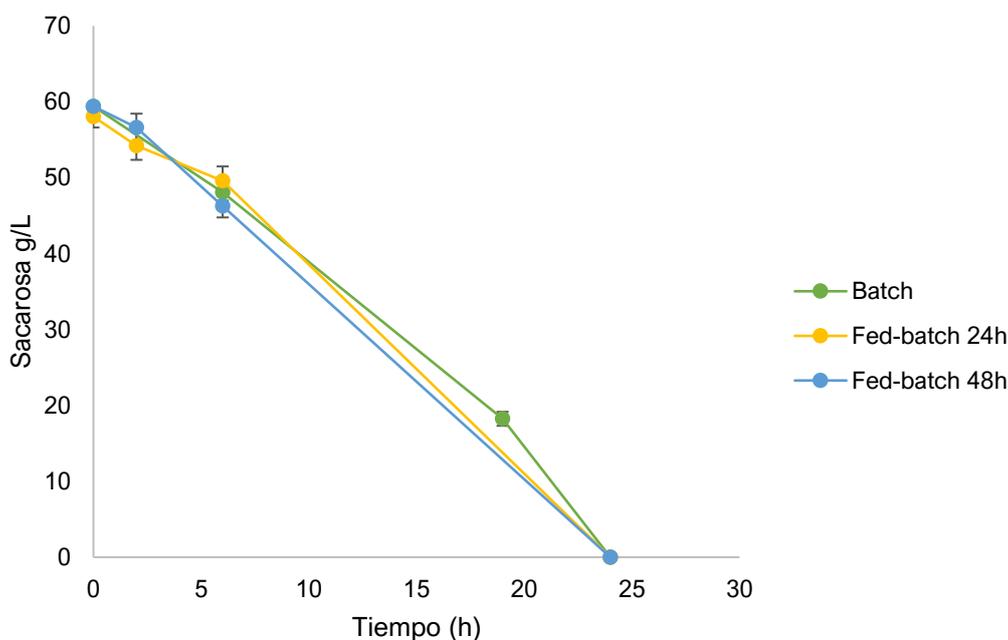


Figura R2.18 Cinéticas de consumo de sacarosa de la cepa *S. cerevisiae* EYS5 en condiciones de producción de biomasa en la fase batch.

Se ha determinado que en levaduras de la especie *S. cerevisiae*, la presencia de oxígeno durante la fase de batch, aunque no es necesaria para el crecimiento y la fermentación de la sacarosa presente en el medio melaza, se requiere para posibilitar el cambio metabólico de fermentación a respiración y que puedan oxidar el etanol producido cuando la sacarosa ha sido consumida y antes de iniciar la alimentación (Pérez-Torrado et al., 2009). Esta transición metabólica es absolutamente necesaria para la eficiente acumulación de biomasa en las condiciones industriales de propagación. Se decidió analizar la concentración de etanol a lo largo de las fases de batch y fed-batch en cada estrategia de propagación y se observó que, en las tres opciones de cultivo analizadas, el etanol se acumula a medida que se fermenta la sacarosa en la fase de batch pero no se produce una disminución posterior de los niveles de etanol (Figura R2.19) lo que indica que la cepa EYS5 no es capaz de respirar el etanol, ni probablemente de activar el metabolismo respiratorio. La cepa EYS5 fue capaz de crecer en placas con glicerol como única fuente de carbono, indicando que es capaz de llevar a cabo la respiración (datos no mostrados).

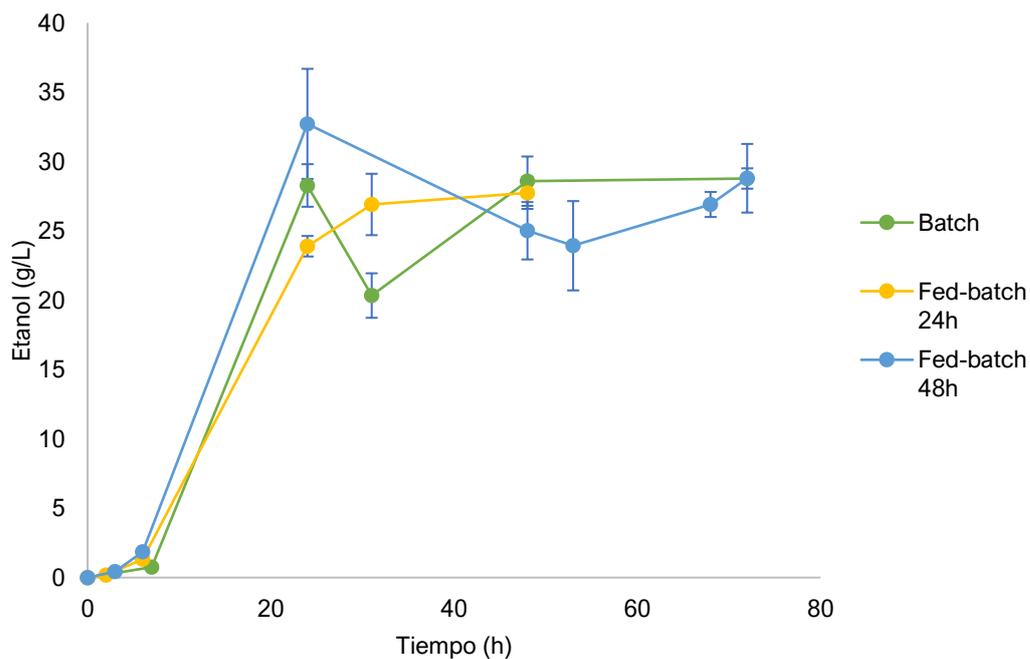


Figura R2.19 Producción y consumo de etanol de la cepa *S. cerevisiae* EYS5 observados durante la simulación del proceso de producción de biomasa en medio melaza a 30 °C en las tres estrategias de cultivo analizadas: discontinuo (batch), con alimentación a partir de las 24 horas (fed-batch 24h), con alimentación a partir de las 48 h (fed-batch 48h).

Durante el proceso de producción de biomasa, el metabolismo de las levaduras Crabtree positivas, como *S. cerevisiae*, cambia con el agotamiento de la sacarosa que resulta fermentada generando etanol durante la fase de batch y, en presencia

de oxígeno, se activa el metabolismo respiratorio lo que permite el crecimiento celular respirando el etanol. Los resultados obtenidos con la cepa ecuatoriana *S. cerevisiae* EYS5 sugieren que no es capaz de activar el metabolismo respiratorio al agotarse los azúcares fermentables de la melaza, ni después al iniciar la alimentación a concentraciones de azúcar fermentable por debajo de los niveles de represión por glucosa. Existen varias diferencias genéticas y fenotípicas entre levaduras silvestres y domesticadas que están asociadas principalmente a la adaptación de las cepas a las condiciones de la industria (Venturini Copetti, 2019), posiblemente los bajos rendimientos a nivel de biomasa están asociados a los rasgos silvestres que presenta la cepa ecuatoriana EYS5.

El etanol es un metabolito clave en la fermentación alcohólica y en procesos de producción de biomasa, especialmente de levaduras de la especie *S. cerevisiae*, ya que la reacción catalizada por las enzimas alcohol deshidrogenas (ADHs) conecta las opciones metabólicas fermentativa y respiratoria permitiendo el uso óptimo de fuentes de carbono (De Smidt et al., 2008). A nivel evolutivo la especie *S. cerevisiae* desarrolló primero la habilidad para tolerar etanol e inhibir el crecimiento de organismos competidores, para posteriormente adaptarse a metabolizarlo (Piskur et al., 2006). La habilidad de tolerar el etanol difiere entre cepas (Chi y Arneborg, 1999) y se ha demostrado que aislados silvestres de esta especie muestran una baja capacidad respiratoria sobre sustratos como el glicerol y el etanol, lo que sugiere que la respiración es uno de rasgo de domesticación importante de las levaduras (Warringer et al., 2011). En estudios realizados con cepas vínicas de *S. cerevisiae* se ha determinado que los rendimientos de biomasa son más bajos que los descritos para cepas panaderas (Pérez-Torrado et al., 2005) y esto se atribuye a que las cepas vínicas respiran peor, posiblemente debido a que están metabólicamente muy adaptadas a la fermentación alcohólica y su metabolismo respiratorio podría haber perdido funcionalidad (Querol et al., 2003). Los resultados obtenidos en este análisis con la cepa EYS5, una cepa aislada en una fermentación espontánea de chicha elaborada a partir de maíz, muestran que posiblemente su exclusiva adaptación a la fermentación alcohólica limite su capacidad respiratoria.

2.3. Análisis del genoma de la cepa ecuatoriana *S. cerevisiae* EYS5

Como ya se ha mencionado, la cepa ecuatoriana *S. cerevisiae* EYS5 presenta características interesantes para ser utilizada como iniciador de procesos fermentativos, pese a que los resultados obtenidos en condiciones industriales de propagación de biomasa no fueron satisfactorios y se requiere optimizar las condiciones para su producción. En el estudio del desempeño fermentativo de esta cepa en mosto de cerveza se determinó un aspecto particular que no suele presentarse en cepas de la especie *S. cerevisiae*, la cepa EYS5 es capaz de

fermentar de forma muy eficiente la maltotriosa mientras que la fermentación de la maltosa la realiza de forma incompleta (Tabla R2.13). El contenido de maltotriosa de las cervezas fermentadas con la cepa EYS5 fue estadísticamente igual al obtenido en cervezas fermentadas con la cepa cervecera *S. cerevisiae* A-81062, que posee el gen *STA1* codificante de una glucoamilasa extracelular (Yamashita et al., 1985). En el análisis de los rasgos de domesticación en las cepas ecuatorianas de *S. cerevisiae* se había comprobado por PCR la ausencia en todas ellas de este gen (Figura R1.27 y Tabla R1.15), por lo que un estudio genómico más completo podría aportar información de posibles secuencias génicas codificantes de una posible actividad glucoamilasa en esta cepa que explique su comportamiento en las fermentaciones de mosto de cerveza. Además, otras características de esta cepa, como la fermentación incompleta de la maltosa, la aparente descompensación entre su actividad invertasa no completamente reprimible por glucosa y su capacidad de asimilación de los productos de hidrólisis, y la incapacidad de respiración del etanol en condiciones de *fed-batch* descrita en el apartado anterior, merecen un estudio en profundidad del genoma de esta levadura.

La secuenciación de su genoma completo se realizó de acuerdo a lo descrito en la sección de Materiales y Métodos (Apartado 3.9), para posteriormente realizar el análisis bioinformático de la secuencia de la cepa EYS5, utilizando como referencia la cepa S288c de *S. cerevisiae* con el fin de anotar las potenciales ORFs presentes en dicho genoma y describir las rutas metabólicas en las que podrían estar involucrados. El número de lecturas obtenidas tras la secuenciación fue el adecuado. Para asegurar que se obtenía el ensamblaje más óptimo se realizaron 6 ensamblajes con distintas longitudes de k-mers (secuencias de k-nucleótidos): 27, 33, 45, 55, 77 y 127; los resultados se detallan en la tabla R2.18.

Tabla R2.18 Resultados del ensamblaje de las lecturas con distintos k-mers.

K-mers	Contigs \geq 500pb	N50	Contig más largo	Longitud total
K21	3099	5867	28573	11121378
K33	1746	11963	56811	11336507
K55	1820	11752	48560	11385135
K77	1992	11484	50234	11435455
K99	3027	9542	50234	11760464
K127	3686	9580	78555	12759826

La utilización de los distintos k-mers permitió reconstruir un rango más amplio del genoma de la levadura. El k-mer 127 fue con el que se obtuvo los mejores resultados con una cobertura media total de ensamblaje de 114 x por lo que fue

seleccionado para realizar los posteriores análisis. Se consideran coberturas de ensamblaje altas aquellas mayores a 70 x (Douglass et al., 2019).

En la tabla R2.19 se detallan los resultados obtenidos en el ensamblaje inicial, el análisis con el programa Blast permitió confirmar que los contigs (secuencias consenso) del genoma de esta cepa pertenecen a la especie *S. cerevisiae*. El contig de mayor longitud del ensamblaje de 78.6 kb mostró un alineamiento con buena calidad contra esta especie.

Tabla R2.19 Número de contigs obtenidos en el ensamblaje inicial del genoma de la cepa ecuatoriana *S. cerevisiae* EYS5.

Contigs	Número
≥ 0 pb	4941
≥ 1000 pb	1808
≥ 5000 pb	724
≥ 10000 pb	336
≥ 25000 pb	59
≥ 50000 pb	2
N50	9580
N75	3978
L50	354
L75	867

El contenido GC del genoma de la cepa *S. cerevisiae* EYS5 fue de 38.46%, en la figura R2.20 se detalla el número de contigs con un contenido GC (%) específico. La cepa de referencia *S. cerevisiae* S288c tiene un contenido GC promedio de 38.16% y el tamaño de su genoma es de 11.876 Mb (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome>), estos valores son ligeramente inferiores a los encontrados para el genoma de la cepa EYS5. El contenido de GC de un genoma es una de las variables más usadas que suelen estar altamente correlacionadas con la recombinación, en *S. cerevisiae* se han determinado correlaciones de largo alcance entre la recombinación y el mayor contenido GC del cromosoma III (Marsolier-Kergoat y Yeramian, 2009).

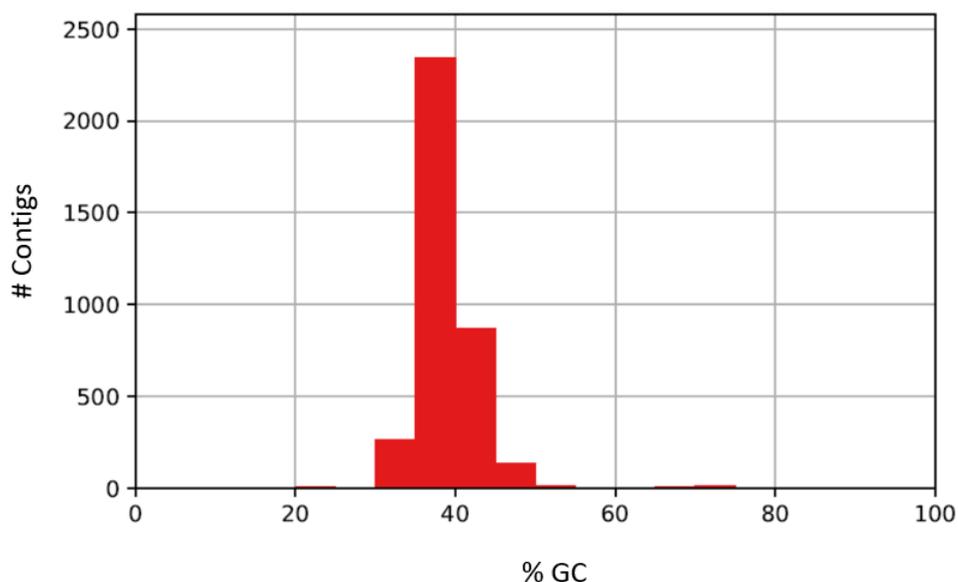


Figura R2.20 Contenido GC (%) de los contigs finales del genoma de la cepa ecuatoriana *S. cerevisiae* EYS5.

Inicialmente se predijo un total de 7054 ORFs mediante el programa GeneMark-ES. Sin embargo, mediante el análisis con el programa Blastp de estas ORFs frente al genoma de referencia de *S. cerevisiae* S288c se obtuvieron un total de 4432 ORFs con un porcentaje de identidad superior al 80 % y una cobertura (query coverage) superior al 80 %. El análisis con el programa Barnap permitió determinar 6 rRNAs en el genoma problema. Los resultados se muestran óptimos en términos de similitud de secuencia y cobertura frente a la especie *S. cerevisiae*. El análisis con el programa tRNAscan-SE ha permitido ubicar y extraer las secuencias de los 288 tRNAs del genoma problema.

El análisis comparativo del genoma de la cepa EYS5 con el de la cepa de referencia S288c reveló algunas diferencias entre ambos, respecto a genes presentes y ausentes. Dos genes presentes en la cepa S288c no aparecieron en la secuencia de la cepa ecuatoriana, *AQY2* y *ATF2*. Tanto las cepas silvestres como las industriales poseen el alelo que codifica para la acuaporina funcional *Aqy1p*, mientras que se ha descrito que no poseen una *Aqy2p* funcional ya que, al parecer, las condiciones industriales y naturales ejercen una presión selectiva para mantener *AQY1* pero no *AQY2*, que únicamente se presenta en ciertas cepas de laboratorio (Laizé et al., 2000). Esta podría ser la razón por la que este gen no se encuentra en el genoma de la cepa EYS5.

En cuanto al gen *ATF2*, que codifica una alcohol acetil transferasa productora de ésteres de acetato (Procopio et al., 2011), en la cepa EYS5 se observa que el gen está fusionado con la ORF situada delante, perteneciente al gen *PBP1* (Figura R2.21), que codifica una proteína de unión a RNA implicada en la formación de gránulos de estrés y, por tanto, está relacionada con la degradación de mRNAs y la regulación de la traducción (Swisher y Parker, 2010). En la cepa S288c, los dos genes están en el mismo cromosoma (cromosoma VII), pero están separados por 611 nucleótidos (www.yeastgenome.org/locus/S000003409), mientras que en la cepa ecuatoriana EYS5 la región intergénica ha sido deletada y ambas ORFs están fusionadas. Faltan los últimos 29 aminoácidos de Pbp1p, de manera que su función también podría verse alterada. El hecho de que estas secuencias aparezcan fusionadas o separadas en diferentes cepas puede utilizarse como un indicador evolutivo (Chia y Kolatkar, 2004), por lo que la fusión de los genes *PBP1-ATF2* de la cepa EYS5 es un aspecto interesante de su genoma que podría ser analizado en profundidad para saber si la enzima mantiene su eficacia y/o especificidad en la proteína de fusión, o si la fusión génica genera alguna nueva función. La cantidad de ésteres es mayor en dicha cepa en comparación con las otras cepas ecuatorianas (Figura R2.15) y es del rango de lo producido por las cepas comerciales, y aunque hay que tener presente que existen otras actividades enzimáticas alcohol acetil transferasa redundantes, particularmente Atf1p, no es descartable que una alteración de Atf2p en la cepa EYS5 altere su fenotipo al respecto. Según la base de datos SGD, el número de moléculas de Atf2p por célula varía entre 537 y 14312 según el medio, mientras que el de Pbp1p está entre entre 2264 y 188842, lo cual sugiere que la proteína de fusión, regulada por el promotor de *PBP1* puede estar en mayor concentración que Atf2p.

A

PBP1	ATGATGGGATCAGGTCCATCTGGCATGCCAGCGAACGGGTCGGCAATGCACAGTCATGGC	2100
EYS5_2459	ATGATGGGATCAGGTCCATCTGGCATGCCAGCGAACGGGTTAATTATGGAAGATATAGAA	2100
ATF2	-----ATGGAAGATATAGAA	15
	*** * * *	
PBP1	CATAGTAGAAATTACCATCAAACACTAGC-----CACCATGGCCACCATAATAGTAGTAC	2153
EYS5_2459	GGATACGAACCAC-ATATCACTCAAGAGTTGATAGACCGTGGCCATGCAAGACGTATGGG	2159
ATF2	GGATACGAACCAC-ATATCACTCAAGAGTTGATAGACCGTGGCCATGCAAGACGTATGGG	74
	* **** * ** *** ***** * ***	
PBP1	CAGTGGCCATAAATAG-----	2169
EYS5_2459	CCACTTGGAAAACACTTTGCTGTTTTGAGTAGGCAGAAAATGTAAGTCTCGAATTTTACTGT	2219
ATF2	CCACTTGGAAAACACTTTGCTGTTTTGAGTAGGCAGAAAATGTAAGTCTCGAATTTTACTGT	134
	* * * * *	

B

PBP1	AGPGAPMGAFGYPPGIPFQGMMSGSPSGMPANGSAMHSHGHSRNYH-QT-SHHGHHSST	718
EYS5_2459	AGPGAPMGAFGYPPGIPFQGMMSGSPSGMPANGLIMEDIEGYEPHITQELIDRGH--ARR	718
ATF2_1	-----MEDIEGYEPHITQELIDRGH--ARR	23
	*.. . : * .:** :	
PBP1	SGHK-----	722
EYS5_2459	MGHLENYFAVLSRQKMYSNFTVYAELNKGVNKRQLMLVLKLLQKYSTLAHTIIPKHYPH	778
ATF2_1	MGHLENYFAVLSRQKMYSNFTVYAELNKGVNKRQLMLVLKLLQKYSTLAHTIIPKHYPH	83
	**	

Figura R2.21 Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos (A) y de aminoácidos (B) de los genes *PBP1* y *ATF2* de la cepa *S. cerevisiae* S288c y su secuencia homóloga codificada por el gen EYS5_2529 en la cepa ecuatoriana EYS5 alrededor de la región de fusión entre ambas ORF.

En la tabla R2.20 se muestran varios de los genes que presentaron diferencias respecto a la cepa de referencia S288c, con menos de 80% de identidad, o alguna alteración importante. Se indica su función, además de las principales alteraciones y diferencias con la cepa de referencia.

Tabla R2.20 Genes diferentes a S288c con menos de 80% de identidad, o con alteraciones.

Gen	Homólogo en S288c	Función	Alteraciones y diferencias
EYS5_2529	<i>MAL13</i>	Factor de transcripción Mal13	Truncado, sólo tiene 85 aminoácidos
EYS5_2530	<i>MAL11</i>	Permeasa de α -glucósidos	Inserción de 9 aminoácidos
EYS5_6225	<i>DSF1</i>	Manitol deshidrogenasa	Muy parecido al gen de Vin7
EYS5_2533	<i>MAL33</i>	Factor de transcripción	Muy parecido a MAL73 de GLBRCY22-3
EYS5_6224	<i>FRE7</i>	Reductasa de hierro	
EYS5_3061	<i>UIP3</i>	Proteína integral de membrana	
EYS5_4873	<i>FIT1</i>	Ribonucleasa E	Similar a EGA62824.1 de FostersO
EYS5_3058	<i>MST2</i>	Supresor multicopia de SEC21	
EYS5_2323	<i>YPS6</i>	Proteasa de aspartato	Similar a EDV10953.1 de RM11
EYS5_69	<i>YNR071C</i>	Manoproteína de pared	
EYS5_80	<i>SEO1</i>	Transportador	Similar a EHN04000.1 de VIN7
EYS5_52	<i>CDC4</i>	Proteína de señalización	Similar a EHN07591 de VIN7

EYS5_6815	<i>AAD14</i>	Arilalcohol deshidrogenasa	Similar a PTN14949.1 de cepa I-329 flor
EYS5_5254	<i>SED1</i>	Proteína de pared	

De los genes indicados en la tabla R2.20 resultan de especial interés aquellos involucrados en la asimilación de azúcares, en especial de la maltosa, dada la característica de esta cepa respecto de su utilización. En la caracterización fisiológica y en el estudio del desempeño fermentativo se había detectado un comportamiento distinto de esta cepa en el metabolismo de la maltosa y maltotriosa, presente especialmente en mosto de cerveza. En previas investigaciones, se ha demostrado que el gen activador *MAL13* está relacionado con un aumento en la expresión inducida por maltosa de los genes estructurales *MAL* (Orikasa et al., 2018). En la figura R2.22 se puede observar el alineamiento entre la secuencia del factor de transcripción *MAL13* de S288c y su homólogo en EYS5 que corresponde a una secuencia truncada de solo 85 aminoácidos.

```

S288c      MTLTKQTCAKQACDCCRIRRVKCDGKRPCSSCLQNSLDCTYLQPSRKRGPKSIRLRSLKR 60
EYS5      MTLTKQTCAKQACDCCRIRRVKCDGKRPCSSCLQNSLDCTYLQPSRKRGPKSIRLRSLKR 60
          *****

S288c      IAEVQRESGPNTIATAPVIYKRVPKKLIDQCLRLYHDNLYVIWPLLSYDDLHKLLLEE-KY 119
EYS5      IAEVQRESGPNTIATAPVIYKRVPKSSISACGSITI--IYTSGPFRTMTFTNFWRKNTM 118
          *****
          * . * : : * . * : : : . .
    
```

Figura R2.22 Alineamiento entre la secuencia del factor de transcripción codificado por el gen *MAL13* de la cepa *S. cerevisiae* S288c y su secuencia homóloga codificada por el gen EYS5_2529 en la cepa ecuatoriana EYS5. El recuadro azul remarca la secuencia truncada de 85 aminoácidos que permanece en esta última cepa.

Esta importante diferencia podría estar relacionada con el uso pobre de la maltosa observado en la fermentación del mosto de cerveza. La secuencia del activador transcripcional *MAL33* de EYS5 es similar a la del gen *MAL73* de la cepa GLBRCY22-3 usada en la producción de biocombustibles (McIlwain et al., 2016). Este gen ha sido descrito como un regulador de la fermentación de la maltosa y se considera que es afuncional en S288c. Se ha atenuado funcionalmente en levaduras de sake por delección de un solo nucleótido a lo largo de su manejo industrial (Ohdate et al., 2018). La presencia de este gen podría compensar algunas de las funciones del gen *MAL13* truncado, ya que la cepa crece eficientemente en maltosa (Tabla R1.14). Es posible que alguna de estas variaciones, o una combinación de ellas, contribuyan al muy eficiente consumo de maltotriosa por parte de esta cepa. Por otra parte, respecto del gen

MAL11, que codifica una permeasa de maltosa de alta afinidad (Alves et al., 2008), su homólogo en la cepa EYS5 presenta una inserción de 9 aminoácidos que podría alterar su función. En un trabajo reciente de Trichez et al. (2019) se demostró que cuatro aminoácidos de esta enzima son claves para la fermentación eficiente de la maltotriosa en *S. cerevisiae*.

Varios de los genes con menos de 80% de identidad o con alteraciones que se muestran en la Tabla R2.21 tienen alta similitud con sus ortólogos en cepas industriales y tolerantes al estrés. Los genes *DSF1*, *SEO1* y *CDC4* de EYS5 presentaron la homología más alta respecto a sus ortólogos de la cepa comercial vínica VIN7, un híbrido alotriploide de *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (Borneman et al., 2012). De igual forma, los genes *FIT1*, *YPS6* y *AAD14* de EYS5 mostraron mayor similitud con los ortólogos de las cepas industriales FostersO, RM11 e I-329 (Eldarov et al., 2018), respectivamente. Es complicado atribuir a priori ventajas o desventajas derivadas de la presencia de estos genes respecto a características positivas individuales de la cepa EYS5 pero, en general, indican una mayor similitud a cepas de probada eficiencia tecnológica.

Otro aspecto importante en el análisis de un genoma es determinar si algunas de las ORFs que no tienen ningún tipo de homología con la cepa de referencia, en este caso la cepa S288c, pueden ser atribuidas a sucesos de transferencia génica horizontal. Según Novo et al., (2009) puede ocurrir transferencia genética entre especies *Saccharomyces* y no *Saccharomyces*, estos eventos suelen estar favorecidos por la proximidad ecológica y están involucrados en la adaptación molecular de las levaduras a distintas condiciones de estrés. Se identificaron 21 ORFs en EYS5 ausentes en la cepa de referencia S288c, cuatro de ellas tienen ortólogos en las especies *Zygosaccharomyces bailii* (EYS5_6623, EYS5_6622), *S. pastorianus* (EYS5_1399) y *S. kudriavzevii* (EYS5_173). Algunas de estas ORFs corresponden a ortólogos de cepas *S. cerevisiae* vínicas como EC1118, RM-11, VIN7, P301 mientras que otras ORFs tienen sus ortólogos en cepas de sake (K5), productoras de bioetanol (JAY291) o de laboratorio (Σ1278b). En la Tabla R2.21 se describen varios de estos genes presentes en la cepa ecuatoriana EYS5 junto con sus homólogos y posible función.

Tabla R2.21 Proteínas presentes en EYS5 y ausentes en S288c que suelen ser sucesos de transferencia génica horizontal.

Gen	Homólogo	Función
EYS5_416	EC1118_1O4_6512p	Deshidrogenasa/reductasa de cadena corta de la familia SDR procedente de <i>L. kluyveri</i>
EYS5_113	EC1118_1O4_6513p	Potencial transportador de aminoácidos procedente de <i>Z. rouxii</i>
EYS5_413	EC1118_1O4_6645p	Helicasa de DNA (similar a <i>S. cerevisiae</i> YFR1-8)
EYS5_3319	EC1118_1O4_6656p	Helicasa de DNA (similar a <i>S. cerevisiae</i> YFR1-2)
EYS5_79	EC1118_1O4_6480p	Factor de transcripción fúngico
EYS5_2155	EC1118_1112_1684p	Potencial factor killer parecida a <i>KHR1</i> de <i>S. cerevisiae</i> YJM789
EYS5_5340	KZV10434	Factor de transcripción <i>ZTF3</i> de la cepa GLBRCY22-3
EYS5_2017	C1Q_05652	Hipotética proteína de la cepa JAY291
EYS5_6621	C1Q_05653	Factor de transcripción de la cepa JAY291
EYS5_3362	C1Q_05663	Hipotética proteína de la cepa JAY291
EYS5_6622	QA23_5177	Factor transcripcional homólogo a <i>GAL4</i> procedente de <i>Z. bailii</i>
EYS5_1175	EDV12202.1	Transporte vacuolar, <i>PEP1</i> de la cepa RM-11
EYS5_414	EHN03988	Transportador de azúcares Itr2p de la cepa VIN7
EYS5_68	SCRG_03463	Acetiltransferasa de ácido L-azetidín-2-carboxílico <i>MPR1</i> de la cepa Σ 1278b
EYS5_1399	BAF57236	Permeasa de tirosina de <i>S. pastorianus</i>
EYS5_4072	BAD90000	Aspartato aminotransferasa, síntesis de biotina idéntica a <i>BIO6</i> de la cepa de sake K7
EYS5_6227	EWG87950	Hipotética proteína de la familia Grp1_Fun34_YaaH también encontrada en la cepa P301 de Prosecco
EYS5_3165	P40113.1	Proteína que confiere resistencia a melazas <i>RTM1</i>
EYS5_6623	AEJ82629.1	Idéntica a oxoprolinasa de <i>Z. bailii</i>
EYS5_531	EHN04001.1	SOD2 de la cepa vínica híbrido VIN7
EYS5_173	EJT43782.1	Homólogo al transportador de aminoácidos <i>GAP1</i> de <i>S. kudriavzevii</i> de la cepa IFO 1802

S. cerevisiae carece de genes *STA* funcionales pero contiene un gen *SGA* que codifica para una glucoamilasa intracelular, que se expresa específicamente durante la meiosis y la esporulación (Hostinová y Gašperík, 2010). De las ORFs descritas en la tabla R2.21, ninguna de ellas corresponde a los genes *STA*

relacionados con la actividad glucoamilasa de la cepa *S. cerevisiae* var *diastaticus*, lo que corrobora los resultados obtenidos en los análisis realizados mediante PCR (Apartado 1.9.5).

El genoma de la cepa ecuatoriana EYS5 muestra una zona similar al evento de transferencia génica horizontal descrito en el cromosoma XVI de la cepa vínica EC1118 (Novo et al., 2009), con al menos seis genes que presentan homología. No hay indicios que indiquen que los otros dos eventos de transferencia horizontal descritos en EC1118 estén presentes en EYS5, lo que puede indicar que éste fue un evento anterior a los otros dos eventos descritos.

La presencia de un gen con homología al gen *ZTF3* de la cepa GLBRCY22-3 utilizada para la producción de bioetanol, sugiere la presencia en la cepa EYS5 de una región subtelo mérica del cromosoma IX de dicha cepa, que contiene un gen codificante de una invertasa, denominado *SUC72*, que podría tener regulación diferente a la descrita para el gen codificante de la invertasa mayoritaria, *SUC2* (McIlwain et al., 2016). Debido a su localización muy próxima al telómero puede que no haya sido incluida en el ensamblaje de nuestra cepa y se requeriría trabajo adicional para determinar su presencia y secuencia completa. La cepa EYS5 contiene un gen *SUC2* que es 98% idéntico al de S288c y una región promotora hasta la siguiente ORF de función conocida, *NIT1*, sin alteraciones que indiquen una regulación distinta. Por otro lado, la presencia del homólogo al gen *RTM1* presente en cepas industriales con resistencia a la toxicidad de las melazas, cuyo locus siempre está físicamente asociado al locus telomérico *SUC* (Ness y Aigle, 1995), podría estar relacionada con el comportamiento de esta cepa en medios ricos en sacarosa.

Otra anomalía de interés en la cepa EYS5 es la presencia de una copia extra del gen *SOD2*, además del gen correspondiente en S288c. Ese gen *SOD2* adicional presenta una mayor homología con el gen *SOD2* de la cepa vínica V7. *SOD2* codifica una manganeso-superóxido dismutasa localizada en la matriz mitocondrial, involucrada en la detoxificación de ROS. Se ha descrito que la sobreexpresión de los genes codificantes de superóxido dismutasas *SOD1* y *SOD2* en *S. cerevisiae* aumenta la supervivencia en condiciones de estrés oxidativo pero no afecta a las tasas metabólicas celulares (Fabrizio y Longo, 2003). Sin embargo, la cepa EYS5 presenta una baja tolerancia al estrés oxidativo causado por peróxido de hidrógeno (Tabla R1.5), lo que podría interpretarse como una baja eficiencia de su sistema de detoxificación de ROS, o quizás la adición de este gen extra altera la regulación redox, afectando a la tolerancia a otras ROS. La tolerancia a un generador de radicales superóxidos sería una prueba interesante para determinar si esta adición supone alguna mejora.

2.4. Discusión general

En la primera parte de este capítulo se realizó el análisis del desempeño fermentativo de cuatro cepas de levaduras seleccionadas aisladas a partir de chichas ecuatorianas, tres de la especie *S. cerevisiae*, ERS1, EYS4 y EYS5, y una de la especie *T. delbrueckii* EGT1, tanto en un sustrato modelo tipo chicha (MCS), desarrollado como parte de esta investigación, así como en mosto de cerveza. Se usaron estas cepas ya que las tres de la especie *S. cerevisiae* mostraron una capacidad fermentativa similar a las cepas de referencia (Tabla R1.7), una actividad invertasa inusual (Figura R1.13) y además las cepas EYS5 y EGT1 demostraron una alta tolerancia a la deshidratación (Figura R1.16), lo que hacía a estas cepas interesantes. Las fermentaciones en los dos sustratos se realizaron a escala de laboratorio (100 mL) y a escala piloto (1.5 L) con cultivos puros de cada cepa y sus respectivos controles (dos cepas vínicas y dos cepas cerveceras), se realizaron además fermentaciones mixtas a escala de laboratorio con las cepas *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1.

En relación a las fermentaciones en MCS se determinó que todas las cepas eran capaces de metabolizar este sustrato tanto a temperaturas bajas (12 °C) como a temperatura ambiente (20 °C), en todas las chichas se obtuvieron concentraciones finales de alcohol, luego de 14 días de fermentación, superiores a 6.3 % (v/v). Las cinéticas de fermentación más lentas las presentaron las cepas ERS1 y EGT1 mientras que las cepas EYS4 y EYS5 fermentaron el sustrato de forma muy similar, aunque algo peor que las cepas industriales de referencia. Con todas las cepas se obtuvo una atenuación aparente final del sustrato superior al 84 %, que refleja la conversión eficiente de los azúcares en casi todas las inoculaciones. En relación al análisis aromático de las bebidas finales, aquellas fermentadas con la cepa EYS4 presentaron los promedios más altos de alcoholes superiores mientras que, en relación a la concentración total de ésteres, el valor más alto correspondió a la cepa ERS1 seguida por las cepas EYS5 y EYS4. De forma general, la producción de ésteres de las cepas ecuatorianas en este sustrato, fue mayor que la de las cepas de referencia. La alteración genética del gen productor de ésteres *ATF2*, que se encuentra fusionado con el gen anterior *PBP1* en la cepa EYS5, puede estar relacionado con esta diferencia, y es un aspecto interesante a estudiar en el resto de cepas ecuatorianas. De todas las cepas evaluadas, incluidas las de referencia, la cepa ERS1 fue con la que produjo las chichas con un mejor balance aromático, que suele reflejarse en la relación alcoholes superiores:ésteres. Esta cepa fue aislada de chicha de arroz por lo que posiblemente esté mejor adaptada a este sustrato. Al contrario, aquellas chichas obtenidas con la cepa *T. delbrueckii* EGT1 presentaron los peores valores, tanto a nivel de aromas como en los parámetros de fermentación, lo que indica que

posiblemente el uso de cultivos puros de esta especie en producción de chicha no es una estrategia adecuada.

Como ya se había determinado en el capítulo anterior, solo una de las cepas ecuatorianas seleccionadas, la cepa EYS5 era capaz de metabolizar la maltosa y maltotriosa, que son los azúcares más abundantes en el mosto de cerveza. Este comportamiento se ratificó en las fermentaciones en este sustrato donde las cepas categorizadas como maltosa negativas (ERS1, EYS4 y EGT1) solo consumieron la glucosa y fructosa presente en el mosto, lo que se reflejó en concentraciones finales de etanol de las cervezas obtenidas con estas cepas inferiores al 1.4 % (v/v). En el caso de las fermentaciones llevadas a cabo con la cepa EYS5, se observó que, a bajas temperaturas (12 °C) esta era incapaz de fermentar el mosto de cerveza, mientras que, a 20°C, presentaba una cinética de fermentación más lenta comparada con las cepas cerveceras de referencia. En los análisis de los azúcares residuales presentes en las cervezas fermentadas con la cepa EYS5 se observó concentraciones de maltosa altas (~ 26 g/L) mientras que las de maltotriosa fueron incluso inferiores a las de las cepas cerveceras. Valores tan bajos para las concentraciones de maltotriosa como los encontrados con la cepa ecuatoriana EYS5 son muy comunes en cervezas fermentadas con cepas diastáticas, que son aquellas que producen glucoamilasas extracelulares, la cepa *S. cerevisiae* var *diastaticus* produce y secreta una glucoamilasa codificada por el gen *STA1* y por ello se decidió analizar la presencia de este gen en dicha cepa. En el análisis por PCR (Tabla R1.15) así como en los datos de la secuenciación de su genoma, no se detectó la presencia de este gen. Los valores de atenuación real del mosto para las cepas cerveceras fueron superiores al 70%, que es el valor que comúnmente se obtiene en fermentaciones de este sustrato, mientras que en las cervezas fermentadas con la cepa EYS5 se obtuvieron valores del 58%; en el caso de las cepas maltosa negativas los valores fueron inferiores al 14%. Estos resultados nos muestran que la cepa ecuatoriana EYS5 fermenta de una forma pobre la maltosa, lo que puede estar relacionado con la presencia de una mutación que trunca el factor de transcripción *MAL13*, que regula la inducción de genes de la familia *MAL*. Sin embargo, en los resultados de los análisis de aromas de las cervezas finales se obtuvo con esta cepa, un balance adecuado reflejado en la relación entre la concentración de alcoholes superiores y la de ésteres, que es similar a la alcanzada con las cepas cerveceras de referencia. Pese a que las cepas *S. cerevisiae* ERS1, EYS4 y *T. delbrueckii* EGT1 son incapaces de metabolizar la maltosa y la maltotriosa se observaron diferencias en las características finales de las cervezas fermentadas con estas cepas, que se reflejaban en contenidos distintos de ésteres y alcoholes superiores, lo que abre la posibilidad del uso de estas cepas en cervezas de bajo contenido de alcohol.

En relación a las fermentaciones mixtas en los dos sustratos con las cepas *T. delbrueckii* EGT1 y *S. cerevisiae* EYS5, se determinó que los mejores resultados en ambos casos se obtuvieron por coinoculación. En las fermentaciones en MCS la concentración de alcohol final obtenida con los cultivos mixtos fue similar a la de los cultivos puros mientras que, en mosto de cerveza, la concentración de alcohol más alta se obtuvo con el cultivo puro de la cepa EYS5, seguido por el obtenido por coinoculación. Las cervezas obtenidas por coinoculación presentaron un balance adecuado de aromas reflejado en una relación alcoholes superiores: ésteres de 5.4:1, por lo que sería interesante realizar análisis a escala piloto. La coinoculación mejora ciertos aspectos, como el acetaldehído y el glicerol.

Debido al potencial interés de los resultados obtenidos en las fermentaciones con la cepa *S. cerevisiae* EYS5, su adecuado crecimiento en melaza en cultivos de laboratorio y a su alta tolerancia a la deshidratación, se analizó su comportamiento en condiciones de simulación de la propagación de biomasa, en medio melaza en fermentador con un diseño de tipo batch mas fed-batch, con la idea de evaluar su uso como cultivo iniciador. Sin embargo, esta cepa presentó un mal crecimiento en estas condiciones y los rendimientos de biomasa obtenidos fueron muy bajos. En todas las estrategias de cultivo probadas se observó un comportamiento deficiente de la cepa en las fases de cultivo que requieren activación del metabolismo respiratorio, de manera que no fue capaz de consumir el etanol generado en la fase fermentativa de *batch*. Un comportamiento similar se ha observado con otras cepas silvestres, ya que no suelen estar adaptadas a las condiciones de crecimiento industriales, por lo que sería necesario una adaptación de las condiciones de cultivo para la producción óptima de biomasa de esta cepa.

Por las características tecnológicas potencialmente interesantes de la cepa EYS5 y por el interés básico de caracterización de algunos de sus rasgos fisiológicos, se ha llevado a cabo la secuenciación de su genoma. Se mostró un alineamiento con buena calidad contra la cepa *S. cerevisiae* S288 c, usada como referencia. Se encontraron en la cepa EYS5, 14 genes diferentes con menos del 80% de identidad o con alteraciones, además de 21 genes que están presentes en la cepa ecuatoriana EYS5 pero ausentes en la cepa de referencia S288c. Estas últimas secuencias suelen ser producto de sucesos de transferencia génica horizontal y, en el caso particular de la cepa EYS5, varias de estas ORFs presentan homología con genes presentes en cepas de levaduras vínicas industriales. Algunas de estas diferencias genéticas pueden justificar el distinto comportamiento de dicha cepa en condiciones específicas y podrían también ser la base de nuevas potencialidades tecnológicas que recomiendan trabajo adicional para completar la caracterización genómica y funcional de esta cepa.

CONCLUSIONES

Las conclusiones generales que se obtuvieron en este trabajo se detallan a continuación:

1. Las especies de levaduras dominantes en las chichas ecuatorianas pertenecen a los géneros *Hanseniaspora* y *Candida* mientras que el número de aislados y cepas de las especies fermentadoras *Saccharomyces cerevisiae* y *Torulaspora delbrueckii* obtenidos en esta investigación fue relativamente bajo, lo que se atribuye a la fermentación espontánea controlada de la que fueron producto las bebidas originarias. La mayoría de las cepas ecuatorianas de la especie *S. cerevisiae* mostraron una mejor tolerancia a altas concentraciones de NaCl y un perfil de tolerancia a estrés que podría estar relacionado con la habilidad de estas cepas para fermentar sustratos con alta osmolaridad como son las chichas.
2. El aislado de la especie *Cryptococcus sp.* presentó una alta actividad amilasa y todas las cepas ecuatorianas de la especie *S. cerevisiae* mostraron una mayor actividad invertasa que las cepas control, así como una represión incompleta de la misma en condiciones de alta concentración de glucosa, característica de cepas aisladas de fermentaciones industriales. Todas las cepas ecuatorianas seleccionadas fueron capaces de crecer en medio melaza en condiciones de laboratorio y mostraron una capacidad fermentativa aceptable en medios ricos en glucosa y fructosa.
3. Dos de las cepas ecuatorianas seleccionadas, *S. cerevisiae* EYS5 y *T. delbrueckii* EGT1, mostraron una alta resistencia a la deshidratación que podría estar relacionada con su capacidad de mantener elevada la relación GSH:GSSG, así como de incrementar eficientemente su contenido en trehalosa y de sufrir un incremento moderado de su peroxidación lipídica. Además, la cepa EYS5 mostró ciertos rasgos de domesticación similares a los descritos en cepas de cerveza, como son el uso de maltotriosa y maltosa y un comportamiento negativo en la producción de compuestos fenólicos (POF -).
4. Las levaduras ecuatorianas seleccionadas de las especies *S. cerevisiae* y *T. delbrueckii*, así como las cepas industriales vínicas y cerveceras usadas en este estudio, fueron capaces de fermentar el sustrato modelo tipo chicha MCS desarrollado en esta investigación, sin embargo las chichas fermentadas con las cepas ecuatorianas presentaron una mayor concentración total de ésteres. Al menos en el caso de la cepa EYS5, esta

característica podría estar relacionada con la alteración detectada en el gen *ATF2*, codificante de una alcohol acetil transferasa.

5. La cepa EYS5 presenta un comportamiento deficiente en condiciones de propagación de biomasa que requieren la activación del metabolismo respiratorio, de manera que no fue capaz de consumir el etanol generado en la fase fermentativa de batch de la simulación del proceso de propagación industrial de biomasa, dando por tanto rendimientos muy bajos. Dicho proceso de producción ha de ser adaptado y optimizado.

6. La única cepa ecuatoriana capaz de fermentar el mosto de cerveza, *S. cerevisiae* EYS5, presenta en su genoma una mutación que trunca el factor de transcripción *MAL13*, que regula la inducción de genes de la familia *MAL* y que podría estar relacionada con la fermentación incompleta de este azúcar, mientras que la eficiente fermentación de la maltotriosa observada en esta cepa no se relaciona con la presencia de los genes *STA*, que codifican glucoamilasas. El genoma de la cepa EYS5 presenta 14 genes diferentes o con alteraciones, además de 21 genes que están presentes en esta cepa pero ausentes en la cepa de referencia *S. cerevisiae* S288c, varias de estas ORFs presentan homología con genes presentes en cepas de levaduras vínicas industriales, que podrían causar alguna de sus características fisiológicas de interés, por lo que se recomienda su caracterización funcional.

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Listado de tablas

Tabla I.1 Datos de consumo y producción de bebidas fermentadas en los cinco continentes en el año 2013.....	3
Tabla I.2 Bebidas tradicionales fermentadas más comunes elaboradas a partir de cereales.....	6
Tabla I.3 Microorganismos presentes en alimentos fermentados.....	9
Tabla I.4 Principales diferencias entre levaduras de los grupos ascomicetos y basidiomicetos.....	14
Tabla I.5 Métodos y técnicas para la identificación y diferenciación de levaduras y cepas.....	16
Tabla I.6 Distribución y funciones principales de las levaduras fermentativas dominantes en alimentos y bebidas fermentadas.....	18
Tabla I.7 Especies de levaduras no- <i>Saccharomyces</i> productoras de etanol.....	19
Tabla I.8 Disacáridos como sustratos para el crecimiento de levaduras.....	25
Tabla I.9 Ejemplos de levaduras de acuerdo a su estrategia de producción de energía.....	26
Tabla I.10 Ejemplos de especies de levaduras Crabtree positivas y negativas.....	28
Tabla I.11 Principales genes responsables de la respuesta a los principales tipos de estrés durante la fermentación alcohólica.....	37
Tabla M.1 Especies y cepas de levaduras usadas en este estudio.....	45
Tabla M.2 Cepas de levaduras aisladas en este trabajo, fuente de aislamiento y tiempo de fermentación del que proceden.....	45
Tabla M.3 Secuencias de oligonucleótidos utilizados en este trabajo.....	49
Tabla M.4 Fórmula básica de preparación de las cuatro chichas ecuatorianas usadas en este trabajo.....	51
Tabla R1.1 Perfil de fragmentos de restricción de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 con varias enzimas de restricción de aislados de levaduras de cuatro chichas ecuatorianas.....	75
Tabla R1.2 Especie, número de aislados y perfil de restricción de aislados de levaduras de cuatro chichas ecuatorianas identificadas por secuenciación de la región D1/D2 26S rDNA.....	76
Tabla R1.3 Crecimiento de especies de levaduras aisladas en chichas ecuatorianas bajo estrés por etanol, temperatura y osmótico.....	86
Tabla R1.4 Crecimiento de las cepas de las especies <i>Candida</i> sp., <i>S. cerevisiae</i> y <i>T. delbrueckii</i> bajo diferentes condiciones de estrés.....	89

Tabla R1.5 Diámetro del halo de hidrólisis (mm) de cada cepa en dos medios ricos en almidón.....	92
Tabla R1.6 Crecimiento en melaza (DO ₆₀₀) de cepas de levaduras seleccionadas <i>S. cerevisiae</i> y no- <i>Saccharomyces</i>	99
Tabla R1.7 Capacidad fermentativa final de biomasa fresca de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> , <i>T. delbrueckii</i> y <i>Candida sp</i>	103
Tabla R1.8 Tiempos de deshidratación (teórico y experimental) en cada cepa seleccionada para obtener un 10 % de humedad relativa.	107
Tabla R1.9 Porcentaje de viabilidad y capacidad fermentativa final de la biomasa deshidratada (HR ~ 10 %) de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> y <i>T. delbrueckii</i>	107
Tabla R1.10 Incremento en el nivel de trehalosa en células deshidratadas tomando como base los valores obtenidos en células frescas.	110
Tabla R1.11 Incremento en el nivel de peroxidación de lípidos en células deshidratadas tomando como base los valores obtenidos en células frescas.....	116
Tabla R1.12 Floculación y producción de compuestos fenólicos (POF) de las levaduras estudiadas.....	120
Tabla R1.13 Perfil general de utilización de azúcares de las levaduras estudiadas.	121
Tabla R1.14 Tiempo de latencia (λ) y velocidad máxima de crecimiento (μ) en medios con diferentes azúcares para las levaduras seleccionadas.	122
Tabla R1.15 Análisis de alineamientos y similitud para las secuencias obtenidas con los con los oligonucleótidos SD-5A y SD-6B.....	128
Tabla R2.1 Formulación original para la preparación de chicha de arroz en Ecuador.	135
Tabla R2.2 Parámetros de fermentación finales en chichas obtenidas a partir de cuatro formulaciones diferentes inoculadas con las cepas <i>S. cerevisiae</i> EYS5 y L2056	138
Tabla R2.3 Composición del sustrato modelo tipo chicha (MCS).	141
Tabla R2.4 Parámetros de fermentación de chichas inoculadas con las cepas seleccionadas luego de 14 días.	144
Tabla R2.5 Parámetros finales de fermentación de las chichas fermentadas con las cepas seleccionadas a escala de laboratorio (100 mL).	147
Tabla R2.6 Análisis de las chichas fermentadas por las cepas investigadas, los valores están expresados en g/L.	152
Tabla R2.7 Límites organolépticos de los compuestos que contribuyen al aroma relacionados con el metabolismo de levaduras presentes en cervezas y sabor que producen en la bebida final.....	153
Tabla R2.8 Concentración de acetaldehído, alcoholes superiores y ésteres en el sustrato modelo tipo chicha (MCS) fermentado con las cepas seleccionadas.....	154
Tabla R2.9 Parámetros de fermentación de las chichas preparadas con cultivos puros y mixtos de las cepas <i>S. cerevisiae</i> EYS5 y <i>T. delbrueckii</i> EGT1.....	160

Tabla R2.10 Composición del mosto de cerveza utilizado en esta investigación (<i>all-malt wort VTT</i>).....	161
Tabla R2.11 Parámetros finales de las cervezas fermentadas con las cepas seleccionadas en fermentaciones a escala de laboratorio (100 mL) a 12 °C y 20 °C.	163
Tabla R2.12 Concentración de acetaldehído, alcoholes superiores y ésteres en mosto de cerveza fermentado con las cepas seleccionadas.....	165
Tabla R2.13 Análisis de las cervezas después de ser fermentadas con las levaduras investigadas.....	171
Tabla R2.14 Concentraciones de acetaldehído, alcoholes superiores y ésteres en cervezas fermentadas con las cepas seleccionadas.....	172
Tabla R2.15 Parámetros de fermentación de las cervezas preparadas con cultivos puros y mixtos (coinoculación (EYS5:EGT1) e inoculación secuencial (EGT1 → EYS5)) de las cepas <i>S. cerevisiae</i> EYS5 y <i>T. delbrueckii</i> EGT1.	177
Tabla R2.16 Concentraciones de acetaldehído, alcoholes superiores y ésteres en cervezas fermentadas con cultivos puros y mixtos (coinoculación (EYS5:EGT1) e inoculación secuencial (EGT1 → EYS5)) de las cepas <i>S. cerevisiae</i> EYS5 y <i>T. delbrueckii</i> EGT1.	178
Tabla R2.17 Parámetros finales de crecimiento de la cepa <i>S. cerevisiae</i> EYS5 en las tres estrategias de cultivo analizadas: discontinuo (<i>batch</i>), con alimentación a las 24 horas (<i>fed-batch 24h</i>), con alimentación a las 48 h (<i>fed-batch 48h</i>).	182
Tabla R2.18 Resultados del ensamblaje de las lecturas con distintos k-mers.	185
Tabla R2.19 Número de contigs obtenidos en el ensamblaje inicial del genoma de la cepa ecuatoriana <i>S. cerevisiae</i> EYS5.....	186
Tabla R2.20 Genes diferentes a S288c con menos de 80% de identidad, o con alteraciones.	189
Tabla R2.21 Proteínas presentes en EYS5 y ausentes en S288c que suelen ser sucesos de transferencia génica horizontal.....	192

Listado de figuras

Figura I.1 Clasificación de las fermentaciones alimentarias.....	2
Figura I.2 Clasificación de las bebidas fermentadas.	4
Figura I.3 Proceso de elaboración ancestral de la chicha de Jora.	7
Figura I.4 Proceso básico de preparación de chichas en la actualidad.	8
Figura I.5 Especies del género <i>Saccharomyces</i> y principales híbridos claves en la industria.....	19
Figura I.6 Sublinajes de la domesticación de las levaduras industriales de la especie <i>S. cerevisiae</i> en función de sus características fenotípicas y genotípicas.....	21
Figura I.7 Modelo de la progresión hacia la domesticación microbiana.	23
Figura I.8 Destinos metabólicos del piruvato generado en la glucólisis en la respiración y en la fermentación alcohólica en <i>S. cerevisiae</i>	26
Figura I.9 Síntesis de compuestos aromáticos a partir del metabolismo de <i>S. cerevisiae</i>	30
Figura I.10 Diagrama de las distintas etapas de producción de ADY y los principales tipos de estrés relacionado con cada fase.....	33
Figura I.11 Respuesta a estrés durante el uso biotecnológico de levaduras en fermentaciones alcohólicas.....	34
Figura M.1 Recipientes de fermentación cilíndricos de acero inoxidable de 2 L donde se llevaron a cabo las fermentaciones a escala piloto (1.5 L).....	62
Figura R1.1 Fermentación controlada de cuatro chichas ecuatorianas: chicha de uva (A), chicha del Yamor (B), chicha de avena (C) y chicha de arroz (D) (día 3 de fermentación).	72
Figura R1.2 Abundancia relativa de los aislados de levaduras en los tres tiempos de muestreo (días 3, 7 y 14) en cuatro chichas diferentes (RC, GC, OC y YC).	73
Figura R1.3 Análisis de restricción de la región ITS-5.8S rDNA de varios aislados de levaduras a partir de chichas ecuatorianas obtenidos con tres enzimas de restricción: <i>CfoI</i> , <i>HaeIII</i> , <i>HinfI</i>	74
Figura R1.4 Abundancia relativa de especies de levaduras en los tres tiempos de muestreo (días 3, 7 y 14) en chicha de arroz (A), chicha del Yamor (B), chicha de avena (C) y chicha de uva (D).	78
Figura R1.5 Abundancia relativa de especies de levaduras en cuatro chichas diferentes (arroz, avena, uva y Yamor) identificadas por secuenciación de la región D1/D2 del gen que codifica el rDNA.....	80
Figura R1.6 Patrones electroforéticos obtenidos mediante el análisis de elementos delta de las diferentes cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas a partir de chichas ecuatorianas.	82

Figura R1.7 Árboles filogenéticos (Neighbour-joining) basados en (A) Secuencias de los fragmentos de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (aproximadamente 850 pb) (B) Secuencias de los fragmentos de la región D1/D2 26S rDNA (aproximadamente 600pb).	83
Figura R1.8 Perfil de restricción con la enzima <i>HinfI</i> del DNA mitocondrial de las cepas de <i>T. delbrueckii</i> aisladas a partir de chichas ecuatorianas.....	84
Figura R1.9 Árbol filogenético (Neighbour-joining) basados en las secuencias de los fragmentos de la región ITS1-5.8S rDNA-ITS2 (aproximadamente 850 pb).....	84
Figura R1.10 Ejemplo del crecimiento de varios aislados de levaduras de chichas ecuatorianas de diferentes especies en condiciones de estrés por etanol (10 %) y estrés por temperatura (37 °C).....	87
Figura R1.11 Crecimiento de algunas cepas de <i>S. cerevisiae</i> aisladas en chichas ecuatorianas (ERS1, ERS2 y ERS3) en medio YPD y varias condiciones de estrés (37 °C, H ₂ O ₂ 3.5M, NaCl 0.7 M).....	90
Figura R1.12 Imagen de la cepa de la especie <i>Criptomococcus</i> sp. (B) comparada con la cepa panadera de referencia <i>S. cerevisiae</i> Cinta Roja (A) en placas con medio AAM (0.5 % de almidón) teñida con vapores de yodo.....	93
Figura R1.13 Actividad invertasa de cepas de levaduras seleccionadas en condiciones de represión (2 % glucosa) y desrepresión (0.05 % glucosa). Las cepas usadas como control fueron <i>S. cerevisiae</i> L2056 y BY4742, y <i>T. delbrueckii</i> D291.	95
Figura R1.14 Crecimiento en melaza (UFC/mL) de cepas de levaduras seleccionadas <i>S. cerevisiae</i> (A) y no- <i>Saccharomyces</i> (B). Se usó como cepas control <i>S. cerevisiae</i> L0256 y <i>T. delbrueckii</i> D291.	98
Figura R1.15 Capacidad fermentativa (mL CO ₂ /10 ⁷ células) en medio YPGF a partir de biomasa fresca (A) Cepas del género <i>Saccharomyces</i> (B) Cepas no- <i>Saccharomyces</i>	102
Figura R1.16 Viabilidad de las cepas de levaduras seleccionadas, después de diferentes tiempos de deshidratación (30, 45 y 60 min) en un deshidratador de lecho fluidizado.....	105
Figura R1.17 Cinética de deshidratación de las levaduras seleccionadas en un deshidratador de lecho fluidizado.	106
Figura R1.18 Niveles de trehalosa en las células frescas y deshidratadas.....	109
Figura R1.19 Niveles de glutatión total en células frescas (A) y en células deshidratadas (B).....	112
Figura R1.20 Niveles de glutatión oxidado (GSSG) en células frescas y deshidratadas.	113
Figura R1.21 Relación GSH/GSSG en células frescas y deshidratadas.	114
Figura R1.22 Niveles de peroxidación de lípidos en células frescas y deshidratadas.	115

Figura R1.23 Imágenes microscópicas (Nikon eclipse 90i) de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> estudiadas tras 24 h de crecimiento en medio YPD.....	118
Figura R1.24 Imágenes de las colonias de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> estudiadas tras 6 días de crecimiento en medio YPD a 30°C.....	119
Figura R1.25 Crecimiento de levaduras a baja temperatura (12 °C) en medio YP suplementado con A) glucosa o B) maltosa (2 % w/v) como única fuente de carbono.	125
Figura R1.26 Masa seca final después de 6 días de crecimiento en los medios YPD y YPM a 12°C.....	126
Figura R1.27 Amplificación del gen <i>STA1</i> en varias cepas ecuatorianas de la especie <i>S. cerevisiae</i> (ERS1, ERS2, ERS3, EYS4, EYS5, EYS6), <i>Candida</i> sp. (EOC1, EOC2), <i>T. delbrueckii</i> (EGT1) además de las cepas <i>S. cerevisiae</i> Cinta Roja, L2056 (control negativo) y A-81062 (control positivo).....	127
Figura R2.1 Cinética del consumo de azúcares reductores de las cepas <i>S. cerevisiae</i> EYS5 y L2056 en distintas formulaciones y estrategias de esterilización del MSC.	136
Figura R2.2 Cinética del consumo de azúcares reductores de la cepa <i>S. cerevisiae</i> EYS5 en distintas formulaciones y estrategias de esterilización de un sustrato similar al usado en la elaboración de chicha de Jora.	139
Figura R2.3 Gráficas de cambios de parámetros de fermentación en un sustrato similar al usado en la fermentación de chicha de Jora (A) Concentraciones de etanol g/L, (B) pH, (C) viabilidad (log UFC/mL).....	140
Figura R2.4 Cinética de consumo de azúcares en fermentaciones a escala de laboratorio (30 mL) en MCS durante 14 días.....	143
Figura R2.5 Pérdida de masa durante la fermentación a escala de laboratorio (100 mL), en sustrato modelo tipo chicha (MCS) (13 – 14 °P) en dos temperaturas diferentes (A) 12 °C y (B) 20 °C.	146
Figura R2.6 Disminución del extracto aparente para todas las cepas investigadas durante la fermentación (20 °C) en 1.5 L MCS (13 – 14 °P).	150
Figura R2.7 Atenuación final aparente del sustrato modelo tipo Chicha (MCS) fermentado con las cepas seleccionadas y sus controles.....	151
Figura R2.8 Concentraciones totales de alcoholes superiores y ésteres presentes en las chichas fermentadas con las cepas seleccionadas y sus respectivos controles....	156
Figura R2.9 Pérdida de masa durante la fermentación en MCS (13 – 14 °P) con las cepas EYS5, EGT1 y cultivos mixtos por inoculación secuencial (EGT1 → EYS5) y coinoculación (EYS5:EGT1).	159
Figura R2.10 Pérdida de peso durante la fermentación en mosto de cerveza (15 °P) a dos temperaturas 12 °C y 20 °C.....	162

Figura R2.11 Concentraciones totales de alcoholes superiores (HA) y ésteres presentes en las cervezas fermentadas con las cepas seleccionadas y sus respectivos controles.	167
Figura R2.12 Disminución del extracto real para todas las cepas investigadas durante las fermentaciones a escala 1.5 L en mosto de cerveza (15 °P, 20 °C).	168
Figura R2.13 Atenuación aparente y real de los mostos de cerveza fermentados con las cepas seleccionadas.	170
Figura R2.14 Concentraciones totales de alcoholes superiores (HA) y ésteres presentes en las chichas fermentadas con las cepas seleccionadas y sus respectivos controles.	174
Figura R2.15 Pérdida de masa durante la fermentación en mosto de cerveza (15 °P – 20 °C) con las cepas EYS5, EGT1 y cultivos mixtos por inoculación secuencial (EGT1 → EYS5) y coinoculación (EYS5:EGT1).....	176
Figura R2.16 Concentraciones totales de alcoholes superiores y ésteres en cervezas fermentadas con cultivos puros y mixtos (coinoculación (EYS5:EGT1) e inoculación secuencial (EGT1 → EYS5)) de las cepas <i>S. cerevisiae</i> EYS5 y <i>T. delbrueckii</i> EGT1.	179
Figura R2.17 Crecimiento de la cepa EYS5 durante la simulación del proceso de producción de biomasa en medio melaza a 30 °C en las tres estrategias de cultivo analizadas: discontinuo (batch), con alimentación a las 24 horas (fed-batch 24h), con alimentación a las 48 h (fed-batch 48h).	181
Figura R2.18 Cinéticas de consumo de sacarosa de la cepa <i>S. cerevisiae</i> EYS5 en condiciones de producción de biomasa en la fase batch.....	182
Figura R2.19 Producción y consumo de etanol observados durante la simulación del proceso de producción de biomasa en medio melaza a 30 °C en las tres estrategias de cultivo analizadas: discontinuo (batch), con alimentación a las 24 horas (fed-batch 24h), con alimentación a las 48 h (fed-batch 48h).....	183
Figura R2.20 Contenido GC (%) de los contigs finales del genoma de la cepa ecuatoriana <i>S. cerevisiae</i> EYS5.....	187
Figura R2.21 Alineamiento entre las secuencias de nucleótidos (A) y de aminoácidos (B) de los genes PBP1 y ATF2 de la cepa <i>S. cerevisiae</i> S288c y su secuencia homóloga codificada por el gen EYS5_2529 en la cepa ecuatoriana EYS5 alrededor de la región de fusión entre ambas ORF.	189
Figura R2.22 Alineamiento entre la secuencia del factor de transcripción codificado por el gen <i>MAL13</i> de la cepa <i>S. cerevisiae</i> S288c y su secuencia homóloga codificada por el gen EYS5_2529 en la cepa ecuatoriana EYS5.	190

BIBLIOGRAFÍA

- Adam, A.C., Latorre-García, L., Polaina, J., 2004. Structural analysis of glucoamylase encoded by the STA1 gene of *Saccharomyces cerevisiae* (var. *diastaticus*). *Yeast* 21, 379-388.
- Aidoo, K.E., Nout, M.J.R., 2010. Functional yeast and molds in fermented foods and beverages, en: Tamang, J.P., Kailasapathy, K. (Eds.), *Fermented foods and beverages of the world*. Taylor & Francis, pp. 127-148.
- Albertin, W., Chasseriaud, L., Comte, G., Panfili, A., Delcamp, A., Salin, F., Marullo, P., Bely, M., 2014. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. *PLoS One* 9(4): e94246.
- Alves-Araújo, C., Pacheco, A., Almeida, M.J., Spencer-Martins, I., Leão, C., Sousa, M.J., 2007. Sugar utilization patterns and respiro-fermentative metabolism in the baker's yeast *Torulaspora delbrueckii*. *Microbiology* 153, 898-904.
- Alves, S.L., Herberts, R.A., Hollatz, C., Miletti, L.C., Stambuk, B.U., 2007. Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 65, 99-104.
- Alves, S.L., Herberts, R.A., Hollatz, C., Trichez, D., Miletti, L.C., De Araujo, P.S., Stambuk, B.U., 2008. Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the AGT1 permease. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 1494-1501.
- Anagnostopoulos, D.A., Tsaltas, D., 2019. Fermented foods and beverages, en: Galanakis, C. (Ed.), *Innovations in Traditional Foods*. Elsevier Inc, pp. 257-291.
- Aranda, A., Matallana, E., del Olmo, M., 2011. *Saccharomyces* yeasts I: primary fermentation, en: Carrascosa, A., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Elsevier, pp. 1-31.
- Aranda, J.S., Salgado, E., Taillandier, P., 2004. Trehalose accumulation en *Saccharomyces cerevisiae* cells: Experimental data and structured modeling. *Biochem. Eng. J.* 17, 129-140.
- 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, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 111, 1749-1766.
- Arroyo, A., Bencomo, M., Bianco, H., 2011. Perfil microbiológico de la chicha de venta ambulante en Barquisimeto, Estado Lara, Venezuela. *Salud Arte y Cuidado.* 4, 13-24.
- Auesukaree, C., 2017. Molecular mechanisms of the yeast adaptive response and tolerance to stresses encountered during ethanol fermentation. *J. Biosci. Bioeng.* 124, 133-142.
- Barbosa, E.A., Souza, M.T., Diniz, R.H.S., Godoy-Santos, F., Faria-Oliveira, F., Correa, L.F.M., Alvarez, F., Coutrim, M.X., Afonso, R.J.C.F., Castro, I.M., Brandão, R.L., 2016.

- Quality improvement and geographical indication of cachaça (Brazilian spirit) by using locally selected yeast strains. *J. Appl. Microbiol.* 121, 1038-1051.
- Barbosa, R., Pontes, A., Santos, R.O., Montandon, G.G., Ponzzes-Gomes, C.M. de, Morais, P.B., Gonçalves, P., Rosa, C.A., Sampaio, J.P., 2018. Multiple rounds of artificial selection promote microbe secondary domestication-The case of Cachaça yeast. *Genome Biol. Evol.* 10, 1939–1955.
- Basso, R.F., Alcarde, A.R., Portugal, C.B., 2016. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Res. Int.* 86, 112-120.
- Bauer, F.F., Pretorius, I.S., 2000. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine—a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 27 – 51.
- Bekatorou, A., Psarianos, C., Koutinas, A.A., 2006. Production of food grade yeasts. *Food Technol. Biotechnol.* 44, 407-415.
- Bell, P.J.L., Higgins, V.J., Attfield, P. V., 2001. Comparison of fermentative capacities of industrial baking and wild-type yeasts of the species *Saccharomyces cerevisiae* in different sugar media. *Lett. Appl. Microbiol.* 32, 224-229.
- Bellut, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., Jacob, F., De Schutter, D.P., Daenen, L., Lynch, K.M., Zannini, E., Arendt, E.K., 2018. Application of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from kombucha in the production of alcohol-free beer. *Fermentation* 4, 1-19.
- Bely, M., Stoeckle, P., Masneuf-Pomarède, I., Dubourdieu, D., 2008. Impact of mixed *Torulaspora delbrueckii*-*Saccharomyces cerevisiae* culture on high-sugar fermentation. *Int. J. Food Microbiol.* 122, 312-320.
- Benito, S., 2018. The impact of *Torulaspora delbrueckii* yeast in winemaking. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 102, 3081-3094.
- Blanco, C.A., Andrés-Iglesias, C., Montero, O., 2016. Low-alcohol beers: Flavor compounds, defects, and improvement strategies. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 56, 1379-1388.
- Blandino, A., Al-Aseeri, M.E., Pandiella, S.S., Cantero, D., Webb, C., 2003. Cereal-based fermented foods and beverages. *Food Res. Int.* 36, 527-543.
- Borneman, A.R., Desany, B.A., Riches, D., Affourtit, J.P., Forgan, A.H., Pretorius, I.S., Egholm, M., Chambers, P.J., 2012. The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins. *FEMS Yeast Res.* 12, 88-96.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., Frisvad, J.C., Gerds, M.L., Hammes, W.P., Harnett, J., Huys, G., Laulund, S., Ouwehand, A., Powell, I.B., Prajapati, J.B., Seto, Y., Ter Schure, E., Van Boven, A., Vankerckhoven, V., Zgoda, A., Tuijtelaars, S., Hansen, E.B., 2012. Food fermentations: Microorganisms with technological beneficial use. *Int. J. Food Microbiol.* 154, 87-97.
- Bozdog, G.O., Greig, D., 2014. The genetics of a putative social trait in natural populations

- of yeast. *Mol. Ecol.* 23, 5061-5071.
- Brandt, M.J., 2014. Starter cultures for cereal based foods. *Food Microbiol.* 37, 41-43.
- Buege, J.A., Aust, S.D., 1978. Microsomal lipid peroxidation, en: Fleischer, S., Packer, L. (Eds.), *Methods in Enzymology*. Elsevier, pp. 302-310. h
- Buratti, S., Benedetti, S., 2016. Alcoholic fermentation using electronic nose and electronic tongue, en: Rodríguez-Méndez, M.L. (Ed.), *Electronic Noses and Tongues in Food Science*. Elsevier Inc., pp. 291-299.
- Câmara, A. de A., Maréchal, P.A., Tourdou-Maréchal, R., Husson, F., 2019. Dehydration stress responses of yeasts *Torulaspora delbrueckii*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Lachancea thermotolerans*: Effects of glutathione and trehalose biosynthesis. *Food Microbiol.* 79, 137-146.
- 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 Microbiol.* 56, 45-51.
- Canonico, L., Comitini, F., Ciani, M., 2015. TdPIR minisatellite fingerprinting as a useful new tool for *Torulaspora delbrueckii* molecular typing. *Int. J. Food Microbiol.* 200, 47-51.
- Caplice, E., Fitzgerald, G.F., 1999. Food fermentations: Role of microorganisms in food production and preservation. *Int. J. Food Microbiol.* 50, 131-149.
- Carballo Marrero, S., Martínez-Rodríguez, A., Maestre Pérez, S., Prats Moya, S., 2019. New trends and applications in fermented beverages, en: Grumezescu, A.M., Holban, A.M. (Eds.), *Fermented Beverages*. Elsevier Inc., pp. 31-66.
- Carrau, F., Gaggero, C., Aguilar, P.S., 2015. Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends Biotechnol.* 33, 148-154.
- Carvajal, J., 2012. *Arqueología microbiana*. *Nuestra Ciencia* 14, 3-7.
- Carvajal, J., Barahona, P., Tufiño, C., Bastidas, B., Guamán-Burneo, C., Freitas, L., Rosa, C., 2014. An overview of the yeast biodiversity in the Galápagos Islands and other Ecuadorian Regions, en: Grillo, O. (Ed.), *Biodiversity - The Dynamic Balance of the Planet*. Intech. pp 193 - 232.
- Chand Bhalla, T., Bansuli, Thakur, Neerja, Savitri, Thakur, Navdeep, 2017. Invertase of *Saccharomyces cerevisiae* SAA-612: Production, characterization and application in synthesis of fructo-oligosaccharides. *LWT - Food Sci. Technol.* 77, 178-185.
- Chang, C.F., Lin, Y.C., Chen, S.F., Carvaja Barriga, E.J., Barahona, P.P., James, S.A., Bond, C.J., Roberts, I.N., Lee, C.F., 2012. *Candida theae* sp. nov., a new anamorphic beverage-associated member of the *Lodderomyces* clade. *Int. J. Food Microbiol.* 153, 10-14.
- Chaves-López, C., Serio, A., Grande-Tovar, C.D., Cuervo-Mulet, R., Delgado-Ospina, J., Paparella, A., 2014. Traditional fermented foods and beverages from a

- microbiological and nutritional perspective: The colombian heritage. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 13, 1031-1048.
- Chi, Z., Arneborg, N., 1999. Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 86, 1047-1052.
- Chia, J.M., Kolatkar, P.R., 2004. Implications for domain fusion protein-protein interactions based on structural information. *BMC Bioinformatics* 5:161.
- Choudhary, J., Singh, S., Nain, L., 2017. Bioprospecting thermotolerant ethanologenic yeasts for simultaneous saccharification and fermentation from diverse environments. *J. Biosci. Bioeng.* 123, 342-346.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., 2013. Fermentation, in: Fath, B. (Ed.), *Encyclopedia of Ecology*. Elsevier Inc., pp. 310–321.
- Colehour, A.M., Meadow, J.F., Liebert, M.A., Cepon-Robins, T.J., Gildner, T.E., Urlacher, S.S., Bohannan, B.J.M., Snodgrass, J.J., Sugiyama, L.S., 2014. Local domestication of lactic acid bacteria via cassava beer fermentation. *PeerJ* 2, e479.
- Compagno, C., Dashko, S., Piskur, J., 2014. Introduction to carbon metabolism in yeast, en: Piskur, J., Compagno, C. (Eds.), *Molecular Mechanisms in Yeast Carbon Metabolism*. Springer, pp. 1-19.
- Cox, L.J., Caicedo, B., Vanos, V., Heck, E., Hofstaetter, S., Cordier, J.L., 1987. A catalogue of some ecuadorean fermented beverages, with notes on their microflora. *J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 3, 143-153.
- Crowley, W.K., 2000. Chile's wine industry: Historical character and changing geography. *Conf. Lat. Am. Geogr.* 26, 87-101.
- 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, 1-16.
- Dakal, T.C., Solieri, L., Giudici, P., 2014. Adaptive response and tolerance to sugar and salt stress in the food yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Int. J. Food Microbiol.* 185, 140-157.
- Pietrowski, G. A. M., Dos Santos, C.M.E., Sauer, E., Wosiacki, G., Nogueira, A., 2012. Influence of fermentation with *Hanseniaspora* sp. yeast on the volatile profile of fermented apple. *J. Agric. Food Chem.* 60, 9815-9821.
- De Filippis, F., Parente, E., Ercolini, D., 2017. Metagenomics insights into food fermentations. *Microb. Biotechnol.* 10, 91-102.
- De Smidt, O., Du Preez, J.C., Albertyn, J., 2008. The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: A comprehensive review. *FEMS Yeast Res.* 8, 967-978.
- Del Castillo-Agudo, L., Nieto-Soria, A., Sentandreu, R., 1992. Differential expression of the invertase-encoding SUC genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* 120, 59-65.

- Di Gianvito, P., Arfelli, G., Suzzi, G., Tofalo, R., 2019. New Trends in Sparkling Wine Production: Yeast Rational Selection, in: Grumezescu, A., Holban, A. (Eds.), *Alcoholic Beverages*. Elsevier Inc., pp. 347–386.
- Dietrich, F.S., Mulligan, J., Hennessy, M., Yelton, M., Allen, E., Araujo, R., Aviles, E., Berno, A., Brennan, T., Carperter, J., Chen, E., Cherry, J.M., Chung, E., Duncan, M., Guzman, E., Hartzell, G., Hunicke-Smith, S., Hyman, R., Kayser, A., Komp, C., Lashkari, D., Lew, H., Lin, D., Mosedale, D., Nakahara, K., Namath, A., Norgren, R., Oefner, P., Oh, C., Petel, F.X., Roberts, D., Sehl, P., Schramm, S., Shogren, T., Smith, V., Taylo, P., Wei, Y., Botstein, D., Davis, R.W., 1997. The nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome V. *Nature* 387, 78-81.
- Douglass, A.P., O'Brien, C.E., Offei, B., Coughlan, A.Y., Ortiz-Merino, R.A., Butler, G., Byrne, K.P., Wolfe, K.H., 2019. Coverage-versus-length plots, a simple quality control step for de novo yeast genome sequence assemblies. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 9, 879-887.
- Dueñas-Sánchez, R., Gutiérrez, G., Rincón, A.M., Codón, A.C., Benítez, T., 2012. Transcriptional regulation of fermentative and respiratory metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* industrial bakers' strains. *FEMS Yeast Res.* 12, 625-636.
- Dussap, C.-G., Poughon, L., 2017. Microbiology of alcoholic fermentation, en: Pandey, A., Sanromán, M.Á., Du, G., Soccol, C.R., Dussap, Claude-Gilles (Eds.), *Current developments in biotechnology and bioengineering: food and beverages industry*. Elsevier, Amsterdam, pp. 263-279.
- Dwivedi, G.R., Sisodia, B.S., Shikha, 2018. Secondary metabolites : Metabolomics for secondary metabolites, en: Gupta, V.K., Pandey, A. (Eds.), *New and Future Developments in Microbial Biotechnology and Bioengineering*. Elsevier B.V., pp. 333-344.
- Eldarov, M.A., Beletsky, A. V., Tanashchuk, T.N., Kishkovskaya, S.A., Ravin, N. V., Mardanov, A. V., 2018. Whole-genome analysis of three yeast strains used for production of sherry-like wines revealed genetic traits specific to flor yeasts. *Front. Microbiol.* 9 : 965
- Elizaquível, P., Pérez-Cataluña, A., Yépez, A., Aristimuño, C., Jiménez, E., Cocconcelli, P.S., Vignolo, G., Aznar, R., 2015. Pyrosequencing vs. culture-dependent approaches to analyze lactic acid bacteria associated to chicha, a traditional maize-based fermented beverage from Northwestern Argentina. *Int. J. Food Microbiol.* 198, 9-18.
- Espindola, A.D.S., Gomes, D.S., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2003. The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiology* 47, 236-241.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A., 1999. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 49, 329-337.
- Etschmann, M., Bluemke, W., Sell, D., Schrader, J., 2002. Biotechnological production of

- 2-phenylethanol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 59, 1–8.
- Fabrizio, P., Longo, V.D., 2003. The chronological life span of *Saccharomyces cerevisiae*. *Aging Cell* 2, 73-81.
- Faria-Oliveira, F., Diniz, R.H.S., Godoy-Santos, F., Piló, F.B., Mezdari, H., Castro, I.M., Brandão, R.L., 2015. The role of yeast and lactic acid bacteria in the production of fermented beverages in South America, en: Eissa, A. (Ed.), *Food Production and Industry*. InTechOpen, London, UK, pp. 107-135.
- Farooq, A., Greetham, D., Somani, A., Marvin, M., Louis, E., Du, C., 2018. Identification of ethanologenic yeast strains from wild habitats. *J. Appl. Microbiol. Biochem.* Vol 2, No. 3:9.
- Feldmann, H., 2012. Yeast metabolism, en: Feldmann, H. (Ed.), *Yeast: Molecular and Cell Biology*. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, pp. 25-58.
- Fellows, P.J., 2017. Dehydration, en: *Food Processing Technology*. Elsevier, pp. 661-716.
- Fernández-Espinar, M.T., Llopis, S., Querol, A., Barrio, E., 2011. Molecular identification and characterization of wine yeasts, en: Carrascosa, A., Muñoz, R., González, R. (Eds.), *Molecular Wine Microbiology*. Elsevier Inc., pp. 111-141.
- Figueiredo, B.I.C., Saraiva, M.A.F., Pimenta, P.P. de S., Testasica, M.C. de S., Sampaio, G.M.S., da Cunha, A.C., Afonso, L.C.C., de Queiroz, M.V., Castro, I. de M., Brandão, R.L., 2017. New lager brewery strains obtained by crossing techniques using cachaça (Brazilian spirit) yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 83 (20) e01582-17.
- Fleet, G.H., 2007. Yeasts in foods and beverages: Impact on product quality and safety. *Curr. Opin. Biotechnol.* 18, 170-175.
- Flores, C.-L., Rodríguez, C., Petit, T., Gancedo, C., 2000. Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional. *FEMS Microbiol. Rev.* 24, 507-529.
- Flores, J.A., Gschaedler, A., Amaya-Delgado, L., Herrera-López, E.J., Arellano, M., Arrizon, J., 2013. Simultaneous saccharification and fermentation of *Agave tequilana fructans* by *Kluyveromyces marxianus* yeasts for bioethanol and tequila production. *Bioresour. Technol.* 146, 267–273.
- Folch-Mallol, J., Garay-Arroyo, A., Lledías, F., Covarrubias Robles, A.A., 2004. La respuesta a estrés en la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. *Rev. Latinoam. Microbiol.* 46, 24-46.
- França, M.B., Panek, A.D., Eleutherio, E.C.A., 2007. Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp. Biochem. Physiol. - A Mol. Integr. Physiol.* 146, 621-631.
- Freire, A.L., Ramos, C.L., da Costa Souza, P.N., Cardoso, M.G.B., Schwan, R.F., 2017. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 248, 39-46.
- Freire, A.L., Zapata, S., Mosquera, J., Mejia, M.L., Trueba, G., 2016. Bacteria associated with human saliva are major microbial components of Ecuadorian indigenous beers

- (*chicha*). PeerJ 4, e1962.
- Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J.L., Maere, S., Verstrepen, K.J., Steensels, J., 2018. Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. Curr. Opin. Biotechnol. 49, 148-155.
- 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, 1397-1410.
- Gamero-Sandemetrio, E., Gómez-Pastor, R., Aranda, A., Matallana, E., 2019. Validation and biochemical characterisation of beneficial argan oil treatment in biomass propagation for industrial active dry yeast production. Innov. Food Sci. Emerg. Technol. 51, 156-166.
- Gamero-Sandemetrio, E., Gómez-Pastor, R., Matallana, E., 2014. Antioxidant defense parameters as predictive biomarkers for fermentative capacity of active dried wine yeast. Biotechnol. J. 9, 1055-1064.
- Gamero-Sandemetrio, E., Gómez-Pastor, R., Matallana, E., 2013. Zymogram profiling of superoxide dismutase and catalase activities allows *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* species differentiation and correlates to their fermentation performance. Appl. Microbiol. Biotechnol. 97, 4563-4576.
- Gamero-Sandemetrio, E., Payá-Tormo, L., Gómez-Pastor, R., Aranda, A., Matallana, E., 2018. Non-canonical regulation of glutathione and trehalose biosynthesis characterizes non-*Saccharomyces* wine yeasts with poor performance in active dry yeast production. Microb. Cell 5, 184-197.
- Gamero-Sandemetrio, E., Torrellas, M., Rábena, M.T., Gómez-Pastor, R., Aranda, A., Matallana, E., 2015. Food-grade argan oil supplementation in molasses enhances fermentative performance and antioxidant defenses of active dry wine yeast. AMB Express 5 (1): 75.
- García, M.J., Ríos, G., Ali, R., Bellés, J.M., Serrano, R., 1997. Comparative physiology of salt tolerance in *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiology 143, 1125-1131.
- Garre, E., Raginel, F., Palacios, A., Julien, A., Matallana, E., 2010. Oxidative stress responses and lipid peroxidation damage are induced during dehydration in the production of dry active wine yeasts. Int. J. Food Microbiol. 136, 295-303.
- Gasch, A.P., 2003. The environmental stress response: a common yeast response to diverse environmental stresses, en: Hohmann, S., Mager, W. (Eds.), Yeast Stress Responses. Springer, pp. 11-70.
- Gibbons, J.G., Rinker, D.C., 2015. The genomics of microbial domestication in the fermented food environment. Curr. Opin. Genet. Dev. 35, 1-8.

- 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 Res.* 17(4), fox038.
- Gibson, B., Lawrence, S.J., Leclaire, J.P.R., Powell, C.D., Smart, K.A., 2007. Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. *FEMS Microbiol. Rev.* 31, 535-569.
- Gibson, B., 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.
- Gomes, F.C.O., Lacerda, I.C.A., Libkind, D., Lopes, C.A., Carvajal, J., Rosa, C.A., 2009. Traditional foods and beverages from South America: Microbial communities and production strategies, en: Krause, J., Fleischer, O. (Eds.), *Industrial Fermentation (Food Science and Technology)*. Nova Science. pp 79 - 114.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Cabisco, E., Matallana, E., 2010. Transcriptomic and proteomic insights of the wine yeast biomass propagation process. *FEMS Yeast Res.* 10, 870-884.
- Gómez-Pastor, R., Pérez-Torrado, R., Garre, E., Matallana, 2011. Recent advances in yeast biomass production, en: Matovic, D. (Ed.), *Biomass - Detection, Production and Usage*. InTechOpen, pp. 201-222.
- Gonçalves, F.A.G., Colen, G., Takahashi, J.A., 2014. *Yarrowia lipolytica* and its multiple applications in the biotechnological industry. *Sci. World J.* 14. Article ID 476207.
- 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. *Curr. Biol.* 26, 2750-2761.
- Gordon, J.L., Armisén, D., Proux-Wéra, E., O'Éigeartaigh, S.S., Byrne, K.P., Wolfe, K.H., 2011. Evolutionary erosion of yeast sex chromosomes by mating-type switching accidents. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 108, 20024-20029.
- Grijalva-Vallejos, N., Aranda, A., Matallana, A. 2019. Evaluation of yeasts from Ecuadorian chicha by their performance as starters for alcoholic fermentations in the food industry. *Int. J. Food Microbiol* (en revisión)
- Granek, J.A., Magwene, P.M., 2010. Environmental and genetic determinants of colony morphology in yeast. *PLoS Genet.* 6, e1000823.
- Griffith, O.W., 1980. Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal. Biochem.* 106, 207-212.
- Gschaedler, A., 2017. Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. *Curr. Opin. Food Sci.* 13, 73-77.
- Hackbarth, J.J., 2011. The effect of ethanol-sucrose interactions on specific gravity. Part 2: A new algorithm for estimating specific gravity. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 69, 39-43.

- Hagman, A., Piškur, J., 2015. A study on the fundamental mechanism and the evolutionary driving forces behind aerobic fermentation in yeast. *PLoS One* 10(1):e0116942.
- Harkness, T., Arnason, T., 2014. A Simplified Method for Measuring Secreted Invertase Activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Pharmacol.* 3: 151.
- Hayashida, F.M., 2008. Ancient beer and modern brewers: Ethnoarchaeological observations of chicha production in two regions of the north coast of Peru. *J. Anthropol. Archaeol.* 27, 161-174.
- He, Y., Dong, J., Yin, H., Zhao, Y., Chen, R., Wan, X., Chen, P., Hou, X., Liu, J., Chen, L., 2014. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer - A review. *J. Inst. Brew.* 120, 157-163.
- Hernández-López, M.J., Pallotti, C., Andreu, P., Aguilera, J., Prieto, J.A., Randez-Gil, F., 2007. Characterization of a *Torulaspora delbrueckii* diploid strain with optimized performance in sweet and frozen sweet dough. *Int. J. Food Microbiol.* 116, 103-110.
- Hierro, N., González, Á., Mas, A., Guillamón, J.M., 2004. New PCR-based methods for yeast identification. *J. Appl. Microbiol.* 97, 792-801.
- Hittinger, C.T., 2013. *Saccharomyces* diversity and evolution: A budding model genus. *Trends Genet.* 29, 309-317.
- Hittinger, C.T., Steele, J.L., Ryder, D.S., 2018. Diverse yeasts for diverse fermented beverages and foods. *Curr. Opin. Biotechnol.* 49, 199-206.
- Hofstede, R., Lips, J., Jongsma, W., 1998. Geografía, ecología y forestación de la Sierra alta del Ecuador. Abya-Yala, Quito, Ecuador.
- Hohmann, S., Mager, W., 2003. *Yeast Stress Responses*. Springer.
- Holzappel, W.H., 2002. Appropriate starter culture technologies for small-scale fermentation in developing countries. *Int. J. Food Microbiol.* 75, 197-212.
- Hostinová, E., Gašperík, J., 2010. Yeast glucoamylases: Molecular-genetic and structural characterization. *Biologia (Bratisl)*. 65, 559-568.
- Howell, K., 2015. Spoilage: Yeast Spoilage of Food and Beverages, in: Caballero, B., Finglas, P., Toldrá, F. (Eds.), *Encyclopedia of Food and Health*. Elsevier Ltd., pp. 113–117.
- Huber, S., Leonardi, A., Dedon, P., Begley, T., 2019. The versatile roles of the tRNA epitranscriptome during cellular responses to toxic exposures and environmental stress. *Toxics* 7, 17.
- Hui, Y.H., Evranuz, Ö., 2012. *Handbook of plant-based fermented food and beverage technology*, 2.^a ed. CRC Press. pp 677-686
- Hutzler, M., Koob, J., Riedl, R., Schneiderbanger, H., Mueller-Auffermann, K., Jacob, F., 2015. Yeast identification and characterization, en: Hill, A. (Ed.), *Brewing Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 65-104.

- Ivorra, C., Pérez-Ortín, J., del Olmo, M. I., 1999. An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. *Biotechnol. Bioeng.* 64, 698-708.
- Jaffé, W.R., 2015. Nutritional and functional components of non centrifugal cane sugar: A compilation of the data from the analytical literature. *J. Food Compos. Anal.* 43, 194-202.
- Jenkins, D., Powel, C.D., Smart, K.A., 2010. Dried Yeast: Impact of dehydration and rehydration on brewing yeast DNA integrity. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 68, 132-138.
- Jennings, J., 2005. La chichera y el patrón: Chicha and the energetics of feasting in the prehistoric Andes. *Archaeological Pap. Am. Anthropol. Assoc.* 14, 241-259.
- Johnson, E.A., 2013. Biotechnology of non-*Saccharomyces* yeasts-the basidiomycetes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 97, 7563-7577.
- Jouhten, P., Boruta, T., Andrejev, S., Pereira, F., Rocha, I., Patil, K.R., 2016. Yeast metabolic chassis designs for diverse biotechnological products. *Sci. Rep.* 6, 29694
- Kieliszek, M., Kot, A.M., Bzducha-Wróbel, A., Błażejczak, S., Gientka, I., Kurcz, A., 2017. Biotechnological use of *Candida* yeasts in the food industry: A review. *Fungal Biol. Rev.* 31, 185-198.
- Krause, D.J., Kominek, J., Oplente, D.A., Shen, X., Zhou, X., Langdon, Q., DeVirgilio, J., Hulfachor, A., Kurtzman, C.P., Rokas, A., Hittinger, C.T., 2018. Functional and evolutionary characterization of a secondary metabolite gene cluster in budding yeasts 115, 11030-11035.
- Krogerus, K., Holmström, S., Gibson, B., 2018. Enhanced wort fermentation with de novo lager hybrids adapted to high-ethanol environments. *Appl. Environ. Microbiol.* 84 (4) e02302-17.
- Krogerus, K., Magalhães, F., Kuivanen, J., Gibson, B., 2019. A deletion in the STA1 promoter determines maltotriose and starch utilization in STA1+ *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 103, 7597-7615.
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., Gibson, B., 2015. New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 769-778.
- Kulshrestha, S., Tyagi, P., Sindhi, V., Yadavilli, K.S., 2013. Invertase and its applications – A brief review. *J. Pharm. Res.* 7, 792-797.
- Kurtzman, C.P., Fell, J.W., Boekhout, T., 2011. *The Yeasts: A Taxonomic Study*, 5th Edition, Volume 2.
- Kurtzman, C.P., Robnett, C.J., 1998. Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 73, 331-371.
- Kuthan, M., Devaux, F., Janderová, B., Slaninová, I., Jacq, C., Palková, Z., 2003. Domestication of wild *Saccharomyces cerevisiae* is accompanied by changes in gene expression and colony morphology. *Molecular Microbiol.* 47, 745-754.

- Kvitek, D.J., Will, J.L., Gasch, A.P., 2008. Variations in stress sensitivity and genomic expression in diverse *S. cerevisiae* isolates. *PLoS Genet* 4(10): e1000223.
- Laizé, V., Tacnet, F., Ripoche, P., Hohmann, S., 2000. Polymorphism of *Saccharomyces cerevisiae* aquaporins. *Yeast* 16, 897-903.
- Lee, H.N., Magwene, P.M., Brem, R.B., 2011. Natural variation in *CDC28* underlies morphological phenotypes in an environmental yeast isolate. *Genetics* 188, 723-730.
- Legras, J.L., Karst, F., 2003. Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiol. Lett.* 221, 249-255.
- Libkind, D., Van Broock, M., 2006. Biomass and carotenoid pigment production by patagonian native yeasts. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 22, 687-692.
- López, V., Querol, A., Ramón, D., Fernández-Espinar, M.T., 2001. A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *Int. J. Food Microbiol.* 68, 75-81.
- López, W., Ramírez, M., Mambuscay-Mena, L.A., Osorio-Cadavid, E., 2010. Diversidad de levaduras asociadas a chichas tradicionales de Colombia. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 12, 176-186.
- 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. *Rev. Argent. Microbiol.* In press.
- Lyumugabe, F., Gros, J., Nzungize, J., Bajyana, E., Thonart, P., 2012. Characteristics of African traditional beers brewed with sorghum malt: a review. *Biotechnol. Agron. Soc. Env.* 16, 509-530.
- Madigan, M.T. et al. (1999) *Brock Biology of Microorganisms*, Prentice Hall
- Marques, W.L., Raghavendran, V., Stambuk, B.U., Gombert, A.K., 2015. Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: A relationship most sweet. *FEMS Yeast Res.* 16(1): fov107.
- Marsh, A.J., Hill, C., Ross, R.P., Cotter, P.D., 2014. Fermented beverages with health-promoting potential: past and future perspectives. *Trends Food Sci. Technol.* 38, 113-124.
- Marsolier-Kergoat, M.C., Yeramian, E., 2009. GC content and recombination: Reassessing the causal effects for the *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Genetics* 183, 31-38.
- Matallana, E., Aranda, A., 2017. Biotechnological impact of stress response on wine yeast. *Lett. Appl. Microbiol.* 64, 103-110.
- McIlwain, S.J., Peris, D., Sardi, M., Moskvina, O. V., Zhan, F., Myers, K.S., Riley, N.M., Buzzell, A., Parreiras, L.S., Ong, I.M., Landick, R., Coon, J.J., Gasch, A.P., Sato, T.K., Hittinger, C.T., 2016. Genome sequence and analysis of a stress-tolerant, wild-

- derived strain of *Saccharomyces cerevisiae* used in biofuels research. *G3 Genes, Genomes, Genet.* 6, 1757-1766.
- Meier-Dörnberg, T., Kory, O.I., Jacob, F., Michel, M., Hutzler, M., 2018. *Saccharomyces cerevisiae* variety *diastaticus* friend or foe? *FEMS Yeast Res.* 18(4).
- Meilgaard, M. C. 1975. Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *MBAA Technical Quarterly*, 12, 151–168.
- Mendoza, L.M., Neef, A., Vignolo, G., Belloch, C., 2017. Yeast diversity during the fermentation of Andean chicha: A comparison of high-throughput sequencing and culture-dependent approaches. *Food Microbiol.* 67, 1-10.
- Menezes, A.G.T., Ramos, C.L., Dias, D.R., Schwan, R.F., 2018. Combination of probiotic yeast and lactic acid bacteria as starter culture to produce maize-based beverages. *Food Res. Int.* 111, 187-197.
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T., Zarnkow, M., Jacob, F., Hutzler, M., 2016a. Screening for new brewing yeast in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. *Yeast*, 33, 129– 144.
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F.J., Wagner, R.S., Hutzler, M., 2016b. Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *J. Inst. Brew.* 122, 569-587.
- Mohanan, N., Satyanarayana, T., 2019. Amylases, in: Schmidt, T. (Ed.), *Encyclopedia of Microbiology*. Academic Press, pp. 107–126.
- Monostori, P., Wittmann, G., Karg, E., Túri, S., 2009. Determination of glutathione and glutathione disulfide in biological samples: An in-depth review. *J. Chromatogr. B* 877, 3331-3346.
- Morales, B.M., Molina Córdoba, M., 2015. Evaluación de factores que pueden influir en el proceso de sacarificación-fermentación simultáneas para la producción de etanol a partir de materiales amiláceos. *Rev. Ing.* 25, 47-61.
- Moreira, N., Pina, C., Mendes, F., Couto, J.A., Hogg, T., Vasconcelos, I., 2011. Volatile compounds contribution of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora uvarum* during red wine vinifications. *Food Control* 22, 662-667.
- Mukherjee, V., Radecka, D., Aerts, G., Verstrepen, K.J., Lievens, B., Thevelein, J.M., 2017. Phenotypic landscape of non-conventional yeast species for different stress tolerance traits desirable in bioethanol fermentation. *Biotechnol. Biofuels* 10:216.
- Narváez-Rivadeneira, E., 2006. La fiesta del Yamor. *Revista Sarance - ensayos locales*, Vol 3, Flacso - Ecuador.
- Navarrete-Bolaños, J.L., 2012. Improving traditional fermented beverages: How to evolve from spontaneous to directed fermentation. *Eng. Life Sci.* 12, 410-418.
- Ness, F., Aigle, M., 1995. RTM1: A member of a new family of telomeric repeated genes in yeast. *Genetics* 140, 945-956.

- Nikulín, J., Krogerus, K., Gibson, B., 2018. Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation. *Yeast* 35, 113-127.
- Nout, M.J.R., 2014. Food technologies: Fermentation, en: Motarjemi, Y., Moy, G., Tood, E. (Eds.), *Encyclopedia of Food Safety*. Elsevier Inc., pp. 168-177.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J.-L., Wincker, P., Casaregola, S., Dequin, S., 2009. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (38) 16333-16338.
- Ohdate, T., Omura, F., Hatanaka, H., Zhou, Y., Takagi, M., Goshima, T., Akao, T., Ono, E., 2018. *MAL73*, a novel regulator of maltose fermentation, is functionally impaired by single nucleotide polymorphism in sake brewing yeast. *PLoS one*13(6): e0198744.
- Orikasa, Y., Mikumo, D., Ohwada, T., 2018. A 2-deoxyglucose-resistant mutant of *Saccharomyces cerevisiae* shows enhanced maltose fermentative ability by the activation of mal genes. *Foods* 7(4), 52.
- Orozco, H., Matallana, E., Aranda, A., 2019. Stress response in yeast used for food production, in: Paramithiotis, S., Patra, J. (Eds.), *Food Molecular Microbiology*. CRC Press, pp. 183–206.
- Osorio-Cadavid, E., Chaves-López, C., Tofalo, R., Paparella, A., Suzzi, G., 2008. Detection and identification of wild yeasts in Champús, a fermented Colombian maize beverage. *Food Microbiol.* 25, 771-777.
- Padilla, B., Gil, J. V., Manzanares, P., 2016. Past and future of non-*Saccharomyces* yeasts: From spoilage microorganisms to biotechnological tools for improving wine aroma complexity. *Front. Microbiol.* 7, 411.
- Parrou, J.L., François, J., 1997. A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal. Biochem.* 248, 186-188.
- Passoth, V., Blomqvist, J., Schnürer, J., 2007. *Dekkera bruxellensis* and *Lactobacillus vini* form a stable ethanol-producing consortium in a commercial alcohol production process. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 4354–4356.
- Pazmiño, D., Escudero, M., Grijalva, N., 2014. Diversidad microbiana asociada a la chicha de arroz: una bebida tradicional de Bolívar - Ecuador. *Enfoque UTE* 5, 1-14.
- Pereira, E. de J., Panek, A.D., Araujo Eleutherio, E.C., 2003. Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones* 8, 120-124.
- Pérez-Torrado, R., Bruno-Bárcena, J., Matallana, E., 2005. Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of. *Appl. Environ. Microbiol.* 71, 6831-6837.
- Pérez-Torrado, R., Gómez-Pastor, R., Larsson, C., Matallana, E., 2009. Fermentative capacity of dry active wine yeast requires a specific oxidative stress response during industrial biomass growth. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81, 951–960.

- Pérez-Torrado, R., Gamero, E., Gómez-Pastor, R., Garre, E., Aranda, A., Matallana, E., 2015. Yeast biomass, an optimised product with myriad applications in the food industry. *Trends Food Sci. Technol.* 46, 167-175.
- Pérez-Torrado, R., Barrio, E., Querol, A., 2018. Alternative yeasts for winemaking: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 58, 1780–1790.
- Pfeiffer, T., Morley, A., 2014. An evolutionary perspective on the Crabtree effect. *Front. Mol. Biosci.* 1, 17.
- Piló, F.B., Carvajal-Barriga, E.J., Guamán-Burneo, M.C., Portero-Barahona, P., Dias, A.M.M., Freitas, L.F.D. de, Gomes, F. de C.O., Rosa, C.A., 2018. *Saccharomyces cerevisiae* populations and other yeasts associated with indigenous beers (chicha) of Ecuador. *Brazilian J. Microbiol.* 49, 808-815.
- Pina, C., Santos, C., Couto, J.A., Hogg, T., 2004. Ethanol tolerance of five non-*Saccharomyces* wine yeasts in comparison with a strain of *Saccharomyces cerevisiae* - Influence of different culture conditions. *Food Microbiol.* 21, 439 - 447.
- Piškur, J., Langkjær, R.B., 2004. Yeast genome sequencing: The power of comparative genomics. *Mol. Microbiol.* 53, 381-389.
- Piškur, J., Rozpedowska, E., Polakova, S., Merico, A., Compagno, C., 2006. How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends Genet.* 22, 183-186.
- Polášková, P., Herszage, J., Ebeler, S.E., 2008. Wine flavor: Chemistry in a glass. *Chem. Soc. Rev.* 37, 2478-2489.
- Portugal, C.B., de Silva, A.P., Bortoletto, A.M., Alcarde, A.R., 2017. How native yeasts may influence the chemical profile of the Brazilian spirit, cachaça? *Food Res. Int.* 91, 18-25.
- Prado, F.C., Parada, J.L., Pandey, A., Socol, C.R., 2008. Trends in non-dairy probiotic beverages. *Food Res. Int.* 41, 111-123.
- Pretorius, I.S., 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* 16, 675-729.
- Procopio, S., Qian, F., Becker, T., 2011. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *Eur. Food Res. Technol.* 233, 721-729.
- Puerari, C., Magalhães-Guedes, K.T., Schwan, R.F., 2015. Physicochemical and microbiological characterization of chicha, a rice-based fermented beverage produced by Umutina Brazilian Amerindians. *Food Microbiol.* 46, 210-217.
- Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., Del Olmo, M., Barrio, E., 2003. Adaptive evolution of wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* 86, 3-10.
- Quirós, M., Rojas, V., Gonzalez, R., Morales, P., 2014. Selection of non-*Saccharomyces* yeast strains for reducing alcohol levels in wine by sugar respiration. *Int. J. Food*

- Microbiol. 181, 85-91.
- Ramírez, M., Velázquez, R., 2018. The yeast *Torulaspora delbrueckii*: An interesting but difficult-to-use tool for winemaking. *Fermentation* 4, 94.
- Ramos, C.L., Duarte, W.F., Freire, A.L., Dias, D.R., Eleutherio, E.C.A., Schwan, R.F., 2013. Evaluation of stress tolerance and fermentative behavior of indigenous *Saccharomyces cerevisiae*. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 935-944.
- Ramos, C.L., Schwan, R.F., 2017. Technological and nutritional aspects of indigenous Latin America fermented foods. *Curr. Opin. Food Sci.* 13, 97-102.
- Ratnakumar, S., Tunnacliffe, A., 2006. Intracellular trehalose is neither necessary nor sufficient for desiccation tolerance in yeast. *FEMS Yeast Res.* 6, 902-913.
- Reis, V.R., Antonangelo, A.T.B.F., Bassi, A.P.G., Colombi, D., Ceccato-Antonini, S.R., 2017. Bioethanol strains of *Saccharomyces cerevisiae* characterised by microsatellite and stress resistance. *Brazilian J. Microbiol.* 48, 268-274.
- Resende, L.V., Pinheiro, L.K., Miguel, M.G.C.P., Ramos, C.L., Vilela, D.M., Schwan, R.F., 2018. Microbial community and physicochemical dynamics during the production of 'Chicha', a traditional beverage of indigenous people of Brazil. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 34:46.
- Robyt, J.F., Whelan, W.J., 1972. Reducing value methods for maltodextrins. I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. *Anal. Biochem.* 45, 510-516.
- Rodicio, R., Heinisch, J.J., 2009. Sugar metabolism by *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts, en: König, H., Unden, G., Fröhlich, J. (Eds.), *Biology of Microorganisms on Grapes, in Must and in Wine*. Springer, pp. 113-134.
- Rodrigues, F., Ludovico, P., Leao, C., 2006. Sugar metabolism in yeast: an overview of aerobic and anerobic glucose catabolism, en: Péter, G., Rosa, C. (Eds.), *Biodiversity and ecophysiology of yeast. The yeast Handbook*. Springer, pp. 101-121.
- Rodríguez, M., Pérez-Través, L., Sangorrín, M., Barrio, E., Querol, A., Lopes, C., 2017. *Saccharomyces uvarum* is responsible for the traditional fermentation of apple CHICHA in Patagonia. *FEMS Yeast Res*, Vol 13:1. fow109
- Romano, P., Capece, A., Jespersen, L., 2006. Taxonomic and ecological diversity of food and beverage yeasts, en: Querol, A., Fleet, G. (Eds.), *Yeasts in Food and Beverages*. Springer, pp. 13-53.
- Saini, P., Beniwal, A., Kokkiligadda, A., Vij, S., 2018. Response and tolerance of yeast to changing environmental stress during ethanol fermentation. *Process Biochem.* 72, 1-12.
- Schnierda, T., Bauer, F.F., Divol, B., van Rensburg, E., Görgens, J.F., 2014. Optimization of carbon and nitrogen medium components for biomass production using non-*Saccharomyces* wine yeasts. *Lett. Appl. Microbiol.* 58, 478-485.

- Segura-García, L.E., Taillandier, P., Brandam, C., Gschaedler, A., 2015. Fermentative capacity of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* in agave juice and semi-synthetic medium. *LWT - Food Sci. Technol.* 60, 284-291.
- Sicard, D., Legras, J.L., 2011. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus - Biol.* 334, 229-236.
- Simonin, H., Beney, L., Gervais, P., 2007. Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: Mechanisms of cell death. *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.* 1768, 1600-1610.
- Steensels, J., Gallone, B., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J., 2019. Domestication of industrial microbes. *Curr. Biol.* 29, R381-R393.
- Steensels, J., Snoek, T., Meersman, E., Nicolino, M.P., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J., 2014. Improving industrial yeast strains: Exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol. Rev.* 38, 947-995.
- Steensels, J., Verstrepen, K.J., 2014. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu. Rev. Microbiol.* 68, 61-80.
- Steinkraus, K.H., 2002. Fermentations in world food processing. *Compr. Rev. Food Sci. Food Saf.* 1, 23-32.
- Stewart, G., 2017. The production of secondary metabolites with flavour potential during brewing and distilling wort fermentations. *Fermentation* 3(4), 63.
- Struyf, N., Laurent, J., Verspreet, J., Verstrepen, K.J., Courtin, C.M., 2017. Substrate-limited *Saccharomyces cerevisiae* yeast strains allow control of fermentation during bread making. *J. Agric. Food Chem.* 65, 3368-3377.
- Suh, S.-O., Blackwell, M., Kurtzman, C.P., Lachance, M.-A., 2006. Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia* 98, 1006-1017.
- Swisher, K.D., Parker, R., 2010. Localization to, and effects of Pbp1, Pbp4, Lsm12, Dhh1, and Pab1 on stress granules in *Saccharomyces cerevisiae*. *PLoS One* 5(4):e10006.
- Tamang, J.P., Watanabe, K., Holzapfel, W.H., 2016. Review: diversity of microorganisms in global fermented foods and beverages. *Front. Microbiol.* 7, 377.
- Taylor, J.R.N., 2015. Fermentation: foods and nonalcoholic beverages, en: Wrigley, C., Corke, H., Seetharaman, K., Faubion, J. (Eds.), *Encyclopedia of Food Grains: Second Edition*. Elsevier Ltd., pp. 183-192.
- Terefe, N., 2016. Food fermentation, in: Smithers, G. (Ed.), *Reference Module in Food Science*. Elsevier Inc.
- Trichez, D., Knychala, M.M., Figueiredo, C.M., Alves, S.L., da Silva, M.A., Miletti, L.C., de Araujo, P.S., Stambuk, B.U., 2019. Key amino acid residues of the AGT1 permease required for maltotriose consumption and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol.* 126, 580-594.
- Thompson, J., Higgins, D., Gibson, T., 1994. CLUSTAL W: improving the sensitivity of

- progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22, 4673-4680.
- Tietze, F., 1969. Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: Applications to mammalian blood and other tissues. *Anal. Biochem.* 27, 502-522.
- Toh, D.W.K., Chua, J.Y., Liu, S.Q., 2018. Impact of simultaneous fermentation with *Saccharomyces cerevisiae* and *Torulaspora delbrueckii* on volatile and non-volatile constituents in beer. *LWT - Food Sci. Technol.* 91, 26-33.
- Torija, M.J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J.M., Mas, A., 2003. Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int. J. Food Microbiol.* 80, 47-53.
- Tristezza, M., Fantastico, L., Vetrano, C., Bleve, G., Corallo, D., Mita, G., Grieco, F., 2014. Molecular and technological characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from natural fermentation of susumaniello grape must in Apulia, Southern Italy. *Int. J. Microbiol.* Article ID 897428.
- Ülgen, K.Ö., Saygılı, B., Önsan, Z.I., Kirdar, B., 2002. Bioconversion of starch into ethanol by a recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain YPG-AB. *Process Biochem.* 37, 1157-1168.
- Vallejo, J.A., Miranda, P., Flores-Félix, J.D., Sánchez-Juanes, F., Ageitos, J.M., González-Buitrago, J.M., Velázquez, E., Villa, T.G., 2013. Atypical yeasts identified as *Saccharomyces cerevisiae* by MALDI-TOF MS and gene sequencing are the main responsible of fermentation of chicha, a traditional beverage from Peru. *Syst. Appl. Microbiol.* 36, 560-564.
- Van Breda, V., Jolly, N., van Wyk, J., 2013. Characterisation of commercial and natural *Torulaspora delbrueckii* wine yeast strains. *Int. J. Food Microbiol.* 163, 80-88.
- Van Dijken, J.P., Weusthuis, R.A., Pronk, J.T., 1993. Kinetics of growth and sugar consumption in yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* 63, 343-352.
- Van Hoek, P., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 1998. Effect of specific growthrate on fermentative capacity of baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* 64, 4226-4233
- van Maris, A.J.A., Abbott, D.A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A.H., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., van Dijken, J.P., Pronk, J.T., 2006. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: Current status. *Antonie van Leeuwenhoek, Int. J. Gen. Mol. Microbiol.* 90, 391-418.
- Varela, C., 2016. The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 100: 9861
- Vasudha, S., Mishra, H.N., 2013. Non dairy probiotic beverages. *Int. Food Res. J.* 20, 7-15.
- Venturini Copetti, M., 2019. Yeasts and molds in fermented food production: an ancient

- bioprocess. *Curr. Opin. Food Sci.* 25, 57-61.
- Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Delvaux, F.R., 2003. Yeast flocculation: What brewers should know. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 61, 197-205.
- 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 Res.* 10, 402-411.
- Vieira, É.D., Stupiello Andrietta, M. da G., Andrietta, S.R., 2013. Yeast biomass production: A new approach in glucose-limited feeding strategy. *Brazilian J. Microbiol.* 44, 551-558.
- Walker, G., Stewart, G., 2016. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of Fermented Beverages. *Beverages* 2, 30.
- Walker, G.M., Walker, R.S.K., 2018. Enhancing yeast alcoholic fermentations, en: Gadd, G., Sariaslani, S. (Eds.), *Advances in Applied Microbiology*. Elsevier Ltd, pp. 87-129.
- Wanderley, K.J., Torres, F.A.G., Moraes, L.M.P., Ulhoa, C.J., 2004. Biochemical characterization of α -amylase from the yeast *Cryptococcus flavus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 231, 165-169.
- Wang, J., Fung, D.Y.C., 1996. Alkaline-fermented foods: a review with emphasis on pidan fermentation. *Crit. Rev. Microbiol.* 22, 101-138.
- Warringer, J., Zörgö, E., Cubillos, F.A., Zia, A., Gjuvsland, A., Simpson, J.T., Forsmark, A., Durbin, R., Omholt, S.W., Louis, E.J., Liti, G., Moses, A., Blomberg, A., 2011. Trait variation in yeast is defined by population history. *PLoS Genet.* 7(6): e1002111.
- Yalcin, T.H., Corbaci, C., 2013. Isolation and characterization of amylase producing yeasts and improvement of amylase production. *Turkish J. Biochem.* 38, 101-108.
- Yamashita, I., Suzuki, K., Fukui, S., 1985. Nucleotide sequence of the extracellular glucoamylase gene STA1 in the yeast *Saccharomyces diastaticus*. *J. Bacteriol.* 161, 567-573.
- Yamauchi, H., Yamamoto, H., Shibano, Y., Amaya, N., Takeshi, S., 1998. Rapid methods for detecting *Saccharomyces diastaticus*, a beer spoilage yeast, using the polymerase chain reaction. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 56, 58-63.
- Zumárraga, M., Barbero, F., 2014. *Saccharomyces cerevisiae*, contribución organoléptica en la vinificación. *Revista Oficial Asociación de Bodegas de Rioja Alavesa*, 4: 42 - 45.
- Zymánczyk-Duda, E., Brzezinska-Rodak, M., Klimek-Ochab, M., Duda, M., Zerka, A., 2017. Yeast as a versatile tool in biotechnology, en: Antonio, M., Loira, I. (Eds.), *Yeast - Industrial Applications*. InTechOpen. pp. 3-40.