



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

## Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Caracterización del perfil fermentativo de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de mezcal, en mosto de cerveza.

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:  
Maestro en Ciencias

PRESENTA:

Ing. José Alberto Sosa Romo

TUTOR PRINCIPAL

Dr. Francisco Ruíz Terán

Facultad de Química, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR

Dr. Antonio Peña Díaz

Instituto de Fisiología Celular, UNAM

Dr. José Mariano García Garibay

Facultad de Química, UNAM

Ciudad de México. Junio, 2021



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## Agradecimientos

Quiero expresar mi profunda gratitud hacia el Dr. Francisco Ruiz Terán por abrirme las puertas de su laboratorio y por su guía durante la realización de este trabajo. Agradezco a los miembros de mi comité tutor, el Dr. Mariano García y el Dr. Antonio Peña.

Estoy agradecido con el Dr. Arturo Navarro, M.C Julieta Sandoval, Dra. Gloria Díaz, Dr. Martín Vargas, Dra. Hilda Calderón, Q.A. Paulina Martínez, Q.A. Sara Geyer y M.C. Sandra Villarreal, quienes me apoyaron con reactivos para mis experimentos, facilitaron el uso de equipos de laboratorio y/o brindaron sugerencias y aportaciones que sumaron para la realización de este trabajo. Muchas gracias.

Gracias a El Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), organismo que otorgó la mayor parte del apoyo financiero para la realización de esta tesis. Gracias a la fundación de *The American Society of Brewing Chemists* (ASBC) y a la corporación Ecolab, por la beca que me otorgaron.

Agradezco mi amigo, el Dr. Jorge Santiago por su gran aportación a este trabajo, consejos técnicos y las entretenidas charlas en el laboratorio. Gracias a todas las personas del laboratorio 321 del Departamento de Alimentos y Biotecnología que me ayudaron e hicieron mi estancia en el laboratorio más amena y divertida.

Para Elizabeth y Marisela

«Espíritu» viene de la palabra latina «respirar». Lo que respiramos es aire, que es realmente materia, por sutil que sea. A pesar del uso en sentido contrario, la palabra «espiritual» no implica necesariamente que hablemos de algo distinto de la materia (incluyendo la materia de la que está hecho el cerebro), o de algo ajeno al reino de la ciencia... La ciencia no sólo es compatible con la espiritualidad, sino que es una fuente de espiritualidad profunda.

Carl Sagan, *The Demon-Haunted World* (1996).

## Abreviaturas

<b>°B</b>	grados Brix
<b>°C</b>	grados Celsius
<b>µl</b>	microlitro
<b>4VG</b>	4 vinil guaiacol
<b>ADH</b>	enzima alcohol deshidrogenasa
<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>AF</b>	alcohol(es) de fusel
<b>AGCM</b>	ácido graso de cadena mediana
<b>BJCP</b>	programa de certificación de jueces de cerveza
<b>CG</b>	cromatografía de gases
<b>DMS</b>	sulfuro de dimetilo
<b>DMSO</b>	dimetilsulfóxido
<b>DO</b>	densidad óptica
<b>EDTA</b>	ácido etilendiaminotetraacético
<b>FAN</b>	amino nitrógeno libre
<b>FID</b>	detector de ionización de llama
<b>g</b>	fuerza de gravedad de la tierra
<b>GE</b>	gravedad específica
<b>GPI</b>	glicosilfosfatidilinositol
<b>h</b>	hora
<b>ITS</b>	espaciadores transcritos internos
<b>LA</b>	límite de atenuación
<b>LSD</b>	diferencia mínima significativa
<b>M</b>	concentración molar
<b>Mb</b>	millón de pares de bases
<b>min</b>	minuto
<b>ml</b>	mililitro
<b>mM</b>	concentración milimolar

<b>MSM</b>	medio selectivo con maltosa
<b>NA</b>	no aplica
<b>NAD+</b>	el dinucleótido de nicotinamida y adenina en su forma oxidada
<b>ng</b>	nanogramo
<b>nm</b>	nanómetros
<b>p/p</b>	relación peso peso
<b>p/v</b>	relación peso volumen
<b>pb</b>	pares de base
<b>PCI</b>	fenol-cloroformo-alcohol isoamílico
<b>PCR</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PF</b>	potencial de floculación
<b>PGE</b>	puntos de gravedad específica
<b>PMS</b>	<i>pantone matching system</i>
<b>ppm</b>	partes por millón
<b>RFLP</b>	polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
<b>rpm</b>	revoluciones por minuto
<b>RTD</b>	bebidas listas para beber
<b>SSM</b>	S-metilmetionina
<b>TE</b>	<i>buffer</i> Tris-EDTA
<b>UFC</b>	unidades formadoras de colonias
<b>v/v</b>	relación volumen volumen
<b>WLN</b>	<i>Wallerstein Laboratory Nutrient</i>
<b>YEPD</b>	medio con extracto levadura, peptona y dextrosa
<b>YNB</b>	base nitrogenada de levadura

# Contenido

<b>1. Resumen</b> .....	11
<b>2. Introducción</b> .....	13
2.1. Definición de cerveza.....	13
2.2. Producción de cerveza .....	14
2.2.1. Descripción del sustrato .....	14
2.2.2. Proceso de elaboración de la cerveza .....	15
2.3. Las levaduras en la cerveza .....	17
2.3.1. Principales metabolitos producidos por las levaduras cerveceras .....	21
2.3.2 Levaduras del género <i>Saccharomyces</i> .....	25
2.3.3 Levaduras cerveceras del género <i>Saccharomyces</i> .....	25
2.4 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> no-convencionales .....	26
2.5 Ensayos empleados en el proceso de selección de levaduras cerveceras .....	27
2.5.1 Flocculación.....	28
2.5.2 Atenuación.....	30
<b>3. Antecedentes</b> .....	31
3.1 Producción de mezcal y su relación con <i>S. cerevisiae</i> .....	31
3.2 Justificación .....	33
<b>4. Hipótesis</b> .....	38
<b>5. Objetivos</b> .....	39
5.1 Objetivo general .....	39
5.2 Objetivos particulares.....	39
<b>6. Estrategia experimental</b> .....	40
<b>7. Materiales y métodos</b> .....	41
7.1 Levaduras .....	41
7.2 Reactivación de levaduras. ....	42
7.3. Cultivo en agar nutritivo WL (WLN) .....	42
7.4 Confirmación de la identidad de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .....	42
7.4.1 Extracción de ADN .....	43
7.4.2 PCR .....	43
7.4.3 Restricción de los fragmentos amplificados .....	44



7.5 Pre-selección de cepas con potencial para la producción de cerveza.....	44
7.5.1 Producción de 4 vinil guaiacol (4VG). .....	45
7.5.2. Cálculo de Límite de Atenuación .....	45
7.5.3. Consumo de maltosa .....	46
7.6. Selección de levaduras.....	46
7.6.1. Crecimiento en maltosa.....	46
7.6.2. Prueba preliminar de floculación.....	47
7.7 Curva estándar de número de células.....	47
7.8 Ensayos de fermentación .....	47
7.8.1. Preparación del mosto, propagación, inoculación y condiciones de fermentación.....	48
7.8.2. Determinación de azúcares .....	49
7.8.3. Cuantificación de compuestos volátiles .....	50
7.8.4. Análisis estadístico.....	50
7.8.5. Determinación de pH y células en suspensión.....	51
7.9. Pruebas de floculación en condiciones aerobias.....	51
7.9.1. Cuantificación del potencial de floculación.....	51
7.9.2. Determinación de la inhibición de la floculación por azúcares.....	52
<b>8. Resultados y discusión .....</b>	<b>53</b>
8.1. Cultivo de las cepas y confirmación de su identidad molecular .....	53
8.1.1. Reactivación de las cepas en caldo y agar YEPD .....	53
8.1.2. Cultivo de levaduras en agar nutritivo WL.....	54
8.1.3. Identificación molecular de levaduras .....	57
8.2. Pre-selección de las cepas de <i>S. cerevisiae</i> con potencial para la producción de cerveza.....	58
8.2.1. Producción de 4 vinil guaiacol.....	58
8.2.2. Pruebas de Límite de Atenuación.....	59
8.2.3. Formación de colonias en placa maltosa/YNB .....	60
8.3. Selección de cepas de <i>S. cerevisiae</i> con potencial para la producción de cerveza	62
8.3.1. Prueba de crecimiento en maltosa/YNB.....	62
8.3.2. Prueba preliminar de floculación.....	64
8.4. Fermentación de mosto con las cepas de <i>S. cerevisiae</i> seleccionadas.....	65

8.4.1. Consumo de azúcares.....	66
8.4.2. Producción de etanol .....	76
8.4.3. Producción y cuantificación de compuestos volátiles de las levaduras seleccionadas .....	79
8.4.4. Levaduras en suspensión y pH del medio.....	82
8.5. Floculación.....	85
8.5.1. Inhibición de la floculación por carbohidratos .....	88
<b>9. Conclusiones .....</b>	<b>94</b>
<b>10. Perspectivas.....</b>	<b>96</b>
<b>11. Bibliografía .....</b>	<b>97</b>
<b>12. Anexos.....</b>	<b>111</b>
12.1. Anexo 1. Preparación de medios de cultivo .....	111
12.2. Anexo 2. Conteo celular y viabilidad celular .....	114
12.3. Anexo 3. Curvas de calibración de número de células .....	116
12.4. Anexo 4. Curvas de calibración de azúcares por HPLC .....	117

# 1. Resumen

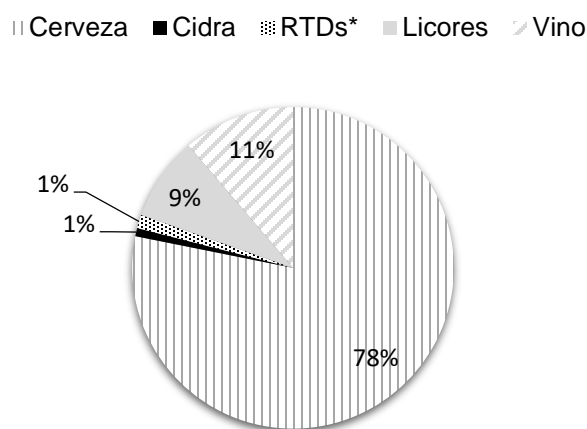
En este estudio se evaluó la capacidad de las levaduras nativas de la fermentación natural del mezcal para fermentar mosto de malta de cebada. El objetivo consistió en caracterizar a las cepas para determinar si podrían ser usadas en la producción de cerveza, y contribuir a la innovación de las características organolépticas de la cerveza. Se evaluaron 19 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de una colección de levaduras aisladas durante la fermentación de jugo de maguey, provenientes de diferentes regiones del estado de Oaxaca. La morfología de las cepas en medio agar YEPD y medio nutritivo WL fue típica de *S. cerevisiae*. Para tener la certeza de trabajar con levaduras *S. cerevisiae* se confirmó su identidad mediante un análisis PCR-RFLP de la región de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y el gen ribosomal 5.8S. Todas las cepas presentaron un tamaño de amplicón de 850 pb y los fragmentos de restricción generados por las enzimas *Hae III*, *Hinf I* y *Hha I* fueron similares a los patrones reportados previamente para *S. cerevisiae*. En las pruebas de pre-selección, todas las levaduras produjeron 4VG y mostraron Límites de Atenuación bajos (11 a 20%) al crecer en mosto de malta. Asimismo, desarrollaron colonias en agar con maltosa (el principal carbohidrato del mosto de malta) al 1%, como única fuente de carbono, pero solamente las cepas LC-12, LC-14, DI-01, DI-03, DH2, FV-10 y CH-01 formaron colonias distribuidas por toda la placa. Se seleccionaron a las cepas FV10 y DH2 para los ensayos de fermentación de mosto de malta. La cepa FV10 se seleccionó por destacar en su capacidad de crecer en maltosa con 6% p/v de maltosa como única fuente de carbono, mientras que DH2 se seleccionó por contar con un fenotipo de fuerte adherencia célula-célula. En los ensayos de fermentación del mosto de malta, se encontró que ambas cepas fermentaron glucosa y fructosa, pero no maltosa ni maltotriosa. Solamente DH2 fermentó sacarosa, y su consumo fue mínimo. La cepa de referencia consumió todos los azúcares fermentables con excepción de maltosa durante los 11 días de fermentación establecidos. Como resultado del bajo consumo de azúcares, FV10 y DH2, tuvieron bajas atenuaciones aparentes (16 y 20%) y produjeron en promedio, el 7.9 y 11.2% (respectivamente) de la cantidad de etanol que la cepa de referencia produjo. Ambas levaduras dejaron acetaldehído residual al término de los ensayos

de la fermentación; también produjeron alcoholes superiores (alcohol isoamílico, alcohol amílico y alcohol fenético) y acetato de feniletilo, compuestos que favorecen las características sensoriales de la cerveza. El potencial de floculación de FV10 y DH2 fue de 7.53 y 87.81%, respectivamente. DH2 resultó ser una cepa muy floculante que podría utilizarse en ensayos de co-floculación con células no floculantes. La floculación de FV10 fue inhibida por glucosa, fructosa y manosa, y la de DH2 fue inhibida por manosa, maltosa y sacarosa. Los resultados obtenidos en este estudio sugieren que las levaduras nativas del mezcal podrían emplearse en la producción de cerveza con bajo contenido de alcohol, o bien utilizarse en una etapa de pre-fermentación, con la finalidad de contribuir con la generación de compuestos de aromas y sabores en la cerveza.

## 2. Introducción

### 2.1. Definición de cerveza

La cerveza es la bebida alcohólica fermentada más consumida en el mundo (Euromonitor, 2014) (Figura 1). A diferencia del vino, que se elabora a partir de la fermentación del extracto de cualquier fruta, la cerveza se produce de la hidratación, maceración y fermentación de alguna fuente de carbono feculenta, como semillas, tubérculos o raíces (Di Genova, 2011). La palabra “cerveza” se originó del celtolatino *cerevisia* (RAE, 2019), cuya etimología es un tanto incierta, probablemente, debido al largo tiempo que los humanos han disfrutado de esta bebida.



**Figura 1.** Distribución del volumen total de bebidas alcohólicas producidas en el mundo en el año 2013, con base en 251,000 millones de litros. Bebidas: cerveza, cidra, RTD\* (*Ready To Drink*), licores y vino (Euromonitor, 2014).

Las fuentes de carbono para la elaboración de la cerveza son numerosas, por lo que esta bebida es difícil de definir (Boulton & Quain, 2006). La Norma Oficial Mexicana, NOM-199-SCFI-2017, define a la cerveza como una bebida alcohólica fermentada elaborada con malta, lúpulo, levadura y agua potable, la cual puede adicionarse con infusiones de cualquier semilla farinácea procedente de gramíneas

o leguminosas, raíces o materia prima vegetal feculenta y/o carbohidratos de origen vegetal susceptibles de ser hidrolizados o, en su caso, azúcares que son adjuntos de la malta, con adición de lúpulos o sucedáneos en estos; con contenido alcohólico de 2% a 20% Alc. Vol. (D.O.F., 2017). Los microorganismos encargados de la fermentación de la cerveza, normalmente son las levaduras del género *Saccharomyces*. Algunas cervezas, como las *lambic* y *gueuze*, se producen a partir de la fermentación con bacterias (*Pediococcus cerevisiae*) y otros hongos (*Brettanomyces*, *Kloeckera apiculata*) (Van Oevelen *et al.*, 1977). Para fines de este trabajo, la cerveza se define como una bebida alcohólica, producida a partir de un medio acuoso llamado mosto, que contiene azúcares y nutrientes derivados de la cebada malteada y fermentada por *S. cerevisiae* (Boulton & Quain, 2006).

## 2.2. Producción de cerveza

### 2.2.1. Descripción del sustrato

El mosto de malta de cebada es un sustrato rico en carbohidratos, fibra, proteínas, FAN (nitrógeno amino libre), lípidos, vitaminas y minerales. Los carbohidratos son los principales sólidos solubles del mosto (90-92%), las proteínas están presentes en un 4-5% del extracto soluble, el contenido de FAN normalmente es de 200 a 300 mg/L y el contenido de lípidos oscila entre 40 y 70 mg/L (MacWilliam, 1968). En la Tabla 1 se enlistan los principales azúcares solubles presentes en el mosto.

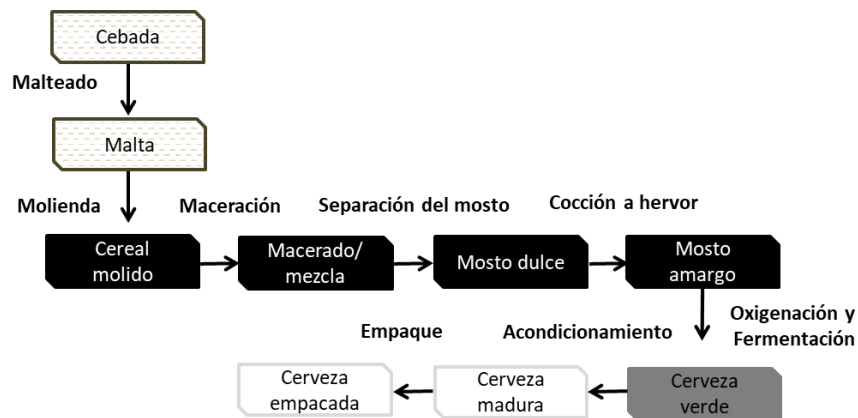
**Tabla 1.** Concentración de carbohidratos solubles en el mosto para la producción de cerveza.

Azúcar	Concentración (g/100ml)
Fructosa	0.1-0.97
Glucosa	0.5-1.47
Sacarosa	0.1-0.6
Maltosa	3.89-6.04
Maltotriosa	1.14-1.77
Dextrinas*	2.39-4.21

Obtenido de Boulton & Quain, (2006). \* Carbohidratos generalmente no fermentables por *S. cerevisiae* cerveceras.

### 2.2.2. Proceso de elaboración de la cerveza

El proceso de elaboración de cerveza se puede dividir en 4 etapas: 1) selección del cereal y malteado, 2) preparación del mosto, 3) fermentación y 4) post-fermentación. Cada etapa cuenta con diversos pasos (Figura 2).



**Figura 2.** Proceso de elaboración de cerveza modificado de Boulton & Quain, (2006). En blanco y líneas horizontales: la selección de cebada y malteado. En negro: la preparación del mosto. En gris: fermentación. En blanco: post-fermentación y empaçado de cerveza.

La cebada se selecciona de acuerdo con su desempeño agronómico y potencial de modificación (Boulton & Quain, 2006; Gupta *et al.*, 2010; Mallet, 2014). Posteriormente, la cebada se procesa a malta, es decir se “maltea”, con el fin de inducir la actividad enzimática, modificar palatabilidad, aumentar poder diastático y disponibilidad de FAN (Mallet, 2014). El malteado se define como la germinación controlada de cereales, para asegurar los cambios físicos y bioquímicos del grano de cereal, con un posterior proceso de secado. El malteado involucra tres pasos: 1) remojo para que el grano alcance entre 12% y 40% de humedad; esto promueve la 2) germinación, que consiste en el crecimiento del embrión, síntesis de enzimas y rompimiento del endospermo; por último 3) secado, para asegurar la estabilidad del producto. La preparación del mosto es el “bloque caliente” del proceso e inicia con la molienda de la malta en harina gruesa que posteriormente se hidrata. La temperatura de la mezcla o macerado se incrementa gradualmente de 37 a 78°C, de manera controlada, para obtener un extracto acuoso llamado mosto. Durante el macerado se promueve la degradación enzimática de algunos de los polisacáridos, lo que da lugar a carbohidratos solubles en el mosto. El mosto se separa del material insoluble (proteínas, arabinosanos y beta glucanos) (Gupta *et al.*, 2010) y se cuece a hervor para eliminar microorganismos, solubilizar los  $\alpha$ -ácidos del lúpulo (responsables del amargor), volatilizar compuestos indeseables y promover la coagulación de proteínas insolubles (Boulton & Quain, 2006). El mosto amargo resultante, se separa del material insoluble, mediante centrifugación, se enfría y transfiere hacia el fermentador. El “bloque frío” del proceso (White & Zainasheff, 2010) comienza con la adición de oxígeno al mosto amargo y la inoculación de las levaduras. Las levaduras consumen los azúcares y nutrientes del mosto. Una vez que se obtiene la gravedad específica final esperada, el resultado es una cerveza llamada: “cerveza verde”, y entonces, las levaduras se retiran del fermentador por medio del cono inferior. La cerveza verde debe evolucionar hacia una forma en la que pueda consumirse (Boulton & Quain, 2006). Durante la maduración desaparecen compuestos indeseables producidos durante la fermentación (p.e. acetaldehído, diacetilo y ácido sulfhídrico), y se ajusta la carbonatación para mejorar la palatabilidad de la cerveza madura. La post-fermentación se centra en aumentar



el tiempo de anaquel de la cerveza, mediante la filtración y pasteurización; mientras que el empaqueo es fundamental para la distribución del producto.

### 2.3. Las levaduras en la cerveza

Las levaduras son organismos eucariotas unicelulares, que juegan un papel importante en los sectores de alimentos, bebidas, farmacia, químicos, farmacéuticos y agricultura (Satyanarayana & Kunze, 2009). Existen alrededor de 1,500 especies de levaduras, divididas en más de 100 géneros diferentes. Estos microorganismos poseen las herramientas genéticas para metabolizar aeróbica o anaeróbicamente los azúcares (Deák, 2003), por lo que pueden consumir los azúcares mediante fermentación y respiración. El género *Saccharomyces* es el más explotado comercialmente (Boulton & Quain, 2006), y es utilizado en fermentaciones controladas debido a tres características principales: 1) producción eficiente de altas cantidades de etanol; 2) el uso de la fermentación como ruta metabólica principal, combinado con el efecto Crabtree positivo; y 3) mayor tolerancia a etanol y otros factores de estrés (Steensels & Verstrepen, 2014).

*S. cerevisiae* está muy relacionada con actividades humanas como fabricación de cerveza, pan, vino, producción de biomasa, extracto de levadura y saborizantes (Boulton & Quain 2006; Borneman & Pretorius, 2015). Las cepas cerveceras de *S. cerevisiae* son capaces de metabolizar los principales carbohidratos del mosto de malta de cebada (Tablas 1 y 2): glucosa, fructosa, maltosa, maltotriosa, pero no las dextrinas (White & Zainasheff, 2010), y utiliza algunos azúcares más fácilmente que otros. La glucosa y fructosa se asimilan simultáneamente a través de transportadores de alta y baja afinidad que operan por difusión facilitada (Boulton & Quain, 2006, White & Zainasheff, 2010). La glucosa es el azúcar preferido por *S. cerevisiae* (D'Amore, *et al.*, 1989; Marques *et al.*, 2016) y su presencia en el medio inactiva o reprime a los acarreadores del consumo de otros azúcares (Lagunas, 1993; Phaweni, *et al.*, 1992). La fructosa se asimila de la misma manera que la glucosa, y el rendimiento energético de ambos monosacáridos es de dos (2) moléculas de ATP por cada hexosa. La sacarosa generalmente se

metaboliza mediante hidrólisis extracelular llevada a cabo por una invertasa. Posteriormente se consumen los monosacáridos resultantes, glucosa y fructosa (Carlson & Botstein, 1982). La invertasa extracelular que hidroliza a la sacarosa está codificado por el gen *SUC*. Existen nueve loci *SUC* que codifican para invertasas extracelulares. El alelo *suc2* es considerado el locus ancestral, y el resto de los alelos *suc* pudieron haber surgido por la adaptación de *S. cerevisiae* a ambientes con diferente disponibilidad de sacarosa. Asimismo, otras cepas cuentan con un pseudogen *suc2* y no producen invertasa (Bozda & Greig, 2014). Cuando la disponibilidad de glucosa baja a una concentración crítica (Phaweni, *et al.*, 1992; Van Urk, *et al.*, 1989), se inicia el consumo de maltosa y maltotriosa (Walkey y Kirsop, 1969; White & Zainasheff, 2010). La asimilación de maltosa depende de los genes *mal* ubicados en cada uno de los 5 loci *MAL*: *MAL1-MAL4* y *MAL6*. Cada locus contiene tres genes (*malxz*, donde *x* es el número de locus y *z* es el número de gen). El gen 1 codifica para una permeasa de maltosa, el gen 2 codifica para una  $\alpha$  glucosidasa (maltasa) y el gen 3 codifica para un activador transcripcional que regula la expresión de los dos primeros genes (Orikasa *et al.*, 2018). El locus *MAL1* se considera el progenitor del resto de los locus y se piensa que estos últimos pudieron originarse de eventos de translocación de zonas teloméricas. Asimismo, los locus *MAL* muestran un alto nivel de similitud (secuencial y funcional), pero también existe variabilidad, y se han descrito múltiples alelos que resultan en diferentes fenotipos, por ejemplo, cepas *MAL*-inducibles o *MAL*-constitutivas (Nollet, *et al.*, 2012). La permeasa le permite a la maltosa entrar a la célula y posteriormente, la maltasa la hidroliza en dos moléculas de glucosa, las cuáles son metabolizadas por la ruta glicolítica (Stambuk *et al.*, 2006). La utilización de maltosa por las células de *S. cerevisiae*, se lleva a cabo mediante transporte activo, y por cada molécula de maltosa que se transporta al interior de la célula, también se importa un protón (Alves *et al.*, 2014), mismo que debe ser posteriormente exportado para mantener el pH intracelular adecuado. La exportación la realiza una ATPasa de la membrana celular, que también lleva a cabo la hidrólisis de una molécula de ATP. La conversión anaeróbica de la maltosa tiene como rendimiento neto a tres (3) moléculas de ATP (1.5 moléculas de ATP por glucosa). Esto equivale a 25% menos

rendimiento de ATP por el consumo de maltosa, en comparación con dos moléculas de glucosa (de Kok, *et al.*, 2011). Existen cepas *S. cerevisiae* que no cuentan con la invertasa extracelular para la hidrólisis de sacarosa, pero que pueden consumirla, debido a que el transportador *malx1* de la maltosa, con baja afinidad y baja capacidad para el simporte de sacarosa. Una vez dentro de la célula, la sacarosa puede ser hidrolizada por maltasas intracelulares (Badotti, *et al.*, 2008). El consumo de la sacarosa mediante su simporte e hidrólisis intracelular, genera un 25% de menor rendimiento energético (en ATP), comparado con su consumo mediante hidrólisis extracelular (Marques, *et al.* 2016). No todas las cepas *S. cerevisiae* cerveceras tienen la capacidad de fermentar maltotriosa, trisacárido que cuyo consumo puede ser dependiente e independiente de los genes *mal* (Salema-Oom, 2005; Magalhães, *et al.*, 2016). Las dextrinas son azúcares con cuatro o más unidades de glucosa, que las cepas cerveceras de *S. cerevisiae*, no pueden consumir. Las cepas mutantes *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, pueden metabolizar las dextrinas, ya que expresan una glucoamilasa extracelular codificada por los genes *STA* (Meier-Dörnber, *et al.*, 2018). En estudios realizados por Gallone *et al.* (2016), se identificaron dos sub-linajes de levaduras cerveceras *S. cerevisiae* (cada sub-linaje cervecero a su vez se compone de diversas cepas) los cuales derivaron de dos eventos independientes de domesticación europea. El sub-linaje cervecero 1 tiene mayor facilidad para consumir maltotriosa y menor capacidad de producir 4 vinil guaiacol que el sub-linaje cervecero 2. El genotipo de la levadura se puede inferir por el consumo secuencial de los azúcares del mosto, resultado de la represión, inducción e inactivación catabólica de carbono (Boulton & Quain, 2006).

**Tabla 2.** Descripción y metabolismo de los azúcares solubles del mosto de malta de cebada por *S. cerevisiae* cerveceras.

Azúcar	Transporte	Descripción	Consumo por cepas cerveceras*	Represión por glucosa	Observaciones
Glucosa	Difusión facilitada	Monosacárido	Si	No	Azúcar preferido por <i>S. cerevisiae</i> .
Fructosa	Difusión facilitada	Monosacárido	Si	Generalmente no (Phaweni, <i>et al.</i> , 1992)	Compite con la glucosa por los transportadores.
Sacarosa	Hidrólisis extracelular	Disacárido. Glucosa $\alpha(1-2)$ fructosa	Si	Generalmente no (Kuchin, <i>et al.</i> , 1993)	Su hidrólisis extracelular resulta en glucosa y fructosa
Maltosa	Transporte activo con simporte de protones	Disacárido. Glucosa $\alpha(1-4)$ glucosa	Si	Generalmente si (Kuchin, <i>et al.</i> , 1993)	Dentro de la célula se hidroliza en dos glucosas
Maltotriosa	Transporte activo con simporte de protones	Trisacárido. Tres moléculas de glucosa unidas por enlaces glicosídicos $\alpha(1-4)$	Algunas	Generalmente si (Graham & Russell, 1987)	Dentro de la célula se hidroliza en tres glucosas
Dextrinas	Hidrólisis extracelular	Cuatro o más unidades de glucosa. Pueden ser polímeros lineales con enlace $\alpha(1-4)$ y ramificaciones $\alpha(1-6)$	No	Generalmente si (Graham & Russell, 1987)	Hidrolizadas extracelularmente por <i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>

\*Por cepas cerveceras de *S. cerevisiae*.

### 2.3.1. Principales metabolitos producidos por las levaduras cerveceras

El carácter esencial de cualquier cerveza está determinado por los metabolitos generados por la levadura cervecera (Meilgaard, 1975). Algunos de estos metabolitos son: etanol, alcoholes superiores, ésteres, aldehídos, cetonas, ácidos orgánicos, compuestos azufrados y compuestos fenólicos (Tabla 3).

El etanol es el principal metabolito de la cerveza y es producido por la acción de alcohol deshidrogenasa (ADH) que reduce al acetaldehído a etanol y simultáneamente regenera el NAD<sup>+</sup> glicolítico que restaura el balance redox necesario para continuar la ruta Embden–Meyerhof–Parnas (de Smidt *et al.*, 2008). El acetaldehído representa más del 95% de los aldehídos en la cerveza (Almeida, *et al.*, 2003), y es el más importante. Este se produce durante la fermentación, a partir del piruvato mediante la acción de la enzima piruvato descarboxilasa (PDC) con requerimiento de tiamina pirofosfato y magnesio como cofactores (Chen, & Jordan, 1984). La detección organoléptica (>25 ppm) (Otter & Taylor, 1971) del acetaldehído en la cerveza es normalmente un defecto y denota que el producto debe seguir madurando, la levadura estuvo en condiciones de estrés o se inoculó en una cuenta baja de levaduras.

Los alcoholes superiores son alcoholes alifáticos, también conocidos como alcoholes de *fusel* (AF). La formación de AF también representa la formación de NAD<sup>+</sup> como producto e intermediario de la ruta Embden–Meyerhof–Parnas (Hazelwood *et al.*, 2008). La principal ruta de formación de los AF es la ruta catabólica de Ehrlich, por la cual los aminoácidos que son asimilados por la levadura se “transaminan” en  $\alpha$ -cetoácidos, los cuáles no pueden ser redirigidos al metabolismo central de carbono y son convertidos en AF antes de ser excretados al medio. Los  $\alpha$ -cetoácidos son convertidos en aldehídos y posteriormente en alcoholes, a través de la acción de la cetoácido descarboxilasa y ADH, respectivamente. Los AF más importantes son el alcohol isobutílico, alcohol amílico, alcohol isoamílico, alcohol fenético e isopropanol (Chen, 1978; Hazelwood *et al.*, 2008). Los ésteres son compuestos presentes en la cerveza en concentraciones

bajas, pero debido a su alto umbral de detección pueden definir el aroma final del producto, lo que los convierte en los elementos de aroma más importantes de la cerveza (Pires *et al.*, 2014). Los ésteres se forman por la condensación enzimática de un ácido orgánico con un alcohol (Pires *et al.*, 2014), y existen dos grupos principales en cerveza: los ésteres de acetato y los ésteres de etilo (Cordente *et al.*, 2012). Los ésteres de acetato se forman a partir de Acetil-CoA y un alcohol que puede ser etanol o un AF; los ésteres de etilo se forman con un ácido graso de cadena mediana (AGCM) y etanol. Los factores que influyen la generación de ésteres son la composición del mosto, temperatura, aireación, diseño del fermentador y la cepa de levadura utilizada (Saerens *et al.*, 2008; Pires *et al.*, 2014). Los ésteres más importantes en la cerveza son acetato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, acetato de feniletilo (Cordente *et al.*, 2012; Pires *et al.*, 2014).

Los compuestos fenólicos están formados por anillos aromáticos hidroxilados. El 3-metoxi-4-hidroxiestireno (4 vinil guaiacol) es el principal compuesto fenólico en la cerveza e imparte un aroma y sabor a clavo o especias (Coghe *et al.*, 2004; McMurrrough, *et al.*, 1996). En algunas cervezas, los fenoles son considerados un defecto, pero en otras es un atributo importante, como en el estilo *Hefeweizen* alemán. El precursor del 4 vinil guaiacol (4VG) es el ácido ferúlico, ácido fenólico que se encuentra naturalmente en la cebada (McMurrrough *et al.*, 1996). El ácido ferúlico se encuentra unido covalentemente a la pared celular de la semilla de cebada, y puede ser liberado al medio durante el proceso de maceración y cocción del mosto dulce. El ácido ferúlico es transformado a 4VG por acción de la enzima ferulato descarboxilasa (Michel *et al.*, 2016a), la cual es codificada por el gen dominante *pof1* (*phenolic off flavor*, por sus siglas en inglés). Pueden existir más genes involucrados en la producción de 4VG y las enzimas involucradas se denominan descarboxilasas de ácido ferúlico (Diderich, *et al.*, 2018). La presencia de 4VG en la cerveza puede indicar contaminación con levaduras silvestres (levaduras no cerveceras) (Thurston & Tubb, 1981). Algunas levaduras cerveceras tienen inactivo el gen *pof1* (Preiss *et al.*, 2018) y la presencia de 4VG en ciertas

cervezas es deseable y por lo tanto se utilizan cepas capaces de producirlo (Michel *et al.*, 2016b; BJCP, 2015).

Los compuestos azufrados son importantes en la cerveza, ya que pueden tener un rol en la generación de aromas y sabores agradables o desagradables. Dos de los principales compuestos azufrados son el ácido sulfhídrico ( $H_2S$ ) y sulfuro de dimetilo (DMS). El  $H_2S$  se deriva de la síntesis de compuestos orgánicos sulfurados como la metionina y cisteína. Su metabolismo deriva del sulfato ( $SO_4^{2-}$ ) en donde están involucrados los genes *MET* encargados del metabolismo de metionina y cisteína (Omura, 1995). La detección sensorial de  $H_2S$  va desde un perfil pungente hasta algo similar al aroma de huevos podridos (Landaud, *et al.*, 2008). El DMS es un compuesto que se forma en la cerveza de dos posibles formas: 1) a partir del S-metilmationina, compuesto presente en la malta que se descompone en DMS durante la cocción del mosto, y 2) a partir de la reducción de dimetilsulfóxido (DMSO) catalizada por la fermentación de la levadura. El DMSO se forma en el proceso de malteado cuando el cereal se somete a temperaturas mayores a  $60^\circ C$ . El DMS es percibido con un desagradable aroma y sabor a “elote dulce cocido”, pero en bajas concentraciones (<100 ppb) otorga un aroma característico a las cervezas tipo *lager* (Boulton & Quain, 2006; Landau, *et al.*, 2008).

**Tabla 3.** Descripción de los principales metabolitos generados por *S. cerevisiae* cerveceras durante la fermentación de mosto de malta de cebada.

<b>Metabolitos</b>	<b>Principales compuestos</b>	<b>Enzima involucrada en su producción</b>	<b>Precursor</b>
<b>Alcohol</b>	Etanol	Alcohol deshidrogenasa (ADH)	Acetaldehído
<b>Aldehído</b>	Acetaldehído	Piruvato descarboxilasa (PDC)	Piruvato
<b>Alcoholes superiores</b>	Alcohol isobutílico Alcohol amílico Alcohol isoamílico Alcohol fenético Isopropanol	Alcohol deshidrogenasa (ADH)	Aminoácidos y piruvato
<b>Ésteres</b>	Acetato de etilo Acetato de isoamilo Acetato de feniletilo Hexanoato de etilo Octanoato de etilo	Alcohol acetiltransferasas (AAT)  <i>O-aciltransferasas</i>	Alcohol y AGCM o alcohol y Acetil-CoA
<b>Fenoles</b>	4 vinil guaiacol	Enzima con actividad de descarboxilasa de ácido ferúlico	Ácido ferúlico
<b>Compuestos azufrados</b>	DMS Ácido sulfhídrico	Degradación por calor Genes <i>MET</i>	S-metilmetionina SO <sub>4</sub> <sup>2-</sup>



### 2.3.2 Levaduras del género *Saccharomyces*

Además de *S. cerevisiae*, otras especies del género *Saccharomyces* con aplicación industrial son: *S. bayanus*, *S. eubayanus*, *S. pastorianus* y *S. uvarum*. *S. bayanus* es un híbrido complejo entre *S. eubayanus*, *S. uvarum* y *S. cerevisiae* (Stewart *et al.*, 2013). *S. pastorianus* surgió de un evento (o varios) de hibridación entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*, y el genoma de *S. pastorianus* proviene en mayor proporción de *S. eubayanus* que de *S. cerevisiae* (Borneman y Pretorius, 2015; Baker, *et al.*, 2015). Las levaduras *S. bayanus*, *S. uvarum* están involucradas en la producción de vino y *S. pastorianus* en la fabricación de cerveza tipo *lager* (Boulton & Quain, 2006; Stewart *et al.*, 2013).

### 2.3.3 Levaduras cerveceras del género *Saccharomyces*

Las levaduras cerveceras más importantes son *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*. La primera es conocida como levadura tipo *ale* y la segunda como tipo *lager* (White y Zainasheff, 2010). Ambas especies de levaduras producen cervezas con diferentes sabores (Polaina, 2002). Las principales características de estas levaduras son comparadas en la Tabla 4. La clasificación *ale-lager* es la más general y se basa en la identidad genómica de las levaduras, así como en sus productos de fermentación. El genoma de *S. cerevisiae* tiene un tamaño aproximado de 12 Mb (NCBI, s.f.) y fue el primer genoma eucariota en ser secuenciado (Goffeau *et al.*, 1996). El genoma de *S. pastorianus* es aproximadamente 1.5 veces más grande que el de *S. cerevisiae* (Quain, 2006) y entre el 40 y 50% del genoma de la primera no lo comparte con la segunda. A esto se debe la capacidad exclusiva de *S. pastorianus* de consumir eficientemente melibiosa (disacárido de galactosa y glucosa) y de contar mayor resistencia a las temperaturas bajas (“criofílica”) (Boulton & Quain, 2006; Baker, *et al.*, 2015). Ambas especies tienen características fermentativas distintas, lo que resulta en cervezas con diferentes características organolépticas. *S. cerevisiae* produce más ésteres, mientras que *S. pastorianus* genera más compuestos azufrados como DMS y H<sub>2</sub>S. *S. pastorianus* es capaz de

fermentar óptimamente a temperaturas menores a 10°C. Por lo general, durante la fermentación se mantiene suspendida en el medio, algunas células flocculan y se mantienen en la parte inferior del tanque de fermentación. Por otro lado, *S. cerevisiae* requiere de temperaturas de fermentación arriba de 16°C, durante la fermentación parte de la biomasa se mantiene suspendida en el medio y otra parte de ella floccula y sedimenta, por lo que se mantiene en la parte inferior del tanque de fermentación.

**Tabla 4.** Características de *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*. Modificado de Stewart, (2016) & Quain, (2006).

<b>Característica</b>	<b>Levadura ale</b>	<b>Levadura lager</b>
Especie	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pastorianus</i>
Tamaño de genoma*	1	1.5
Temperatura de crecimiento máxima	≥37°C	<34°C
Temperatura de fermentación	17-25°C	8-15°C
Tiempo de fermentación	3 a 9 días	7 a 14 días
Utilización de maltotriosa	Generalmente mala	Generalmente buena
Hidrólisis de melibiosa	No	Si
Tipo de fermentación	«alta»	«baja»
Compuestos de fermentación	Mayor cantidad de ésteres	Mayor cantidad de compuestos azufrados

\* Referente a tamaño de genoma de *S. cerevisiae*

## 2.4 *Saccharomyces cerevisiae* no-convencionales

Se han encontrado levaduras *S. cerevisiae*, aisladas de diferentes fuentes naturales, capaces de consumir maltosa con atenuaciones aparentes de 35 a 57% (Capece *et al.*, 2018). Por ejemplo, se han encontrado cepas de *S. cerevisiae*, aisladas de diferentes destilerías de cachaza, con características apropiadas para producir estilos de cerveza *lager* y *ale* (Macedo-Araújo *et al.*, 2018). La cepa

denominada LBCM1078 produce una concentración de etanol de 4.80% v/v, en condiciones de fermentación tipo *ale* (20°C y 8 días), mientras que en condiciones de fermentación tipo *lager* (11°C y 5 días), esta misma cepa produce una concentración de etanol de 3.76% v/v. Esta diferencia de etanol producido puede deberse a la menor actividad celular en condiciones tipo *lager*, así como un menor tiempo disponible para agotar los carbohidratos del medio. Algunas cepas se han caracterizado por su capacidad de producir alcoholes superiores (isopropanol, alcohol isobutílico y alcohol isoamílico) y ésteres (acetato de etilo y octanoato de etilo) similares a los producidos por cepas cerveceras comerciales (Macedo-Araújo *et al.*, 2018). Levaduras aisladas de cachaza se han identificado por su capacidad para tolerar pH bajo (<3), resistir altas concentraciones de etanol (8-10%) y alta osmolaridad (>18% de concentración de carbohidratos) (Macedo-Araújo *et al.*, 2018). Así, las destilerías pueden ser un nicho importante para explorar y aislar levaduras con potencial biotecnológico y de interés industrial. Marongiu *et al.*, (2014) aislaron cepas de *S. cerevisiae* de la masa fermentada empleada en la producción de pan, e identificaron algunas cepas con la capacidad de fermentar maltosa, glucosa y trehalosa, y producir mayor cantidad de etanol (~6% v/v) que una cepa de levadura cervecera comercial (5% v/v) (Marongiu *et al.*, 2014). En general, se ha demostrado que los alimentos y bebidas fermentadas naturalmente (espontáneamente) son una buena fuente para el aislamiento de microorganismos con potencial biotecnológico.

## 2.5 Ensayos empleados en el proceso de selección de levaduras cerveceras

Utilizar cepas puras en la producción de bebidas alcohólicas, permite un mejor control de la producción y la predicción del producto final (Gallone, *et al.*, 2016). Los primeros cultivos puros de levaduras cerveceras fueron desarrollados por Emil Christian Hansen entre 1881 y 1883 en el laboratorio de Cervecería Carlsberg (Guilliermond, 2003). Para utilizar cepas puras de levadura es necesario aislarlas y posteriormente identificarlas. El aislamiento de levaduras se puede

realizar a partir de bebidas alcohólicas en etapa fermentación (Andrade, 2006), frutas (Prahl, 2009) y animales (Tawfik *et al.*, 1989). Las levaduras no siempre se encuentran en ambientes libres de bacterias y otros hongos, así que el primer paso es utilizar medios que permitan restringir el crecimiento de hongos y bacterias (Kurtzman *et al.*, 2011). Las pruebas empleadas en la selección de levaduras se basan en las características requeridas en la producción de cerveza. Alves, *et al.*, (2008), Hazelwood *et al.*, (2010) y Bamforth (2003) consideran que los parámetros claves de las levaduras para la fermentación de cerveza son la capacidad para consumir los azúcares del mosto (maltosa 50-60%; maltotriosa 15-20%; glucosa 10-15%) y la capacidad para crecer en el mosto lupulado. Macedo-Araújo *et al.*, (2018) consideran la capacidad para flocular al final de la fermentación, como un criterio importante para la selección de levaduras cerveceras.

### 2.5.1 Floculación

La floculación es una característica de algunas levaduras, que permite la remoción de las células, después de la fermentación, de manera fácil y económica (Kerr *et al.*, 2018). Es de gran importancia en la industria de elaboración de cerveza ya que facilita la separación de las células del producto final, reduce costos y es amigable con el ambiente (Van Mulders *et al.*, 2010). El fenómeno de floculación consiste en la agregación de miles de células individuales en flóculos, los cuáles una vez formados, sedimentan rápidamente (Vidgren & Londesborough, 2011; Van Mulders *et al.*, 2009).

El mecanismo de la floculación aceptado actualmente es la adhesión (célula-célula) mediada por manoproteínas llamadas adhesinas parecidas a lectinas o floculinas. La interacción puede ser de tipo proteína-carbohidrato, y/o de tipo glicano-glicano. La interacción proteína-carbohidrato se da entre las floculinas que se unen a haptenos como manano-oligosacáridos o gluco-mananos que forman parte de otras manoproteínas presentes en la pared celular de células adyacentes (Patelakis *et al.*, 1998; Jin & Speers, 2000; Vidgren & Londesborough, 2011; Nayyar *et al.*, 2017). Recientemente Goossens *et al.* (2015) demostró que el mecanismo de adhesión (célula-célula) también puede ocurrir por interacciones glicano-glicano, las

cuales ocurren entre dos floculinas de células adyacentes adheridas a través de interacciones de glicanos N-glicosilados. El calcio es esencial para la floculación por cualquiera de los dos mecanismos de floculación, ya que interviene en la correcta conformación estructural para llevar a cabo las adhesiones (D'Hautcourt, O. & Smart, K., 1999; Goossens *et al.*, 2015). Las floculinas consisten en tres dominios estructurales: 1) N-terminal, involucrado con el reconocimiento del ligando; 2) C-terminal, involucrado en el anclaje por glicosilfosfatidilinositol (GPI); y 3) el dominio central que contiene varias secuencias repetidas en tándem (Zhao *et al.*, 2012; Goossens *et al.*, 2015). Las manoproteínas son proteínas muy abundantes en la pared celular, forman hasta 50% de la composición de la pared celular de *S. cerevisiae* (Boulton & Quain, 2006) y consisten en 90% manosa y 10% proteínas (Fleet, 1991). La floculación es un fenómeno reversible y los flóculos formados pueden disociarse con ayuda de un agente quelante que remueva los iones de calcio del medio, o bien con mono/disacáridos de manosa o glucosa (Patelakis *et al.*, 1998; Jin & Speers, 2000) los cuales compiten con los glicanos de la pared celular de las levaduras por los sitios de unión de las floculinas (Vidgren & Londesborough, 2011).

Las floculinas de las levaduras son productos de una familia de genes conocidas como genes *flo*. En *S. cerevisiae* se han identificado a los siguientes genes *flo*: *flo1*, *flo5*, *flo9*, *flo10*, *flo11*, *lg-flo1*, *flon1* y *flons* (Vidgren & Londesborough, 2011; Rossouw *et al.*, 2015) y recientemente se ha identificado variaciones del gen *flo1* (*flonf*) que generan un potencial de floculación muy alto (Westman, *et al.*, 2018). Los distintos genes *flo* codifican para proteínas distintas pero que comparten cierta identidad. Por ejemplo, FLO5, FLO9, FLO10 y FLO11 son 96, 95, 58 y 37% idénticas a la proteína FLO1 respectivamente. Se ha visto que floculinas largas, debido a un gran número de repetidos en tándem, tienen mayor fuerza de adhesión célula-célula (Van Mulders *et al.*, 2009, Vidgren & Londesborough, 2011). Asimismo, diferentes proteínas FLO cuentan con diferentes afinidades de unión a unidades de monosacáridos y oligosacáridos, los cuáles pueden o no contar con manosa (Willaert, 2018). Los antecedentes genéticos de los genes *flo* pueden cambiar en diferentes cepas (Vidgren & Londesborough, 2011), por ejemplo, Zhao, *et al.*, (2012)

estudiaron algunos genes *flo* en 16 cepas, y la mayoría de ellas contaron con los genes *flo1* y *flo11*, nueve con *flo5*, cinco con *flo9*, seis con *flo10* (Zhao, *et al.*, 2012). El fenotipo de floculación depende de la combinación y expresión de genes *flo* presente en las cepas (Vidgren & Londesborough 2011), pero también de los genes involucrados en la expresión de los genes *flo*, por ejemplo, *flo8*, cuya presencia es necesaria para que exista floculación. Muestra de lo anterior es la cepa S288C, comúnmente utilizada en laboratorios, la cual no tiene la capacidad de flocular (Zhao *et al.*, 2012; Soares, 2010), a pesar de que contiene los genes *flo1*, *flo5*, *flo9*, *flo10* y *flo11* (Van Mulders, 2009). Esto se debe a que tiene un defecto en el gen *flo8* (Soares, 2010). Existen dos principales fenotipos de floculación llamados Flo1 y NewFlo. La floculación de las cepas con fenotipo Flo1 es inhibida exclusivamente por manosa (Bayly *et al.*, 2005). En cambio, la floculación del fenotipo NewFlo es inhibida por diferentes carbohidratos, incluyendo manosa, glucosa, maltosa y sacarosa (Bayly *et al.*, 2005).

### 2.5.2 Atenuación

La densidad de la cerveza disminuye conforme avanza la fermentación, la levadura agota los azúcares fermentables y produce etanol. La densidad del mosto dulce normalmente se expresa en grados Brix (gramos de sólidos disueltos por cada 100 gramos de solución), pero también puede expresarse en gravedad específica (GE), la cual indica la densidad de una sustancia con respecto a la densidad del agua, a la misma temperatura;  $GE = \text{densidad de la sustancia} / \text{densidad del agua}$ . Un mosto con concentración de 10°B equivale a una gravedad específica de 1.040. El monitoreo de la gravedad específica de la cerveza verde (o en fermentación) es importante como indicador del correcto desempeño de las levaduras post-inoculación. La atenuación (%) se utiliza para medir la proporción de carbohidratos que han sido consumidos al final de la fermentación; asimismo evalúa qué tan completa fue la fermentación del mosto, y se expresa en porcentaje (White y Zainasheff, 2010). La atenuación depende de la composición del mosto (carbohidratos, aminoácidos y oxígeno disuelto), la cepa de levadura, la cantidad de inóculo, y parámetros como temperatura de fermentación, presión, tiempo, así como

de la capacidad de la levadura de consumir maltotriosa y otros azúcares del medio (Jin & Speers, 2000). Los valores de atenuación de la cerveza pueden sobreestimarse, debido a que los resultados de las mediciones de la gravedad específica de la cerveza verde, no se deben solamente a la desaparición de carbohidratos sino a la aparición de etanol, cuya densidad ( $0.789 \text{ g/cm}^3$  a  $20^\circ\text{C}$ ) es más baja que la del agua ( $0.998 \text{ g/cm}^3$  a  $20^\circ\text{C}$ ). Debido a esta situación se utiliza el término atenuación aparente, la cual otorga una idea de la variación de la densidad de la cerveza sin ser una medida exacta del consumo de azúcares (para lo cual tendría que destilarse el etanol). El límite de atenuación (LA) es la atenuación aparente máxima que una levadura es capaz de alcanzar. El LA se calcula en un cultivo con el mismo mosto de malta de cebada utilizado en la producción de la cerveza, pero en condiciones aerobias, temperatura más alta que la de fermentación ( $25^\circ\text{C}$ ), agitación vigorosa y exceso de biomasa. La intención de este ensayo es contar con el máximo consumo posible de azúcares y alcanzar la gravedad específica final más baja posible.

### **3. Antecedentes**

#### **3.1 Producción de mezcal y su relación con *S. cerevisiae***

Una de las líneas de investigación del Dr. Francisco Ruíz Terán (laboratorio 321, Alimentos y Biotecnología, Facultad de Química, UNAM) es el estudio de cepas *S. cerevisiae* aisladas del proceso de producción del mezcal. En el laboratorio 321, se han efectuado análisis taxonómicos (Andrade, 2006), determinación de diferencias moleculares a nivel de especie (Cova, 2010) y a nivel de cepa (Martínez, 2014), evaluación de la resistencia a condiciones de estrés (Martínez, 2014; Zavala-Nacul, 2013) y determinación de los compuestos volátiles producidos durante la fermentación de mostos de agave y mostos sintéticos (Espinosa, 2013; Geyer, 2015).

La NOM-070-SCFI-2016 define al mezcal como una bebida alcohólica destilada, elaborada a partir de la fermentación de los azúcares de magueyes maduros y cocidos (D.O.F., 2016). El proceso de elaboración de esta bebida

espirituosa involucra cuatro pasos principales: cocción del maguey, molienda, fermentación y destilación. Los magueyes contienen fructanos ramificados, los cuales son hidrolizados en la etapa de cocción para obtener los monosacáridos fructosa y glucosa (Alcazar-Valle *et al.*, 2019). La fructosa es el principal carbohidrato fermentable en la producción de mezcal (Walker & Stewart, 2016; Kirchmayr *et al.*, 2017) y la proporción de glucosa-fructosa obtenida en el mosto del maguey, posterior a su cocción, puede ser hasta de 1:20 (Miranda-Castilleja *et al.*, 2017). El maguey molido es colocado en tinas de madera donde se lleva a cabo una fermentación natural por medio de bacterias y levaduras autóctonas, que se encuentran en las tinas o que son depositados por diferentes vectores, tales como insectos, polvo, viento, herramientas y personal de producción. Los microorganismos involucrados en la fermentación forman un consorcio microbiano y llevan a cabo interacciones complejas que derivan en la producción de ácidos y/o alcoholes (Kirchmayr *et al.*, 2017; López-Álvarez, *et al.*, 2012). Estos últimos producen cambios en el pH y generan toxicidad, que a su vez ocasiona la aparición selectiva de microorganismos a lo largo del proceso de fermentación. La identidad de los microorganismos en las fermentaciones depende del tipo de agave utilizado, de la disponibilidad de nutrientes, resistencia a factores que restringen su crecimiento (Alcazar-Valle *et al.*, 2019), de las prácticas de limpieza e higiene del fabricante (Lachance, 1995), y de la etapa de fermentación (Páez-Lerma *et al.*, 2013; Lachance, 1995). Se han identificado las siguientes levaduras durante la fermentación de mostos de agave en el estado de Durango: *Kluyveromyces marxianus*, *Torulaspota delbrueckii*, *Candida diversa*, *Pichia fermentans*, *Hanseniaspora uvarum* y *Saccharomyces cerevisiae*, siendo esta última la levadura predominante al final de la fermentación (Páez-Lerma *et al.*, 2013). Por otro lado, en el estado de Oaxaca se han encontrado la predominancia de 4 especies de levaduras mezcaleras: *Pichia kudriavzevii*, *Pichia manshurica*, *S. cerevisiae* y *K. marxianus* (Nolasco-Cancino *et al.*, 2018). Las pruebas moleculares realizadas por Páez-Lerma *et al.*, (2013) mostraron que levaduras *S. cerevisiae* aisladas de destilerías de mezcal en México son filogenéticamente diferentes de otras levaduras *S. cerevisiae* aisladas de otras regiones del mundo, como Latino América y Europa.



## 3.2 Justificación

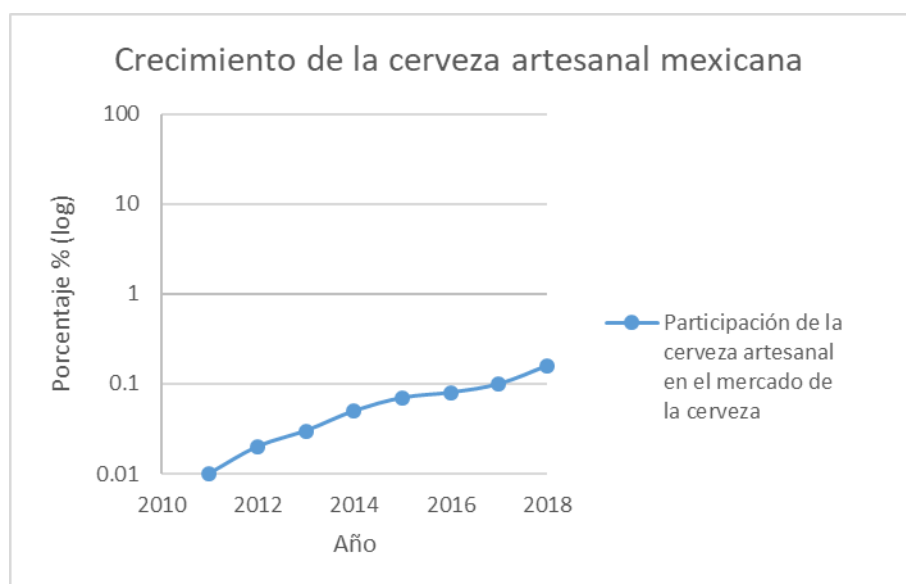
Hansen aisló y caracterizó diferentes especies y cepas de *Saccharomyces* (Ling, 1909) con las que obtuvo lotes piloto de diferentes características, algunas deseables y otras indeseables. Una de las cepas, denominada temporalmente como “Levadura No. 1”, mostró un desempeño convincente. Se trataba de una levadura *S. pastorianus* (*lager*) que fue elegida por Cervecería Carlsberg para la fabricación de sus lotes comerciales en 1883 (Guilliermond, 2003; Walther, *et al.*, 2014) y también fue comercializada a otras cervecerías (Walther, *et al.*, 2014; Polaina, 2002). La reproducibilidad “lote a lote” que permitía el uso de cepas puras, aunado al desarrollo científico del siglo XIX (Polaina, 2002), dieron lugar a la masificación de la producción de cerveza *lager* en Europa (Polaina, 2002; Boulton & Quain, 2006) y al dominio del mercado en Europa y Norte América. A pesar de que las técnicas de aislamiento de cepas puras fueron establecidas y publicadas por Hansen a finales del siglo XIX (Hansen, 1883), no fue sino hasta después de 1950 cuando los ingleses decidieron producir cerveza comercial con cultivos puros de *S. cerevisiae* (Boulton & Quain, 2006); así que el dominio histórico (hasta hoy en día) de la cerveza *lager* es, quizá, una consecuencia de la reticencia de los ingleses a la innovación. Recientemente, en 2015 se produjeron casi 200 mil millones de litros de cerveza en el mundo y el 89% fue cerveza *lager* (Gorter de Vries, *et al.*, 2019). Por esta razón las grandes cerveceras como AB InBev, Heineken o Carlsberg, han optado por invertir más recursos en investigación científica en el desarrollo de cervezas *lager*. En los últimos años, a pesar de que la producción de cerveza no ha disminuido (o se ha mantenido igual), la participación en el mercado de las cervezas industriales clásicas ha disminuido y su lugar está siendo ocupado por la “cerveza artesanal” (Meier-Dörnberg, *et al.*, 2017).

**Tabla 5.** Número de cervecerías independientes en México y Estados Unidos entre el 2010 y 2018. Se consideran cervecerías independientes locales, regionales, con exportación al extranjero y bares que producen su propia cerveza.

<b>País/Año</b>	<b>2010</b>	<b>2011</b>	<b>2012</b>	<b>2013</b>	<b>2014</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>
<b>México</b>	14	26	55	80	137	256	400	630	940
<b>EE.UU.</b>	1754	2016	2420	2898	3814	4628	5539	6490	7346

Existe una tendencia en el establecimiento de nuevas cervecerías independientes por todo el mundo. En el año 2018 el número de cervecerías independientes en EE.UU. era 8 veces más grandes que el de México (Tabla 5) (ACERMEX, 2018; Brewers Association, 2020). Esto se explica porque en EE.UU. el movimiento de la “cerveza artesanal” comenzó alrededor de los años 80, en México, después del año 2000. No tenemos una definición legal de “cervecería independiente” en México, pero *Brewers Association* (EE.UU.) la define con las siguientes características: 1) produce cerveza; 2) tiene una producción baja o limitada (menor a 7 millones de hectolitros al año); 3) es independiente, es decir, sus acciones no pueden pertenecer a una cervecería industrial (restringido a menos del 25%); 4) utiliza materias primas de alta calidad (malta) y pocos adjuntos (como sorgo, trigo o arroz); 5) utiliza adjuntos no para mejorar el margen de ganancia, sino para mejorar las características (sabor y apariencia) del producto final (Brewers Association, 2018). El movimiento de las cervecerías independientes puede atribuirse a dos factores: consumidor y empresario. Los consumidores desconfían con mayor frecuencia de las corporaciones grandes y, además, buscan una alternativa contra la insipidez y parecido de sabor entre las cervezas *lager*. Por otro lado, es cada vez más común que las personas emprendan, por ejemplo, en México la población joven está emprendiendo por falta de empleo (Canales, *et al.*, 2017). Asimismo, emprender va de la mano con el interés por la innovación y la experimentación. El mercado de la cerveza artesanal estadounidense es grande,

pues ocupa casi una cuarta parte (24%) del mercado de la cerveza en EE.UU. (Brewers Association, 2020). En México, el crecimiento de la oferta de cerveza artesanal tiene un comportamiento exponencial (Figura 3), y en 2018, de cada mil litros de cerveza producida en México, 1.5 litros fueron producidos por cervecerías independientes. Actualmente, el consumidor mexicano está dispuesto a pagar en promedio 3 veces más por litro de cerveza artesanal (ACERMEX, 2018).



**Figura 3.** Crecimiento de la participación en la producción de la cerveza artesanal independiente en México. La gráfica es una representación semi-logarítmica. Los datos en las ordenadas están en escala log. Datos recopilados de ACERMEX, (2018).

Las cervezas artesanales cuentan con sabores, apariencias y características distintivas, y generalmente se producen con cepas de fermentación alta, *S. cerevisiae*. Más del 80% de los compuestos aromáticamente activos son producidos por la levadura, y por lo tanto es el elemento que determina el perfil sensorial y aromático de la cerveza (Meier-Dörnberg, *et al.*, 2017). Diversos estudios han demostrado el potencial de levaduras no-convencionales para la producción de cerveza (De Francesco *et al.*, 2015; Marongiu *et al.*, 2014; Michel *et al.*, 2016b;

Domizio *et al.*, 2016; Macedo-Araújo *et al.*, 2018). Por ejemplo, se han encontrado cepas de *S. cerevisiae*, aisladas de diferentes destilerías de cachaza, con características apropiadas para producir cerveza (Macedo-Araújo *et al.*, 2018). La industria cervecera utiliza a algunas cepas de levaduras por razones históricas, más que por motivos científicos (Steensels *et al.*, 2012) y en este contexto el uso de las levaduras aisladas de fuentes hidroalcohólicas, diferentes al mosto de malta de cebada, como el jugo de maguey fermentado, puede ser una opción para el desarrollo de nuevos productos. Diferentes levaduras *S. cerevisiae*, aisladas del proceso de producción del mezcal, se han caracterizado a nivel de cepa y se ha demostrado su potencial biotecnológico como cultivos iniciadores en la fermentación de maguey (Ruíz-Terán *et al.*, 2018). Se ha encontrado que son capaces de tolerar pH bajo (valor de 3), osmolaridad (concentración de 30% de carbohidratos), temperatura de 37°C y 42°C, así como concentración de 12% de etanol v/v. Asimismo, tienen una eficiencia de conversión de carbohidratos en etanol alrededor del 60%, rendimiento de etanol con respecto al sustrato de aproximadamente 0.30 p/p, y la capacidad de producir alcoholes superiores y ésteres (Ruiz-Terán *et al.*, 2018). Estas cepas tienen adaptación al mosto de maguey, consumo de fructosa, temperaturas ambientales alrededor de los 40°C, pH bajo (4), entre otros factores (Ruiz-Terán *et al.*, 2018; Nolasco-Cancino *et al.*, 2018). Las propiedades de estas cepas *S. cerevisiae* nativas del mezcal podrían representar una oportunidad para explorar su capacidad y aplicación en la producción de cerveza. Lachance (1995), encontró que tres cuartas partes de las levaduras *S. cerevisiae* que aisló de la fermentación de jugo de maguey utilizaban maltosa (Lachance, 1995), el carbohidrato más importante en el mosto de malta para la producción de cerveza. Es posible elegir entre levaduras cerveceras clásicas de las cuáles se conocen sus características, condiciones ideales de crecimiento y los productos de fermentación esperados (White & Zainasheff, 2010; BSI, s.f.). Sin embargo, el desarrollo de nuevas cervezas involucra la búsqueda y caracterización de levaduras no tradicionales para conseguir nuevos aromas y sabores que resulten en cervezas alternativas o nuevos estilos (Michel, *et al.*, 2016b). En este estudio se evalúa la capacidad de 19 cepas *S. cerevisiae* nativas del mezcal (Nolasco-Cancino,

*et al.*, 2018; Ruiz-Terán, *et al.*, 2018) para la fermentación de mosto de malta para la producción de cerveza. Las cepas *Saccharomyces cerevisiae* de estudio están habituadas a un ambiente con fructosa, glucosa y oligosacáridos derivados de fructanos; producen alcohol y pueden utilizar sacarosa como fuente de carbono. Estas cepas se expondrán a maltosa y maltotriosa, azúcares inusuales para ellas.

## 4. Hipótesis

Las cepas *Saccharomyces cerevisiae* de estudio serán capaces de consumir maltosa debido a que las levaduras del género *Saccharomyces* usualmente tienen la maquinaria celular para utilizarla como fuente de carbono, pero no podrán consumir maltotriosa, un azúcar que incluso algunas cepas cerveceras no pueden metabolizar. Derivado del menor rendimiento de consumo de azúcares, producirán menor cantidad de etanol que una cepa *Saccharomyces cerevisiae* cervecera, y producirán un espectro distinto de compuestos volátiles derivados de la fermentación.

## 5. Objetivos

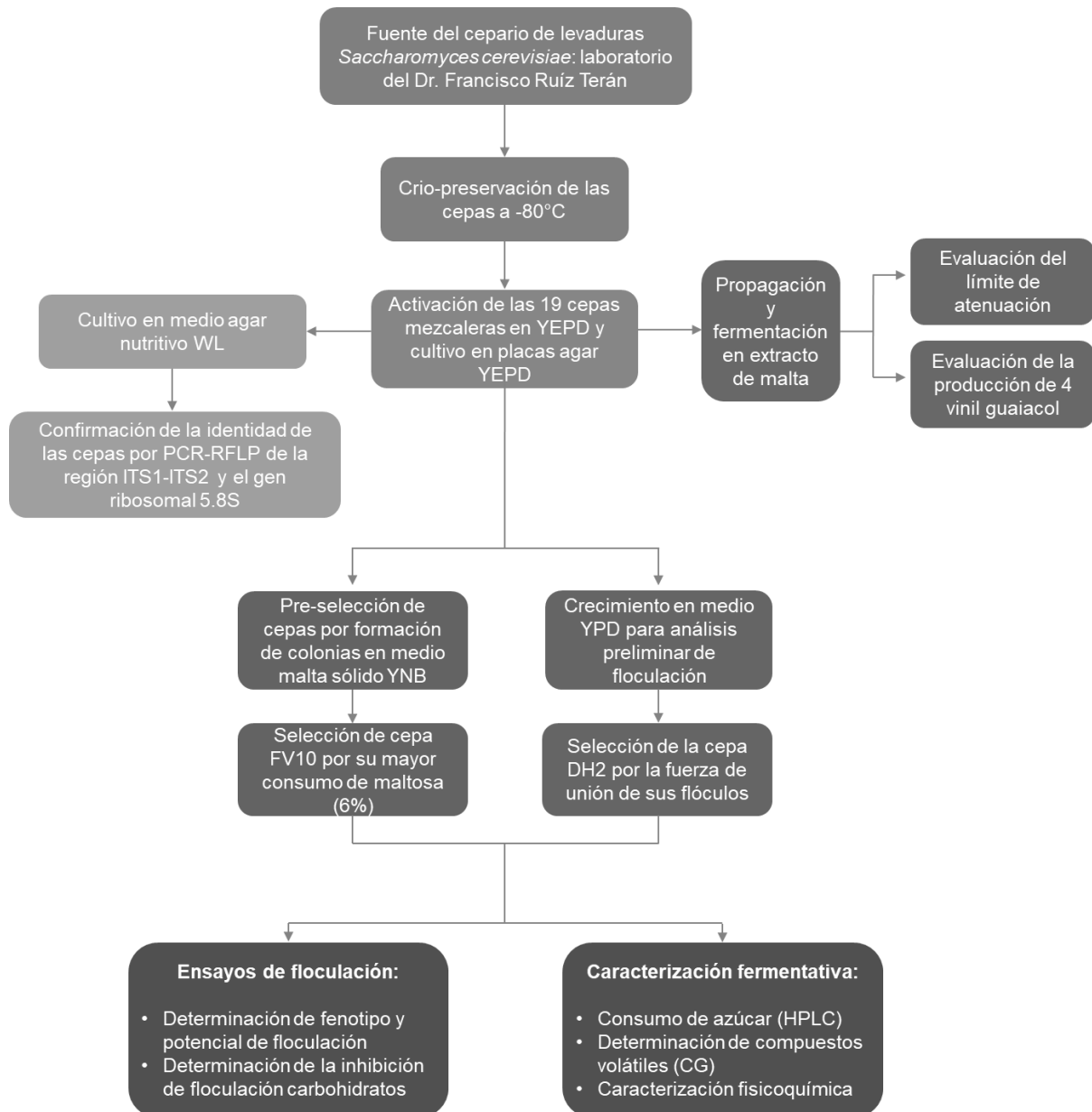
### 5.1 Objetivo general

Evaluar la producción de cerveza con cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* aisladas del proceso de fermentación de jugo de agave.

### 5.2 Objetivos particulares

1. Seleccionar a las mejores candidatas para la producción de cerveza, de acuerdo con su consumo de maltosa y fenotipo de floculación.
2. Evaluar las características fermentativas (límite de atenuación, consumo de azúcares, pH, crecimiento en maltosa) de las cepas seleccionadas.
3. Determinar cuáles metabolitos de fermentación producen las levaduras seleccionadas en mosto de malta de cebada en condiciones de fermentación tipo *a/e*.
4. Determinar la potencial de floculación de las cepas seleccionadas.
5. Evaluar si los carbohidratos del mosto de cebada inhiben la floculación de las cepas seleccionadas.

## 6. Estrategia experimental





## 7. Materiales y métodos

### 7.1 Levaduras

En este estudio se emplearon 19 cepas *S. cerevisiae* (Tabla 6) obtenidas del laboratorio 321 del Departamento de Alimentos y Biotecnología de la Facultad de Química, UNAM. Las cepas se aislaron de la fermentación del jugo de maguey para la elaboración de mezcal y se identificaron por análisis PCR-RFLP y secuenciación del dominio D1/D2 del ADN ribosomal 26S (Martínez-Zepeda, 2014; Nolasco-Cancino *et al.*, 2018; Ruiz-Terán *et al.*, 2018).

**Tabla 6.** Nombres/códigos de las cepas de levaduras de estudio y su origen.

Nombre de cepas	Especie	Origen (Municipio de Oaxaca)
CH-01	<i>S. cerevisiae</i>	San Baltazar Guelavila, Tlacolula
CH-02	<i>S. cerevisiae</i>	
CH-03	<i>S. cerevisiae</i>	
CH-07	<i>S. cerevisiae</i>	
DH-1	<i>S. cerevisiae</i>	
DH-2	<i>S. cerevisiae</i>	Santiago Matatlán, Tlacolula
DI-01	<i>S. cerevisiae</i>	
DI-03	<i>S. cerevisiae</i>	
DI-10	<i>S. cerevisiae</i>	
DI-11	<i>S. cerevisiae</i>	
DI-12	<i>S. cerevisiae</i>	San Baltazar Chichicapam, Ocotlán
DI-14	<i>S. cerevisiae</i>	
PA-16	<i>S. cerevisiae</i>	
PA-18	<i>S. cerevisiae</i>	
FV-10	<i>S. cerevisiae</i>	
FV-11	<i>S. cerevisiae</i>	Santa Catarina Minas, Ocotlán
LC-12	<i>S. cerevisiae</i>	
LC-14	<i>S. cerevisiae</i>	Santa María Ecatepec, Yautepec
ZA-06	<i>S. cerevisiae</i>	
FF-07	<i>S. cerevisiae</i>	Magdalena Tequisistlán, Tehuantepec

## 7.2 Reactivación de levaduras.

Previo a este estudio, las levaduras se mantenían preservadas en caldo YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica, 2% dextrosa) con 30% de glicerol a -80°C. Para su cultivo, las cepas se descongelaron a temperatura ambiente, y se tomaron 20 µL de la suspensión y se sembraron en 5 mL de caldo YEPD. Los cultivos se crecieron en condiciones aerobias con agitación (Lab-Line, MA, USA) a 150 rpm durante 48 h a temperatura ambiente. Después del crecimiento celular, la suspensión se resembró en placas de agar YEPD (1% extracto de levadura, 2% peptona bacteriológica, 2% dextrosa, 2% agar) mediante el método de estría en placa, y los cultivos se incubaron a 30°C por 3 días. Las placas se utilizaron inmediatamente o se almacenaron en refrigeración (4°C).

## 7.3. Cultivo en agar nutritivo WL (WLN)

Se confirmó la pureza de las colonias de levaduras desarrolladas en las placas de agar YEPD, por medio de resiembras en placas de agar nutritivo WL (Wallerstein Laboratory; Difco™). Este medio de cultivo permite diferenciar algunas especies por medio de la distinta coloración que adquieren las colonias sobre el agar (Priest & Campbell, 2003; Verdugo-Valdez *et al.*, 2011). Cinco colonias de cada cepa fueron resembradas en este medio de cultivo, y las placas se incubaron a 30°C por 3 días.

## 7.4 Confirmación de la identidad de *Saccharomyces cerevisiae*

Se realizó una prueba confirmatoria de la identidad de las cepas como *S. cerevisiae*, mediante el análisis PCR-RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) de la región de los espaciadores transcritos internos (ITS1 e ITS2) y el gen ribosomal 5.8S, y la posterior comparación de los perfiles de restricción con información disponible en trabajos publicados (Esteve-Zarsozo *et al.*, 1999) para su identificación.

### 7.4.1 Extracción de ADN

Cada cepa se cultivó en 5 mL de caldo YEPD, se incubó a temperatura ambiente con una agitación (Lab-Line, MA, USA) de 150 rpm durante 24 h. Del cultivo obtenido se tomó 1.5 mL y se transfirió a un tubo *Eppendorf*, el cual se centrifugó a 20,000 x g a 4°C durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el *pellet* celular se recuperó para la extracción de ADN, siguiendo el protocolo descrito por Santiago-Urbina (2015). Cada *pellet* de las distintas cepas, se resuspendió en 200 µL de buffer de ruptura (2% de triton X-100, 1% de SDS, 100 mM de NaCl, 10 mM de Tris pH 8, 1 mM de EDTA pH 8), se añadió 0.3 gramos de perlas de vidrio (0.42-0.6 mm de diámetro) y 200 µL de solución PCI (fenol-cloroformo-alcohol isoamílico: 25:24:1 v/v; Sigma-Aldrich). Se agitó en *vortex* durante un min. y posteriormente se centrifugó a 20,000 x g a 4°C durante 10 min. A continuación, se agregó 200 µL de buffer TE (10 mM de Tris, 1 mM de EDTA pH 7.6) y se centrifugó a 20,000 x g a 4°C por 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo *Eppendorf* estéril y el ADN se precipitó añadiendo 1 mL de etanol (96% v/v) frío. Se centrifugó a 20,000 x g a 4°C por 10 min., el *pellet* de ADN recuperado se lavó con etanol frío al 70% y el tubo se dejó abierto toda la noche para que la muestra de ADN se seque. Se resuspendió la muestra de ADN en 50 µL de agua desionizada estéril durante media hora a temperatura ambiente, se añadió 1 µL de ARNasa (Invitrogen), se incubó a 37°C por 30 min. y se almacenó a -20°C hasta su uso.

### 7.4.2 PCR

Se amplificó la región 5.8S-ITS del ADN ribosomal de las levaduras de estudio mediante PCR. Los cebadores utilizados fueron ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). La reacción se llevó a cabo en un volumen final de 35 µL: buffer 1x, 2.25 mM de MgCl<sub>2</sub>, 100 µM de dNTPs, 0.5 µM de cada uno de los cebadores, 1.25 U de ADN polimerasa *Taq* (Invitrogen) y 40 ng del ADN. La PCR se realizó en un termociclador PIKO 24 (Thermo Scientific, Vantaa, Finland) bajo las condiciones descritas por Estevez-Zarzoso *et al.* (1999). La amplificación se confirmó mediante una electroforesis en gel de agarosa (Invitrogen) al 1%, conteniendo 0.7 µg/mL de bromuro de etidio (Bio-

Rad). Se mezclaron diez  $\mu\text{L}$  de amplicón con 1.5  $\mu\text{L}$  de buffer de carga 2x (Invitrogen) y la mezcla se cargó en los pozos del gel; se utilizó un marcador de peso molecular 100 pb DNA ladder de Invitrogen. El gel se corrió en buffer TBE 0.5x (44.5 mM de Tris, 44.5 mM de ácido bórico, 1 mM de EDTA) a 100 V durante 90 min y se fotografiaron bajo luz ultravioleta transiluminada (Gel Doc XR). El análisis del tamaño de las bandas de ADN se llevó a cabo utilizando el programa Image Lab™ software.

### 7.4.3 Restricción de los fragmentos amplificados

Los productos de PCR de la región ITS1-5.8S-ITS2, se cortaron usando las enzimas de restricción *Hae* III, *Hha* I y *Hinf* I, siguiendo la metodología descrita por Santiago-Urbina, (2015). 11.5  $\mu\text{L}$  del producto de PCR se mezcló con 1.5  $\mu\text{L}$  de buffer 10x, 0.2  $\mu\text{L}$  de enzima de restricción (2 U) y 1.8  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril. La mezcla de reacción se incubó por 3.8 h a 37°C. Los fragmentos de restricción se analizaron por electroforesis en gel de agarosa al 2% conteniendo 0.7  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de bromuro de etidio (Bio-Rad), en buffer TBE 0.5X. El tamaño de los fragmentos se determinó usando un marcador de peso molecular (100 pb, Invitrogen). Para la identificación de las levaduras, se compararon los patrones de restricción de cada cepa con información previamente publicada por Esteve-Zarzoso *et al.*, (1999).

## 7.5 Pre-selección de cepas con potencial para la producción de cerveza

Se estableció un procedimiento de pre-selección para las 19 cepas de levaduras que consistió en tres ensayos: 1) identificación de la capacidad de producción de 4VG; 2) determinación de la atenuación máxima aparente en mosto de extracto de malta de todas las cepas y; 3) determinación de crecimiento colonial de las cepas en placas de agar con maltosa (1%) como única fuente de carbono, YNB (Yeast Nitrogen Base; base nitrogenada de levadura sin aminoácidos. BD DIFCO®) como fuente de vitaminas y sales inorgánicas.

### 7.5.1 Producción de 4 vinil guaiacol (4VG).

Las cepas se propagaron en 5 mL de caldo YEPD a partir de los cultivos en placa agar YEPD. Se recuperó la biomasa de cada cepa y se cultivó a una tasa de  $10^7$  cél/mL en 5 mL de mosto con (EM) 10°B. El crecimiento se llevó a cabo en condiciones anaerobias y temperatura ambiente (aproximadamente 25°C) por 7 días. Transcurrido el tiempo de fermentación, se tomaron muestras, se congelaron a -20°C hasta su uso. La determinación de 4VG se llevó a cabo con el protocolo descrito en el apartado 7.8.3.

### 7.5.2. Cálculo de Límite de Atenuación

Para la prueba de LA, se cultivó cada cepa en 5 mL de caldo YEPD y los cultivos se propagaron a temperatura ambiente, condiciones aerobias y agitación (Lab-Line, MA, USA) de 150 rpm por 48 h. El primer cultivo se transfirió a 50 mL de mosto de malta 11°B, concentración que fue medida con un refractómetro (ATAGO, Japan) para una segunda propagación en las mismas condiciones. La biomasa generada con los cultivos anteriores se inoculó en 200 mL de mosto de malta (11°B) y las condiciones de la prueba fueron temperatura ambiente, condiciones aerobias y agitación a 150 rpm por una semana. La densidad del mosto dulce, y del mosto fermentado se determinaron con un hidrómetro (Brannan™, UK). Para calcular la atenuación aparente (%) se convirtieron las gravedades específicas (GE) en puntos de gravedad específica (PGE):  $PGE = 1000 * (GE - 1)$ . La atenuación aparente o LA se calcularon con la siguiente fórmula (Huuskonen, *et al.*, 2010):

$$\text{Atenuación aparente (\%)} = [(PGEM - PGEF) / PGEM] * 100$$

PGEM = Puntos de gravedad específica del mosto.

PGEF = Puntos de gravedad específica final (de la cerveza).

### 7.5.3. Consumo de maltosa

Con la finalidad de confirmar el crecimiento de las levaduras en maltosa como única fuente de carbono, las cepas se cultivaron en agar con 1% de maltosa (Alves *et al.*, 2007) y YNB. Las placas se incubaron a 30°C en condiciones aerobias.

## 7.6. Selección de levaduras

Las levaduras pre-seleccionadas se sometieron a crecimiento en maltosa, como única fuente de carbono, en concentraciones de 2 y 6% p/v y se determinó el fenotipo preliminar de floculación de todas las cepas.

### 7.6.1. Crecimiento en maltosa

Esta prueba se llevó a cabo en condiciones aerobias, en tubos con 5 mL de maltosa al 2 y 6% (p/v) como única fuente de carbono y YNB como fuente de vitaminas y sales inorgánicas. Se eligieron las concentraciones de 2 y 6% porque la primera es una concentración muy baja de maltosa y la segunda es la máxima concentración de maltosa que se puede encontrar en el mosto de cebada. Las cepas que fueron capaces de formar colonias en el medio selectivo agar maltosa/YNB fueron tomadas y cultivadas en tubos con 5 mL de caldo YEPD a temperatura ambiente, con agitación (Lab-Line, MA, USA) de 150 rpm por dos días. A partir de este cultivo, las células fueron lavadas y se inocularon  $5 \times 10^6$  cél/mL en 5 mL de medio selectivo maltosa (MSM) al 2% y se incubaron por 4 días a temperatura ambiente con agitación de 150 rpm. El crecimiento de las levaduras se comparó por medio del cambio en la densidad óptica determinada a 600 nm. A partir de las células que crecieron en MSM (2%), se inocularon  $5 \times 10^6$  cél/mL en 5 mL de MSM al 6%, el cultivo se incubó por 4 días a temperatura ambiente con una agitación de 150 rpm. El crecimiento de las levaduras en MSM (6%) se determinó por medio del cambio en la densidad óptica estimada a 600 nm. A partir de esta prueba, se seleccionó a la cepa que presentó mayor crecimiento en MSM (6%).

### 7.6.2. Prueba preliminar de floculación

La prueba preliminar de floculación de las levaduras se llevó a cabo para determinar si alguna de las cepas *S. cerevisiae* destacaba por su fenotipo de floculación. El protocolo se llevó a cabo de la siguiente manera: se tomó una colonia de cada cepa cultivada en agar YEPD y se inoculó en un tubo con 5 mL de caldo YEPD. El crecimiento se llevó a cabo a temperatura ambiente, con agitación (Lab-Line, MA, USA) de 150 rpm, en condiciones aerobias por 48 h. Se permitió la sedimentación de los cultivos por 24 h y posteriormente, la biomasa sedimentada se resuspendió suavemente, o en algunos casos se empleó un *vortex* para resuspender los flóculos con mayor fuerza de unión. Se seleccionó a la cepa de levadura con unión de sedimento más vigorosa para su futura caracterización.

### 7.7 Curva estándar de número de células

Para las pruebas de fermentación y floculación en condiciones aerobias, se construyeron curvas estándar para las cepas DH2, FV10 y la cepa de referencia WLP001 (*Saccharomyces cerevisiae*, California Ale Yeast, Whitelabs, CA, USA). Se preparó una suspensión de levaduras y las células se contaron con una cámara de Neubauer observadas al microscopio (Anexo 2). Asimismo, se determinó la absorbancia de la suspensión celular (600 nm) usando un espectrofotómetro (Cintra 101). Con esta información se construyeron curvas que relacionan el número de células/mL en función de la densidad óptica (Anexo 3).

### 7.8 Ensayos de fermentación

Para realizar las pruebas de fermentación se seleccionaron las cepas FV10, DH2 y la cepa de referencia WLP001.

### 7.8.1. Preparación del mosto, propagación, inoculación y condiciones de fermentación.

Los experimentos de fermentación se llevaron a cabo de acuerdo con siguiente procedimiento: las cepas FV10, DH2 y WLP001 se cultivaron en 5 mL de caldo YEPD por 48 h a temperatura ambiente y agitación (Lab-Line, MA, USA) a 150 rpm. Con la finalidad de generar biomasa, el pre-inóculo se vertió en 250 mL de medio extracto de malta 8°B por 72 h en condiciones similares hasta obtener biomasa con una viabilidad de al menos 90% (Anexo 2) (White & Zainasheff, 2010). La cepa WLP001 se usó como referencia, esta cepa ha sido previamente identificada como *S. cerevisiae* (Berner *et al.*, 2013), su atenuación máxima aparente varía entre 73 y 80% (White Labs, s.f.a), produce pocos ésteres, alcoholes superiores y no genera 4VG, es decir se considera una “fermentadora limpia” (Fix & Fix, 1997).

El material para la fermentación (tubos enchaquetados, tapones y material de muestreo) se esterilizó previamente para cada ensayo. La fermentación del mosto se realizó en tubos enchaquetados con recirculación (Figura 4). El mosto de malta (11°B), no lupulado, se inoculó con una suspensión de levaduras para una concentración inicial de  $1.1 \times 10^7$  cél/mL y se utilizó un tapón de goma para promover un cierre hermético y un ambiente anaerobio. Previo al inicio de la fermentación el mosto se agitó vigorosamente para promover la solubilización de oxígeno en el medio, ya que el oxígeno es necesario como nutriente para las levaduras (White & Zainasheff, 2010). La liberación de dióxido de carbono se reguló con el uso de una trampa de aire “*airlock*” (Figura 4). La fermentación se llevó a cabo en condiciones tipo *ale* a 21°C y se implementó agitación a 150 rpm para promover un proceso más rápido (Nienow *et al.*, 2011). La agitación durante la fermentación se implementó debido a que, durante la estandarización de los ensayos, se obtuvieron fermentaciones lentas.

La prueba de fermentación se realizó en tubos enchaquetados con recirculación de 450 mL de mosto. El monitoreo de la fermentación se evaluó midiendo el consumo de azúcares, células en suspensión y pH los días 1, 2, 3, 4, 5,



8 y 11. La concentración de etanol y compuestos volátiles se determinó en los días 7 y 11. Las muestras fueron analizadas inmediatamente o almacenadas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La atenuación aparente en los ensayos de fermentación, se calculó midiendo la gravedad específica del mosto y la gravedad específica de la cerveza fermentada con un hidrómetro (Brannan<sup>TM</sup>, UK), y se utilizó la fórmula de atenuación aparente del apartado 7.5.2.



**Figura 4.** Para la fermentación del mosto de extracto de malta, se utilizaron tubos enchaquetados con tapones de goma y *airlocks* para la liberación de dióxido de carbono. La fermentación se controlaba con ayuda de un sistema de recirculación de agua a  $21^{\circ}\text{C}$  y se llevó a cabo por triplicado.

### 7.8.2. Determinación de azúcares

Para la determinación de la concentración de azúcares (glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa) se empleó un cromatógrafo de líquidos (Waters 2414) equipada con una columna de exclusión de iones Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm) (BIO-RAD, USA) y un detector de índice de refracción (Waters 2414, Massachusetts, USA). La fase móvil fue una solución de ácido sulfúrico 4 mM, a un flujo de 0.6 mL/min. Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 12,000 x g durante 10 min., posteriormente, el sobrenadante se filtró con una membrana millipore de  $0.45\ \mu\text{m}$  y se inyectaron 10  $\mu\text{L}$  de muestra. Cada uno de los azúcares se identificó mediante la comparación de los tiempos de retención de estándares

certificados (Sigma-Aldrich). Para determinar la concentración de cada uno de los azúcares, se realizó una curva estándar de cada analito (Anexo 4).

### 7.8.3. Cuantificación de compuestos volátiles

Las muestras fueron descongeladas y centrifugadas a 12,000 x g durante 10 min., posteriormente, el sobrenadante se filtró con una membrana millipore de 0.45  $\mu\text{m}$  para obtener 1 mL de muestra colectado en viales especiales para el equipo de cromatografía, se añadió hexanol (10 mg/L) como estándar interno.

Para la técnica de cromatografía de gases/FID se utilizó un cromatógrafo de gases (CG) 6890N (Agilent) equipado con inyector (250°C) Split 1:5, detector de ionización de llama (FID) (250°C) y una columna Optima Wax (Macherey-Nagel) empacada, 0.25 mm diámetro interno, 60 m y 0.25  $\mu\text{m}$  de grosor de la película. El modo de operación fue inyección automática directa y las condiciones de operación fueron similares a las utilizadas por Ibañez Baltazar, (2013): flujo de hidrógeno a 40 mL/min, aire a 400 mL/min y nitrógeno a 28.3 mL/min. El horno se programó a una temperatura de 40°C por 5 min.; rampa de 5°C/min hasta 140°C por 5 min.; rampa de 10°C/min hasta 240°C por 10 min.

Los compuestos volátiles identificados fueron: isopropanol, isobutanol, alcohol amílico, alcohol isoamílico, alcohol fenético, acetato de etilo, acetato de isoamilo, hexanoato de etilo, octanoato de etilo, acetato de feniletilo, acetaldehído, diacetilo, 4 vinil guaiacol y etanol. Su identificación se realizó por medio de la comparación de los tiempos de retención obtenidos de estándares. La concentración de los analitos se expresó por medio de las áreas obtenidas normalizadas con el área del hexanol (estándar interno) para cada compuesto.

### 7.8.4. Análisis estadístico

Las medias de las áreas de los compuestos volátiles se analizaron mediante el método LSD (diferencia mínima significativa) con un  $\alpha = 0.05$ , usando el software Statgraphics Centurion XVI.

### 7.8.5. Determinación de pH y células en suspensión

El pH de las muestras se determinó con ayuda de un potenciómetro (pH-meter AB15, Accumet). Las soluciones buffer de calibración utilizadas fueron a pH de 4, 7 y 10. Las muestras para la determinación de células en suspensión fueron centrifugadas a 12,000 x g durante 10 min. y el *pellet* obtenido se resuspendió en agua destilada. Las células fueron contadas usando una cámara de Neubauer y microscopio (Carl Zeiss), y con ayuda de las curvas estándares construidas.

## 7.9. Pruebas de floculación en condiciones aerobias

Se empleó la prueba de floculación sugerida por *The American Society of Brewing Chemists* (Bendiak *et al.*, 1996) con algunas modificaciones. La habilidad de un cultivo de levaduras para flocular (potencial de floculación) se mide con la proporción de levaduras que sedimentan en condiciones estáticas. A una suspensión homogénea de levaduras (y de cantidad conocida) se le permite reposar, y después de cierto periodo de tiempo, se estima la cantidad de células que se encuentran suspendidas (densidad óptica) y eso se utiliza para calcular la proporción de células que han sedimentado. Se emplearon tres soluciones: La solución de lavado con sulfato de calcio en agua destilada (0.51g/L); la solución de floculación con sulfato de calcio (0.51 g/L), acetato de sodio (6.8 g/L) y ácido acético (4.05 g/L) con pH de 4.5; y la solución de desfloculación con ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5M con pH de 7.

### 7.9.1. Cuantificación del potencial de floculación

Este análisis se llevó a cabo para las cepas FV10, DH2 y WLP001. Se transfirieron 10 mL de un cultivo propagado en mosto EM (11°B) por 3 días, a dos tubos *falcon* de 15 mL marcados como tubo A y tubo B. El tubo A se centrifugó a 900 x g por 2.5 min. y el sobrenadante se eliminó. El *pellet* se resuspendió en 9.9 ml de agua y 0.1 mL de solución de desfloculación; la mezcla se homogenizó utilizando un *vórtex* por 15 segundo. De esta suspensión se tomó un mililitro y se mezcló con 9 mL de agua y se determinó la absorbancia a 600 nm. El tubo B se centrifugó a 900 x g por 2.5 min. y el sobrenadante se eliminó, el *pellet* obtenido se

resuspendió en 10 mL de solución de lavado, la mezcla se homogenizó con un *vórtex* por 15 segundos y posteriormente se centrifugó a 900 x g por 2.5 min. El sobrenadante se eliminó y el *pellet* se resuspendió en 10 mL de solución de floculación. La suspensión se homogenizó por 15 segundos usando un *vortex*. Luego, el tubo se agitó por inversión lentamente cinco veces durante 15 segundos. El tubo se colocó verticalmente durante 6 min., sin perturbar su contenido. Transcurrido el tiempo de reposo, se tomó 1 mL de la parte superior, se mezcló en 9 mL de agua, se agitó con *vórtex* y se midió la absorbancia a 600 nm.

### 7.9.2. Determinación de la inhibición de la floculación por azúcares

Para esta prueba, se utilizaron glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa y manosa (Sigma Aldrich). Se prepararon 20 diferentes soluciones de floculación de la misma forma señalada en el apartado 7.9.1. Cada solución de floculación tenía uno de los 5 carbohidratos a una concentración de 1 M, 500 mM, 100 mM o 20 mM, como lo sugirió Van Mulders *et al.*, (2009). Con ayuda del procedimiento descrito en el apartado 7.9.1, y el uso de cada una de las 20 soluciones de floculación con carbohidratos, se determinó si los azúcares inhibieron la floculación de las cepas FV10, DH2 y WLP001. En la Tabla 7 se muestran las concentraciones en mM y g/100 mL de cada solución de carbohidratos preparada.

**Tabla 7.** Concentración de azúcares (g/100 mL) utilizadas en las soluciones de floculación de los ensayos de inhibición de la floculación por carbohidratos.

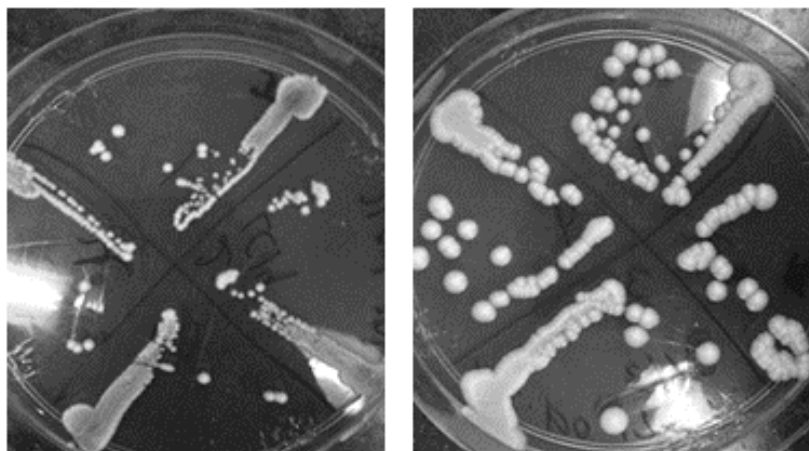
<b>Azúcar/Concentración (milimolar)</b>	<b>20 mM</b>	<b>100 mM</b>	<b>500 mM</b>	<b>1000 mM</b>
Manosa	0.36	1.8	9	18
Fructosa	0.36	1.8	9	18
Glucosa	0.36	1.8	9	18
Sacarosa	0.68	3.4	17.1	34.2
Maltosa	0.68	3.4	17.1	34.2

## 8. Resultados y discusión

### 8.1. Cultivo de las cepas y confirmación de su identidad molecular

#### 8.1.1. Reactivación de las cepas en caldo y agar YEPD

Las colonias aisladas en placas de agar YEPD presentaron una morfología típica de *S. cerevisiae* (Naiman-Ali & Mazharuddin-Khan, 2014) lisas, circulares, con bordes enteros o irregulares, de color blanco/crema y convexas o montañosas (Figura 5). Encontrar desarrollo de colonias con morfologías lisas fue un buen indicador, ya que las morfologías rugosas están frecuentemente asociadas con levaduras derivadas de procesos de fermentación desfavorables (Reis, *et al.*, 2013).



**Figura 5.** Colonias de levaduras en placas de agar YEPD. La imagen del lado izquierdo son colonias de la cepa LC-14, mientras que la imagen del lado derecho son colonias de la cepa CH-3.

La morfología de las diferentes cepas en agar YPED no es similar, lo cual podría indicar que son cepas diferentes. Estudios previos realizados por Ruiz-Terán *et al.* (2018) agruparon a estas 19 cepas de *S. cerevisiae* con base a sus fragmentos delta, y las clasificaron en 12 grupos: a) CH2, b) FV11 y FV10, c) ZA6, d) CH1, CH7 y CH3, e) DI3, f) LC12, g) FF7, h) DH1 y DH2, i) LC14, j) DI3 y DI12, k) DI14, DI10 y DI11, l) PA18.

LC-14 es una cepa diferente al resto de las levaduras de estudio por su huella genética de ADN (Ruiz-Terán *et al.*, 2018), pero también por el atípico pequeño tamaño de sus colonias, las cuales podían identificarse a simple vista y no crecían más de lo mostrado en la Figura 5, a pesar de ser incubadas por más de 7 días a 25°C. El tamaño de las colonias de LC-14 podría deberse a una mutación en la mitocondria que ocasiona un fenotipo de colonias pequeñas denominado *petit* (Cox, 1995). La presencia de *petits* en la fermentación de la cerveza puede generar estancamientos en la velocidad de fermentación, bajo crecimiento celular, cambios de floculación, así como elevados niveles de diacetilo y alcoholes superiores (Boulton & Quain, 2006), por lo que si LC-14 fuera una cepa *petit* no sería una buena candidata para su selección como cepa cervecera. El siguiente paso fue cultivar a todas las cepas en un medio que permitiera identificar diferencias más claras entre las cepas, en medio agar nutritivo WL.

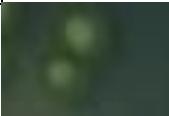
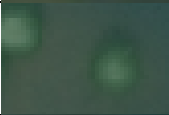
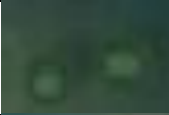
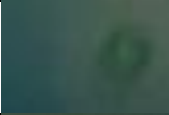
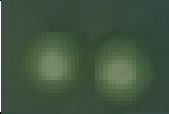

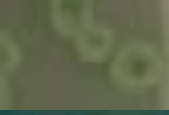

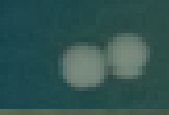
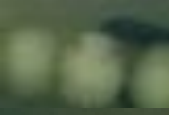
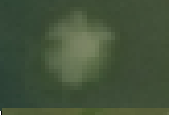

### 8.1.2. Cultivo de levaduras en agar nutritivo WL

El agar nutritivo WL (WLN) es recomendado para el control de fermentaciones industriales (Santiago-Urbina, 2015), particularmente en la fabricación de cerveza, además de ser ideal para diferenciar entre especies y cepas de levaduras (Priest & Campbell, 2003; Verdugo-Valdez *et al.*, 2011). El agar WLN contiene verde de bromocresol, un indicador ácido-base de color amarillo a un pH menor a 3.8, azul a un pH mayor a 5.4 y verde a un pH entre 3.8 y 5.4 (Chemical land 21 s.f.). Las levaduras *S. cerevisiae* captan el verde de bromocresol, algunas cepas son capaces de metabolizarlo (forman colonias color crema) (Yokobson, 2010), o de acuerdo con el nivel de acidificación, desarrollan colonias que varían de tonalidades entre amarillo/crema, verde pálido, verde intenso o verde/azul (Yokobson, 2010; Priest & Campbell, 2003). En la Tabla 8 se presentan las características morfo-coloniales de las cepas de estudio cultivadas en agar WLN. La morfología de las colonias de las cepas de estudio se clasificó de acuerdo con lo descrito por Hall, (1971) y Naiman-Ali & Mazharuddin-Khan, (2014): forma circular o puntiforme, margen entero o irregular y elevación ligeramente convexa, o

montañosa. Adicionalmente también se tomó en cuenta el color desarrollado por las colonias.

Todas las cepas de estudio desarrollaron colonias lisas. Las cepas DI1, ZA6, PA18, CH2, DI10 y LC14 desarrollaron colonias características, es decir, no se parecieron a las colonias del resto de las cepas. Este resultado coincide con la agrupación realizada por Ruiz-Terán *et al.*, (2018) con excepción de la cepa DI10, la cual es una cepa que comparte huella genética, 100% de similitud, con DI11 y DI14. Estas tres cepas desarrollaron colonias con exactamente el mismo color, pero DI11 y DI14 formaron algunas colonias enteras y algunas irregulares en la misma placa, en cambio DI10 desarrolló cepas exclusivamente irregulares (Tabla 8). El desarrollo de diferentes morfologías de una sola cepa, como el caso de DI11 y DI14, puede explicarse por la capacidad de *S. cerevisiae* de diferenciarse en distintos patrones celulares, llamado patrón de células fúngicas (Piccirillo *et al.*, 2010). Por otro lado, hubo formación de colonias idénticas en los siguientes grupos: FV11 y FV10; CH1, CH3 y CH7; DH1 y DH2; DI3 y DI12. Esto coincide, una vez más con la agrupación realizada por Ruiz-Terán *et al.*, (2018). La cepa LC12 creció en medio agar WLN con características muy similares a la cepa FF7, a pesar de ser cepas con huellas genéticas que difieren en 35% (Ruiz-Terán *et al.*, 2018). Los resultados anteriores muestran que las colonias de las cepas pueden compartir morfología y color a pesar de no ser la misma cepa, o pueden variar en morfología a pesar de ser determinadas como la misma cepa, como el caso de DI10 con DI11 y DI14. Una vez más, LC14 forma colonias extrañas. En este caso fue la única cepa puntiforme con diferentes tamaños de colonias y diferentes colores.

**Tabla 8.** Características de las colonias de levaduras desarrolladas en placas con agar nutritivo WL.

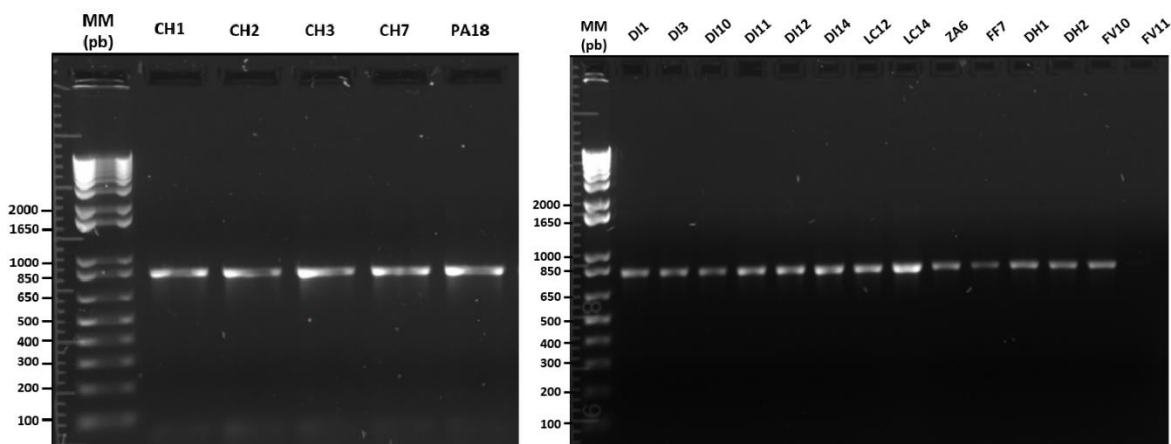
Morfología			Color	Referencia de color	Cepas	Imagen*
Forma	Márgen	Elevación				
Circular	Entero	Convexa	Contorno delgado verde azulado intenso con centro color crema grisáceo	PMS 3308	DI1	
			Contorno delgado verde azulado con centro color crema grisáceo	PMS 553	FV10, FV11	
			Contorno delgado verde con centro color crema	PMS 3435	ZA6	
			Colonia casi totalmente verde con centro crema	PMS 3435	PA18	
	Montañosa	Entero	Contorno grueso verde y centro color verde lima	PMS 350	DB3, DI12	
			Contorno grueso verde azulado y centro color crema grisáceo	PMS 343	CH1, CH3, CH7	
			Contorno grueso color crema con algunas colonias con centro verde olivo/café	PMS 378	DH1, DH2	
			Contorno color crema grisáceo con centro color crema	NA	LC12, FF7	
	Ligeramente convexa	Ligeramente convexa	Colonias color crema uniformes	NA	CH2	
	Entero e irregular	Montañosa	Halo delgado color verde lima con centro crema	PMS 575	DI11, DI14	
Irregular	Montañosa	Halo delgado color verde lima con centro crema	PMS575	DI10		
Puntiforme	Entero e irregular	Ligeramente convexa	Algunas colonias grandes, otras en formas de puntos con colores crema, verde pálido a verde intenso	NA	LC14	

\* El tamaño de las colonias de las diferentes fotografías no es comparable.



### 8.1.3. Identificación molecular de levaduras

La confirmación de la identidad de las cepas de levaduras se realizó mediante un análisis PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal. Todos los amplicones mostraron un tamaño de 850 pares de bases (Figura 6), este tamaño del producto amplificado es común en *S. cerevisiae* (Esteve-Zarsozo *et al.*, 1999). En la Tabla 9 se muestra un ejemplo de los tamaños de los fragmentos de restricción, los cuales se compararon con los perfiles obtenidos en publicaciones anteriores (Esteve-Zarsozo *et al.*, 1999, Zavala-Nacul, 2013), demostrando que las cepas corresponden a *S. cerevisiae*. Ruiz-Terán *et al.* (2018) y Nolasco-Cancino *et al.* (2018) también confirmaron que estas levaduras aisladas de la fermentación natural del mezcal corresponden a *S. cerevisiae*. La identificación de estas cepas ha sido confirmada por medio de la secuenciación del dominio D1/D2 del gen ribosomal 26S y depositada en las bases de datos del GenBank (número de acceso KT875211; Nolasco-Cancino *et al.*, 2018).



**Figura 6.** Productos de PCR de la región ITS1-ITS2 y el gen ribosomal 5.8S de las cepas de *S. cerevisiae* aisladas del mezcal.

**Tabla 9.** Tamaño de los amplicones y los fragmentos de restricción obtenidos a partir de la región ITS-5.8S de las cepas de *S. cerevisiae* del mezcal.

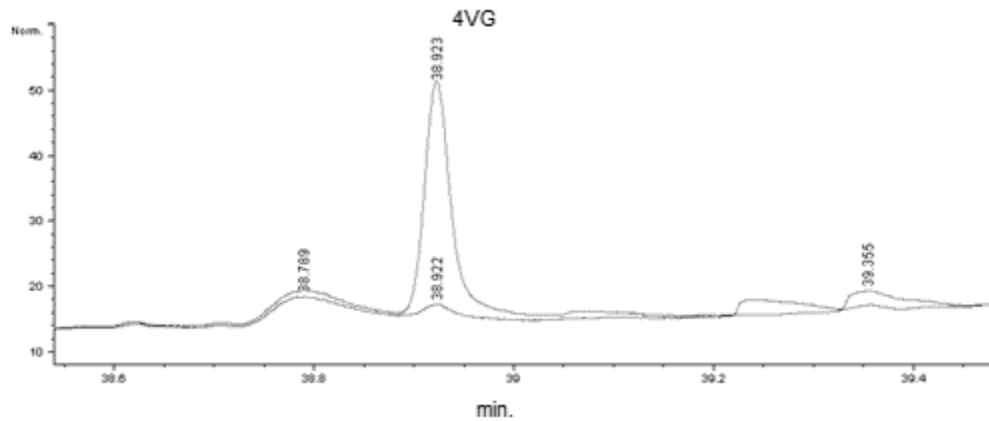
Cepa	Amplicón (pb)	Fragmentos de restricción (pb)			Especie identificada
		<i>Hae III</i>	<i>Hinf I</i>	<i>Hha I</i>	
FV10	850	320 + 230 + 170 + 130	360 + 360 + 130	370 + 330 + 140	<i>S. cerevisiae</i>

Todas las cepas estudiadas presentaron el mismo perfil de restricción con las enzimas *Hae III*, *Hinf I* y *Hha I*, en esta tabla, solo se presenta a la cepa FV10 como ejemplo.

## 8.2. Pre-selección de las cepas de *S. cerevisiae* con potencial para la producción de cerveza

### 8.2.1. Producción de 4 vinil guaiacol

Las cepas *S. cerevisiae* silvestres comúnmente producen 4 vinil guaiacol (4VG) (Thurston & Tubb, 1981). El 4VG, es un compuesto indeseable en algunos estilos de cerveza, pero admisible en otros estilos (Coghe *et al.*, 2004). El análisis de 4VG se llevó a cabo determinando su tiempo de retención en el cromatógrafo de gases. Se hizo una corrida con una cerveza sin 4VG control (Sol, Heineken) y posteriormente se realizó otra corrida con la misma cerveza a la que se le agregó 2 ppm de 4VG. El tiempo de retención del 4VG se determinó en 38.922 min. (Figura 7). Esta prueba se realizó de manera cualitativa, ya que no importó la cantidad de 4VG producido, sino la capacidad de las cepas para producirlo.



**Figura 7.** Cromatograma de 4VG. Las señales obtenidas al min. 38.92, corresponden al 4VG. El pico corto (38.922 min.) pertenece a la señal detectada en la cerveza Sol (Heineken), mientras que el pico grande (38.923 min.) pertenece a la misma cerveza con adición de 2 ppm de 4VG.

Se detectó la presencia de 4VG en todos los mostos fermentados por las 19 cepas de estudio. Se utilizó a la cerveza Sol (Heineken México) ya que es una cerveza estilo *american light lager* y la presencia de 4VG está descartada (BJCP, 2015). Debido a que todas las cepas de estudio produjeron 4VG se buscó otro método de selección de levaduras.

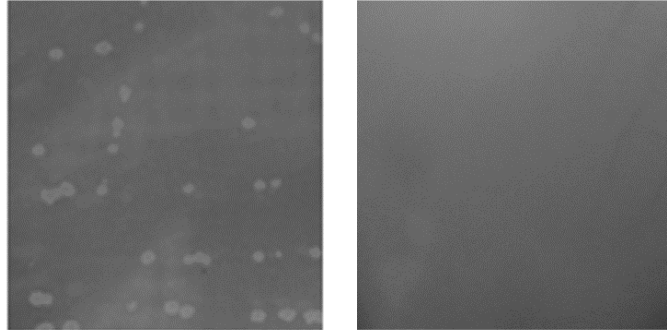
### 8.2.2. Pruebas de Límite de Atenuación

Las cepas de estudio se sometieron a la prueba de atenuación aparente máxima y alcanzaron valores de entre 15 y 20%, con excepción de LC14 con 11%. Estos resultados de Límite de Atenuación son muy bajos (White & Zainasheff, 2010), ya que los valores de atenuaciones que se buscan en las cepas cerveceras son, de al menos, 70% (Lentz *et al.*, 2014). Las bajas atenuaciones aparentes obtenidas, podrían deberse a la incapacidad de las cepas de consumir los azúcares fermentables del mosto, como maltosa y maltotriosa.

### 8.2.3. Formación de colonias en placa maltosa/YNB

Debido a los resultados bajos de atenuación mostrados por las cepas del mezcal, se evaluó la capacidad de utilizar maltosa como única fuente de carbono, ya que uno de los principales parámetros en la selección de levaduras no convencionales para la producción de cerveza, es la capacidad para consumir los azúcares del mosto (Michel *et al.*, 2016b). La composición promedio de azúcares fermentables en las maltas cerveceras es 12% glucosa y fructosa, 5% sacarosa, 65% maltosa, 17.5% maltotriosa (Boulton & Quain, 2006). Las cepas han demostrado consumir glucosa, fructosa y sacarosa de forma aerobia, y fermentar glucosa y fructosa (Ruiz-Terán *et al.*, 2018). En esta prueba, todas las cepas de estudio fueron cultivadas en agar maltosa/YNB, pero sólo las cepas LC-12, LC-14, DI-01, DI-03, DH2, FV-10 y CH-01 desarrollaron colonias que se esparcieron por el medio agar maltosa/YNB a 30°C (Figura 8), demostrando su capacidad para crecer en maltosa como única fuente de carbono. Para que se llevara a cabo la formación de colonias, las cepas *S. cerevisiae* de estudio debieron consumir maltosa, la única fuente de carbono. Se ha identificado que colonias con poca densidad de levaduras ronda los  $1.1 \times 10^5$  células (Joseph & Hall, 2004). Si asumiéramos que la cantidad de células en las colonias formadas por las 7 cepas de estudio era 10 veces menor al número propuesto por Joseph & Hall, (2004), es decir 10,000 células por colonia, el crecimiento sería imposible sin el consumo de una fuente de carbono.

El resto de las cepas también crecieron en el medio agar maltosa/YNB, pero formaron pocas colonias aisladas o crecieron solamente en la zona donde comenzó el estriado. La eficiencia de la fermentación del mosto de malta de cebada está relacionada con la capacidad de las cepas de levaduras para fermentar los azúcares (Macedo-Araújo *et al.*, 2018). Esta prueba de cultivo en agar maltosa/YNB, permitió la discriminación de las cepas que no lograron esparcirse en todo el medio a pesar de que se utilizó suficiente biomasa distribuida por toda la placa.



**Figura 8.** El cultivo en medio maltosa/YNB de la cepa PA18 (derecha) no creció. La cepa LC12 (izquierda), fue una de las cepas que lograron crecer distribuidas por todo el medio agar maltosa/YNB.

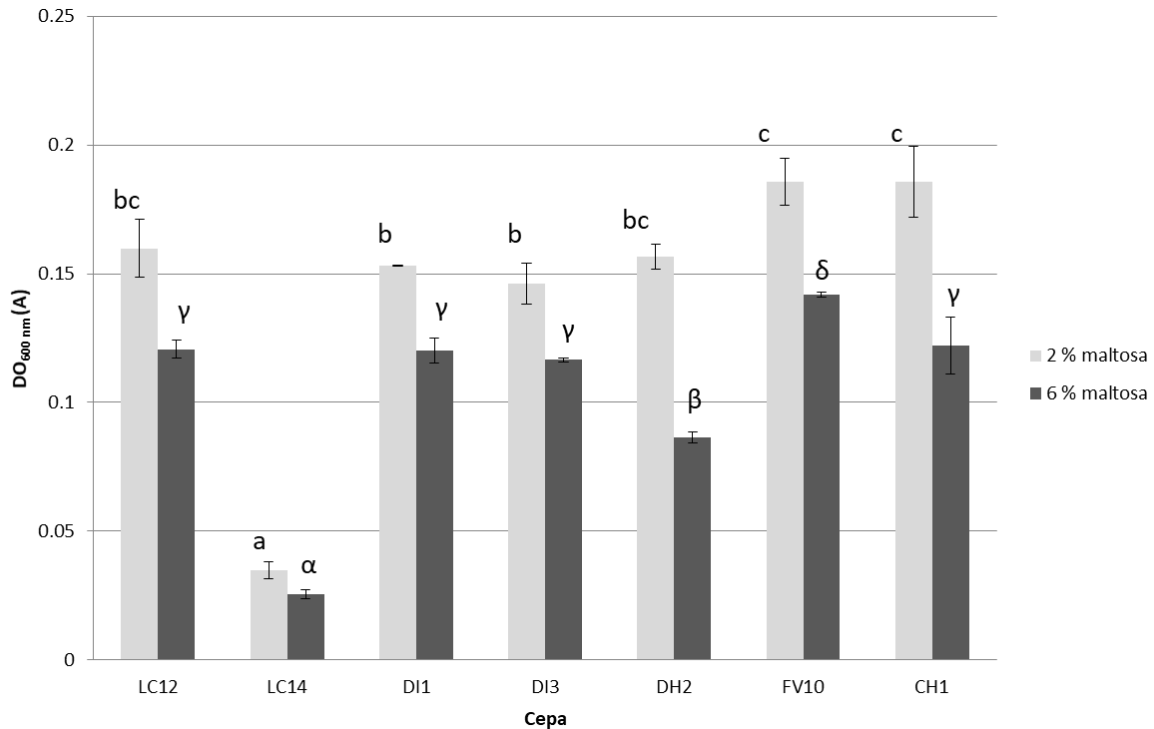
No todas las cepas agrupadas con el mismo perfil de fragmentos delta, son capaces de esparcirse por el medio agar maltosa/YNB. Por ejemplo, CH-01, CH-03 y CH-07, mostraron un porcentaje de similitud de sus fragmentos deltas del 100%, sin embargo, solo CH-01 fue capaz de formar múltiples colonias esparcidas por todo el medio. Esta diferencia en la formación de colonias en agar maltosa/YNB puede deberse a la diferencia en la capacidad de transporte e hidrólisis de la maltosa por parte de las diferentes cepas. Se ha estudiado previamente la capacidad de *S. cerevisiae* de incrementar su afinidad a la maltosa (Jansen *et al.*, 2004). La fermentación anaerobia de maltosa tiene menor rendimiento energético que la fermentación de la glucosa (1.5 moléculas de ATP en lugar de 2 moléculas de ATP por cada molécula de glucosa) (de Kok, *et al.*, 2011), por lo que maltosa no es el azúcar preferido por *S. cerevisiae*. Otra posibilidad en la diferencia de formación y esparcimiento colonial, es la expresión de *flo11*, un gen asociado a la adherencia en superficies abióticas (Voordeckers, *et al.*, 2012).

### 8.3. Selección de cepas de *S. cerevisiae* con potencial para la producción de cerveza

Las cepas LC-12, LC-14, D1-01, DI-03, DH2, FV-10 y CH-01 formaron colonias en placas con agar maltosa/YNB, demostrando así su capacidad de consumir maltosa como única fuente de carbono en condiciones aerobias. Estas siete cepas fueron sometidas a prueba de crecimiento en maltosa en medio líquido con 2 y 6% de maltosa con YNB (sección 8.3.1). Adicional a esto, las 19 cepas se sometieron a prueba preliminar de floculación (Sección 8.3.2) para determinar su potencial para sedimentar y ser separadas al final de la fermentación.

#### 8.3.1. Prueba de crecimiento en maltosa/YNB

La prueba en placas agar maltosa/YNB permitieron identificar que al menos 7 cepas de estudio pueden consumir maltosa como única fuente de carbono en condiciones aerobias (8.2.3). Estas 7 cepas de estudio se sometieron a cultivos en dos concentraciones de maltosa como única fuente de carbono, 2 y 6% p/v (Figura 9). Está reportado previamente la evaluación de la DO a 600 nm como indicador del crecimiento celular para la evaluación del consumo de maltosa (Lee *et al.*, 2011).



**Figura 9.** Crecimiento ( $DO_{600\text{ nm}}$ ) de las cepas de levaduras en caldo con 2 y 6% de maltosa. En gris oscuro se muestra el crecimiento de las cepas en medio con 2% de maltosa y en gris claro se muestra el crecimiento de las cepas en medio con 6% de maltosa. Las mismas letras indican que no existen diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ , LSD) entre el crecimiento de las cepas en la misma concentración de maltosa. Las letras a, b, c se utilizaron para los experimentos de 2% de maltosa y las letras  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  para los experimentos de 6% de maltosa.

No hubo diferencias significativas en el crecimiento a 2% de maltosa, con excepción de LC14, en términos de absorbancia, pero en el cultivo 6% de maltosa, la cepa con mayor crecimiento fue FV10 (Figura 9), mostrando diferencia estadísticamente significativa al comparar las medias del crecimiento ( $DO_{600\text{ nm}}$ ). La cepa FV10 fue seleccionada para futuros experimentos, debido a su posible potencial para utilizar maltosa.

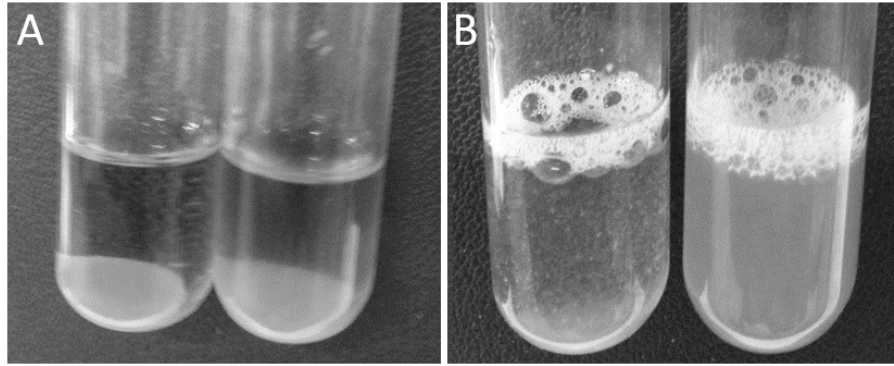
### 8.3.2. Prueba preliminar de floculación

Esta prueba se basó el trabajo realizado por Van Mulders, *et al.*, (2009), quienes identificaron dos fenotipos de floculación muy particulares en cepas de *S. cerevisiae* cultivadas en medios líquidos. El primer fenotipo consiste en cepas *S. cerevisiae* que forman flóculos que no se separan fácilmente, ni siquiera con el uso de *vortex*. El segundo fenotipo lo presentan cepas que forman flóculos grandes al mezclar suavemente y que se resuspenden homogéneamente en el medio al ser agitadas vigorosamente.

En este estudio se demostró que todas las cepas aisladas del mezcal tienen la capacidad de flocular y sedimentar con al menos un día de reposo, tras el consumo de la glucosa en tubos con 5 mL de medio YEPD caldo. La cepa DH2 demostró un fenotipo de floculación fuerte, ya que forma grumos compactos y difíciles de resuspender aún con el uso de *vortex* (Figura 10). DH2 presentó mayor capacidad de floculación que el resto de las cepas de mezcal bajo las condiciones aerobias del estudio. El fenotipo de floculación que presenta la cepa DH2, la convierte en una fuerte candidata para el proceso de producción de cerveza, considerando que además de la sedimentación, las células dentro del floculo están protegidas de las diferentes sustancias tóxicas del mosto verde, lo que puede permitir su reutilización en fermentaciones posteriores (Vidgren & Londesborough 2011).

En la Figura 10 se muestran cultivos de las cepas DH2 y CH1 en dos diferentes condiciones. La Figura 10A, muestra a los cultivos con las células sedimentadas por más de un día (formación de *pellet* depositado en la parte inferior de los tubos). La Figura 10B, muestra a los cultivos 10 segundos después de haber sido agitados vigorosamente con ayuda de un *vortex*. En la Figura 10B se nota la capacidad de DH2 de comenzar a formar flóculos y sedimentar (el medio de cultivo es visiblemente menos turbio) rápidamente.





**Figura 10.** Floculación en condiciones aerobias de las cepas DH2 y CH1 en medio YEPD incubadas por 2 días a temperatura ambiente y 150 rpm. A: tubos depositados verticalmente sin alterar el depósito de levadura (tubo izquierdo es medio con DH2, tubo derecho es el medio con CH1). B: tubos agitados vigorosamente por 10 segundos (tubo izquierdo es medio con DH2, tubo derecho es el medio con CH1).

DH1 y DH2, mostraron tener un 100% de identidad en las pruebas de fragmentos delta, sin embargo, no cuentan con la misma capacidad de floculación. Múltiples estudios han demostrado que la floculación es propensa a ser inestable (Chester, 1963, Gilliland, 1971, Donnelly & Hurley, 1996). Debido a su peculiar fenotipo de floculación, DH2 también fue seleccionada para los siguientes experimentos.

#### 8.4. Fermentación de mosto con las cepas de *S. cerevisiae* seleccionadas

Las cepas FV10 y DH2, dos cepas diferentes, determinadas por sus fragmentos delta (Ruiz-Terán *et al.*, 2018), fueron seleccionadas para los ensayos de fermentación de mosto. Además, la cepa FV10 fue seleccionada por su capacidad de generar mayor biomasa que el resto de las cepas en maltosa 6% como única fuente de carbono. Mientras que, la cepa DH2 fue seleccionada por su capacidad de formar flóculos y sedimentar rápidamente. Los ensayos de fermentación se prologaron por 11 días (264 h) ya que las fermentaciones comerciales tipo *ale*, con mostos con densidad de 11°B (ATAGO, Japan), no duran

más de 7 días (White & Zainasheff, 2010), y el tiempo restante de 4 días se consideró como tiempo para maduración.

#### 8.4.1. Consumo de azúcares

La Tabla 10 muestra la concentración de los azúcares fermentables presentes en el mosto de cebada utilizado para los ensayos de fermentación. Los azúcares fermentables monitoreados durante la fermentación fueron maltosa, maltotriosa, sacarosa, glucosa y fructosa. En la Tabla 11 se muestra la concentración aproximada de dextrinas y azúcares solubles no fermentables presentes en el mosto (aprox. 2.07°B) calculada como la diferencia de la concentración inicial del mosto (11°B) y la suma de la concentración inicial de los azúcares fermentables (8.93°B). La concentración de sacarosa encontrada en el extracto de malta fue de 3.8 g/100 mL, y es alta en comparación con lo reportado en los mostos de malta para la fabricación de cerveza (Tabla 1). La concentración alta de sacarosa, se identificó en dos diferentes proveedores de extracto de malta de cebada (Maltexco y Briess), y quizá se deba a que los proveedores agregan sacarosa para aumentar el potencial de dulzor del extracto ya que este producto también es utilizado en repostería.

**Tabla 10.** Concentración de azúcares fermentables del mosto de extracto de malta de cebada (Briess) determinado mediante cromatografía de líquidos.

Azúcar fermentable	Concentración* (g/100 mL)	Desviación estándar
Maltosa	2.01	0.75
Maltotriosa	1.45	0.078
Sacarosa	3.88	0.142
Glucosa	1.45	0.047
Fructosa	0.14	0.009
<b>Total promedio</b>	<b>8.93</b>	

\*La determinación de la concentración de azúcares se realizó por triplicado, se muestra el promedio.

**Tabla 11.** Concentración de azúcares solubles en el mosto de extracto de malta de cebada.

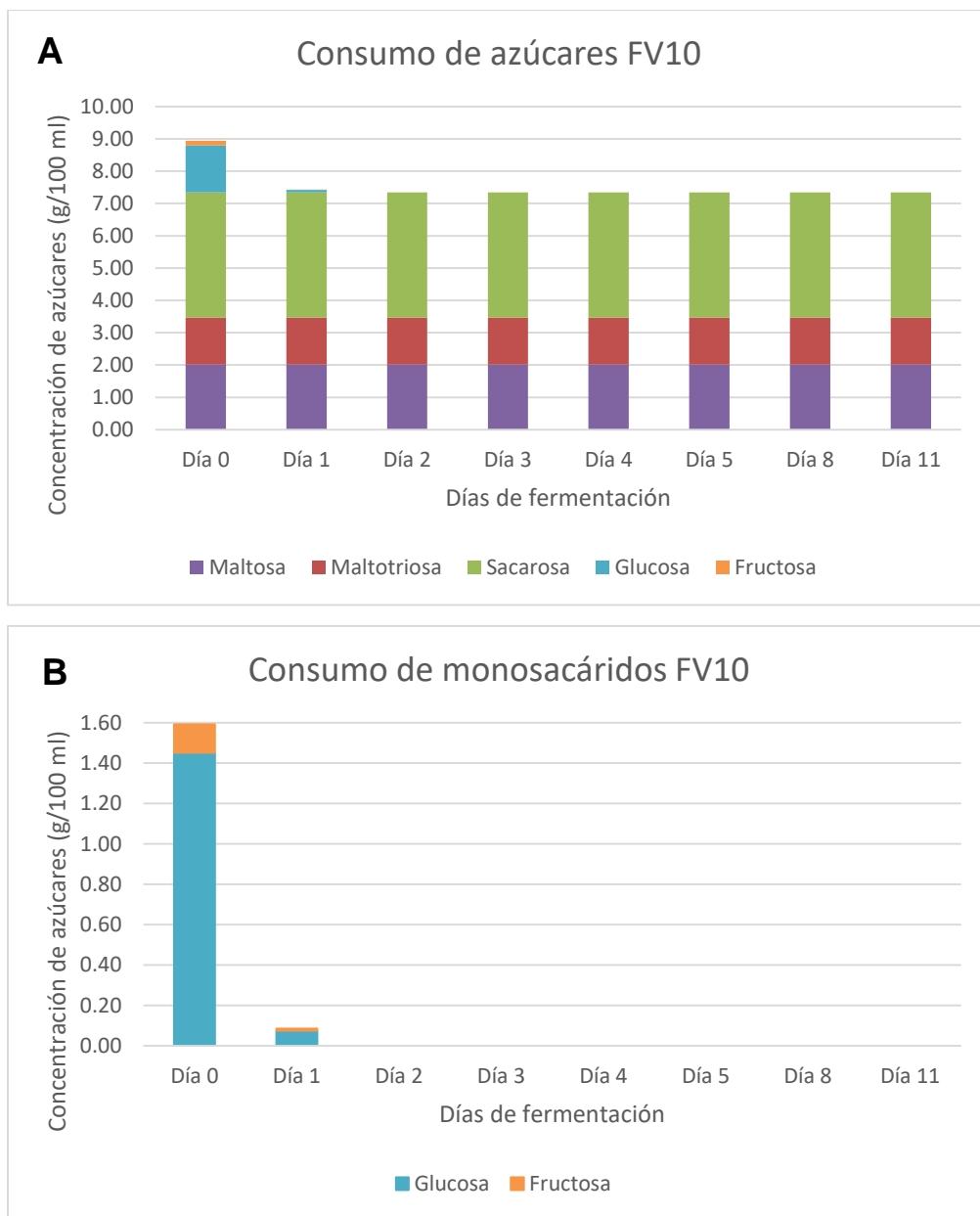
<b>Mosto de extracto de malta de cebada</b>	<b>°B</b>	<b>Gravedad específica</b>
Concentración total de azúcares solubles	11	1.044
Concentración inicial de azúcares fermentables	8.93	1.036
Concentración de dextrinas y azúcares solubles no fermentables*	2.07	1.008

\*El cálculo de las dextrinas y azúcares solubles no fermentables se realizó con la diferencia de la densidad total del mosto y la densidad total de los azúcares fermentables.

El control positivo tuvo un rendimiento de consumo de azúcares fermentables del 77%, mientras que FV10 y DH2 de 18 y 22%, respectivamente. El rendimiento de consumo de azúcares del control positivo WLP001 debió de ser de 100% pero no fue así porque no consumió la maltosa y dejó fructosa residual (0.02 g/100 mL) (Figura 13). Las cepas del mezcal tuvieron un rendimiento muy bajo de consumo de azúcar debido a su bajo consumo de sacarosa (solo la cepa DH2 consumió 10% de la sacarosa total), y a su incapacidad para consumir maltosa y maltotriosa (Figuras 11 y 12).

#### *8.4.1.1. Consumo de monosacáridos*

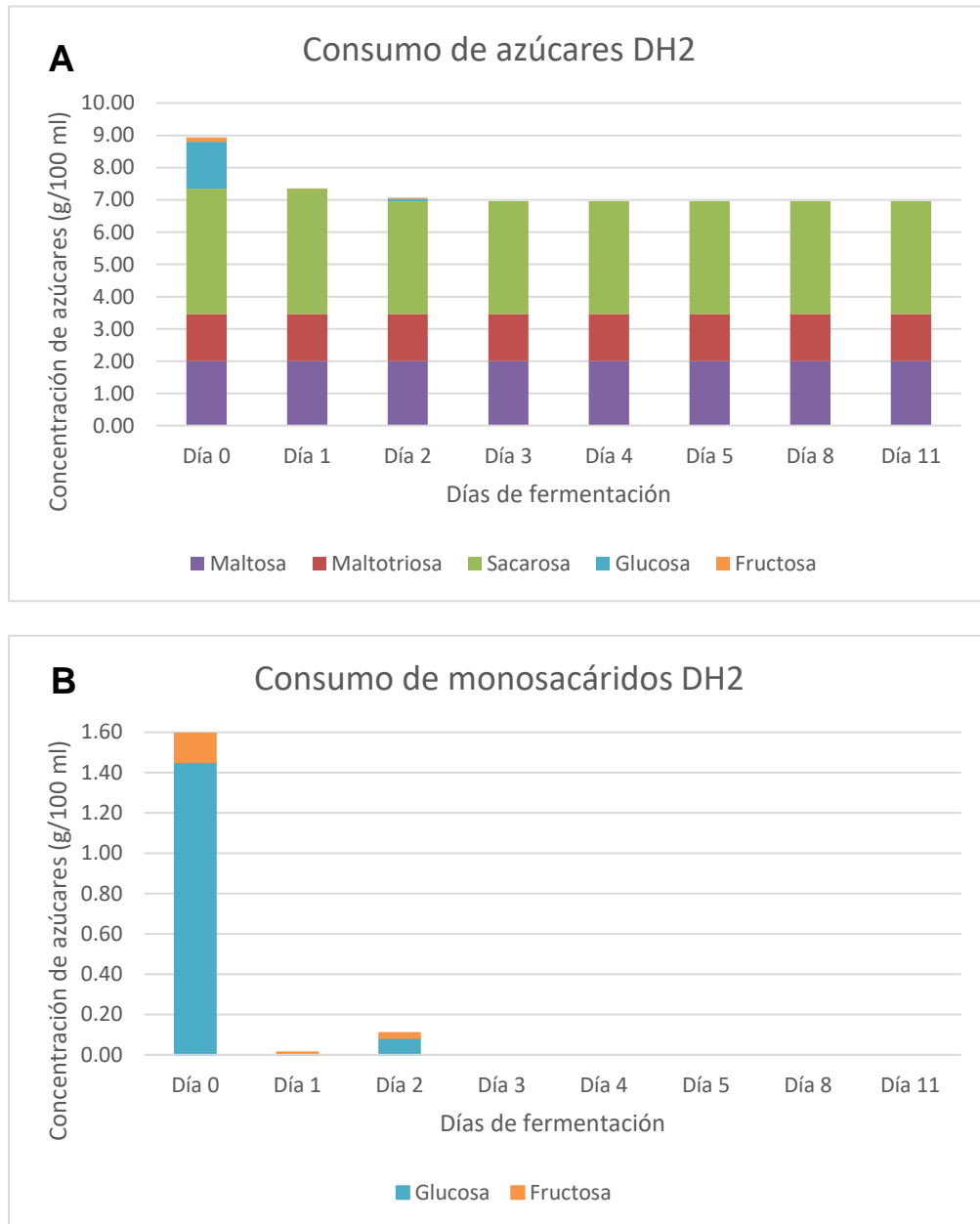
Las 3 cepas consumieron los monosacáridos glucosa y fructosa durante la fermentación de mosto de malta (Figuras 11, 12 y 13). En el caso de FV10, se detectaron glucosa y fructosa residuales (0.08 y 0.01 g/100 mL, respectivamente) a las 24 h de fermentación, mientras que a las 48 h de fermentación ambos monosacáridos desaparecieron del mosto en fermentación (Figura 11).



**Figura 11.** Concentración de azúcares presentes en el mosto durante la fermentación con la cepa FV10. En la figura A se muestra el consumo de todos los carbohidratos fermentables. En la figura B se muestra una ampliación del consumo de los monosacáridos glucosa y fructosa.

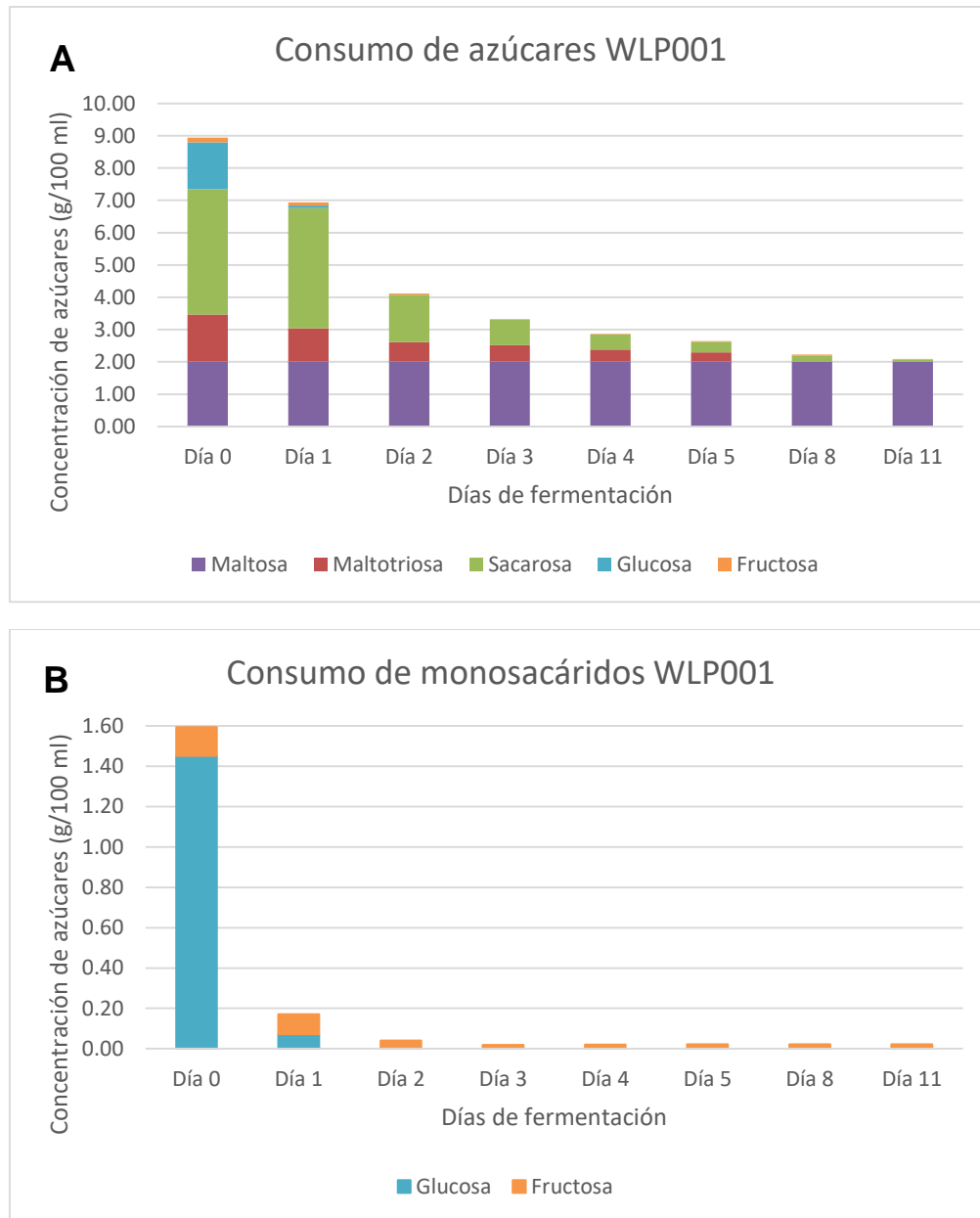
En las primeras 24 h, la cepa DH2 consumió toda la glucosa, y dejó 0.01 g/mL de fructosa, y a las 48 h se volvió a detectar glucosa (0.08 g/100 mL) en el mosto en fermentación, y la concentración de fructosa se duplicó (0.02 g/100 mL). Esto se podría explicar por el consumo de sacarosa, y su hidrólisis extracelular llevada a

cabo por una invertasa (Özcan *et al.*, 1997). A las 72 h ya no se detectó presencia de glucosa o fructosa, pero tampoco disminución de la concentración de sacarosa (Figura 12).



**Figura 12.** Concentración de azúcares presentes en el mosto durante la fermentación con la cepa DH2. En la figura A se muestra el consumo de todos los carbohidratos fermentables. En la figura B se muestra una ampliación del consumo de los monosacáridos glucosa y fructosa.

En el mosto fermentado por el control positivo, WLP001, se detectó glucosa (0.07 g/100 mL) a las primeras 24 h de fermentación, pero la fructosa prácticamente permaneció igual (0.10 g/100 mL) que al inicio de la fermentación (0.14 g/100 mL) (Figura 13).



**Figura 13.** Concentración de azúcares presentes en el mosto durante la fermentación con la cepa WLP001. En la figura A se muestra el consumo de todos los carbohidratos fermentables. En la figura B se muestra una ampliación del consumo de los monosacáridos glucosa y fructosa.

A las 48 h, la glucosa desapareció por completo mientras que la fructosa permaneció en el medio en cantidades residuales de 0.04 a 0.02 g/100 mL) hasta el día 11 (264 h). Esta detección constante de fructosa coincide con la hidrólisis y consumo de sacarosa (Özcan *et al.*, 1997). La Figura 13 muestra que WLP001 tuvo mayor consumo de glucosa que de fructosa, lo cual es un parámetro que depende de las propiedades inherentes de la cepa (Berthels *et al.*, 2004). Lo mismo podría ocurrir con la cepa DH2, la cual, en las primeras 24 h de fermentación consumió toda la glucosa, pero dejó fructosa residual (Figura 12).

#### .4.1.1. Consumo de monosacáridos

Las 3 cepas consumieron los monosacáridos glucosa y fructosa durante la fermentación de mosto de malta (Figuras 11, 12 y 13). En el caso de FV10, se detectaron glucosa y fructosa residuales (0.08 y 0.01 g/100 mL, respectivamente) a las 24 h de fermentación, mientras que a las 48 h de fermentación ambos monosacáridos desaparecieron del mosto en fermentación (Figura 11). En las primeras 24 h, la cepa DH2 consumió toda la glucosa, y dejó 0.01 g/mL de fructosa, y a las 48 h se volvió a detectar glucosa (0.08 g/100 mL) en el mosto en fermentación, y la concentración de fructosa se duplicó (0.02 g/100 mL). Esto se podría explicar por el consumo de sacarosa, y su hidrólisis extracelular llevada a cabo por una invertasa (Özcan *et al.*, 1997). A las 72 h ya no se detectó presencia de glucosa o fructosa, pero tampoco disminución de la concentración de sacarosa (Figura 12). En el mosto fermentado por el control positivo, WLP001, se detectó glucosa (0.07 g/100 mL) a las primeras 24 h de fermentación, pero la fructosa prácticamente permaneció igual (0.10 g/100 mL) que al inicio de la fermentación (0.14 g/100 mL) (Figura 13). A las 48 h, la glucosa desapareció por completo mientras que la fructosa permaneció en el medio en cantidades residuales de 0.04 a 0.02 g/100 mL) hasta el día 11 (264 h). Esta detección constante de fructosa coincide con la hidrólisis y consumo de sacarosa (Özcan *et al.*, 1997). La Figura 13 muestra que WLP001 tuvo un mayor consumo de glucosa que de fructosa, lo cual es un parámetro que depende de las propiedades inherentes de la cepa (Berthels

*et al.*, 2004). Lo mismo podría ocurrir con la cepa DH2, la cual, en las primeras 24 h de fermentación consumió toda la glucosa, pero dejó fructosa residual (Figura 12).

#### 8.4.1.2. Consumo de sacarosa, maltosa y maltotriosa

La cepa FV10 no consumió sacarosa, pero DH2 sí. A las 48 h de fermentación se detectó una disminución en la concentración de este azúcar en el mosto inoculado con DH2, y consumió únicamente el 10% de sacarosa inicial después de 11 días de fermentación. DH2 comenzó a consumir la sacarosa una vez que la glucosa se agotó del medio. Esto es consistente con la represión e inactivación catabólica, por la presencia de glucosa, en la hidrólisis de la sacarosa (Sarokin & Carlson, 1984; Olsson & Nielsen, 2000). La cepa de referencia WLP001 consumió prácticamente toda la sacarosa y en el día 11 (264 h) se detectaron cantidades trazas (0.06 g/100 ml) del disacárido. La hidrólisis extracelular de sacarosa es evidente en DH2 y WLP001 por la aparición de fructosa y glucosa en el medio. El consumo de sacarosa, por parte de la cepa DH2, podría también llevarse a cabo por transporte al interior de la célula, sin embargo, la evidencia señala que la sacarosa se hidrolizó extracelularmente por dos razones: 1) existe desaparición de sacarosa en el medio y simultánea aparición de glucosa y fructosa; y 2) se ha identificado que el transporte de sacarosa es llevado a cabo por el transportador de maltosa MALX1, por lo tanto, para que ocurriera transporte de sacarosa, primero debió haber transporte de maltosa (Badotti, *et al.*, 2008). DH2 solamente consumió una pequeña porción de sacarosa (1.75 g) y posteriormente dejó de consumirla. Esto podría explicarse por la fuerte capacidad de floculación de la cepa DH2, que provoca una sedimentación prematura, y por lo tanto la levadura no se encuentra suspendida en el medio para consumir la sacarosa. Se ha identificado que un fenotipo de floculación fuerte puede dejar fermentaciones incompletas (Vidgren & Londesborough, 2011) o disminuir la velocidad de consumo de azúcares simples como la glucosa (Van Mulders *et al.*, 2009). WLP001 tardó mucho tiempo en consumir la sacarosa, pues las cepas cerveceras tipo *a/e* consumen la sacarosa dentro de los primeros 2-4 días de fermentación (Boulton & Quain, 2006). Este



consumo lento podría deberse a la elevada concentración de sacarosa (3.88 g/100 mL) en el mosto de los ensayos, en comparación con la concentración de sacarosa que normalmente se encuentra en los mostos cerveceros (Tabla 1).

La asimilación de maltosa y maltotriosa por *S. cerevisiae* es regulada por los tres genes *mal* (*mal1*, *mal2* y *mal3*). Estos genes codifican para una permeasa, un  $\alpha$  glucosidasa (maltasa) y un activador transcripcional para la expresión de los dos primeros genes (Orikasa *et al.*, 2018). A diferencia de la sacarosa, que se hidroliza extracelularmente, la maltosa y maltotriosa primero entran a la célula a través de un transportador de simporte de protones, y dentro de la célula estos carbohidratos se hidrolizan. Tanto *mal2* como *mal3* son reprimidos por la presencia de glucosa y *mal1* es regulado a nivel transcripcional y post-traducciona por la presencia de glucosa (Hatanaka *et al.*, 2018). Esto explica por qué WLP001 no consumió la maltosa, ya que para el día 11 (264 h) de fermentación, esta cepa seguía consumiendo sacarosa, y por lo tanto se generaba glucosa extracelular. WLP001 es una cepa cervecera muy utilizada en la industria, así que lo más probable es que hubiera conseguido consumir toda la maltosa si el tiempo de fermentación hubiera sido más largo. El consumo de maltotriosa por parte de WLP001, se llevó a cabo al mismo tiempo que el consumo de glucosa, fructosa y sacarosa (Figura 13), así que el metabolismo de este trisacárido no fue inhibido por la presencia de glucosa. Previamente se han identificado genes *mal* insensibles a la represión por glucosa (Alves *et al.*, 2014). Aunque el consumo de maltotriosa por parte de WLP001, no fue inhibido por la presencia de glucosa, no ocurrió lo mismo con el metabolismo de la maltosa; por lo tanto, es posible que el consumo de maltotriosa en WLP001, se llevara a cabo por genes *mal* insensibles a represión por glucosa con afinidad por la maltotriosa y sin afinidad por maltosa (Salema-Oom, 2005; Magalhães, *et al.*, 2016).

La deficiencia en el consumo de maltosa y sacarosa, en condiciones anaerobias, por parte de las cepas DH2 y FV10, podría estar relacionada con la deficiencia para salir de la represión (des-represión) por glucosa (Ciriacy, 1977; Kuchin, *et al.*, 1993). Se ha encontrado que *S. cerevisiae* puede ser incapaz de

utilizar sacarosa en condiciones anaerobias debido a deficiencias en el gen *snf1* (por *sucrose nonfermenting* por sus siglas en inglés) (Carlson *et al.*, 1981; Celenza & Carlson, 1986; Olsson & Nielsen, 2000). La ruta de represión/des-represión por glucosa consiste en una cascada de señalización compleja, la cual tiene los siguientes elementos clave: hexocinasa PII (Hxk2p), el complejo proteína fosfatasa 1 (Reg1p, Reg2p, Glc7p), el complejo proteína cinasa (Snf1p, Snf4p), y proteínas de unión a ADN como Mg1p, proteína que recluta a los complejos represores (Ssn6p, Tup1p), hacia los promotores de genes blanco reprimidos por glucosa (Klein *et al.*, 1999; Fragoso & Coello, 2008). Los “genes blanco” son los responsables de llevar a cabo, directa o indirectamente, el metabolismo de fuentes de carbono diferentes a la glucosa, como la sacarosa, maltosa o maltotriosa (Kuchin, *et al.*, 1992; Klein *et al.*, 1999; Olsson & Nielsen, 2000). Snf1 es una proteína homóloga a AMPK (cinasa activada por AMP, por sus siglas en inglés) en la levadura *S. cerevisiae* (Fragoso & Coello, 2008), y está encargada de conservar y mantener la homeostasis energética en la levadura (Hedbacker & Carlson, 2008; Coccetti *et al.*, 2018). La presencia de glucosa ocasiona la reducción de los niveles de ADP, lo que causa la desfosforilación e inactivación de Snf1 (Zhang *et al.*, 2015), pero cuando la concentración de glucosa es baja, Snf1 se activa a través de la acción de cinasas (Maziarz, *et al.*, 2016). La unidad catalítica de Snf1 es la responsable de llevar a cabo la des-represión por glucosa ya que inactiva al represor de la transcripción Mig1. Se ha encontrado que el gen *SUC*, que codifica para la invertasa que hidroliza a la sacarosa, está sujeto a la inhibición de su transcripción por los represores Mig1 y Mig2 (Olsson & Nielsen, 2000). El metabolismo de la maltosa también está sujeta a la actividad de Snf1 y para consumir la maltosa en anaerobiosis es necesario des-reprimir los genes *MAL* (Klein, *et al.*, 1999; Olsson & Nielsen, 2000; Zhang, *et al.*, 2015). La des-represión metabólica por glucosa podría no llevarse a cabo por tres razones: 1) la cascada de señalización no promueve la activación de Snf1 (río arriba de Snf1), las proteínas que inhiben la expresión de genes blanco no se inhiben (río abajo de Snf1) o algún problema con la actividad o expresión de Snf1. Cualquiera de las tres opciones resulta en la incapacidad de consumir sacarosa y maltosa, y esto podría estar ocurriendo con FV10 y DH2.

#### 8.4.1.3. Atenuación aparente y azúcares residuales

El bajo consumo de azúcares fermentables por parte de las cepas FV10 y DH2, y la ausencia de consumo de maltosa por parte de la cepa WLP001, originaron atenuaciones aparentes bajas, con valores de 16%, 20% y 64%, poner si son diferencias significativas respectivamente. Los valores de atenuación aparente de los ensayos de fermentación coinciden con los valores de LA (obtenidos en la preselección de las cepas), las cuáles también fueron bajas. La concentración residual de azúcares en las cervezas fermentadas por las cepas FV10, DH2 y WLP001 se presenta en la Tabla 12.

**Tabla 12.** Azúcares residuales de la fermentación (después de 11 días/264 h) de mosto de malta con las diferentes cepas de *S. cerevisiae*. La concentración inicial de azúcares totales fue de 11 g/100 mL de mosto/ 1.044.

<b>Carbohidratos solubles</b>	<b>Concentración al término de la fermentación (g/100 ml)</b>		
	FV10	DH2	WLP001
<b>Glucosa</b>	0	0	0
<b>Fructosa</b>	0	0	0.02
<b>Sacarosa</b>	3.88	3.49	0.06
<b>Maltosa</b>	2.01	2.01	2.01
<b>Maltotriosa</b>	1.45	1.45	0
<b>Azúcares fermentables residuales</b>	7.34	6.95	2.09
<b>Azúcares totales residuales</b>			
<b>(g/100 ml)</b>	9.41	9.02	4.16
<b>(GE final) *</b>	1.037	1.035	1.016

\* La GE es adimensional y no tiene unidades.

En estudios previos realizados por Ruiz-Terán *et al.*, (2018) y Martínez-Zepeda (2014), se demostró que DH2 y FV10 son capaces de consumir sacarosa como única fuente de carbono en condiciones aerobias. Asimismo, en este estudio se demostró que DH2 y FV10 pueden utilizar maltosa como única fuente de carbono en aerobiosis. Sin embargo, ambas cepas fueron incapaces de consumir ambos

disacáridos en las condiciones anaerobias de los ensayos de fermentación de mosto (solo DH2 consumió aproximadamente el 10% de la sacarosa). Los azúcares que predominan en el ambiente donde las cepas DH2 y FV10 fueron aisladas, son glucosa y fructosa (López-Álvarez *et al.*, 2012; Kirchmayr *et al.*, 2017). Ambos carbohidratos fueron rápidamente metabolizados por ambas levaduras autóctonas del mezcal en los ensayos de fermentación de mosto de malta (11°B) (Figuras 11 y 12). A pesar de que las cepas DH2 y FV10 sí pueden consumir sacarosa y maltosa en condiciones aerobias, no pueden consumir estos azúcares de manera anaerobia, lo cual podría estar relacionado con la expresión de los genes involucrados en el consumo de estos disacáridos.

Ninguna de las dos cepas mezcaleras fue capaz de consumir maltotriosa durante la fermentación de mosto de cebada. Existen levaduras cerveceras incapaces de consumir maltotriosa, y por lo tanto sus productos de fermentación tienen maltotriosa residual (Gallone *et al.*, 2016), lo resulta en cerveza con mayor densidad final y, por lo tanto, mayor cuerpo. Esto denota, quizá, un interés industrial más alto por el perfil organoléptico en las cervezas, que por la alta atenuación del producto final.

#### 8.4.2. Producción de etanol

En la Tabla 13 se muestra la cantidad de etanol teórica que podrían producir dos cepas de estudio y el control positivo, de acuerdo a la cantidad de azúcares fermentables que consumieron durante la fermentación; además se presenta la cantidad máxima teórica de etanol que *S. cerevisiae* podría producir si consumiera el 100% de los azúcares fermentables. Se consideró que, por cada 2.066 gramos de extracto de azúcares fermentables del mosto, se producen hasta 1.000 gramos de etanol, con una conversión del 88% debido a formación de biomasa, compuestos con-genéricos y otros subproductos del crecimiento de la levadura (Hill, 2015; Boulton & Quain, 2006).

**Tabla 13.** Datos teóricos de la concentración de etanol que podrían producir las cepas de acuerdo con la cantidad de azúcares fermentables que consumieron durante la fermentación.

Cepa	Azúcares consumidos durante la fermentación (g.L <sup>-1</sup> )	Producción teórica de etanol (g.L <sup>-1</sup> )*
<b>FV10</b>	15.9	6.77
<b>DH2</b>	19.8	8.43
<b>WLP001</b>	68.4	29.13
<b>MT<sup>a</sup></b>	89.3	38.04

Calculado con el rendimiento propuesto por Hill, (2015) y Boulton & Quain, (2006). <sup>a</sup>Cantidad Máxima Teórica (MT) de azúcares fermentables disponibles y de etanol que se podría producir. \*Cantidad de etanol teórica considerando la cantidad de azúcares que cada cepa consumió durante la fermentación.

En la Tabla 14 se muestra la cantidad relativa de etanol que produjeron las cepas de estudio y el control positivo; además se calculó la cantidad de etanol que produjeron con respecto al control positivo (normalización).

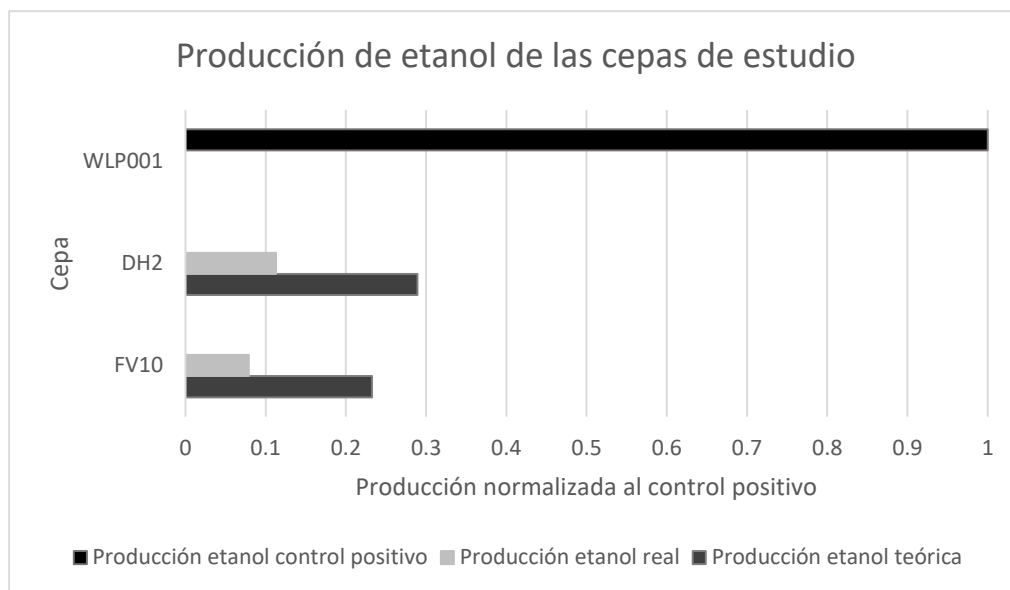
**Tabla 14.** Datos reales de la concentración relativa de etanol medido por cromatografía de gases. Se determinó la concentración relativa final de etanol después de 11 días de fermentación. Para el cálculo se normalizó con respecto al control positivo.

Etanol	Día 11		
	DH2	FV10	WLP001
Respuesta relativa	930.12±126.60 <sup>a</sup>	652.01±95.04 <sup>a</sup>	8237.99±647.66 <sup>b</sup>
Producción relativa al control positivo	11.20%	7.90%	100%

Las áreas de respuesta de todos los metabolitos analizados mediante cromatografía de gases, están normalizadas con las áreas de respuesta del hexanol (10 ppm). Los valores corresponden a las medias de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes en superíndice en la misma línea indican diferencias estadísticas significativas (p≤0.05, LSD). La comparación de las medias de las tres cepas se realizó por separado para el día 7 y el día 11.

La cantidad máxima teórica de producción de etanol para el control positivo fue de 29.13 g.L<sup>-1</sup> de etanol. Esta cepa no consumió la maltosa y el posible motivo

se discutió en el capítulo (8.4.1.2.). Dado el consumo de azúcares fermentables, las cepas FV10 y DH2 podrían producir teóricamente 6.77 y 8.43 g.L<sup>-1</sup> de etanol respectivamente (Tabla 13), lo que equivale al 23.2 y 28.9% (respectivamente) de la cantidad de etanol que podría producir el control positivo (29.13 g.L<sup>-1</sup>) (Figura 14). Sin embargo, las cepas FV10 y DH2 produjeron en promedio 7.9 % y 11.2 % de la cantidad de etanol producida por el control positivo (Tabla 14). Esto quiere decir que las cepas de mezcal tienen un menor rendimiento al teórico (Figura 14). La presencia residual de acetaldehído en los mostos fermentados con las cepas mezcaleras, podría estar relacionada con la baja concentración de etanol. La cepa WLP001 tuvo un comportamiento diferente, ya que, no solamente produjo mayor cantidad de etanol (en comparación con las cepas mezcaleras), sino que no se detectó acetaldehído en el día 11 de fermentación (Tabla 15).



**Figura 14.** Producción de etanol de las cepas FV10, DH2 y WLP001 analizado el día 11 de fermentación. Los promedios de las señales de etanol de las 3 cepas se normalizaron con la del control positivo, WLP001. Las cepas FV10 y DH2 produjeron en promedio 7.9 y 11.2 % del etanol que la cepa WLP001 produjo.

### 8.4.3. Producción y cuantificación de compuestos volátiles de las levaduras seleccionadas

Los compuestos volátiles etanol, acetaldehído, ésteres, alcoholes superiores (AF) y diacetilo, fueron determinados el día 7 y 11 de la fermentación. En la Tabla 15 se muestran las áreas obtenidas por CG de los compuestos volátiles analizados, normalizadas con la señal del estándar interno, hexanol (10 ppm). La concentración de los metabolitos se expresó como el tamaño del área después de la integración de los picos cromatográficos. Las áreas de respuesta de cada metabolito están normalizadas con el hexanol, así que los datos son adimensionales.

**Tabla 15.** Metabolitos producidos por las cepas nativas del mezcal y *S. cerevisiae* de referencia.

11.

Compuesto	Día 7			Día 11		
	DH2	FV10	WLP001	DH2	FV10	WLP001
Acetaldehído	4.92±0.63 <sup>a</sup>	6.64±0.54 <sup>b</sup>	5.12±0.19 <sup>a</sup>	4.46±0.53 <sup>a</sup>	4.86±0.71 <sup>a</sup>	0
Acetato de etilo	0	0	0	0	0	1.32±0.19 <sup>a</sup>
Etanol	1049.76±108.51 <sup>a</sup>	468.318±68.08 <sup>b</sup>	3318.90±329.61 <sup>c</sup>	930.12±126.60 <sup>a</sup>	652.01±95.04 <sup>a</sup>	8237.99±647.66 <sup>b</sup>
Diacetilo	0	0	0	0	0	0
Isopropanol	0	0	2.35±0.65 <sup>a</sup>	0	0.69±0.10 <sup>a</sup>	6.70±0.60 <sup>b</sup>
Isobutanol	0	0	2.06±1.79 <sup>a</sup>	0	0	8.36±1.11 <sup>a</sup>
Acetato de isoamilo	0	0	0	0	0	0
Alcohol amílico	1.06±0.21 <sup>a</sup>	0	1.04±0.91 <sup>a</sup>	1.03±0.25 <sup>a</sup>	1.12±0.19 <sup>a</sup>	3.68±3.42 <sup>b</sup>
Alcohol isoamílico	5.25±0.81 <sup>a</sup>	2.65±0.23 <sup>b</sup>	5.62±0.52 <sup>a</sup>	5.12±1.07 <sup>a</sup>	4.51±1.12 <sup>a</sup>	14.77±1.53 <sup>b</sup>
Hexanoato de etilo	0	0	0	0	0	0
Octanoato de etilo	0	0	0	0	0	0
Acetato de feniletilo	25.67±1.14 <sup>a</sup>	26.96±0.43 <sup>a</sup>	30.32±0.13 <sup>b</sup>	26.30±0.04 <sup>a</sup>	25.08±0.74 <sup>a</sup>	31.22±1.68 <sup>b</sup>
Alcohol fenetílico	2.56±0.24 <sup>a</sup>	3.73±0.18 <sup>b</sup>	16.06±0.33 <sup>c</sup>	2.52±0.19 <sup>a</sup>	3.40±0.24 <sup>a</sup>	19.63±1.36 <sup>b</sup>

Las áreas de respuesta de todos los metabolitos analizados mediante cromatografía de gases, están normalizadas con las áreas de respuesta del hexanol (10 ppm). Los valores corresponden a las medias de tres repeticiones ± desviación estándar. Letras diferentes en superíndice en la misma línea indican diferencias estadísticas significativas ( $p \leq 0.05$ , LSD). La comparación de las medias de las tres cepas se realizó por separado para el día 7 y el día 11.

En los ensayos de fermentación se detectó acetaldehído en el día 7 de fermentación en las cervezas producidas por las tres cepas, con mayores niveles en la cerveza de FV10. El día 11 de fermentación, no se detectó acetaldehído para la cepa WLP001. Las cepas aisladas del mezcal sí presentaron niveles de

acetaldehído y sus respuestas relativas no tuvieron diferencias significativas. La presencia de acetaldehído en concentraciones altas es indeseable (Wang *et al.*, 2013), aunque en este caso no se determinó la concentración exacta de acetaldehído residual, sí se notó que el control positivo WLP001 fue más eficiente en la conversión de acetaldehído en etanol (Tabla 15), una característica deseable en una cepa cervecera. El acetaldehído aparece durante los primeros días de fermentación, difunde hacia el medio, y desaparece conforme la cerveza alcanza la densidad final, lo cual ocurre porque las células lo reincorporan y metabolizan (Pickerell, *et al.*, 1991). Las cepas del mezcal sedimentaron muy rápido en la fermentación (Figura 15), y es posible que la falta de células en suspensión durante un gran periodo de la fermentación ocasionara la conversión incompleta del acetaldehído en etanol.

Los AF son algunos de los compuestos organolépticos más abundantes e importantes en la cerveza (Hazelwood, *et al.*, 2008). En la cerveza fermentada por la cepa FV10, se detectó la presencia de todos los AF estudiados, con excepción de isobutanol. Entre el día 7 y el día 11 de fermentación ocurrió lo siguiente con los AF: el isopropanol y alcohol amílico aparecieron, el alcohol isoamílico aumentó su concentración (70%) y el alcohol fenílico se encontró en los mismos niveles. DH2 solamente produjo el alcohol amílico, alcohol isoamílico y alcohol fenílico, y la concentración de los tres AF no cambió entre el día 7 y el día 11. El alcohol isoamílico y el alcohol fenílico fueron los AF que las cepas mezcaleras produjeron en mayor concentración. Tanto el alcohol isoamílico como el alcohol fenílico son AF relevantes en la cerveza debido a que contribuyen con la calidad organoléptica, el alcohol isoamílico confiere aroma a plátano y el alcohol fenílico, a rosas (Pires *et al.*, 2014). Los AF que FV10 y DH2 produjeron en común, no tuvieron diferencias significativas de concentración. En la cerveza fermentada por el control positivo WLP001 se detectó la presencia de los 5 AF, y todos aumentaron su concentración, del día 7 al día 11, en al menos 20% (alcohol fenílico) y hasta en 405% (isobutanol). A diferencia de las cepas del mezcal, WLP001 produjo isobutanol. También produjo todos los AF estudiados, en mayor concentración que ambas cepas mezcaleras. La proporción de concentración de alcohol amílico/alcohol



isoamílico al término del ensayo (11 días) fue de  $\sim 0.2$  para las tres cepas, lo cual es un indicador importante de fermentación por parte de cepas *S. cerevisiae* (Boulton & Quain, 2006).

No fue posible detectar acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo en ninguna de las cervezas producidas por las tres cepas. Esto podría deberse a la baja concentración de los ésteres en el medio, aunque la ausencia de estos tres ésteres puede deberse a que WLP001 no produce los característicos aromas a plátano, manzana dulce y manzana agria asociados al acetato de isoamilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo, respectivamente (Fix & Fix, 1997; Pires *et al.*, 2014). Las cepas del mezcal no produjeron acetato de etilo, probablemente por la baja concentración de etanol en el mosto, ya que este alcohol sirve como sustrato para su síntesis (Saerens *et al.*, 2008). La cepa de referencia WLP001 sí produjo acetato de etilo y fue detectado el día 11 de fermentación, cuando la concentración de etanol fue la más alta (Tabla 15). El acetato de feniletilo fue el único éster producido por las cepas mezcaleras, sin diferencias significativas en concentración final; y también fue producido por la cepa de referencia en mayores concentraciones que las cepas mezcaleras (Tabla 15). La presencia de acetato de feniletilo puede explicarse porque las tres cepas produjeron el alcohol fenílico, AF que da lugar a la síntesis de este éster al condensarse con el acetil-CoA (Saerens *et al.*, 2008). El acetato de feniletilo es relevante en las características organolépticas de las cervezas por conferir aromas a rosas y miel (Pires *et al.*, 2014), aromas deseables en las bebidas alcohólicas fermentadas.

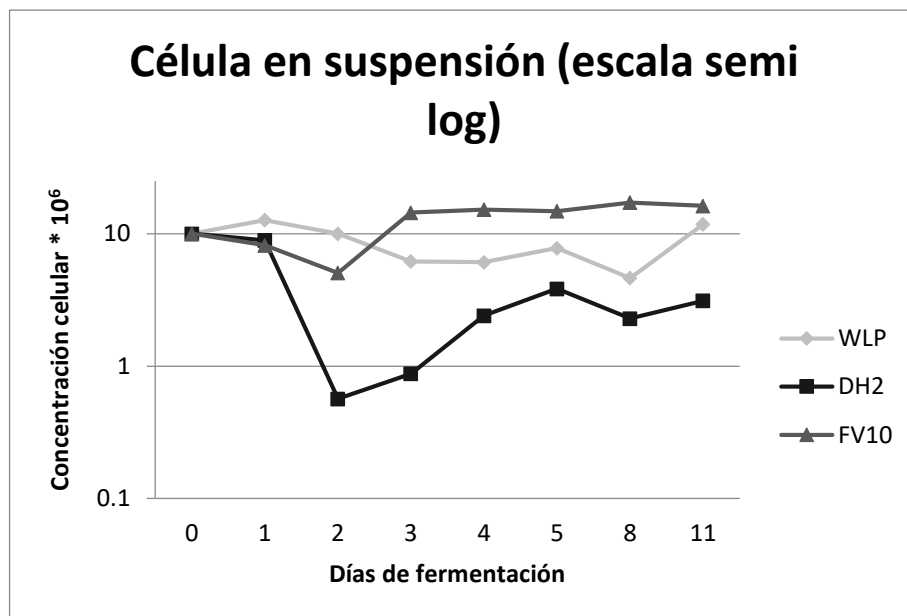
Lentz *et al.* (2014) han encontrado levaduras silvestres deficientes en fermentación con un porcentaje de atenuación aparente de 20 a 25%, las cuáles son mayores a las obtenidas por FV10 y DH2 (16 y 20%). Existen en el mercado cervezas con bajo contenido o libres de alcohol, y una de las características de las cepas de levaduras empleadas en la producción de estas cervezas es la incapacidad para fermentar maltosa y maltotriosa (Bellut *et al.*, 2018). Actualmente, debido al desarrollo de nuevos productos, tales como cervezas con bajo contenido o libres de alcohol, cervezas funcionales y cervezas con aromas y sabores

particulares (Brányik, *et al.*, 2012; De Francesco *et al.*, 2015; Michel *et al.*, 2016b; Bellut *et al.*, 2018; Holt *et al.*, 2018), se han desarrollado metodologías que permiten la selección de cepas de levaduras con potencial para la producción de cervezas (Michel *et al.*, 2016b; Macedo-Araújo *et al.*, 2018). El umbral de detección de etanol es 13 g/L (Boulton & Quain, 2006), y las cepas FV10 y DH2, teóricamente no produjeron más de 6.77 y 8.43 g/L de etanol, respectivamente. Diferentes especies y cepas de levaduras se han aislado de diferentes fuentes y evaluado para su uso en la producción de cerveza, por ejemplo, néctar de flores, fermentación de cacao, mosto de uva, jugo de caña de azúcar (Holt *et al.*, 2018). Las cepas de estudio, aisladas del mezcal, son capaces de producir 4VG, un fenol aromáticamente activo que es deseable como perfil característico de ciertas levaduras (Michel *et al.*, 2016b; BJCP, 2015). También son capaces de producir algunos alcoholes superiores y acetato de feniletilo (Tabla 15). Adicionalmente, se ha comprobado la factibilidad de fabricar cerveza a partir de mosto de malta con adición de mosto de uva (Veljovic, *et al.*, 2010), el cual está compuesto principalmente por glucosa y fructosa, azúcares que las levaduras de estudio (FV10 y DH2) son capaces de consumir.

#### 8.4.4. Levaduras en suspensión y pH del medio

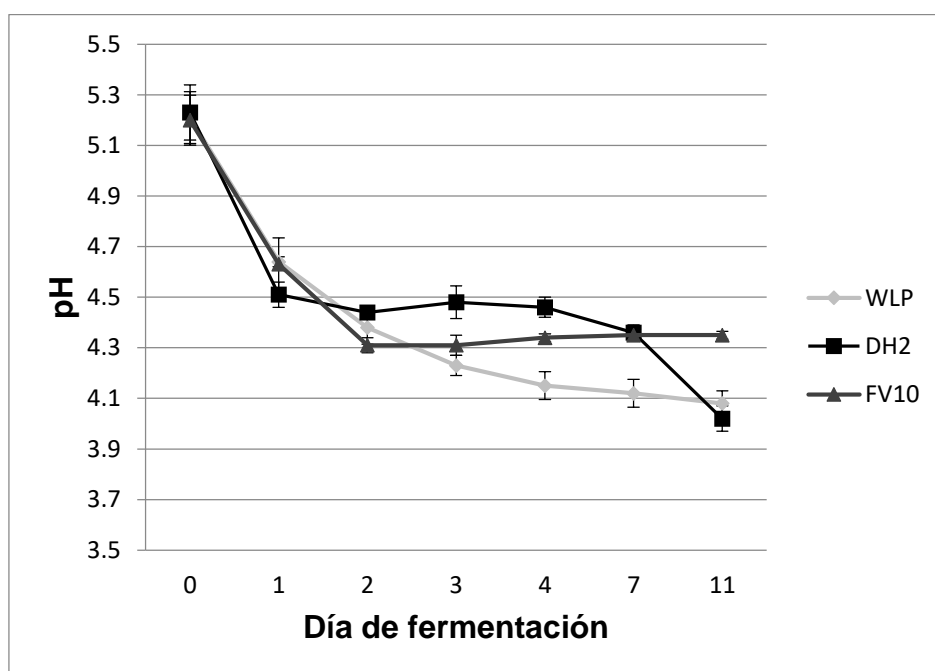
Todas las cepas fueron inoculadas a una concentración de  $1.00 \times 10^7$  UFC/mL, y agitadas para la adición de oxígeno, previo al inicio de la fermentación (Figura 15). El número de células en suspensión de la cepa FV10 disminuyó del día 0 al día 2 de fermentación, hasta alcanzar alrededor de  $5.06 \times 10^6$  UFC/mL. A partir del día 3 de fermentación, el número de células en suspensión de FV10 aumentó considerablemente ( $1.44 \times 10^7$  UFC/mL) hasta llegar a  $1.62 \times 10^7$  UFC/mL. La cepa DH2 tuvo un comportamiento diferente a FV10, ya que, para el segundo día de fermentación, el número de células en suspensión de DH2 disminuyó drásticamente ( $5.70 \times 10^5$  UFC/mL) y para al término de la fermentación (día 11), el número de células en suspensión aumentó hasta alcanzar  $3.12 \times 10^6$  UFC/mL, concentración celular en suspensión más baja que la inicial. La cepa de referencia WLP001 aumentó su número de células en suspensión el primer día de fermentación ( $1.26 \times 10^7$  UFC/mL), y el resto del tiempo de fermentación se mantuvo por debajo de

la cuenta inicial, hasta el último día de fermentación, cuando alcanzó  $1.18 \times 10^7$  UFC/mL. De las 3 cepas evaluadas, FV10 fue la cepa con mayor concentración celular en suspensión durante la fermentación (Figura 15). A pesar de que el número de células en suspensión de las cepas FV10 y DH2 bajó durante el primer día de fermentación, el número de células en suspensión de FV10 aumentó durante el resto del tiempo de fermentación, mientras el de la cepa DH2 bajó. DH2 sedimentó prematuramente, ya que a partir del segundo día de fermentación se detectó una cantidad baja de células en suspensión (Figura 15). La característica de sedimentación prematura de DH2 tiene relación con su capacidad de formar flóculos fuertes y difíciles de resuspender. La capacidad de las cepas WLP001 y FV10 de mantenerse suspendidas en el medio por mayor cantidad de tiempo, podría deberse a la capacidad de sus floculinas para reconocer los azúcares del mosto de cebada, como sacarosa o maltosa.



**Figura 15.** La gráfica ilustra la concentración celular ( $\text{UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 10^6$ ) de las diferentes cepas durante la fermentación de mosto de extracto de malta. La concentración inicial de las 3 cepas fue de  $10 \text{ UFC} \cdot \text{ml}^{-1} \cdot 10^6$ . La concentración celular se determinó con el protocolo descrito en el Anexo 3.

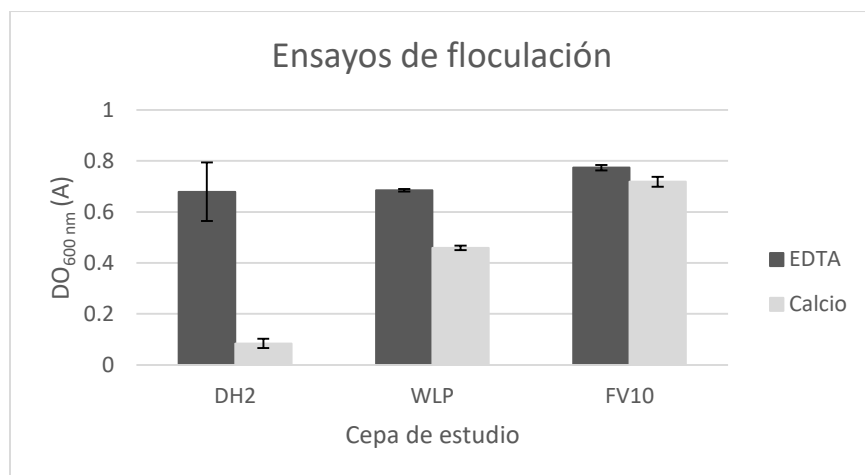
Desde la inoculación (día 0), hasta el fin de los ensayos (día 11), el control positivo, WLP001 bajó el pH de 5.21 a 4.08, FV10 hizo lo propio de 5.20 a 4.35 y DH2 de 5.23 a 4.02 (Figura 16). La disminución de pH (típicamente a 4) se debe al metabolismo de la levadura, secreción de ciertos ácidos orgánicos y de protones debida a la asimilación de azúcares (Boulton & Quain, 2006), además esta disminución de pH es importante porque funciona como inhibidor de bacterias contaminantes, principalmente bacterias Gram-negativas (Michel *et al.*, 2016a). El valor de pH del mosto fermentado por las cepas evaluadas disminuyó en las primeras 24 h a un pH menor a 4.5 (Figura 16), lo cual indica un desempeño adecuado posterior a la inoculación (Boulton & Quain, 2006). Para el control positivo WLP001 y para la cepa DH2 se puede observar que el pH menor se determinó al día 11.



**Figura 16.** Valores de pH registrados durante la fermentación del mosto de malta por parte de las 3 cepas estudiadas. El pH se determinó con ayuda de un potenciómetro (AB15, Accumet). Las soluciones buffer de calibración utilizadas fueron a pH de 4, 7 y 10.

## 8.5. Floculación

La floculación se lleva a cabo cuando existen floculinas ancladas en la pared celular de las levaduras, y estas floculinas se adhieren a los manano-oligosacáridos de las manoproteínas de otra célula a través de interacciones proteína-glicano y/o de interacciones glicano-glicano (Goossens & Willaert, 2010; Goossens *et al.*, 2015). Las células de las tres cepas de estudio se propagaron por 72 h, tiempo que Boulton & Quain, (2006) sugieren para que se lleve a cabo la expresión los genes *flo*, sujeta al agotamiento de los azúcares en el medio (Nayyar *et al.*, 2017). Mediante la prueba de floculación sugerida por *The American Society of Brewing Chemists* (Bendiak *et al.*, 1996) se evaluó el efecto de dos tratamientos, en la cantidad de células suspendidas (determinada por la densidad óptica a 600 nm) en cultivos verticales y estáticos de las cepas de estudio. La comparación de la DO se llevó a cabo entre las mismas cepas, con la misma cantidad de biomasa. La Figura 17 muestra que los tratamientos con la solución de floculación (con calcio) y la solución de desfloculación (con EDTA) tuvieron efecto en la suspensión celular.



**Figura 17.** Valores de (DO<sub>600 nm</sub>) registrados en cultivos de las tres cepas de estudio después del tratamiento con dos soluciones diferentes. En gris oscuro: tratamiento con solución de floculación (sulfato de calcio (0.51 g/L), acetato de sodio (6.8 g/L) y ácido acético (4.05 g/L) a pH de 4.5). En gris claro: tratamiento con solución de desfloculación (ácido etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5M a pH de 7). La determinación de la DO se hizo por triplicado. Las líneas verticales representan la  $\pm$  desviación estándar.

Hubo una tendencia hacia la sedimentación por parte de las células de las tres cepas de estudio tratadas con la solución de floculación (barras grises claro, Figura 17). Asimismo, una mayor proporción de células se mantuvieron suspendidas en el medio con el tratamiento de la solución de desfloculación (barras grises oscuro, Figura 17). Esto último se explica por la presencia de EDTA (0.5 M), que como agente quelante, evitó que el calcio estuviera disponible para llevar a cabo su rol en la floculación. Goossens *et al.*, (2015) demostró que el calcio juega un papel fundamental en el mecanismo de la floculación. Por un lado, en la adhesión proteína-carbohidrato, el  $\text{Ca}^{2+}$  forma un complejo con el sitio de unión de carbohidratos (de la floculina) y el carbohidrato ligando. Por otro lado, la floculación por adhesión glicano-glicano, resulta de interacciones iónicas fuertes, mediadas por calcio, debidas a la presencia de grupos manosil-fosfato de los glicanos (Goossens *et al.*, 2015). La floculación de las cepas de estudio podría darse por cualquiera de los dos mecanismos mencionados, o por una combinación de ambos.

La menor DO resultante de los cultivos con tratamiento con calcio, se debió a la floculación de las células. Primeramente, las células se trataron con condiciones que propician la floculación (sulfato de calcio (0.51 g/L), acetato de sodio (6.8 g/L) y ácido acético (4.05 g/L)) a pH de 4.5) (Bendiak *et al.*, 1996). En segundo lugar, los tratamientos con solución de floculación, tuvieron una menor DO en comparación con el tratamiento con solución de desfloculación; lo cual indica que las células de las tres cepas tratadas con la solución de floculación, sedimentaron. La sedimentación no es exclusiva de la floculación, es decir, las células no floculantes sedimentan eventualmente, debido a que, con el paso del tiempo, estas se sobreponen al movimiento browniano que las mantiene suspendidas; sin embargo, cuando las células floculan, forman agregados grandes (flóculos) de cientos o miles de células que sedimentan rápidamente ya que son menos retardadas por la fricción (viscosidad) (Vidgren & Londesborough 2011). Para que la sedimentación se llevar a cabo en el periodo tan corto (6 minutos) que propone el método de Bendiak *et al.*, (1996) (sección 7.9.1), debió existir floculación.

La diferencia relativa entre las células totales y el número de células que flocculan es el porcentaje de floculación, también conocido como potencial de floculación (PF), el cual se calcula para cada cepa con la siguiente fórmula (Bendiak *et al.*, 1996):

$$\text{Potencial de floculación (\%)} = \frac{100(A - B)}{A}$$

Donde:

- A es la absorbancia de la suspensión de las células totales.
- B es la absorbancia de la suspensión en reposo.

En la Tabla 16 se muestran los resultados del PF de cada cepa. De acuerdo con Bendiak *et al.*, (1996) la cepa DH2 es una cepa muy flocculante, WLP001 es una cepa medianamente flocculante mientras que FV10 es una cepa no flocculante (Bendiak *et al.*, 1996).

**Tabla 16.** Cuantificación de la floculación y sedimentación de las cepas seleccionadas

<b>Cepa</b>	<b>Potencial de floculación</b>	<b>Desviación estándar</b>
WLP001	32.94 %	1.13 %
FV10	7.53 %	1.92 %
DH2	87.81 %	3.23 %

\*La determinación del PF se hizo por triplicados, se presenta el promedio.

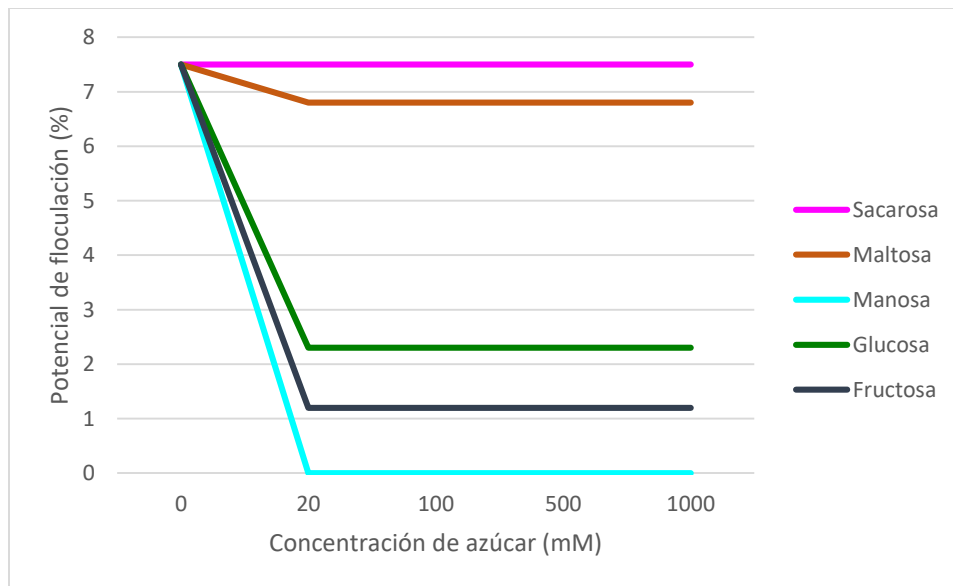
Lachance, (1995) encontró que en una población de cepas *S. cerevisiae* originarias del mosto de agave, algunas de ellas tenían un fenotipo de floculación muy fuerte, como es el caso de DH2 (Figura 10B y Tabla 16). Diversos estudios han

demostrado que la capacidad de floculación de las levaduras, es regulada por la expresión de los genes pertenecientes a la familia *flo* (Di Gianvito *et al.*, 2017). En *S. cerevisiae* F6789, por ejemplo, el gen *flo5* impulsa la floculación e influye en las propiedades adhesivas (Di Gianvito *et al.*, 2017). El PF (87.81%) de la cepa DH2 es mayor a los de otras cepas de *S. cerevisiae* cerveceras, como el control positivo (WLP001). Es posible que DH2 cuente con expresión del gen *flo1*, ya que se ha identificado que el gen *flo1* otorga una capacidad de floculación muy fuerte (Westman, *et al.*, 2018). FV10 mostró ser una cepa no-floculante (Tabla 16), lo cual no sería un impedimento para producción de cerveza, ya que existen cepas cerveceras comerciales poco-floculantes como WLP380 (White Labs, s.f.b), así como cepas no-floculantes como las cepas cerveceras chinas 6508, 6525 y YK (Zhao, *et al.*, 2012). La floculación puede ocurrir al inicio de la fermentación, lo cual puede generar fermentaciones incompletas y una gravedad específica alta resultante de un consumo incompleto de azúcares fermentables (Vidgren & Londesborough, 2011). Esto podría explicar la incapacidad de DH2 de consumir por completo sacarosa, ya que a pesar de que la cepa comenzó a consumir este azúcar, las células sedimentaron en el segundo día de fermentación (Figura 15) y no continuaron el consumo de este disacárido.

### 8.5.1. Inhibición de la floculación por carbohidratos

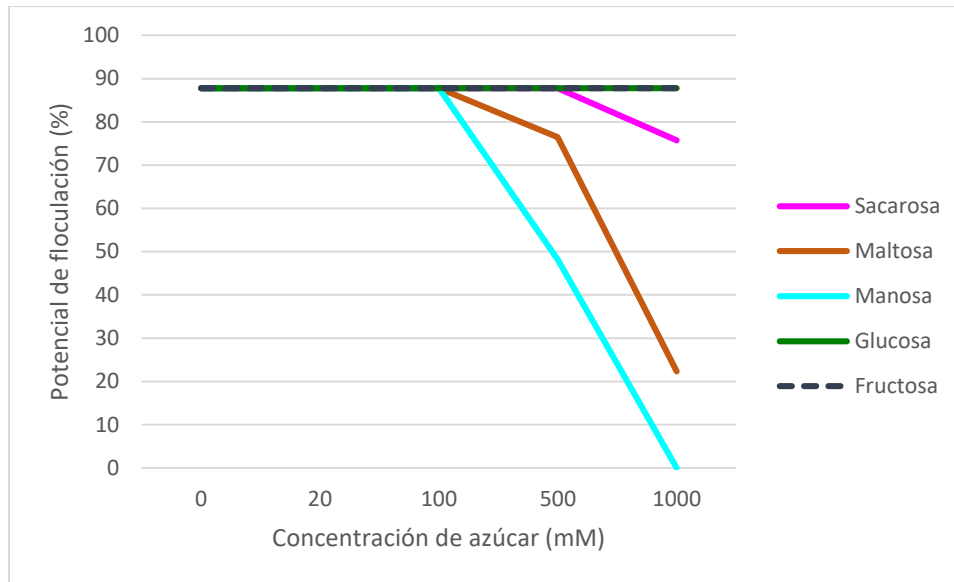
Se evaluó el efecto que tienen diferentes carbohidratos (glucosa, fructosa, maltosa, sacarosa y manosa), en concentraciones variadas, para inhibir la floculación o reducir el PF de las diferentes cepas. La floculación de la cepa FV10 fue inhibida por tres carbohidratos: manosa, fructosa y glucosa. La floculación de DH2 fue inhibida por manosa, maltosa y sacarosa. Mientras que la floculación de la cepa WLP001 fue inhibida por los 5 carbohidratos. En las Figuras 18, 19 y 20 se muestra la inhibición de la floculación generada por diferentes azúcares en las cepas de estudio. La floculación es un fenómeno cepa-dependiente y reversible, ya que los flóculos formados pueden disociarse con un agente quelante, manosa u otros carbohidratos que compiten con los glicanos de la pared celular de las levaduras por los sitios de unión de las floclinas (Vidgren & Londesborough, 2011).





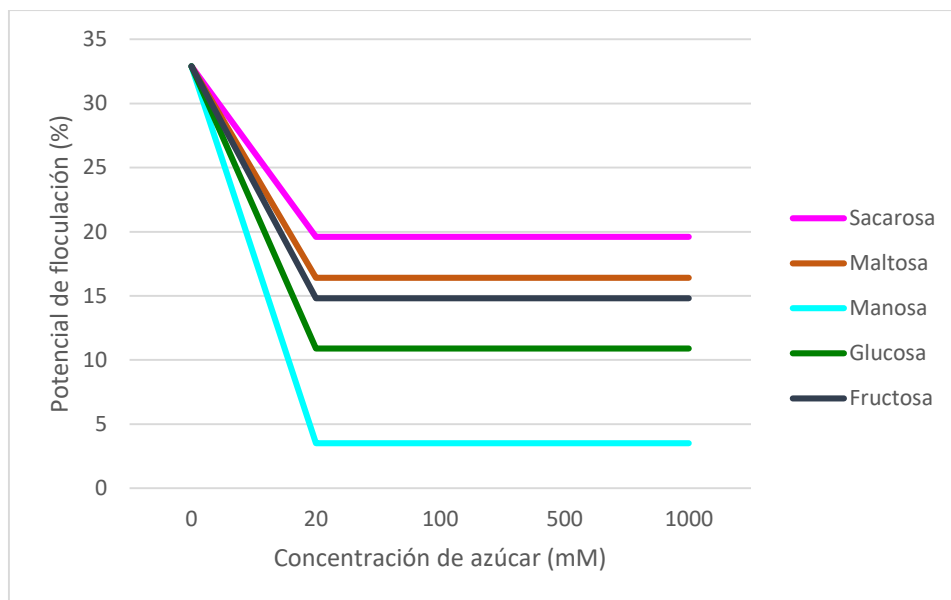
**Figura 18.** Inhibición de floculación de la cepa FV10 causada por los diferentes azúcares en distintas concentraciones.

El PF de la cepa FV10 disminuyó al ser tratada con los monosacáridos, pero no se modificó con el tratamiento con los disacáridos (Figura 18). La manosa inhibió por completo la floculación de FV10 en la concentración más baja (20 nM), lo que podría indicar una afinidad alta de las floculinas de FV10 por manosa y una afinidad baja por los oligo-mananos, lo cual coincide con el PF inherentemente bajo (7.53%) de FV10, y con su baja sedimentación durante la fermentación (Figura 15). La disminución del PF de FV10 con la presencia de una concentración baja de monosacáridos podría significar que la manosa, glucosa y fructosa, compiten con los sitios de unión de carbohidratos de las floculinas.



**Figura 19.** Inhibición de floculación de la cepa DH2 causada por los diferentes azúcares en distintas concentraciones.

La cepa DH2 tiene un alto potencial de floculación (87.81%), así que es posible que las floculinas de esta cepa cuenten con alta afinidad por los residuos de manano-olisacárido de las manoproteínas ancladas a la pared celular de sus células. La manosa disminuyó e inhibió la floculación de DH2 en las dos concentraciones más altas utilizadas, respectivamente. Stratford, (1992) encontró que existen cepas de *S. cerevisiae* cuyos ligandos favoritos para la floculación, son cadenas de di/tri sacáridos de manosa de las cadenas laterales de las manoproteínas; además estas cepas son incapaces de flocular si las cadenas laterales de las manoproteínas constan de una sola manosa (Stratford, 1992), esto puede explicar una posible afinidad más alta, de las floculinas de DH2, por polímeros de manosa que por monómeros de dicho carbohidrato. Está demostrado que, en algunas cepas, los disacáridos de carbohidratos pueden disminuir en mayor proporción la floculación que los monómeros (Masy *et al.*, 1992). Esto coincide con el hecho de que disacáridos como la maltosa y la sacarosa hayan disminuido el PF de DH2, pero la glucosa y fructosa no hayan generado un efecto de disminución del PF (Figura 19).



**Figura 20.** Inhibición de floculación de la cepa WLP001 causada por los diferentes azúcares en distintas concentraciones.

Por último, la cepa WLP001 mostró tener la menor especificidad de reconocimiento a azúcares de todas las cepas de estudio, ya que su PF fue afectado por todos los carbohidratos. El azúcar que modificó, en mayor medida, el PF del control positivo fue la manosa, seguida por glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa. La inhibición de la floculación de WLP001 fue independiente de la concentración de azúcares (Figura 20), es decir, la concentración más baja de cada azúcar bastó para inhibir la floculación de WLP001 en la misma medida que las concentraciones más altas. Dranginis *et al.* (2007) explica que los sitios de unión de carbohidratos en las floculinas, pueden ser sitios flexibles que reconocen diferentes azúcares, de diferentes longitudes y diferentes enlaces glucosídicos (Dranginis, *et al.*, 2007).

El tratamiento con azúcares modifica el PF de las cepas de forma diferente, y es dependiente de la concentración de carbohidratos, tipo de carbohidratos, de la identidad de las floculinas que expresan las cepas y del grado de compactación del sitio de unión de la floculina (Van Mulders, *et al.*, 2009; Goossens *et al.*, 2015). Willaert, (2018) estudió que diferentes proteínas FLO cuentan con diferentes

afinidades de unión a unidades de monosacáridos y oligosacáridos, los cuáles pueden o no contar con manosa (Willaert, 2018).

La floculación de WLP001 y de FV10 coincide con el fenotipo de floculación llamado NewFlo. El fenotipo NewFlo se caracteriza por que la floculación es inhibida por la presencia de manosa, glucosa, fructosa, maltosa y sacarosa en el medio (Stratford & Assinder, 1991). Otro fenotipo de floculación llamado Flo1 se caracteriza por floculaciones inhibidas exclusivamente por manosa. Las cepas cerveceras con fenotipo NewFlo, como WLP001 (Figura 20), tienen la capacidad permanecer suspendidas en el medio mientras haya carbohidratos en el mosto (Boulton & Quain, 2006), y una vez que agotan los carbohidratos del medio floculan y sedimentan. Generalmente, los fenotipos NewFlo se asocian exclusivamente a cepas cerveceras, sin embargo, FV10 (cepa mezcalera) demostró tener características de este fenotipo (Figura 18). Van Mulders *et al.*, (2009) estudiaron floculinas y genes *flo*, y determinaron que la clasificación Flo y NewFlo no es tan estricta, ya que algunos fenotipos que han sido determinados como Flo1 pueden ser inhibidos por carbohidratos diferentes a la manosa.

Boulton & Quain, (2006) consideran que la floculación es un parámetro importante a monitorear durante la fermentación, y es casi tan fundamental como el monitoreo de la velocidad de la fermentación (Boulton & Quain, 2006). Existen pocos estudios de caracterización de floculación de cepas aisladas de mezcal. Lachance, (1995), hizo algunas observaciones de cepas *S. cerevisiae* aisladas de la fermentación del jugo de maguey y Vergara-Álvarez, (2014) caracterizó la floculación de cepas de levaduras aisladas del mezcal, en términos de la inhibición de la floculación por diversos azúcares en condiciones de estrés, y también identificó los genes *flo* presentes en algunas cepas. Para entender más a fondo las características de floculación de las cepas DH2 y FV10, es necesario determinar con cuáles genes *flo* cuentan, y aunque la presencia de genes no predice el fenotipo de floculación, sí es un indicador que permite comprender mejor las características fermentativas de las cepas (Zhao *et al.*, 2012). El alto potencial de floculación de DH2 la convierte en una candidata interesante para ensayos de co-floculación. La

co-floculación consiste en floculación conjunta de una cepa no-floculante y una cepa muy floculante. Las floculinas de la cepa muy floculante se adhieren a las manoproteínas de la pared celular de la cepa poco floculante (Stratford, 1992). Algunas cepas no-floculantes o poco-floculantes se utilizan en la industria cervecera debido a su aporte sensorial, sin embargo, estas cepas cuentan con la desventaja de sedimentar en periodos largos, lo que significa mayores tiempos y costos de proceso. Las cepas no/poco-floculantes, pueden ser retiradas del medio a través de centrifugación y/o filtración. La desventaja de la primera es el costo de la tecnología, la segunda puede llegar a ser complicada debido al latente estancamiento de las levaduras en los medios filtrantes. En este sentido, la adición de biomasa de levaduras muy floculantes, al término de la fermentación con cepas no/poco-floculantes es una solución posible, aunque poco explorada.

## 9. Conclusiones

Se determinó la identidad de las 19 levaduras de estudio aisladas de la producción de mezcal. Las cepas se re-identificaron como *Saccharomyces cerevisiae*, a través del análisis de PCR-RFLP de la región ITS-5.8S del ADN ribosomal. Todas las levaduras produjeron el compuesto fenólico 4VG, un producto de fermentación típico de levaduras no cerveceras que imparte sabor a clavo. Además, presentaron límites de atenuación de 11 a 20%, valores bajos para su aplicación en producción de cerveza.

FV10 y DH2 fueron cepas capaces de consumir maltosa y sacarosa como única fuente de carbono en aerobiosis y ambas contaron con características útiles para la fabricación de cerveza. FV10 tuvo una mayor capacidad de crecimiento en maltosa (6% p/v) en aerobiosis que el resto de las cepas de estudio. DH2 tuvo una capacidad de sedimentación rápida y generación de flóculos de fuerte unión, dos características muy útiles para la remoción de biomasa al término de las fermentaciones. Ambas cepas fueron seleccionadas para experimentos adicionales de fermentación y floculación.

Tanto FV10 como DH2 tuvieron bajo consumo de carbohidratos de mosto de malta de cebada en comparación a un control positivo (WLP001, una levadura cervecera). Ambas cepas de estudio fermentaron glucosa y fructosa, solamente DH2 fermentó sacarosa y ninguna de las dos cepas fermentaron maltosa ni maltotriosa. Derivado del bajo consumo de carbohidratos, las dos cepas de estudio tuvieron baja producción de etanol en comparación al control positivo. FV10 y DH2 produjeron en promedio 7.9% y 11.2 % de la cantidad de etanol producida por la cepa de referencia, respectivamente. El nulo consumo de maltosa y maltotriosa del mosto de malta, y la subsecuente baja producción de etanol, convierten a las dos cepas estudio en candidatas poco ideales para la producción de cervezas convencionales. Sin embargo, estas cepas produjeron compuestos aromáticos como los alcoholes isoamílico y fenético (que aportan un perfil sensorial a plátano y rosas, respectivamente); el éster acetato de feniletilo; el fenol 4VG; y mostraron la

capacidad de bajar rápidamente el pH del medio. Estas características son ideales para levaduras candidatas a la producción de cervezas alternativas con bajo contenido de alcohol.

De acuerdo con su PF, con un valor de 7.53%, FV10 se trató de una cepa no floculante. Interesantemente DH2 fue una cepa muy floculante con un PF de 87.81%. Es posible que FV10 cuente con floculinas con reconocimiento a monosácaridos, ya que la floculación de FV10 fue inhibida parcialmente, por glucosa y fructosa, e inhibida completamente por manosa. Por otro lado, la cepa DH2 podría contar con expresión del gen de floculación que otorgue una capacidad de floculación muy fuerte, por ejemplo, *flo1*. Además, podría tener alta afinidad por los manano-oligosacáridos de su pared celular, ya que su floculación fue inhibida con tratamientos de altas concentraciones de manosa, maltosa y sacarosa. El bajo PF de FV10 la convierte en una candidata para la fabricación de cervezas turbias que contienen levaduras suspendidas como las *Hefeweizen* alemanas y las *Witbier* belgas. Por otro lado, debido a su alto potencial de floculación, DH2 podría emplearse en ensayos de floculación con cepas *S. cerevisiae* no floculantes para promover la co-floculación.

## 10. Perspectivas

Se podría estudiar la capacidad de las cepas *Saccharomyces cerevisiae*, DH2 y FV10 para escapar de la represión catabólica por glucosa, ya que ambas cepas no consumieron los disacáridos sacarosa y maltosa durante los ensayos de fermentación. Carlson *et al.*, (1981) fueron los primeros en identificar que una mutación en *snf1* puede originar un fenotipo de no consumo de sacarosa durante condiciones anaerobias (Carlson *et al.*, 1981). La ruta de represión por glucosa consiste en una cascada de señalización compleja que inhibe a los genes *suc* y *mal* (Klein, *et al.*, 1999; Olsson & Nielsen, 2000), y una vez que baja la concentración de glucosa, la ruta tiene un sentido contrario de “desrepresión” (Maziarz, *et al.*, 2016). Los genes involucrados en la ruta de des-represión por glucosa, son *snf1*, *sak1*, *tos3*, *elm1*, *mig1* y *mig2*, los cuáles podrían analizarse a nivel de expresión y actividad.

Adicionalmente, sería interesante identificar a los genes *flo* (y genes involucrados en la floculación como *flo8*) que se encuentran expresados. Los resultados de estos ensayos podrían ser un camino interesante para relacionar el genotipo de las floculinas de las cepas de estudio con el espectro de reconocimiento de carbohidratos, o bien, la inhibición de la floculación.



## 11. Bibliografía

- ACERMEX (2018). Reporte de la industria independiente mexicana 2018. Recuperado el 07/04/2020 en: <http://acermex.org/wp-content/uploads/2019/11/Reporte-de-la-Industria-.Acermex.pdf>
- Almeida, P.J., Rodrigues J.A., Guido, L.F., Santos J.R. & Barros A.G. (2003). Free sulfur dioxide in beer as the difference between total sulfur dioxide and acetaldehyde: a voltammetric approach. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61, 191-195.
- Alcazar-Valle, M., Gschaedler, A., Gutierrez-Pulido, H., Arana- Sánchez, A. & Arellano-Plaza M. (2019). Fermentative capabilities of native yeast strains grown on juices from different Agave species used for tequila and mezcal production. *Braz. J. Microbiol.* 50, 379-388.
- Alves, S.L.Jr., Herberts, R., Holatz, C., Miletti, L., & Stambuk, B. (2007). Maltose and maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 65, 99-104.
- Alves., S.L.Jr., 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. *App. Environ. Microbiol.* 74, 1494–1501.
- Alves, S.L.Jr., Thevelein, J. M. & Stambuk, B. U. (2014). Expression of *Saccharomyces cerevisiae*  $\alpha$ -glucoside transporters under different growth conditions. *Braz. J. Chem. Eng.* 31, 1-8.
- Andrade, O. (2006). Identificación de levaduras por medio de PCR-RFLP de la región RNAr 5.8S-ITS aisladas durante la fermentación de mezcal de la región de Sola de Vega Oaxaca. Tesis de Maestría, Facultad de Química, UNAM.
- Badotti, F., Dário, M.G., Alves Jr., S.L., Cordioli, M.L., Miletti, L.C., de Araujo, P.S. & Stambuk, B.U. (2008). Switching the mode of sucrose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb. Cell Fact.* 7:4.
- Baker, E.C., Wang, B., Bellora, N., Peris, D., Hulfachor, A.B., Koshalek, J.A., Adams, M., Libkind, D. & Hittinger, C.T. (2015). The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of Lager-brewing yeasts. *Mo. Biol. Evol.* 32, 2818-2831.
- Bamforth C. (2003). Wort composition and beer quality. In *Brewing Yeast Fermentation Performance*, Smart K, Bamforth CW (eds). Blackwell Science: Oxford; 75-85.
- Bayly, J.C., Douglas, L.M., Pretorius, I.S., Bauer, F.F & Dranginis, A.M. (2005). Characteristics of Flo11-dependent flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 5(12): 1151-1156.

- BJCP (2015). Beer Judge Certification Program. 2015 Styles Guidelines. Recuperado el 05/06/2019 en: [https://www.bjcp.org/docs/2015\\_Guidelines\\_Beer.pdf](https://www.bjcp.org/docs/2015_Guidelines_Beer.pdf).
- Bellut, K., Michel, M., Zarnkw, 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, 66.
- Bendiak, D., van der Aar, P., Barber, F., Benzing, P., Berndt, R., Carrick, K., Dull, C., Dunn-Dufault, S., Eto, M., Gonzalez, M., Hayashi, N., Lawrence, D., Miller, J., Phare, K., Pugh, T., Rashed, L., Rossmoore, K., Smart, K., Sobczak, J., Speers, A. & Casey, G. (1996). Yeast flocculation by absorbance method. *J. Am. Soc. Brew. Chem. Methods of Analysis*. Publication no. J-1996-0923-01O.
- Berner, T.S., Jacobsen, S. & Arneborg, N. (2013). The impact of different ale brewer's yeast strains on the proteome of immature beer. *BMC Microbiology*. 13, 215-222.
- Berthels, N.J., Cordero, R.R., Bauer, F.F., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S. (2004). Discrepancy in glucose and fructose utilisation during fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains. *FEMS Yeast Res.* 4, 683–689.
- Borneman, A.R. & Pretorius, I.S. (2015). Genomic insights into the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genetics* 199, 281-291.
- Boulton & Quain (2006). *Brewing yeast & fermentation*. Primera edición en pasta blanda. Oxford, UK: Blackwell Science Ltd.
- Bozda, G.O. & Greig, D. (2014). The genetics of a putative social trait in natural populations of yeast. *Mol Ecol*. 23, 5061-5071.
- Brányik, T., Silva, D.P., Baszczynski, M., Lehnert, R. & Almeida e Silva, J.B. (2012). A review of methods of low alcohol and alcohol-free beer production. *J. Food Eng.* 108, 493-506.
- Brewers Association (2018). Craft Brewer definition. Obtenido el día 07/04/2020 en: <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/craft-brewer-definition/>
- Brewers Association (2020). National Beer Sales & Production Data. Obtenido el día 07/04/2020 en: <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/national-beer-stats/>.
- BSI. (s.f.). Yest library. Obtenido el 06/06/2019 en: <https://www.brewingscience.com/yeast-library/>.
- Canales, R.A., Román, Y.G., Aldana, W.O. (2017). Entrepreneurship of young people in Mexico. A critical perspective. *Entreciencias: diálogos en la Sociedad del Conocimiento*. 5, DOI: /10.21933/J.EDSC.2017.12.211
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G. & Romano, P. (2018). Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*. 4, 38.

- Carlson, M. & Botstein, D. (1982). Two differentially regulated mRNA with different 5' ends encode secrete intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28, 145-54.
- Carlson, M., Osmond, B.C & Botstein, D. (1981). Mutants of yeast defective in sucrose utilization. *Genetics*. 98, 25-40.
- Celenza, J.L & Carlson, M. (1986). A yeast gene that is essential for release from glucose repression encodes a protein kinase. *Science*. 233, 1175-1180.
- Chemical land 21 (s.f.). Bromocresol Green. Recuperado el día 05/06/2019 en:  
<http://chemicalland21.com/specialtychem/finechem/BROMOCRESOL%20GREEN.htm>.
- Chen, E.C. (1978). The relative contribution of Ehrlich and biosynthetic pathways to the formation of fusel alcohols. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 36, 39-43.
- Chen, G.C. & Jordan, F. (1984). Brewers' yeast pyruvate decarboxylase produces acetoin from acetaldehyde: a novel tool to study the mechanism of steps subsequent to carbon dioxide loss. *Biochemistry*. 23, 3576-3582.
- Chester, V.E. (1963). A study of changes in flocculence in a single cell culture of a strain of *Saccharomyces cerevisiae*. 26, 223-233.
- Ciriacy, M. (1997). Isolation and characterization of yeast mutants defective in intermediary carbon metabolism and in carbon catabolite derepression. *Molec. Gen. Genet.* 154, 213-220.
- Cocchetti, P., Nicastro, R. & Tripodi, F. (2018). Conventional and emerging roles of the energy sensor Snf1/AMPK in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microb Cell*. 5(11): 482-494.
- Coghe, S., Benoot, K., Devaux, F., Vanderhaegen, B. & Delvaux, F.R. (2004). Ferulic acid release and 4-vinylguaicol formation during brewing and fermentation: indications for feruloyl esterase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Agric. Food Chem.* 52, 602-608.
- Cordente, A.G., Curtin, C.D., Varela, C. & Pretorius, I.S. (2012). Flavour-active wine yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 96, 601-618.
- Cova, C. (2010). Caracterización molecular de las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de la fermentación de mezcal, pulque y tequila. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Cox, B.S. (1995) Genetic analysis in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*. In *The Yests*, 2<sup>nd</sup> edition, (eds A.H. Rose, A.E. Wheals and J.S. Harrison), vol. 6. Pp. 7-67. Academic Press, London.
- D'Amore, T., Russell, I. & Stewart, G.G. (1989). Sugar utilization by yeast during fermentation. *J. Ind. Microbiol.* 4, 315-324.

- De Francesco, G., Turchetti, B., Sileoni, V., Marconi, O. & Perretti G. (2015). Screening of new strains of *Saccharomycesoides ludwigii* and *Zygosaccharamyces rouxi* to produce low-alcohol beer. J. Inst. Brew. 121, 113-121.
- Deák, T. (2003). Yeast, Editor(s): Benjamin Caballero, Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition (Second Edition), Academic Press, Pages 6233-6239, ISBN 9780122270550.
- De Kok, S., Yilmaz, D., Suir, E., Pronk, J.T., Daran, J.M., van Maris, A.J.A. (2011). Increasing free-energy (ATP) conservation in maltose-grown *Saccharomyces cerevisiae* by expression of a heterologous maltose phosphorylase. Metab. Eng. 13, 518-526.
- de Smidt, O., du Preez, J. & Albertyn J. (2008). The alcohol dehydrogenases of *Saccharomyces cerevisiae*: a comprehensive review. FEMS Yeast Res. 8, 967-978.
- Di Gianvito, P., Tesnière, C., Suzzi, G., Blondin, B., & Tofalo, R. (2017). FLO5 gene controls flocculation phenotype and adhesive properties in a *Saccharomyces cerevisiae* sparkling wine strain. Sci Rep. 7, 10786.
- Di Genova (2012). El barman científico. Primera edición. Siglo XXI editores.
- Diderich, J.A., Weening, S.M., van den Broek, M., Pronk, J.T. & Daran, J.M.G. (2018). Selection of Pof *Saccharomyces eubayanus* variants for the construction of *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* hybrids with reduced 4-vinyl guaiacol formation. Front. Microbiol. 9:1640. doi: 10.3389/fmicb.2018.01640
- Dranginis, A.M., Rauceo, J.M, Coronado, J.E. & Lipke P.N. (2007). A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 71, 282-294.
- D'Hautcourt, O. & Smart, K. (1999). Measurement of brewing yeast flocculation. J. Am. Soc. Brew. Chem. 57,123-128.
- D.O.F. (2016). Norma Oficial Mexicana, NOM-070-SCFI-2016, Bebidas alcohólicas-Mezcal-Especificaciones. Obtenido el día 02/06/2019 en: [https://dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017](https://dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5472787&fecha=23/02/2017)
- D.O.F. (2017). Norma Oficial Mexicana, NOM-199-SCFI-2017. Bebidas alcohólicas-Denominación, especificaciones fisicoquímicas, información comercial y métodos de prueba. Obtenido el día 02/06/2014 en: [http://www.dof.gob.mx/nota\\_detalle.php?codigo=5502882&fecha=30/10/2017](http://www.dof.gob.mx/nota_detalle.php?codigo=5502882&fecha=30/10/2017)
- Domizio, P., House, J.F., Joseph, C.M., Bisson, L.F. & Bamforth, C.W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative for production of beer. J. Inst. Brew. 122, 599-604.

- Donnelly, D. & Hurley, J. (1996) Yeast monitoring: the Guinness experience. *Ferment*, 9, 283-286.
- Espinosa, D. (2013). Evaluación de la producción de etanol y compuestos congénicos en mostos de agave potatorum utilizando levaduras aisladas de fermentaciones de mezcal. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- 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.
- Euromonitor International, (2013) Beer. A New Dawn brewing. Recuperado el día 06/05/2014 en <http://www.euromonitor.com/>.
- Euromonitor International, (2014) Alcoholic Drinks: Euromonitor from trade sources/national statistics. Date Exported (GMT): 06/05/2014 18:12:04
- Fix, G. & Fix, L. (1997). An analysis of brewing techniques. Primera edición. Brewing Publications.
- Fleet, G.H. (1991). Cell walls. In *The Yeasts*. Segunda edición. Editores A. Rose & J. Harrison. Vol. 4. Pp 199-277. Academic Press, Londres.
- Fragoso, S. & Coello, P. (2008). La AMPK y la homeostasis energética. *REB*. 27(1):3-8.
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Veerle, S., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Telling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., Verstrepen, K. (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell* 166, 1397-1410.
- Gilliland, R. (1971). Yeast classification. *J. Inst. Brew.* 77, 276-284.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis R.W., Dujon, B., Feldemann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. & Oliver, S.G. (1996). Life with 6000 genes. *Science*. 274, 546, 563-567.
- Goossens, K.V., Ielasi, F.S., Nookaew, I., Stals, I., Alonso-Sarduy, L., Daenen, L., Van Mulders, S.E., Stassen, C., van Eijsden, R.G.E., Siewers, V., Delvaux, F.R., Kasas, S., Nielsen, J., Devreese, B. & Willaert, R.G. (2015). Molecular mechanism of flocculation self-recognition in yeast and its role in mating and survival. *MBio*. 6, 1-16.
- Goossens, K. & Willaert R. (2010). Flocculation protein structure and cell-cell adhesion mechanism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett.* 32, 1571:1585.
- Gorter de Vries, A., Pronk, J.T. & Daran, J-M.G. (2019). Lager-brewing yeasts in the era of modern genetics. *FEMS Yeast Res.* 19(7) foz063.
- Graham, G.S. & Russell, I. (1987). Biochemistry and genetics of carbohydrate utilization by industrial yeast strains. *Pure & Appl. Chem.* 59, 1493-1500.

- Guilliermond, A. (2003). Yeast: culture, Identification and microbiology. Watchmaker Publishing. Pp: 235.
- Gupta, M., Abu-Ghannam, N. & Gallagher, E. (2010) Barley for brewing: Characteristic changes during malting, brewing and applications of its by-products. *Compr. Rev. Food Sci. F.* 9, 318-328.
- Hall, J.F. (1971). Detection of wild yeasts in the brewery. *J. Inst. Brew.* 77, 513-516.
- Hansen E. C., (1883). Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques V. Methodes pour obtenir des cultures pures de *Saccharomyces* et. de mikroorganismes analogues. *C. R. Trav. Lab. Carlsberg.* 2, 92–105.
- Hatanaka, H., Mitsunaga H. & Fukusaki, E. (2018). Inhibition of *Saccharomyces cerevisiae* growth by simultaneous uptake of glucose and maltose. *J. Biosci. Bioeng.* 125, 52-58.
- Hazelwood, L.A., Daran, J.M., van Maris, A.J., Pronk, J.T., & Dickinson, J.R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl. Environ. Microbiol.* 74, 2259-2266.
- Hazelwood, L., Walsh, M.C., Pronk, J.T., Daran, J.M. (2010). Involvement of vacuolar sequestration and active transport in tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to hop iso-alpha-acids. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 318-328.
- Hedbacker, K. & Carlson M. (2008). SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci.* 13: 2408-2420.
- Hill, A. (2015). Brewing microbiology: Managing microbes, ensuring quality and valorising waste. Primera edición. Woodheas Publishing Elsevier. Páginas 33-34.
- Houghton-Larsen J., Brandt, A. (2006). Fermentation of high concentrations of maltose by *Saccharomyces cerevisiae* is limited by the COMPASS methylation complex. *Appl. Environ. Microbiol.* 72, 7176-7182.
- Huuskonen, A., Markkula, T., Vidgre, V., Lima, L., Mulder, L., Geurts, W., Walsh, M. & Londesborough, J. (2010). Selection from industrial lager yeast strains of variants with improved fermentation performance in very-high-gravity worts. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 1563-1573.
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, b., Verstrepen, K.J. & Thevelein, J.M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiol.* 72, 55-66.
- Ibañez Baltazar, A.T. (2013). Determinación de compuestos congenéricos en cerveza elaborada a partir de mosto de malta de alta gravedad. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Jansen, M.L, Daran-Lapujade, P., de Winde, J.H., Piper, M.D. & Pronk, J.T. (2004) Prolonged maltose-limited cultivation of *Saccharomyces cerevisiae* selects for cells with improved maltose affinity and hypersensitivity. *Appl Environ Microbiol.* 70, 1956–1963.

- Jin, Y.L. & Speers, A. (2000). Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Am. Soc. Brew. Chem. 58, 108-116.
- Joseph, S.B. & Hall, D.W. (2004) Spontaneous mutation in diploid *Sacchromyces cerevisiae*. Genetics. 168, 1817-1825.
- Kerr, E.D., McDiarmid, D.C., Fraser, J.A. & Schulz, B.L. (2018). Cell wall and whole cell proteomes define flocculation and fermentation behavior of yeast. Fermentation 4, 80.
- Kirchmayr M.R., Segura-García L.E., Lappe-Oliveras P., Moreno-Terrazas R., de la Rosa M., Gschaedler-Mathis A. (2017). Impact of environmental conditions and process modifications on microbial diversity, fermentation efficiency and chemical profile during the fermentation of mezcal in Oaxaca. LWT Food Sci. Technol. 79, 160–169.
- Klein, C.J.L., Rasmussen, J.J., Rønnow B., Olsson, L. & Nielsen, J. (1999). Investigation of the impact of MIG1 and MIG2 on the physiology of *Saccharomyces cerevisiae*. J. Biotechnol. 68, 197-212.
- Kuchin, S.V, Kartasheva, N.N. & Benevolensky, S.V. (1993). Genes required for derepression of an extracellular glycoamylase gene, STA2, in the yeast *Saccharomyces*. Yeast. 9, 533-541.
- Kurtzman, C., Fell, J., Boekhout, T. & Robert V. (2011). Chapter 7- Methods for Isolation, Phenotypic Characterization and Maintenance of Yeast. The Yeast, 87-110.
- Lachance, M.A. (1995). Yeast communities in a natural tequila fermentation. Antonie van Leewenhoek. 68,151-160.
- Lagunas, R. (1993). Sugar transport in *Saccharomyces cerevisiae*. FEMS Microbiol. Rev. 10, 229-242.
- Landaud, S., Helinck, S. & Bonnarme, P. (2008). Formation of volatile sulfur compounds and metabolism of methionine and other sulfur compounds in fermented food. Appl. Microbiol. Biotechnol. 77, 1191-1205.
- Lee, Y.J., Choi, Y.R., Lee, S.Y., Park, J.T., Shim, J.H., Park, K.H., & Kim, J.W. (2011). Screening wild yeast strains for alcohol fermentation from various fruits. Mycobiology. 39, 33–39.
- Lentz, M., Travis, Putzke, T., Hessler, R. & Luman, E. (2014). Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential. J. Inst. Brew. 120, 559-564.
- Ling, A. (1909). Prof. Emil Christian Hansen. Nature 81, 310. <https://doi.org/10.1038/081310a0>
- López-Álvarez, A., Díaz-Pérez A.L., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L. & Campos-García, J. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. J. Biosci. Bioeng. 113, 614-618.

- Macedo-Araújo, T., Teixeira-Souza, M., Santos-Diniz, R.H., Kiyomi-Yamakawa, C., Bergmann-Soares, L., Lutz-Lenczak, J. de Castro-Oliveira, J. Henrique-Goldman, G., Alves-Barbosa, E., Silva-Campos, A.C., Miranda-Castro, I. & Lopes-Brandão, R. (2018). Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. *Antonie van Leeuwenhoek*. 111, 1749-1766.
- MacWilliam, I.C. (1968). Wort Composition- A review. *J. Inst. Brew.* 74, 38-54.
- Magalhães, F., Vidgren, V., Ruohonen, L., & Gibson, B. (2016). Maltose and maltotriose utilisation by group I strains of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *FEMS yeast research*, 16(5).
- Mallet, J. (2014). *Malt- A practical guide from field to brewhouse*. Primera edición. Boulder, Colorado, USA: Brewers Publications.
- Marongiu, A., Zara, G., Legras, J.L., Del Caro, A., Mascia, I., Fadda, C. & Budroni, M. (2014). Novel starters for old processes: use of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from artisanal sourdough for craft beer production at a brewery scale. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 42, 85-92.
- Marques, W.L. Raghavendran, V., Stambuk, B.U. & Gombert, A.K. (2016). Sucrose and *Saccharomyces cerevisiae*: a relationship most sweet. *FEMS Yeast Res.* 16, fov107.
- Martínez-Zepeda, P.N. (2014). Evaluación de la tolerancia a diversas condiciones de estrés y determinación de las diferencias a nivel molecular de cepas *Saccharomyces cerevisiae* aisladas de palenques de mezcal en el estado de Oaxaca. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Masy, C.L., Henquinet, A. & Mestadagh, M.M. (1992). Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*: inhibition by sugars. *Can J. Microbiol.* 38, 1298-1306.
- Maziarz, M., Shevade, A., Barrett, L. & Kuchin, S. (2016). Springing into action: Reg2 negatively regulates Snf1 protein kinase and facilitates recovery from prolonged glucose starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* 82, 3875-3885.
- McMurrough, I., Madigan, D., Donnelly, D., Hurley, J., Doyle, A.N., Hennigan, G., McNulty, N. & Smyth, M.R. (1996). Control of ferulic acid and 4-vinylguaiacol in brewing. *J. Inst. Brew.* 102, 327-332.
- Meier-Dörnberg, T., Kory, O.I., Jacob, F., Michel, M. & Hutzler, M. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe? - spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization. *FEMS Yeast Res.* 18, foy023.
- Meier-Dörnberg, T., Hutzler, M., Michel, M., Methner, F.J. & Jacob, F. (2017). The importance of a comparative characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* strains for brewing. *Fermentation* 3,41.



- Meilgaard, M.C. (1975) Flavour chemistry of beer. Part 2 Flavour and threshold of 239 aroma volatiles. Master Brewers Association of the Americas Technical Quarterly, 12, 151-68.
- Michel, M., Kopecká, J., Meier-Dörnberg, T.M., Zarnkow, M., Jacob F. & Hutzler M. (2016a). Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspota delbrueckii* as model. Yeast. 33, 129-144.
- Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, Fritz, Methner, F.J., Wagner, R.S. & Hutzler, M. (2016b). Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications J. Inst. Brew. 122, 569-587.
- Miranda-Castilleja, D.E., Aldrete-Tapia, J.A., Arvizu-Medrano, S.M., Hernández-Iturriaga, M., Soto-Muñoz, L. & Martínez-Peniche, R.Á. (2017). Growth kinetics for the selection of yeast strains for fermented beverages. Yeast - Industrial Applications, Antonio Morata and Iris Loira, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.70224.
- Naiman-Ali, M. & Mazharuddin-Khan, M. (2014). Screening, identification and characterization of alcohol tolerant potential bioethanol producing yeasts. Current Res. Microbiol. Biotechnol. 2, 316-324.
- NCBI (s.f.). *Saccharomyces cerevisiae* (Baker's yeast) Obtenido el día 3/08/2019 en: [https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Saccharomyces%20cerevisiae\[Organism\]&cmd=DetailsSearch](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/?term=Saccharomyces%20cerevisiae[Organism]&cmd=DetailsSearch)
- Nayyar, A., Walker, G., Wardrop, F. & Adya, A. (2017). Flocculation in industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae*: role of cell wall polysaccharides and lectin-like receptors. J. Inst. Brew. 123, 211-218.
- Nienow, A. W., Nordkvist, M. and Boulton, C. A. (2011). Scale-down/scale-up studies leading to improved commercial beer fermentation. Biotechnol. J. 6, 911-925.
- Nolasco-Cancino, H., Santiago-Urbina, J.A., Wachter, C., & Ruíz-Terán, F. (2018). Predominant yeasts during artisanal mezcal fermentation and their capacity to ferment maguey juice. Frontiers in Microbiol. 9, 2900.
- Nollet, L.M.L, Simpson, B.K., Toldra, F., Benjakul, S., Paliyath, G. & Hui, Y.H. (2012). Food Biochemistry and Food Processing. Pág. 630. Segunda edición. Iowa State University Press.
- Olsson, L. & Nielsen, J. (2000). The role of metabolic engineering in the improvement of *Saccharomyces cerevisiae*: utilization of industrial media. Enzyme and Microbial Technology 26, 785-792.
- Omura, F., Shibano, Y., Fukui, N. & Nakatani, K. (1995). Reduction of hydrogen sulfide production in brewing yeast by constitutive expression of MET25 gene. J. Am. Soc. Brew. Chem. 53, 58-62.

- 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, 52-62.
- Otter, G. E., & Taylor, L. (1971). Estimation and occurrence of acetaldehyde in beer. *J. Inst. Brew.* 77, 467-472.
- Özcan, S., Vallier, L. G., Flick J. S., Carlson, M. & Johnston, M. (1997). Expression of the SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae* is induced by low levels of glucose. *Yeast*. 13, 127-137.
- Páez-Lerma, J.B., Arias-García, A., Rutiaga-Quiñones, O.M., Barrio, E. & Soto-Cruz, N.O. (2013). Yeasts isolated from the alcoholic fermentation of agave duranguensis during mezcal production. *Food Biotechnol.* 27, 342-356.
- Patelakis, S.J.J., Ritcey, L.L., Speers, R.A. (1998). Density of lectin-like receptors in the FLO1 phenotype of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26, 279-282.
- Phaweni, M., O'Connor-Cox, E., Pickerell, A. & Axcell, B. (1992) The effects of glucose adjunct in high gravity fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* 2036. *J. Inst. Brew.* 98, 179-185.
- Piccirillo, S., White, M.G., Murphy, J.C., Law, D.J., & Honigberg, S.M. (2010). The Rim101p/PacC pathway and alkaline pH regulate pattern formation in yeast colonies. *Genetics*, 184, 707–716.
- Pickerell, T.W., Hwang, A. & Axcell, B.C. (1991). Impact of yeast-handling procedures on beer flavor development during fermentation. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 49, 87-92.
- Pires E., Teixeira, J.A., Brányik T. & Vicente A.A. (2014). Yeast: the soul of beer's aroma – a review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 98, 1937-1949.
- Polaina, J. (2002). Brewer's yeast: Genetics and Biotechnology. *Appl. Mycol. Biotechnol.* Vol. 2.
- Prahl, T. (2009). Apple wine fermentation- using indigenous yeasts as starter cultures. Pp: 27-28.
- Preiss, R., Tyrawa, C., Krogerus, K., Marius-Garshol, L. & van der Merwe. (2018). Traditional Norwegian Kveik are a genetically distinct group of domesticated *Saccharomyces cerevisiae* brewing yeasts. *Front. Microbiol.* 9, 2137.
- Priest, F. & Campbell, I. (2003). *Brewing Microbiology*. Tercera edición. Springer Science & Business Media, Nueva York. Pp 379-383.
- Quain, D.E. (2006). Editor(s): Charlie Bamforth, *Brewing: New Technologies*. Primer Edición. Woodhead Publishing, ISBN-10: 1845690036. Pp. 149-154.
- R.A.E. (2018). Definición de cerveza. Edición del tricentenario. Obtenido el 02/06/19 en: <https://dle.rae.es/?id=8P5KABB>

- Reis, V., Guarnieri, A., Gomes da Silva, J. & Ceccato-Antonini, S. (2013). Characteristics of *Saccharomyces cerevisiae* yeasts exhibiting rough colonies and pseudohyphal morphology with respect to alcoholic fermentation. *Braz J Microbiol*; 44, 1121-1131.
- Rossouw, D., Bagheri, B., Setati, M. E., & Bauer, F. F. (2015). Co-flocculation of yeast species, a new mechanism to govern population dynamics in microbial ecosystems. *PLoS one*, 10, e0136249.
- Ruíz-Terán, F., Martínez-Zepeda, P.N. Geyer- de la Merced, S.Y., Nolasco-Cancino, H. & Santiago-Urbina, J.A. (2018). Mezcal: indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains and their potential as starter cultures. *Food Sci Biotechnol*. 28, 459-467.
- Saerens S.M.G., Delvaux F., Verstrepen, K.J., Van Dijck P., Thevelein J.M. & Delvaux F.R. (2008). Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl. Environ. Microbiol*. 74, 454-461.
- Salema-Oom, M., Valadão Pinto, V., Gonçalves, P. & Spencer-Martins, I. (2005). Maltotriose utilization by industrial *Saccharomyces* Strains: Characterization of a new member of the  $\alpha$ -glucoside transporter family. *Appl. Environ. Microbiol*. 71, 5044-5049.
- Santiago-Urbina J.A. (2015). Caracterización fisicoquímica y microbiológica de Taberna, una bebida tradicional de palma de coyol (*Acrocomia aculeata*). Tesis de Doctorado, Facultad de Química, UNAM.
- Sarokin, L. & Carlson, M. (1984). Upstream region required for regulated expression of the glucose-repressible SUC2 gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, 4, 2750-2757.
- Satyanarayana, T. & Kunze, G. (2009). *Yeast Biotechnology: Diversity and applications*. Primera edición. Springer Netherlands. doi: 10.1007/978-1-4020-8292-4
- Soares, E.V. (2010). Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*: a review. *J. Appl. Microbiol*. 110, 1-18.
- Stambuk, B.U., Alves, S.L. Jr., Hollatz, C. & Zastrow, C.R. (2006). Improvement of maltotriose fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett Appl Microbiol*. 43, 370-376.
- Steensels J., Snoek, T., Meersman, E., Picca Nicolino, M., Aslankoohi, E., Christiaens, J.F., Gemayel, R., Meert, W., New, A.M., Pougach, K., Saels, V., van der Zande, E., Voordeckers, K., Verstrepen, K.J. (2012). Selecting and generating superior yeasts for the brewing industry. *Cerevisia* 37, 63–67.
- Steensels, J. & Verstrepen, K.J. (2014). Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Ann. Rev. Microbiol*. 68, 61-80.
- Stewart G. (2016). *Brewing fundamentals, part 1: Yeast- an introduction to fermentation*. Master Brewers Association of the Americas. 53, 3-9.

- Stewart G., Hill, A. & Russell, I. (2013). 125<sup>th</sup> Anniversary Review: Developments in brewing and distilling yeast strains. *J. Inst. Brew.* 119, 202:220.
- Stratford, M. (1992). Yeast flocculation: receptor definition by mnn mutants and concanavalin A. *Yeast*, 8, 635-645.
- Stratford, M., & Assinder, S. (1991). Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast*. 7, 559-574.
- Tawfik O.W., Papasian C.J., Dixon A.Y., and Potter L.M. (1989). *Saccharomyces cerevisiae* pneumonia in a patient with acquired immune deficiency syndrome. *J Clin Microbiol.* 27, 1689–1691.
- Thurston, P.A. & Tubb, R.S. (1981). Screening yeast strains for their ability to produce pholic off-flavours: A simple method for determining phenols in wort and beer. *J. Inst. Brew.* 87, 177-179.
- Van Mulders, S.E., Christianen, E., Saerens, S., Daenen, L., Verbelen, P., Willaert, R., Verstrepen, K. & Delvaux, F. (2009). Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* 9, 178-190
- Van Mulders, S.E., Ghequire, M., Daenen, L., Verbelen, P.J., Verstrepen, K.J., & Delvaux, F.R. (2010). Flocculation gene variability in industrial brewer's yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 88, 1321-1331.
- Van Oevelen, D., Spaepen, M., Timmermans, P., & Verachtert, H. (1977). Microbiological aspects of spontaneous wort fermentation in the production of lambic and gueuze. *J. Inst. Brew.* 83, 356-360.
- Van Urk, H., Postma, E., Scheffers W.A. & Van Dijken, J.P.V. (1989). Glucose transport in Crabtree-positive and Crabtree-negative yeasts. *J. Gen. Microbiol.* 135, 2399-2406.
- Veljovic, M, Djordjevic, R., Leskosek-Cukalovic, I., Lakik, N., Despotovic, S., Pecic, S. & Nedovic, V. (2010). The possibility of producing a special type of beer made from wort with the addition of grape must. *J. Inst. Brew.* 116, 440-444.
- Verdugo-Valez, A., Segura-García, L., Kirchmayr, M., Ramírez-Rodríguez, P., González-Esquinca, R., Coria, R. & Gschaedler-Mathis, A. (2011). Yeast communities associated with artisanal mezcal fermentations from *Agave salmiana*. *Antonie van Leeuwenhoek.* 100, 497-506.
- Vergara-Álvarez, I. (2014). Evaluación de la producción de metabolitos y de la capacidad de floculación en respuesta al estrés por temperatura de levaduras aisladas del mezcal. Tesis de Maestría, Centro de Biotecnología Genómica, IPN.

- Vidgren, V. & Londesborough, J. (2011), 125th Anniversary Review: Yeast Flocculation and Sedimentation in Brewing. *J. Inst. Brew.* 117, 475–487.
- Voordeckers, K., Maeyer, D., van der Zande, E., Vincés, M., Meert, W., Cloots, L., Ryan, O., Marchal, K. & Verstrepen, K. (2012). Identification of a complex genetic network underlying *Saccharomyces cerevisiae* colony morphology. *Mol. Microbiol.* 86, 225-239.
- Walker, G.M. & Stewart, G.G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages.* 2, 1-12.
- Walkey R.J. & Kirsop B.H. (1969). Performance of strains of *Saccharomyces cerevisiae* in batch fermentation. *J. Inst. Brew.* 75, 393-398.
- Walther, A., Hesselbart, A. & Wendland J. (2014). Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. *G3 (Bethesda)*; 4, 783-793.
- Wang, J., Shen, N., Yin, H., Liu, C., Li, Y. & Li, Q. (2013). Development of industrial brewing yeast with low acetaldehyde production and improved flavor stability. *Appl. Biochem. Biotechnol.* 169, 1016-1025.
- Westman, J., Nyman, J., Manara, R., Mapelli, V. & Franzén, C. (2018). A novel chimaeric flocculation protein enhances flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Metab. Eng. Commun.* 6, 49-55.
- White, C., & Zainasheff, J. (2010). *Yeast- The practical guide to beer fermentation*. Primera edición. Boulder, Colorado, USA: Brewing Publications.
- White Labs (s.f.a). WLP001 Californai Ale Yeast®. Recuperado el día 31/05/2019 en: <https://www.whitelabs.com/yeast-bank/wlp001-california-ale-yeast>
- White Labs (s.f.b). WLP380 Hefeweizen IV Ale Yeast. Recuperado el día 1/06/2019 en: <https://www.whitelabs.com/yeast-bank/wlp380-hefeweizen-iv-ale-yeast>
- Willaert, R.G (2018). Adhesins of yeasts: Protein structure and interactions. *J of Fungi* 4, 119; doi:10.3390/jof4040119
- Yokobson, C. (2010). The *Brettanomyces* Project. Recuperado el día 05/06/2019 en: <http://brettanomycesproject.com/dissertation/>
- Zavala-Nacul, H. (2013). Identificación molecular y evaluación de tolerancias a diferentes condiciones de estrés de cepas de *Saccharomyces cerevisiae*, aisladas de mostos de mezcal procedentes de diferentes regiones de Oaxaca. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química, UNAM.
- Zhang, CY, Bai, X.W., Lin, X., Liu, X.E. & Xiao, D.G. (2015). Effects of SNF1 on maltose metabolism and leavening ability of baker's yeast in lean dough. *J. Food Sci.* 80, 2879-2885.

Zhao, X.Q, Li, Q., He, L.Y., Li, F., Que, W.W & Bai, F.W. (2012). Exploration of a natural reservoir of flocculating genes from various *Saccharomyces cerevisiae* strains and improved ethanol fermentation using stable genetically engineered flocculating yeast strains. *Process Biochem.* 47, 1612-1619.

## 12. Anexos

### 12.1. Anexo 1. Preparación de medios de cultivo

#### Medio WLN agar

El medio WLN (Sigma Aldrich) tiene la siguiente composición por cada litro de medio preparado: agar (20 g/L), verde de bromocresol (0.022 g/L), cloruro de calcio (0.125 g/L), hidrolisado enzimático de caseína (5 g/L), dextrosa (50 g/L), cloruro férrico (0.0025 g/L), sulfato de magnesio (0.125 g/L), fosfato monopotasio (0.55 g/L), cloruro de potasio (0.425 g/L), extracto de levadura (4 g/L).

La preparación se llevó a cabo como lo recomienda el proveedor (Sigma Aldrich):

1. Se disolvieron 60 gramos de medio WLN en 1 litro de agua destilada.
2. El medio se esterilizó en autoclave por 15 min. a 15 psi y 121 °C.
3. Una vez que el medio podía ser manipulado con las manos, y trabajando en condiciones de esterilidad, se vertieron 25 ml de medio en diferentes cajas Petri. Se dejó enfriar el medio de las cajas por unos minutos y se retiró el agua condensada por decantación.
4. Las cajas se etiquetaron en la parte inferior, se cerraron con *parafilm* e incubarla de manera invertida por 24 h para evaluar esterilidad del medio.

### Solución YNB

La solución de trabajo 1x contiene nitrógeno en forma de sales de amonio (5 g), vitaminas, sales y elementos traza.

Preparación de solución YNB stock 10x:

1. Se vertieron 6.8 gramos del medio en polvo YNB sin aminoácidos en 100 ml de agua destilada.
2. Se filtró la solución anterior con ayuda de un filtro estéril de 0.22 micras (millipore) hacia un recipiente de almacenamiento estéril y se almacenó tapado a 4°C.

### Medio maltosa/YNB agar

1. Para preparar un medio con 2 % p/v, se disolvieron 20 gramos de maltosa (Sigma Aldrich) y 10 gramos de agar en 900 mililitros de agua destilada.
2. El medio se esterilizó en autoclave por 15 min. a 15 psi y 121 °C.
3. Una vez que el medio podía ser manipulado con las manos, y trabajando en condiciones de esterilidad, se vertieron 100 mL de solución stock YNB 10x en el recipiente con los 900 mL de solución maltosa y agar. Se vertieron 25 mL de medio tibio en cada una de las cajas Petri de trabajo, se dejó enfriar el medio de las cajas por unos min. y se retiró el agua condensada por decantación.
4. Las cajas se etiquetaron de la parte inferior, se cerraron con *parafilm* e incubaron de manera invertida por 24 h para evaluar esterilidad del medio.



### Medio maltosa/YNB caldo

1. Para preparar un medio con 2 % p/v de maltosa, se disolvieron 20 gramos de maltosa (Sigma Aldrich) en 900 mililitros de agua destilada. Para preparar un medio con 6 % p/v de maltosa, se disolvieron 60 gramos de maltosa en 900 mililitros de agua destilada.
2. Se vertieron 4.5 mL de la solución con maltosa en tubos de ensayo (16 cm x 150 mm) con tapa limpios. El medio se esterilizó en autoclave por 15 min. a 15 psi y 121 °C.
3. Una vez que los tubos se enfriaron, y trabajando en condiciones de esterilidad, se vertieron 0.5 ml de solución stock YNB 10x en cada tubo con solución maltosa.
4. Los tubos tapados se etiquetaron e incubaron por 24 h para evaluar esterilidad del medio.

### Mosto de extracto de malta (EM)

1. Para preparar mosto extracto de malta (EM) 11 °B, se disolvieron 11 gramos de extracto de malta seco (Briess, Chilton, WI, EE.UU.) por cada 100 gramos solución. (8 gramos de extracto de malta seco por cada 100 gramos de solución para 8 °B). La densidad fue medida con un refractómetro (ATAGO, Japan)
2. Se calentó mezcla de agua con EM (mosto) para solubilizar el extracto de malta en el agua. El mosto se esterilizó en autoclave por 15 min. a 15 psi y 121 °C.
3. Una vez que el mosto se enfrió, se separó el mosto cristalino del sedimento con proteínas y lípidos insolubles por medio de decantación hacia un recipiente estéril.

## 12.2. Anexo 2. Conteo celular y viabilidad celular

Los protocolos del conteo celular y la determinación de la viabilidad celular fueron realizados como lo describieron White & Zainasheff, (2010).

### Preparación de solución de azul de metileno

1. Para obtener una solución de 0.1% de azul de metileno se pesó 0.1 gramo de azul de metileno (Sigma Aldrich) y se colocó dentro de un recipiente con tapa de 100 mililitros.
2. Se añadió agua destilada hasta que el volumen final fue de 100 mililitros.
3. Se mezcló el contenedor hasta disolver el polvo.

### Preparación de muestra

1. Se etiquetó un tubo *Eppendorf* por cada cepa de levadura utilizada.
2. De ser necesario se diluye la muestra de levadura de 1:10, 1:100 o 1:1000, dependiendo de qué tan poblada se encuentre la muestra al microscopio.
3. Se mezclaron 500  $\mu$ L de la suspensión de levaduras, con 500  $\mu$ L de solución de azul de metileno para obtener un factor de dilución de 2. Se mezcló dos min. y se dejó asentar por un min. antes de llenar la cámara del hematocitómetro.

### Procedimiento para conteo celular

1. Se limpió el hematocitómetro con agua destilada y una franela, procurando no rallar el vidrio.
2. Se posicionó el cubre hematocitómetro de tal manera que el vidrio cubriera ambas áreas de conteo de manera uniforme.
3. Se llenó cada uno de los canales de la cámara con 10  $\mu$ l de muestra.
4. Se colocó el hematocitómetro en la plataforma del microscopio. Se inició con una magnificación baja al centro del hematocitómetro y se trabajó a magnificación de 400X, notando la distribución de las células en la cámara.

5. Se contaron las células localizadas dentro de cinco de los cuadros centrales dentro del área que mide 1 mm<sup>2</sup> de la cámara. No se contaron las células que tocaban la parte superior y derecha de las líneas, mientras que las células que se encontraban en las líneas de abajo o de la izquierda sí se contaron. Se contaron los brotes emergiendo de las células madre solamente si los brotes eran de, al menos, la mitad del tamaño de la célula madre.
6. Para estimar el número de células se contaron 5 cuadros de los 25 de la cámara de Neubauer. Se contaron los cuadros de los 4 extremos y el cuadro central. El número de células de los 5 cuadros se sumó y se determinó el promedio y se denominó células contadas
7. Se utilizó la siguiente fórmula para obtener la concentración de células por ml:

$$[\text{Células}] (\text{cél/mL}) = (\text{promedio de células contadas}) (\text{factor de dilución}) (25) (10^4)$$

Donde el factor de dilución es el producto de la dilución de la preparación de la muestra y la dilución por el azul de metileno.

#### Procedimiento para determinación de viabilidad celular

Se consideraron células muertas las células que se observaron color azul mientras se contaron. Mientras que las células azul pálido y las que estaban reproduciéndose, se consideraron vivas.

Para determinar la viabilidad se utilizó la siguiente fórmula:

$$\text{Viabilidad (\%)} = [(\text{células contadas} - \text{células muertas}) / \text{células contadas}] * 100$$

### 12.3. Anexo 3. Curvas de calibración de número de células

Curvas de calibración de células por conteo en cámara de Neubauer y medición de DO a 600 nm.

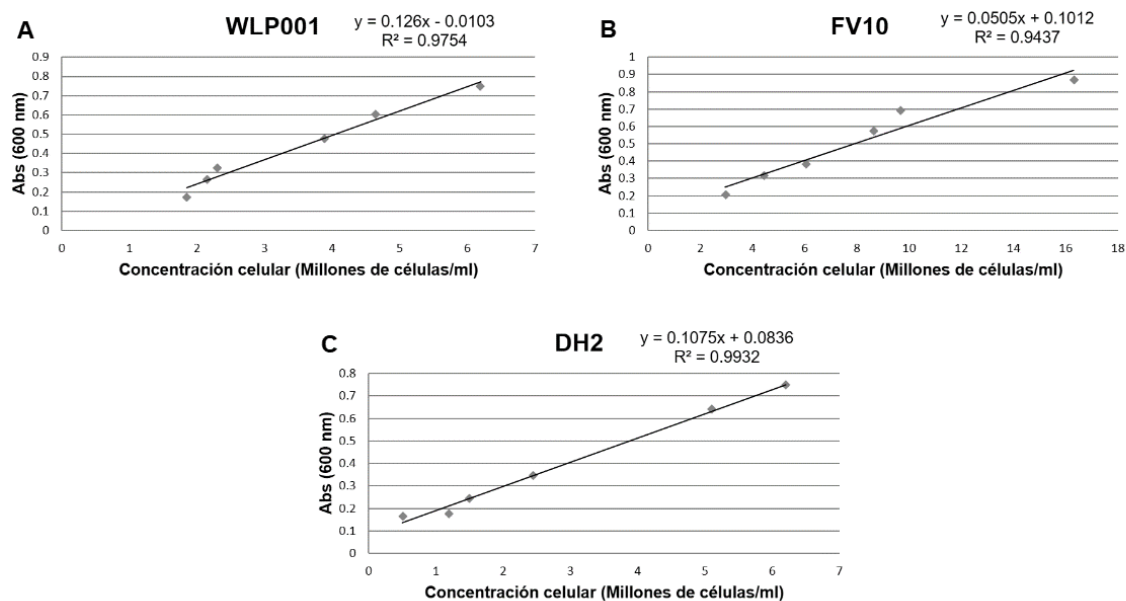
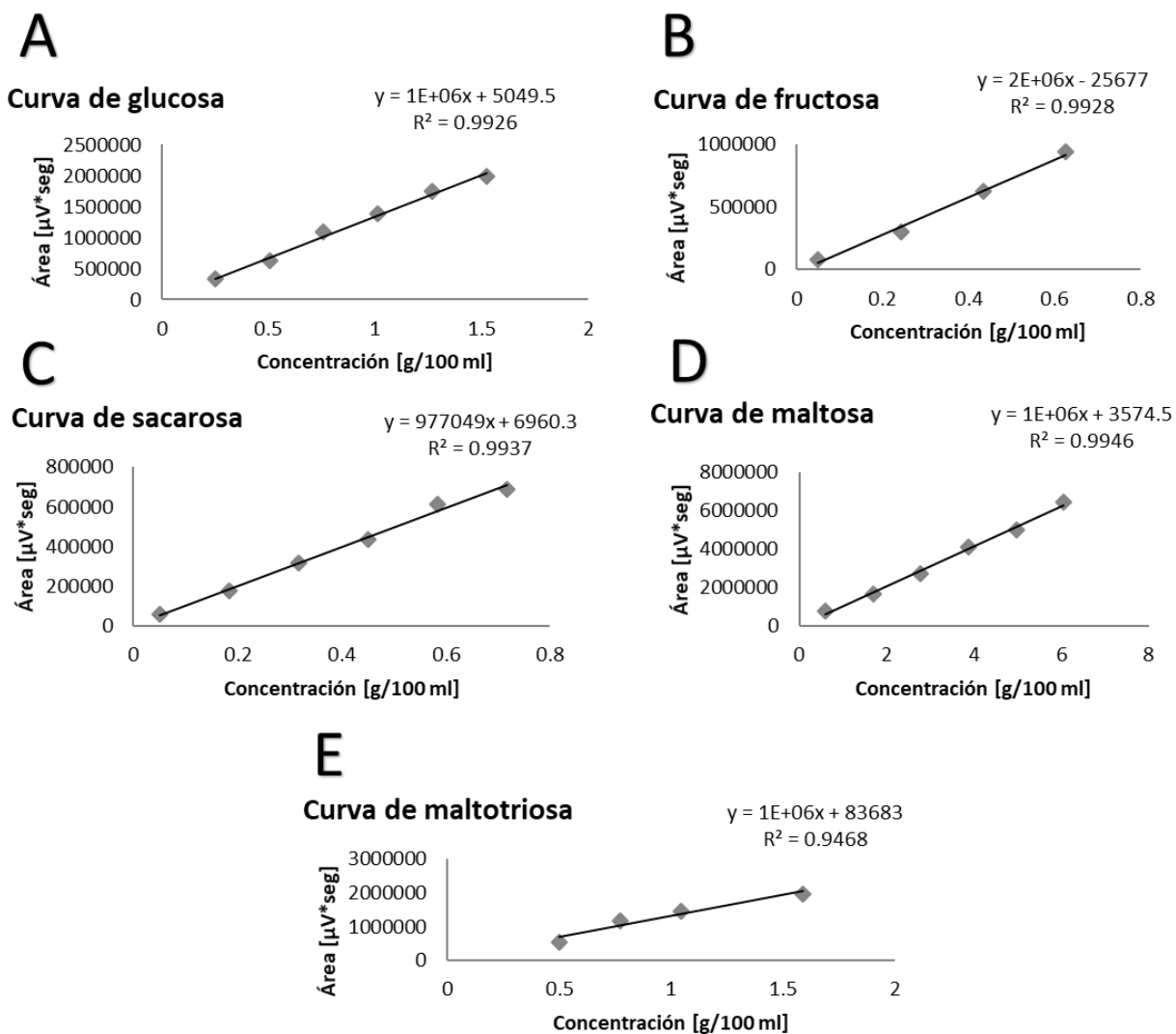


Figura 21. Curva de ajuste de concentración de células vs absorbancia a 600 nm. Para las cepas de estudio DH2, FV10 y el control positivo WLP001.

## 12.4. Anexo 4. Curvas de calibración de azúcares por HPLC



**Figura 22.** Curva de calibración para los azúcares fermentables determinados por HPLC. Se empleó un cromatógrafo de líquidos (Waters 2414) equipado con una columna de exclusión de iones Aminex HPX-87H (300 X 7.8 mm) (BIO-RAD, USA) y un detector de índice de refracción (Waters 2414, Massachusetts, USA).