

UNIVERSIDAD NACIONAL DEL COMAHUE

Centro Regional Universitario Bariloche



Caracterización de levaduras no convencionales de la Patagonia para la producción de whisky con características sensoriales distintivas

Trabajo final para optar por el título de
Licenciada en Ciencias Biológicas

Josefina Lohrmann

Director: Dr. Martín Moliné

Co-directora: Lic. Julieta A. Burini

Lugar de trabajo: Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC), Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), Centro Regional Universitario Bariloche, Universidad Nacional del Comahue.

2021

Resumen

El interés por lograr bebidas fermentadas con un perfil sensorial mejorado y novedoso sin el agregado de productos químicos sintéticos es cada vez mayor. En este contexto, las levaduras no convencionales son consideradas como una herramienta de innovación productiva debido a la diversidad de subproductos de fermentación que pueden aportar. Su aplicación está siendo muy estudiada en la producción de bebidas alcohólicas como la cerveza, el vino y la sidra, sin embargo, los trabajos en la producción de whisky son escasos. En este trabajo se buscó caracterizar la aptitud fermentativa y el perfil organoléptico de cepas de levaduras nativas (no convencionales) aisladas en la Patagonia, y evaluar su potencial aplicación para la producción de whisky con características sensoriales distintivas. Para esto, se caracterizó la cinética fermentativa, el consumo de azúcares, la producción de fenoles y las características sensoriales de 9 cepas nativas en mosto congreso y mosto de fábrica y se seleccionaron las más promisorias para la producción de whisky. Se realizaron fermentaciones mixtas secuenciales (co-inóculos) a partir de las cepas nativas seleccionadas (*S. uvarum* CRUB 209 y *S. eubayanus* CR10-11) con la cepa comercial Safspirit M1 (*S. cerevisiae*), y se evaluó el rendimiento de etanol y el perfil sensorial de las fermentaciones. Las mismas fueron posteriormente destiladas y se evaluaron las características de aroma y sabor del primer destilado. Los resultados de este trabajo revelaron que las levaduras no convencionales evaluadas poseen una capacidad fermentativa disminuida en relación a la cepa comercial y consumen de forma incompleta los principales azúcares del mosto (maltosa y maltotriosa), afectando negativamente el rendimiento de etanol. Sin embargo, aportan un perfil organoléptico diferencial, con mayor presencia de ésteres y fenoles, tanto de forma individual como co-inoculadas con la cepa M1. Los destilados de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas seleccionadas presentan una mayor complejidad en el perfil sensorial que el destilado de las fermentaciones inoculadas únicamente con la cepa comercial, mostrando el potencial de estas levaduras nativas para la producción de whisky con características organolépticas distintivas en co-inoculaciones con la cepa comercial.

Abstract

The interest in producing fermented beverages with an improved and novel sensory profile is increasing. In this context, non-conventional yeasts are beginning to be considered as tools for productive innovation due to the large diversity of fermentation by-products they can provide. Although application of non-conventional yeasts is being studied in the production of alcoholic beverages such as beer, wine and cider, there are few reports of their application in whisky. In this study, we evaluated the fermentation capacity and organoleptic properties of native yeast strains (non-conventional) isolated in Patagonia, and their potential application for the production of whiskys with distinctive sensory characteristics. The fermentation kinetics, sugar consumption, phenol production and sensory characteristics of 9 native strains were characterized in two types of wort, and the most promising ones were selected for whisky production. Sequential mixed fermentations were carried out with the selected native strains (*S. uvarum* CRUB 209 and *S. eubayanus* CR10-11), and the commercial strain Safspirit M1 (*S. cerevisiae*), Ethanol yield and sensory profile of the mixed fermentations were assessed. These fermentations were distilled and the aroma and flavor characteristics of the first distillate were evaluated. The results of this work revealed that the tested non-conventional yeasts have a decreased fermentation capacity in relation to the commercial strain, and they do not fully consume the main sugars in the wort (maltose and maltotriose), negatively affecting the ethanol yield. However, they provide a differential organoleptic profile to the fermentations, with a greater presence of esters and phenols, both individually and co-inoculated with the M1 strain. Distillates from the fermentations co-inoculated with the selected native strains present a complex sensory profile than the distillate from the fermentations inoculated only with the commercial strain, showing the potential of these native yeasts for the production of whisky with distinctive organoleptic characteristics.

Índice general

Resumen	2
Abstract	3
Índice general	4
1. Introducción	6
1.1. Aplicación biotecnológica de levaduras en alimentos y bebidas fermentadas	6
1.2. Producción de bebidas fermentadas en la historia y domesticación de levaduras	7
1.3 Origen y tipos de whisky	8
1.4. Proceso de producción del whisky y su influencia en el perfil organoléptico	9
1.5. Levaduras no convencionales como agentes biosaborizantes.....	11
1.6. Levaduras nativas de la Patagonia y su potencial aplicación en la producción de bebidas fermentadas	12
Objetivo general	13
Objetivos particulares	13
Hipótesis	13
Predicción	14
2. Materiales y métodos	14
2.1. Cepas.....	14
2.2. Medios de cultivo	14
2.3. Caracterización de las fermentaciones con levaduras nativas.....	15
2.4. Fermentaciones co-inoculadas con levaduras nativas y la cepa M1	18
2.5. Destilado de las fermentaciones mixtas	19
2.6. Evaluación sensorial	19
2.7. Determinación del perfil de consumo de azúcares y producción de etanol.....	20

2.8. Caracterización de fenoles volátiles	20
2.9. Análisis estadísticos.....	21
3. Resultados y discusión.....	21
3.1. Caracterización de las fermentaciones de las levaduras nativas	21
3.2. Fermentaciones co-inoculadas con levaduras nativas y la cepa M1	41
3.3. Destilado de las fermentaciones co-inoculadas con levaduras nativas y la cepa M151	
3.4. Consideraciones finales	57
4. Conclusiones	58
5. Referencias.....	60
Anexo I.....	69
Anexo II	70
Agradecimientos.....	72

1. Introducción

Las levaduras son hongos unicelulares ascomicetes y basidiomicetes, que se caracterizan por no desarrollar cuerpos fructíferos (Kurtzman et al., 2011). Son organismos muy importantes para la obtención de productos biotecnológicos superando en capacidad y producción a cualquier otro grupo de microorganismos (Johnson & Echavarri-Erasun, 2011); son utilizados para la producción de biocombustibles (Antoni et al., 2007), en procesos de biorremediación (He et al., 2014) como agentes de control biológico, y como fuente de compuestos y enzimas tanto nativas (propias del organismo) como heterólogas (cuya síntesis se realiza en un organismo distinto al organismo de origen) para su aplicación en la industria farmacéutica, química, alimenticia y agrícola (Blaser et al., 2005; Johnson, 2013; Schmidt, 2004; Walsh, 2005). Sin embargo, su aplicación más relevante y antigua es en la producción de alimentos fermentados.

1.1. Aplicación biotecnológica de levaduras en alimentos y bebidas fermentadas

La mayoría de las levaduras aplicadas en la producción de alimentos y bebidas fermentadas, incluyendo el pan, chocolate, cerveza, vino y whisky, pertenecen al género *Saccharomyces*, particularmente a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. Esta especie es considerada el organismo modelo para la investigación de procesos biológicos fundamentales (citológicos, genéticos, bioquímicos, etc.) en eucariotas (Dolinski & Botstein, 2005; Nielsen & Jewett, 2008; Oliver, 2006; Suter et al., 2006). El genoma de *S. cerevisiae* fue el primer genoma eucariota secuenciado de forma completa, siendo hoy el mejor caracterizado (Dolinski & Botstein, 2005; Engel et al., 2014). Si bien las levaduras sacaromycéticas continúan liderando la industria de productos fermentados, el avance de la tecnología en las últimas dos décadas, ha permitido realizar estudios detallados sobre levaduras consideradas no convencionales y llevar a cabo su aplicación en distintos procesos fermentativos (Johnson, 2013).

Las levaduras del orden *Saccharomycetales* (que incluye a los géneros *Saccharomyces*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, entre otros) son fermentadoras-facultativas, capaces de metabolizar los azúcares a través del proceso de fermentación alcohólica, generando etanol y dióxido de carbono como principales subproductos de fermentación (Suh et al., 2006; Walker & Stewart, 2016). En presencia de oxígeno, los azúcares son metabolizados de forma preferencial a través de la vía Embden-Meyerhof (o glucólisis) seguida de la cadena respiratoria en la cual el oxígeno actúa como aceptor terminal de los electrones (van Dijken & Scheffers,

1986). Cuando el oxígeno es limitante, los azúcares son oxidados de forma parcial a través del proceso de fermentación en el cual una molécula de acetaldehído (en el caso de la fermentación alcohólica) actúa como receptor final de electrones, dando lugar a la formación de etanol y dióxido de carbono (van Dijken & Scheffers, 1986; Walker & Stewart, 2016). Durante la fermentación alcohólica, las levaduras además de liberar etanol y dióxido de carbono, producen y excretan una gran variedad de moléculas al medio extracelular. Dentro de los metabolitos secundarios más comunes se encuentra el glicerol, que es un intermediario de la vía Embden-Meyerhof y, además, es producido para mantener el balance redox de la célula durante la fermentación (van Dijken & Scheffers, 1986; Walker & Stewart, 2016); los ésteres, que derivan de la condensación de alcoholes con moléculas de ácidos grasos (Olaniran et al., 2017); los alcoholes superiores, que se producen durante la desaminación y descarboxilación de aminoácidos cuando se encuentran en exceso en el medio (Walker, 1998); los compuestos fenólicos, provenientes de la descarboxilación enzimática de ácidos hidroxicinámicos presentes en el medio (Mukai et al., 2010); y compuestos azufrados originados a partir de la reducción enzimática de sulfatos a sulfitos. El tipo y los niveles de producción de estos compuestos secundarios no sólo dependen de las condiciones de cultivo (tasa de inóculo, temperatura, oxigenación, composición del medio, relación C/N del medio y duración de la fermentación) sino también varían en relación a la especie e incluso entre cepas de la misma especie (Stewart, 2017). Esta gran variedad de metabolismos es aprovechada desde la antigüedad para la producción de alimentos y bebidas, y mucho antes del conocimiento e identificación de la levadura como organismo responsable del proceso de fermentación.

1.2. Producción de bebidas fermentadas en la historia y domesticación de levaduras

La producción de alimentos y bebidas fermentadas es una de las prácticas biotecnológicas más antiguas y fue desarrollada de forma casi universal en las sociedades humanas. Los arqueólogos han encontrado evidencia de que las bebidas fermentadas producidas por levaduras eran consumidas en tiempos neolíticos (8500-4000 a. C.) en China, Irán y Egipto, y otras áreas del mundo (Cavalieri et al., 2003; McGovern, 2009; McGovern et al., 1997, 2004). La fermentación contribuye a la preservación de los alimentos, al desarrollo de nuevos sabores y aromas, y a mejorar la digestión y el valor nutricional enriqueciendo en compuestos esenciales como vitaminas, aminoácidos y ácidos grasos (Carrau et al., 2015; Swiegers et al., 2016). En la antigüedad, las bebidas alcohólicas eran producidas a partir de la fermentación de fuentes de

azúcares naturales disponibles en los hábitats locales con el fin de ser consumidas en rituales religiosos y sociales o por sus efectos analgésicos y nutricionales (McGovern, 2009; Vallee, 1998). Las fermentaciones ocurrían de forma espontánea a partir de los microorganismos presentes en las materias primas y el ambiente, sin conocerse los mecanismos biológicos subyacentes al proceso (Fleet, 1998). Fue Louis Pasteur (1857) en el siglo XIX quien demostró el importante rol de las levaduras en el proceso fermentativo, y Emil Hansen (1883) quien logró aislar el primer cultivo puro de una cepa de levadura presente en la cerveza. Las fermentaciones a partir de cultivos puros fueron rápidamente adoptadas por la industria cervecera y gradualmente aplicadas en la industria del vino, la sidra y las bebidas destiladas (Rose, 1975). Los procesos de selección natural y artificial que tuvieron lugar a lo largo de la historia en los ambientes fermentativos, condujeron a la evolución de cepas altamente especializadas y adaptadas a ellos (proceso de domesticación). La especie *S. cerevisiae* es entonces uno de los organismos domesticados más antiguos (Cubillos et al., 2019). Si bien las características que la convierten en una levadura fermentadora (capacidad de producir dióxido de carbono y etanol) surgieron mucho antes de que el hombre comenzara a producir alimentos fermentados (Piškur et al., 2006), sus atributos específicos en la fermentación de alimentos y bebidas se encuentran asociados a su evolución desde tiempos antiguos en ambientes fermentativos antrópicos (Gallone et al., 2016). Esta levadura es capaz de metabolizar eficientemente azúcares específicos (maltosa, maltotriosa) a través fermentación alcohólica incluso en presencia de oxígeno (efecto Crabtree), producir altos niveles de etanol y, además, tolera diversas condiciones de estrés ambiental (altas temperaturas y concentraciones de etanol) (Steensels & Verstrepen, 2014). Si bien estas propiedades individuales también están presentes en otras levaduras, se combinan de forma única en esta especie convirtiéndola en una de las levaduras más elegidas para la producción de cerveza, vino, y bebidas destiladas.

1.3 Origen y tipos de whisky

El whisky es una bebida alcohólica originada en Escocia que se obtiene a partir de la destilación del alcohol producido durante la fermentación de un mosto de cereales y su posterior maduración en barricas de roble. La bebida precursora del whisky tuvo su origen en Irlanda en el siglo VII, donde los monjes destilaban el alcohol de fruta fermentada y era utilizada sólo con fines medicinales. En el siglo IX, los monjes irlandeses y su alcohol medicinal llegaron a Escocia y fue en el siglo XVI cuando aparecieron los primeros registros acerca del Whisky de cebada (Wiśniewska et al., 2015). Actualmente, existen tres tipos de whisky escocés: el whisky

de malta, el whisky de grano y el whisky *blend*, producido a partir de la mezcla del whisky de malta y whisky de grano al momento del embotellado (Wiśniewska et al., 2015). El whisky de malta se produce a partir de la destilación de mosto fermentado preparado únicamente a partir de malta de cebada; en cambio, el whisky de grano, se produce a partir de la destilación continua de mosto fermentado producido por enzimas de malta que actúan sobre un sustrato de granos de otros cereales (maíz, centeno o trigo) (Russell & Stewart, 2003).

1.4. Proceso de producción del whisky y su influencia en el perfil organoléptico

La producción del whisky de malta implica cinco pasos: el malteado de la cebada, la preparación del mosto (macerado), la fermentación alcohólica del mosto, la destilación del alcohol y, por último, la maduración del destilado. El grano de cebada contiene azúcares complejos (almidón) en su forma natural, por lo que son sometidos a procesos de malteado y macerado para convertirlos en azúcares fermentables. El malteado consiste en remojar los granos en agua durante un período de 4 a 6 días, permitiendo que germinen parcialmente y de forma controlada. Durante este proceso, ocurre la síntesis de enzimas α -amilasas y la activación de enzimas β -amilasas capaces de degradar los polímeros del almidón en azúcares simples (Georg-Kraemer et al., 2001; Grime & Briggs, 1996). Pasado el tiempo de germinación, se los seca a bajas temperaturas (40 °C a 65 °C) con el fin de detener el desarrollo preservando la totalidad de las capacidades enzimáticas (Zoeller, 2008). La preparación del mosto consiste en macerar la malta en agua a temperaturas de entre 60 °C y 70 °C durante aproximadamente una hora. Durante el macerado, las enzimas α -amilasa y β -amilasa hidrolizan los enlaces α -1,4-D-glucosídicos de la amilopectina y la amilosa, los polímeros de glucosa más abundantes en el almidón, en azúcares fermentables (fructosa, glucosa, maltosa y maltotriosa) (Evans et al., 2011; Vriesekoop et al., 2010). A través de la fermentación, las levaduras metabolizan la fructosa, glucosa, maltosa y maltotriosa alcanzando una concentración de alcohol del 8-10 % v/v que luego es concentrado a través de una doble destilación. El primer destilado alcanza una concentración de alcohol del 20-25 % v/v y es colectado en su totalidad, mientras que en la segunda destilación son descartadas la fracción inicial (cabeza) y la fracción final (cola), siendo la fracción media (corazón), que presenta una concentración de etanol del 60-68 % v/v, la que se transformará en el whisky. Finalmente, el destilado es sometido a un período de maduración en barricas de roble por un tiempo mínimo de tres años (Russell & Stewart, 2003).

Las características organolépticas del whisky son el resultado de los compuestos obtenidos a partir de la materia prima utilizada, del proceso de fermentación y de destilación, y de

complejos procesos químicos que ocurren durante la maduración en barrica. Las distintas formas de producción aplicadas en las distintas etapas del proceso permiten obtener perfiles organolépticos diferentes entre productos.

Malteado y macerado. El aumento de las temperaturas de secado y macerado de la malta favorecen reacciones inducidas por calor que dan como resultado compuestos de aroma y sabor activos. Por ejemplo, la reacción de Maillard, que se produce entre aminoácidos y azúcares, tiende a generar notas a cereales o tostadas (Jack, 2012). También, la aplicación de humo de turba o de otros materiales en el proceso de secado de la malta, genera que los compuestos aromáticos del humo (fenoles, cresoles y guayacoles) se adhieran a la pared del grano dando como resultado aromas ahumados y medicinales en el whisky (Harrison, 2007; Kew et al., 2017).

Fermentación. Las levaduras no sólo producen etanol y dióxido de carbono durante la fermentación, sino que también generan una gran cantidad de metabolitos secundarios (alcoholes superiores, ácidos orgánicos, ésteres, fenoles) que contribuyen al carácter del whisky y que varían en relación a la cepa y los parámetros fermentativos elegidos (Russell & Stewart, 2014; Steensels & Verstrepen, 2014; Suomalainen & Lehtonen, 1979). Debido a que el mosto no es llevado a ebullición (para conservar la actividad amilolítica de las enzimas), las bacterias sobrevivientes a la temperatura de macerado participan en la fermentación junto a las levaduras inoculadas (Wilson, 2014a). Las bacterias más frecuentes son las ácido lácticas que, cuando están presentes en pequeñas proporciones añaden complejidad al whisky, pero en exceso podrían causar sabores indeseables y un bajo rendimiento de etanol (Wilson, 2014b).

Destilación. Al igual que la etapa de fermentación, la destilación es crucial para la formación de sabor y hay muchos aspectos del procedimiento que pueden afectar el perfil del whisky. Tanto la cabeza como la cola del destilado contienen compuestos que afectan negativamente el sabor y aroma por lo que son separados del corazón del destilado. Los puntos de corte que separan estas fracciones, determinan el balance de compuestos volátiles que pasarán a formar parte del whisky y, por lo tanto, el perfil sensorial del mismo (Russell & Stewart, 2003).

Maduración. Finalmente, durante la maduración se producen reacciones que suavizan los caracteres inmaduros y promueven el desarrollo de los sabores deseados. La madera que constituye la barrica aporta principalmente taninos y moléculas provenientes de la hidrólisis de los polímeros de lignina y hemicelulosa (Russell & Stewart, 2003). Estos compuestos y su interacción con el destilado introducen nuevos aromas y son los principales responsables del color del whisky maduro. Existen además reacciones sustractivas que incluyen procesos como

la evaporación de compuestos volátiles y la adsorción o degradación de compuestos sulfurados como el dimetil sulfuro (Piggott et al., 1993). El tiempo de maduración, el tamaño de la barrica, los tratamientos térmicos, la especie de roble usada para su construcción y la temperatura y humedad ambiental, son factores que influyen notablemente en el aroma, sabor, color y cuerpo del producto final (Conner et al., 1999; Jack, 2012). Por esto, el tipo de barrica que se elige a la hora de la maduración del whisky, es uno de los elementos de innovación más utilizado por las marcas.

1.5. Levaduras no convencionales como agentes biosaborizantes

El uso de cultivos de levadura puros en la producción de bebidas fermentadas permitió estandarizar los procesos y optimizar el rendimiento productivo; sin embargo, limitó la variedad de levaduras involucradas en la fermentación y, por lo tanto, la complejidad del perfil sensorial (Cubillos et al., 2019; Domizio et al., 2007). Debido a esto, muchos productores de bebidas alcohólicas (vino, cerveza, sidra) comenzaron a considerar a las levaduras no convencionales o salvajes como una herramienta de desarrollo de productos exclusivos (Burini et al., 2021; Steensels & Verstrepen, 2014). Generalmente, presentan un desempeño fermentativo bajo comparado con las levaduras tradicionales, debido a que no son capaces de utilizar todos los azúcares fermentables presentes en mosto y por ser menos tolerantes al estrés por etanol; siendo necesario muchas veces adaptar el proceso de producción para mejorar los rendimientos (Origone et al., 2017). A cambio, ofrecen una amplia gama de metabolitos que aportan nuevos sabores y aromas. De esta forma, las levaduras no convencionales dejaron de ser consideradas microorganismos indeseables asociados al deterioro de los alimentos, y pasaron a poseer un rol principal en el desarrollo de productos innovadores (Padilla et al., 2016; Sibirny, 2019).

La síntesis y transformación de compuestos de aroma y sabor a través de métodos biológicos se conoce como biosaborizar (*bioflavoring*) (Capece et al., 2018). Las levaduras no sólo son capaces de producir compuestos aromáticos, sino también, pueden mediar la bioconversión de compuestos precursores presentes en el mosto en compuestos de aroma y sabor activos (Steensels & Verstrepen, 2014). De esta manera, la elección de una cepa adecuada puede liberar esta fracción potencial de aroma y sabor. Una estrategia usada en la producción de vino y cerveza es el uso de co-inóculos o inoculaciones secuenciales de manera de complementar las características de los microorganismos involucrados (Benito et al., 2016). En este tipo de procesos la capacidad fermentativa de las levaduras nativas resulta secundaria y su aplicación

se enfoca en una mayor producción de compuestos aromáticos deseables y, a menudo únicos que, combinado con el uso de levaduras sacaromicéticas tradicionales, asegura una fermentación completa de los azúcares y, por lo tanto, un alto contenido de etanol (Clemente-Jimenez et al., 2005; Moreira et al., 2008). A pesar del potencial que representan las levaduras no convencionales a la hora de producir nuevos productos, los desarrollos con el objetivo de generar nuevos sabores y aromas en el whisky no se han extendido en gran medida en torno a la levadura elegida para la fermentación.

1.6. Levaduras nativas de la Patagonia y su potencial aplicación en la producción de bebidas fermentadas

En los últimos años se han aislado de la Patagonia Argentina numerosas especies de levaduras sacaromicéticas y no sacaromicéticas con la potencialidad de ser usadas como herramientas de innovación productiva (Almeida et al., 2014; Libkind et al., 2011; Rodríguez et al., 2014). El foco de interés está puesto actualmente en la especie *Saccharomyces eubayanus*, identificada como la levadura parental, junto a *S. cerevisiae*, del híbrido utilizado para la producción de la cerveza lager (Libkind et al., 2011). Esta levadura nativa de los bosques andino-patagónicos de Chile y Argentina, demostró tener una fermentación eficiente de la maltosa y la glucosa a bajas temperaturas (10°C), además de producir compuestos de sabor distintivos como fenoles y ésteres frutales (Burini et al., 2021; Eizaguirre et al., 2018; Gibson et al., 2013; Krogerus et al., 2015). Esto impulsó la producción de la primera cerveza 100% patagónica usando exclusivamente una cepa de *S. eubayanus* (Burini et al., 2021). También es de gran interés la aplicación de levaduras pertenecientes a la especie *Saccharomyces uvarum* en la producción de bebidas alcohólicas. Una gran cantidad de cepas de esta especie fueron aisladas de bebidas fermentadas y ambientes productivos de Europa, mientras que los bosques patagónicos son la fuente más grande de cepas asociadas a ambientes naturales (Almeida et al., 2014; Libkind et al., 2016). Al igual que *S. eubayanus*, *S. uvarum* es una especie criotolerante y por lo tanto, suele dominar las fermentaciones a bajas temperaturas (Naumov et al., 2001; Valles et al., 2007). Se ha estudiado particularmente su aplicación en la producción de vino y sidra porque, si bien suelen estar caracterizadas por una baja producción de etanol, tienen la capacidad de generar niveles elevados de compuestos deseables como alcoholes superiores y glicerol (Gonzalez Flores, 2019; Masneuf-Pomarède et al., 2010). Dentro del conjunto de levaduras no sacaromicéticas aisladas en la Patagonia, se encuentran cepas del género *Hanseniaspora* y *Lachancea* (Mestre et al., 2010; Čadez et al., 2018, Eizaguirre, 2019 y datos no publicados).

Algunos estudios demuestran que las levaduras de estos géneros aportan compuestos de aroma y sabor diferenciales (en comparación a las fermentaciones con cepas tradicionales) en fermentaciones de vino, sidra y cerveza, co-inoculadas con *S. cerevisiae* y en fermentaciones individuales (Moreira et al., 2009; Xu et. al., 2006; Benito, 2018; Morata et al., 2018; Canonico et al., 2019; Domizio et al., 2016).

En esta tesis proponemos evaluar las características fermentativas de cepas de levaduras nativas, con particular foco en la producción de compuestos de sabor y aroma, para su aplicación en la producción de whisky con características sensoriales distintivas.

Objetivo general

Caracterizar la cinética fermentativa y características organolépticas de cepas de levaduras nativas (no convencionales) y su potencial aplicación para la producción de whisky con características sensoriales distintivas.

Objetivos particulares

- Caracterizar la cinética fermentativa de 9 cepas de levaduras nativas aisladas de la Patagonia y seleccionar las más promisorias para la producción de whisky.
- Caracterizar la producción de alcohol y evaluar características organolépticas distintivas en fermentaciones mixtas secuenciales utilizando las cepas de levaduras nativas seleccionadas y la cepa comercial Safspirit M1 utilizada en la producción de whisky.
- Producir un primer destilado de las fermentaciones mixtas con características organolépticas y fermentativas diferenciales, y evaluar sus características de sabor y aroma.

Hipótesis

Las levaduras no convencionales aportan a las fermentaciones perfiles organolépticos diferentes a los aportados por las levaduras convencionales.

Predicción

La utilización de levaduras no convencionales en fermentaciones mixtas permitirá producir un producto con perfiles organolépticos distintivos.

2. Materiales y métodos

2.1. Cepas

Se utilizaron ocho cepas de levaduras salvajes aisladas de ambientes naturales de la Patagonia; *Saccharomyces uvarum* CRUB 209, *S. uvarum* CRUB 222, *Saccharomyces eubayanus* CRUB 1568^T, *S. eubayanus* CRUB 1963 (CR10-11), *Lachancea nothofagi* CRUB 197, *L. cidri* CRUB 568, *Hanseniaspora “simithiae”* CRUB 1583 y *H. “simithiae”* CRUB 1602; y la cepa *S. eubayanus* CRUB A62 evolucionada a partir de la cepa parental CRUB 1568^T (Eizaguirre, 2019) pertenecientes a la colección de microorganismos del Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC) y registradas en el banco de recursos biológicos de la Secretaria de Ambiente y Desarrollo Sustentable de la Prov. de Río Negro. Las cepas fueron seleccionadas considerando la tolerancia al estrés osmótico y al estrés por etanol, y por su capacidad de producir compuestos de aroma y sabor deseables como fenoles y ésteres (Eizaguirre, 2019 y datos no publicados obtenidos en el Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC)). La cepa Safspirit M1® (Fermentis), una levadura comercial seca de la especie *S. cerevisiae*, utilizada para producir whiskys de malta por su alto rendimiento fermentativo y por su tolerancia al etanol (>15 % v/v), fue utilizada como cepa de referencia y en los ensayos de fermentaciones mixtas.

2.2. Medios de cultivo

Se utilizaron dos medios de cultivo. Mosto de cebada para la producción artesanal de whisky proveniente de una fábrica local de escala artesanal (MF) y mosto congreso (MC) formulado según Evans et al. (2011) modificado. La preparación del mosto congreso modificado consistió en el macerado de granos de cebada malteada y molida (molienda ajustada en 0,7 mm) en agua a una relación agua:grano de 3:1. La temperatura de macerado inició en 65 °C durante 1 hora, seguido de una elevación de la temperatura a una tasa de 1 °C/minuto hasta alcanzar los 74 °C, manteniendo esta temperatura por 10 minutos. Una vez finalizado el tiempo de macerado, se

diluyó con agua hasta llegar a una densidad de 1,060 gr/mL. Una vez filtrado, se esterilizó mediante autoclave (15 minutos a 121 °C) y, posteriormente, se trasvasó para eliminar el sedimento. El MF no fue esterilizado ni oxigenado. La densidad inicial de los mostos fue determinada mediante refractómetro (Alla France 0-32 °Bx) con precisión de 0,2 °Brix y expresada en gr/mL o en °Plato (°P) según fue necesario según la tabla de Kaiser, ver anexo I. Se determinó el pH inicial de los mostos mediante pHmetro (Sartorius PR15) siendo 5,5 para MC y de 5,7 para MF.

2.3. Caracterización de las fermentaciones con levaduras nativas

2.3.1. Fermentaciones a escala laboratorio

Las cinéticas de fermentación y la caracterización organoléptica de las distintas cepas utilizadas se evaluaron en fermentaciones individuales en MC y en MF. Las fermentaciones se realizaron en botellas de vidrio estériles de 1 litro adaptadas con un cierre tipo airlock conteniendo 600 mL del mosto correspondiente. El mosto congreso fue oxigenado bajo condiciones de esterilidad a una concentración inicial de 15 ppm determinada mediante un medidor portátil Hach (HQ30D) con sensor de oxígeno disuelto luminiscente. Se inocularon las cepas seleccionadas de modo de alcanzar el número de células calculadas a través de la ecuación propuesta para una fermentación estándar (White & Zainasheff, 2010):

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

donde la tasa de inóculo utilizada fue de $0,5 \times 10^6$ células/mL (fermentaciones de tipo Ale) y la densidad inicial determinada fue de 14,8 °P (14,2 °Bx) para el MC y 15,6 °P (15 °Bx) para el MF. La densidad de células viables a inocular fue estimada mediante el conteo de células en cámara de Neubauer y tinción con violeta de metileno para evaluar la viabilidad (Smart et al., 1999).

Con el objetivo de estudiar la variación en la atenuación a lo largo del tiempo para cada una de las 9 cepas nativas evaluadas y de la cepa M1 en ambos mostos, y el comportamiento de los microorganismos en MF las fermentaciones fueron incubadas por un tiempo de 188 h. Las botellas se incubaron bajo rampas de temperatura simulando las condiciones fermentativas de la fábrica de whisky, iniciando en 20 °C grados por 19 h, luego 25 °C por 4 h, 30 °C por 48 h y por último 25 °C hasta finalizar las 188 h de incubación. Los ensayos se realizaron por duplicado a excepción de las fermentaciones en MC de *S. uvarum* CRUB 209, *S. eubayanus* CRUB A62, *S. eubayanus* CR10-11, *L. nothofagi* CRUB 197, *H. "simithiae"* CRUB 1602 y la cepa M1 se realizaron por cuadruplicado. De las fermentaciones realizadas por cuadruplicado,

dos de las réplicas se finalizaron a las 48 h con el objetivo de establecer la atenuación y el perfil de consumo de azúcares tras la finalización del crecimiento de estas levaduras en un medio de cultivo sin la presencia de otros microorganismos, y las dos réplicas restantes se finalizaron a las 188 h como fue indicado arriba (Figura 1). La cinética de las fermentaciones se evaluó mediante la medición de pérdida de peso (Lopes et al., 2007). En las fermentaciones individuales realizadas en MC, las botellas se pesaron en balanza (AND EK 1200A) con precisión de 0,1 gr cada 24 h. En las fermentaciones individuales realizadas en MF, las botellas se pesaron cada 12 h durante un periodo de 96 h y luego cada 24 h. Para evaluar el consumo de azúcares se utilizó como aproximación la medición de atenuación aparente que se determinó mediante refractómetro como la diferencia entre la densidad inicial (DI) y la final (DF) en el sobrenadante de la fermentación y fue expresada como porcentaje de atenuación (%) (White & Zainasheff, 2010):

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

La capacidad o aptitud fermentativa fue evaluada a partir del porcentaje atenuación y la velocidad máxima de fermentación ($\mu_{m\acute{a}x}$). La velocidad máxima de fermentación fue estimada mediante el ajuste de las curvas de fermentación usando la reparametrización de la ecuación de Gompertz propuesta por Zwietering et al. (1990). El ajuste de datos se realizó usando el software R studio (paquete easynls, función nlsfit, modelo=10 (Gompertz)), minimizando la diferencia entre los datos experimentales y el ajuste del modelo (Pérez-Través et al., 2015). Las curvas de las fermentaciones individuales en MC fueron ajustadas hasta las 188 h de fermentación y las curvas de las fermentaciones individuales en MF hasta las 56 h (ver sección 3.1.1.).

2.3.2. Caracterización microbiológica de bacterias y levaduras no sacaromícéticas en las fermentaciones

Se realizó un control microbiológico para la determinación de bacterias y levaduras no sacaromícéticas en las fermentaciones individuales realizadas en MF (mosto sin esterilizar) luego de finalizadas las 188 h de fermentación, con el fin de cuantificar e identificar los principales grupos de microorganismos presentes en fermentaciones artesanales del whisky producido en fábrica. Se utilizó el medio diferencial de Wallerstein (WLD) para aislamiento selectivo y cuantificación de bacterias aeróbicas ácido lácticas, bacterias ácido acéticas y/o *Escherichia coli*. Se sembraron 100 ul de cada una de las fermentaciones en placas de petri con medio WLD estéril y se incubaron a 30 °C por 28 h. Para detectar la presencia de levaduras no sacaromícéticas, se utilizó el medio *Lin's Cupric Sulfate Medium* (LCSM). Se sembraron 100

ul de cada una de las fermentaciones en placas de petri con medio LCSM estéril y se incubaron a 25 °C por 48h. Se realizó un control de crecimiento de las cepas nativas utilizadas en este trabajo realizando un estriado por agotamiento en este medio. Para determinar la presencia de bacterias ácido lácticas anaeróbicas (*Lactobacillus* y *Pediococcus*) se utilizó el medio Hsu´ *Lactobacillus-Pediococcus*. Se sembró 1 mL de muestra en 14 mL de medio HLP semisólido y se mezcló por inversión dos veces. Los tubos se incubaron a 30 °C por 48 h. Al finalizar el tiempo de incubación las placas se examinaron en lupa para determinar el número de unidades formadoras de colonias (Rose, 1975).

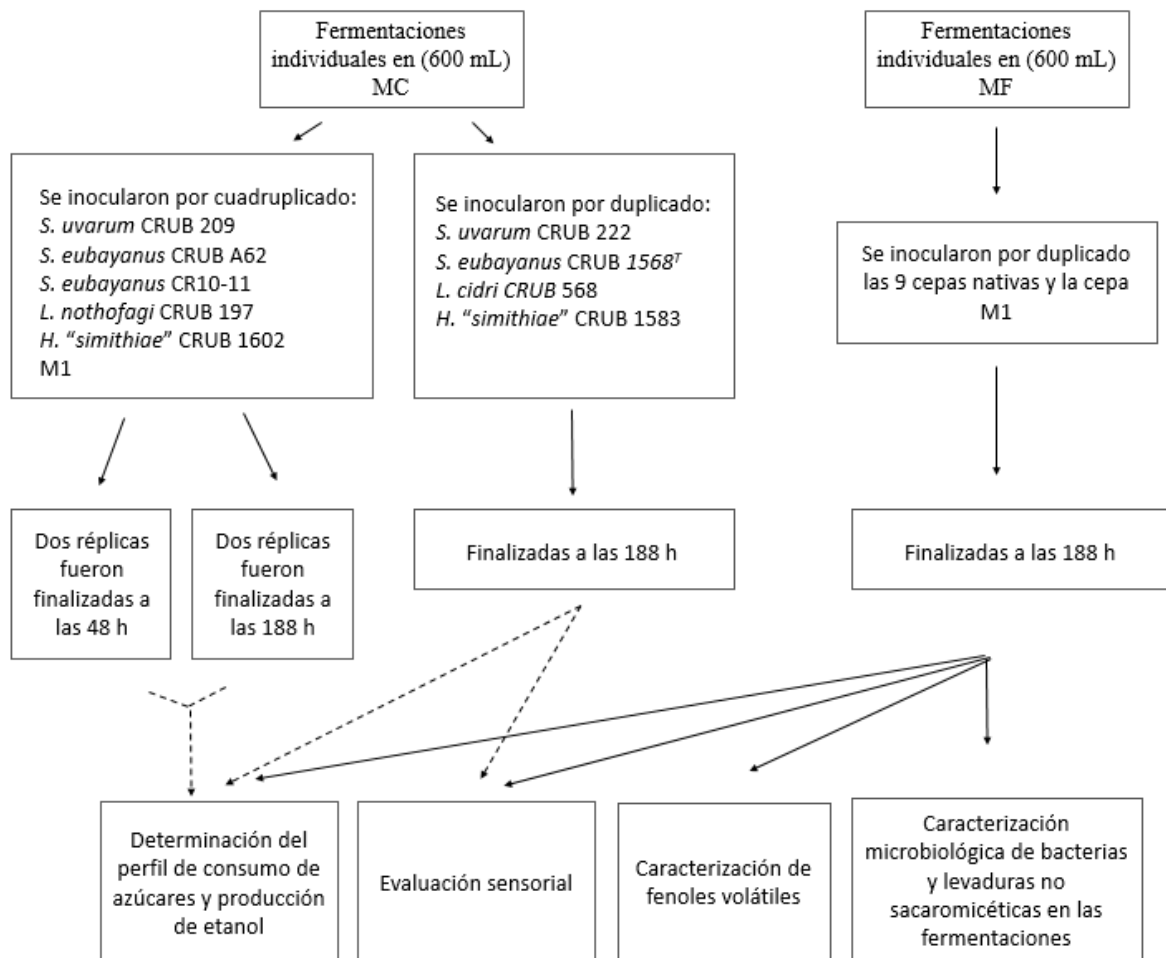


Figura 1: Diagrama de flujo que presenta el procedimiento realizado para las fermentaciones individuales.

2.4. Fermentaciones co-inoculadas con levaduras nativas y la cepa M1

Fermentaciones a escala laboratorio

Para las fermentaciones mixtas entre las cepas seleccionadas y la cepa comercial M1 Safspirit (Fermentis) se inocularon botellas estériles de 1 litro conteniendo 600 mL de MC y frascos tipo Schott de 2 litros conteniendo 1600 mL de MF, con las cepas *S. eubayanus* CR10-11 y *S. uvarum* CRUB 209 alcanzando una densidad celular inicial de $7,4 \times 10^6$ células/mL para MC y $7,8 \times 10^6$ células/mL para MF (ver sección 2.3.1). Las botellas se incubaron bajo una rampa de temperatura de 20 °C por 23 h, seguida por 25 °C por 25 h. Luego de 48 h de fermentación se inoculó la cepa M1 a la misma tasa inicial, y se incubó por 48 h a 30 °C (Figura 2). Las fermentaciones se realizaron por duplicado. La cinética de las fermentaciones se evaluó mediante pérdida de peso para las fermentaciones realizadas en MC y por medio de la determinación de la densidad del sobrenadante cuantificado mediante refractómetro, para las fermentaciones inoculadas en MF. Los controles fueron fermentaciones realizadas sólo con la cepa M1. Para ello la inoculación secuencial se realizó ambas veces con la cepa comercial, respetando las mismas condiciones aplicadas para las fermentaciones mixtas. Luego de 96 h totales de fermentación se estimó la atenuación final.

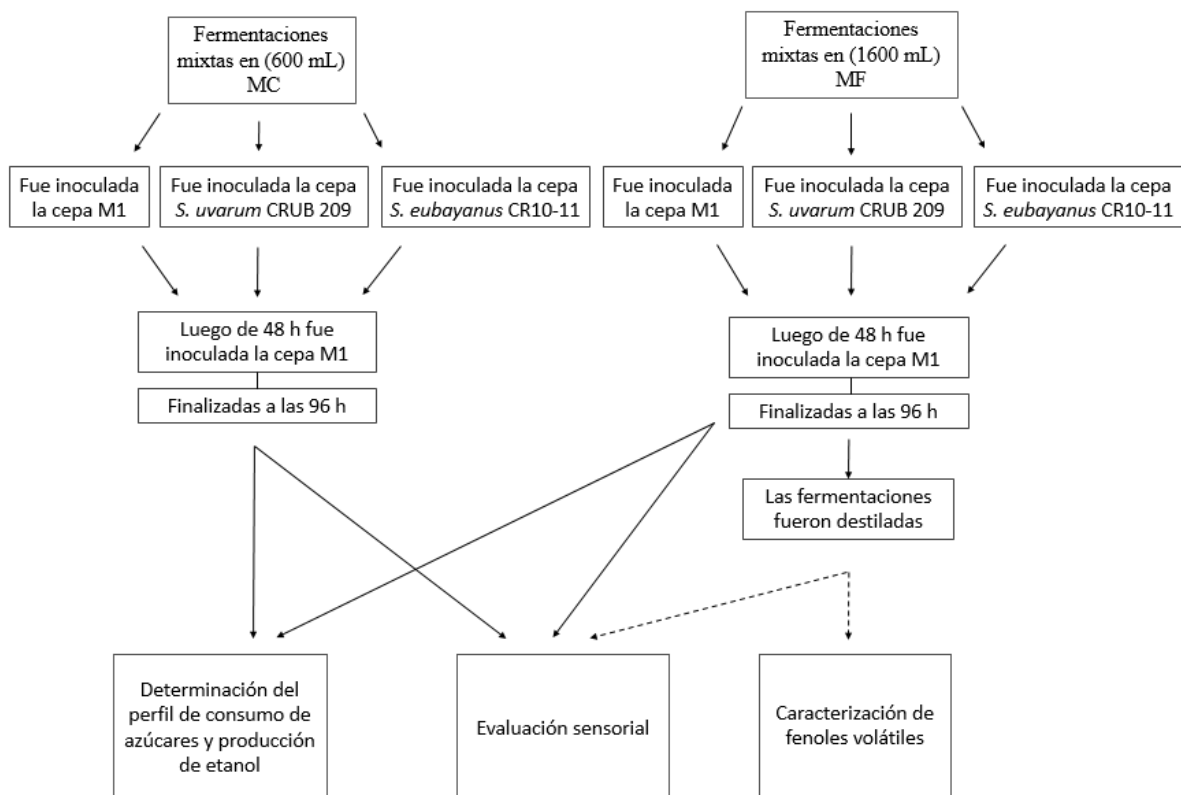


Figura 2: Diagrama de flujo que presenta el procedimiento realizado para las fermentaciones mixtas.

2.5. Destilado de las fermentaciones mixtas

Las fermentaciones co-inoculadas realizadas en MF se destilaron mediante un alambique artesanal de cobre de 3,5 litros de capacidad (Figura 3) hasta obtener un primer destilado de aproximadamente 22 % v/v de alcohol. El destilado se colectó en cinco fracciones. El volumen de la primera fracción (inicio del destilado) fue de 50 mL y el de las 4 fracciones restantes de 150 mL.



Figura 3: Alambique artesanal de cobre utilizado para la destilación de las fermentaciones.

2.6. Evaluación sensorial

La presencia de compuestos de aroma y sabor en las fermentaciones y en el destilado fue evaluada por un panel sensorial entrenado del CRELTEC (Figura 1 y 2). El panel sensorial que evaluó las fermentaciones individuales realizadas en MC fue integrado por 6 personas, el de las fermentaciones individuales en MF por 8 personas, el de las fermentaciones mixtas en MC

por 7 personas y el de las fermentaciones mixtas en MF y su destilado por 5 personas. Los duplicados de las fermentaciones se mezclaron en partes iguales y se les asignó un código aleatorio. Las evaluaciones se realizaron a ciegas asignando la evaluación a cada uno de los códigos generados. Los panelistas calificaron descriptores de aroma (malta, ésteres, fenoles, sulfuros) y sabor (malta, ésteres, amargor, dulzor, acidez, alcohol, fenoles) en una escala de 0 (no percibido) a 5 (presencia muy fuerte).

2.7. Determinación del perfil de consumo de azúcares y producción de etanol

El perfil de azúcares consumidos y el etanol producido en las fermentaciones fueron cuantificados Nguyen et al. (2010) en cromatografía líquida de alta presión (HPLC – Waters), utilizando una columna RezexTM (ROA-Organic Acid, 300 x 7,8 mm) y detector de índice de refracción (Figura 1 y 2). Se realizó una elución isocrática con H₂SO₄ 0,005 N como fase móvil, con un flujo de 0,6 ml/min durante 30 min. La cuantificación se realizó por medio de curvas de calibración de los estándares de D-glucosa 99,8% (Merck), Maltosa 98% (Sigma), Maltotriosa 95% (Sigma) y Etanol Absoluto 99,3% (Sintorgan). Las curvas de calibración fueron construidas a partir de soluciones stock realizadas para cada compuesto en agua mili-Q. La concentración de las soluciones stock fue de 8% m/v para maltosa, 4% m/v para maltotriosa, 5% v/v para etanol y 5% m/v para D-glucosa. Se realizaron 4 diluciones de las soluciones stock a partir de las cuales fueron construidas las curvas de calibración para cada compuesto (0,1-8% m/v para maltosa, 0,5-4% m/v para maltotriosa, 1-5% v/v para etanol y 0,5-5% m/v para D-glucosa). Se detectó la presencia/ausencia de fructosa. El contenido de etanol de los destilados finales y de las 5 fracciones colectadas fueron medidos con alcoholímetro Alex 500 (Anton Paar). Se utilizaron 40 mL de muestra para cada medición.

2.8. Caracterización de fenoles volátiles

La acumulación de los compuestos fenólicos 4-vinilguaiacol (4-VG), 4-etilguaiacol (4-EG), 4-vinilfenol (4-VF) y 4-etilfenol (4-EF) fue cuantificado para las fermentaciones individuales en MF y para las fracciones 1, 3 y 5 del destilado final de las fermentaciones mixtas (Figura 1 y 2). Se determinaron mediante HPLC (Waters) según Saez et al. (2011), utilizando una columna Luna 5u C18 (Phenomenex, 250 x 4,6 mm) y registrando la absorbancia a 230 y 280 nm mediante un detector de arreglo de diodos. La fase móvil estaba compuesta por acetonitrilo (grado HPLC) y agua con ácido fórmico (0,12 g/L, pH a 3,5). Se realizó una elución en gradiente de acetonitrilo (10 min-75% acetonitrilo, 5 min-60%, 5 min-50%, 15 min-40 %, 5 min-75%), con un reequilibrio de la columna de 10 min después de cada corrida. La elución se

realizó a flujo constante de 0,9 ml/min durante 35 min. La cuantificación se realizó por medio de curvas de calibración de los estándares de 4-vinilfenol, solución 10,1 % m/m en propilenglicol (Sigma), 4-etilfenol, 99 % m/m (Sigma), 4-vinilguaiacol, 99,7 % m/m (Sigma) y 4-etilguaiacol, 98,1 % m/v (Sigma). Las curvas de calibración fueron construidas a partir de soluciones stock para cada compuesto en acetonitrilo de una concentración de 2 ppm. Se realizaron 4 diluciones de las soluciones stock a partir de las cuales fueron construidas las curvas de calibración para cada compuesto (0,1-2 ppm).

2.9. Análisis estadísticos

La comparación de medias se realizó mediante la prueba no paramétrica Kruskal-Wallis en el programa estadístico R Studio utilizando los paquetes dplyr y car debido a que los datos no cumplieron el supuesto de normalidad (prueba de Shapiro-Wilk, p-valor < 0,05) y tampoco pudieron ser normalizados mediante la transformación de las variables. Se compararon las medias de atenuación, producción de etanol, $\mu_{\text{máx}}$ y azúcares residuales entre las diferentes cepas y entre los dos tipos de medios (MC y MF). Las medias de producción de fenoles volátiles de las fermentaciones y de los destilados fueron comparados entre cepas.

3. Resultados y discusión

3.1. Caracterización de las fermentaciones de las levaduras nativas

3.1.1. Fermentaciones a escala laboratorio

La cinética del comportamiento fermentativo y la atenuación final junto con la producción de etanol de los fermentados realizados con las 9 cepas evaluadas se presentan en la Figura 4 y Figura 5, respectivamente. En la Tabla 1 se presentan la velocidad máxima de fermentación ($\mu_{\text{máx}}$) junto con el porcentaje de atenuación alcanzado por las cepas evaluadas en ambos mostos. De las fermentaciones realizadas en MC con 188 h de incubación, las de la cepa M1 alcanzaron el mayor porcentaje de atenuación observado ($96,7 \pm 4,1\%$) y el mayor rendimiento de etanol ($6,1\%$ v/v). En este mosto, las levaduras nativas mostraron una menor actividad fermentativa, con una atenuación observada entre 15,9-47,8% y una producción de etanol entre 1,0-3,2% v/v. Dentro de las cepas nativas, *S. eubayanus* A62 presentó los mayores valores de atenuación ($72,7 \pm 2,2\%$) y de rendimiento de etanol ($5,6 \pm 0,1\%$), comparables con los de la cepa comercial (Figura 5). Las cepas nativas inoculadas en MC e incubadas por 48 h, también presentaron menor actividad fermentativa en comparación a la cepa comercial, observándose valores de atenuación y producción de etanol entre un 11,3-38,9% y un 1,0-3,0% v/v,

respectivamente. En este tiempo de 48 h, la cepa comercial M1 alcanzó una atenuación del $88,6 \pm 0\%$ y una producción de etanol del $7,8 \pm 0,1\%$ v/v. Las diferencias de atenuación y de producción de etanol entre cepas en MC no fueron estadísticamente significativas (p-valor $> 0,05$). En general las cepas que presentaron los menores porcentajes de atenuación alcanzaron un $\mu_{\text{máx}}$ elevados y las cepas con mayores niveles de atenuación presentaron un $\mu_{\text{máx}}$ similar o menor a las cepas cuya atenuación fue baja, estas diferencias son fueron estadísticamente significativas (p-valor $> 0,05$).

Las fermentaciones realizadas en MF presentaron una cinética de crecimiento diferente a lo observado en MC. En MF el desempeño de la cepa M1 fue mayor que en MC, alcanzando una atenuación que superó el 100% y un rendimiento de etanol del $8,9 \pm 0,48\%$ v/v. Esta cepa alcanzó la fase estacionaria en 42 h en MF y 70 h en MC. Por otro lado, las cepas nativas en MF mostraron una menor actividad fermentativa en relación a la cepa comercial (pero en todos los casos mayor que en MC) (Figura 4) hasta las 56 h, para las que se observó una atenuación entre un 60-80% y una producción de etanol entre 3,9-7,4 % v/v (Figura 5). Las diferencias de atenuación y de producción de etanol entre cepas en MF no fueron estadísticamente significativas (p-valor $> 0,05$). En MF se observaron los mismos patrones que en MC con respecto al $\mu_{\text{máx}}$, las cepas que presentaron los menores porcentajes de atenuación alcanzaron un $\mu_{\text{máx}}$ elevado y las cepas con mayores niveles de atenuación presentaron un $\mu_{\text{máx}}$ similar o menor a estas, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (p-valor $> 0,05$).

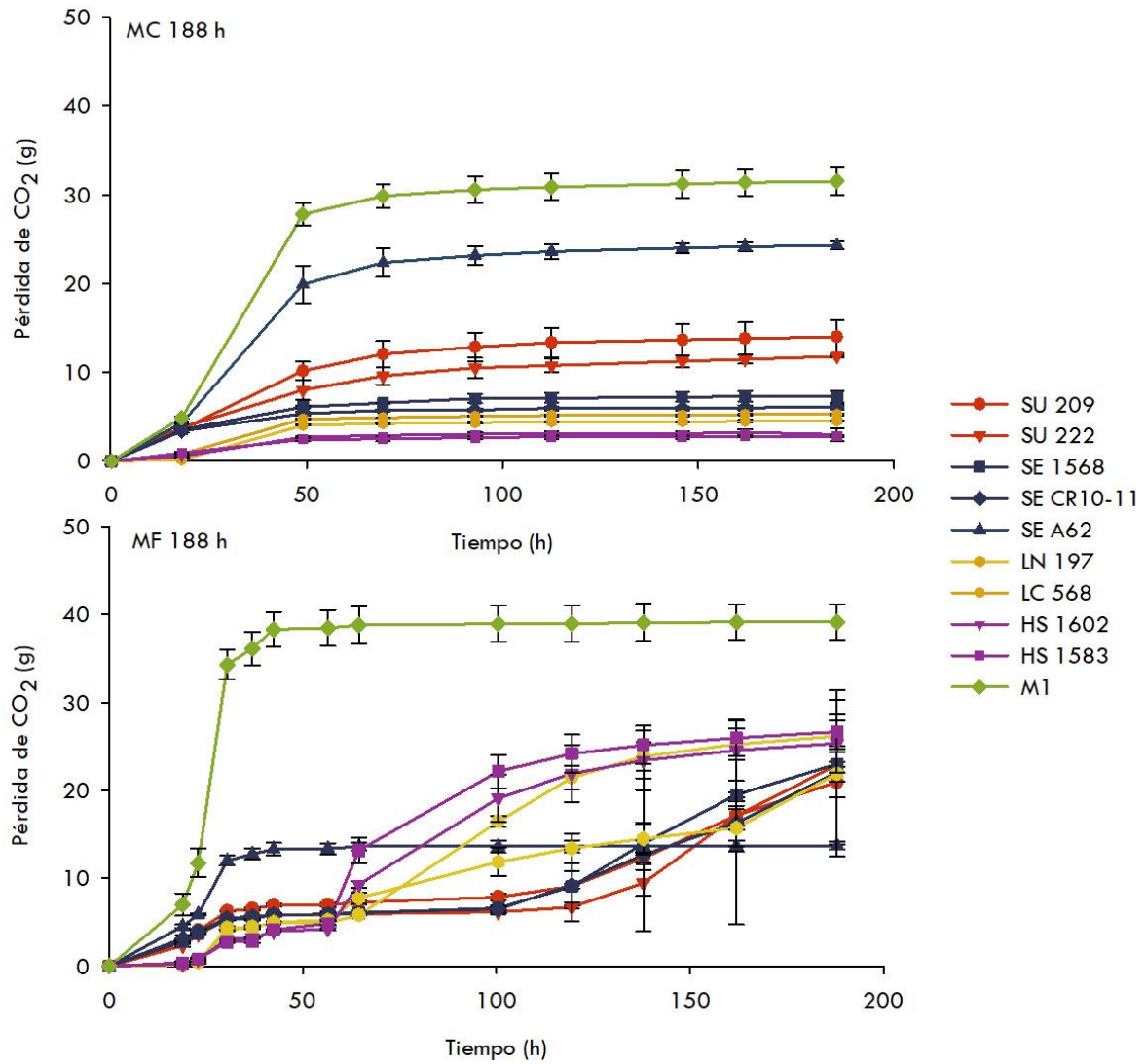


Figura 4: Cinética de fermentación de las cepas nativas evaluadas y de la cepa control M1 en MC y MF representada como la pérdida de CO₂ (g) en función del tiempo (h). SU 209: cepa *S. uvarum* CRUB 209, SU 222: *S. uvarum* CRUB 222, SE: 1568 a *S. eubayanus* CRUB 1568^T, SE CR10-11: *S. eubayanus* CR10-11, SE A62: *S. eubayanus* A62, LN 197: *Lachancea nothofagi* CRUB 197, LC 568: *Lachancea cidrii* CRUB 568, HS 1602: *Hanseniaspora "simithiae"* CRUB 1602 y HS 1583: *Hanseniaspora "simithiae"* CRUB 1583.

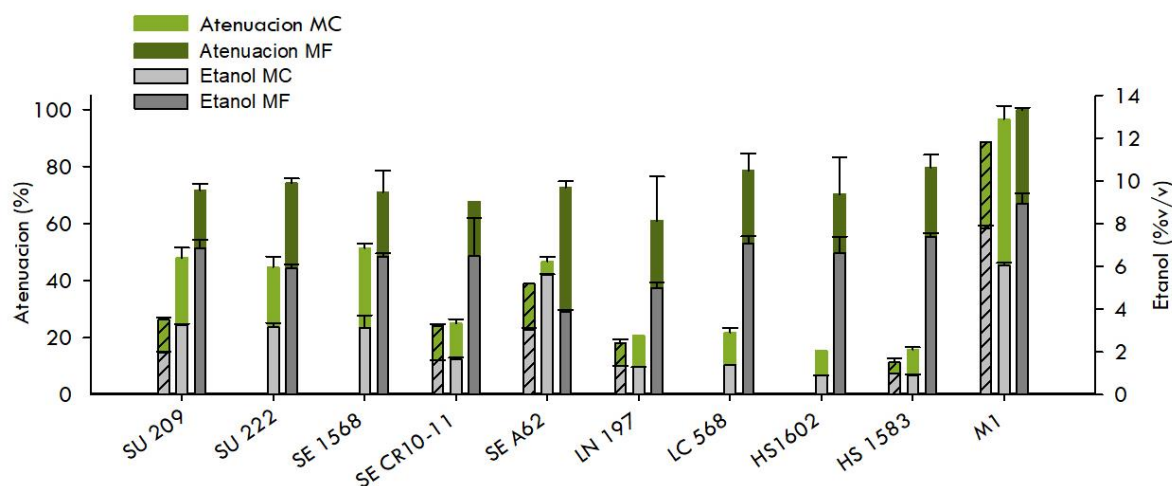


Figura 5: Atenuación y producción de etanol a tiempo final (188 h) para las nueve cepas nativas y la cepa de referencia (M1) en MC y MF. Las barras rayadas representan las fermentaciones realizadas en MC finalizadas luego de 48 h de fermentación.

Tabla 1: Velocidad máxima de fermentación ($\mu_{\text{máx}}$) y porcentaje medio de atenuación alcanzado a tiempo final (188 h) para las fermentaciones individuales en MC y MF.

Cepa	MC		MF	
	$\mu_{\text{máx}}$	Atenuación (%)	$\mu_{\text{máx}}$	Atenuación (%)
SU 209	0,05	47,8	0,15	71,5
SU 222	0,04	44,7	0,17	74,2
SE 1568	0,07	51,5	0,15	70,9
SE CR10-11	0,10	25,0	0,15	67,6
SE A62	0,07	72,7	0,16	46,7
LN 197	0,11	20,7	0,31	61,0
LC 568	0,10	21,8	0,41	78,5
HS 1602	0,08	15,3	0,18	70,3
HS 1583	0,07	15,9	0,10	79,5
M1	0,09	96,7	0,21	>100

Estos ensayos permitieron conocer la cinética de las levaduras nativas evaluadas y de la cepa M1 y cómo se produce la atenuación a lo largo del tiempo en MC y en MF, así como el rol de la flora natural del MF en las fermentaciones. La cinética del comportamiento fermentativo reveló que, en ambos mostos, la cepa M1 posee el mejor desempeño fermentativo de las cepas evaluadas, seguida por la cepa *S. eubayanus* A62. En ambos mostos estas cepas presentaron una velocidad fermentativa similar (Tabla 1) y en MC presentaron los mayores niveles de atenuación. Si bien en MF la atenuación de la cepa A62 es menor al resto de las cepas nativas esto se debe al desarrollo microbiano diferencial entre fermentaciones (explicado más adelante), sin embargo, en las primeras 50 h de fermentación se puede observar el mejor

desempeño fermentativo de la cepa A62 respecto de las demás cepas nativas evaluadas (Figura 4). Estos resultados son esperables debido a que la M1 es una cepa domesticada y seleccionada artificialmente para lograr una fermentación rápida y completa de los azúcares del mosto (Walker et al., 2019), mientras que *S. eubayanus* A62, es una cepa que ha sido obtenida a través de evolución experimental dirigida por 630 generaciones en mosto congreso a partir de la cepa parental CRUB 1568^T. Esta cepa es capaz de duplicar tanto en consumo de maltosa como en velocidad de fermentación a la cepa parental salvaje (Eizaguirre, 2019). La domesticación de estas cepas de levaduras explica la cinética fermentativa superior en estos medios respecto de su contraparte salvaje. Por otra parte, resultan destacables las diferencias en el desempeño de ambas levaduras comparando el MC con el MF. Mientras la cepa A62 se desempeña mejor en MC (diferencia porcentual de un 37,5% de atenuación entre mostos), la cepa M1 se desempeña mejor en MF (diferencia de 6,5% entre mostos), notablemente esto se correlaciona con los medios en los cuales ambas evolucionaron originalmente. La cepa M1 es una cepa adaptada a la producción de whisky (resiste concentraciones de hasta 15% v/v de etanol y consume de forma eficiente la maltosa y maltotriosa), que durante generaciones se adaptó a las condiciones de los mostos utilizados para la elaboración de whisky (Walker et al., 2019). Por su parte, la cepa A62 se domesticó en MC y por lo tanto se encuentra adaptada a la composición de este tipo de mosto. Una de las principales diferencias entre MC y MF es el proceso de esterilización térmica mediante autoclave (121°C durante 15 minutos) aplicado en el MC. Mishra & Speers (2020) encontraron que el aumento en la temperatura y tiempo de ebullición del mosto disminuyen los niveles iniciales de amino nitrógeno libre (FAN, por sus siglas en inglés) y de pH del mosto. La concentración inicial de FAN en el medio es considerada un factor que afecta el desempeño fermentativo de las levaduras (Hill & Stewart, 2019). El proceso de esterilización térmica aplicado en MC es considerado entonces un factor que modifica significativamente las características del mismo y, como consecuencia, podría afectar el desempeño fermentativo de las cepas respecto del MF. Los resultados de este trabajo sugieren que es deseable que los procesos de domesticación realizados por evolución experimental se realicen en condiciones y en medios de cultivo que representen lo mejor posible las condiciones en que serán aplicadas a nivel productivo ya que modificaciones en el proceso de producción podrían impactar en el desempeño fermentativo.

La baja cinética fermentativa observada para todas las cepas nativas se debe a que se trata de levaduras salvajes que no están adaptadas al consumo de los azúcares predominantes del mosto de cebada (maltosa y maltotriosa) (ver sección 3.1.2.). Si bien presentaron un $\mu_{\text{máx}}$ elevado en

comparación la cepa M1, esto se debe al rápido consumo de glucosa presente en el MF y de glucosa y fructosa presente en el MC (ver sección 3.1.2.). Sin embargo, el bajo grado de detalle de las curvas en las primeras horas de fermentación limitó el análisis de éste y otros parámetros como por ejemplo la fase de latencia de las cepas en estos medios. Las cepas del género *Lachancea* y de la especie *S. eubayanus* utilizadas en este trabajo fueron aisladas de corteza de árboles del género *Nothofagus* y las cepas del género *Hanseniaspora* y la especie *S. uvarum* de fructificaciones de *Cyttaria hariatii* y *Cyttaria johowii*. Estas cepas se desarrollan naturalmente en ambientes donde azúcares como la maltosa y la maltotriosa se encuentran ausentes, por lo tanto, es esperable que sus cinéticas de crecimiento hayan sido menos eficientes. Por otro lado, las diferencias de aptitud fermentativa entre las distintas cepas nativas puede atribuirse a que las levaduras del género *Saccharomyces* se encuentran filogenéticamente muy distantes de las levaduras del género *Lachancea* y del género *Hanseniaspora* (Kurtzman, 2003). Existió un evento de duplicación del genoma completo (WGD, por sus siglas en inglés) hace 100 Ma seguido por una diploidización del genoma, para seis géneros de la familia Saccharomycetaceae, que incluyó al género *Saccharomyces* pero no a *Lachancea* y *Hanseniaspora* (fue posterior su divergencia) (Wolfe, 2001). La WGD se asocia con una diversificación estructural, funcional y fenotípica a largo o corto plazo (Albertin & Marullo 2012). Por lo tanto, las diferencias encontradas entre las distintas cepas podrían deberse en parte a factores ecológico-evolutivos y a eventos de duplicación génica y diversificación funcional a lo largo de la filogenia.

La diferencia observada en la cinética fermentativa entre mostos después de 50 h de cultivo es atribuida a la presencia de otros microorganismos en el MF. En todas las fermentaciones de las cepas nativas (a excepción de *S. eubayanus* A62) realizadas en MF se observó una segunda curva de fermentación a partir de las 56 h que es atribuida a la actividad de microorganismos diferentes a las levaduras inoculadas (ver sección 3.1.1). A diferencia del MC, el MF no fue esterilizado. La actividad microbiana tardía es típica de las fermentaciones de whisky y coincide con lo observado por Beek & Priest (2002) en este tipo de fermentaciones, en las cuales luego de 30-40 h la población de levaduras decrece y da lugar a la proliferación de bacterias ácido lácticas que, luego de 70 h, dominan la fermentación. La pérdida de peso por CO₂ observada para estas cepas nativas sugiere que las bacterias y levaduras presentes en el mosto se están desarrollando aprovechando los azúcares residuales. Por el contrario, el aumento tardío de la cinética fermentativa no se observó en las fermentaciones de las cepas M1 y *S. eubayanus* A62. Como se mencionó anteriormente estas levaduras presentan un mejor desempeño fermentativo (y como se discutirá más abajo, dejan menor cantidad de azúcares

residuales fermentables); por lo que el crecimiento microbiano se ve limitado por el mayor consumo de azúcares y nutrientes del medio, y/o por la mayor producción de etanol (inhibidor bacteriano) por parte de estas cepas (Narendranath et al., 1997). Las diferencias en la proliferación microbiana entre fermentaciones, también se vio reflejada en el pH final de las distintas fermentaciones que disminuyó desde un pH inicial de 5,7 a un pH de entre 3,2-3,3 en las fermentaciones inoculadas con las cepas nativas en MF, y a un pH de 3,7 en las fermentaciones realizadas con la cepa M1. Los valores de pH de las fermentaciones de las cepas nativas en MF se encuentran por debajo del rango de valores normales de pH para fermentaciones de whisky (3,8-4,1) (Russell & Stewart, 2003) indicando que las cepas y los parámetros fermentativos utilizados para este ensayo favorecieron el desarrollo de microorganismos por encima de los valores normales en fermentaciones de whisky.

Para cada cepa, atenuación y la concentración de etanol final de las fermentaciones se corresponden con sus cinéticas de fermentación. En MC el mayor rendimiento de etanol fue observado para la cepa M1 y para la *S. eubayanus* A62 lo que se correlaciona con el alto consumo de azúcares. Asimismo, el bajo rendimiento de etanol de las cepas nativas en MC se correlaciona con el bajo consumo de azúcares. La mayor atenuación observada en las fermentaciones en MF en relación al MC es atribuido al consumo de azúcares por parte de los microorganismos presentes en el mosto. Además, fue reportado que la presencia de bacterias y/o levaduras superatenuantes, capaces de degradar los azúcares complejos no fermentables del mosto (dextrinas), aumentan la disponibilidad de azúcares simples para las levaduras (Narendranath et al., 1997; Park et al., 2014) y el rendimiento de etanol en fermentaciones mixtas (Kongkiattikajorn & Sornvoraweat, 2011), lo cual explica los mayores niveles de atenuación y etanol alcanzados en las fermentaciones en MF.

La consistencia entre los resultados obtenidos para la cinética de las fermentaciones, la atenuación, la producción final de etanol y el pH revelaron que la aptitud fermentativa de las cepas nativas es baja en comparación a la cepa comercial M1 y la cepa evolucionada *S. eubayanus* A62, y que la actividad microbiana presente en el MF sucede a las levaduras inoculadas al principio de la fermentación y se correlacionaría con la mejora en la atenuación de las cepas nativas en MF. Estas consideraciones deben ser tenidas en cuenta para los sistemas de co-cultivo y serán discutidos en dicha sección.

3.1.2. Perfil de consumo de azúcares de las fermentaciones

El perfil de azúcares de los dos mostos utilizados resulta muy similar: 69% de maltosa, 15% de maltotriosa y 16% de glucosa para MF y 64% de maltosa, 18% de maltotriosa y 14% de

glucosa para MC (del total de azúcares fermentables). En MC fue detectada fructosa pero no pudo ser cuantificada en este trabajo; sin embargo, Fox et al. (2019) reportaron que en mosto congreso se encuentra en una concentración de hasta 4%.

El consumo de azúcares fue diferente entre las fermentaciones de las 9 cepas evaluadas y entre los medios de cultivo, principalmente para los azúcares maltosa y maltotriosa. En MC, la cepa comercial M1 consumió el 100% de fructosa, glucosa y maltotriosa, y el $98 \pm 0,1\%$ de la maltosa presente en el mosto luego de 188 h de fermentación (Figura 6). El consumo de maltosa en las fermentaciones inoculadas con las cepas nativas varió entre 0-92,8% siendo *L. cidri* y *S. eubayanus* A62 las que menor y mayor consumo presentaron respectivamente. La fructosa y la glucosa fueron consumidas en su totalidad por todas las cepas, a excepción de las pertenecientes al género *Hanseniaspora* para las que se evidenció presencia de fructosa remanente y un consumo de glucosa del $68,2 \pm 0\%$ para la cepa 1602 y $66,7 \pm 2,1\%$ para la cepa 1583. Por el contrario, ninguna de las cepas nativas fue capaz de consumir maltotriosa. Las fermentaciones finalizadas luego de 48 h de incubación mostraron que el patrón de azúcares residuales para las cepas *H. "simithiae"* CRUB 1583, *L. cidri* CRUB 568 y *S. eubayanus* CR10-11 fue similar al observado en las fermentaciones incubadas por 188 h. Por el contrario, para *S. uvarum* CRUB 209, *S. eubayanus* A62 y la cepa M1 el contenido de azúcares residuales luego de 48 h, resultó mayor que en las fermentaciones finalizadas a las 188 h, indicando que es necesario un tiempo de incubación mayor para alcanzar el máximo rendimiento de etanol. Sin embargo, las diferencias de consumo de azúcares entre cepas y entre MC y MF no resultaron estadísticamente significativas (p -valor $> 0,05$).

La cuantificación de los azúcares residuales en MF demostró que el patrón de consumo de la cepa de referencia M1 fue similar a lo observado para las fermentaciones en MC ($100 \pm 0\%$ de la glucosa, $98,1 \pm 0,02\%$ de maltosa y $89,4 \pm 0,02\%$ maltotriosa, Figura 6). Sin embargo, el patrón de consumo para las fermentaciones inoculadas con las cepas nativas en MF fue diferente que en MC. Si bien el consumo de glucosa se encontró entre 94,2-95,7% en ambos mostos, el consumo de maltosa en MF varió entre el 37,3-87,5%; siendo las fermentaciones inoculadas con *S. eubayanus* A62 y *H. "simithiae"* CRUB 1583 las que menor y mayor porcentaje presentaron respectivamente (las diferencias de consumo de glucosa y maltosa entre cepas y de la cepa A62 entre los dos tipos de mosto no resultaron estadísticamente significativas, p -valor $> 0,05$). Estos resultados son opuestos a lo observado en las fermentaciones en MC. En este medio el consumo de maltosa por parte de *S. eubayanus* A62 fue mayor al observado para el resto de las cepas nativas mientras que ambas cepas de la

especie *H. "simithiae"* presentaron niveles muy bajos de consumo de este azúcar. A diferencia de las fermentaciones realizadas en MC, se detectó un consumo de maltotriosa (7,1-40,1%) para todas las cepas nativas.

El análisis de áreas relativas para el primer pico detectado por HPLC y correspondiente principalmente a dextrinas residuales reveló que las fermentaciones realizadas tanto en MC como en MF presentaron una disminución en su área respecto al área total de los mostos sin fermentar (Figura 7). Esta disminución fue mucho mayor en MF (23-68%) que en MC (0-23%) (Figura 6), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas ($p>0,05$).

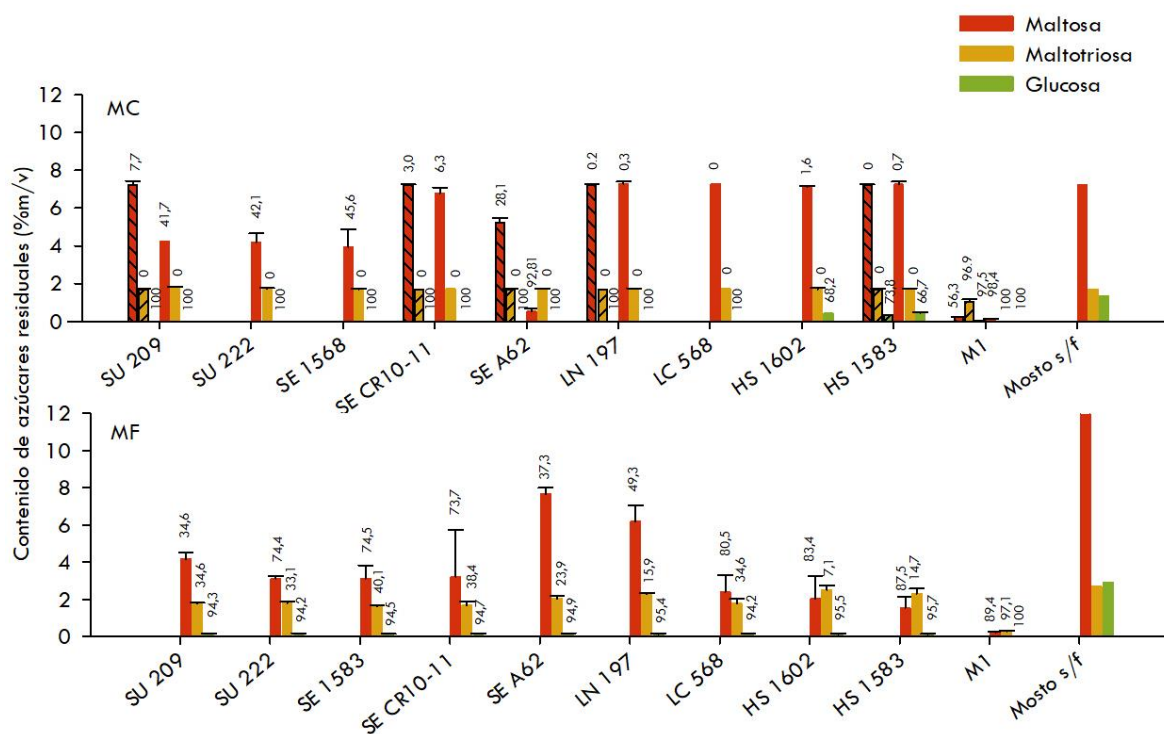


Figura 6: Cuantificación de azúcares residuales (HPLC) de las fermentaciones en MC y MF para las nueve cepas nativas y la cepa de referencia (M1). Las barras rayadas representan el patrón de azúcares residuales de las fermentaciones en MC finalizadas luego de 48 h de fermentación. Los números en las barras indican el porcentaje de consumo de cada azúcar.

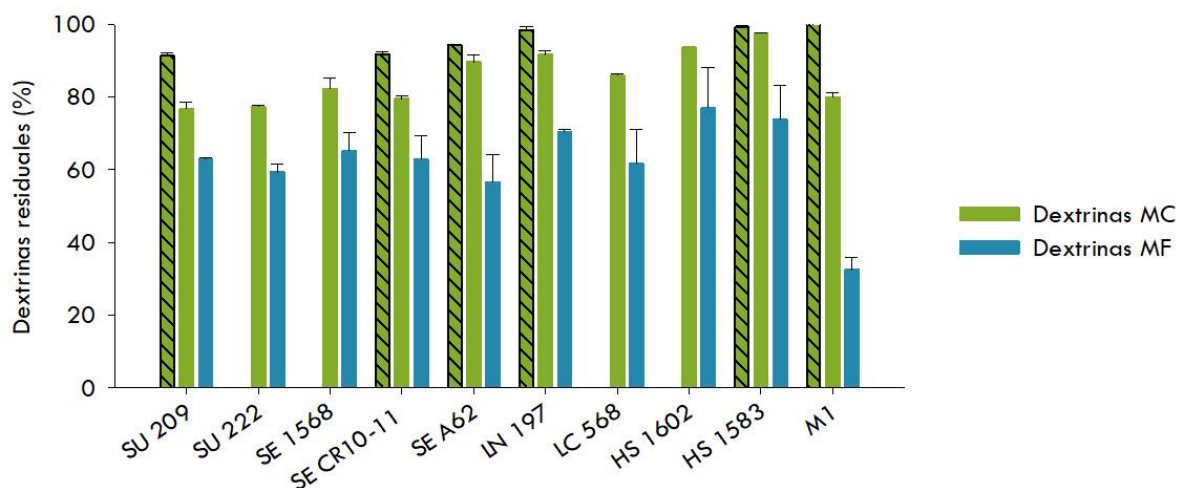


Figura 7: Porcentaje de dextrinas residuales (HPLC) de las fermentaciones en MC y MF para las nueve cepas nativas y la cepa de referencia (M1). Las barras rayadas representan el porcentaje de dextrinas residuales de las fermentaciones en MC finalizadas luego de 48 h de fermentación.

El perfil de azúcares remanentes de las fermentaciones en MC reveló que ninguna de las cepas nativas es capaz de consumir maltotriosa y que el consumo de maltosa es bajo con respecto a la cepa M1 para todas las cepas a excepción de la cepa evolucionada *S. eubayanus* A62. Los resultados obtenidos son consistentes con la cinética de consumo de los mo- di- y trisacáridos descrita para *S. cerevisiae*. Rautio & Londesborough (2003) describieron que la glucosa y la fructosa del mosto son consumidas por las levaduras de forma rápida y preferencial. La maltosa es utilizada por la mayoría de las cepas, sin embargo, su consumo ocurre luego de que la concentración de glucosa cae por debajo de una concentración umbral (Rautio & Londesborough, 2003; Reifengerger et al., 1995). Por su parte, la maltotriosa es el último azúcar fermentable y la mayoría de las cepas no convencionales, incluyendo todas las cepas utilizadas en este trabajo, son incapaces de asimilarla (Yoon et al., 2003; Zheng et al., 1994). La utilización de maltosa y maltotriosa por parte de las levaduras se produce mediante el transporte activo de estos azúcares a través de la membrana plasmática por permeasas, y su posterior hidrólisis por α -glucosidasas citoplasmáticas. Las α -glucosidasas son enzimas que hidrolizan la maltosa en sus subunidades de glucosa y que también son capaces de hidrolizar la maltotriosa (Rautio & Londesborough, 2003). Sin embargo, solo unos pocos transportadores de maltosa pueden también transportar maltotriosa hacia el interior de la célula (Brown et al., 2010), por lo que la principal limitante para el consumo de este trisacárido es la incapacidad de las levaduras para ingresarlo al interior celular. El proceso de domesticación llevado a cabo a

través de la selección artificial de levaduras en los ambientes fermentativos, contribuyó al desarrollo de cepas con una fermentación optimizada de la maltosa debido a un aumento en la eficiencia del transporte de este azúcar, y de cepas capaces de consumir maltotriosa debido a la evolución de transportadores específicos (ej. AGT1, MTT1) (Gallone et al., 2016). Esto explica el eficiente consumo de los azúcares del mosto por parte de la cepa comercial M1 en MC, en contraste con la menor aptitud fermentativa observada para las cepas nativas no adaptadas a este medio. El perfil de consumo de *S. eubayanus* A62 en MC es consistente con lo observado por Domizio et al. (2016) y Eizaguirre (2019), donde el consumo de maltosa fue marcadamente mayor que para las cepas nativas salvajes pero no presentó consumo de maltotriosa. Sin embargo, en MF se observó consumo de maltotriosa en todas las fermentaciones y un mayor consumo de maltosa en comparación a las fermentaciones en MC. La diferencia en el perfil de azúcares entre las fermentaciones realizadas en MF y MC debe ser atribuido a la fermentación de la flora microbiana presente en el mosto de whisky ya que no está reportado para las cepas de los géneros *Lachancea* y *Hanseniaspora* ni para las cepas de *S. eubayanus* la capacidad de metabolizar este azúcar.

Diversos estudios han evaluado la capacidad fermentativa de levaduras no convencionales de los géneros utilizados en este trabajo. Domizio et al. (2016) evaluaron el crecimiento de *Lachancea thermotolerans* en mosto de cerveza y, pese a que el consumo de maltosa es similar al de cepas comerciales de *S. cerevisiae*, se requieren tiempos de fermentación más extensos (2-3 semanas) para que esto ocurra. Por otra parte, se ha demostrado que *Lachancea thermotolerans* y *Lanchancea fermentati* (KBI 12.1) son incapaces de asimilar maltotriosa (Bellut et al., 2019; Domizio et al., 2016). Los estudios para levaduras del género *Hanseniaspora* en relación al consumo de los azúcares presentes en mosto de cebada son más escasos. Bourbon-Melo et al. (2021), reportaron altas concentraciones de maltosa y maltotriosa residuales en fermentaciones de extracto de malta realizadas con cepas de *H. guilliermondii*, *H. opuntiae* y *H. uvarum* (aisladas de uva y mostos de uva). Si bien algunas de las cepas parecían consumir parcialmente estos dos azúcares, no crecieron en caldo YNB con maltosa como única fuente de carbono, sugiriendo la ausencia de un locus MAL funcional en estas cepas, necesario para el metabolismo de la maltosa (Novak et al., 2004). La fermentación de maltosa no ha sido observada para el género *Hanseniaspora* (Cadez & Smith, 2011), y no se encontraron homólogos de los genes necesarios para la utilización de maltosa en genomas públicos disponibles de cepas de *Hanseniaspora* (Čadež et al., 2019). Por otra parte, el desempeño fermentativo reportado para *S. eubayanus* en mosto cervecero, indica que esta

especie presenta un consumo de maltosa promedio del $87,0 \pm 1,6 \%$, pero que es incapaz de utilizar la maltotriosa (Nakao et al., 2009, Eizaguirre, 2019, Burini et al., en prep). Por último, la especie *S. uvarum* ha sido estudiada principalmente en fermentaciones relativas a la industria del vino y la sidra, y tras una extensa revisión bibliográfica no se han hallado reportes que evalúen su capacidad de fermentar los azúcares específicos del mosto de cebada. Este trabajo representa la primera caracterización de la cinética fermentativa en mostos de cebada para cepas de *S. uvarum*. En este sentido se destaca que, en las fermentaciones en medio estéril (MC) las cepas de *S. uvarum* son incapaces de consumir maltotriosa y presentan una baja eficiencia de consumo de maltosa (*S. uvarum* CRUB 209 $41,7 \pm 0\%$ y *S. uvarum* CRUB 222 $42,1 \pm 6,4\%$). Finalmente, si bien en este trabajo se observó una disminución del área que corresponde al pico de las dextrinas en las fermentaciones realizadas en MC, esta disminución es atribuida a la metodología utilizada para cuantificar estos azúcares dado que no permite resolver de forma completa el pico de las dextrinas. No está reportado que cepas nativas de los géneros estudiados en este trabajo sean capaces de consumir dextrinas, lo que implica que la caída del área observada se debe a la modificación del área del pico correspondiente a las dextrinas debido al consumo de otros azúcares del mosto (para más detalles ver cromatogramas de ejemplo en el Anexo II).

Por su parte, la disminución del área correspondiente a las dextrinas en las fermentaciones en MF fue marcada, y no puede ser atribuida únicamente a la metodología. La degradación de dextrinas se produce por la acción de levaduras o bacterias presentes en el mosto que expresan alfa-amilasas, capaces de hidrolizar los enlaces alfa-1,4- alfa-1,6- glucosídicos de las dextrinas (Park et al., 2014). Por otra parte, el mosto de whisky presenta enzimas amilolíticas activas de la malta debido a que no presenta una etapa de hervor en el proceso de producción (Vriesekoop et al., 2010). La disminución de las dextrinas observada en MF puede atribuirse a la presencia de microorganismos y a la actividad amilasa de las enzimas de la malta que continuaron degradando los azúcares complejos en el transcurso de la fermentación.

Los resultados del perfil de consumo de azúcares son consistentes con los resultados de cinética fermentativa y de atenuación presentados en la sección anterior. Las cepas nativas salvajes consumen de forma ineficiente la maltosa y no son capaces de consumir maltotriosa mientras que la cepa evolucionada A62 de la especie *S. eubayanus* presentó en MC mayor consumo de maltosa en relación a las cepas nativas salvajes. Por otro lado, los microorganismos presentes en MF (diferentes de las levaduras inoculadas), capaces de degradar maltosa, maltotriosa y

dextrinas, disminuyeron la cantidad de azúcares residuales de estos azúcares en las fermentaciones realizadas en este medio.

3.1.3. Caracterización microbiológica de bacterias y levaduras no sacaromícéticas en las fermentaciones

Los cultivos realizados en medios WLD y HLP permitieron determinar la presencia de bacterias aeróbicas y anaeróbicas con forma de bacilo presentes al final de todas las fermentaciones realizadas en MF. Las unidades formadoras de colonia en todas las fermentaciones realizadas en este medio fueron superiores a las 500 UFC/mL. No se observó crecimiento de levaduras no sacaromícéticas en el medio LCSM. Los controles de crecimiento en LCSM para las especies *S. eubayanus* y *S. uvarum* fueron negativos y para las cepas de los géneros *Hanseniaspora* y *Lachancea* fueron positivos.

Los resultados obtenidos en las pruebas microbiológicas confirman que los microorganismos presentes en el MF se corresponden con la flora bacteriana típica de fermentaciones de whisky (Beek & Priest, 2002). El crecimiento observado en los medios WLD y HLP permite confirmar la presencia de bacterias ácido-lácticas aeróbicas y anaeróbicas en el MF, que son las bacterias predominantes en las fermentaciones tardías de whisky (Beek & Priest, 2002). El crecimiento de estas bacterias es consistente con el menor pH final observado en las cinéticas de crecimiento en el MF, así como el mayor consumo de azúcares descritos en las secciones anteriores. La ausencia de crecimiento en los controles positivos en LCSM para *S. eubayanus* y *S. uvarum* son consistentes con el medio de cultivo utilizado, que inhibe el crecimiento de levaduras sacaromícéticas. Finalmente, la ausencia de crecimiento en este medio para las fermentaciones del género *Hanseniaspora* y *Lachancea* (pese a que el control de crecimiento resultó positivo) es consistente con lo observado por Narendranath et al. (1997) en fermentaciones mixtas entre *S. cerevisiae* y bacterias, en las que la acumulación de altas concentraciones de ácido láctico y acético disminuye la viabilidad de las levaduras a lo largo de la fermentación. Pese a que los resultados negativos en el medio LCSM no permiten afirmar la ausencia de levaduras salvajes en el MF, el volumen de muestra sembrado en este medio selectivo sugiere que la viabilidad de estas levaduras al final de las fermentaciones es inferior a 10 células/mL. La alta densidad celular de bacterias ácido lácticas y la baja viabilidad de levaduras al final de las fermentaciones observadas en este trabajo, son consistentes con la evolución de las poblaciones de bacterias y levaduras descrita para fermentaciones de whisky.

3.1.4. Perfil de fenoles volátiles de las fermentaciones en MF

La caracterización de fenoles volátiles de las fermentaciones en MF reveló que existe variabilidad entre las cepas evaluadas (Figura 8). La producción de 4-VF para todas las cepas fue similar (0,9-1,4 ppm), superando el umbral de percepción en todas las fermentaciones (0,2 ppm) (Wackerbauer, 1982). Por su parte, la concentración de 4-VG varió entre los 0,2-2,0 ppm. Las fermentaciones inoculadas con *L. nothofagi* CRUB 197 y *H. "simithiae"* CRUB 1602 mostraron los niveles más bajos de 4-VG (<0,2 ppm), los cuales se encontraron por debajo del umbral de percepción (0,3 ppm) (Meilgaard, 1975), y las fermentaciones inoculadas con la cepa comercial presentaron la concentración más alta de este compuesto ($1,98 \pm 0,07$ ppm), seguida por las fermentaciones de las cepas de *S. eubayanus* CRUB 1568^T ($1,4 \pm 0$ ppm) y A62 ($1,2 \pm 0,4$ ppm). Sólo en las fermentaciones inoculadas con cepas del género *Hanseniaspora* se detectó la presencia de 4-EG ($0,3 \pm 0,1$ ppm para *H. "simithiae"* CRUB 1602 y $0,6 \pm 0,5$ ppm para *H. "simithiae"* CRUB 1583), superando en ambos casos el umbral de percepción de este compuesto (0,13 ppm) (Wackerbauer, 1982). En ninguna de las fermentaciones se detectó la presencia de 4-EF. Las diferencias en la producción de fenoles entre cepas fueron estadísticamente significativas únicamente en el caso de las cepas *H. "simithiae"* con respecto a la producción de 4-EG (p-valor=0,028).

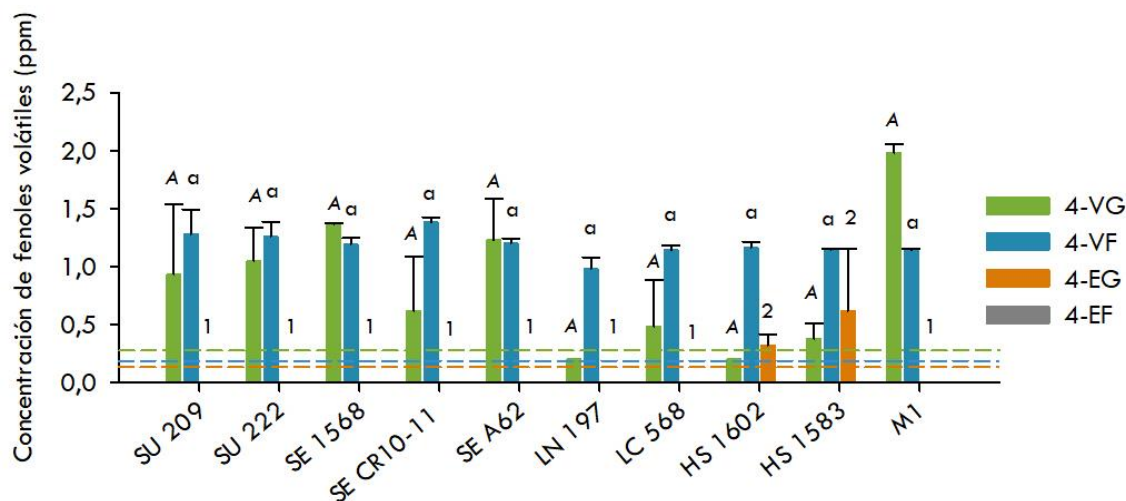


Figura 8: Producción de 4-vinilguaiacol (4-VG), 4-vinilfenol (4-VF), 4-etilguaiacol (4-EG) y 4-etilfenol (4-EF) de las nueve cepas nativas y la cepa control (M1). Las líneas punteadas indican el umbral de percepción para cada compuesto detectado: 0,3 ppm para 4-VG, 0,2 ppm para 4-VF y 0,13 ppm para 4-EG. Las letras y números indican las diferencias estadísticamente significativas en la producción de cada compuesto entre las cepas evaluadas.

La cuantificación de fenoles volátiles indica que tanto en las fermentaciones de las levaduras nativas como las de la cepa M1 presentan fenoles volátiles por encima de los umbrales de

percepción de estos compuestos. Los fenoles en el whisky se generan a partir de la descarboxilación y reducción enzimática de los ácidos hidroxicinámicos p-cumárico y ferúlico presentes en la pared celular de los granos de cebada, los cuales son liberados al mosto durante el proceso de macerado (Wall et al., 1961). En la fermentación, los ácidos ferúlico y p-cumárico son descarboxilados a 4-vinilguaiacol (4-VG) y 4-vinilfenol (4-VP) por acción de la enzima ácido ferúlico descarboxilasa (PAD1); la misma requiere del co-factor flavín mononucleótido sintetizado por la enzima ácido ferúlico descarboxilasa (FDC1) y en una etapa posterior de reducción da como lugar la síntesis de 4-etilguaiacol (4-EG) y 4-etilfenol (4-EP) catalizada por la enzima vinil fenol reductasa (VPR). Sin embargo, esta ruta no está presente en todas las levaduras dado que estas enzimas son sintetizadas por microorganismos que poseen los genes *PAD1*, *FDC1* y/o *VPR* funcionales y que presentan el fenotipo denominado *POF+* (“*phenolic off-flavors*”) (Chatonnet et al., 1993; Vanbeneden et al., 2008). Las levaduras salvajes (no domesticadas) suelen tener funcionales sus genes *PAD1* y *FDC1* (Gallone et al., 2016), lo que explica la elevada producción de fenoles volátiles detectada en las fermentaciones de todas las cepas nativas estudiadas. Diversos estudios evaluaron la producción de fenoles volátiles por los géneros de levaduras no convencionales utilizados en este trabajo. Eizaguirre (2019) y Urbina et al. (2020) detectaron la presencia de fenoles por encima del umbral de percepción para cepas salvajes de *S. eubayanus* y la existencia de variabilidad intraespecífica, que coincide con la variación observada en relación a la concentración de 4-VG y 4-VF para las fermentaciones de las tres cepas evaluadas de esta especie. Urbina et al., (2020) analizaron la relación entre la ubicación geográfica de los aislamientos de distintas cepas de *S. eubayanus* y el perfil aromático producido por las mismas. El análisis sugiere que las cepas con perfiles aromáticos similares no tienen un origen geográfico o genético común, por el contrario, presentaron una distribución aleatoria. Por lo tanto, la cantidad y variedad de compuestos volátiles producidos por *S. eubayanus* parecen ser rasgos específicos de cada cepa reflejando la gran diversidad genética de la especie. Para levaduras del género *Lachancea*, la producción de fenoles volátiles resulta variable entre especies. Estudios realizados en cerveza para cepas de la especie *L. fermentati* revelan que es *POF* negativa (Bellut et al., 2019), mientras que para *L. thermotolerans* se observó la producción de 4-VF y 4-EF (Toh et al., 2020). En este trabajo pudimos verificar que ambas especies de este género produjeron 4-VG y 4-VF, aunque la presencia de 4-VF en las fermentaciones de *L. nothofagi* CRUB 197 no supera el umbral de percepción. En el caso de levaduras del género *Hanseniaspora* y de la especie *S.*

uvarum, no hay reportes de la producción de fenoles volátiles en mostos de cebada. López et al. (2014) observaron la producción de 4-VG y 4-VF para cepas de *H. vineae* y *H. uvarum* en fermentaciones de vino; y González-Flores et al. (2019) detectaron presencia de 4-EF y 4-EG en sidras fermentadas con cepas de *S. uvarum*, aunque en valores del orden de los ppb (partes por billón). En las condiciones utilizadas en este trabajo, las fermentaciones de las cepas de la especie *S. uvarum* presentaron concentraciones de 4-VG y 4-VF por encima del valor umbral de estos compuestos, mientras que las cepas del género *Hanseniaspora* fueron las únicas de las levaduras evaluadas capaces de producir 4-EG. En este trabajo verificamos que todas las especies nativas utilizadas en fermentación de mosto presentan el fenotipo POF+.

Las fermentaciones de la cepa M1 también se caracterizaron por presentar una alta concentración de 4-VG y 4-VF. En general, las levaduras utilizadas para la producción industrial de bebidas alcohólicas (excepto las aplicadas a la producción de vino y ciertos estilos de cerveza) perdieron la capacidad de producir fenoles volátiles debido a mutaciones sin sentido o de cambio de marco de lectura en los genes PAD1 y FDC1, como producto del proceso de domesticación (Gallone et al., 2016; Gonçalves et al., 2016; Krogerus et al., 2017). Pese a que la cepa M1 es una levadura domesticada, esta pertenece al grupo de cepas de “tipo M” (muy utilizadas para la producción de whisky) que se caracterizan por presentar el fenotipo POF+ (Russel & Stewar 2003). Esto se debe a que estas cepas son el resultado de la hibridación natural entre *S. cerevisiae* y *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, y su capacidad de producir fenoles podría estar asociada a la contribución del parental *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (Russell & Stewar, 2003; Watson, 1981).

Finalmente, se ha descrito que bacterias del género *Lactobacillus* y *Pediococcus* también presentan el fenotipo POF+ (Van Beek y Priest, 2000), por lo que también podrían aportar al perfil de fenoles detectado en este trabajo.

En conjunto los resultados obtenidos en este trabajo indican que todas las cepas evaluadas presentan el fenotipo POF+ y que existe variabilidad en la cantidad y tipo de compuestos fenólicos que son capaces de producir con respecto a la cepa comercial M1. Asimismo, hay que considerar que el perfil de fenoles de las fermentaciones incluye también el aporte de la actividad fermentativa de la flora natural del mosto de whisky.

3.1.5. Evaluación sensorial de las fermentaciones

La evaluación sensorial de las fermentaciones realizadas en MC y MF permitieron detectar diferencias importantes en el aporte de las distintas cepas a las fermentaciones, consistentes

con las cinéticas fermentativas y la ausencia / presencia de otros microorganismos. La evaluación en MC reveló que existen diferencias en los perfiles de aroma y sabor entre las cepas evaluadas. En el perfil correspondiente a sabor, el descriptor percibido en MC con mayor intensidad fue el dulzor (Figura 9). Las fermentaciones inoculadas con las cepas nativas se percibieron más dulces (3,0-4,6) que las inoculadas con la cepa M1 ($1,75 \pm 1,2$) y *S. eubayanus* A62 ($2,2 \pm 0,6$). Las fermentaciones de la cepa *S. eubayanus* CRUB 1568^T ($1,9 \pm 0,7$), ambas cepas de la especie *S. uvarum* (1,3-1,5) y *H. "simithiae"* CRUB 1583 ($1,5 \pm 0,83$) presentaron un perfil de sabor compatible con la presencia de ésteres pero con menor intensidad que en las fermentaciones de la cepa M1 ($2,2 \pm 1,5$); y las fermentaciones de ambas cepas de la especie *S. uvarum* CRUB 209 (1,2-2,5), y las tres cepas de *S. eubayanus* (1,2-2,2) presentaron una mayor presencia de fenoles en el perfil de sabor en comparación con las de la cepa M1 ($0,9 \pm 0,8$). En cuanto al perfil de aroma, las fermentaciones de ambas cepas de *S. uvarum* (2,0-2,1) y *S. eubayanus* A62 ($1,9 \pm 0,9$) presentaron un perfil de aroma compatible con la presencia de ésteres, pero en menor intensidad que en las fermentaciones de la cepa M1; y las fermentaciones de ambas cepas de la especie *S. uvarum* (2,8-2,9) y las tres cepas de *S. eubayanus* evaluadas (2,7-1,75) presentaron aromas fenólicos elevados en comparación a las fermentaciones de la cepa M1. Por último, se detectaron sulfuros en el perfil de aroma de las fermentaciones de *S. eubayanus* CRUB 1568^T.

La evaluación sensorial de las fermentaciones realizadas en MF se presenta en la Figura 10. El perfil de sabor fue muy similar entre las distintas muestras. El descriptor predominante fue la acidez, que varió entre $2,4 \pm 0,9$ y $4,4 \pm 0,8$ donde las fermentaciones inoculadas con la cepa M1 y con *S. eubayanus* CR10-11 fueron las que menor y mayor nivel de acidez presentaron respectivamente. No se percibieron diferencias marcadas en la presencia de ésteres (1,1-1,4) ni de fenoles (0,4-1,4) en el perfil de sabor entre las distintas fermentaciones. Por el contrario, si se percibieron diferencias en el perfil de aroma entre fermentaciones. En las fermentaciones inoculadas con la especie *S. uvarum* se percibieron mayores concentraciones de fenoles (2,4-3,0) que de ésteres (1,5-1,9), en las fermentaciones inoculadas con las cepas del género *Hanseniaspora* y *Lachancea* se detectó mayor presencia de ésteres (*Hanseniaspora* 2,5-2,7; *Lachancea* 2,3-2,5) que de aromas fenólicos (*Hanseniaspora* 0,9-1,1; *Lachancea* 0,6-0,8), mientras que en las fermentaciones inoculadas con *S. eubayanus* se observaron diferencias entre cepas siendo CR10-11 la que presentó mayores niveles de ésteres ($2,8 \pm 0,9$) y CRUB 1568^T la que presentó una mayor concentración de fenoles ($2,4 \pm 1,3$). La cepa M1 presentó un perfil con niveles intermedios de estos compuestos con respecto a las fermentaciones de las

cepas nativas. Por su parte, tanto en las fermentaciones con la cepa M1, como con *L. nothofagi*, fue percibida la presencia de sulfuros.

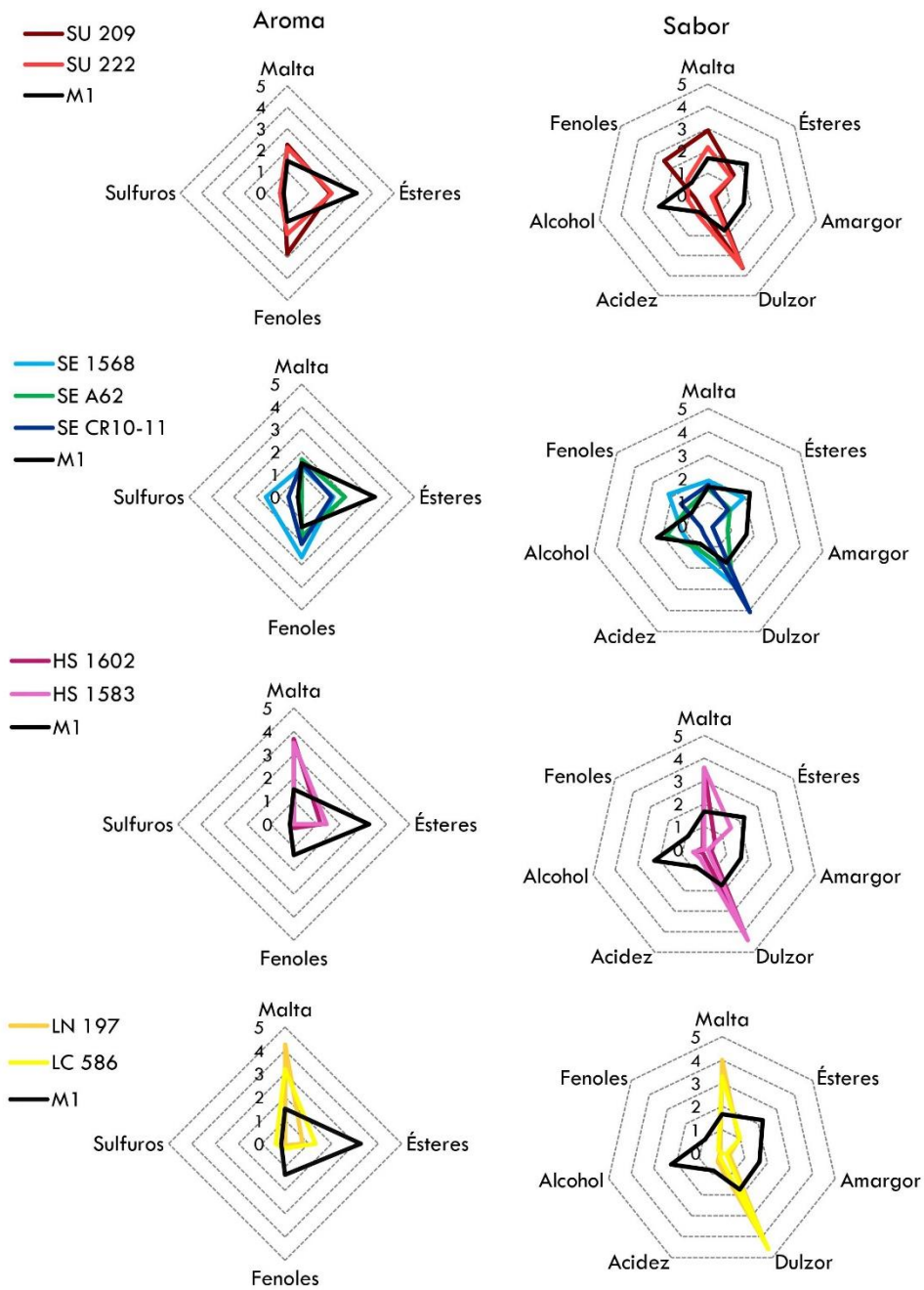


Figura 9: Gráfico de araña que muestra las medias de los descriptores de aroma (izquierda) y sabor (derecha) percibidos por el panel sensorial en las fermentaciones realizadas en MC.

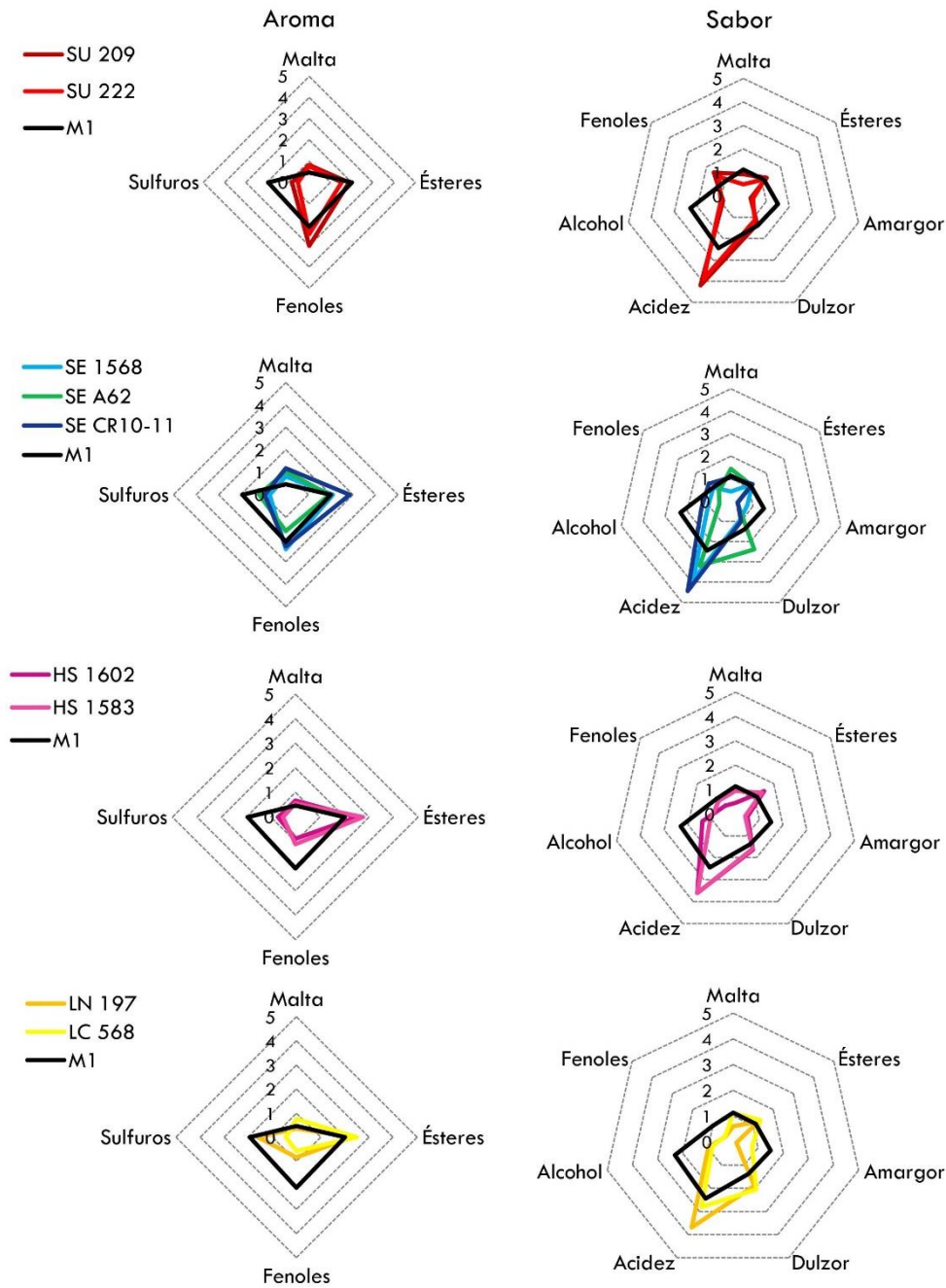


Figura 10: Gráfico de araña que muestra las medias de los descriptores de aroma (izquierda) y sabor (derecha) percibidos por el panel sensorial en las fermentaciones realizadas en MF.

Las diferencias de sabor observadas entre las fermentaciones en MC y MF son consistentes con la cinética de las fermentaciones y la atenuación observada. El dulzor percibido en las fermentaciones de las cepas nativas salvajes en MC es atribuido a la mayor concentración de azúcares remanentes en comparación a las fermentaciones de la cepa M1 y la cepa A62, que fueron percibidas menos dulces. Por el contrario, el alto nivel de acidez de las fermentaciones

realizadas en MF se atribuye a la actividad de las bacterias ácido lácticas e influyó negativamente en la detección de otros compuestos de sabor que sí fueron percibidos en las fermentaciones realizadas en MC.

El análisis sensorial del perfil de aroma permitió identificar mayor cantidad relativa de ésteres en las fermentaciones de las cepas del género *Lachancea* y *Hanseniaspora* en MF. Estos resultados son consistentes con lo observado por otros autores que evaluaron las características organolépticas de las fermentaciones de cepas de estos géneros. Basso et al., (2016) detectaron la producción de acetato de isoamilo (aroma a banana) y acetato de etilo (aroma frutal) en cepas de *Hanseniaspora uvarum*, Canonico et al. (2019) observaron que *L. thermotolerans* produce fermentaciones con altos contenidos de los ésteres acetato y butirato etilo (frutado, miel, dulce) en comparación con *S. cerevisiae* y Bellut et al., (2019) reportaron que *L. fermentati* produce ésteres en una concentración hasta 3 veces que levaduras cerveceras convencionales. Sin embargo, la ausencia de ésteres en las fermentaciones en MC podría indicar que estos compuestos derivan de la fermentación bacteriana. El aumento de ácido láctico y ácido acético durante la fermentación tardía favorece el desarrollo de notas frutales y florales debido a que estos ácidos orgánicos al reaccionar con el etanol producen lactato de etilo y acetato de etilo (Beek & Priest, 2000). El aporte de ésteres es considerado positivo para el perfil del whisky por lo que muchas destilerías aprovechan la flora natural presente en el mosto y practican fermentaciones largas (más de 55 h) dando lugar a que ocurra la fermentación láctica tardía (Beek & Priest, 2000). Debido a esto, no es posible atribuir únicamente a las levaduras la presencia de ésteres en las fermentaciones de las cepas del género *Hanseniaspora* y *Lachancea* en MF.

La percepción de ésteres en las fermentaciones de las cepas de la especie *S. uvarum* tanto en MC como en MF indica que fueron producidas por las levaduras, lo cual coincide con los resultados de González Flores (2019) y González Flores et al. (2017) en los que observaron una mayor producción de ésteres por parte de las cepas NPCC 1314 y NPCC 1420 en comparación a *S. cerevisiae*. Por otro lado, la alta presencia de fenoles percibida en las fermentaciones de *S. uvarum* no fue reportada anteriormente para fermentaciones en mostos de cebada, y los estudios en sidras fermentadas por esta especie presentaron valores por debajo del umbral de percepción de estos compuestos (en el orden de los ppb) (Gonzalez Flores et al. 2019). Por otro lado, las fermentaciones de *S. eubayanus* también presentaron tanto ésteres como fenoles, aunque con cierta variabilidad entre cepas. *S. eubayanus* se caracteriza por la producción de fenoles volátiles con aromas a clavo de olor, especiados y ahumados, y por

producir una concentración moderada de ésteres, como acetato de isoamilo y acetato de etilo, que aportan aromas a banana y pera (Krogerus et al., 2015; Mertens et al., 2015; Eizaguirre, 2019; Burini et al., en prep), esto es consistente con lo percibido por el panel sensorial. En MC, la cepa 1568^T de esta especie produjo fermentaciones con una alta cantidad de sulfuros. Krogerus et al. (2017) también observaron que, en mosto de cebada y de uva, esta especie produce compuestos azufrados (etanotiol, etil tioacetato). Los compuestos azufrados suelen ser indeseados en la producción de cerveza y vino porque aportan aromas desagradables (huevo podrido, goma quemada) y tienen un umbral de percepción bajo (Meilgaard, 1982, Russel & Stewar, 2003). En el whisky, los sulfuros reaccionan con el cobre de los alambiques durante la destilación limitando los niveles de estos compuestos en el destilado final (Russell & Stewar, 2003). Es por esto que la presencia de compuestos azufrados en las fermentaciones en concentraciones moderadas, no representan un problema en la producción de whisky.

Estos resultados indican que las cepas evaluadas aportan compuestos de aroma y sabor diferentes entre sí y con respecto a la cepa M1. Particularmente, las especies *S. eubayanus* y *S. uvarum* contribuyen al desarrollo de aromas y sabores característicos de los fenoles y ésteres. Sin embargo, la flora bacteriana presente en los mostos de whisky influencia notablemente el perfil sensorial de las fermentaciones, principalmente mediante el aporte de acidez y de aromas frutales. Si bien se observan diferencias en el perfil sensorial de aroma y sabor de las fermentaciones entre cepas y entre ambos tipos de mostos, y estas son consistentes con la cinética fermentativa y con los resultados presentados más adelante, es importante destacar que estas diferencias fueron analizadas de forma cualitativa. Los descriptores presentaron una variabilidad significativa de intensidad con la que fueron percibidos. Estas dispersiones son propias de los paneles de cata y se ven influidas por factores biológicos, factores emocionales, experiencias previas, etc. (Desira et al., 2020; Running & Hayes, 2016). Sin embargo, la evaluación sensorial es una herramienta cada vez más utilizada para evaluar la calidad y aceptabilidad del producto y su utilidad para la toma de decisiones es incuestionable.

3.2. Fermentaciones co-inoculadas con levaduras nativas y la cepa M1

3.2.1. Fermentaciones a escala laboratorio

A partir de los resultados obtenidos en la evaluación del desempeño fermentativo y organoléptico en las secciones anteriores, se seleccionaron las cepas *S. eubayanus* CR10-11 y *S. uvarum* CRUB 209 por presentar los mayores niveles de atenuación en tiempos cortos de

fermentación (luego de *S. eubayanus* A62¹) y aportar aromas y sabores agradables y distintivos en las fermentaciones de ambos mostos. Las cepas nativas fueron inoculadas individualmente al inicio permitiendo que dominaran la primera fase de fermentación (momento de mayor producción de metabolitos de aroma y sabor; White & Zainasheff, 2010) y hasta alcanzar la fase estacionaria descrita anteriormente. La cinética de las fermentaciones co-inoculadas en cada mosto se presenta en la Figura 11. La cinética de las fermentaciones co-inoculadas realizadas mostró que a las 48 h las cepas nativas alcanzaron la fase estacionaria de forma similar a lo observado en las fermentaciones individuales; luego de que se inocula la cepa M1, la actividad fermentativa aumenta. Finalizadas las 96 h de fermentación, las curvas de cinética de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas alcanzan una atenuación y producción de etanol menor a lo observado para las fermentaciones control (Figura 12). La atenuación final en MC fue de $80,9 \pm 3,7\%$ para *S. uvarum* CRUB 209 + M1 y de $82,4 \pm 1,5\%$ para *S. eubayanus* CR10-11 + M1, en relación a $91,2 \pm 0,7\%$ para la fermentación control M1 + M1 (aunque no resultan significativas, p-valor > 0,05). La producción de etanol de cada una de las fermentaciones se correlaciona con los niveles de atenuación observados, siendo $7,5 \pm 0,5\%$ v/v para *S. uvarum* CRUB 209 + M1, $7,6 \pm 0,3\%$ v/v para *S. eubayanus* CR10-11 + M1 y $8,3 \pm 0,8\%$ v/v para la fermentación inoculada ambas veces con la cepa comercial M1. Estos valores representan un rendimiento de etanol del 91,3% para las fermentaciones co-inoculadas con *S. uvarum* CRUB 209 y del 90,1% para las fermentaciones inoculadas con *S. eubayanus* CR10-11, con respecto a la fermentación control realizado con la cepa M1. La cinética fermentativa de las fermentaciones co-inoculadas realizadas en MF fueron similares a los obtenidos en MC. Sin embargo, en este medio se alcanzaron valores de atenuación mayores que en MC; siendo de $88,5 \pm 1,0\%$ para *S. uvarum* CRUB 209 + M1, $90,6 \pm 3,8\%$ para *S. eubayanus* CR10-11 + M1 y mayor a 100% para la fermentación control. La producción de etanol en MF resultó menor que en MC para las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas ($6,8 \pm 0,2\%$ v/v para *S. uvarum* CRUB 209 + M1 y $6,6 \pm 0,2\%$ v/v 0,3 para *S. eubayanus* CR10-11+ M1). En este medio el rendimiento de etanol de las fermentaciones inoculadas con *S. uvarum* CRUB 209 fue del 78,8% y las inoculadas con *S. eubayanus* CR10-11 fue del 76,1%,

¹ La cepa *S. eubayanus* A62 presentó menores tiempos de fermentación respecto de las demás cepas nativas, pero la complejidad del perfil organoléptico de las fermentaciones resultó inferior, por lo que no fue considerada para las fermentaciones co-inoculadas.

con respecto al control de la cepa M1. En ningún caso las diferencias fueron estadísticamente significativas (p -valor $> 0,05$).

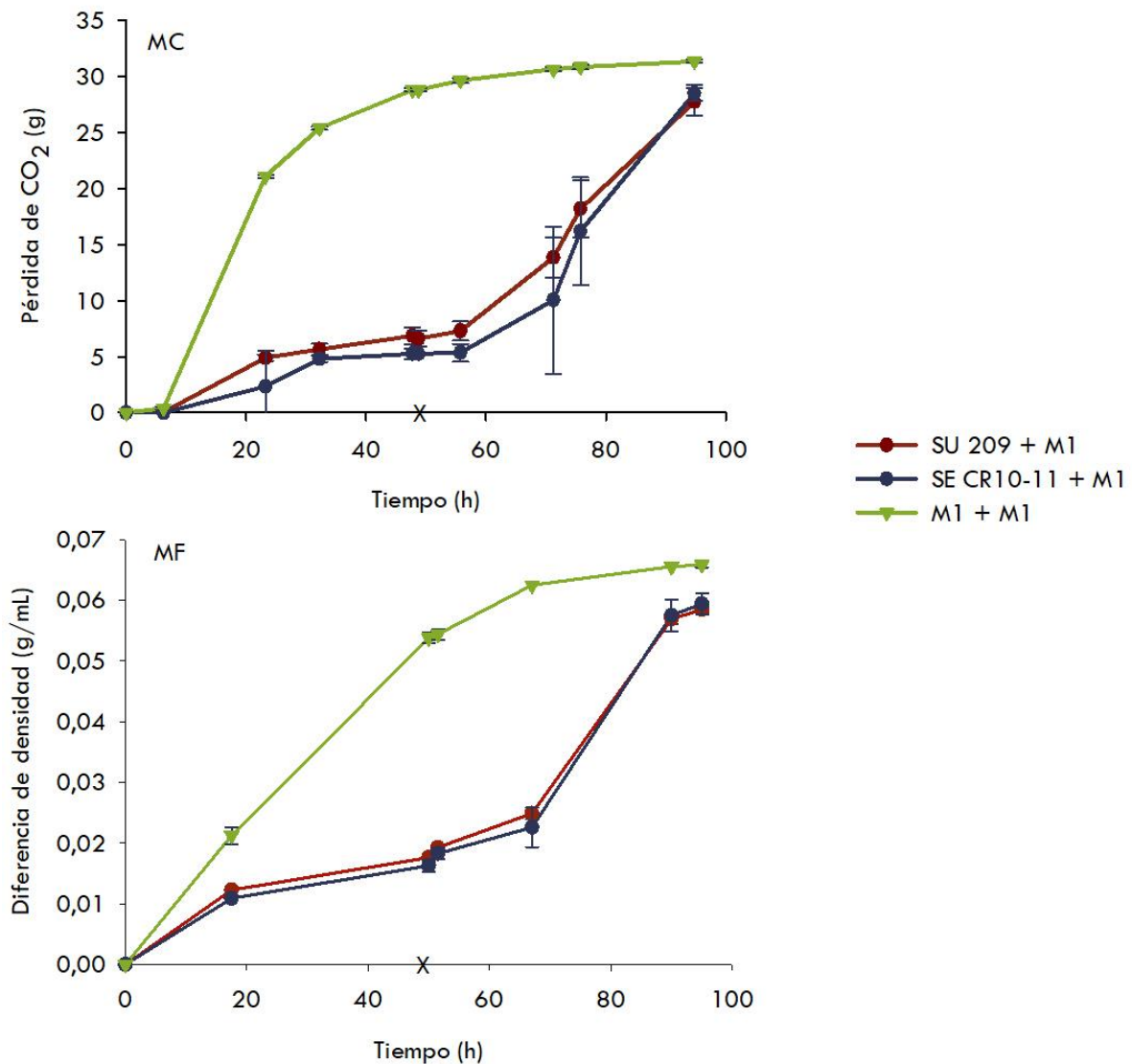


Figura 11: Cinética de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas y la cepa M1 realizadas en MC y en MF representada como la pérdida de CO₂ (g) en función del tiempo (h) y como la diferencia de densidad del mosto (g/mL) en función del tiempo (h), respectivamente. Se indica con una cruz en el eje horizontal el momento en el cual es inoculada la cepa M1.

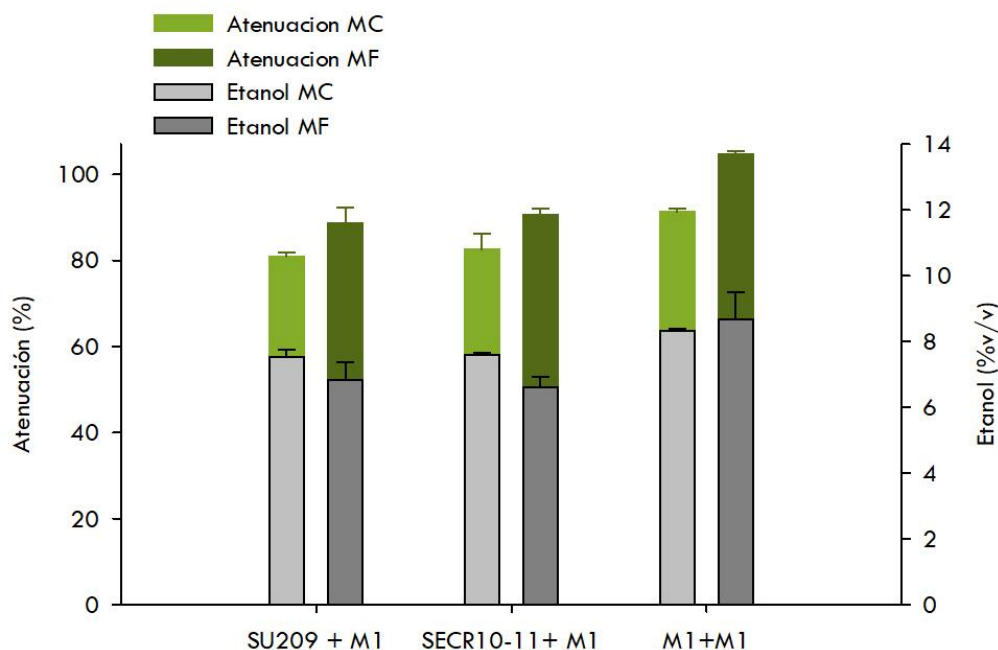


Figura 12: Porcentaje de atenuación y etanol producido luego de 96 h para fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas seleccionadas y para la fermentación control (M1 + M1) en MC y MF.

El menor rendimiento de etanol en las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas con respecto a la fermentación control observada en ambos tipos de mostos es atribuida a la interacción entre las levaduras inoculadas y al menor rendimiento de las cepas nativas en comparación a la cepa M1. Diversos estudios en los que se evaluó el desarrollo de fermentaciones mixtas indicaron que la aplicación de levaduras no convencionales disminuye el rendimiento de etanol. Contreras et al. (2015) observaron que la inoculación secuencial de la cepa *Metschnikowia pulcherrima* (AWRI1149) con *S. cerevisiae* reduce el contenido de etanol en vinos entre un 0,9% v/v y 1,6% v/v en relación a fermentaciones llevadas a cabo únicamente con *S. cerevisiae*. García et al. (2020), también estudiaron el uso de inóculos secuenciales en vino con las especies *Wickerhamomyces anomalus*, *Meyerozyma guilliermondii* y *M. pulcherrima* en combinación con *S. cerevisiae*, y las fermentaciones presentaron un 0,8- 1,3% v/v menos de etanol que la fermentación control (*S. cerevisiae*), a pesar incluso de presentar bajas concentraciones de azúcares residuales. La mayoría de las levaduras no convencionales presentan un menor rendimiento de etanol en comparación a cepas de *S. cerevisiae* debido a que no se encuentran adaptadas a los medios de fermentación y no fueron seleccionadas para maximizar la producción de etanol. Por lo tanto, los azúcares son metabolizados a través de diferentes vías como la respiración o el metabolismo glicerol-

piruvato (Canónico et al., 2016; Ciani & Comitini, 2019) y son utilizados en la producción de compuestos diferentes al etanol como glicerol, ácido pirúvico, o para la síntesis de biomasa (Canónico et al., 2016). Por otro lado, el agotamiento de fuentes de nitrógeno y vitaminas también influye en el rendimiento de etanol al impactar negativamente en el crecimiento de *S. cerevisiae* (Bisson, 1999; Fleet, 1998). Taillandier et al. (2014) reportaron una menor velocidad fermentativa en fermentaciones secuenciales de *T. delbrueckii* con *S. cerevisiae* debido al agotamiento del nitrógeno por *T. delbrueckii*. Por último, fueron descritas una gran variedad de interacciones entre levaduras que modifican/limitan la actividad fermentativa (Albergaria et al., 2010; Branco et al., 2014; Fleet, 2003). Por lo tanto, la menor concentración de azúcares disponibles en el mosto al momento de la inoculación con la cepa M1, la transformación ineficiente de azúcares a etanol por parte de las cepas nativas y las posibles interacciones antagónicas entre cepas explican la diferencia de etanol observada entre las fermentaciones mixtas y la fermentación inoculada únicamente con la cepa M1.

Por otra parte, las diferencias en la relación atenuación-producción de etanol entre los mostos utilizados, puede ser explicada por la proliferación diferencial de bacterias entre ambos sistemas de fermentación. Thomas et al. (2001) observaron que, cuando las bacterias (*Lactobacillus fermentarum*) son inoculadas 24 h previas a la levadura (*S. cerevisiae*), las concentraciones de ácido láctico aumentan rápidamente y llegan a concentraciones mayores en comparación con fermentaciones en las cuales bacterias y levaduras fueron co-inoculadas en forma conjunta, provocando un crecimiento disminuido y una viabilidad celular baja en las levaduras. En el sistema de co-inóculo utilizado en este trabajo, la adición de la cepa M1 se realizó luego de 48 h del inicio de la fermentación. Las levaduras nativas utilizadas en este trabajo poseen cinéticas de crecimiento y consumos de azúcares fermentables considerablemente menores a los de la cepa M1. Por estos motivos la proliferación de la flora natural del MF pudo haberse desarrollado por encima de los valores normales para una fermentación de whisky afectando el rendimiento de fermentación de la cepa M1. El pH final de las fermentaciones co-inoculadas en MF, que fue notablemente menor (3,4) que el pH de las fermentaciones control (4,7) y que las fermentaciones realizadas en MC (4,3 para las co-inoculadas y 4,5 para las realizadas con la cepa M1), es evidencia que sustenta esta hipótesis. Por su parte, la alta atenuación observada en MF, pero con baja concentración de etanol final, sugieren que los azúcares son consumidos parcialmente por la flora bacteriana afectando el desempeño de la cepa M1. Futuros trabajos deberán abordar las cinéticas de cada grupo microbiano con el objetivo de optimizar las condiciones de fermentación.

Todos estos resultados revelaron que la aplicación de inóculos secuenciales de *S. uvarum* CRUB 209 y *S. eubayanus* CR10-11 resulta en fermentaciones con altos valores de atenuación, pero con una pérdida en el rendimiento de etanol de un 9-10% para las fermentaciones en MC y de 21-24% para fermentaciones en MF en comparación de la fermentación control, cuando la cepa M1 es inoculada 48 h después que las cepas nativas. La caída en el rendimiento de etanol es perjudicial para la elaboración de whisky, por lo que futuros trabajos deberán orientarse a acortar el tiempo de fermentación de las cepas nativas de modo de afectar en menor medida este rendimiento.

3.2.2. Perfil de consumo de azúcares de las fermentaciones co-inoculadas con levaduras nativas y la cepa M1

En las fermentaciones inoculadas con la cepa M1 realizadas en MC el consumo de glucosa fue del 100%, el consumo de maltosa de $99,6 \pm 0,1\%$ y el de maltotriosa de $94,7 \pm 0,3\%$ (Figura 13). En el caso de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas el consumo de azúcares fue similar entre sí (96,1% de glucosa, 94,9-95,7% de maltosa y 39,1-44,1% de maltotriosa), y levemente mayor al de la fermentación control; sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas (p -valor $> 0,05$). En las fermentaciones de la cepa M1 realizadas en MF el consumo de glucosa fue de 100%, el de maltosa $97 \pm 0,2\%$ y el de maltotriosa $84 \pm 1,7\%$. En MF las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas también presentaron un consumo de azúcares similar entre sí y menor al de la cepa M1. El consumo de glucosa fue 87,3-100%, de maltosa 96,1-96,5% y de maltotriosa 45,0-46,4%.

La disminución relativa del área del primer pico en el perfil de azúcares por HPLC (y que corresponde a las dextrinas) reveló que las fermentaciones realizadas en MF (55,4-62,2%) presentaron un consumo mayor que las realizadas en MC (0-14,3%) (Figura 14), sin embargo, estas diferencias no fueron significativas (P -valor $> 0,05$).

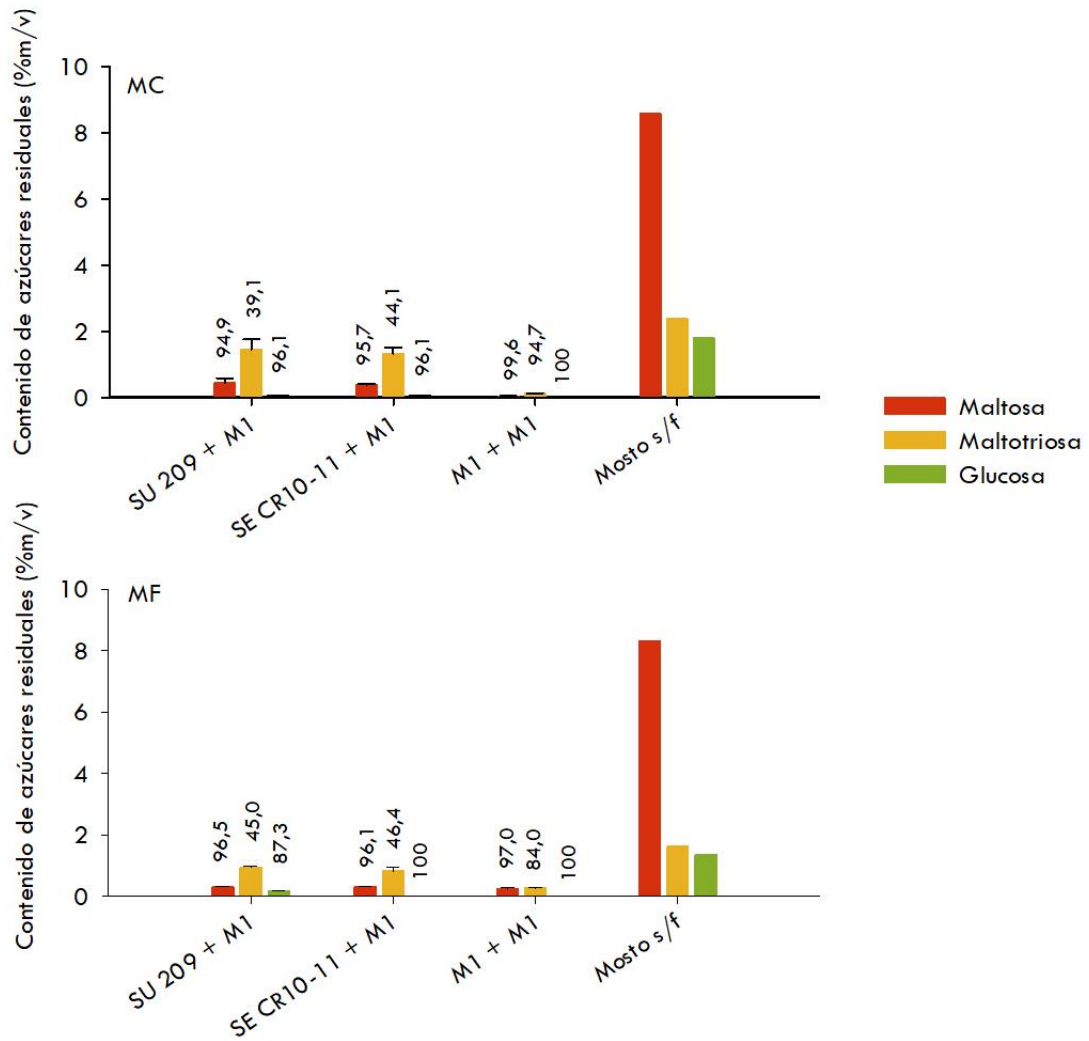


Figura 13: Cuantificación de azúcares residuales de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas, la fermentación control y el mosto sin fermentar, realizadas en MC y MF. Los números en las barras indican el porcentaje de consumo de cada azúcar.

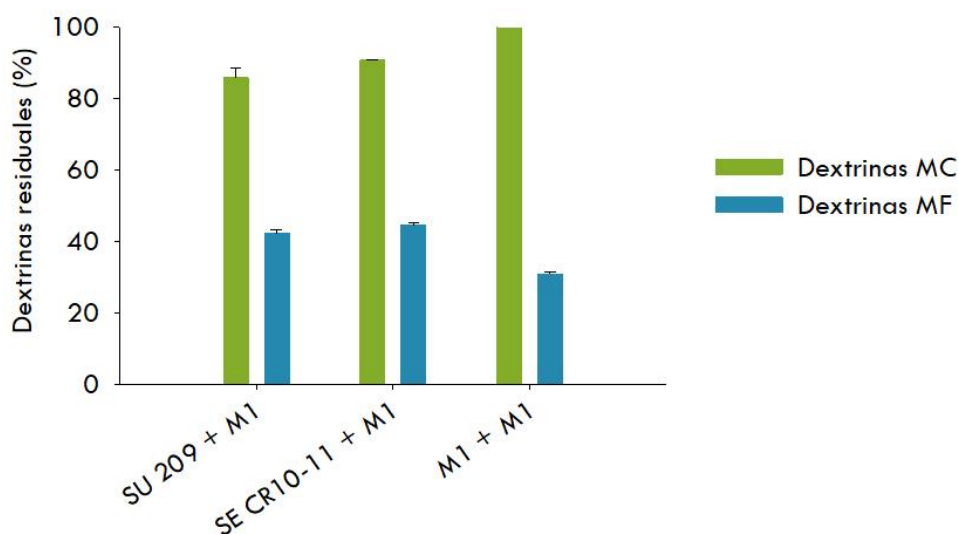


Figura 14: Porcentaje de dextrinas residuales (HPLC) de las fermentaciones en MC y MF para las fermentaciones co-inoculadas con cepas nativas y la cepa de referencia (M1) y la fermentación control.

El perfil de consumo de azúcares fermentables resultó similar entre ambos mostos (Figura 11). La pequeña variación de azúcares remanentes observada en las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas entre ambos mostos, es atribuida al consumo de azúcares fermentables por parte de las bacterias en MF. Por otro lado, las diferencias en el consumo de azúcares fermentables entre las fermentaciones co-inoculadas y las fermentaciones control en ambos mostos, son consistentes con las hipótesis planteadas en la sección anterior. La menor concentración de azúcares disponibles en el mosto al momento de la inoculación con la cepa M1 y/o las posibles interacciones antagónicas entre cepas explican las diferencias del perfil de azúcares entre las fermentaciones co-inoculadas y la fermentación inoculada únicamente con la cepa M1 como fue discutido anteriormente (ver sección 3.2.1.).

En las fermentaciones realizadas en MF se observó una mayor disminución en el área relativa del primer pico correspondiente a las dextrinas (HPLC), que en MC. Como se discutió en la sección 3.1.2, la degradación de dextrinas está asociada a la degradación por parte de las amilasas de la malta y la fermentación bacteriana (Park et al., 2014; Vriesekoop et al., 2010). La disponibilización de azúcares fermentables debido a la degradación de dextrinas y la eficiencia fermentativa de la cepa M1 explica que las fermentaciones inoculadas con la cepa M1 en MF presente el mayor rendimiento de etanol (Kongkiattikajorn y Sornvoraweat 2011).

Todos estos resultados indican que la co-inoculación de la cepa M1 luego de 48 h de fermentación con las cepas nativas reduce la concentración de azúcares remanentes en las fermentaciones; sin embargo, las fermentaciones control consumen de forma más eficiente los azúcares del mosto. Por otro lado, las dextrinas en MF fueron degradadas en un 55-62% indicando que las bacterias presentes en el mosto degradan a estos azúcares colaborando en la fermentación de este sistema de forma similar a lo observado en fermentaciones simples.

3.2.3. Evaluación sensorial de las fermentaciones co-inoculadas con levaduras nativas y la cepa M1

La evaluación sensorial permitió detectar diferencias en el perfil organoléptico de las fermentaciones evaluadas (Figura 15). En las fermentaciones realizadas en MC, las cepas nativas contribuyeron principalmente al desarrollo de aromas y sabores frutados característicos de los ésteres y considerados agradables por los integrantes del panel sensorial. En una escala de 1 a 5, la presencia de ésteres en el perfil de aroma de las fermentaciones de *S. eubayanus* CR10-11 + M1 fue de $3,6 \pm 0,9$ y en el perfil de sabor fue de $2,4 \pm 1$, mientras que la presencia de fenoles fue de $1,46 \pm 1,2$ en el perfil de aroma y de $1,37 \pm 0,9$ en el perfil de sabor. Fueron descritas con sabor a banana y caramelo, y se destacó la presencia de alcoholes superiores percibidos como calentamiento en boca. Las fermentaciones de *S. uvarum* CRUB 209 + M1 fueron consideradas equilibradas con respecto al balance entre fenoles y ésteres, con aroma agradable y fenoles suaves ($1,0 \pm 1,3$). En estas fermentaciones los ésteres se percibieron en una alta concentración en el perfil de aroma ($3,0 \pm 1,0$) y en una concentración moderada en el de sabor ($1,3 \pm 1,0$). Por el contrario, las fermentaciones con la cepa comercial se caracterizaron por presentar un amargor considerado desagradable y fenoles y ésteres moderados tanto en aroma como en sabor.

La evaluación sensorial de las fermentaciones en MF reveló que el perfil organoléptico difiere del observado en MC, tanto en aroma como en sabor. Las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas se percibieron con una acidez alta (4,0-4,2) en comparación con las fermentaciones control ($1,8 \pm 1,3$). En cuanto al aroma, en las fermentaciones co-inoculadas con *S. uvarum* CRUB 209 y la fermentación control predominaron los aromas frutados (manzana y banana) característicos de los ésteres ($2,9 \pm 1,1$ y $2,7 \pm 1,3$, respectivamente). A diferencia del perfil de las fermentaciones realizadas en MC, las fermentaciones co-inoculadas con *S. eubayanus* presentaron una baja presencia de ésteres ($1,1 \pm 1,0$) en el perfil de aroma y no fueron percibidos alcoholes superiores.

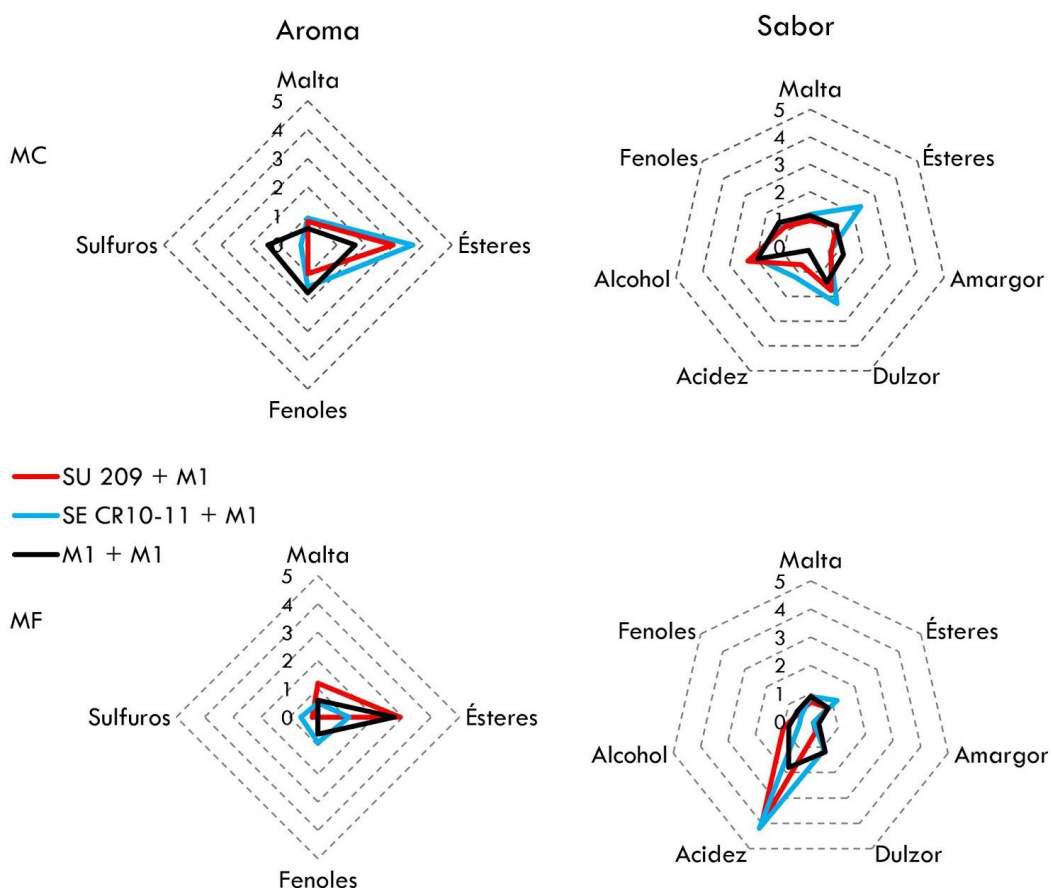


Figura 15: Gráfico de araña que presenta las medias de los descriptores de aroma (izquierda) y sabor (derecha) percibidos en las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas y la cepa comercial M1 en MC y MF.

El perfil de sabor de las fermentaciones difiere entre mostos de forma consistente con la hipótesis planteada en la sección 3.2.1. La acidez percibida en las fermentaciones co-inoculadas realizadas en MF es consistente con la actividad bacteriana debido a que la baja actividad fermentativa de las cepas nativas pudo permitir el desarrollo de microorganismos durante las primeras 48h, aportando mayor acidez y complejidad al perfil sensorial. En las fermentaciones realizadas en MC el dulzor percibido se corresponde con los azúcares residuales observados en la sección anterior. Las fermentaciones co-inoculadas fueron percibidas levemente más dulces que la fermentación de la cepa M1. La cepa *S. eubayanus* CR10-11 aportó una mayor presencia de ésteres al perfil de sabor de las fermentaciones de ambos mostos en comparación de la cepa M1 inoculada de forma individual; sin embargo, la presencia de ésteres y alcoholes superiores sólo fueron percibidos en el perfil de aroma de las fermentaciones realizadas en MC. Martens et al (2015) y Burini et al (en preparación) estudiaron la producción de compuestos de aroma

y sabor en *S. eubayanus* y reportaron que la producción de ésteres y alcoholes superiores es una característica común de la especie. Por otro lado, *S. uvarum* CRUB 209 aportó una alta concentración de aromas frutados al perfil de aroma de las fermentaciones en ambos mostos. Gonzalez-Flores et al. (2017 y 2019) encontraron resultados similares, las fermentaciones de esta especie presentaron altas concentraciones de ésteres como acetato de 2-feniletilo, acetato de isobutilo, octanoato de etilo y decanoato de etilo. Estos ésteres se han relacionado con el aporte de notas frutadas y florales a las fermentaciones: el acetato de isobutilo se asocia con el sabor afrutado, el octanoato de etilo con notas de manzana, el decanoato de etilo con notas de pera y el acetato de 2-feniletilo con sabor floral (Huang et al., 2001; Lambrechts & Pretorius, 2000).

La aplicación de las cepas no convencionales junto a la cepa M1 resultó en fermentaciones con un perfil de aroma y sabor diferencial respecto de la fermentación inoculada únicamente con M1. *S. eubayanus* CR10-11 aportó principalmente ésteres frutales y alcoholes superiores en el perfil organoléptico de las fermentaciones en MC, pero estos compuestos no fueron percibidos con tanta intensidad en las fermentaciones realizadas en MF. *S. uvarum* CRUB 209 aportó aromas frutales en el perfil de aroma en las fermentaciones realizadas tanto en MC como en MF. La acidez percibida en las fermentaciones co-inoculadas en MF es consistente con la actividad bacteriana de la flora en el mosto. A fin de evaluar si las diferencias en el perfil organoléptico de las fermentaciones son transferidas al destilado final, se realizó una primera destilación de las fermentaciones en MF.

3.3. Destilado de las fermentaciones co-inoculadas con levaduras nativas y la cepa M1

Las fermentaciones realizadas en MF y destiladas en un alambique de cobre permitieron obtener un primer destilado con una concentración final de alcohol de $23,3 \pm 0,5\%$ v/v para el destilado de *S. uvarum* CRUB 209 + M1, $21,3 \pm 1,3\%$ v/v para el destilado de *S. eubayanus* CR10-11 + M1 y $20,4 \pm 0,05\%$ v/v para el destilado de M1+M1. La cinética de caída en la concentración de etanol, el aumento de la temperatura del sistema, y la concentración de fenoles para cada una de fracciones caracterizadas se presenta en la Figura 16. Las curvas de temperatura son similares en los tres casos, iniciando con una temperatura de ebullición de 90-91°C y de 97°C entre los 30-35 minutos de iniciada la destilación. La destilación de las fermentaciones control realizadas con la cepa M1 dio lugar a una concentración de etanol de $59,5 \pm 1,5\%$ v/v para la primera fracción colectada, mientras que en las fermentaciones co-inoculadas con *S. uvarum* CRUB 209 y *S. eubayanus* CR10-11 la concentración de etanol para la primera fracción fue $45,0 \pm 4,2\%$ v/v y $46,6 \pm 7,6\%$ v/v, respectivamente. Asimismo, las

curvas de etanol difieren entre sí de forma consistente con el rendimiento de alcohol alcanzado en cada una de las fermentaciones.

3.3.1. Perfil de fenoles volátiles de los destilados

La cuantificación de fenoles volátiles en las fracciones evaluadas reveló que su concentración varía entre muestras y a lo largo de la destilación (Figura 16). El perfil fue similar entre los destilados de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas, pero diferente al obtenido en la destilación control. En el destilado de *S. uvarum* CRUB 209 + M1 y de *S. eubayanus* CR10-11 + M1 predominaron el 4-VG y 4-EF. El primero alcanza su concentración máxima en la fracción 3 del destilado, mientras que el segundo la alcanzó al inicio de la destilación (fracción 1), y decrece en el tiempo. En menor cantidad fueron detectados 4-EG y 4-VF en la fracción 3 y 5. Por su parte, en la destilación control el 4-EF se encontró únicamente al inicio del destilado, se detectó una mayor concentración de 4-VF en la fracción 3 y 5 en comparación a las destilaciones de las fermentaciones co-inoculadas y no se evidenció presencia de 4-EG. Estas diferencias se ven reflejadas en el perfil de fenoles volátiles del primer destilado (Figura 17), donde se observa que hay una mayor diversidad de fenoles en las destilaciones de las fermentaciones co-inoculadas que en la destilación control.

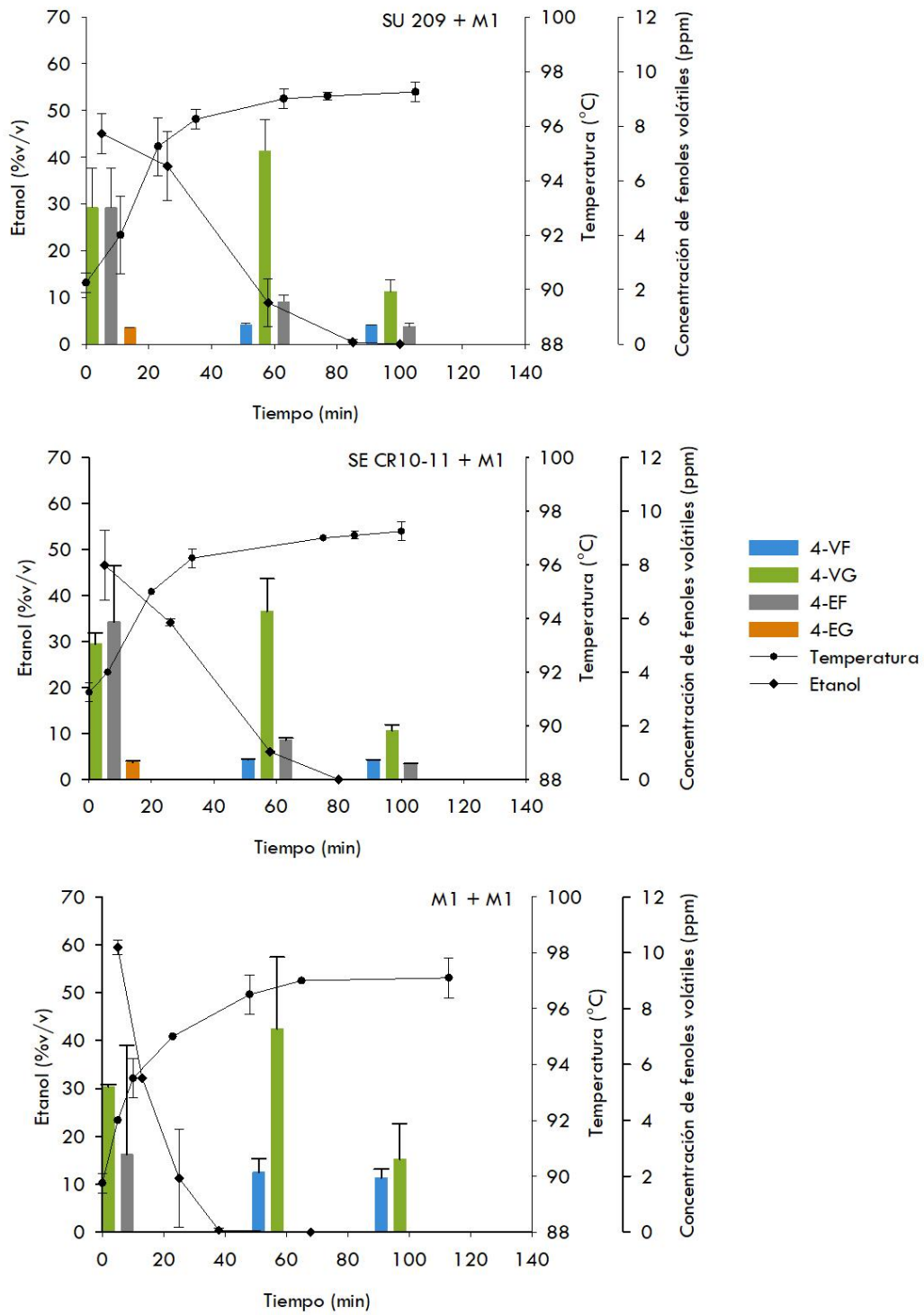


Figura 16: Curvas de destilación que representan la variación de concentración de etanol del destilado y la temperatura de ebullición del sistema a lo largo del tiempo. Las barras representan el perfil de fenoles presentes en la fracción 1, 3 y 5 del destilado.

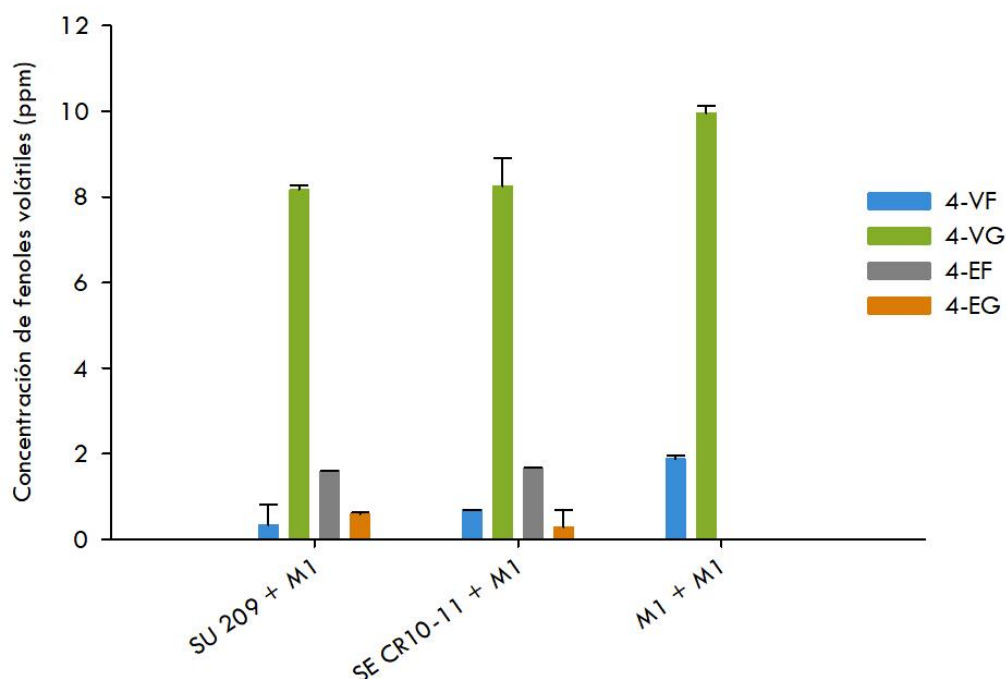


Figura 17: Fenoles volátiles presentes en el primer destilado de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas y de la fermentación control.

La presencia de 4-VF y 4-VG en el destilado son consistentes con lo observado en el perfil de fenoles de las fermentaciones individuales (Figura 8), sin embargo, los compuestos 4-EF presentes en los tres destilados y el 4-EG presente en los destilados de las fermentaciones co-inoculadas no fueron detectados en las fermentaciones individuales de estas cepas. La detección de estos fenoles en las fracciones se debe a que los compuestos volátiles presentes en las fermentaciones son concentrados durante el proceso de destilación. González-Flores et al. (2019) detectaron presencia de 4-EF y 4-EG en fermentaciones de *S. uvarum*, aunque en valores del orden de los ppb, que no pueden ser detectados por los métodos usados en este trabajo (del orden de los ppm). Esto indica que el 4-EF y 4-EG estaban presentes en las fermentaciones en concentraciones no detectables por los métodos de cuantificación utilizados (HPLC) y que fueron concentrados durante la destilación permitiendo su detección.

La variación de compuestos fenólicos presentes en distintas fracciones indica que presentan diferente volatilidad y que el momento en el cual es colectado el destilado determina la composición y la cantidad relativa de compuestos que estarán presentes. La temperatura a la cual destilan los distintos compuestos presentes en las fermentaciones depende de su volatilidad (Ikari & Kubo, 1975), por lo que los compuestos de bajo peso molecular que se

volatilizan al inicio de la destilación no formarán parte del destilado final (ésteres y fenoles de bajo peso molecular). Lo mismo sucede con los compuestos de alto peso molecular y baja volatilidad, como los alcoholes superiores, que se vaporizan a temperaturas mayores que el etanol, y por lo tanto no serán incluidos en el destilado final (Russel & Stewart, 2003). La eliminación diferencial de compuestos se observó de forma evidente en el destilado control en el cual el descarte de la fracción 1 resultó en la ausencia de 4-EF en el perfil del primer destilado.

El proceso de destilación utilizado en la elaboración del whisky aumenta la concentración relativa y modifica el perfil de fenoles del destilado respecto de la fermentación de origen. El aumento de la concentración de compuestos volátiles durante la destilación permitió cuantificar etilfenoles en los destilados que no habían sido detectados en las fermentaciones. Sin embargo, su pronta aparición en la destilación sugiere que no formarían parte del producto final. La presencia de estos fenoles podría ser deseable para la elaboración del whisky y su presencia aportada por levaduras nativas le conferiría una característica diferencial. Por estos motivos comprender los rangos de temperatura en los cuales se destilan los distintos fenoles volátiles es un factor importante a tener en cuenta al momento de colectar la fracción de destilado que se transformará en whisky.

3.3.2. Evaluación sensorial de los destilados

Sensorialmente se percibieron diferencias en el perfil de los destilados (Figura 18). Con respecto al aroma, en los destilados de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas fueron percibidos mayores niveles de ésteres (1,2) que en las destilaciones control ($0,8 \pm 0,7$). Sin embargo, la presencia de aromas fenólicos fue percibida con mayor intensidad en la destilación control ($0,6 \pm 0,4$) y en la destilación de la fermentación co-inoculada con *S. eubayanus* CR10-11 ($1,2 \pm 1,1$). En cuanto al perfil de sabor, las destilaciones de las fermentaciones co-inoculadas se percibieron más dulces (1,1-1,6) y con una mayor presencia de ésteres (0,8-0,7), mientras que la destilación control presentó una mayor presencia de fenoles ($1,0 \pm 0,9$). En la evaluación de preferencia, los destilados de las fermentaciones co-inoculadas fueron elegidos por sobre el destilado control por presentar una mayor complejidad en el perfil de sabor y aroma.

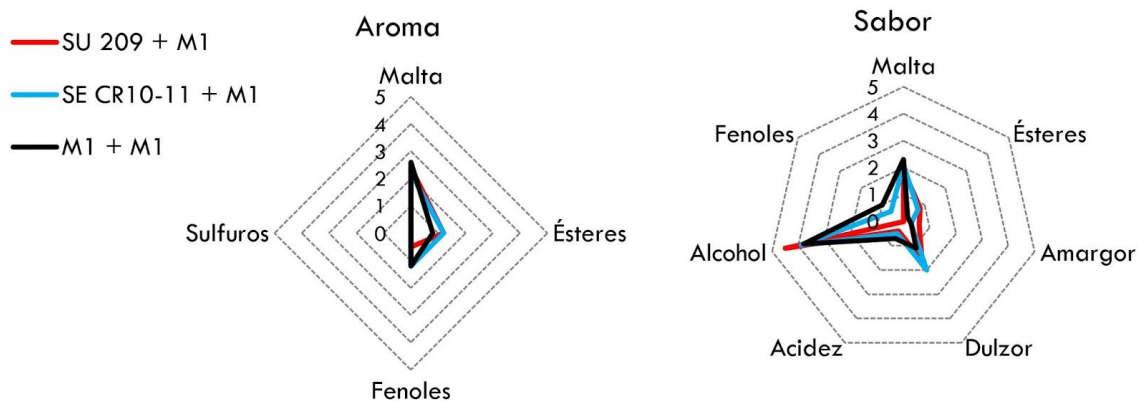


Figura 18: Gráfico de araña que presenta las medias de los descriptores de aroma y sabor percibidos en el destilado de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas y la cepa comercial M1.

La principal diferencia entre los destilados es la mayor presencia de ésteres tanto en el perfil de aroma, como en el perfil de sabor en las destilaciones de las fermentaciones co-inoculadas con respecto al control. La mayor concentración y complejidad de ésteres que pueden aportar las levaduras no convencionales a las fermentaciones se describe en distintos trabajos (Basso et al. 2016; Canonico 2019), y fue observada en las fermentaciones de las levaduras nativas evaluadas en este trabajo (Figuras 9, 10 y 15). Se ha demostrado que la volatilidad de los ésteres coincide con el perfil de destilación del etanol tanto en los sistemas experimentales como en los modelos, lo que aumenta la transferencia de estos compuestos al destilado (Ikari & Kubo, 1975). Los ésteres tienen un gran impacto en el perfil de las bebidas destiladas (aromas frutales y florales) debido a su baja volatilidad y a los bajos umbrales de percepción (Buxton & Hughes, 2020; Christoph & Bauer-Christoph, 2007). Esto es consistente con los resultados de este ensayo en los que una mayor presencia de ésteres en los destilados se corresponde con una mayor producción de ésteres por parte de *S. eubayanus* y *S. uvarum* durante la fermentación. La actividad de las bacterias ácido lácticas también influye en el aporte de aromas y sabores. Durante la destilación, el ácido láctico reacciona con el etanol produciendo lactato de etilo por lo que los destilados de fermentaciones largas (mayores a 55 h) o aquellos donde la proliferación de bacterias ácido lácticas resulta mayor, como es el caso de las fermentaciones co-inoculadas con levaduras nativas, tienden a tener concentraciones de ésteres más altas (Geddes & Riffkin, 1989). Finalmente, a pesar de que la cuantificación de fenoles volátiles mostró una concentración alta y variable entre las destilaciones, esto no fue percibido en la

evaluación sensorial. Las altas concentraciones de etanol tienen un gran impacto en el perfil sensorial y en los umbrales de percepción de los compuestos (Ickes & Cadwallader, 2017) por lo que los fenoles volátiles se perciben con menor intensidad en los destilados.

La aplicación de levaduras no convencionales en las fermentaciones resultó en un producto de destilación con características sensoriales diferenciales al destilado de las fermentaciones inoculadas únicamente con la cepa M1. Los destilados de las fermentaciones co-inoculadas tanto con *S. uvarum* CRUB 209, como con *S. eubayanus* CR10-11 fueron percibidas con una mayor presencia de ésteres y con un perfil organoléptico más complejo que aquellas inoculadas únicamente con la cepa comercial. Los resultados obtenidos indican que la aplicación de levaduras no convencionales junto a la cepa M1 podrían ser utilizadas para la producción de whisky con características sensoriales distintivas.

3.4. Consideraciones finales

Durante la destilación del whisky se extraen y concentran etanol y compuestos volátiles producidos durante la fermentación, pero también ocurre la transformación de compuestos de sabor activos (Geddes & Riffkin, 1989; Russell & Stewart, 2003). El interés por lograr bebidas con un perfil sensorial mejorado y novedoso sin el agregado de productos químicos sintéticos es cada vez mayor y, en este contexto, surge el concepto de biosaborización (o *bioflavoring*), donde las levaduras no convencionales juegan un rol fundamental debido a la diversidad natural de metabolismos y, por lo tanto, de subproductos de fermentación que pueden aportar. Si bien la aplicación de levaduras no convencionales en la producción de bebidas alcohólicas como la cerveza, el vino y la sidra está siendo muy estudiada, no lo es aún para su aplicación en la producción de whisky. Este trabajo representa la primera aproximación para la obtención de whiskys con características sensoriales distintivas realizados con levaduras no convencionales aisladas de ambientes naturales de la Patagonia. La obtención de una primera destilación del mosto fermentado (*low wine*) con una concentración aproximada de 22% v/v de etanol colectando la totalidad del destilado (a excepción de los primeros 50 mL), permitió demostrar no solo la factibilidad del sistema, sino la posibilidad de obtener un producto con características organolépticas destacadas por el panel de cata en el ensayo de preferencia.

En la producción artesanal o industrial de whisky el primer destilado es sometido a una segunda destilación en la cual se colecta únicamente la fracción media (corazón). Tanto la cabeza como la cola contienen compuestos que afectan negativamente el sabor y aroma del destilado por lo que son separados del corazón y mezclados con el siguiente *low wine* a destilar. Es necesario, por lo tanto, continuar los estudios para comprender cómo los compuestos específicos que aportan estas levaduras se transfieren y/o transforman durante el proceso de destilación. La elección del punto en el cual se colecta el corazón es un factor que determina el perfil organoléptico del producto final. En este trabajo encontramos que los distintos fenoles se encuentran presentes en distintas variedades y concentraciones durante el proceso de destilación, por lo tanto, para comprender con más precisión el perfil del whisky obtenido a partir de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas es necesario obtener un segundo destilado de las mismas. Sin embargo, estos resultados demuestran que la aplicación de *S. uvarum* CRUB 209 y *S. eubayanus* CR10-11 aportan características diferentes a las obtenidas en fermentaciones realizadas con las levaduras comerciales, y que estas diferencias son transferidas y percibidas en una primera destilación.

4. Conclusiones

- Este trabajo representa el primer estudio de la dinámica fermentativa de levaduras no convencionales aisladas de ambientes naturales de la Patagonia para la elaboración de whisky.
- Las levaduras no convencionales evaluadas consumen de forma incompleta los principales azúcares del mosto en comparación con la levadura comercial M1.
- Este trabajo representa la primera caracterización de la cinética fermentativa en mostos de cebada para cepas de la especie *S. uvarum*.
- Las levaduras no convencionales utilizadas aportaron a las fermentaciones un perfil organoléptico diferente al de la levadura comercial M1, con mayor presencia de ésteres y fenoles.
- La co-inoculación entre levaduras no convencionales y la cepa comercial M1, y su interacción con la flora microbiana presente en los mostos de fábrica, modifica positivamente el perfil organoléptico, pero afecta negativamente el contenido final de etanol.

- Los distintos fenoles presentes en las fermentaciones destilan a diferentes temperaturas de ebullición, por lo que el punto de corte elegido para la colecta del destilado determina los compuestos que son trasladados al producto final.
- Los destilados producidos a partir de las fermentaciones co-inoculadas con las cepas nativas y la levadura comercial M1 presentan una mayor complejidad en el perfil de sabor y aroma, y son preferidos por sobre el producto de destilación de las fermentaciones con la cepa comercial M1.
- La aplicación de levaduras no convencionales, junto a levaduras comerciales en la producción de whisky, aporta características organolépticas diferenciales tanto a las fermentaciones como al producto de destilación de las mismas.

5. Referencias

- Albergaria, H., Francisco, D., Gori, K., Arneborg, N., & Gírio, F. (2010). *Saccharomyces cerevisiae* CCM1 885 secretes peptides that inhibit the growth of some non-*Saccharomyces* wine-related strains. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 86(3), 965-972. <https://doi.org/10.1007/s00253-009-2409-6>
- Albertin, W., & Marullo, P. (2012). Polyploidy in fungi: evolution after whole-genome duplication. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 279(1738), 2497-2509
- Almeida, P., Gonçalves, C., Teixeira, S., Libkind, D., Bontrager, M., Masneuf-Pomarède, I., Albertin, W., Durrrens, P., Sherman, D. J., Marullo, P., Todd Hittinger, C., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P. (2014). A Gondwanan imprint on global diversity and domestication of wine and cider yeast *Saccharomyces uvarum*. *Nature Communications*, 5(1), 4044. <https://doi.org/10.1038/ncomms5044>
- Antoni, D., Zverlov, V. V., & Schwarz, W. H. (2007). Biofuels from microbes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 77(1), 23-35. <https://doi.org/10.1007/s00253-007-1163-x>
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., & Portugal, C. B. (2016). Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International*, 86, 112-120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>
- Beek, S. van, & Priest, F. G. (2002). Evolution of the Lactic Acid Bacterial Community during Malt Whisky Fermentation: A Polyphasic Study. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(1), 297-305. <https://doi.org/10.1128/AEM.68.1.297-305.2002>
- Bellut, K., Michel, M., Hutzler, M., Zarnkow, M., Jacob, F., Schutter, D. P. D., Daenen, L., Lynch, K. M., Zannini, E., & Arendt, E. K. (2019). Investigation into the Potential of *Lachancea fermentati* Strain KBI 12.1 for Low Alcohol Beer Brewing. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 77(3), 157-169. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1629227>
- Benito, Á., Calderón, F., & Benito, S. (2016). Combined Use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in Winemaking. Beneficial Effects Determined Through the Study of Wines' Analytical Characteristics. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 21(12). <https://doi.org/10.3390/molecules21121744>
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107-119.
- Blaser, H.-U., Pugin, B., & Spindler, F. (2005). Progress in enantioselective catalysis assessed from an industrial point of view. *Journal of Molecular Catalysis A: Chemical*, 231(1), 1-20. <https://doi.org/10.1016/j.molcata.2004.11.025>
- Bourbon-Melo, N., Palma, M., Rocha, M. P., Ferreira, A., Bronze, M. R., Elias, H., & Sá-Correia, I. (2021). Use of *Hanseniaspora guilliermondii* and *Hanseniaspora opuntiae* to enhance the aromatic profile of beer in mixed-culture fermentation with *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Microbiology*, 95, 103678. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2020.103678>
- Branco, P., Francisco, D., Chambon, C., Hébraud, M., Arneborg, N., Almeida, M. G., Caldeira, J., & Albergaria, H. (2014). Identification of novel GAPDH-derived antimicrobial peptides secreted by *Saccharomyces cerevisiae* and involved in wine microbial interactions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(2), 843-853. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5411-y>
- Brown, C. A., Murray, A. W., & Verstrepen, K. J. (2010). Rapid Expansion and Functional Divergence of Subtelomeric Gene Families in Yeasts. *Current Biology*, 20(10), 895-903. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2010.04.027>

- Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. *Revista Argentina de Microbiología*. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
- Buxton, I., & Hughes, P. S. (2020). *The Science and Commerce of Whisky*. <https://pubs.rsc.org/en/content/ebook/978-1-78801-538-7>
- Čadež, N., Bellora, N., Ulloa, R., Hittinger, C. T., & Libkind, D. (2019). Genomic content of a novel yeast species *Hanseniaspora gamundiae* sp. Nov. From fungal stromata (*Cyttaria*) associated with a unique fermented beverage in Andean Patagonia, Argentina. *PloS One*, *14*(1), e0210792. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0210792>
- Cadez, N., & Smith, M. Th. (2011). Chapter 32—*Hanseniaspora* Zikes (1912). En C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. 421-434). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00032-X>
- Canónico, L., Agarbati, A., Comitini, F., & Ciani, M. (2016). *Torulasporea delbrueckii* in the brewing process: A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiology*, *56*, 45-51. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2015.12.005>
- Capece, A., Romaniello, R., Scrano, L., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Yeast Starter as a Biotechnological Tool for Reducing Copper Content in Wine. *Frontiers in Microbiology*, *8*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02632>
- Carrau, F., Gaggero, C., & Aguilar, P. S. (2015). Yeast diversity and native vigor for flavor phenotypes. *Trends in Biotechnology*, *33*(3), 148-154. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2014.12.009>
- Cavaliere, D., McGovern, P. E., Hartl, D. L., Mortimer, R., & Polsinelli, M. (2003). Evidence for *S. cerevisiae* fermentation in ancient wine. *Journal of Molecular Evolution*, *57 Suppl 1*, S226-232. <https://doi.org/10.1007/s00239-003-0031-2>
- Chatonnet, P., Dubourdieu, D., Boidron, J., & Lavigne, V. (1993). Synthesis of volatile phenols by *Saccharomyces cerevisiae* in wines. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *62*(2), 191-202. <https://doi.org/10.1002/jsfa.2740620213>
- Christoph, N., & Bauer-Christoph, C. (2007). Flavour of Spirit Drinks: Raw Materials, Fermentation, Distillation, and Ageing. En R. G. Berger (Ed.), *Flavours and Fragrances: Chemistry, Bioprocessing and Sustainability* (pp. 219-239). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-540-49339-6_10
- Ciani, M., & Comitini, F. (2019). Chapter 4—Use of Non-*Saccharomyces* Yeasts in Red Winemaking. En A. Morata (Ed.), *Red Wine Technology* (pp. 51-68). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814399-5.00004-9>
- Clemente-Jimenez, J. M., Mingorance-Cazorla, L., Martínez-Rodríguez, S., Las Heras-Vázquez, F. J., & Rodríguez-Vico, F. (2005). Influence of sequential yeast mixtures on wine fermentation. *International Journal of Food Microbiology*, *98*(3), 301-308. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2004.06.007>
- Conner, J. M., Paterson, A., & Piggott, J. R. (1999). Release of distillate flavour compounds in Scotch malt whisky. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, *79*(7), 1015-1020. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0010\(19990515\)79:7<1015::AID-JSFA321>3.0.CO;2-R](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0010(19990515)79:7<1015::AID-JSFA321>3.0.CO;2-R)
- Contreras, A., Curtin, C., & Varela, C. (2015). Yeast population dynamics reveal a potential ‘collaboration’ between *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces uvarum* for the production of reduced alcohol wines during Shiraz fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(4), 1885-1895. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-6193-6>

- Cubillos, F. A., Gibson, B., Grijalva-Vallejos, N., Krogerus, K., & Nikulin, J. (2019). Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast*, *36*(6), 383-398. <https://doi.org/10.1002/yea.3380>
- Desira, Beth; Watson, Shaun; Van Doorn, George; Timora, Justin; Spence, Charles (2020). Happy Hour? A Preliminary Study of the Effect of Induced Joviality and Sadness on Beer Perception. *Beverages*, *6*(2), 35–. doi:10.3390/beverages6020035
- Dolinski, K., & Botstein, D. (2005). Changing perspectives in yeast research nearly a decade after the genome sequence. *Genome Research*, *15*(12), 1611-1619. <https://doi.org/10.1101/gr.3727505>
- Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. M. L., Bisson, L. F., & Bamforth, C. W. (2016). *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *Journal of the Institute of Brewing*, *122*(4), 599-604. <https://doi.org/10.1002/jib.362>
- Domizio, P., Lencioni, L., Ciani, M., Di Blasi, S., Pontremolesi, C., & Sabatelli, M. P. (2007). Spontaneous and inoculated yeast populations dynamics and their effect on organoleptic characters of Vinsanto wine under different process conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *115*(3), 281-289. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.052>
- Eizaguirre, J. I. (2019). Caracterización y domesticación de cepas naturales de *Saccharomyces eubayanus* para su aplicación en la industria cervecera (Tesis doctoral). Universidad Nacional del Comahue, Centro Universitario Bariloche, Argentina.
- Eizaguirre, J. I., Peris, D., Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., Ríos, P. D. L., Hittinger, C. T., & Libkind, D. (2018). Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environmental Microbiology*, *20*(10), 3732-3743. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14375>
- Engel, S. R., Dietrich, F. S., Fisk, D. G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Hitz, B. C., Karra, K., Nash, R. S., Weng, S., Wong, E. D., Lloyd, P., Skrzypek, M. S., Miyasato, S. R., Simison, M., & Cherry, J. M. (2014). The reference genome sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and now. *G3 (Bethesda, Md.)*, *4*(3), 389-398. <https://doi.org/10.1534/g3.113.008995>
- Evans, D. E., Goldsmith, M., Damberg, R., & Nischwitz, R. (2011). A Comprehensive Reevaluation of Small-Scale Congress Mash Protocol Parameters for Determining Extract and Fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *69*(1), 13-27. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2011-0111-01>
- Fleet, G. H. (1998). The microbiology of alcoholic beverages. En B. J. B. Wood (Ed.), *Microbiology of Fermented Foods* (pp. 217-262). Springer US. https://doi.org/10.1007/978-1-4613-0309-1_9
- Fleet, Graham H. (2003). Yeast interactions and wine flavour. *International Journal of Food Microbiology*, *86*(1), 11-22. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00245-9](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00245-9)
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, *166*(6), 1397-1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
- García, M., Esteve-Zarzoso, B., Cabellos, J. M., & Arroyo, T. (2020). Sequential Non-*Saccharomyces* and *Saccharomyces cerevisiae* Fermentations to Reduce the Alcohol Content in Wine. *Fermentation*, *6*(2), 60. <https://doi.org/10.3390/fermentation6020060>
- Geddes, P. A., & Riffkin, H. L. (1989). Influence of lactic acid bacteria on aldehyde, ester and higher alcohol formation during Scotch whisky fermentations. Distilled beverage flavour. Ellis Horwood, Chichester, United Kingdom, 193-199.

- Georg-Kraemer, J. E., Mundstock, E. C., & Cavalli-Molina, S. (2001). Developmental Expression of Amylases During Barley Malting. *Journal of Cereal Science*, 33(3), 279-288. <https://doi.org/10.1006/jcrs.2001.0367>
- Gibson, B. R., Storgårds, E., Krogerus, K., & Vidgren, V. (2013). Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast*, 30(7), 255-266. <https://doi.org/10.1002/yea.2960>
- Gonçalves, M., Pontes, A., Almeida, P., Barbosa, R., Serra, M., Libkind, D., ... & Sampaio, J. P. (2016). Distinct domestication trajectories in top-fermenting beer yeasts and wine yeasts. *Current Biology*, 26(20), 2750-2761.
- Gonzalez Flores, M. (2019). *Saccharomyces uvarum* de ambientes naturales y bebidas fermentadas de la Norpatagonia: Caracterización y potencial para elaborar sidras a bajas temperaturas. <https://ri.conicet.gov.ar/handle/11336/79856>
- González Flores, M., Rodríguez, M. E., Oteiza, J. M., Barbagelata, R. J., & Lopes, C. A. (2017). Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking. *International Journal of Food Microbiology*, 249, 9-17. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.02.018>
- Grime, K. H., & Briggs, D. E. (1996). The release of bound β -amilase by macromolecules. *Journal of the Institute of Brewing*, 102(4), 261-270. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1996.tb00911.x>
- Harrison, B. (2007). *Peat source and its impact on the flavour of Scotch whisky* [Thesis, Heriot-Watt University]. <https://www.ros.hw.ac.uk/handle/10399/2032>
- He, Y.-M., Duan, X.-G., & Liu, Y.-S. (2014). Enhanced bioremediation of oily sludge using co-culture of specific bacterial and yeast strains. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 89(11), 1785-1792. <https://doi.org/10.1002/jctb.4471>
- Hill, A. E., & Stewart, G. G. (2019). Free amino nitrogen in brewing. *Fermentation*, 5(1), 22.
- Huang, C.-J., Lee, S.-L., & Chou, C.-C. (2001). Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. *Food Research International*, 34(4), 277-282. [https://doi.org/10.1016/S0963-9969\(00\)00164-2](https://doi.org/10.1016/S0963-9969(00)00164-2)
- Ickes, C. M., & Cadwallader, K. R. (2017). Effects of Ethanol on Flavor Perception in Alcoholic Beverages. *Chemosensory Perception*, 10(4), 119-134. <https://doi.org/10.1007/s12078-017-9238-2>
- Ikari, A., & Kubo, R. (1975). Behavior of Various Impurities in Simple Distillation of Aqueous Solution of Ethanol. *Journal of Chemical Engineering of Japan*, 8(4), 294-299. <https://doi.org/10.1252/jcej.8.294>
- Jack, F. R. (2012). 19 - Whiskies: Composition, sensory properties and sensory analysis. En J. Piggott (Ed.), *Alcoholic Beverages* (pp. 379-392). Woodhead Publishing. <https://doi.org/10.1533/9780857095176.3.379>
- Johnson, E. A. (2013). Biotechnology of non-Saccharomyces yeasts—The ascomycetes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 97(2), 503-517. <https://doi.org/10.1007/s00253-012-4497-y>
- Johnson, E. A., & Echavarri-Erasun, C. (2011). Chapter 3—Yeast Biotechnology. En C. P. Kurtzman, J. W. Fell, & T. Boekhout (Eds.), *The Yeasts (Fifth Edition)* (pp. 21-44). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-52149-1.00003-3>
- Kew, W., Bell, N. G. A., Goodall, I., & Uhrin, D. (2017). Advanced solvent signal suppression for the acquisition of 1D and 2D NMR spectra of Scotch Whisky. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 55(9), 785-796. <https://doi.org/10.1002/mrc.4621>

- Kongkiattakajorn, J., & Sornvoraweat, B. (2011). Comparative Study of Bioethanol Production from Cassava Peels by Monoculture and Co-Culture of Yeast. *Agriculture and Natural Resources*, 45(2), 268-274.
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., & Gibson, B. (2015). New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 42(5), 769-778. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1597-6>
- Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (2011). *The Yeasts: A Taxonomic Study*. Elsevier.
- Kurtzman, C. P. (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulasporea*. *FEMS yeast research*, 4(3), 233-245
- Lambrechts, M., & Pretorius, I. (2000). Yeast and its importance to wine aroma. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, 21, 97-129.
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(35), 14539-14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>
- Libkind, D., Moliné, M., Trochine, A., Bellora, N., & de Garcia, V. (2016). Biotechnologically Relevant Yeasts from Patagonian Natural Environments. En N. L. Olivera, D. Libkind, & E. Donati (Eds.), *Biology and Biotechnology of Patagonian Microorganisms* (pp. 325-351). Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-42801-7_18
- Lopes, C. A., Rodríguez, M. E., Sangorrín, M., Querol, A., & Caballero, A. C. (2007). Patagonian wines: The selection of an indigenous yeast starter. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 34(8), 539-546. <https://doi.org/10.1007/s10295-007-0227-3>
- López, S., Mateo, J. J., & Maicas, S. (2014). Characterisation of *Hanseniaspora* isolates with potential aroma-enhancing properties in Muscat wines. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 35(2), 292-303.
- Masneuf-Pomarède, I., Bely, M., Marullo, P., Lonvaud-Funel, A., & Dubourdiou, D. (2010). Reassessment of phenotypic traits for *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* wine yeast strains. *International Journal of Food Microbiology*, 139(1), 79-86. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.01.038>
- McGovern, P. E. (2009). *Uncorking the Past: The Quest for Wine, Beer, and Other Alcoholic Beverages*. University of California Press.
- McGovern, P. E., Hartung, U., Badler, V. R., Glusker, D. L., & Exner, L. J. (1997). The Beginnings of Winemaking and Viniculture in the Ancient Near East and Egypt. *Expedition: The Magazine of the University of Pennsylvania*, 39(1), 3-21.
- McGovern, P. E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G. R., Moreau, R. A., Nuñez, A., Butrym, E. D., Richards, M. P., Wang, C., Cheng, G., Zhao, Z., & Wang, C. (2004). Fermented beverages of pre- and proto-historic China. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(51), 17593-17598. <https://doi.org/10.1073/pnas.0407921102>
- Meilgaard, M. C. (1975). Flavor chemistry of beer. II. Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. *Tech. Quart. Master. Brew. Assoc. Am.*, 12, 151-168.
- Mertens, S., Steensels, J., Saels, V., De Rouck, G., Aerts, G., & Verstrepen, K. J. (2015). A Large Set of Newly Created Interspecific *Saccharomyces* Hybrids Increases Aromatic Diversity in Lager Beers. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(23), 8202-8214. <https://doi.org/10.1128/AEM.02464-15>

- Mishra, A.; Speers, R. A. (2020). Wort Boil Time and Trub Effects on Fermentability. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 1–7. doi:10.1080/03610470.2020.1795782
- Moreira, N., Mendes, F., Guedes de Pinho, P., Hogg, T., & Vasconcelos, I. (2008). Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology*, 124(3), 231-238. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2008.03.025>
- Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M., & Iefuji, H. (2010). PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 109(6), 564-569. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.11.011>
- Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M., & Ashikari, T. (2009). Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid. *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 16(2), 115-129. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsp003>
- Narendranath, N. V., Hynes, S. H., Thomas, K. C., & Ingledew, W. M. (1997). Effects of lactobacilli on yeast-catalyzed ethanol fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 63(11), 4158-4163. <https://doi.org/10.1128/AEM.63.11.4158-4163.1997>
- Naumov, G., Nguyen, H., Naumova, E., Michel, A., Aigle, M., & Gaillardin, C. (2001). Genetic identification of *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*, a cider-fermenting yeast. *International journal of food microbiology*, 65, 163-171. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(00\)00515-8](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(00)00515-8)
- Nielsen, J., & Jewett, M. C. (2008). Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 8(1), 122-131. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00302.x>
- Novak, S., Zechner-Krpan, V., & Marić, V. (2004). Regulation of Maltose Transport and Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Technology and Biotechnology*, 42(3), 213-218.
- Nguyen, N., McGinley, M., & Mott, J. Faster Real-time Response to Bacterial Infection of Bioethanol Fermentation using a Short Rezex™ ROA Column.
- Olaniran, A. O., Hiralal, L., Mokoena, M. P., & Pillay, B. (2017). Flavour-active volatile compounds in beer: Production, regulation and control. *Journal of the Institute of Brewing*, 123(1), 13-23. <https://doi.org/10.1002/jib.389>
- Oliver, S. G. (2006). From genomes to systems: The path with yeast. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 361(1467), 477-482. <https://doi.org/10.1098/rstb.2005.1805>
- Origone, A. C., Mónaco, S. M. del, Ávila, J. R., Flores, M. G., Rodríguez, M. E., & Lopes, C. A. (2017). Tolerance to winemaking stress conditions of Patagonian strains of *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum*. *Journal of Applied Microbiology*, 123(2), 450-463. <https://doi.org/10.1111/jam.13495>
- Padilla, B., Gil, J. V., & Manzanares, P. (2016). Past and Future of Non-*Saccharomyces* Yeasts: From Spoilage Microorganisms to Biotechnological Tools for Improving Wine Aroma Complexity. *Frontiers in Microbiology*, 7. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00411>
- Park, J.-Y., Lee, J.-Y., Choi, S.-H., Ko, H.-M., Kim, I.-C., Lee, H. B., & Bai, S. (2014). Construction of dextrin and isomaltose-assimilating brewer's yeasts for production of low-carbohydrate beer. *Biotechnology Letters*, 36(8), 1693-1699. <https://doi.org/10.1007/s10529-014-1530-5>
- Pérez-Través, L., Lopes, C. A., González, R., Barrio, E., & Querol, A. (2015). Physiological and genomic characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* hybrids with improved

- fermentation performance and mannoprotein release capacity. *International journal of food microbiology*, 205, 30-40.
- Piggott, J. R., Conner, J. M., Paterson, A., & Clyne, J. (1993). Effects on Scotch whisky composition and flavour of maturation in oak casks with varying histories. *International Journal of Food Science & Technology*, 28(3), 303-318. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.1993.tb01276.x>
- Piškur, J., Rozpędowska, E., Polakova, S., Merico, A., & Compagno, C. (2006). How did *Saccharomyces* evolve to become a good brewer? *Trends in Genetics*, 22(4), 183-186. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.02.002>
- Rautio, J., & Londesborough, J. (2003). Maltose Transport by Brewer's Yeasts in Brewer's Wort. *Journal of the Institute of Brewing*, 109(3), 251-261. <https://doi.org/10.1002/j.2050->
- Reifenberger, E., Freidel, K., & Ciriacy, M. (1995). Identification of novel HXT genes in *Saccharomyces cerevisiae* reveals the impact of individual hexose transporters on glycolytic flux. *Molecular Microbiology*, 16(1), 157-167. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1995.tb02400.x>
- Rodrigues, F., Ludovico, P., & Leão, C. (2006). Sugar Metabolism in Yeasts: An Overview of Aerobic and Anaerobic Glucose Catabolism. En G. Péter & C. Rosa (Eds.), *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts* (pp. 101-121). Springer. https://doi.org/10.1007/3-540-30985-3_6
- Rodríguez, M. E., Pérez-Través, L., Sangorrín, M. P., Barrio, E., & Lopes, C. A. (2014). *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS Yeast Research*, 14(6), 948-965. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12183>
- Rose, A. H. (1975). Chapter 1 Growth and Handling of Yeasts. En D. M. Prescott (Ed.), *Methods in Cell Biology* (Vol. 12, pp. 1-16). Academic Press. [https://doi.org/10.1016/S0091-679X\(08\)60948-6](https://doi.org/10.1016/S0091-679X(08)60948-6)
- Running, C. A., & Hayes, J. E. (2016). Individual differences in multisensory flavor perception. *Multisensory Flavor Perception*, 185-210.
- Russell, I., & Stewart, G. (2003). *Whisky: Technology, Production and Marketing* (p. 366).
- Russell, Inge, & Stewart, G. (2014). Chapter 7—Distilling yeast and fermentation. En Inge Russell & G. Stewart (Eds.), *Whisky (Second Edition)* (pp. 123-146). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401735-1.00007-6>
- Schmidt, F. R. (2004). Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(4), 363-372. <https://doi.org/10.1007/s00253-004-1656-9>
- Sibirny, A. (Ed.). (2019). *Non-conventional Yeasts: From Basic Research to Application*. Springer International Publishing. <https://doi.org/10.1007/978-3-030-21110-3>
- Spencer, J. F. T., & Spencer, D. M. (2013). *Yeasts in Natural and Artificial Habitats*. Springer Science & Business Media.
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68(1), 61-80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
- Stewart, Graham G. (2017). The Production of Secondary Metabolites with Flavour Potential during Brewing and Distilling Wort Fermentations. *Fermentation*, 3(4), 63. <https://doi.org/10.3390/fermentation3040063>
- Suh, S.-O., Blackwell, M., Kurtzman, C. P., & Lachance, M.-A. (2006). Phylogenetics of *Saccharomycetales*, the ascomycete yeasts. *Mycologia*, 98(6), 1006-1017. <https://doi.org/10.1080/15572536.2006.11832629>

- Suomalainen, H., & Lehtonen, M. (1979). The Production of Aroma Compounds by Yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 85(3), 149-156. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.1979.tb06846.x>
- Suter, B., Auerbach, D., & Stagljar, I. (2006). Yeast-based functional genomics and proteomics technologies: The first 15 years and beyond. *BioTechniques*, 40(5), 625-644. <https://doi.org/10.2144/000112151>
- Swiegers, J. H., Saerens, S. M. G., & Pretorius, I. S. (2016). Novel yeast strains as tools for adjusting the flavor of fermented beverages to market specifications. En *Biotechnology in Flavor Production* (pp. 62-132). John Wiley & Sons, Ltd. <https://doi.org/10.1002/9781118354056.ch3>
- Taillandier, P., Lai, Q. P., Julien-Ortiz, A., & Brandam, C. (2014). Interactions between *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* in wine fermentation: Influence of inoculation and nitrogen content. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 30(7), 1959-1967. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1618-z>
- Thomas, K. C., Hynes, S. H., & Ingledew, W. M. (2001). Effect of lactobacilli on yeast growth, viability and batch and semi-continuous alcoholic fermentation of corn mash. *Journal of Applied Microbiology*, 90(5), 819-828. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01311.x>
- Toh, D. W. K., Chua, J. Y., Lu, Y., & Liu, S. Q. (2020). Evaluation of the potential of commercial non-*Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. *International Journal of Food Science & Technology*, 55(5), 2049-2059. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14399>
- Urbina, K., Villarreal, P., Nespolo, R. F., Salazar, R., Santander, R., & Cubillos, F. A. (2020). Volatile Compound Screening Using HS-SPME-GC/MS on *Saccharomyces eubayanus* Strains under Low-Temperature Pilsner Wort Fermentation. *Microorganisms*, 8(5), 755. <https://doi.org/10.3390/microorganisms8050755>
- Vallee, B. L. (1998). Alcohol in the Western World. *Scientific American*, 278(6), 80-85.
- Valles, B. S., Bedriñana, R. P., Tascón, N. F., Simón, A. Q., & Madrera, R. R. (2007). Yeast species associated with the spontaneous fermentation of cider. *Food Microbiology*, 24(1), 25-31. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2006.04.001>
- van Dijken, J. P., & Scheffers, W. A. (1986). Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 1(3-4), 199-224. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1986.tb01194.x>
- Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107(1), 221-230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>
- Vriesekoop, F., Rathband, A., MacKinlay, J., & Bryce, J. H. (2010). The Evolution of Dextrins During the Mashing and Fermentation of All-malt Whisky Production. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(3), 230-238. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2010.tb00425.x>
- Wackerbauer, K., Kramer, P., & Siepert, J. (1982). Phenolische aromastoffe in bier. *Brauwelt*, 15, 618-626
- Walker, G. M. (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. John Wiley & Sons.
- Walker, G. M., Lappe-Oliveras, P., Moreno-Terrazas C., R., Kirchmayr, M., Arellano-Plaza, M., & Gschaedler-Mathis, A. C. (2019). Yeasts Associated With the Production of Distilled Alcoholic Beverages. En P. Romano, M. Ciani, & G. H. Fleet (Eds.), *Yeasts in the Production of Wine* (pp. 477-512). Springer. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9782-4_16
- Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the Production of Fermented Beverages. *Beverages*, 2(4), 30. <https://doi.org/10.3390/beverages2040030>

- Wall, J. S., Swango, L. C., Tessari, D., & Dimler, R. J. (1961). Organic acids of barley grain. *Cereal Chemistry*, 38, 407-422.
- Walsh, G. (2005). Biopharmaceuticals: Recent approvals and likely directions. *Trends in Biotechnology*, 23(11), 553-558. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2005.07.005>
- Watson, D. C. (1981). 9—The development of specialized yeast strains for use in scotch malt whisky fermentations. En Geaham G. Stewart & I. Russell (Eds.), *Advances in Biotechnology* (pp. 57-62). Pergamon. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-025382-4.50014-9>
- White, C., & Zainasheff, J. (2010). *Yeast: The Practical Guide to Beer Fermentation*. Brewers Publications.
- Wilson, N. (2014b). *Contamination: Bacteria and wild yeasts in a whisky fermentation*. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401735-1.00008-8>
- Wilson, Nicholas. (2014a). Chapter 8 - Contamination: Bacteria and wild yeasts in a whisky fermentation. En Inge Russell & G. Stewart (Eds.), *Whisky (Second Edition)* (pp. 147-154). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-401735-1.00008-8>
- Wiśniewska, P., Dymerski, T., Wardencki, W., & Namieśnik, J. (2015). Chemical composition analysis and authentication of whisky. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 95(11), 2159-2166. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6960>
- Wolfe, K. H. (2001). Yesterday's polyploids and the mystery of diploidization. *Nature Reviews Genetics*, 2(5), 333-341.
- Yoon, S.-H., Mukerjea, R., & Robyt, J. F. (2003). Specificity of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) in removing carbohydrates by fermentation. *Carbohydrate Research*, 338(10), 1127-1132. [https://doi.org/10.1016/S0008-6215\(03\)00097-1](https://doi.org/10.1016/S0008-6215(03)00097-1)
- Zheng, X., D'Amore, T., Russell, I., & Stewart, G. G. (1994). Factors Influencing Maltotriose Utilization During Brewery Wort Fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 52(2), 41-47. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-52-0041>
- Zoeller, K. (2008). Comparative evaluation of ethanol yield from HTF corn varieties in the whisky production process. *Electronic Theses and Dissertations*. <https://doi.org/10.18297/etd/1652>
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., & Van't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial 4081 growth curve. *Applied and environmental microbiology*, 56(6), 1875-1881.

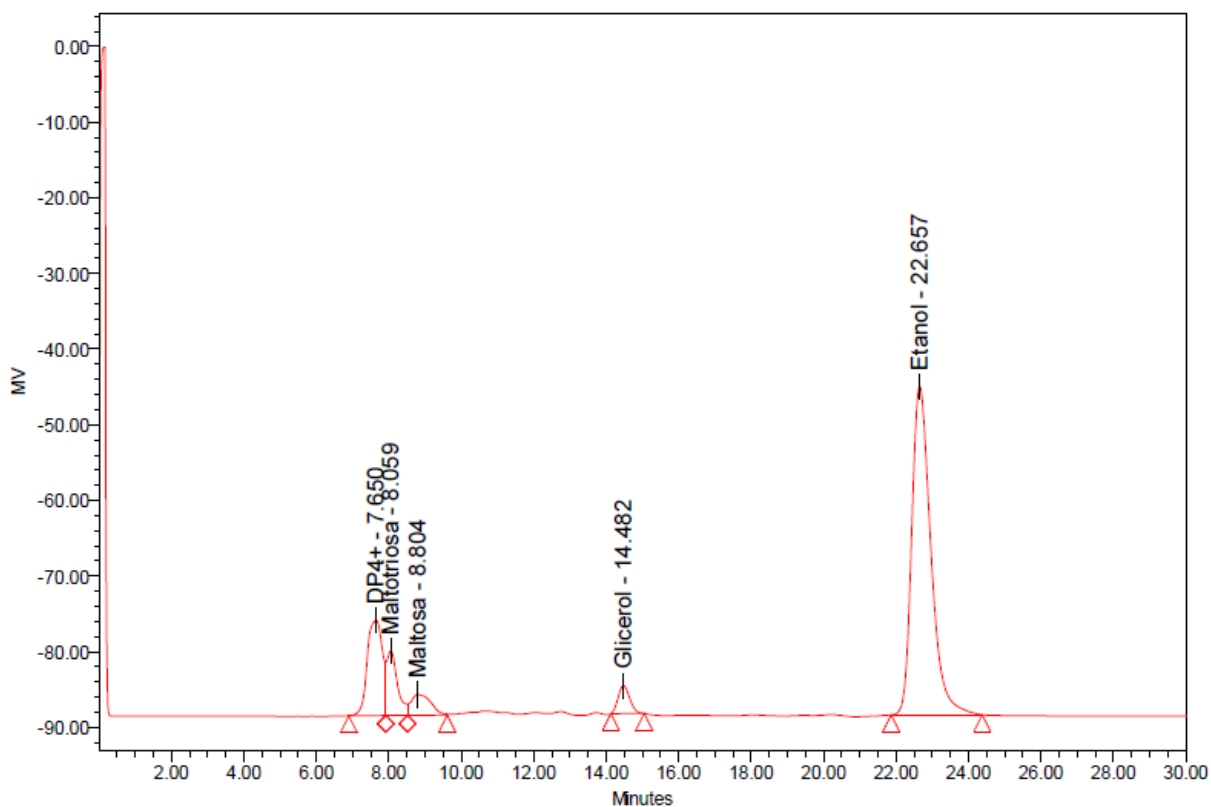
Anexo I

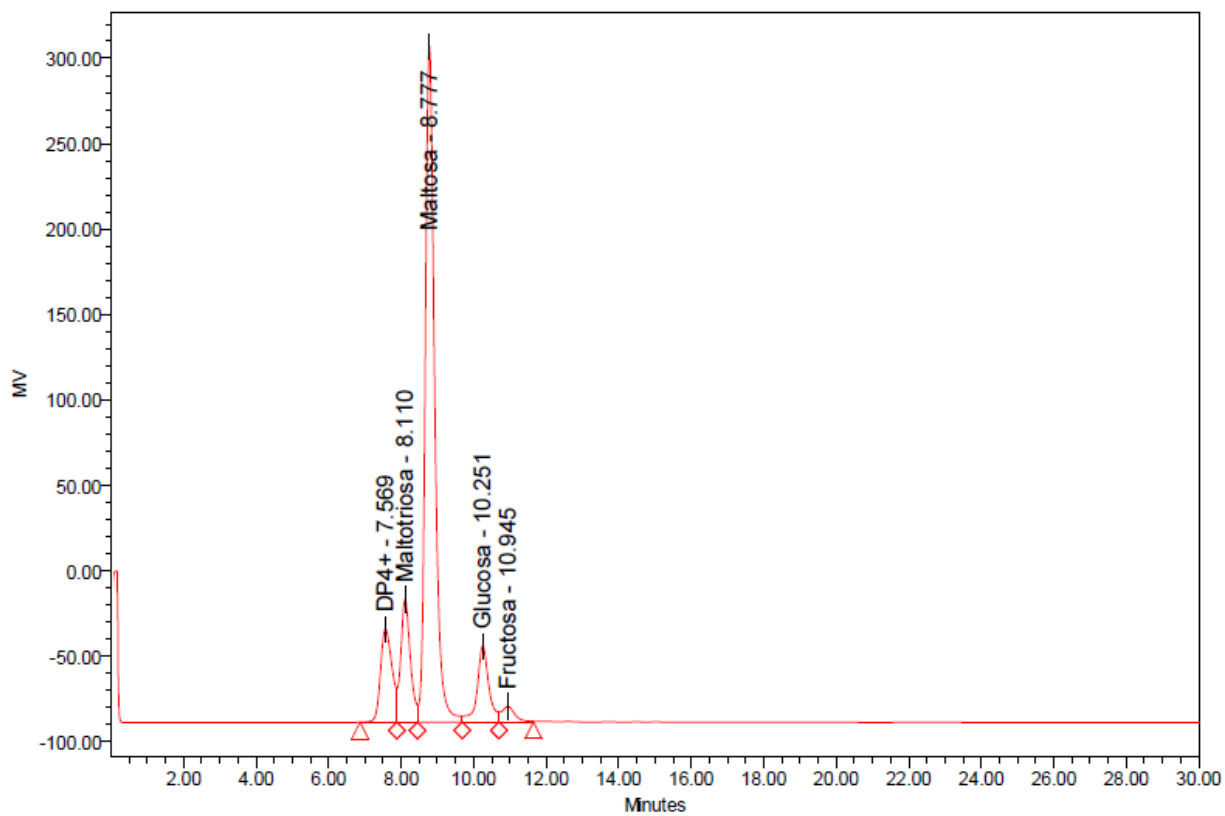
Tabla 1: Tabla de Kaiser. Conversión de °Brix a °Plato y densidad relativa (SG).

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

Anexo II

Cromatograma por HPLC de los principales picos que conforman el perfil de azúcares del mosto. En la técnica utilizada los picos correspondientes a dextrinas y a maltotriosa se encuentran parcialmente superpuestos en los cromatogramas obtenidos por HPLC, por tanto el área de los picos se aproxima mediante el punto más bajo del valle que se forma entre ellos. La presencia de distintas concentraciones de azúcares en el mosto puede provocar un corrimiento relativo de los valles, lo que genera dispersión en la caracterización de estos azúcares.





Agradecimientos

A mis directores Martín y Juli por su guía, paciencia y ayuda permanente y porque, a pesar de las adversidades que trajo la pandemia, hicieron posible la finalización de este trabajo en tiempo record.

Quisiera agradecer a Clara Bruzone por compartir sus conocimientos y por su acompañamiento durante los ensayos de laboratorio.

A todos los integrantes del Laboratorio de Microbiología por su calidez humana. En especial a Lu Cavallini por las largas tardes compartidas y su predisposición para ayudarme en todo momento y a Nacho Bolognino por la ayuda con los análisis estadísticos.

A Mariana Langenheim por las interminables corridas de HPLC.

A Agus, Mica y Facu por estar siempre para lo que sea, me siento afortunada por haber podido cursar desde el primer hasta el último día de la carrera con ustedes.

A mis papás y mi hermano, por el aguante durante todos estos años. Por las palabras de aliento en los momentos difíciles y por compartir y celebrar mis alegrías.

A Manu y a mi segunda familia, que siempre me escucharon y me alentaron a seguir estudiando y a disfrutar a pesar del cansancio.

A mis amigas Caro y Lin que están lejos, pero siempre están presentes.

A la Universidad del Comahue por permitirme estudiar de forma libre y gratuita y a los profesores que, compartiendo sus conocimientos y su pasión, hicieron que yo descubriera la mía.

Y un especial agradecimiento a los jurados, Andrea Trochine, Andrea Premoli y Diego Libkind, por el tiempo dedicado a la evaluación de esta tesina y su contribución a la mejora de la misma.