



UNIVERSIDAD NACIONAL DE SAN JUAN

Facultad de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales

Departamento de Biología

Licenciatura en Biología

Trabajo Final de Licenciatura

“Uso de levaduras autóctonas multifuncionales con aptitudes probióticas para la elaboración de cerveza funcional”

Alumna: Julieta Anabel Araya

Asesora: Dra. Yolanda Paola Maturano

Co-Asesora: Dra. Silvia Cristina Vergara Alvarez

Co-Asesora: Ing. María José Leiva

San Juan

2026

AGRADECIMIENTOS

Quiero comenzar agradeciendo a mi mamá, Alfonsina, por ser mi cómplice y mi compañera siempre. Gracias por creer en mí, por acompañar cada uno de mis pasos y por enseñarme, con tu ejemplo, que los sueños se construyen con esfuerzo, constancia y amor.

A mi papá, Fabián, por tener las palabras justas cuando más las necesité y por transmitirme serenidad en los momentos de incertidumbre. Gracias por enseñarme a mirar los desafíos con calma y a confiar en mis propias capacidades.

A mis hermanos, Paula, Franco y Lucca, por llenar este camino de risas y momentos de distracción. Gracias por hacerme reír cuando lo necesitaba, por las charlas sin sentido que terminaban en carcajadas y por recordarme que, incluso en los días más exigentes, siempre hay lugar para la alegría.

A mi pareja, Alvaro, por caminar a mi lado durante todo este proceso, por ser mi complemento y mi amor, por acompañarme con paciencia y por entender cada momento de cansancio, entusiasmo y nervios. Gracias por celebrar mis logros como propios y por estar siempre presente.

A mis amigos de toda la vida, Nati, Magui y Eze, por crecer conmigo y por conocerme como pocas personas lo hacen. Gracias por tantos años compartidos, por las risas, las anécdotas y por haber estado a mi lado en tantas etapas que forman parte de quien soy hoy.

A Sofi, Luli, Euge y Mari, con quienes compartí bailes, risas y tantos momentos que llenaron mis días de alegría y diversión. Gracias por hacer que cada encuentro juntas sea especial y por sumar siempre buena energía a mi vida.

A mis amigos de la facultad, Nico, Aldi, Ampí y Anita, con quienes formamos un grupo que fue creciendo con el tiempo y fortaleciendo nuestra amistad. Gracias por la ayuda mutua, las horas de estudio compartidas y por hacer que los años de facultad estuvieran llenos de compañerismo y momentos inolvidables.

A Cami, por ser una compañera fundamental mucho antes de esta tesis y también durante su realización. Gracias por compartir tantos momentos juntas y por acompañarnos la una a la otra, haciendo de este proceso una experiencia mucho más linda y significativa.

A los profesores que, con dedicación y vocación, marcaron mi camino y me enseñaron no sólo conocimientos académicos, sino también valores que me acompañarán toda la vida. Gracias por

despertar mi curiosidad, por motivarme a superarme y por ayudarme a construir el camino que hoy me trae hasta aquí.

A mis directoras de tesis, Pao, Pipi y Jose, por su paciencia, su guía y su compromiso durante todo este proceso. Gracias por compartir sus conocimientos, por orientar cada etapa del trabajo y por confiar en mí para llevar adelante este proyecto.

A la universidad, por brindarme el espacio para formarme, crecer y descubrir mi vocación. Gracias por permitirme transitar este camino y por hacer posible que hoy pueda recibir este honorable título que representa años de aprendizaje y dedicación.

Y, por último, a mí misma. Porque sólo yo sé cuántas veces, en los viajes de colectivo, me imaginé y soñé este momento. Hoy siento que cada madrugada de estudio, cada desafío superado y cada pequeño avance se resumen en este día tan esperado. Gracias por no rendirme, por seguir adelante cuando parecía difícil y por tener la perseverancia para llegar hasta acá. Este logro es el reflejo de todo el camino recorrido y de la convicción de que los sueños, cuando se persiguen con el corazón, se hacen realidad.

ABREVIATURAS

Aminas biógenas	AB
<i>Bismuth Glucose Glycine Yeast</i>	BIGGY
Código Alimentario Argentino	CAA
Facultad de Ingeniería	FI
Instituto de Biotecnología	IBT
Jugo gástrico	JG
Jugo pancreático	JP
Tracto gastrointestinal	TGI
Unidades Formadoras de Colonias	UFC
Universidad Nacional de San Juan	UNSJ
<i>Yeast Extract Peptone Dextrose</i> (Extracto de levadura, peptona y dextrosa)	YEPD
<i>Yeast Nitrogen Base</i> (Base nitrogenada para levaduras)	YNB

ÍNDICE

1. RESUMEN	7
2. INTRODUCCIÓN	8
3. HIPÓTESIS.....	12
4. OBJETIVOS	13
4.1.Objetivo general.....	13
4.2.Objetivos específicos	13
5. MATERIALES Y MÉTODOS	13
5.1.Microorganismos	13
5.2. Caracterización tecnológica de levaduras para ser empleadas en el proceso fermentativo de cerveza tipo <i>Ale</i>	15
5.2.1. Rasgos negativos.....	15
5.2.1.1.Actividad de descarboxilación.....	15
5.2.1.2.Determinación de compuestos <i>Off-flavors</i>	15
5.2.2. Rasgos positivos.....	16
5.2.2.1.Determinación cuantitativa de actividad β -glucosidasa.....	16
5.2.2.2.Metabolización de azúcares por metabolismo fermentativo.....	17
5.2.2.3.Metabolización de azúcares por vía fermentativa en mosto cervecero	17
5.3.Proceso fermentativo de cerveza tipo <i>Ale</i> a escala de laboratorio.....	18
5.4.Simulación del tracto gastrointestinal de levadura <i>starter</i>	20
5.5.Evaluación sensorial de cerveza tipo <i>Ale</i> estilo <i>Kölsch</i>	20
5.6.Análisis estadístico.....	22
6. RESULTADOS.....	23
6.1.Caracterización tecnológica de levaduras para ser empleadas en el proceso fermentativo de cerveza tipo <i>Ale</i>	23
6.1.1. Rasgos negativos.....	22
6.1.1.1.Actividad de descarboxilación.....	22
6.1.1.2.Determinación de compuestos <i>Off-flavors</i>	23
6.1.2. Rasgos positivos.....	25
6.1.2.1.Determinación cuantitativa de actividad β -glucosidasa	25
6.1.2.2.Fermentación de azúcares del mosto cervecero.....	26

6.2. Proceso fermentativo de cerveza tipo <i>Ale estilo Kölsch</i> a escala de laboratorio	28
6.3. Simulación del tracto gastrointestinal posterior a la fermentación de mosto cervecero	30
6.4. Evaluación sensorial de cerveza tipo <i>Ale estilo Kölsch</i>	31
6.5. Proceso fermentativo de cerveza tipo <i>Ale estilo Belgian</i> a escala de laboratorio	33
6.6. Evaluación sensorial de cerveza tipo <i>Ale estilo Belgian</i>	35
6.7. DISCUSIÓN	36
6.8. CONCLUSIONES	41
6.9. BIBLIOGRAFÍA	42

1. RESUMEN

En la actualidad, existe un interés creciente por los alimentos funcionales, definidos como aquellos que, además de su valor nutricional, aportan beneficios a la salud. Entre los ingredientes de alimentos funcionales se destacan los probióticos, microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren un beneficio al huésped. Dado que la cerveza es una de las bebidas alcohólicas de mayor consumo a nivel mundial, representa un vehículo ideal para la incorporación de microorganismos con potencial probiótico. En la provincia de San Juan, Argentina, la industria vitivinícola genera entornos de gran biodiversidad microbiana, lo que permite la selección de levaduras nativas que otorguen identidad y valor regional a productos locales. El objetivo de este trabajo fue elaborar una cerveza funcional con propiedades organolépticas distintivas, mediante el uso de una levadura autóctona seleccionada con aptitudes probióticas. La presente investigación se sustentó en el estudio de 15 aislamientos pertenecientes a los géneros *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Wickerhamomyces* y *Saccharomyces*, seleccionados por sus antecedentes de para ser utilizadas como potenciales probióticas. Sobre este grupo, se realizó una caracterización tecnológica para determinar su aptitud cervecera, evaluando la actividad de descarboxilación, la formación de compuestos indeseables (*off-flavors*) y la capacidad de fermentar los azúcares del mosto. Como resultado de este proceso, se seleccionó la levadura *Saccharomyces cerevisiae* PB101 para la elaboración de cerveza *Ale* sin filtrar. Se elaboraron lotes experimentales en los que se determinó la viabilidad del microorganismo durante la fermentación, maduración y almacenamiento, así como su resistencia a condiciones simuladas del tracto gastrointestinal post fermentación. Los resultados mostraron que la levadura seleccionada, PB101, mantuvo su viabilidad durante las instancias evaluadas, alcanzando niveles de unidades formadoras de colonias compatibles con los requeridos para que un producto sea considerado funcional. En conclusión, la adición de la levadura seleccionada con potencial probiótico en cerveza artesanal *Ale* sin filtrar resultó técnicamente factible, permitió desarrollar un producto con valor agregado por sus beneficios potenciales para la salud y constituyó una alternativa innovadora que podría mejorar la competitividad del sector cervecero regional.

2. INTRODUCCIÓN

El tracto gastrointestinal (TGI) representa una de las principales interfaces de contacto con el ambiente externo, con una superficie de entre 250 y 400 m², donde interactúan el huésped, los factores ambientales y los antígenos (Thursby & Juge, 2017). Este ecosistema digestivo es colonizado por bacterias, arqueas y una fracción fúngica (levaduras y hongos) que conforman la microbiota intestinal (Underhill & Iliev, 2014), estableciendo una relación de coevolución mutuamente beneficiosa (Backhed et al., 2005; Neish, 2009) y constituyendo la población microbiana más diversa del cuerpo humano (Quigley, 2013). Bajo el concepto de microbioma, estos microorganismos forman una unidad metabólica integrada que abarca no solo sus genomas, sino también sus metabolitos y las condiciones físico-químicas de su hábitat (Requena & Velasco, 2019; Sebastián et al., 2021). Dichos gradientes ambientales a lo largo del TGI determinan la funcionalidad de esta comunidad (Hillman et al., 2017), la cual cumple funciones esenciales como el fortalecimiento del epitelio, la obtención de energía, la protección frente a patógenos y la regulación inmunitaria (Natividad & Verdu, 2013; Bäumlner y Sperandio, 2016; Gensollen et al., 2016). Alteraciones en este equilibrio, fenómeno conocido como disbiosis, pueden comprometer dichas funciones y se han asociado con el desarrollo de diversas enfermedades inflamatorias y crónicas no transmisibles (Huang et al., 2023).

En este contexto, y ante la creciente evidencia que vincula el equilibrio microbiano intestinal con la salud general del huésped, surge el interés por estrategias capaces de modular la microbiota de manera beneficiosa (Almada et al., 2015). Entre ellas, el uso de probióticos ha cobrado especial relevancia en las últimas décadas, siendo definidos como “microorganismos vivos que, administrados en cantidades adecuadas, confieren beneficios a la salud del huésped” (Hill et al., 2014). Estos microorganismos contribuyen a modular la microbiota y limitan la proliferación de bacterias patógenas (Almada et al., 2015). Además, favorecen la digestión y absorción de nutrientes, fortalecen la barrera intestinal y mitigan síntomas asociados a la intolerancia a la lactosa, propiedades que han impulsado su integración sistemática en la industria alimentaria (Leahy et al., 2005; Iñiguez-Palomares et al., 2014; Pandey et al., 2015).

Aunque la mayoría de los probióticos comercializados corresponden a bacterias, las levaduras presentan características diferenciales que las posiciona como alternativas de interés. Entre ellas se destaca su resistencia intrínseca a antibacterianos, su mayor tamaño celular que favorece una protección más efectiva de la mucosa intestinal y su baja capacidad de transferencia genética horizontal (Czerucka et al., 2007; Banik et al., 2019). Además, su afinidad por ambientes de pH ácido refuerza su estabilidad durante el pasaje por el TGI,

particularmente durante la fase gástrica (Ogunremi et al., 2015; Banik et al., 2019; Hsiung et al., 2021). Actualmente, hay dos levaduras probióticas que son comercializadas: *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* CNCM I-745 y *Kluyveromyces marxianus* B0399 (Quarella et al., 2016; di Cagno et al., 2020). No obstante, la investigación científica se ha orientado hacia la identificación y caracterización de nuevas cepas, incluyendo tanto especies de *Saccharomyces* como levaduras no convencionales, con el objetivo de ampliar la diversidad de productos funcionales disponibles (Fernández-Pacheco et al., 2021; Angulo et al., 2023).

En el marco normativo de Argentina, la incorporación de cepas probióticas en alimentos se encuentra regulada por el Código Alimentario Argentino (CAA). De acuerdo con lo establecido en el Artículo 1389 del Capítulo XVII, este marco regulatorio se inscribe en una concepción ampliada de la alimentación, donde los productos no solo deben aportar nutrientes esenciales para el metabolismo y la obtención de energía, sino también ejercer efectos fisiológicos específicos que contribuyen a la prevención de enfermedades (Siró et al., 2008). Bajo este contexto surgen los alimentos funcionales, definidos como aquellos productos que, consumidos de manera regular dentro de una dieta equilibrada, proporcionan beneficios fisiológicos adicionales a su valor nutricional básico (Granato et al., 2017).

En las últimas décadas, el interés por los alimentos funcionales ha crecido de manera notable, tanto en el ámbito científico como en el mercado global, especialmente tras el impacto de la reciente crisis sanitaria (Onwe et al., 2022, Lafarga et al., 2023, Galanis et al., 2024). Los probióticos se destacan como uno de los ingredientes funcionales con mayor aceptación para modular la microbiota (Suvarna et al., 2018), lo que ha impulsado a la industria alimentaria a diversificar las matrices de administración hacia alternativas no lácteas, destinadas a consumidores con alergias, intolerancias o preferencias éticas específicas (Chui et al., 2023). Si bien los estudios sobre alimentos funcionales fermentados con levaduras probióticas son aún limitados en comparación con las matrices fermentadas por bacterias, el interés científico en este campo ha aumentado de manera sostenida en los últimos años (Fernández-Pacheco et al., 2021). Dentro de la tendencia hacia matrices no lácteas, surge el interés por explorar bebidas fermentadas de amplio consumo como vehículos para la administración de probióticos.

La cerveza es una bebida obtenida a partir de la sacarificación de almidones de cereales, principalmente cebada malteada, y su posterior fermentación (Hornsey, 2003). En la elaboración de cervezas tipo *Ale*, *S. cerevisiae* es la levadura fermentativa predominante y se ha establecido como el principal agente responsable de la conversión de azúcares del mosto, así como de la producción de compuestos organolépticos deseables (Verstrepen et al., 2003;

Kunze, 2010). Estas fermentaciones suelen realizarse a temperaturas más elevadas que las de tipo *Lager*, lo que favorece la producción de ésteres y otros metabolitos que contribuyen al perfil sensorial característico del producto final. La floculación constituye un rasgo relevante en levaduras cerveceras ya que influye en la clarificación natural del producto, y en la gestión de la biomasa durante y después de la fermentación (Basso et al., 2016; Stewart, 2017). En conjunto, estos aspectos fisiológicos y tecnológicos son criterios clave en la selección de cultivos *starter* para procesos cerveceros tipo *Ale*.

Tras la recuperación de los mercados posteriores a la pandemia, la producción mundial de cerveza alcanzó nuevamente niveles elevados, consolidándose como la bebida alcohólica fermentada más consumida a nivel global (Statista, 2025). Según datos de consumo per cápita reportados por fuentes estadísticas internacionales, el consumo de cerveza en Argentina se encuentra alrededor de 42.6 L por persona en 2021, ubicando a la cerveza como una de las bebidas alcohólicas preferidas en el país y confirmando su importancia cultural y de mercado (Helgi Library, 2023). En particular, la provincia de San Juan, ha experimentado un crecimiento sostenido del sector cervecero artesanal desde 2015, posicionándose como un producto de gran importancia regional tanto por su escala de elaboración como por su arraigo en el consumo local (Ruarte et al., 2025). En este contexto de expansión del sector, la incorporación de microorganismos probióticos en la cerveza representa una estrategia innovadora que fusiona la tradición cervecera con la tendencia global hacia el desarrollo de alimentos funcionales (Basso et al., 2016; Ruarte et al., 2025). Además de su elevada aceptación por parte de los consumidores, la cerveza puede considerarse una matriz biológicamente adecuada para este propósito, ya que contiene compuestos nutricionales de interés, tales como polifenoles, folatos, maltodextrinas, vitaminas del complejo B, proteínas y fracciones de fibra soluble (Sohrabvandi et al., 2012). Estos componentes no solo enriquecen el perfil nutricional del producto, sino que también pueden favorecer la viabilidad y el transporte de los microorganismos probióticos hacia su sitio de acción en el TGI (Zendeboodi et al., 2021).

A pesar de que la literatura define a la cerveza funcional como aquella que incorpora ingredientes no convencionales (como frutas o granos alternativos) o microorganismos capaces de generar compuestos beneficiosos (Basso et al., 2016), el CAA no contempla actualmente una categoría que tipifique a la cerveza como un alimento funcional o con probiótico. Dado que este producto debe ajustarse estrictamente a los estándares de identidad establecidos en el Artículo 1080 del CAA, cualquier innovación que incluya microorganismos vivos queda fuera de los parámetros vigentes. Esta situación pone de manifiesto la necesidad de generar evidencia

científica sólida que respalde la seguridad y la eficacia de estas formulaciones, y que contribuya al desarrollo de futuras normativas que acompañen esta innovación en la industria alimentaria nacional.

En el ámbito de la microbiología de alimentos, existe un interés creciente por los microorganismos con funciones múltiples, por ejemplo, capaces de llevar a cabo procesos fermentativos, y sintetizar compuestos beneficiosos ejerciendo efectos probióticos (Bevilacqua et al., 2012). En la industria cervecera, el concepto de cultivo *starter* se refiere al uso de cepas seleccionadas que aseguran una fermentación alcohólica controlada y contribuyen de manera predecible a las características sensoriales del producto final. Su selección depende de criterios tecnológicos específicos, tales como un corto período de adaptación al mosto, una atenuación adecuada y la capacidad de fermentar determinados azúcares (Comitini et al., 2011; Lengeler et al., 2020), pero también de una rigurosa evaluación de seguridad y calidad organoléptica. En este aspecto, resulta importante descartar rasgos negativos como la actividad de descarboxilación, precursora de aminas biógenas (AB), y la producción de compuestos *off-flavors* como fenoles volátiles o ácido sulfhídrico (H₂S) (Capece et al., 2018; Pietrafesa et al., 2023). Además, se valoran atributos positivos como la actividad de enzimas β -glucosidasas, las cuales potencian el aroma del producto y la biodisponibilidad de compuestos bioactivos (Bevilacqua et al., 2012; Capece et al., 2018). En este sentido, el empleo de levaduras autóctonas representa una ventaja estratégica, ya que permite obtener perfiles aromáticos diferenciados al integrar de manera natural las capacidades fermentativas con las funciones probióticas (Pietrafesa et al., 2023).

Estas características adquieren especial relevancia cuando se busca desarrollar cervezas con potencial funcional, ya que no solo es necesario garantizar la eficiencia fermentativa, sino también preservar la viabilidad del microorganismo y evitar la generación de compuestos que puedan comprometer la calidad sensorial o la aceptación del producto. Dado que la viabilidad celular es un requisito indispensable para la eficacia de los probióticos, la cerveza artesanal destinada a este fin no debería someterse a procesos de pasteurización ni a filtraciones posteriores a la fermentación (Zendeboodi et al., 2021). De este modo, una cerveza *Ale* artesanal sin filtrar constituye una matriz potencialmente favorable para la conservación de microorganismos probióticos viables. Por ello, la ejecución de ensayos de simulación del TGI, que evalúan la resistencia a jugos gástricos, pancreáticos y sales biliares, resulta un paso crítico para validar la robustez de las levaduras seleccionadas y su potencial funcional post fermentación (Vergara et al., 2023; Vergara, 2024).

En el Instituto de Biotecnología (IBT), de la Facultad de Ingeniería (FI) de la Universidad Nacional de San Juan (UNSJ), se inició en 2018 una línea de investigación para evaluar las aptitudes probióticas de levaduras autóctonas aisladas de viñedos y bodegas de la provincia de San Juan, ecosistemas donde los microorganismos han evolucionado adaptándose a condiciones ambientales hostiles como bajo pH, alta osmolaridad y concentraciones crecientes de etanol (Kurtzman et al., 2011; Vergara et al., 2023). Estas características presentan notables similitudes con las barreras del TGI humano, posicionando a estas levaduras como candidatas probióticas potenciales para la promoción de la salud. La integración de métodos cerveceros tradicionales con herramientas biotecnológicas constituye una estrategia de interés para optimizar la calidad del producto y favorecer la diferenciación en el sector cervecero artesanal regional. En este sentido, resulta fundamental considerar la multifuncionalidad de las levaduras seleccionadas, las cuales pueden desempeñar un doble rol durante el proceso productivo. Por un lado, actúan como agentes fermentativos responsables de la transformación del mosto cervecero y del desarrollo de perfiles sensoriales específicos, que permitan la diferenciación del producto (Senkarcinova et al., 2019; Vergara, 2024); por otro, pueden funcionar como microorganismos con potencial funcional probiótico al mantener su viabilidad en la matriz final (Zendeboodi et al., 2021). En este marco, se analizaron 96 aislamientos, de los cuales se seleccionaron 15 levaduras autóctonas con las mejores aptitudes probióticas (Vergara et al., 2023). Se evaluaron propiedades beneficiosas, como la disminución de niveles de colesterol, actividad antioxidante, antimicrobiana, inmunomoduladora y la síntesis de enzimas hidrolíticas (proteasas, amilasas y fitasas), vinculadas a la mejora de la digestibilidad (Vergara, 2024; Leiva Alaniz et al., 2025). No obstante, a pesar del creciente interés en cervezas funcionales, aún son limitados los estudios que evalúan de manera integral el desempeño tecnológico, fermentativo, sensorial y probiótico de levaduras autóctonas en cervezas artesanales sin filtrar, por lo que resulta necesario generar evidencia experimental que valide su seguridad, estabilidad y viabilidad en matrices reales. En consecuencia, el presente trabajo propuso la selección de una de estas 15 levaduras para su empleo como cultivo *starter* en una cerveza artesanal tipo *Ale*.

3. HIPÓTESIS

Las levaduras autóctonas aisladas de ambientes vitivinícolas con funcionalidad probiótica son propicias para ser empleadas como cultivos iniciadores (*starters*) en la elaboración de cerveza artesanal tipo *Ale*, estilo *Kölsch*, permitiendo la obtención de una cerveza con propiedades funcionales.

4. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Elaborar una cerveza funcional con propiedades organolépticas distintivas, mediante el uso de una levadura autóctona seleccionada con aptitudes probióticas.

4.2. Objetivos específicos

- Evaluar las características tecnológicas de levaduras autóctonas con potencial probiótico, con el fin de determinar su aptitud como cultivos *starter* en el proceso fermentativo de cerveza artesanal tipo *Ale*, estilo *Kölsch*, sin filtrar.
- Conducir el proceso fermentativo mediante la inoculación de una levadura autóctona seleccionada con aptitudes probióticas.
- Evaluar la supervivencia postfermentación de la levadura autóctona con aptitudes probióticas, bajo condiciones gastrointestinales simuladas.
- Evaluar las propiedades organolépticas de la cerveza artesanal tipo *Ale*, estilo *Kölsch*, elaborada mediante la implementación de la levadura autóctona seleccionada con aptitudes probióticas.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Microorganismos

Los aislamientos de levadura de origen vitivinícola utilizados en el presente trabajo fueron 15: *Hanseniaspora guilliermondii* (PB15), *Pichia kudriazzevii* (PB48, PB50, PB51, PB52, PB53 y PB100), *Pichia manshurica* (PB54), *Pichia occidentalis* (PB56, PB57, PB58), *Wickerhamomyces anomalus* (PB97, PB98, PB99), y *Saccharomyces cerevisiae* (PB101). Los mismos forman parte de la colección de cultivos microbianos del IBT-FI-UNSJ y fueron identificados bioquímica, morfológica y molecularmente mediante protocolos establecidos por Kurtzman et al. (2011) y Esteve- Zarzoso et al. (1999) (Figura 1).

Estas levaduras fueron seleccionadas de acuerdo con los siguientes parámetros:

- Rasgos de bioseguridad: actividad hemolítica y ureasa negativa, resistencia a antibacterianos (ampicilina 25, gentamicina 10, levofloxacin 10, rifampicina 20, tetraciclina 80, cloranfenicol 60 µg/mL) y sensibilidad al menos a 6 antifúngicos ensayados (ketoconazol 50, clotrimazol 10, fluconazol 10, itraconazol 10, miconazol 50, nistatina 100 µg/mL). Supervivencia mayor al 90 % de larvas de *G. mellonella*.

- Tolerancia a las condiciones del TGI: Crecimiento a 37, 39 y 42 °C, resistencia a valores de pH ácidos (2 y 3) y sales biliares (1 %) IR_{bilis} (Índice de Resistencia a las sales biliares) mayor o igual a 10.
- Propiedades para adherirse a las células epiteliales del intestino: hidrofobicidad, producción de biofilm (>cepa control) y autoagregación (> 85 %).
- Tolerancias a condiciones del TGI simuladas.
- Propiedades benéficas: Actividad antimicrobiana frente a enteropatógenos, actividades enzimáticas (lipasas, amilasas, esterasas, proteasas, fitasas), actividad antioxidante (resistencia al peróxido de hidrógeno, eliminación de radicales libres DPPH, actividad de captación de radicales hidroxilo), acción antagonista (producción de sideróforos, producción de ácidos orgánicos de cadena corta y etanol, producción de toxinas *killer*, actividad de la catalasa), capacidad para reducir el colesterol (Leiva Alaniz et al., 2025). Además, cuatro de este grupo de levaduras (PB54, PB97, PB98, PB99) presentan estudios de actividad inmunomoduladora, capacidad de adhesión a células Caco-2/TC-7, y efecto sobre la asociación e invasión de *Salmonella enterica* serovar Enteritidis CIDCA101 en células Caco-2/TC-7 (Vergara Alvarez et al., 2024).

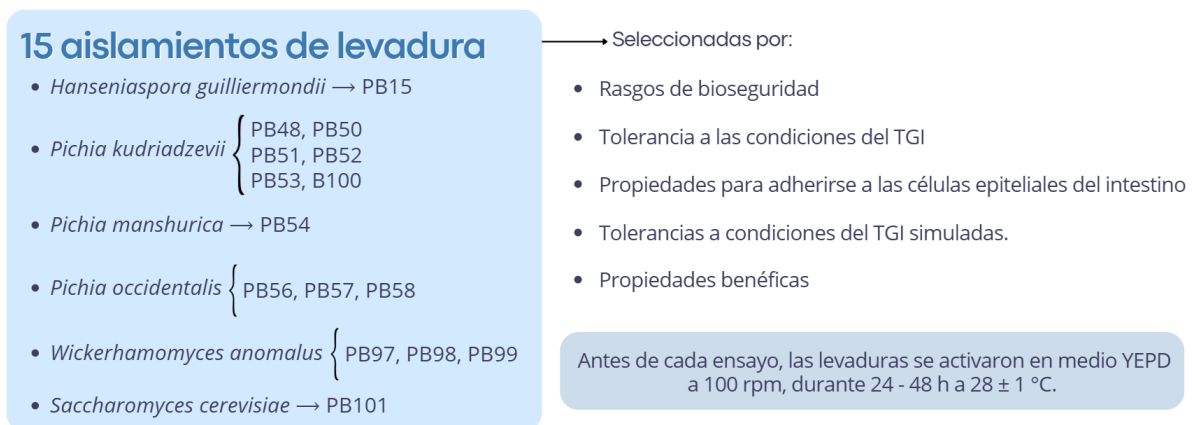


Figura 1: Aislamientos de levaduras de origen vitivinícola seleccionados para el estudio y criterios aplicados en su selección.

Como controles positivos se empleó un aislamiento de la especie *Brettanomyces spp.* para producción de fenoles volátiles y *Pichia spp.* para producción de ácido sulfhídrico, ambas pertenecientes a la colección del IBT-FI-UNSJ. Además, como control positivo del proceso fermentativo de cerveza tipo *Ale* sin filtrar se utilizó la cepa comercial *S. cerevisiae* US05 (® Fermentis, France). Como cepa de referencia probiótica se utilizó a *S. cerevisiae* var. *boulardii* CNCMI-745 (® Floratil).

Antes de cada ensayo, las levaduras se activaron en medio caldo YEPD (*Yeast Extract Peptone Dextrose*: 1 % extracto de levadura, 2 % peptona y 2 % dextrosa) a 100 rpm, durante 24 - 48 h a 28 ± 1 °C.

5.2. Caracterización tecnológica de levaduras para ser empleadas en el proceso fermentativo de cerveza tipo *Ale*.

5.2.1. Rasgos negativos

5.2.1.1. Actividad de descarboxilación

La capacidad de las levaduras para descarboxilar aminoácidos, produciendo AB, se evaluó según lo descrito por Zullo et al., (2019) con modificaciones. Se realizó un medio que contenía (g/L): glucosa, 0.1; púrpura de bromocresol 0.06; *Yeast Nitrogen Base* (YNB), 6.7; agar 15; pH final ajustado a 5.3. Después de la esterilización, se añadió a la solución 1 g/L de cada aminoácido (L-lisina, L-histidina, L-arginina), previamente esterilizados por filtración (0.22 μ m). Las levaduras fueron sembradas puntualmente (5 μ L) y después de 4 días de incubación a 25 ± 1 °C, se designó como positiva a aquellas en las cuales se visualizó un halo violeta alrededor de la siembra.

5.2.1.2. Determinación de compuestos *Off-flavors*

- Producción de fenoles volátiles

Las levaduras fueron sembradas en estría en medio Brett-agar que contenía (g/L): glucosa 10, extracto de levadura 10, agar 15, cloranfenicol 0.5, ciclohexamida 0.05, ácido ρ -cumárico 0.4, etanol 99.9 %, 6 v/v, a pH 5.0. Paralelamente se sembró una concentración de 1×10^6 UFC/mL de cada aislamiento en 7 mL de medio Brett líquido. Tanto el medio agarizado como el líquido fueron incubados de 7 a 10 días a 28 ± 1 °C. Luego de incubación, se determinó la aptitud indeseable de los aislamientos mediante dos criterios: en el medio sólido se evaluó el crecimiento como indicador de resistencia a la ciclohexamida, mientras que en el medio líquido la determinación fue cualitativa mediante olfacción. Se consideró un resultado positivo la detección de aromas fenólicos, en comparación con el control positivo *Brettanomyces spp.*

- Producción de ácido sulfhídrico (H₂S)

Las levaduras se sembraron en estrías medio *Bismuth Glucose Glycine Yeast* (BIGGY-agar) (BBLTM, *Becton, Dickinson and Company, Sparks*, EE.UU., *Le Pont de Claix*, Francia) y se incubaron por 72 h a 25 ± 1 °C. Se evaluó de forma cualitativa el color utilizando una escala arbitraria propuesta por Comitini et al. (2011), donde para el color: 1, color blanco (sin

producción); 2, marrón claro; 3, marrón; 4, marrón oscuro (alta producción). Como control positivo se utilizó *Pichia spp* (Figura 2).



Figura 2: Imagen representativa de la escala arbitraria propuesta por Comitini et al., (2011) para el color de los aislamientos estriados. Imagen generada con ayuda de inteligencia artificial utilizando *ChatGPT* (*OpenAI*, GPT-5)

5.2.2. Rasgos positivos

5.2.2.1. Determinación cuantitativa de actividad β -glucosidasa

Los aislamientos, previamente activados, fueron inoculados e incubados durante 72 h, a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ en agitación constante en medio para inducción de producción de enzimas β -glucosidasas (g/L): YNB sin aminoácidos, 7; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 5; Extracto de levadura, 5; Peptona, 5; Glucosa, 5 en buffer Citrato-Fosfato 50 mM pH 5 (Rodríguez et al., 2004). Con el fin de estudiar la localización de la actividad enzimática, las levaduras desarrolladas en el medio para producción de β -glucosidasa fueron centrifugadas (13000 rpm durante 10 min) para obtener:

- *Pellet* el cual fue resuspendido en buffer citrato fosfato 50 mM pH 5.0 (enzimas del espacio periplasmático).
- El sobrenadante de cultivo libre de células (enzimas extracelulares).

El sistema de reacción se preparó de la siguiente manera: incubación 0.3 mL del sobrenadante o el pellet del cultivo con 0.3 mL de sustrato durante 1 h a $30 \pm 1^\circ\text{C}$ en condiciones estériles. Luego se añadió 1.2 mL de carbonato de sodio 1 M para detener la reacción. El p -nitrofenol liberado se midió a 400 nm (Rosi et al., 1994; Chassagne et al., 2005). Una unidad (U) de β -glucosidasa se definió como la cantidad de enzima que libera un μmol de p -nitrofenol/h, bajo las condiciones especificadas (Maturano et al., 2012). Se utilizó p -nitrofenol para realizar la curva de calibración. Las lecturas del espectrofotómetro se obtuvieron utilizando un fotómetro de microplacas (Thermo Fisher Scientific Multiskan™ FC Microplate Photometer) (Figura 3).

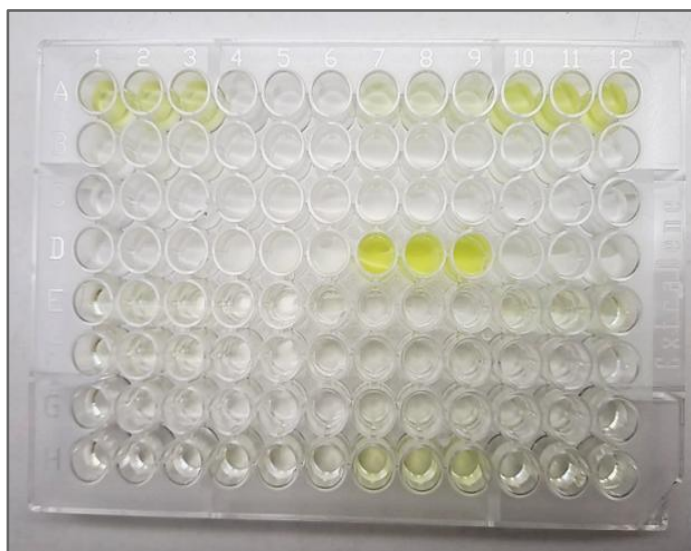


Figura 3: Determinación de la actividad β -glucosidasa en microplaca (96 pocillos) según la metodología propuesta por Maturano (2012).

5.2.2.2. Metabolización de azúcares por metabolismo fermentativo

Se inoculó una concentración de 5×10^6 cel/mL de cada aislamiento en tubos de ensayo con 5 mL de medio líquido YNB (6,7 g/L) y el azúcar en estudio (20 g/L). Los glúcidos evaluados (glucosa, sacarosa, fructosa y maltosa) fueron seleccionados por ser los principales constituyentes del mosto cervecero. Previo a la inoculación, el pH de los medios se ajustó a 5.2 con ácido fosfórico 1 N para simular las condiciones iniciales de la fermentación. Con este experimento se determinó la capacidad de metabolización de los azúcares vía fermentativa. En cada tubo se colocó una campana de *Dürham* invertida para entrapamiento de gases y fue cerrado herméticamente (Suárez Lepe, 2006). Los tubos se incubaron durante 96 h a 19 ± 2 °C, estableciéndose como parámetro de medida el entrapamiento de CO₂ en los tubos con medio líquido evidenciado por el llenado completo de la campana. Como control positivo se utilizó YNB glucosa.

La aptitud fermentativa de los aislamientos fue evaluada mediante ensayos de metabolización por vía fermentativa de sacarosa, fructosa y maltosa, así como en mosto cervecero. El resultado se analizó mediante la observación de patrones de respuesta fermentativa, considerando el volumen relativo de CO₂ producido en la campana de *Dürham* y el tiempo de inicio de la fermentación.

5.2.2.3. Metabolización de azúcares por vía fermentativa en mosto cervecero

Se inoculó una concentración de 5×10^6 cel/mL de cada aislamiento en tubos de ensayo con 5 mL de mosto cervecero (20 IBU, densidad inicial 1048, pH 5.2), previamente esterilizado

a 0.5atm durante 10 min para evitar la caramelización de los azúcares presentes en el mismo. Dentro de cada tubo se colocó una campana de *Dürham* invertida para atrapamiento de gases, y se sellaron herméticamente (Suárez Lepe, 2006). Los tubos se incubaron durante 96 h a $19 \pm 2^\circ\text{C}$. El parámetro a medir fue el atrapamiento de CO_2 en los tubos con mosto cervecero, registrándose como resultado positivo el llenado total de la campana (Figura 4).

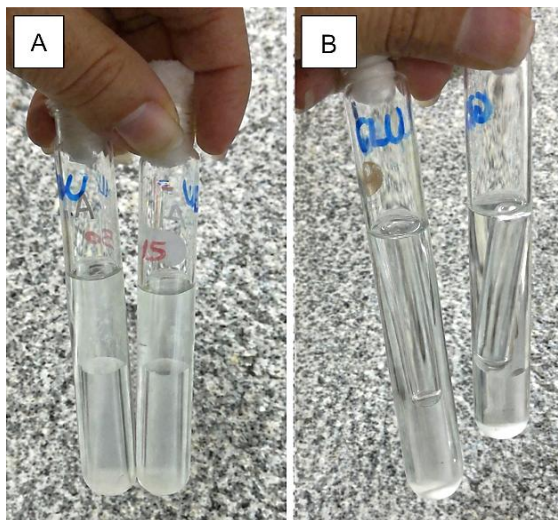


Figura 4: “A” representa un atrapamiento de 50 % o menos de CO_2 en la campana de *Dürham* y “B” un atrapamiento de 50 % o más de CO_2 de la campana.

5.3. Proceso fermentativo de cerveza tipo *Ale* estilo *Kölsch* a escala de laboratorio

De acuerdo a los resultados de la caracterización tecnológica (metodología 5.2), se seleccionó una levadura para conducir el proceso fermentativo. Se llevó a cabo un ensayo comparativo utilizando dos tratamientos: la levadura, que se seleccionará según parámetros descritos anteriormente, y una cepa comercial *S. cerevisiae* US05 utilizada como control. En ambos casos, el inóculo fue de 1×10^7 cel/mL de levadura (previamente activada) en frascos Erlenmeyer de 2000 mL de capacidad, conteniendo 1400 mL de mosto cervecero con una densidad inicial de 1046 °DI (equivalente a grados Plato, °P), 20 IBU (International Bitterness Units) y pH 5.2. Se incubaron en condiciones estáticas a $18 \pm 1^\circ\text{C}$. El mosto cervecero empleado fue estilo *Kölsch* (dorada pampeana) facilitado por la cervecería Donata del Desierto, San Juan, Argentina. Dicho mosto fue tomado directamente en la planta productora tras finalizar la etapa de hervor, asegurando la obtención de un mosto estéril (Figura 5). Posteriormente, el material fue envasado en recipientes estériles con cierre hermético y trasladado al laboratorio bajo condiciones de refrigeración para su conservación y posterior utilización en los ensayos experimentales.

El monitoreo de la cinética fermentativa se llevó a cabo mediante la medición de la densidad del mosto, utilizando un densímetro, y de la pérdida de peso del sistema fermentativo, empleando una balanza con una precisión de 0.01 g. Asimismo, se realizaron tomas periódicas de muestras para su observación microscópica, así como diluciones seriadas y siembra en medio YEPD-agar, con el fin de determinar la población de levaduras viables durante el proceso fermentativo (Figura 5).

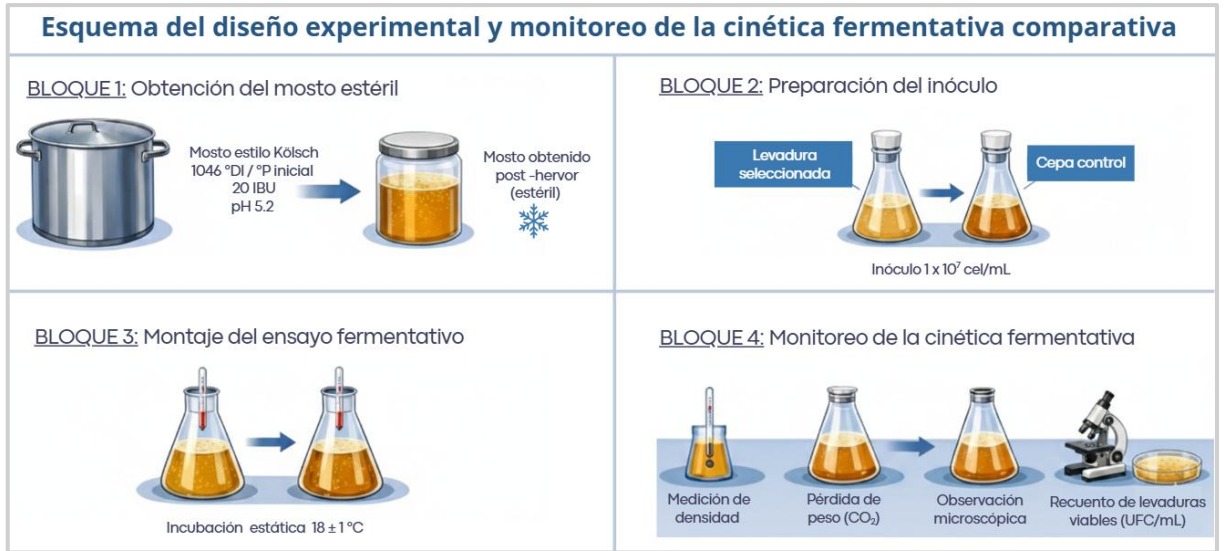


Figura 5: Esquema del diseño experimental y del monitoreo de la cinética fermentativa comparativa en mosto estilo *Kölsch* estéril. Imagen generada con ayuda de inteligencia artificial utilizando *ChatGPT* (*OpenAI*, modelo GPT-5)

Los parámetros determinados al final de la fermentación fueron:

*Atenuación aparente (AA): es el porcentaje de azúcares fermentables consumidos (Mestre et al., 2017; Canonico et al., 2021),

$$AA = 100 * \left(\frac{(D_{inicial} - D_{final})}{D_{inicial}} \right)$$

Donde:

Dinicial: Densidad del mosto antes de iniciar la fermentación.

Dfinal: Densidad al finalizar la fermentación.

*Poder fermentativo (PF): se estimó como la capacidad de la levadura para producir etanol expresado en % v/v (Capece et al., 2018; Pietrafesa et al., 2023).

$$PF = \frac{(D_{inicial} - D_{final})}{7.5}$$

Donde: 7.5 corresponde a la constante estequiométrica empírica derivada de la relación teórica entre consumo de glucosa y producción de etanol.

Para la determinación del contenido alcohólico y la atenuación, los valores de gravedad específica se convirtieron al formato de puntos. El procesamiento de estos datos se realizó mediante la herramienta digital Brewfather (Alcohol Calculator), aplicando las fórmulas estándar de atenuación aparente y de estimación de alcohol por volumen (% v/v), empleando en este último caso la constante estequiométrica de 7.5.

5.4. Simulación del tracto gastrointestinal de levadura *starter*

Se llevó a cabo siguiendo la metodología propuesta por Vergara et al. (2023). Se realizaron soluciones que simulaban las condiciones de digestión gástrica (DG) y digestión pancreática (DP) *in vitro*. Para la DG, se preparó un jugo gástrico (JG) sintético en una solución *buffer* a pH 2.0 compuesta por (g/L): NaCl 2.05; KH₂PO₄ 0.60; CaCl₂ 0.11 y KCl 0.37. Después de la esterilización del medio, se adicionó pepsina (3 g/L) esterilizada por filtración (0.22 μm), para completar la solución gástrica. La simulación de jugo pancreático (JP) se realizó utilizando una solución *buffer* con pH de 7.0, ajustado con HCl 1M, formulado con (g/L): sales biliares 3.0, pancreatina esterilizada por filtración, Na₂HPO₄ 26.9 y NaCl 8.5.

Para determinar la resistencia de la levadura tras la simulación del TGI, se utilizó como inóculo las células viables de la levadura *starter* recolectada luego de la etapa de fermentación y maduración. Para la fase gástrica se inocularon las levaduras en 7 mL de JG estéril, luego de 3 h de incubación a 37 °C a 100 rpm, se recolectaron las levaduras y se resuspendieron en 7 mL de JP simulado estéril. La suspensión se incubó a 37 ± 1 °C durante 3 h a 100 rpm. En ambas fases se determinó el porcentaje de supervivencia mediante siembra en placa a los 0, 1.5 y 3 h.

$$\% \text{ supervivencia} = \left(\frac{(\ln n^{\circ} \text{ UFC / mL final})}{(\ln n^{\circ} \text{ UFC / mL inicial})} \right) * 100$$

Dónde:

ln n° inicial UFC/mL es el logaritmo natural del número inicial de unidades formadoras de colonias por mililitro.

ln n° final UFC/mL es el logaritmo natural del número final de unidades formadoras de colonias por mililitro.

5.5. Evaluación sensorial de cerveza tipo *Ale* estilo *Kölsch*

Al finalizar el proceso fermentativo, las cervezas se conservaron a 4 ± 1 °C durante dos semanas sin carbonatar para su maduración. Luego se sometieron a un análisis sensorial en las instalaciones productivas de las cervecías artesanales Ancestral y Donata del Desierto

(San Juan, Argentina), siguiendo la metodología propuesta por Mestre Furlani et al. (2024). El análisis se realizó mediante una prueba a ciegas con un panel conformado por 8 evaluadores de entre 25 y 45 años (1 mujer, 7 varones). Debido a que las muestras se suministraron sin carbonatación previa, la valoración visual y de espuma fue omitida, centrándose el estudio exclusivamente en los caracteres olfativos y gustativos (Figura 6).

El panel puntuó atributos específicos, tales como aroma (ésteres y fenoles), sabor (balance amargor/dulzor) y sensación en boca (cuerpo), utilizando una escala estructurada de 1 a 5, mientras que la aceptación general del producto se valoró en un rango de 1 a 10. Las muestras fueron servidas a una temperatura controlada de 4 ± 1 °C en vasos descartables (Figura 6).

La evaluación sensorial se utilizó para determinar la aceptabilidad e identificar caracteres aromáticos y gustativos. Esto abre la posibilidad de realizar la fermentación en otros estilos de mosto cervecero a la cual se adecue mejor al perfil de la levadura seleccionada.

HOJA DE EVALUACIÓN DE CERVEZA

Muestra: _____ Catador: _____ Fecha: _____

AROMAS					GUSTO				
MALTA					AMARGO				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
LUPULO					ACIDO				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
FRUTAS MADURAS					SALADO				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
FLORAL					ASTRINGENCIA				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
PIMIENTA					BALANCE				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
CLAVO					CUERPO				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
MANZANA					RETROGUSTO				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
BANANA					EQUILIBRIO				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
ALCOHOL					INTENSIDAD				
1	2	3	4	5	1	2	3	4	5

VALORACIÓN GENERAL (1 AL 10):

Nota:

ESTILO AL QUE MÁS SE PUEDE ADAPTAR:

Figura 6: Hoja de evaluación sensorial entregada al panel de catadores en las cervecerías artesanales Ancestral y Donata del Desierto (San Juan, Argentina).

5.8. Análisis estadístico

Cada ensayo se realizó de forma independiente por triplicado y los resultados representan el promedio de las 3 determinaciones con la desviación estándar correspondiente (\pm DE). Los datos experimentales se procesaron con análisis de varianza (ANOVA), se utilizó la prueba de Shapiro-Wilk para supuesto de normalidad y la prueba de Levene para homogeneidad de varianza. Las diferencias significativas se determinaron mediante la prueba de Tukey y los resultados se consideraron significativos si el valor de p asociado era $< 0,05$.

El análisis estadístico se realizó utilizando el software R versión 4.5.1 (R Core Team, 2025; <https://www.R-project.org>), mientras que la representación gráfica y el análisis descriptivo de los datos se efectuaron con Microsoft Excel.

6. RESULTADOS

6.1. Caracterización tecnológica de levaduras para ser empleadas en el proceso fermentativo de cerveza tipo *Ale*.

6.1.1. Rasgos negativos

6.1.1.1. Actividad de descarboxilación

Ninguna de las 15 levaduras ensayadas presentó actividad de descarboxilación frente a los aminoácidos L-lisina, L-histidina y L-arginina, precursores de AB, bajo las condiciones experimentales empleadas (Tabla 1 y Figura 7).

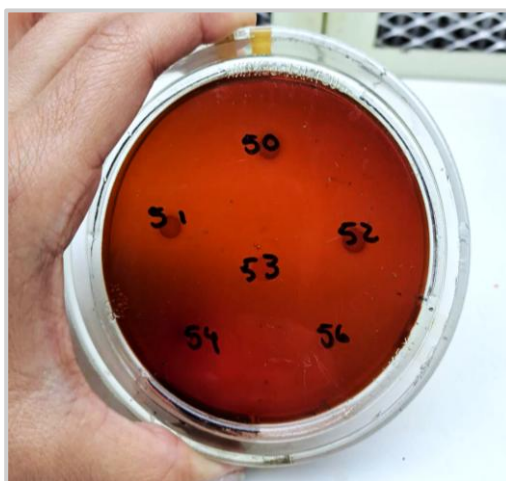


Figura 7: Ensayo *in vitro* para la detección de actividad de descarboxilación frente a los aminoácidos L-lisina, L-histidina y L-arginina. En la imagen se observa que las levaduras mostraron actividad negativa.

6.1.1.2. Determinación de compuestos *Off-flavors*

Los aislamientos *H. guilliermondii* PB15 y *W. anomalus* PB98 crecieron en el medio ensayado y produjeron fenoles volátiles detectables.

En cuanto a la producción de H₂S, los aislamientos de género *Pichia* presentaron valores de 4 dentro de la escala (alta producción de H₂S). Los aislamientos *W. anomalus*, PB97, PB98 y PB99 presentaron una leve coloración marrón por lo que se infiere un nivel de producción bajo (valores 2 y 3), mientras que *S. cerevisiae* PB101 presentó valor de escala 1 (producción nula) (Figura 8).

La caracterización tecnológica permitió identificar aislamientos con atributos considerados no deseables para su aplicación en el proceso fermentativo cervecero. En función de los resultados obtenidos (Tabla 1), se seleccionaron para los ensayos posteriores las

levaduras *W. anomalus* PB97, PB98, PB99 y *S. cerevisiae* PB101, al no presentar producción detectable de compuestos indeseables en las condiciones evaluadas.

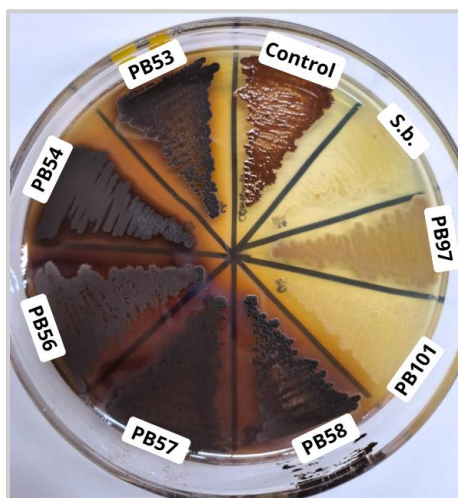


Figura 8: Producción de H₂S detectado en medio Biggy-agar de las levaduras ensayadas junto al control positivo y cepa de referencia probiótica.

Tabla 1: Producción de fenoles volátiles (medio BRETT) ,producción de H₂S (medio Biggy-agar) y actividad de descarboxilación de aminoácidos.

Nomenclatura	Especie	BRETT		BigGy-agar	Actividad de descarboxilacion
		agar	liquido	Valor de escala	
PB15	<i>Hanseniaspora guilliermondii</i>	+	+	-	-
PB48	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4	-
PB50	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4	-
PB51	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4	-
PB52	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4	-
PB53	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4	-
PB54	<i>Pichia masmurica</i>	-	-	4	-
PB56	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	4	-
PB57	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	4	-
PB58	<i>Pichia occidentalis</i>	-	-	4	-
PB97	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	-	-	2	-
PB98	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	-	+	2	-
PB99	<i>Wickeranomyces anomalus</i>	-	-	2	-
PB100	<i>Pichia kudriadzevii</i>	-	-	4	-
PB101	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	1	-
S.b.	<i>Saccharomyces cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i> CNCM I-745	-	-	1	-
US05	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	-	-	1	-
Control	<i>Picchia spp.</i>			3	
Control	<i>Brettanomyces spp.</i>	+	+		

Referencia: Detección positiva de volátiles fenólicos en medio agarizado y/o en medio líquido (+). Los números indican la escala arbitraria propuesta por Comitini et al. (2011) para el color de los aislamientos estriados de 1, color blanco (sin producción); 2, marrón claro; 3, marrón; 4, marrón oscuro (alta producción). En verde se presentan las levaduras que no presentaron actividad de descarboxilación de aminoácidos. Las celdas sombreadas en color rojo identifican a los aislamientos que poseen rasgos tecnológicos negativos.

6.1.2. Rasgos positivos

6.1.2.1. Determinación cuantitativa de actividad β -glucosidasa

La actividad enzimática, expresada en U/(g peso seco/mL), difirió significativamente entre aislamientos y entre fracciones celulares (Figura 9).

En la fracción periplasmática, los niveles de actividad oscilaron entre 128.6 ± 15.2 y 2755.2 ± 150.4 . El mayor valor de actividad se registró en el aislamiento *W. anomalus* PB99 ($\sim 2755.2 \pm 150.4$), seguido por un grupo de alta actividad integrado por *H. guillermondii* PB15 ($\sim 2000 \pm 195.8$) y *W. anomalus* PB98 ($\sim 1940 \pm 128.5$). Se observaron valores intermedios en aislamientos como *P. kudriadzevii* PB51 (688.4 ± 45.2) y *P. kudriadzevii* PB100 (352.1 ± 28.6). Por el contrario, los aislamientos *P. kudriadzevii* PB53 ($\sim 135.2 \pm 18.4$), *P. occidentalis* PB58 ($\sim 128.6 \pm 15.2$) presentaron los menores valores de actividad registrados.

La actividad β -glucosidasa en el sobrenadante, fue considerablemente menor que en la fracción periplasmática. El grupo de mayor actividad estuvo representado por *W. anomalus* PB97 (500.0 ± 35.6) y PB99 (350.0 ± 22.1) y PB98 (275.0 ± 18.4). En valores intermedios se ubicaron aislamientos como *S. cerevisiae* PB101 (185.5 ± 14.2) y *P. occidentalis* PB56 (115.8 ± 12.4). Los grupos de menor actividad incluyeron a *P. kudriadzevii* PB51 (72.4 ± 8.1) y PB52 (21.2 ± 4.5).

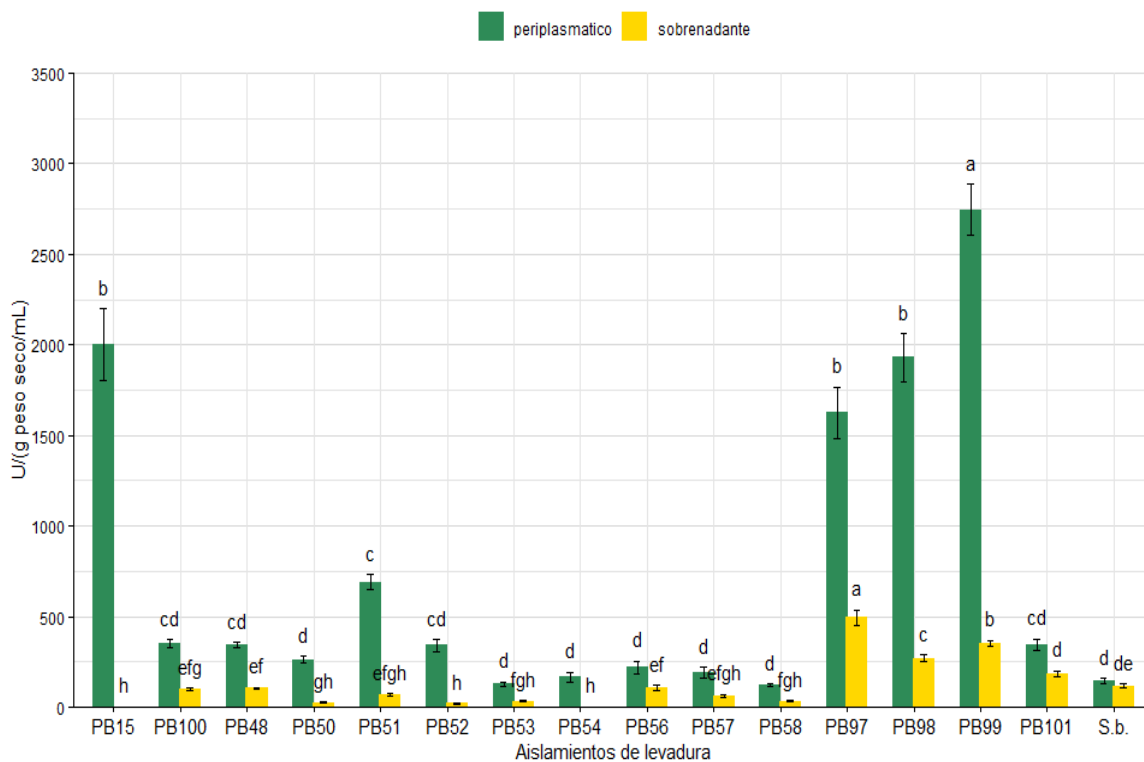


Figura 9: Actividad β -glucosidasa extracelular (sobrenadante) y periplásmica expresada en U/(g peso seco/mL) determinada en los aislamientos de levadura en estudio. Los datos representan el promedio \pm DE de las repeticiones independientes. Las letras sobre las columnas indican diferencias estadísticamente significativas entre aislamientos dentro de cada fracción, determinadas mediante un análisis de la varianza (ANOVA, $p < 0,05$) seguido de un test a posteriori de Tukey.

6.1.2.2. Fermentación de azúcares del mosto cervecero

El ensayo mostró diferencias entre los aislamientos en cuanto a su capacidad fermentativa. Los aislamientos *W. anomalous* PB98 y PB99 presentaron respuestas positivas frente a los 3 carbohidratos evaluados, con una producción de CO_2 superior o igual al 50 %, con un inicio de fermentación a las 48 h. Por el contrario, la levadura *W. anomalous* PB97 mostró una respuesta fermentativa incompleta, caracterizada por la ausencia de fermentación de maltosa, indicado por una producción nula de CO_2 . Dado que la maltosa constituye uno de los principales azúcares fermentables del mosto cervecero, esta limitación metabólica permitió diferenciar a *W. anomalous* PB97 del resto de los aislamientos, justificando su exclusión de las etapas posteriores del estudio (Tabla 2).

El aislamiento *S. cerevisiae* PB101 se destacó en el análisis comparativo por mostrar una buena respuesta fermentativa en todos los carbohidratos ensayados y en mosto cervecero, con un inicio de actividad observable a las 48 h de incubación (Figura 10); este patrón fue comparable a la cepa control comercial *S. cerevisiae* US05. Desde una perspectiva descriptiva,

S. cerevisiae PB101 presentó un perfil consistente, con respuestas positivas simultáneas en todas las condiciones evaluadas, sin registrar valores intermedios o nulos.

Mientras que otras levaduras mostraron capacidades heterogéneas, *S. cerevisiae* PB101 se distinguió por combinar mejor rendimiento y estabilidad en los distintos sustratos. Debido a este desempeño, comparable a los estándares de la industria cervecera, este aislamiento fue seleccionado para continuar su evaluación para ser empleado como *starter* (Figura 11).

Tabla 2: Metabolización por vía fermentativa de carbohidratos (sacarosa, fructosa, maltosa) y metabolización por vía fermentativa en mosto cervecero.

Cepa	Glucosa (control)				Sacarosa				Fructosa				Maltosa				Mosto Cerveceo				
	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	24 h	48 h	72 h	96 h	
PB97		+				+				+											
PB98		+				+				+					+					+	
PB99		+				+					+				+					+	
PB101		+				+				+				+	+					+	
S.b.	+				+	+				+				+						+	
US05	+				+					+				+						+	

Referencia: En verde se presentan aquellas levaduras que llenaron la campana de *Dürham* más de un 50 % del volumen total. En amarillo se muestran aquellas levaduras que llenaron de CO₂ la campana de *Dürham* en un 50 % o menos. Se muestra el símbolo "+" para aquellos aislamientos que metabolizaron azúcares por vía fermentativa igual al control (YNB glucosa). En sombreado rojo se observa la levadura descartada por no presentar la caracterización tecnológica adecuada.

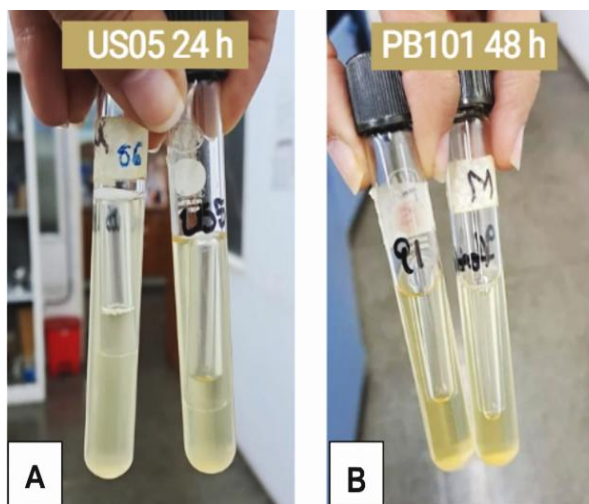


Figura 10: Fermentación de azúcares en mosto cervecero luego de 24 h, US05 (A) y 48 h, PB101 (B) de incubación. Se puede comparar el CO₂ retenido en las campanas de *Dürham* entre la cepa comercial *S. cerevisiae* US05 y la levadura autóctona *S. cerevisiae* PB101.

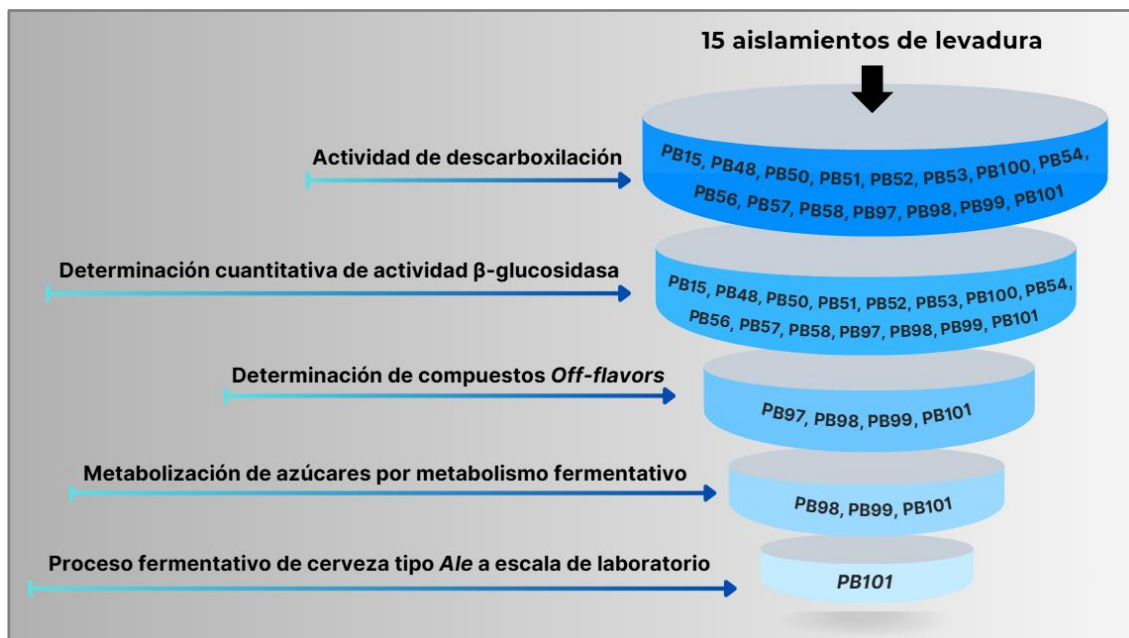


Figura 11: Esquema del proceso de selección progresiva de aislamientos de levaduras a partir de 15 aislamientos iniciales, basado en la evaluación secuencial de propiedades tecnológicas y enzimáticas. Se indican las etapas de análisis: actividad de descarboxilación, determinación cuantitativa de actividad β-glucosidasa, evaluación de compuestos *off-flavors*, capacidad de metabolización de azúcares por metabolismo fermentativo y ensayo de fermentación de cerveza tipo *Ale* a escala de laboratorio. En cada etapa se muestran los aislamientos que cumplieron los criterios establecidos, evidenciando la reducción progresiva del número de levaduras hasta la selección final de *S. cerevisiae* PB101 para el ensayo fermentativo.

Selección de cultivos *starter* para proceso fermentativo de cerveza tipo *Ale* sin filtrar:

6.2. Proceso fermentativo de cerveza tipo *Ale* estilo *Kölsch* a escala de laboratorio

La evaluación del proceso fermentativo se realizó mediante un ensayo con dos tratamientos: el aislamiento seleccionado autóctono *S. cerevisiae* PB101 y la cepa comercial *S. cerevisiae* US05 utilizada como control. La cerveza fermentada con la levadura *S. cerevisiae* PB101 registró un contenido alcohólico de 4.3 % v/v, un pH de 4.18, densidad inicial de 1046, densidad final de 1013 y una atenuación aparente media de 70.9 %. En comparación, la cepa comercial de control *S. cerevisiae* US05 presentó un contenido alcohólico de 4.9 % v/v, pH 4.36, densidad inicial de 1046, densidad final de 1009 y atenuación aparente media de 79.8 %.

La evaluación del proceso fermentativo evidenció la capacidad productiva de la levadura *S. cerevisiae* PB101 durante los 14 días de estudio (Figura 12). El análisis estadístico no mostró una interacción significativa entre el factor levadura y el tiempo ($p = 0.8003$), indicando que el aislamiento autóctono mantiene una cinética de fermentación paralela a la de la cepa comercial. En cuanto a la magnitud de producción de CO₂, la levadura *S. cerevisiae*

PB101 mostró una eficiencia de conversión que se estabilizó en torno a los 35.9 g/L hacia el final del ensayo. Si bien se observaron diferencias significativas entre las levaduras ($p < 0.001$), con una producción superior por parte de la cepa control (45 g/L), el aislamiento *S. cerevisiae* PB101 mantuvo un perfil de producción de CO₂ constante desde las primeras 24 h del proceso.

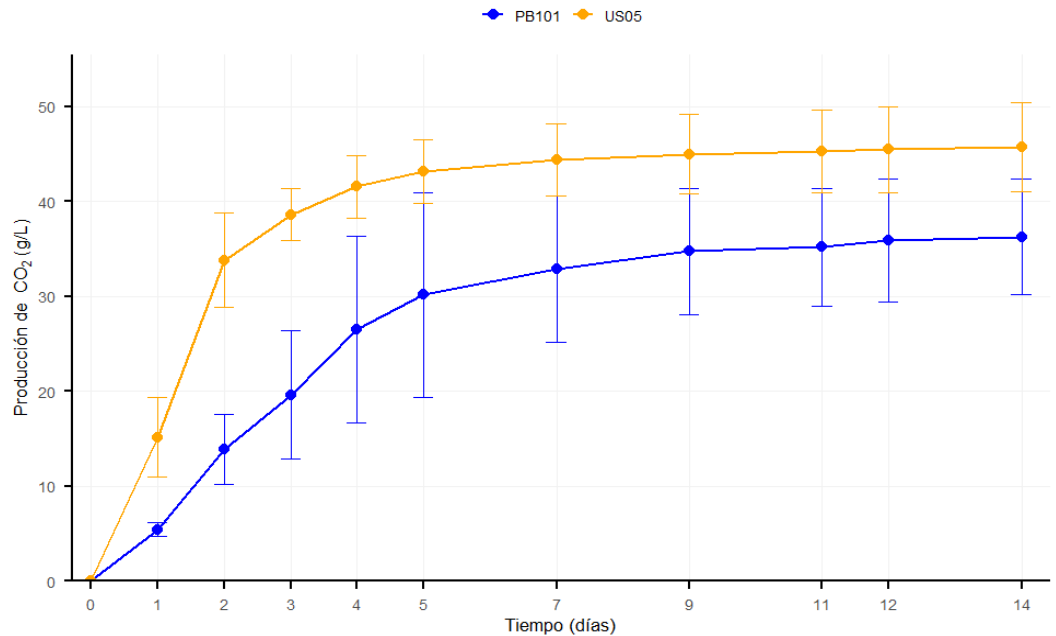


Figura 12: Producción de CO₂ a lo largo del proceso fermentativo de las levaduras *S. cerevisiae* PB101 (levadura autóctona) y *S. cerevisiae* US05 (levadura comercial).

Para complementar el análisis del proceso fermentativo, se evaluó la cinética de crecimiento celular de la levadura autóctona *S. cerevisiae* PB101 mediante el recuento de UFC (Log₁₀ UFC/mL) durante 14 días. El análisis de varianza no mostró una interacción significativa entre el factor aislamiento y el tiempo de fermentación ($p = 0.0959$), indicando que *S. cerevisiae* PB101 sigue una cinética de crecimiento similar a la de la cepa de referencia a lo largo del periodo ensayado.

Como se detalla en la Figura 13, *S. cerevisiae* PB101 mostró un crecimiento poblacional consistente durante las primeras 72 h, caracterizado por una fluctuación inicial tras la inoculación, similar a la del control. Durante los 14 días de ensayo, la levadura *S. cerevisiae* PB101 se mantuvo estable, oscilando cerca de los 7.9 Log₁₀ UFC/mL, mientras que la cepa comercial *S. cerevisiae* US05 alcanzó niveles superiores a los 8.2 Log₁₀ UFC/mL entre los días 5 y 9. Hacia el final del proceso, ambas levaduras ingresaron en la fase de declive, finalizando *S. cerevisiae* PB101 con una densidad celular ligeramente inferior (7.6 Log₁₀ UFC/mL) respecto a *S. cerevisiae* US05 (7.8 Log₁₀ UFC/mL).

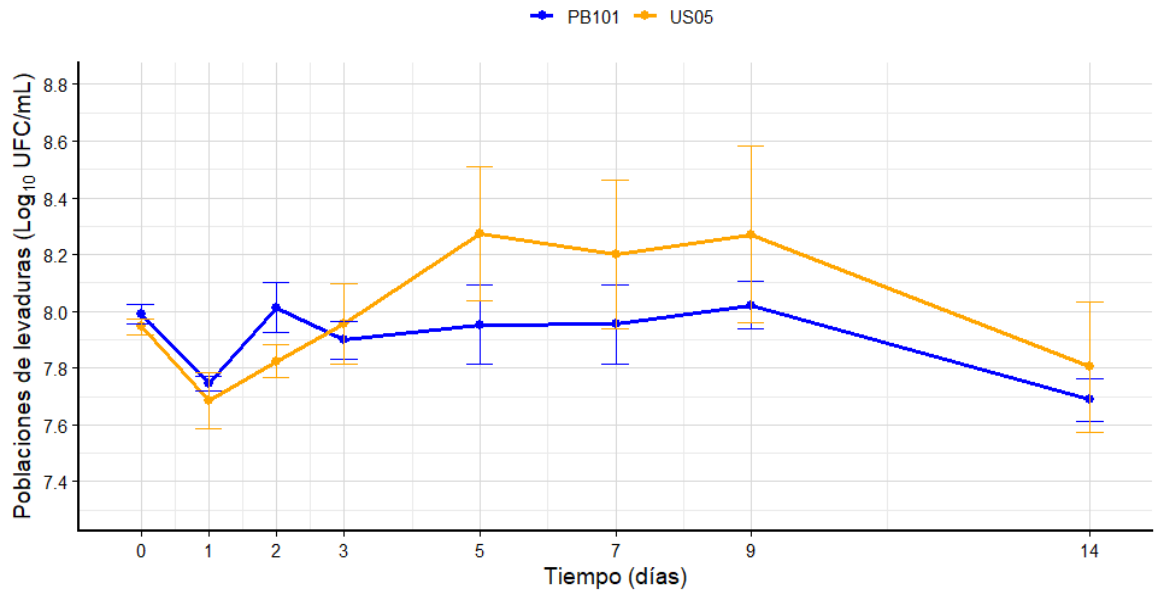


Figura 13: Cinética de crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae* PB101 (levadura autóctona) y *S. cerevisiae* US05 (levadura comercial).

6.3. Simulación del tracto gastrointestinal posterior a la fermentación de mosto cervecero.

Se llevó a cabo la simulación del pasaje por el TGI de la levadura *starter* con aptitudes probióticas *S. cerevisiae* PB101 luego de haber llevado a cabo el proceso fermentativo y la maduración. El ensayo de resistencia de la levadura se inició con un recuento inicial de 3.21×10^7 UFC/mL. Al finalizar la fase gástrica, se registró una supervivencia del 90.96 % (6.74×10^6 UFC/mL). En la transición hacia la fase duodenal, partiendo del recuento previo (6.74×10^6 UFC/mL), se registró una supervivencia de 98.21 % (5.09×10^6 UFC/mL) al concluir esta etapa.

Al considerar el tránsito gastrointestinal completo, desde la fase gástrica inicial hasta el final de la fase duodenal, la levadura *S. cerevisiae* PB101 mantuvo una supervivencia total del 89.34 % (Figura 14).

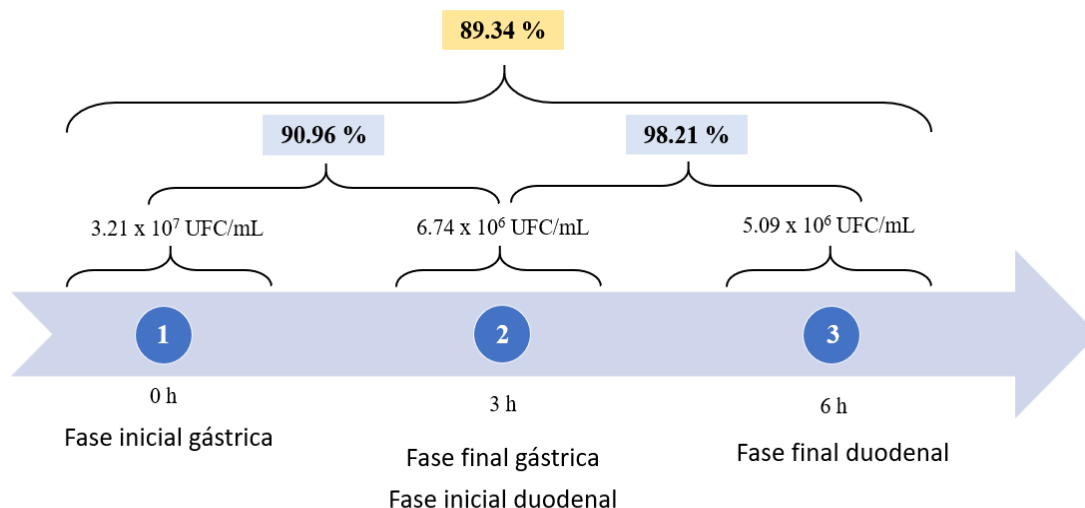


Figura 14: Simulación del TGI posterior a la fermentación de mosto cervecero y maduración. La flecha central indica la progresión del tiempo (h) a través de las distintas fases. Los valores en azul claro representan el % de supervivencia por fase mientras que el valor superior en color amarillo representa el % de supervivencia total del proceso. Las concentraciones se expresan en UFC/mL.

6.4. Evaluación sensorial de cerveza tipo *Ale* estilo *Kölsch*

Los resultados de la evaluación sensorial de la cerveza elaborada con las levaduras *S. cerevisiae* US05 y PB101, evidenciaron una valoración general positiva. Con respecto a los atributos aromáticos, *S. cerevisiae* PB101 se distinguió por una mayor intensidad en las notas a clavo de olor y banana (Figura 15 A). Mientras que la cepa comercial mantuvo una dominancia en los atributos de malta, lúpulo y manzana, *S. cerevisiae* PB101 mostró una mayor puntuación en los descriptores de levadura y notas florales. Este perfil aromático permitió asociar a *S. cerevisiae* PB101 con estilos de cerveza *Belgian*, donde la expresión fenólica es una característica fundamental.

En relación con los aspectos gustativos, (Figura 15 B), los datos reflejan un perfil equilibrado para *S. cerevisiae* PB101, con puntuaciones superiores en las notas ácidas y dulces en comparación con la cepa control. Mientras que la cepa comercial presentó niveles de amargor y astringencia más pronunciados, *S. cerevisiae* PB101 mantuvo intensidades menores. Finalmente, aunque el cuerpo y la intensidad total fueron ligeramente menores que en el control, *S. cerevisiae* PB101 presentó un equilibrio global y un retrogusto comparables, consolidando un perfil sensorial más suave, complejo y con una identidad marcadamente fenólica-frutal.

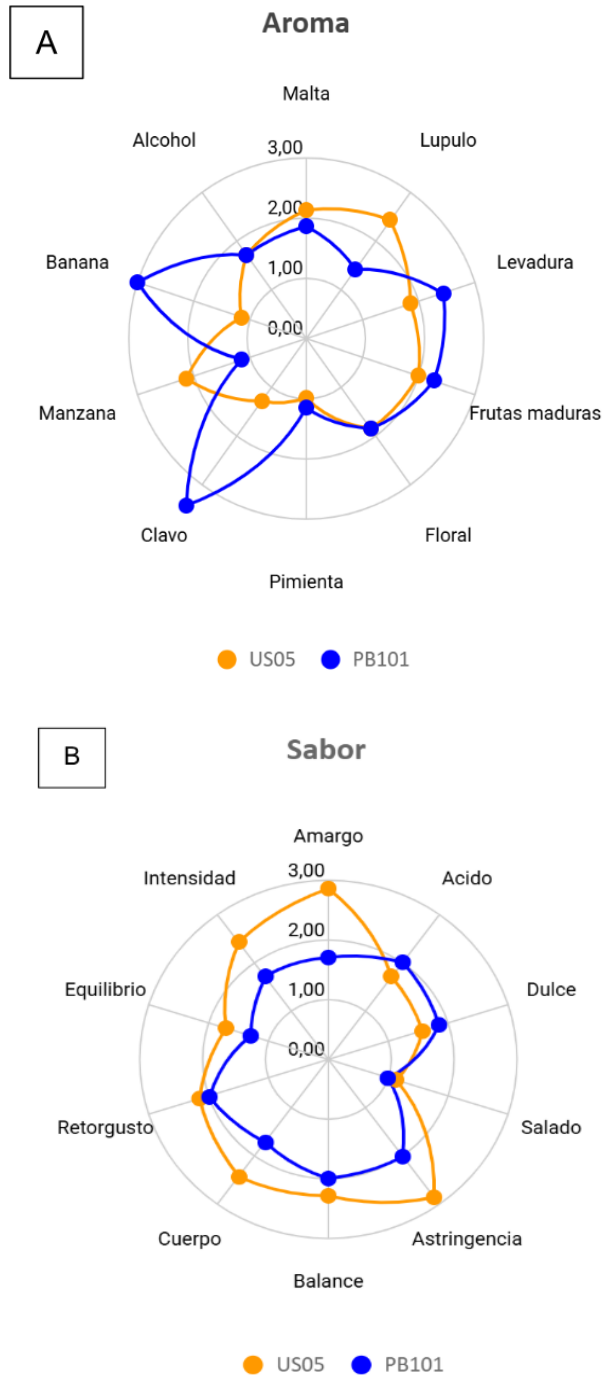


Figura 15: Análisis sensorial hedónico de cerveza elaborada con levadura autóctona *S. cerevisiae* PB101 y comercial US05, “A” representa los atributos de los aspectos aromáticos evaluados y “B” aspectos relacionados con el sabor. Escala máxima 5 y mínima 1.

A partir de la recomendación realizada por los evaluadores, se decidió llevar a cabo un nuevo ensayo de fermentación de cerveza *Ale* a escala de laboratorio. Para este procedimiento se empleó un mosto de estilo *Belgian*, provisto por la cervecería Donata del Desierto (San Juan). Los resultados obtenidos en este ensayo se presentan en el siguiente apartado.

6.5. Proceso fermentativo de cerveza tipo *Ale* estilo *Belgian* a escala de laboratorio

El diseño experimental constó de 2 tratamientos, uno con la levadura con aptitudes probióticas *S. cerevisiae* PB101 y otra como control utilizando la levadura comercial *S. cerevisiae* T58 (SafAle T58), seleccionada por su idoneidad técnica para perfiles de alta densidad y complejidad aromática en cervezas estilo *Belgian*. El procedimiento se llevó a cabo siguiendo estrictamente la metodología detallada en la sección 5.3.

La cerveza fermentada con el aislamiento autóctono *S. cerevisiae* PB101 registró un contenido alcohólico de 4.9 % v/v, un valor de pH de 5.16, densidad inicial de 1049, densidad final de 1012 y atenuación aparente media de 74.7 %. En comparación, el tratamiento control *S. cerevisiae* T58 presentó un contenido alcohólico de 5.6 % v/v, pH de 5.16, densidad inicial de 1049, densidad final de 1006 y atenuación aparente media de 87.3 %.

El análisis del proceso fermentativo evidenció la capacidad productiva de la levadura autóctona *S. cerevisiae* PB101 durante los 14 días de estudio. El análisis estadístico no mostró una interacción significativa entre el factor levadura y el tiempo ($p = 0.597$), indicando nuevamente que el aislamiento autóctono mantiene una cinética de fermentación paralela a la de la cepa comercial.

En cuanto a la magnitud de producción de CO₂, la levadura *S. cerevisiae* PB101 mostró una eficiencia de conversión que se estabilizó en torno a los 45.3 g/L hacia el final del ensayo. Si bien se observaron diferencias significativas entre las levaduras ($p < 0.001$), con una producción superior por parte de la cepa control (51.3 g/L), el aislamiento *S. cerevisiae* PB101 mantuvo un perfil de producción de CO₂ constante desde las primeras 24 h del proceso (Figura 16).

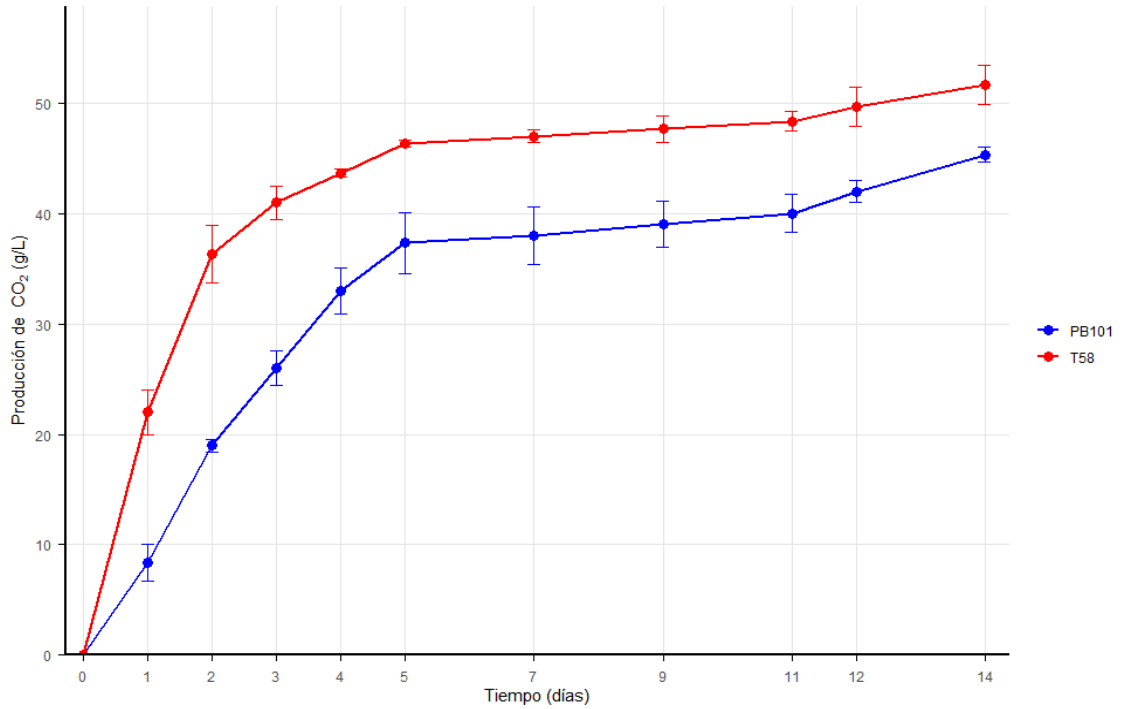


Figura 16: Producción de CO₂ a lo largo del proceso fermentativo de las levaduras *S. cerevisiae* PB101 (levadura autóctona) y T58 (levadura comercial).

Se evaluó el crecimiento poblacional de *S. cerevisiae* PB101 mediante el recuento de UFC (Log₁₀ UFC/mL) durante 14 días. Como se ilustra en la Figura 17, ambas levaduras iniciaron el proceso de forma similar (aproximadamente 7.1 Log₁₀ UFC/mL) y mostraron un incremento acelerado durante las primeras 24 h. No obstante, a partir del segundo día, sus trayectorias divergieron notablemente. Mientras que el aislamiento *S. cerevisiae* PB101 logró estabilizar su población en un rango entre 8.0 y 8.2 Log₁₀ UFC/mL hasta el día 7, la cepa *S. cerevisiae* T58 mostró mayor inestabilidad con fluctuaciones marcadas. Durante la fase final del ensayo, *S. cerevisiae* PB101 finalizó el ensayo con una carga celular de 7.71 Log₁₀ UFC/mL, en contraste con *S. cerevisiae* T58 que descendió hasta los 6.85 Log₁₀ UFC/mL.

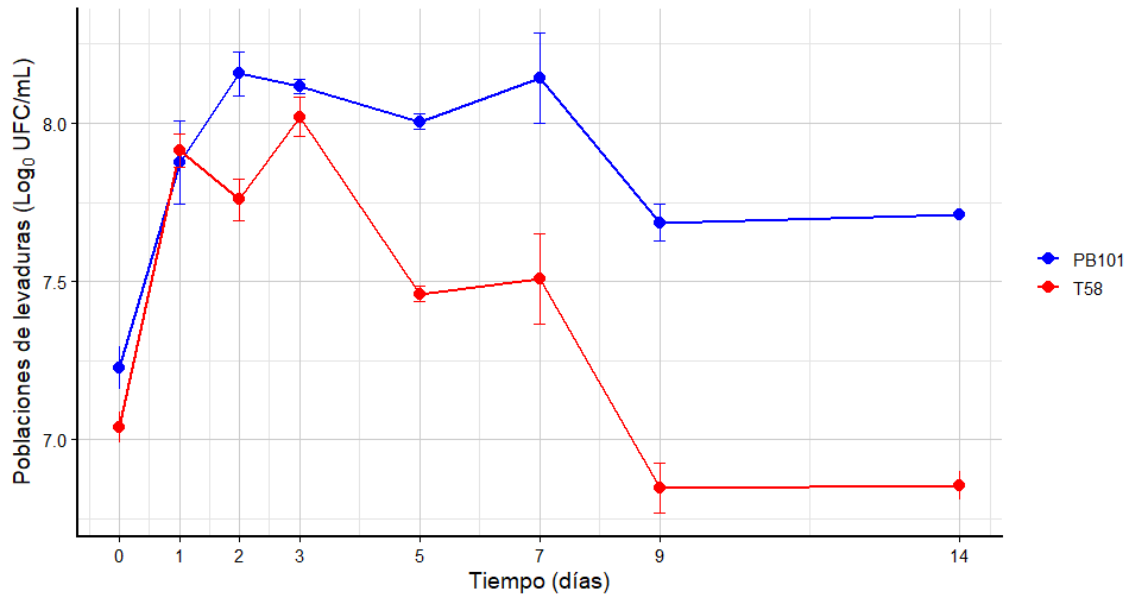


Figura 17: Cinética de crecimiento de las levaduras *S. cerevisiae* PB101 (levadura autóctona) y T58 (levadura comercial).

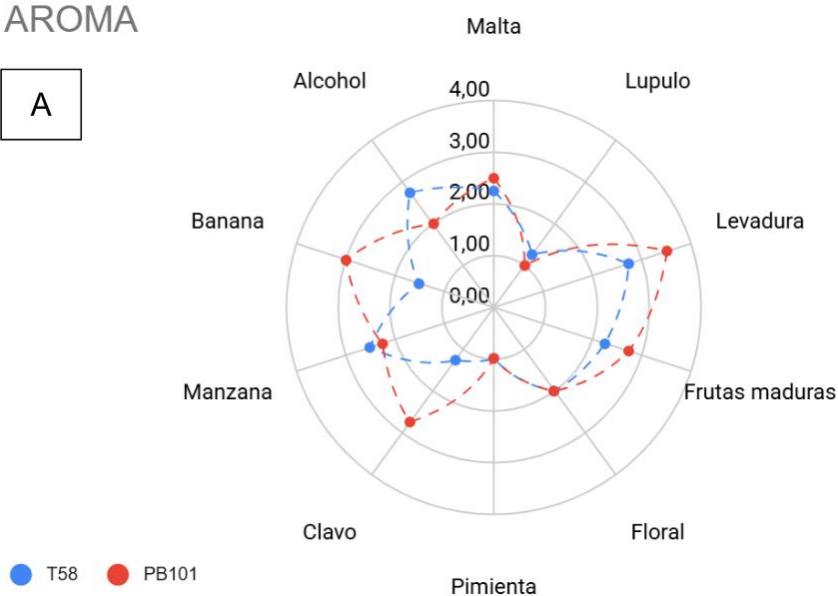
6.6. Evaluación sensorial de cerveza tipo *Ale* estilo *Belgian*

La cerveza elaborada con el aislamiento *S. cerevisiae* PB101 presentó un perfil aromático predominantemente frutal y especiado, con claras notas de banana y clavo de olor. Los descriptores levadura, malta y floral se ubicaron en intensidades medias, mientras que los aportes de manzana, pimienta y lúpulo fueron bajos (Figura 18 A).

En cuanto al aspecto gustativo de *S. cerevisiae* PB101, el perfil general se describió como equilibrado y de buena armonía gustativa, con dulzor moderado y niveles intermedios de acidez y amargo. La astringencia fue baja a media, mientras que el retrogusto fue valorado como de persistencia media-alta, agradable (Figura 18 B). La intensidad global y la persistencia gustativa alcanzaron puntuaciones altas, destacando la complejidad de la levadura en el desarrollo de compuestos aromáticos.

AROMA

A



SABOR

B

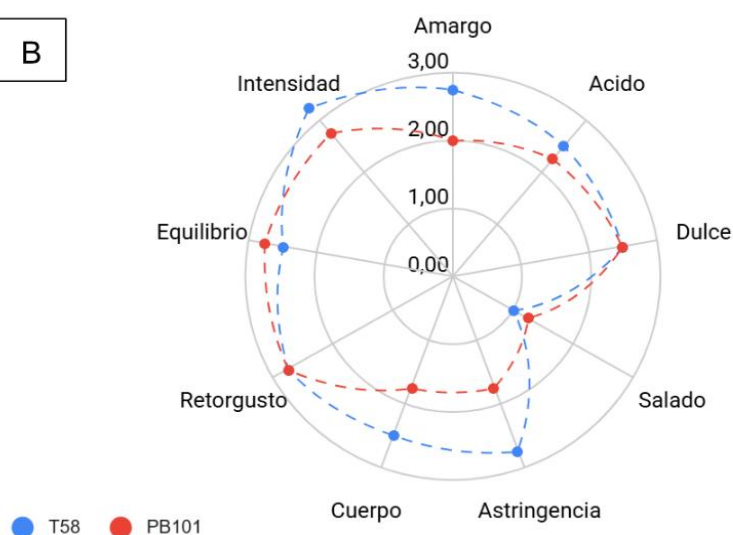


Figura 18: Análisis sensorial de cerveza elaborada con levadura autóctona *S. cerevisiae* PB101 y comercial T58.

“A” representa los atributos de los aspectos aromáticos evaluados y “B” aspectos relacionados con el sabor.

Escala máxima 5 y mínima 1.

7. DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluaron levaduras autóctonas, aisladas de ambientes enológicos con características probióticas y con potencial aplicación en la elaboración de cerveza con características funcionales, mediante un esquema de selección que integró criterios de inocuidad, desempeño fermentativo, comportamiento tecnológico, perfil sensorial y supervivencia en condiciones simuladas del TGI.

En función de los rasgos negativos, la actividad descarboxilasa se considera una característica tecnológica indeseable, ya que la presencia de aminoácidos precursores en la matriz puede derivar en la acumulación de AB (Goñi y Azpilicueta, 2001). Los aislamientos evaluados en este trabajo no exhibieron actividad descarboxilasa frente a los precursores ensayados, lo que indica la incapacidad de transformar la L-histidina en histamina, la L-lisina en cadaverina y la L-arginina en putrescina. La relevancia de este hallazgo radica en que la histamina es el principal agente causal de intoxicaciones alimentarias por AB, manifestándose mediante cefaleas, hipotensión, enrojecimiento facial y trastornos digestivos, debido a su rol como mediador de respuestas inflamatorias (EFSA, 2011; Smit et al., 2012). Por su parte, la cadaverina y la putrescina, aunque presentan una toxicidad directa menor, actúan de forma sinérgica al inhibir las enzimas intestinales (diamino oxidasa e histamina N-metiltransferasa) encargadas de metabolizar la histamina, potenciando significativamente sus efectos adversos en el organismo (Ladero et al., 2010). Desde una perspectiva organoléptica, estas diaminas resultan indeseables ya que su presencia se asocia a defectos sensoriales caracterizados por aromas pútridos, metálicos o fecales, que comprometen la calidad sensorial final de la cerveza. La ausencia de actividad descarboxilasa en los aislamientos analizados sustenta la idea de que la producción de AB es una característica intraespecífica. Esto implica que la capacidad de descarboxilación no constituye un rasgo universal de la especie, sino que varía entre diferentes individuos o cepas de una misma categoría taxonómica (Landete et al., 2007; Capozzi et al., 2012). Esta variabilidad se hace evidente al contrastar los resultados del presente estudio con investigaciones previas, donde otros aislamientos de *W. anomalus*, *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* sí demostraron capacidad para sintetizar AB a partir de arginina e histidina (Zullo et al., 2019; Fernández-Pacheco et al., 2021; Siesto et al., 2022). Garantizar esta inocuidad es un aspecto crítico en la elaboración de cerveza, dado que la malta y el lúpulo ya aportan una carga basal de aminas como putrescina, agmatina y espermina. Es por eso que el empleo de levaduras que no incrementen estos niveles resulta fundamental para asegurar la estabilidad y salubridad del producto final. Si bien la expresión de estas actividades puede estar condicionada por el sustrato y las condiciones de fermentación (Boffo et al., 2020), los resultados obtenidos son consistentes con la baja incidencia de producción de AB reportada en levaduras seleccionadas de alta calidad (Arena & Manca de Nadra, 2001; Capece et al., 2018).

En cuanto a la producción de fenoles volátiles, la presencia de *off-flavors* en varios de los aislamientos analizados, particularmente en aquellos pertenecientes al género *Pichia* (*P. kudriavzevii*, *P. manshurica* y *P. occidentalis*), sugiere una regulación metabólica poco

compatible con fermentaciones cerveceras controladas (Canonico et al., 2021). Esta observación coincide con lo reportado por distintos autores, quienes señalan que, si bien las especies de *Pichia* pueden aportar precursores aromáticos de interés, su uso como cultivo iniciador único en inoculaciones masivas suele derivar en perfiles desequilibrados debido a una producción excesiva de acetato de etilo y ácidos orgánicos de cadena corta, así como a una elevada síntesis de alcoholes superiores que pueden enmascarar los atributos deseables del estilo (Michel et al., 2016; Holt et al., 2019). Entre estos defectos sensoriales destaca la producción de fenoles volátiles (*Phenolic Off-Flavor*), un rasgo característico de las levaduras salvajes o autóctonas debido a la funcionalidad de los genes PAD1 y FDC1. Estos genes codifican para enzimas que producen fenoles por la descarboxilación y subsiguiente reducción de ácidos hidroxicinámicos (ferúlico, ρ -cumárico y cinámico) liberados durante la maceración de la malta (Vanbeneden et al., 2008; Mestre Furlani et al., 2024).

Respecto a la síntesis de compuestos sulfurados, es probable que los perfiles desbalanceados se deban a una síntesis excesiva de otros metabolitos secundarios o compuestos sulfurados vinculados al metabolismo de aminoácidos azufrados, que derivan en olores desagradables como “huevo podrido” (Gallone et al., 2016; Holt et al., 2019). Dicha tendencia se manifestó en los aislamientos del género *Pichia* (PB48 a PB58 y PB100), los cuales exhibieron una alta producción de H₂S con un valor de 4 en la escala de Comitini et al., (2011). Esto es habitual en levaduras que no han atravesado procesos de domesticación. Al emplearlas como cultivo único, se evidencia que carecen de las adaptaciones genéticas presentes en las cepas comerciales, las cuales han sido seleccionadas históricamente para armonizar la producción de estos compuestos con la calidad sensorial del producto final (Padilla et al., 2016). Mientras que las cepas domesticadas de *S. cerevisiae* han evolucionado para moderar la síntesis de metabolitos secundarios y metabolizar eficientemente los precursores del mosto, tal como se observó en el aislamiento PB101 con una producción nula de valor 1, los aislamientos silvestres, incluyendo aquellos de origen vitivinícola, mantienen rasgos metabólicos “salvajes” que pueden comprometer el perfil organoléptico de la cerveza (Gallone et al., 2016; Mestre Furlani et al., 2024).

Con respecto a los rasgos positivos, la actividad β -glucosidasa mostró variabilidad entre las levaduras evaluadas, confirmando que se trata de un carácter dependiente del aislamiento. Esta variabilidad en los niveles de actividad coincide con lo observado por Mendes et al. (2019), quienes reportaron que la capacidad para hidrolizar precursores glucosídicos varía de forma significativa incluso entre cepas de una misma especie. Si bien esta enzima puede

contribuir a la liberación de compuestos aromáticos y a la modificación del perfil sensorial de la cerveza, su presencia aislada no constituye un criterio suficiente para definir la aptitud cervecera de una levadura (Sharp et al., 2017). En el presente trabajo, algunas levaduras con actividad β -glucosidasa detectable como *W. anomalus* PB99 y PB97, no lograron un desempeño fermentativo adecuado o presentaron desvíos sensoriales. Tales efectos han sido señalados por autores como Bui et al. (2021), quienes advierten que una actividad enzimática mal regulada puede derivar en la liberación de compuestos que alteran la tipicidad de la cerveza. Por lo tanto, estos resultados refuerzan la idea de que la actividad β -glucosidasa es complementaria y debe ser interpretada de manera integral junto a otros parámetros tecnológicos, tal como sugieren Michel et al. (2016) al evaluar el impacto global de las enzimas en el proceso.

La evaluación de la capacidad fermentativa, realizada tanto sobre el mosto cervecero como sobre sus azúcares constituyentes de forma individual, evidenció diferencias significativas entre las levaduras analizadas. Varios aislamientos, particularmente aquellas pertenecientes a géneros no convencionales, mostraron una fermentación incompleta, caracterizada por una limitada utilización de maltosa, principal azúcar fermentable del mosto (Michel et al., 2016). Esta limitación suele vincularse con la carencia o la escasa actividad de transportadores de membrana y de la enzima α -glucosidasa, elementos que resultan críticos para la viabilidad del proceso a escala productiva (Steensels & Verstrepen, 2014; Hebly et al., 2015). En contraste, el aislamiento del género *Saccharomyces* ensayado y la cepa de referencia presentaron una fermentación más eficiente y sostenida, coherente con su mayor capacidad para asimilar azúcares complejos. Estas diferencias se interpretan no sólo a partir de la historia de domesticación de *S. cerevisiae*, sino también desde una optimización metabólica específica que favorece su desempeño en matrices ricas en maltosa, como el mosto cervecero (Gallone et al., 2016; Padilla et al., 2016).

La integración de los diferentes criterios evaluados permitió seleccionar a *S. cerevisiae* PB101 como la levadura con mejor desempeño global dentro de las condiciones analizadas. Este aislamiento no solo presentó una fermentación eficiente de los azúcares del mosto, sino que además mantuvo un comportamiento metabólico estable, sin generación de *off-flavors* detectables y con parámetros tecnológicos compatibles con el proceso cervecero. En comparación con los restantes aislamientos evaluados en este estudio, muchos de los cuales pertenecían a géneros no-convencionales, *S. cerevisiae* PB101 evidenció un equilibrio favorable entre eficiencia fermentativa y estabilidad sensorial, atributo clave para su aplicación como cultivo starter. Este perfil coincide con lo reportado para cepas de *S. cerevisiae* adaptadas

a fermentaciones cerveceras, en las que una regulación controlada de las rutas metabólicas se traduce en procesos más predecibles y reproducibles (Steensels & Verstrepen, 2014; Gallone et al., 2016). A partir de esta selección, se evaluó el proceso fermentativo de cerveza tipo *Ale* a escala de laboratorio, incorporando como referencia comparativa a la cepa comercial *S. cerevisiae* US05, ampliamente utilizada en la industria cervecera. Bajo las condiciones ensayadas, *S. cerevisiae* PB101 presentó una cinética fermentativa y un grado de atenuación aparente similares a los observados para *S. cerevisiae* US05, lo que indica una capacidad adecuada de consumo de azúcares fermentables y una fermentación estable a escala de laboratorio demostrando un fitness adecuado. La atenuación aparente obtenida se ubicó dentro de los rangos característicos para cervezas tipo *Ale*, parámetro considerado clave para predecir el buen desempeño del proceso y la reproducibilidad del perfil final logrado en la cerveza (Steensels & Verstrepen, 2014). No obstante, pequeñas diferencias en la fermentación o en la producción de compuestos secundarios podrían adquirir relevancia a mayor escala, aspecto que deberá ser abordado en estudios posteriores.

La simulación del TGI permitió evaluar la tolerancia de *S. cerevisiae* PB101 post fermentación y del periodo de maduración a condiciones de estrés tales como acidez, presencia de enzimas y sales biliares, un aspecto relevante en el marco del desarrollo de cervezas con potencial funcional. La supervivencia observada sugiere que la levadura posee mecanismos de resistencia compatibles con el TGI, posiblemente asociados a la composición de su pared celular y a la activación de respuestas al estrés, tal como ha sido descrito para otras cepas de *S. cerevisiae* (Bustamante et al., 2020). Sin embargo, de acuerdo con la definición de probiótico propuesta por Hill et al. (2014), estos resultados deben considerarse preliminares, ya que la supervivencia gastrointestinal constituye un requisito necesario, pero no suficiente para atribuir efectos beneficiosos en el hospedador. Asimismo, estudios recientes indican que la matriz cervecera puede actuar como un sistema protector que favorece la viabilidad de las levaduras durante el tránsito digestivo (Brassesso et al., 2025). Este efecto protector puede atribuirse a que las macromoléculas presentes en la bebida, principalmente proteínas de la malta y polisacáridos, pueden recubrir las células de levadura proporcionando una barrera física y una capacidad amortiguadora que reduce el impacto directo del pH ácido y las sales biliares sobre la integridad celular (García-Hernández et al., 2021; Senkarcinova et al., 2022).

La aceptación sensorial evidenció que *S. cerevisiae* PB101 no solo fue capaz de fermentar adecuadamente el mosto, sino también de generar un perfil sensorial compatible con el estilo *Ale* evaluado, sin la presencia de defectos perceptibles. Este resultado puede

interpretarse como una consecuencia directa del proceso de selección adoptado, en el cual se priorizó la exclusión de levaduras con expresión de *off-flavors* y una fermentación ineficiente de los azúcares del mosto. La bibliografía destaca que la calidad sensorial final de la cerveza depende en gran medida de la capacidad de la levadura para regular la producción de compuestos secundarios durante la fermentación, y que las cepas con un metabolismo más estable tienden a generar perfiles sensoriales más equilibrados y aceptables para el consumidor (Steensels & Verstrepen, 2014; Michel et al., 2016).

El ensayo exploratorio realizado en mosto de estilo *Belgian*, empleando la cepa comercial *S. cerevisiae* T58 como control, permitió ampliar el marco comparativo del estudio, sin formar parte de la contrastación de la hipótesis principal. La levadura autóctona *S. cerevisiae* PB101 mostró una expresión de compuestos aromáticos y frutales con notas de banana y clavo de olor, rasgos distintivos de las cervezas de origen *Belgian* (Gallone et al., 2016). Además, presentó un comportamiento fermentativo estable y una buena capacidad de mantener la viabilidad celular, generando un perfil sensorial complejo pero equilibrado. Estas observaciones refuerzan el carácter cepa-dependiente del perfil aromático de la cerveza y sugieren que *S. cerevisiae* PB101 posee una notable plasticidad fenotípica, lo que le permite adaptarse a diferentes matrices cerveceras. Esta capacidad de generar expresiones sensoriales diferenciadas constituye un atributo de versatilidad tecnológica, ya que el perfil final no depende exclusivamente del genotipo de la cepa, sino de su interacción dinámica con la composición del mosto. En este sentido, Paszkot et al. (2023) demostraron que incluso una misma cepa puede variar drásticamente su producción de volátiles (como alcoholes superiores y ésteres de acetato) dependiendo de la densidad del extracto y el tipo de malta utilizado, evidenciando que la matriz influye directamente en la regulación del metabolismo secundario de la levadura. Por lo tanto, la variabilidad observada en PB101 podría interpretarse como un potencial para diversificar estilos comerciales mediante el ajuste de la receta del mosto (Steensels et al., 2014; Paszkot et al., 2023). En conjunto, los antecedentes bibliográficos refuerzan la validez del enfoque adoptado, no obstante, los resultados deben interpretarse en el contexto de las condiciones controladas y la escala de laboratorio del estudio.

8. CONCLUSIONES

Los resultados de la presente tesina permiten confirmar que la levadura autóctona *S. cerevisiae* PB101, aislada de un ambiente vitivinícola, presenta rasgos tecnológicos adecuados para su aplicación como cultivo iniciador en la elaboración de cerveza artesanal tipo *Ale*, específicamente en el estilo *Kölsch*. A través de un esquema de evaluación progresivo, se

demostró que este aislamiento no solo garantiza la inocuidad del proceso, sino que conduce de manera eficaz la fermentación, exhibiendo un desempeño y una estabilidad comparables a los de cepas comerciales de referencia como la *S. cerevisiae* US05. Esta eficiencia metabólica, sumada a una calidad sensorial, valida la aplicabilidad de *S. cerevisiae* PB101 en el sector productivo para la obtención de productos con características aceptables y fieles a los estándares del estilo.

La levadura autóctona *S. cerevisiae* PB101 demostró ser una alternativa viable para la fermentación de cerveza tipo *Ale* estilo *Belgian*, destacándose por su estabilidad poblacional y su perfil sensorial equilibrado con notas frutales y especiadas características del estilo. Si bien presentó diferencias productivas respecto de la levadura comercial T-58, su comportamiento cinético paralelo y su mayor estabilidad a lo largo del proceso indican que se adecua mejor a las exigencias del mosto *Belgian*, especialmente en términos de complejidad aromática y persistencia en boca.

La capacidad de *S. cerevisiae* PB101 para sobrevivir a las condiciones críticas del TGI fundamenta la posibilidad de desarrollar cervezas sin filtrar que actúen como vehículo de microorganismos con potencial funcional. La selección de levaduras autóctonas se posiciona como una alternativa concreta para diversificar la oferta del mercado cervecero, integrando criterios de inocuidad y funcionalidad en la producción local.

9. BIBLIOGRAFÍA

Almada, C. N., Martínez, R. C. & Sant´Ana, A. S. (2015). Characterization of the intestinal microbiota and its interaction with probiotics and health impacts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(1), 4175-4199.

Angulo, M., Ramos, A., Reyes-Becerril, M., Guerra, K., Monreal-Escalante, E. & Angulo, C. (2023). Probiotic *Debaryomyces hansenii* CBS 8339 yeast enhanced immune responses in mice. *3 Biotech*, 13(1), 28.

Arena, M. E. & Manca de Nadra, M. C. (2001). Biogenic amine production by *Lactobacillus*. *Journal of Applied Microbiology*, 90(2), 158–162.

Backhed, F., Ley, R. E., Sonnenburg, J. L., Peterson, D. A. & Gordon, J. I. (2005). Host-bacterial mutualism in the human intestine. *Science*, 307(5717), 1915-1920.

- Banik, A., Halder, S. K., Ghosh, C. & Mondal, K. C. (2019). Fungal probiotics: Opportunity, challenge, and prospects. *Recent Advancement in White Biotechnology Through Fungi*, 2, 101-117.
- 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.
- Bäumler, A. J. & Sperandio, V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535(7610), 85-93.
- Bevilacqua, A., Corbo, M. R. & Sinigaglia, M. (2012). Selection of yeasts as starter cultures for table olives: a step-by-step procedure. *Frontiers in Microbiology*, 3, 194.
- Boffo, E. F., Castro, G. S. & de Nadra, M. C. M. (2020). Factors influencing the formation of biogenic amines in fermented beverages. *Food Safety and Quality* (pp. 45–68). Nova Science Publishers.
- Brassesso, M. E., et al. (2025). Survival of probiotic yeasts in beer matrices under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*. Publicación anticipada en línea.
- Bui, T. L. T., Fels, S., Maurice, N., Behr, J. & Vogel, R. F. (2021). The role of β -glucosidasa activity in yeasts for the release of hop-derived terpene alcohols during beer fermentation. *European Food Research and Technology*, 247(4), 931-943.
- Bustamante, M. A., Oomah, B. D., Oliveira, W. P. & Burgos-Díaz, C. (2020). Probiotic potential of yeasts: A review. *Journal of Functional Foods*, 65, Artículo 103735.
- Canonico, L., Agarbati, A., Comitini, F. & Ciani, M. (2021). Non-conventional yeasts for the production of craft beers: Progress and future challenges. *Fermentation*, 7(1), 10.
- Canonico, L., Zannini, E., Ciani, M. & Comitini, F. (2021). Assessment of non-conventional yeasts with potential probiotic for protein-fortified craft beer production. *LWT*, 145, Artículo 111361.
- Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., Pietrafesa, R., Zambuto, M. & Romano, P. (2018). Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *International Journal of Food Microbiology*, 284, 22-30.

- Capozzi, V., Russo, P., Ladero, V., Fernández, M., Mayo, B., Alvarez, M. A. & Spano, G. (2012). Biogenic amines degradation by *Lactobacillus plantarum*: Toward a potential application in wine. *Frontiers in Microbiology*, 3, 122.
- Chassagne, D., Vernizeau, S., Nedjma, M. & Alexandre, H. (2005). Hydrolysis and sorption by *Saccharomyces cerevisiae* strains of Chardonnay grape must glycosides during fermentation. *Enzyme and Microbial technology*, 37(2), 212-217.
- Chui, M., Issler, M., Roberts, R. & Yee, L. (2023). *Technology Trends Outlook 2023*. McKinsey & Company.
- Comitini, F., Gobbi, M., Domizio, P., Romani, C., Lencioni, L., Mannazzu, I. & Ciani, M. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* populations relevant to wine-making: A help to the selection of *Saccharomyces cerevisiae* starter cultures. *Enzyme and Microbial Technology*, 48(6), 485–491.
- Czerucka, D., Piche, T. & Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*. *Aliment Pharmacol Ther*, 26, 767-778.
- Di Cagno, R., Filannino, P., Cantatore, V., Polo, A., Celano, G., Martinovic, A., Cavoski, I. & Gobbetti, M. (2020). Design of potential probiotic yeast starters tailored for making a cornelian cherry (*Cornus mas* L.) functional beverage. *International Journal of Food Microbiology*, 323, Artículo 108591.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F. & Querol, A. (1999). Identification of Yeasts by RFLP Analysis of the 5.8 S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 49, 329–337.
- Fernández-Pacheco, P., García-Béjar, B., Jiménez-del Castillo, M., Carreño-Domínguez, J., Briones Pérez, A. & Arévalo-Villena, M. (2021). Potential probiotic and food protection role of wild yeasts isolated from pistachio fruits (*Pistacia vera*). *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101, 2201–2209.
- Galanis, P., Vraka, I. & Katsiroumpa, A. (2024). Nutrition as a preventive strategy for healthy aging and healthcare cost reduction: A systematic review. *Journal of Functional Foods*, 112, Artículo 106312.

- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B. ... & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, *166*(6), 1397–1410.
- García-Hernández, M. A., García-Cayuela, T., Cano, M. P. & Hernández-Álvarez, A. J. (2021). Review: Gastrointestinal Viability of Probiotics: A Focus on Food Matrices, Modern Technologies, and Beyond. *Food Reviews International*, *39*(8), 5344–5372.
- Gensollen, T., Iyer, S. S., Kasper, D. L. & Blumberg, R. S. (2016). How colonization by microbiota in early life shapes the immune system. *Science*, *352*(6285), 539-544.
- Granato, D., Nunes, D. S. & Barba, F. J. (2017). An integrated strategy between food chemistry, biology, nutrition, pharmacology, and statistics in the development of functional foods: a proposal. *Trends Food Science & Technology*, *62*, 13–22.
- Goñi, D. T. & Azpilicueta, C. A. (2001). Influence of yeast strain on biogenic amine content in wines. *Food Microbiology*, *18*(4), 397-406.
- Hebly, M., Brickwedde, A., Bolat, I., Driessen, A. J., de Hulster, E., van Maris, A. J., Pronk, J. T. & Daran, J. M. (2015). SSS1 encodes a high-affinity maltose transporter in *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces eubayanus*. *FEMS Yeast Research*, *15*(8), fov096
- Helgi Library. (2023). Beer consumption per capita in Argentina.
- Heydari, S., Hosseini, S. E., Mortazavian, A. M. & Taheri, S. (2023). Extraction of bioactive peptides produced in probiotic yoghurt and determination of their biological activities. *International Dairy Journal*, *139*, Artículo 105544.
- Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R. B., Flint, H. J. & Salminen, S. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, *11*, 506-514.
- Hillman, E. T., Lu, H., Yao, T. & Nakatsu, C. H. (2017). Microbial ecology along the gastrointestinal tract. *Microbes and environments*, *32*(4), 300-313.

- Holt, S., Miks, M. H., de Carvalho, B. T., Possamai, T., Magalhães, F., Lallai, S. ... & Gibson, B. (2019). Engineering brewery yeast for the production of specialty beers: challenges and opportunities. *Microbial Biotechnology*, 12(3), 402-417.
- Hornsey, I. S. (2003). *A History of Beer and Brewing*. Royal Society of Chemistry.
- Hsiung, Y. C., Ho, S. T. & Cheng, K. C. (2021). Probiotic Potential of Yeasts Isolated from Traditional Fermented Foods. *Microorganisms*, 9(9), 1836.
- Huang, Z., Li, Y., Park, H., Ho, M., Bhardwaj, K., Sugimura, N. & Zuo, T. (2023). Unveiling and harnessing the human gut microbiome in the rising burden of non-communicable diseases during urbanization. *Gut Microbes*, 15(1), Artículo 2237645.
- Iñiguez-Palomares, C., Pérez-Morales, R. & Acedo-Félix, E. (2014). Functional properties of *Lactobacillus* species isolated from dental caries and saliva of children. *Letters in Applied Microbiology*, 58(4), 314-320.
- Kunze, W. (2010). *Tecnología para Cerveceros y Malteros* (1ª ed.). VLB Berlin.
- Kurtzman, C. P., Fell, J. W. & Boekhout, T. (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
- Ladero, V., Calles-Enríquez, M., Fernández, M. & Álvarez, M. A. (2010). Toxic effects of biogenic amines in dairy products. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 50(8), 774–784.
- Lafarga, T., Viñas, I., Bobo, G. & Aguiló-Aguayo, I. (2023). Recent advances in the development of innovative functional foods. *Food Research International*, 164, Artículo 112345.
- Landete, J. M., Ferrer, S. & Pardo, I. (2007). Biogenic amine production by lactic acid bacteria, organic acid degradation and presence of specific genes. *International Journal of Food Microbiology*, 117(3), 314-320.
- Leahy, S. C., Higgins, D. G., Fitzgerald, G. F. & van Sinderen, D. (2005). Nightingales and probiotics. *Journal of Applied Microbiology*, 98(6), 1303-1315.
- Leiva Alaniz, M. J., Vergara, S. C., Mestre Furlani, M. V., Vázquez, F., Mancha-Agresti, P. & Maturano, Y. P. (2025). Assessment of yeasts from winemaking environments: biosafety and

functional perspectives on probiotic capabilities. *Frontiers in Industrial Microbiology*, 3, Artículo 1494334.

Lengeler, J. W., Drews, G. & Schlegel, H. G. (2020). *Biology of the Prokaryotes*. Georg Thieme Verlag.

Maturano, Y. P., Rodríguez Assaf, L. A., Toro, M. E., Nally, M. C., Oyola, M. J., Vazquez, F. & Combina, M. (2012). Optimization of fermentation through a mixed culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Wickerhamomyces anomalus*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28(1), 115-126.

Mendes, V., Vilaça, R., de Freitas, V., Moradas-Ferreira, P., Ferreira, J. & Mateus, N. (2019). β -Glucosidase activity in *Saccharomyces cerevisiae* strains: Sources of variation and potential for hop aroma enhancement. *Food Research International*, 121, 392-404.

Mestre, M. V., Maturano, Y. P., Combina, M., Mercado, L. A., Toro, M. E. & Vazquez, F. (2017). Selection of non-*Saccharomyces* yeasts to be used in grape musts with high alcoholic potential: a strategy to obtain wines with reduced ethanol content. *FEMS yeast research*, 17(2).

Mestre Furlani, M. V., Vargas Perucca, M. F., Pettrignani, D. B., Vergara, S. C., Leiva-Alaniz, M. J., Maturano, Y. P. ... & Dellacassa, E. (2024). Enhancing flavor complexity in craft beer: sequential inoculation with indigenous non-*Saccharomyces* and commercial *Saccharomyces* yeasts. *Fermentation*, 10(12), 657.

Michel, M., Meier-Dörnberg, T., Jacob, F., Methner, F. J., Wagner, R. S. & Hutzler, M. (2016). Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 122(4), 569–575.

Natividad, J. M. & Verdu, E. F. (2013). Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: pathological and therapeutic implications. *Pharmacological research*, 69(1), 42-51.

Neish, A. S. (2009). Microbes in gastrointestinal health and disease. *Gastroenterology*, 136(1), 65-80.

- Ogunremi, O. R., Sanni, A. I. & Agrawal, R. (2015). Probiotic potentials of yeasts isolated from some cereal-based Nigerian traditional fermented food products. *Journal of Applied Microbiology*, 119(3), 797-808.
- Onwe, R. O., Folorunso, O. R., Anyanwu, M. U., Okorie, C. C. & Mac-Anthony, C. G. (2022). Probiotics: a review of its role in promoting health and preventing diseases. *Applied Food Biotechnology*, 9(3), 173-195.
- 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, 411.
- Pandey, K. R., Naik, S. R. & Vakil, B. V. (2015). Probiotics, prebiotics and synbiotics-a review. *Journal of Food Science and Technology*, 52(12), 7577–7587.
- Pietrafesa, A., Siesto, G., Capece, A. & Romano, P. (2023). Craft Beer as a Reservoir of Ethylic Yeasts with Probiotic Traits. *Fermentation*, 9(3), 262.
- Quarella, S., Lovrovich, P., Scalabrin, S., Campedelli, I., Backovic, A., Gatto, V., Cattonaro, F., Turello, A., Torriani, S. & Felis, G. E. (2016). Draft genome sequence of the probiotic yeast *Kluyveromyces marxianus fragilis* B0399. *Genome Announcements*, 4(5), Artículo e00923–16.
- Quigley, E. M. (2013). Gut bacteria in health and disease. *Gastroenterology & hepatology*, 9(9), 560 - 569.
- Requena, T. & Velasco, M. (2019). Microbioma intestinal y salud: un nuevo paradigma en la medicina del siglo XXI. *Gaceta Médica de México*, 155(9), 541-547.
- Rosi, I., Vinella, M. & Domizio, P. (1994). Characterization of β -glucosidase activity in yeasts of enological origin. *The Journal of Applied Bacteriology*, 77(5), 519-527.
- Ruarte, P. J., Leiva Alaniz, M. J., Vergara, S. C., Groff, M. C., Pantano, M. N., Mestre, M. V., Scaglia, G. J. E. & Maturano, Y. P. (2025). Mathematical modeling for fermentation systems: A case study in probiotic beer production. *Fermentation*, 11(4), 184.
- Sebastián, V., García-Miralles, M. & Ugarte, R. (2021). *Microbioma intestinal y salud*. Elsevier.

- Senkarcinova, B., Dias, I. A. G., Nespor, J. & Branyik, T. (2019). Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var *Boulardii*. *LWT*, *100*, 362-367.
- Senkarcinova, B., Graça, A., Roseiro, L. B. & Dias-Cardoso, M. J. (2022). Survival of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* yeasts in beverage matrices under simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, *361*, Artículo 109462.
- Siesto, G., Capece, A., Pietrafesa, A. & Romano, P. (2022). Screening of wine yeasts for the production of biogenic amines. *Microorganisms*, *10*(2), 234.
- Siró, I., Kápolna, E., Kápolna, B. & Lugasi, A. (2008). Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. *Appetite*, *51*(3), 456-467.
- Sharp, D. C., Steensels, J. & Shellhammer, T. H. (2017). The role of hop glycosides in beer flavor. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *75*(4), 307-313.
- Smit, A. Y., du Toit, W. J. & du Toit, M. (2012). Biogenic amines in wine: Understanding the hazard and control options. *South African Journal of Enology and Viticulture*, *29*(2), 209–227.
- Sohrabvandi, S., Mortazavian, A. M. & Rezaei, K. (2012). Health-related aspects of beer: a review. *International Journal of Food Properties*, *15*(2), 350-373.
- Statista. (2025). *Bebidas alcohólicas: consumo mundial por segmento*. Statista Research Department.
- Steensels, J. & Verstrepen, K. J. (2014). Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, *68*, 61–80.
- Stewart, G. G. (2017). *Brewing yeast and fermentation* (2.^a ed.). Elsevier Academic Press.
- Suvarna, S., Dsouza, J., Ragavan, M. L. & Das, N. (2018). Potential probiotic characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from cocoa fermentation. *Food Science and Biotechnology*, *27*(3), 745-753.
- Thursby, E. & Juge, N. (2017). Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal*, *474*(11), 1823–1836.
- Underhill, D. M. & Iliev, I. D. (2014). The mycobiota: interactions between *Candida* and other fungi and the host. *Nature Reviews Immunology*, *14*(6), 405-416.

Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F. & Delvaux, F. R. (2008). Formation of 4-vinylguaiacol during sorghum beer brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 114(3), 212-219.

Vergara Alvarez, S. C., Leiva Alaniz, M. J., Mestre Furlani, M. V., Vazquez, F., Mancha Agresti, P., Nally, M. C. & Maturano, Y. P. (2023). Bioprospecting of the probiotic potential of yeasts isolated from a wine environment. *Fungal Genetics and Biology*, 164, 103767.

Vergara, S. C. (2024). Caracterización tecnológica y funcional de levaduras no convencionales de origen enológico para su aplicación como agentes probióticos. [Tesis doctoral, Universidad Nacional de San Juan]. Repositorio Institucional.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S. & Delvaux, F. R. (2003). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96(2), 110-118.

Zendeboodi, F., Gholian, M. M., Khanniri, E., Sohrabvandi, S. & Mortazavian, A. M. (2021b). Beer as a vehicle for probiotics. *Applied Food Biotechnology*, 8(4), 329-337.