



UNIVERSIDAD DE EXTREMADURA

FACULTAD DE CIENCIAS

**Grado en BIOTECNOLOGÍA**

**MEMORIA DE TRABAJO DE FIN DE  
GRADO**

**ELABORACIÓN DE CERVEZA ARTESANA  
CON DIFERENTES CEPAS DE  
LACHANCEA SP**

FRANCISCO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ

JUNIO, 2023



**LUIS MIGUEL HERNÁNDEZ MARTÍN**, Catedrático de Microbiología y **PATRICIA GIL FLORES**, contratada predoctoral, ambos del Área de Microbiología del Departamento de CIENCIAS BIOMÉDICAS de la Universidad de Extremadura.

INFORMAN:

Que D. **FRANCISCO FERNÁNDEZ RODRÍGUEZ** ha realizado bajo su dirección el Trabajo de Fin de Grado. Consideran que la memoria reúne los requisitos necesarios para su evaluación.

Fdo. Luis Miguel Hernández Martín

Fdo. Patricia Gil Flores



## **AGRADECIMIENTOS**

Me gustaría empezar dando las gracias a mis tutores del TFG, Luis Miguel Hernández Martín y Patricia Gil Flores. Por todo su esfuerzo, trabajo y sobre todo paciencia; sin ellos nada de esto hubiera sido posible.

Gracias a todo el equipo del Área de Microbiología del Departamento de Ciencias de la Universidad de Extremadura.

Finalmente, muchas gracias a mi familia y amigos, que sin su apoyo no hubiera llegado hasta aquí.



# Índice

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
ABREVIATURAS .....	4
1. INTRODUCCIÓN.....	7
1.1 CERVEZA.....	7
1.1.1 IMPORTANCIA MUNDIAL Y CONSUMO EN ESPAÑA.....	8
1.2 MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN.....	9
1.2.1 DIVERSIDAD DE FERMENTACIONES.....	10
1.2.2 ELABORACIÓN TRADICIONAL CERVEZA ÁCIDA.....	13
1.2.3 UTILIZACIÓN NOVEDOSA DE <i>LACHANCEA THERMOTOLERANS</i> EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ÁCIDA.....	14
1.3 APLICACIONES TECNOLÓGICAS DESEABLES EN LEVADURAS.....	15
2. Objetivos: .....	17
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	19
3.1 MICROORGANISMOS.....	19
3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y MATERIAL UTILIZADO.....	20
3.3 SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACION.....	22
3.4 TEST DE FLOCULACIÓN POR EL MÉTODO DE ABSORBANCIA.....	23
3.5 PROTOCOLO DE MICROFERMENTACIONES.....	24
3.6 PROTOCOLO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA.....	25
3.7 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS TECNOLÓGICO.....	28
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	31
4.4 TEST DE FLOCULACIÓN:.....	31
4.5 CINÉTICA DE MICROFERMENTACIONES: .....	32
4.6 SELECCIÓN DE LEVADURAS CANDIDATAS PARA ELABORACION DE CERVEZA.....	36
4.7 RESULTADOS DE LAS ELABORACIONES.....	36
5. CONCLUSIONES.....	43
6. BIBLIOGRAFÍA.....	45





## RESUMEN.

La cerveza es sin duda la bebida alcohólica más consumida en el mundo. En nuestro país, es consumida de forma habitual por los adultos de todos los rangos de edades. La industria cervecera, a nivel global, trata de innovar continuamente con nuevos sabores y formas de producción, debido a una clientela con unos gustos cada vez más selectos.

Actualmente, una tendencia en la búsqueda de cervezas con características novedosas se centra en la utilización de levaduras alternativas no-*Saccharomyces*, las cuales habitualmente presentan perfiles muy diferenciados del que ostentan las levaduras por excelencia, *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus*.

En este trabajo hemos ensayado *Torulaspora delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* y *Lachancea thermotolerans* como levaduras alternativas no-*Saccharomyces*, para la producción de cerveza. Con las dos primeras no se obtuvieron resultados satisfactorios. La capacidad fermentativa de los azúcares de la malta fue pobre y las características organolépticas del producto tampoco resultaron apreciadas en una cata estándar.

Por el contrario, las cepas utilizadas de *Lachancea thermotolerans*, mostraron resultados más prometedores. Todas ellas mostraron una capacidad fermentativa similar al control (*S. cerevisiae*) y produjeron cantidades significativas de ácido L-láctico, incluso superiores a las de una cepa comercial. Esta característica las convierte en buenas candidatas para la producción de cervezas “ácidas”.

Finalmente, de las 4 cepas ensayadas de *L. thermotolerans*, la *Lt A57* fue la que presentó un perfil organoléptico más favorable en un ejercicio de cata, en 4 experimentos diferentes, incluso mejor que la cepa utilizada como control. En consecuencia, *L. thermotolerans*, *Lt A57* es una firme candidata para ser utilizada en la elaboración de cervezas ácidas, sin necesidad de la intervención de bacterias “acidificantes” en el proceso.

**Palabras claves:** cerveza, levaduras, *Lachancea thermotolerans*, ácido láctico, *Torulaspora delbrueckii*, fermentaciones.



## ABSTRACT.

Beer is undoubtedly the most widely consumed alcoholic beverage in the world. In our country, it is regularly consumed by adults of all age groups. The beer industry, on a global level, is constantly trying to innovate with new flavours and forms of production, due to a clientele with increasingly select tastes.

Currently, a trend in the search for beers with novel characteristics focuses on the use of alternative, non-*Saccharomyces* yeasts, which usually have very different profiles from those of the quintessential yeasts, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus*.

In this work we have tested *Torulaspota delbrueckii*, *Wickerhamomyces anomalus* and *Lachancea thermotolerans* as alternative non-*Saccharomyces* yeasts for beer production. The first two did not give satisfactory results. The fermentative capacity of the malt sugars was poor and the organoleptic characteristics of the product were also not appreciated in a standard tasting.

In contrast, the *Lachancea thermotolerans* strains used showed more promising results. All of them showed a fermentative capacity similar to the control (*S. cerevisiae*) and produced significant amounts of L-lactic acid, even higher than those of a commercial strain. This characteristic makes them good candidates for the production of "sour" beers.

Finally, of the 4 tested strains of *L. thermotolerans*, *Lt A57* was the one that presented the most favourable organoleptic profile in a tasting exercise, in 4 different experiments, even better than the strain used as a control. Consequently, *L. thermotolerans*, *Lt A57* is a strong candidate for use in the brewing of sour beers, without the need for the intervention of "acidifying" bacteria in the process.

**Keywords:** beer, yeasts, *Lachancea thermotolerans*, lactic acid, *Torulaspota delbrueckii*, fermentations.

## ABREVIATURAS

ABREVIATURA	SIGNIFICADO
Lt	<i>Lachancea thermotolerans</i>
Wa	<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
Td	<i>Torulaspota delbrueckii</i>
Sc	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
Sp	<i>Saccharomyces pastorianus</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colonias
YEPD	Yeast Extract Peptone Dextrose
NADPH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate reduced
NAD	Nicotinamide Adenine Dinucleotide
NADH	Nicotinamide Adenine Dinucleotide reduced
ATP	Adenosin-5'-trifosfato
HQ	Hexoquinasa
EDTA	Etilen diamino tetra acetic acid
L-LDH	L-Lactate Dehydrogenase



# **INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1 CERVEZA.

La cerveza es una bebida alcohólica fermentada por levaduras, cuyos ingredientes básicos son: agua, cereales malteados, lúpulo y las propias levaduras. Se tienen evidencias de que el ser humano lleva consumiendo cerveza desde hace más de 6000 años, cuando nuestros antepasados comenzaron a cultivar cereales de forma controlada (Neolítico). Una de las recetas más antiguas se encontró en China y correspondía a una cerveza primigenia elaborada a base de mijo, cebada, lágrimas de Job y tubérculos (Wang y cols., 2016). La cerveza en Egipto y en regiones de Mesopotamia era considerada como una parte esencial de la dieta, se piensa que constituía una parte fundamental de la dieta de los trabajadores durante la construcción de las pirámides. Antiguamente, para contrarrestar el dulzor de los azúcares presentes en los cereales, se utilizaba una mezcla de hierbas aromáticas denominada GRUIT, en lugar del lúpulo. La primera referencia al lúpulo data del S. IX y a partir del S. XVI, sustituyó totalmente al Gruit. El consumo de cerveza creció y se popularizó muchísimo en la Edad Media debido a que el consumo de agua era muy peligroso por ser vehículo transmisor de enfermedades infecciosas. La cerveza, por su contenido en alcohol y lúpulo (también con propiedades antimicrobianas), era mucho más segura que el agua, para calmar la sed.

Tradicionalmente la industria cervecera ha estado más relacionada con el norte de Europa, ya que, debido al clima frío el desarrollo de la viticultura es más problemático (Radonjić y cols., 2020). Tiene especial relevancia la denominada “Ley de pureza de la cerveza alemana” promulgada en 1516 por el Duque Guillermo IV de Baviera. Esta Ley se considera la primera regulación oficial de la elaboración de un alimento y establecía que la cerveza debía elaborarse exclusivamente a partir de agua, cebada y lúpulo.

Actualmente la cerveza es consumida como una bebida recreativa que en dietas como la mediterránea suele estar acompañando las principales comidas (Sánchez-Muniz y cols., 2019). En España, su elaboración está regulada en el *Real Decreto 678/2016, de 16 de diciembre, por el que se aprueba la norma de calidad de la cerveza y de las bebidas de malta*.

El contenido en alcohol de la cerveza puede variar de menos de un 1% a más del 15%, aunque el contenido medio es de alrededor de un 5% de alcohol por volumen (Logan y cols., 1999).

El consumo de bebidas alcohólicas es un tema controvertido, pues se sabe que un consumo moderado de éstas, pueden conferir cierta protección sobre el riesgo de padecer enfermedades relacionadas con la edad (De Gaetano G y cols., 2016). En el caso de la cerveza se asume como consumo moderado por regla general una dosis al día para mujeres (330 mL de alcohol al 4 % p/v) y dos para hombres.

La cerveza ácida se ha destacado en las últimas décadas por su sabor único y por no ser un estilo restringido a un determinado proceso de producción, origen o ingrediente utilizado, pues se caracteriza por una acidez resultante de la alta concentración de ácidos orgánicos y un pH bajo (3,0 a 3.9). En consecuencia, en la mayoría de los casos, resulta de la fermentación de bacterias del ácido láctico (Domizio, P. y cols., 2016).

Hay muchas variaciones de cervezas de tipo ácido en numerosos países del mundo, siendo una de las más populares la Lambic, elaborada en Bélgica desde hace cerca de 400 años (Praia, A. B. y cols., 2022).

En la última década ha habido un interés creciente en el uso de levaduras no-*Saccharomyces* en la producción de algunos estilos de vino. *Lachancea* es única entre los géneros de levadura por su capacidad para producir ácido láctico, que puede afectar tanto el sabor como la sensación en la boca. Podría usarse además de *Saccharomyces* en fermentaciones cerveceras para producir una caída rápida del pH y las cepas que producen altos niveles de ácido láctico podrían potencialmente usarse para la producción de cerveza ácida sin la adición de bacterias, lo que simplificaría y acortaría el proceso.

### **1.1.1 IMPORTANCIA MUNDIAL Y CONSUMO EN ESPAÑA.**

El mercado mundial de la cerveza continúa experimentando aumentos anuales en el consumo y en los ingresos. En 2021 se produjo una recuperación en el mercado tras la excepción que supuso la pandemia de COVID-19. En todo el mundo se vendieron 174,72 mil millones de litros de cerveza en el 2021. El consumo mundial



de cerveza per cápita es de 22,8 litros, el país que más litros consumió fue China con 36,1 millones de kilolitros y el país con mayor consumo per cápita fue la República Checa. El mayor exportador del mundo por volumen es México mientras que el mayor importador es Estados Unidos (Jan Conway, 2022). En cuanto a marcas comerciales la que goza de un mayor capital fue la estadounidense Budweiser con 15.070 millones de dólares en 2022 seguida de Heineken y Stella Artois en segunda y tercera posición respectivamente (Abigail Orús, 2022).

En España la cerveza se ha asimilado como parte de la Dieta Mediterránea, que es considerada Patrimonio de la Humanidad de la Unesco. Además, la Sociedad Española de Nutrición Comunitaria la reconoce como parte de su Pirámide de Alimentación Saludable, mientras su consumo sea moderado y opcional (Aranceta-Bartrina J y cols., 2019). En este país, el consumo de cerveza está muy extendido pues el 83% de la población entre 18 y 65 años la consume de manera habitual u ocasional. El consumo total de cerveza en España en el 2021 fue de 40,04 millones de hectolitros y el consumo de per cápita fue de 50 litros (10).



**Figura 1. Litros de cerveza consumidos en las distintas regiones de España.**

## 1.2 MICROBIOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN.

Aparte de los ingredientes utilizados, lo más importante a la hora de elaborar una cerveza es el proceso de fermentación. Según las condiciones en que se realice

producirá resultados diversos. Tanto los tiempos de fermentación, la temperatura de fermentación, el tipo de levadura utilizados y el comportamiento de ésta en el tanque de fermentación son de gran importancia para producir un tipo de cerveza determinado (Garduño-García, A. y cols., 2014).

Durante la fermentación se producen CO<sub>2</sub>, etanol y otros subproductos metabólicos, además de liberar calor, a partir de carbohidratos, principalmente la glucosa y la maltosa procedentes de la malta del cereal añadido. La eficacia de las levaduras para efectuar la fermentación alcohólica depende de su capacidad para utilizar los azúcares presentes en el mosto. Esta capacidad determina en gran medida la tasa de fermentación, así como la calidad final de la cerveza producida. Para optimizar la eficacia se requiere un gran conocimiento de la cinética de consumo de azúcares que está vinculada a la cinética de crecimiento de la levadura (Simpson y Benjamin K., 2012).

Las principales etapas del proceso de elaboración de la cerveza son: producción de mosto, a partir de los cereales malteados, la fermentación alcohólica y maduración, elaboración de la cerveza. El mosto se transforma en cerveza durante la fermentación alcohólica y maduración, que son los procesos que requieren más tiempo. La fermentación dura entre 3 y 6 días, mientras que el tiempo de maduración es muy variable, desde pocos días hasta varios meses, dependiendo del tipo de cerveza y el resultado que se quiera (Iorizzo, M y cols., 2021).

### **1.2.1 DIVERSIDAD DE FERMENTACIONES.**

Atendiendo a los microorganismos que participan en la fermentación, se pueden distinguir distintos tipos de cervezas:

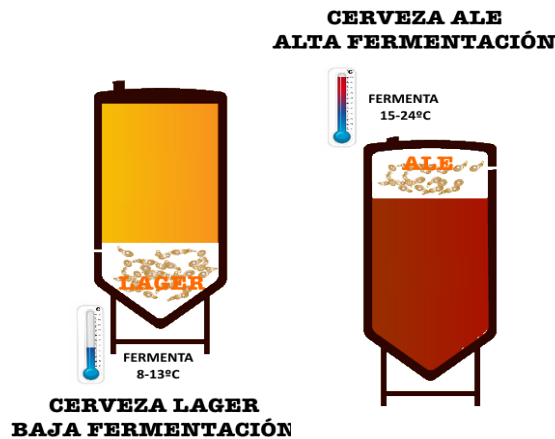
La cerveza ALE es un tipo de cerveza de fermentación alta, fermenta en torno a unos 15-20°C y el proceso dura entre 3 y 5 días. Esta fermentación involucra a la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, esta levadura tiende a flotar de forma natural en la parte superior de la cuba de fermentación y se hunde hasta el fondo una vez acabado el proceso, es por esto que a estas cervezas se las denominan fermentación superior (Vasas, M y cols., 2021). Las cervezas ALE se caracterizan por su gran capacidad de fermentar la maltotriosa, que representa el 20% del total

de azúcares fermentables del mosto cervecero (Iattici, F y cols., 2020). Este tipo de cervezas se distinguen por presentar unos sabores afrutados y aflorados, y una gran turbidez debido a las levaduras en suspensión (Krogerus, K y cols., 2017).

Las cervezas ALE gozan de mayor popularidad tanto en zonas del centro de Europa como en Gran Bretaña y en los Estados Unidos, no teniendo tanto público en nuestro país.

La cerveza LAGER fue elaborada por primera vez en el siglo XV en Baviera. La cerveza LAGER bávara era diferente a la actual cerveza lager, éstas eran bastante oscuras teniendo un color marrón o rojo ámbar. Esto cambió en 1842 cuando Joseph Groll realizó su primer lote de cerveza en Pilsen, utilizando el lúpulo checo denominado Zatec, dando así lugar al nacimiento de la primera cerveza clara del mundo (Pavlsler, A. y Buiatti, S. 2009).

Las cervezas LAGER a diferencia de otras cervezas y vinos requieren una fermentación lenta a temperaturas bajas (10-15°C), teniendo un menor grado alcohólico que las cervezas ALE (Libkind, D y cols., 2011). El 94% del mercado cervecero está dominado por cervezas tipo lager (Peris, D. y cols., 2016). Esta fermentación es llevada a cabo por un tipo de levadura especial, un híbrido alotetraploide, llamado *Saccharomyces pastorianus*. Es una especie domesticada creada a partir de dos progenitores: *Saccharomyces cerevisiae*, la levadura cervecera típica, y *Saccharomyces eubayanus* (Sampaio J. P. 2018). Su parental *S.eubayanus* le confiere una mayor tolerancia al frío, mientras que su parental *S.cerevisiae* le puede conferir otras adaptaciones al entorno de la elaboración de cerveza, como la fermentación de maltotriosa (Peris, D. y cols., 2016).



**Figura 2. Diagrama de fermentación de Lager y ALE**

Las Lambic son unas cervezas de fermentación espontánea. Estas cervezas se producen en una zona del suroeste de Bruselas, rodeando el valle del río Senne (De Roos J y De Vuyst L 2019). Se cree que este valle posee microorganismos específicos que son importantes para la elaboración de este tipo de cervezas. Estas cervezas se elaboran durante los meses de invierno ya que se piensa que las condiciones ambientales son las ideales (Bongaerts, D. y cols., 2021). Estas cervezas se basan en un largo proceso de fermentación espontánea y maduración en barricas de madera horizontales. Este proceso se inicia con la inoculación ambiental y puede durar hasta un máximo de 3 años, pasando así por cuatro fases: la fase enterobacteriana, fase de fermentación alcohólica, fase de acidificación y la fase de maduración. Las cervezas Lambic tienen un carácter ácido refrescante y presentan notas afrutadas (De Roos, J. y cols., 2020).

La creciente popularidad de la cerveza ácida insta al desarrollo de soluciones novedosas para fermentaciones controladas tanto para una acidificación rápida como para la consistencia en el sabor y la calidad del producto. Un enfoque posible es el uso de *S. cerevisiae* en co-fermentación con especies de *Lactobacillus*, que producen ácido láctico como principal producto final del catabolismo de carbohidratos. La capacidad de los lactobacilos para fermentar la cerveza está determinada por su capacidad para soportar el estrés relacionado con la elaboración de la cerveza. Esta co-fermentación de levadura y bacteria redujo los plazos de elaboración de cerveza ácida de 3 años, que tardan las cervezas lámbicas, a tan solo 21 días (Dysvik, A y cols., 2020).

Las levaduras *Brettanomyces* son levaduras no convencionales y se pueden aislar de diferentes fuentes como cáscaras de frutas, kombucha, kéfir, té, aceitunas, refrescos y barriles de madera, entre otros. Su presencia puede cambiar por completo las propiedades organolépticas del producto, creando un carácter controvertido, que se debe principalmente a la producción de metabolitos secundarios al realizar la fermentación alcohólica. Sin embargo, *Brettanomyces* aplicado de la manera correcta puede contribuir a sabores exóticos (por ejemplo, piña, mango, pera, uva). Se puede encontrar la presencia de *Brettanomyces* en las cervezas lambic y gueuze belgas después de la fermentación espontánea, siendo cruciales para su sabor particular (Colomer y cols., 2019).

### **1.2.2 ELABORACIÓN TRADICIONAL CERVEZA ÁCIDA.**

La principal diferencia que separa a las cervezas ácidas de las cervezas tipo ales y lagers es la alta concentración de ácidos orgánicos como el ácido láctico y el acético, a consecuencia de esto se obtiene un pH reducido y un mayor sabor ácido (Dysvik, A. y cols., 2020).

Las cervezas ácidas de manera tradicional tienen una fermentación espontánea en el que el mosto se inocula por exposición ambiental en lugar de inoculación microbiana activa (Dysvik, A. y cols., 2020). Los métodos tradicionales de producción de cerveza ácida originados en Bélgica se siguen utilizando hasta el día de hoy. Las lambics explicadas anteriormente son un tipo de cervezas ácidas.

Las cervezas Gueuze son mezclas de cervezas lámbicas fermentadas espontáneamente. Se mezcla una cerveza lámbica joven (normalmente de un año) con carbohidratos residuales con una cerveza lámbica vieja (normalmente de dos o tres años), que contiene la microbiota que puede convertir los carbohidratos de dextrina en más carbohidratos simples fermentables. Una vez mezcladas la cerveza refermenta espontáneamente sin añadir fuentes de energía, células bacterianas o levaduras. (Spitaels y cols., 2015)

Las cervezas Kriek son un tipo de cervezas lámbicas. Son mixtas, en el que a una cerveza lámbica (medianamente joven) se le agregan unas guindas. En el mercado actual, en muchas ocasiones las guindas son sustituidas por colorantes y

saborizantes para competir con otras cervezas afrutadas. Tradicionalmente las cervezas Kriek tienen un sabor más ácido y son menos afrutadas (De Rouck, G. y cols., 2014).

### **1.2.3 UTILIZACIÓN NOVEDOSA DE *LACHANCEA THERMOTOLERANS* EN LA ELABORACIÓN DE CERVEZA ÁCIDA.**

*Lachancea thermotolerans*, o como se la conocía anteriormente, *Kluyveromyces thermotolerans*; es una levadura muy común apareciendo tanto en ambientes naturales como artificiales. Es conocida por producir ácido láctico en grandes cantidades durante la fermentación del alcohol, llegando su capacidad hasta 16 g/L de producto. También mejora el aroma gracias a la producción de butirato de etilo y acetato de etilo tanto en fermentaciones puras como mixtas. Es una levadura teleomorfa con gemación multipolar que puede reproducirse de forma sexual formando de 1 a 4 ascosporas esféricas.

Actualmente se está estudiando el posible uso en la industria cervecera de *L. thermotolerans* para la producción de cervezas ácidas, pues ésta demostró tener algunas características que la hacían muy eficaz en la producción de cervezas ácidas. *L. thermotolerans* presenta una gran capacidad para el rápido inicio de la fermentación del mosto, y una tolerancia a los compuestos derivados del lúpulo (Zdaniewicz, M. y cols., 2020); una producción de ácido láctico y de glicerol muy elevada (Toh y cols., 2020); también presenta una capacidad más elevada que *S. cerevisiae* para disminuir el pH (Iattici, F. y cols., 2020); es la levadura no convencional que demostró tener una mayor eficiencia en la producción de etanol en extracto de malta (Holt, S. y cols., 2018); *L. thermotolerans* proporcionó diferenciación organoléptica, mejorando la complejidad del aroma y evitando la adición de bacterias (Gatto, V. y cols., 2020) y finalmente también proporciona el sabor agrio buscado en la elaboración de este tipo de cervezas (Kurtzman C. P., 2003).

### 1.3 APLICACIONES TECNOLÓGICAS DESEABLES EN LEVADURAS.

Como se ha indicado las levaduras son un ingrediente esencial en el proceso de elaboración de cervezas. Las cervezas más consumidas en el mundo, con mucha diferencia, son las LAGER, por tanto, la levadura más utilizada es *S. pastorianus*, seguida, a considerable distancia, por *S. cerevisiae*, responsable de la fermentación de cervezas ALE.

Actualmente las levaduras no convencionales han comenzado a ganarse un hueco en la industria, debido al auge de la cerveza artesanal y de consumidores con gustos variados y particularidades específicas. Generalmente las levaduras no convencionales presentan bajos rendimientos de fermentación y son sensibles al estrés por etanol, pero proporcionan un abanico de aromas y sabores distintos y características que impactan en el perfil organoléptico de la cerveza. Las levaduras no convencionales que se utilizaron en este proyecto fueron *L. thermotolerans*, *T. delbrueckii* y *W. anomalus* (Burini, J. A. y cols., 2021).

*L. thermotolerans* tiene múltiples características de relevancia industrial, pero la más interesante es la producción de ácido láctico de forma simultánea a la fermentación alcohólica (Gatto, V. y cols., 2020). *T. delbrueckii* presenta propiedades potenciadoras del sabor y el aroma, así como una notable resistencia al estrés osmótico y de congelación (Fernandes, T. y cols., 2021). *W. anomalus* resultó ser efectiva contra la presencia de mohos en el almacenamiento y en el ambiente, además de producir compuestos aromáticos y de sabor agradables (Arja Laitila y cols., 2011).

# **OBJETIVOS**



## 2. Objetivos:

Este trabajo de Fin de Grado tuvo como objetivo principal demostrar que la producción de cerveza ácida utilizando *Lachancea thermotolerans* será viable en un futuro a corto plazo. Para alcanzar este objetivo general, se establecieron los siguientes objetivos específicos:

1. Analizar su capacidad fermentativa y compararla con otras levaduras que también podrían ser utilizadas en la fermentación de cerveza como alternativa a *S. cerevisiae*.
2. Determinar qué cepas de *L. thermotolerans* mostraban mejores resultados, en general, para la producción de cerveza.
3. Evaluar el perfil sensorial del producto final envasado y analizar el impacto de las diferentes cepas de *L. thermotolerans* utilizadas, poniendo un énfasis especial en la producción de ácido láctico, principal responsable del carácter “agrio” de las cervezas resultantes.

# **MATERIALES Y**

# **MÉTODOS**

### 3. MATERIALES Y MÉTODOS.

#### 3.1 MICROORGANISMOS.

Tabla 1. Microorganismos utilizados en este estudio.

<i>Lachancea thermotolerans.</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Lt CH1F</i></li><li>• <i>Lt CH3f</i></li><li>• <i>Lt CH1T</i></li><li>• <i>Lt cerveza</i></li><li>• <i>Lt X-Fresh</i></li><li>• <i>Lt A391</i></li><li>• <i>Lt A392</i></li><li>• <i>Lt Hansen</i></li><li>• <i>Lt Lallemand</i></li><li>• <i>Lt A57</i></li></ul>
<i>Torulaspota delbrueckii.</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Td EX1180 2k-</i></li><li>• <i>Td TL</i></li><li>• <i>Td TL3</i></li><li>• <i>Td EX1180</i></li><li>• <i>Td EX1180 11C4</i></li><li>• <i>Td EX1257</i></li><li>• <i>Td EX1257 CYH5</i></li><li>• <i>Td Córdoba</i></li><li>• <i>Td EnaRti</i></li></ul>
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>
<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>Wa</i></li></ul>
<i>Saccharomyces</i> utilizadas como control
<ul style="list-style-type: none"><li>• <i>S. pastorianum. Sp S-23</i></li><li>• <i>S. cerevisiae. Sc E7AR1</i></li><li>• <i>S. cerevisiae. Sc S-04</i></li></ul>

### 3.2 MEDIOS DE CULTIVO Y MATERIAL UTILIZADO.

**Tabla 2. Composición del medio Y.E.P.D sólido.**

MEDIO Y.E.P.D SÓLIDO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Glucosa (PanReac), 20 g/L.</li><li>• Peptona de soja (VWR CHEMICAL), 20 g/L.</li><li>• Extracto de levadura (VWR CHEMICAL), 10 g/L.</li><li>• Agar (Cultimed), 20g/L.</li><li>• Agua destilada, hasta 1 L de volumen.</li></ul>

**Tabla 3. Composición del medio Y.E.P.D líquido.**

MEDIO Y.E.P.D. LÍQUIDO
<ul style="list-style-type: none"><li>• Glucosa (PanReac), 20 g/L.</li><li>• Peptona de soja (VWR CHEMICAL), 20 g/L.</li><li>• Extracto de levadura (VWR CHEMICAL), 10 g/L.</li><li>• Agua destilada, hasta 1 L de volumen.</li></ul>

**Tabla 4. Composición del mosto de cerveza sintético.**

MOSTO CERVEZA
<ul style="list-style-type: none"><li>• Extracto de Malta (VWR CHEMICAL), 37,5 g/L.</li><li>• Agua destilada, hasta 1 L de volumen.</li></ul>

**Tabla 5. Materiales utilizados.**

MATERIAL
Material General de Laboratorio: <ul style="list-style-type: none"><li>• Mechero, asas de siembra, palillos estériles.</li><li>• Pipetas automáticas de diferentes volúmenes y puntas.</li><li>• Probetas y matraces de diferentes volúmenes, viales de plástico, tubos de cultivo, gradillas.</li><li>• Alcohol, agua destilada, placas de Petri.</li></ul>

- Estufas de cultivo a 30°C y 37°C.
- Autoclave.
- Campana de flujo laminar.
- Microscopio de laboratorio.
- Microcentrífuga marca Eppendorf.
- Centrífuga marca Sigma.
- Espectrofotómetro.
- Agitador orbital para tubos de cultivo (noria).

Material Específico para la Elaboración de Cerveza:

- Olla de maceración/hervido automática de 30L.
- Equipo MIURA one
- Espiral de refrigeración del mosto.
- Paleta de metal.
- Termómetro, densímetros.
- Maltas, lúpulos y levaduras.
- Molino manual para la malta.



**Figura 3. Centrífuga utilizada para viales de 1,5 mL.**



**Figura 4. Centrifuga utilizada para viales de 20 mL**

### **3.3 SEGUIMIENTO DE LA FERMENTACION**

El progreso de la fermentación, se monitorizó determinando la variación de distintos parámetros: Recuento de células viables, absorbancia, grados Brix y densidad.

3.3.1. El método de recuento en placa es un método de medición de biomasa que permite determinar el número de células viables por unidad de volumen presentes en el fermentador. Consiste en sembrar en una placa con medio sólido una alícuota de cultivo, suficientemente diluida, y contar las colonias generadas por crecimiento de las células aisladas.

3.3.2. La absorbancia se determina utilizando un espectrofotómetro, que es un aparato que dirige la luz de una longitud de onda específica a través de una muestra y mide la cantidad de luz que absorbe la muestra. Cuanto más alta sea la concentración celular, mayor será la cantidad de luz dispersada y menor la cantidad de luz que llega al detector (mayor absorbancia).

3.3.3. Los grados Brix se midieron con un refractómetro, un instrumento que mide la refracción de la luz al atravesar una muestra. Cuanto más alta sea la concentración de azúcares, mayor será el índice de refracción y mayor el número de grados Brix. Cuanto mayor sea el número de grados Brix, mayor será el poder fermentativo de la muestra.

3.3.4. La densidad de la muestra también es proporcional al contenido en azúcares. En esta experiencia, la densidad de las muestras se determinó con un densímetro.

### 3.4 TEST DE FLOCULACIÓN POR EL MÉTODO DE ABSORBANCIA.

Se hicieron cultivos en tubos con 5 mL de YEPD líquido, con agitación (en la noria) durante 48 horas. Una vez que crecieron y se descartó contaminación, los cultivos se centrifugaron a 3000 rpm durante 5 minutos (centrifugadora sigma), se descartaron los sobrenadantes y los precipitados de levaduras se lavaron tres veces con agua destilada estéril. Se colocaron alícuotas de las levaduras a una concentración de  $10^8$  células/mL en seis viales de 1,5 mL, de los cuales 3 eran tratamiento A y los otros 3 tratamiento B, ambos resuspendidos en 1 mL de agua destilada estéril.

- Tubos A: se centrifugaron a 1300 rpm durante 1 minuto (centrifugadora eppendorf) y se descartó el sobrenadante. Se añadió 1 mL de 0.05 M EDTA pH 7 y se agitó con un vortex durante 15 segundos. Se invirtió 5 veces y se dejó reposar entre 10 y 20 min. Se cogieron 100  $\mu$ L del sobrenadante, justo por debajo del menisco, los más superficiales y se pusieron directamente en una cubeta a la que se añadieron 900  $\mu$ L de agua destilada y se midió la densidad óptica a 600nm. Se utilizó agua destilada como blanco.
- Tubos B: se centrifugaron a 1300 rpm durante 1 minuto (centrifugadora eppendorf) y se descartó el sobrenadante. A cada uno de ellos se añadió 1 mL de Helms A ( $\text{CaSO}_4$  0,51g/L; 3,7 mM) y se agitó en un vortex durante 15 segundos para que el pellet se removiera bien. Nuevamente se volvió a centrifugar y se descartó el sobrenadante. El precipitado se resuspendió en 1 mL de solución Helms B ( $\text{CaSO}_4$  0,51g/L: acetato de sodio 6,8 g/L: ácido acético glacial 4,05 g/L: etanol 4% en un litro de agua desionizada). Los viales se invirtieron 5 veces y se dejaron sedimentar durante 20 minutos. Se cogieron 100  $\mu$ L de debajo del menisco con cuidado de no remover el tubo. Estos 100  $\mu$ L se pusieron en una cubeta y se añadieron 900  $\mu$ L de agua destilada. Se midió la densidad óptica a 600 nm frente, a agua destilada.

Para obtener el porcentaje de floculación se utilizó la fórmula matemática:

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

Este protocolo fue realizado con base en las experiencias realizadas por Smart y cols., (2006)

### 3.5 PROTOCOLO DE MICROFERMENTACIONES

Las levaduras se inocularon en 5 mL de medio YEPD líquido y se dejaron crecer durante 48 horas. También se realizó la preparación de mosto de cerveza sintético. El mosto de cerveza fue dosificado en tubos de 25 mL con 20 mL en cada uno. Se rellenaron viales de 1,5 mL con distintas cantidades del inóculo de levaduras en cada caso (*T. delbrueckii*: 800 µL, *L. thermotolerans*: 430 µL, *S. cerevisiae* 260 µL) esto se hizo para que comenzasen con la misma densidad de células, ya que cada especie crece a diferente velocidad. Se dejó un tubo sin inóculo que sirvió como control. Los viales con el inóculo, se sometieron a una centrifugación (1 minuto 1400 rpm en centrifugadora eppendorf). Se retiró el sobrenadante y se resuspendió en 800 µL. Se agitó con un vortex y se centrifugó (1 minuto 1400 rpm en centrifugadora eppendorf) y se descartó el sobrenadante en condiciones de esterilidad; este proceso se repitió 4 veces. Una vez realizados estos lavados, se tomaron 800 µL de cada tubo y se vertieron en los viales, se resuspendió mediante agitación con vortex y se vertieron nuevamente en los tubos. Los tubos se agitaron para conseguir la mezcla, se tomaron 10 µL del contenido de estos y se vertieron en un vial con 990 µL de agua hasta conseguir una dilución de  $10^{-5}$  células/mL que se utilizó para sembrar en placa con medio YEPD sólido. Estas placas se incubaron en una estufa a 30°C durante 48 horas y se contó el número de colonias presentes en cada placa.

Los tubos se agitaron con vortex nuevamente y se extrajeron 600 µL de cada uno, que se utilizaron para determinar la densidad óptica a 600 nm frente al cultivo no inoculado que se dejó como control. De estas mismas cubetas se extrajeron 100 µL para determinar los grados Brix, ajustando previamente el refractómetro a 0, con agua destilada. En el día final de esta experiencia se volvieron a extraer 10 µL de cada tubo, se diluyeron hasta tener la concentración deseada ( $10^{-5}$  células/mL) y se sembraron en una placa de YEPD. Las placas inoculadas se incubaron en una



estufa a 30°C durante dos días para después contar el número de colonias presentes en la placa.



**Figura 5. Refractómetro utilizado para medir los grados Brix.**



**Figura 6. Espectrofotómetro utilizado para medir la densidad óptica.**

### **3.6 PROTOCOLO DE ELABORACIÓN DE CERVEZA.**

Para la elaboración de la cerveza, se utilizaron dos kits comerciales diferentes calculados para 20 L: Múnich y Red Special.

La cerveza Múnich es una cerveza del estilo LAGER.

La cerveza Red Special es una cerveza del tipo ALE, caracterizada por un color rojizo debido a un pequeño porcentaje de maltas coloreadas utilizadas en su elaboración.

Se comenzó moliendo el grano de cereal malteado en un molino manual. El objetivo es partir el grano sin llegar a tritarlo completamente, para que los azúcares se solubilizan más fácilmente y sean más accesibles a las enzimas, pero sin que se forme harina (polvo). Mientras tanto, la olla se llena de agua hasta

aproximadamente 20 litros y se programa la temperatura de maceración, correspondiente al tipo de cerveza que se vaya a elaborar. Cuando el agua alcanza la temperatura objetivo, se añade el grano incluido en una bolsa de malla y se sigue el esquema de maceración adecuado para la cerveza que queremos obtener (ver tablas 6 y 7). Durante la maceración actúan las enzimas presentes en la malta base, con el objetivo principal de generar los azúcares que serán fermentados por la levadura. Una vez completada la maceración, el residuo sólido se lavó con 4 litros de agua adicionales con el objetivo de recoger todos los azúcares solubles. Una vez lavado se retira la bolsa con el grano y la olla se vuelve a programar a 100°C para realizar el hervido de la solución azucarada. Las funciones del hervido son las siguientes: eliminar posibles microorganismos contaminantes, aclarado por precipitación de proteínas, e incorporación del lúpulo. Cuando el agua comienza a hervir se añade el lúpulo, incluido en una cesta metálica, siguiendo las instrucciones del kit comercial (cantidades y tiempos precisos). Cuando el proceso de hervido se ha completado (ver tablas 6 y 7) se retira la cesta con el lúpulo y el mosto se enfría rápidamente con un serpentín con agua fría durante unos 10-15 minutos, o hasta que se consigue bajar la temperatura aproximadamente a 22°C.



**Figura 6. Olla programable con control de temperatura y tiempo utilizado para la elaboración de cerveza**

Seguidamente, el mosto se repartió en matraces de 2 L, con 1 L de mosto cada uno. En esta experiencia se utilizaron 6 matraces. Cada uno de los matraces, se inoculó con la levadura correspondiente, se agitó hasta una completa resuspensión de las células y se incubaron en una habitación termostaticada a 22,5°C.

El seguimiento de la fermentación se realizó tomando muestras periódicamente, en las que se determinaban densidad, grados Brix y número de células, por recuento en placa (ver métodos descritos previamente).

Las levaduras que se utilizaron (Tabla 8) fueron las que mejor resultado dieron en los experimentos de floculación y microfermentaciones.

Cuando la densidad dejó de bajar y se estabilizó, la fermentación se dio por finalizada, por lo que se procedió a embotellar la cerveza. Se utilizaron botellas de cristal de 75 cL. Las botellas fueron previamente lavadas con alcohol como medida esterilizante. En el momento de embotellar, para la cerveza Múnich se añadieron 8 gramos/L de sacarosa como “priming” para que se produzca la segunda fermentación en botella (toma de espuma). En el caso de la Red Special se añadieron solamente 4 gramos/L de sacarosa.

Esquemas de Maceración y Tiempos de Cocción según receta del kit comercial:

**Tabla 6. Esquemas de maceración y tiempo de cocción para el estilo Múnich.**

62°C	72°C	78°C
50 min	20 min	2 min
Tiempo de hervido: 60 min		

**Tabla 7. Esquemas de maceración y tiempo de cocción para el estilo Red Special.**

52°C	62°C	72°C	78°C
12 min	40 min	30 min	5 min
Tiempo de hervido: 75 min			

**Tabla 8. Levaduras usadas para la elaboración de cerveza.**

<b>Levaduras usadas para la elaboración de cerveza</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Lt Hansen</li> <li>• Lt A57</li> <li>• Lt A391</li> <li>• Lt A392</li> <li>• Sc S-04</li> <li>• Wa</li> </ul>



*Figura 8. Medida de la densidad de la cerveza con el densímetro*

### **3.7 CUANTIFICACIÓN DE LOS COMPUESTOS DE INTERÉS TECNOLÓGICO.**

La presencia de azúcares reductores (glucosa y fructosa) así como la cantidad de ácido L-Láctico presente en la cerveza elaborada se determinó mediante un analizador multiparamétrico denominado MIURA One. El fundamento del método de análisis empleado es:

- La enzima Hexoquinasa (HQ) cataliza la fosforilación de la D-Glucosa y de la D-Fructosa mediante la adenosin-5'-trifosfato (ATP), el incremento en la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADPH es directamente proporcional a la concentración de la D-glucosa+D-fructosa en la muestra.
- La enzima L-lactato deshidrogenasa (L-LDH) cataliza la oxidación del ácido L-láctico a piruvato con la reducción concomitante del NAD. El incremento en la absorbancia a 340 nm debido a la formación de NADH es directamente proporcional a la concentración del ácido L-Láctico en la muestra.

El analizador necesita, para su correcto funcionamiento, las dos soluciones reactivas correspondientes a cada parámetro de interés además de un volumen mínimo de 600  $\mu$ L de muestra de cada fermentador.



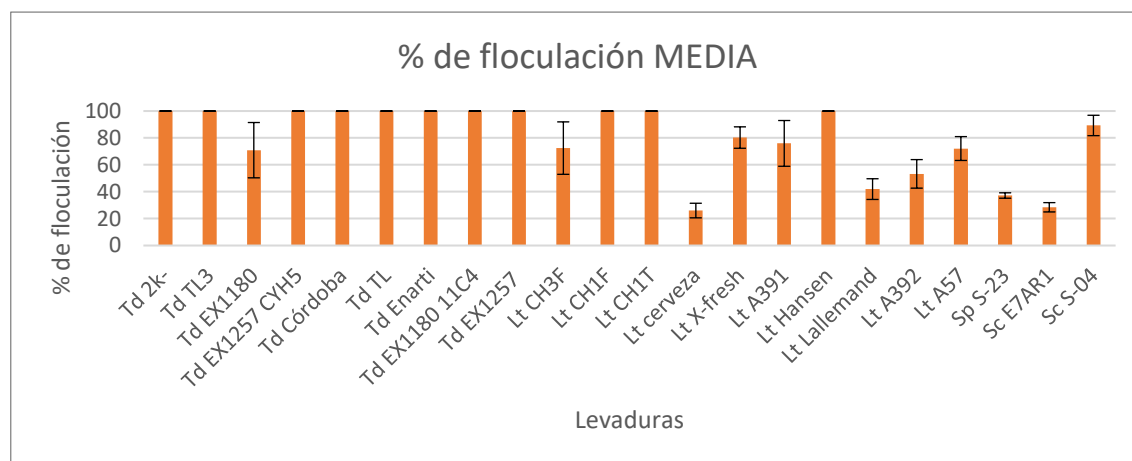
**Figura 9. Analizador multiparamétrico Miura One.**

# **RESULTADOS Y** **DISCUSIÓN**

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 4.4 TEST DE FLOCULACIÓN:

La floculación es un término utilizado para describir el comportamiento de agregación de la levadura, en este caso en la fermentación del mosto cervecero. Cuando una levadura tiene baja floculación, normalmente queda más tiempo suspendida en la cerveza, dándole una apariencia turbia y aportándole unos sabores propios a la misma. En las levaduras del género *Saccharomyces*, cuando presentan alta floculación, al finalizar la fermentación, precipitan mucho más rápido, lo cual facilita que la cerveza sea más clara y tenga unos sabores más limpios. Las levaduras no-*Saccharomyces* presentan una baja floculación, lo cual es un problema que ralentifica la producción cervecera y se debe solventar como se refleja en el estudio de Cubillos y cols., (2018). En las levaduras utilizadas en este estudio (no-*Saccharomyces*), una alta floculación facilitaría el proceso de clarificación de la cerveza en los trasiegos, por lo que hemos realizado un estudio de floculación para las distintas cepas, utilizando la metodología descrita en el apartado 3.4.



**Figura 10. Porcentaje de floculación de las levaduras a estudio.**

Como se puede observar en la figura 10, las levaduras que presentaron un mayor porcentaje de floculación son la *Lachancea thermotolerans* (Lt) CH1F, *Torulaspora delbrueckii* (Td) EX1257 CYH5, Lt CH1T y Td EX1257. Las levaduras en cambio

que menor porcentaje de floculación presentaron fueron *Lt A57*, *Lt cerveza*, *Lt Lallemand* y *Lt A392*.

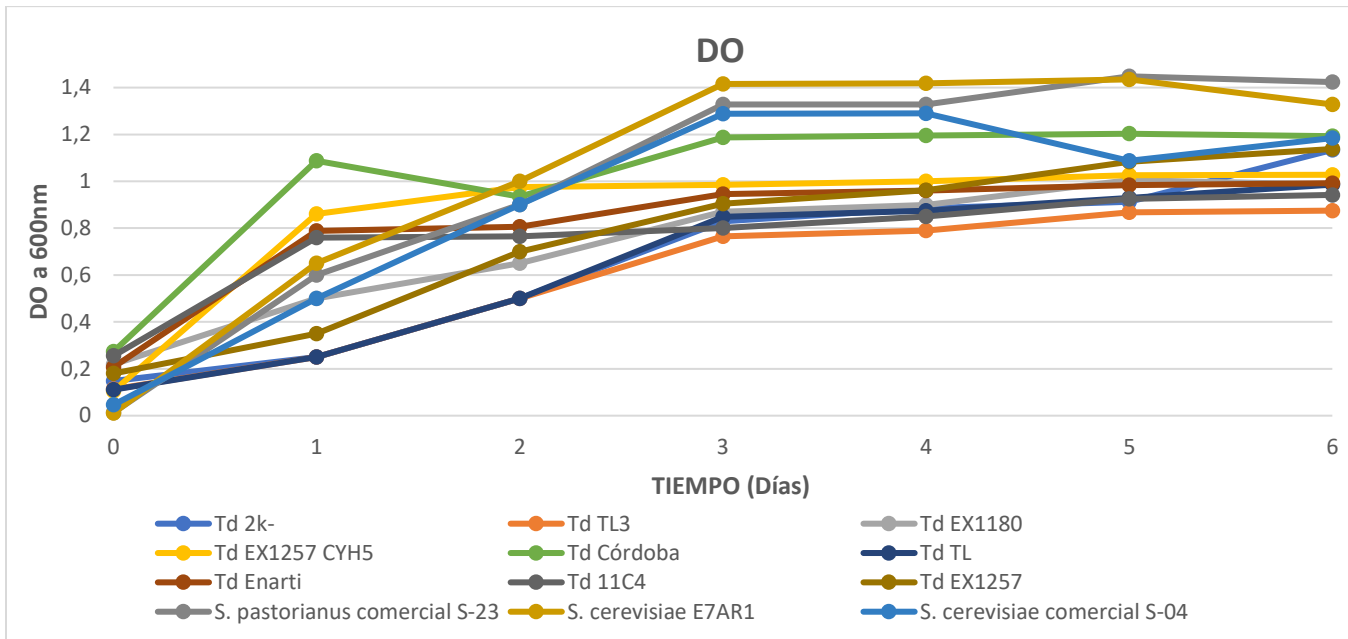
Estos resultados parecen indicar que las cepas analizadas de *Torulaspora delbrueckii*, como norma general, floculan más que las de *Lachancea thermotolerans*.

Estos resultados muestran el nivel de floculación que presentan las levaduras en la fase estacionaria, como apunta el protocolo. Podrían ser interesantes aquellas levaduras que presentan una floculación justo al final de la fermentación, pues si esta floculación se lleva a cabo desde periodos tempranos, la precipitación posterior de estos flóculos, darían como resultado una fermentación de los azúcares no eficiente, pues el resto de azúcares presentes en el mosto no estarían accesibles para las levaduras.

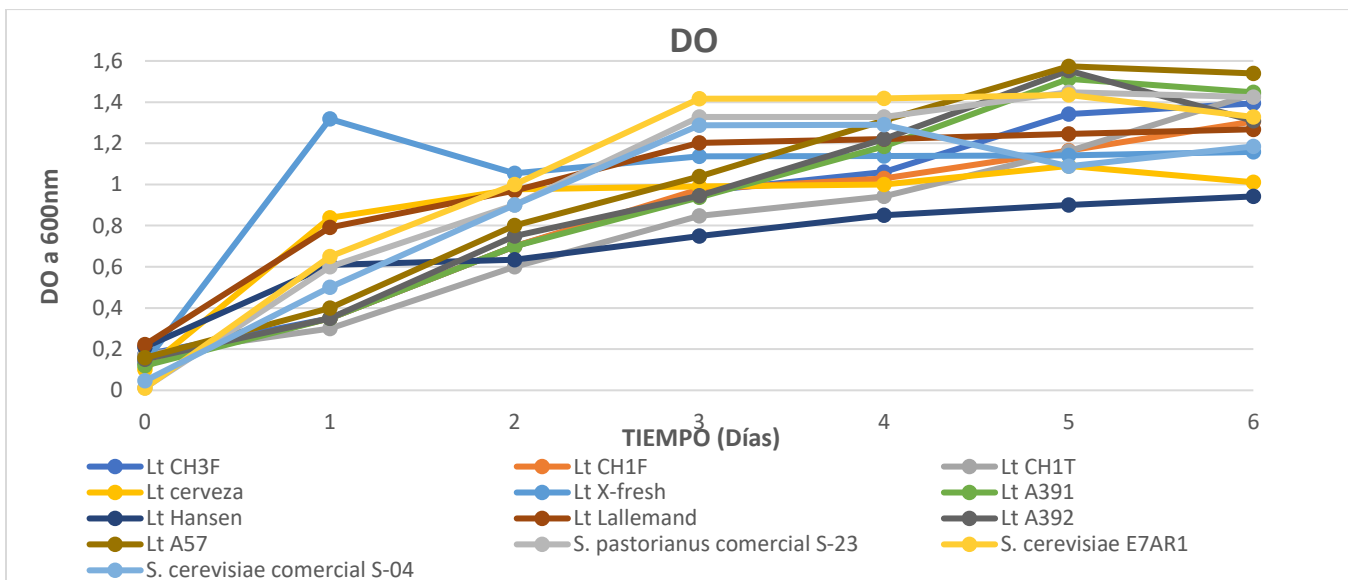
#### **4.5 CINÉTICA DE MICROFERMENTACIONES:**

Para el estudio de la cinética de microfermentaciones, en mosto cervecero sintético, se realizó un seguimiento de la evolución del consumo de azúcares determinado la densidad óptica a 600nm (aumento de la densidad celular, figs. 11 y 12) y la disminución de los grados Brix (figs. 13 y 14). La cinética de fermentación nos da una aproximación del potencial fermentativo que tendría una levadura en el mosto cervecero.



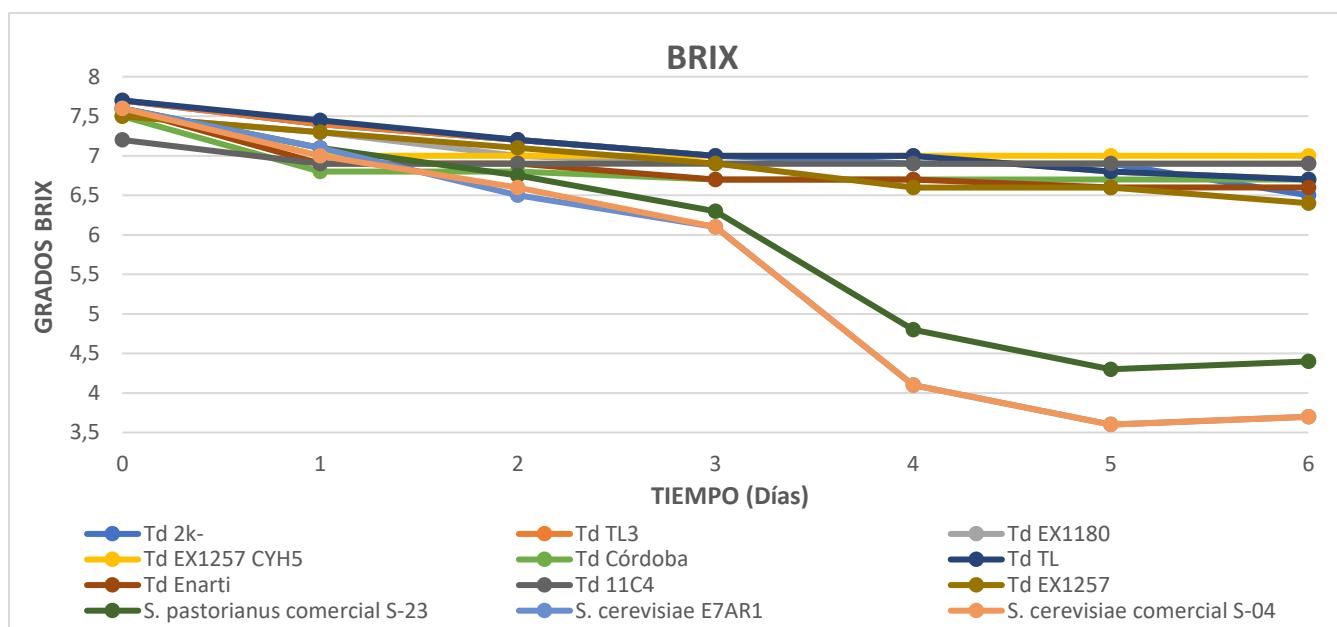


**Figura 11. Evolución de la Densidad Óptica en fermentaciones de Td 2k-, TI3, EX1180, EX1257 CYHH, Td Córdoba, TI, Td Enarti, EX1180 11C4, EX1257, Saccharomyces pastorianus comercial S-23, Saccharomyces cerevisiae E7AR, Saccharomyces cerevisiae comercial S-04.**

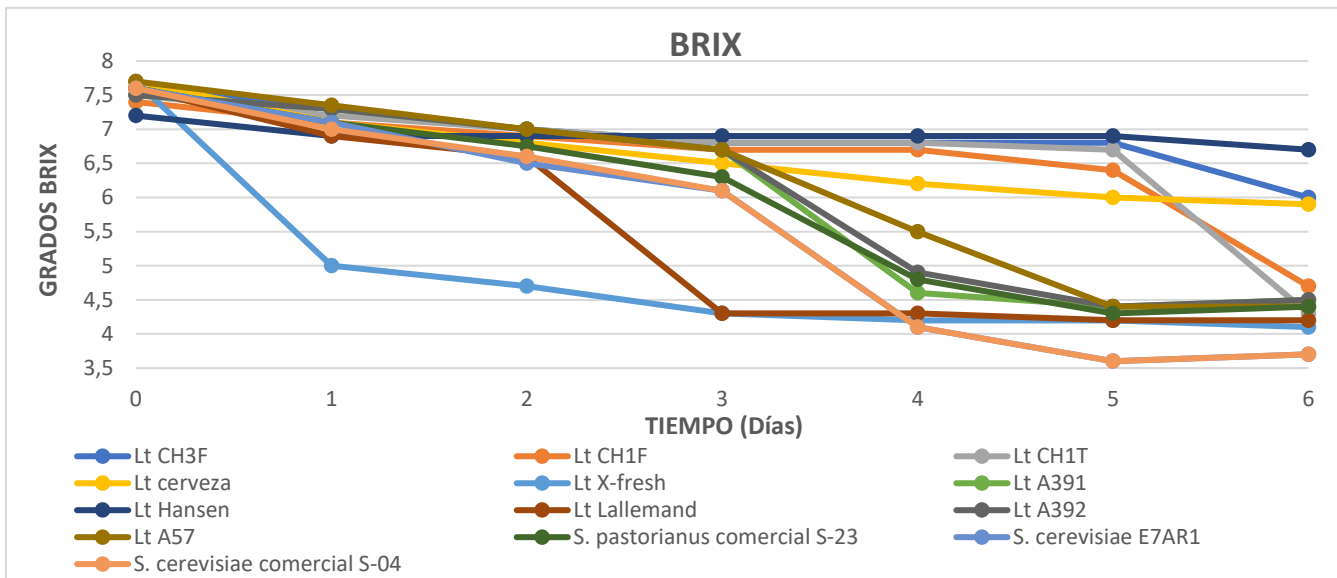


**Figura 12. Evolución de la Densidad Óptica en fermentaciones de Lt CH3f, Lt CH1F, Lt CH1T, Lt cerveza, Lt X-Fresh, Lt A392, Lt Hansen, Lt Lillemand, Lt A392, Lt A57, Saccharomyces pastorianus comercial S-23, Saccharomyces cerevisiae E7AR, Saccharomyces cerevisiae comercial S-04.**

En las gráficas de las figuras 11 y 12, observamos que las levaduras que alcanzan una mayor densidad óptica (mayor densidad celular) son las *Saccharomyces cerevisiae* como era de esperar, pues era el grupo control. Las *L. thermotolerans* alcanzaron una absorbancia mayor que las *T. delbrueckii*, destacando en éstas, las cepas *Lt A57*, *Lt A391*, *Lt A392*, *Lt CH3F*. En cuanto a las *T. delbrueckii* las que alcanzaron una mayor absorbancia fueron la *Td Córdoba* y *Td 2k-*. Estos resultados demuestran que las *L. thermotolerans* crecen algo más rápido y son más eficientes en la utilización de los azúcares que las *T. delbrueckii*.



**Figura 13. Evolución de los Grados Brix en fermentaciones de Td 2k-, TL3 Lallemand, EX1180, EX1257 CYH5, Td Córdoba, TL Lallemand, Td Enanti, EX1180 11C4, EX1257, Saccharomyces pastorianus comercial S-23, Saccharomyces cerevisiae E7AR, Saccharomyces cerevisiae comercial S-04.**



**Figura 14. Evolución de los Grados Brix en fermentaciones de Lt CH3F, Lt CH1F, Lt CH1T, Lt Cerveza, Lt X-fresh, Lt A391, Lt Hansen, Lt Lallemand, Lt A392, Lt A57, Saccharomyces pastorianus comercial S-23, Saccharomyces cerevisiae E7AR, Saccharomyces cerevisiae comercial S-04.**

Como se aprecia en las figuras 13 y 14, las levaduras que provocan una bajada más pronunciada de los grados Brix y, por tanto, las que fermentan más azúcares presentes en el mosto de la cerveza, son las *S. cerevisiae* como cabía de esperar, pues era nuestro grupo control. Asimismo, se observa que las *L. thermotolerans* son más eficientes que las *T. delbrueckii* en el mismo tiempo y, entre ellas, cabe destacar en las *L. thermotolerans*; Lt A57, Lt A392, Lt CH1T y Lt A391. Los resultados de las figuras 13 y 14 están en consonancia con los obtenidos previamente en las figuras 11 y 12: aquellas cepas que no son tan capaces de fermentar los azúcares, no alcanzan densidades ópticas tan elevadas.

Como consecuencia de estos experimentos, podemos concluir que, en general, las *L. thermotolerans*, presentan mejores características fermentativas en el mosto de cerveza, que las *T. delbrueckii* por lo que, desde este punto de vista, parecen más adecuadas para ser utilizadas en elaboración de cerveza. Los resultados del estudio de Iturrutxa y cols., (2023) también corroboran el gran potencial fermentativo de *L. thermotolerans*.

#### **4.6 SELECCIÓN DE LEVADURAS CANDIDATAS PARA ELABORACION DE CERVEZA.**

A partir de los resultados obtenidos en los experimentos de floculación y del potencial fermentativo del mosto cervecero, se seleccionaron las levaduras más favorables para ser utilizadas en el proceso de elaboración de cervezas.

Fueron las siguientes:

*Saccharomyces cerevisiae S-04*. Esta levadura fue seleccionada como control, pues en experimentos previos presentó un buen rendimiento en la producción.

*Lachancea thermotolerans Lt A57, Lt A391, Lt A392, Lt Hansen (comercial)*.

*Wickerhamomyces anomalus*. Esta última levadura se aisló de fermentaciones de aceitunas. En base a los datos encontrados en la literatura (Canónico, L. y cols.,2019), se ensayó de manera experimental en la elaboración de cerveza.

Se elaboraron dos estilos de cerveza diferente: Múnich y Red Special, que básicamente se diferencian en las maltas utilizadas. En cada una de ellas se hicieron varios lotes que se inocularon con las levaduras seleccionadas, para estudiar diferencias cepa-dependientes.

#### **4.7 RESULTADOS DE LAS ELABORACIONES.**

Se realizaron 6 elaboraciones en el estilo Múnich, cada una de ellas con un inóculo diferente de levadura, y las mismas 6 en el estilo Red Special. En ambos casos, se hicieron por duplicado para asegurar la fiabilidad de los resultados y su replicabilidad.

En todos los casos se determinó la densidad al principio y al final de la fermentación, así como el contenido en ácido L-láctico y azúcares (glucosa+fructosa). Los resultados se muestran en la tabla 9.

**Tabla 9. Densidad, contenido en ácido láctico y contenido en azúcares fermentables al inicio y al final de las fermentaciones.**

	Cata	Densidad		Día 0		Día 6	
		Día 0	Día 6	g/L ácido L-láctico	g/L Gluc+fruct	g/L ácido L-láctico	g/L Gluc+fruct
Munich 1	Control Sc S-04	1046	1014	0,05	9,27	0,05	0,07
	Lt A57	1046	1021			1,07	0,03
	Lt A392	1046	1022			0,8	0,04
	Lt A391	1046	1022			0,68	0,04
	Lt Hansen	1046	1022			0,31	0
	Wa	1046	1035			0,56	0
Munich 2	Control Sc S-04	1046	1012	0,05	7,92	0,1	0,06
	Lt A57	1046	1018			0,72	0,01
	Lt A392	1046	1017			0,96	0,02
	Lt A391	1046	1015			0,72	0,02
	Lt Hansen	1046	1019			0,08	0
	Wa	1046	-			0,06	0
Red Special 1	Control Sc S-04	1053	1014	0,08	13,58	0,09	0,05
	Lt A57	1053	1020			1,24	0
	Lt A392	1053	1021			1,69	0
	Lt A391	1053	1021			2,23	0,03
	Lt Hansen	1053	1021			0,29	0
	Wa	1053	1020			0,09	0
Red Special 2	Control Sc S-04	1054	1014	0,06	14	0,07	0,05
	Lt A57	1054	1020			1,84	0
	Lt A392	1054	1020			2,91	0
	Lt A391	1054	1021			3,52	0
	Lt Hansen	1054	1025			0,29	0
	Wa	1054	1034			0,07	0,07

A la vista de los resultados de la tabla 9, se pueden hacer las siguientes consideraciones:

- a) En general, las fermentaciones han transcurrido razonablemente bien con todas las cepas de *Lachancea thermotolerans* utilizadas, ya que tanto la densidad final como la cantidad residual de glucosa+fructosa, se asemejan a los valores obtenidos con el control.
- b) Solamente *Wickerhamomyces anomalus* muestra fermentaciones incompletas puesto que la densidad al final de la fermentación, es claramente más alta de la que presenta el control. No obstante, el contenido en glucosa+fructosa residual es prácticamente 0. Esto parece indicar que

esta levadura consume casi exclusivamente los monosacáridos presentes en el mosto.

- c) El contenido en ácido láctico al final de la fermentación se acerca mucho a lo esperado. La cepa control (*S. cerevisiae*) y *W. anomalus*, no producen ácido láctico, mientras que todas las cepas de *L. thermotolerans* ensayadas, sí lo producen.
- d) Debemos resaltar que la cepa comercial Lt Hansen, es la que presenta valores más bajos de producción de ácido láctico.
- e) El tipo de malta utilizada en la preparación del mosto cervecero (malta Múnich o malta Red Special) no parece influir en la capacidad fermentativa de las levaduras. Sin embargo, los valores de ácido láctico producido durante la fermentación, parecen ser más altos cuando se utiliza la malta Red Special.

Teniendo en cuenta la capacidad fermentativa y la producción de ácido láctico, en principio, cualquiera de las cepas de *Lachancea* aisladas en nuestro laboratorio serían aptas para ser utilizadas en la producción de cervezas ácidas, sin necesidad de utilizar bacterias en el proceso de acidificación. La acidez parece más pronunciada cuando se utiliza malta Red Special.

Los buenos resultados de *L. thermotolerans* en la producción de cervezas ácidas fueron también descritos en el estudio de Postigo y cols., (2023)

En la tabla 10 se pueden observar los resultados del recuento de células viables, crecidas en medio YEPD. Se realizó la siembra en el día 0 de la fermentación y en el día del embotellamiento de la cerveza. Se sembró con una dilución de  $10^{-5}$ . En la Red Special el recuento de colonias se ajustaba bastante bien al número esperado. En cambio, en la Múnich, en algunos casos no observamos crecimiento debido, probablemente, a un fallo en la manipulación durante el proceso.

**Tabla 10. Recuento de células viables de las distintas cepas en medio Y.E.P.D, al inicio y al final de la fermentación.**

Cepa	Levaduras	UFC/mL	
		Tiempo Inicial	Tiempo Final
Munich	A391	-	C
	A392	-	C
	S-04	1,30E+06	C
	WA	5,30E+06	C
	LT Hansen	4,00E+05	C
	A57	4,00E+06	C
Red Special 1	A391	4,20E+06	6,14E+07
	A392	3,40E+06	4,26E+07
	S-04	2,30E+06	7,40E+07
	WA	1,92E+07	8,34E+07
	LT Hansen	9,80E+06	1,29E+08
	A57	3,90E+06	6,02E+07
Red Special 2	A391	2,93E+07	4,02E+07
	A392	3,03E+07	6,76E+07
	S-04	4,90E+06	5,70E+06
	WA	2,30E+07	1,51E+08
	LT Hansen	2,24E+07	1,42E+08
	A57	3,01E+07	8,18E+07

Tras embotellar las cervezas se dejó reposar de nuevo a una temperatura de 22,5°C durante dos semanas con el fin de que se produjera la fermentación del azúcar añadido para la “toma de espuma”. Una vez concluidas las dos semanas se realizó una cata obteniendo los resultados que se presentan en la tabla 11.

El panel de catadores estaba compuesto por 2 mujeres y 4 hombres de entre 22 y 64 años. El archivo de degustación fue descargado de [www.catast.com](http://www.catast.com), siendo este el más común utilizado para este propósito. En este panel sensorial se recogieron resultados de la fase visual, fase de aroma y fase de degustación, y todos ellos iban desde 0, “muy malo”, a 5, “excelente”. Las muestras de cervezas se entregaron codificadas, 100 mL en vasos Tilquin de 25 cL a una temperatura de 8°C. Los catadores tenían todas las cervezas diferentes para comparar correctamente.

**Tabla 11. Cata de las cervezas elaboradas. Descripción de algunas características y puntuación (La puntuación es de 0 a 5 siendo 0 el valor más bajo y 5 el más alto).**

	Cata	Descripción	Puntuación
Munich 1	Control Sc S-04	Presenta poco gas y acidez, posible contaminación.	2
	Lt A57	Muy buena, acidez correcta, mejor que Hansen.	5
	Lt A392	Presenta un olor a agua estancada y acidez, bastante mala en general.	0
	Lt A391	Mismas características que A392.	0
	Lt Hansen	Presenta un buen olor y acidez, mejor que el Control.	4
	Wa	No se embotelló debido a sus malas propiedades.	0
Munich 2	Control Sc S-04	Carbónico al abrir y en boca. Perdura la espuma y posee un olor agradable.	2,5
	Lt A57	Más carbónico al abrir, en boca, frescor, más retrogusto, persistencia, más carbónico. Tenía más espacio de cabeza.	4,5
	Lt A392	Más carbónico al abrir, en boca, sabor parecido al de las manzanas verdes. Mayor espacio de cabeza.	5
	Lt A391	Carbónico como el control, al igual que el aroma. Al abrir ligero olor a sucio, Más aroma que equilibrio. Ácida.	3
	Lt Hansen	Más carbónico que el control pero menos que A57. Poco aroma y poco equilibrado. Perdura más la espuma.	3
	Wa	No se llegó a embotellar debido a los malos resultados previos.	0
Red Special 1	Control Sc S-04	Muy carbónico, olor a regaliz. Se le da una puntuación de 2,5 para compararlos con él (en escala normal, tendría un 4,5 sobre 5)	2,5
	Lt A57	Carbónico pero menos, tiene buen olor. Flocula poco.	3
	Lt A392	Carbónico como A57, flocula más que A391 y tiene olor ácido.	3
	Lt A391	Carbónico, huele peor que A392.	3,5
	Lt Hansen	Mayor acidez que el control. Presentaba espuma.	2,5
	Wa	No tiene espuma, no flocula, no tiene buen olor; huele a acetona.	0
Red Special 2	Control Sc S-04	Aroma mayor aunque menos carbónico al abrir que la primera Red Special.	2,5
	Lt A57	Menos carbónico que el Control pero presenta más aroma, más redondo y más equilibrio que su replicado.	3
	Lt A392	Muy poco gas, más aroma, un poco sucio, toque extra más aroma más cuerpo, poco espacio de cabeza.	4
	Lt A391	Carbónico, presentaba un aroma más dulce y más cuerpo.	4,5
	Lt Hansen	Mejor que la primera Red Special pero no llega al nivel de las demás.	3
	Wa	Nuevamente olor a acetona y ninguna característica buena destacable.	0

Como se puede observar en la tabla, en el caso del estilo Múnich, cerveza mejor valorada resultó ser la elaborado con la cepa Lt A57, en las dos elaboraciones duplicadas, incluso mejor en ambos casos que el control elaborado con *S. cerevisiae* o la cepa comercial Lt Hansen.

Esta cepa también se comportó razonablemente bien en el caso de las Red Special, aunque en este estilo resultó superada ligeramente por Lt A391.

Esta tabla también confirma que la cepa utilizada de *W. anomalus* no es adecuada para ser utilizada en elaboración de cerveza. Habría que extender el estudio a otras cepas de la misma especie para determinar si es esta cepa en concreto, o la especie en su conjunto, la responsable del comportamiento.





# **CONCLUSIONES**

## 5. CONCLUSIONES.

De los resultados obtenidos en el presente trabajo, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

1. Con *Torulaspora delbrueckii* se obtuvieron unos resultados pobres en cuanto a capacidad fermentativa de los azúcares de la malta. No fue capaz de completar las fermentaciones, resultando una cerveza final con muy bajo contenido en alcohol y bastante dulce. Las características organolépticas detectadas en la cata tampoco eran favorables, en consecuencia, ninguna cepa de esta especie parece adecuada para ser utilizada en elaboración.
2. La levadura *Wickerhamomyces anomalus* tampoco mostró resultados favorables. La capacidad fermentativa de los azúcares de la malta fue muy pobre, dando como resultado una cerveza sin apenas alcohol, hecho comprobable porque la densidad del mosto apenas disminuyó durante la fermentación. En la cata del producto se detectaron olores desagradables que recordaban a acetona, motivo por el cual esta levadura fue también descartada para su utilización en la elaboración de cerveza.
3. De entre las levaduras ensayadas, la que presentó un comportamiento más prometedor, en cuanto a capacidad fermentativa, fue *Lachancea thermotolerans*, siendo bastante similar a la cepa utilizada como control, *Saccharomyces cerevisiae*, *Sc S-04*.
4. Todas las cepas ensayadas de *Lachancea thermotolerans* mostraron una producción significativa de ácido láctico, lo que las hace buenas candidatas para ser utilizadas en la producción de cervezas “ácidas”, sin necesidad de utilizar bacterias en el proceso de acidificación. Las cepas aisladas en nuestro laboratorio *Lt A57*, *Lt 391* y *Lt A392*, produjeron incluso un nivel más alto de ácido láctico que la cepa comercial *LT Hansen*.
5. En cuanto a las características organolépticas, la cepa *Lt A57* obtuvo en la cata una valoración muy positiva en todos los casos, incluso mejor que la cepa control *Sc S-04*. En consecuencia, al menos la cepa *Lt A57* de *Lachancea thermotolerans*, es una firme candidata para ser utilizada en la elaboración de cerveza ácida, sin necesidad de utilizar bacterias lácticas en el proceso de acidificación.

# **BIBLIOGRAFÍA**

## 6. BIBLIOGRAFÍA.

1. Wang, J., Liu, L., Ball, T., Yu, L., Li, Y., & Xing, F. (2016). Revealing a 5,000-y-old beer recipe in China. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *113*(23), 6444–6448. <https://doi.org/10.1073/pnas.1601465113>.
2. Radonjić, S., Maraš, V., Raičević, J., & Košmerl, T. (2020). Wine or Beer? Comparison, Changes and Improvement of Polyphenolic Compounds during Technological Phases. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *25*(21), 4960. <https://doi.org/10.3390/molecules25214960>
3. Sánchez-Muniz, F. J., Macho-González, A., Garcimartín, A., Santos-López, J. A., Benedí, J., Bastida, S., & González-Muñoz, M. J. (2019). The Nutritional Components of Beer and Its Relationship with Neurodegeneration and Alzheimer's Disease. *Nutrients*, *11*(7), 1558. <https://doi.org/10.3390/nu11071558>
4. Logan, BK, Case, GA y Distefano , S. (1999). Contenido de alcohol de cerveza y bebidas de malta: Consideraciones forenses. *Revista de Ciencias Forenses*,*44*(6),14603J–1295. doi:10.1520/JFS14603J.
5. Domizio, P., House, J. F., Joseph, C. L., Bisson, L. F., & Petzold, C. J. (2016). *L. achancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer <sup>†</sup>. *Journal of The Institute of Brewing*, *122*(4), 599-604. <https://doi.org/10.1002/jib.362>
6. Praia, A. B., Herkenhoff, M. E., Broedel, O., Frohme, M., & Saad, S. M. I. (2022). Sour Beer with *Lacticaseibacillus paracasei* subsp. *paracasei* F19: Feasibility and Influence of Supplementation with *Spondias mombin* L. Juice and/or By-Product. *Foods (Basel, Switzerland)*, *11*(24), 4068. <https://doi.org/10.3390/foods11244068>
7. De Gaetano G, Costanzo S, Di Castelnuovo A, Badimon L, Bejko D, Alkerwi A, et al. Efectos del consumo moderado de cerveza sobre la salud y la enfermedad: un documento de consenso. *Nutr Metab Cardiovasc Dis* 2016;*26*(6):443-67.
8. Cavallini, N., Savorani, F., Bro, R., & Cocchi, M. (2021). A Metabolomic Approach to Beer Characterization. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *26*(5), 1472. <https://doi.org/10.3390/molecules26051472>

9. Jan Conway (2022, septiembre 5). Industria cervecera mundial: estadísticas y datos. Statista. <https://www.statista.com/topics/7974/global-beer-industry/>
10. Abigail Orús. (2022, 1 agosto). Valor de marca de las marcas cerveceras líderes en el mundo en 2022. Statista. <https://es.statista.com/estadisticas/600208/valor-de-marca-de-las-marcas-cerveceras-mas-importantes-en-el-mundo/>.
11. Aranceta-Bartrina, J., Partearroyo, T., López-Sobaler, A. M., Ortega, R. M., Varela-Moreiras, G., Serra-Majem, L., Pérez-Rodrigo, C., & Collaborative Group for the Dietary Guidelines for the Spanish Population (SENC) (2019). Updating the Food-Based Dietary Guidelines for the Spanish Population: The Spanish Society of Community Nutrition (SENC) Proposal. *Nutrients*, 11(11), 2675. <https://doi.org/10.3390/nu11112675>.
12. Informe Socioeconómico del Sector de la Cerveza en España 2021: ligero crecimiento en 2021, pero aún lejos de los niveles de 2019. (s/f). Informe Socioeconómico del Sector de la Cerveza en España 2021: ligero crecimiento en 2021, pero aún lejos de los niveles de 2019. Recuperado el 29 de enero de 2023, de <https://cerveceros.org/noticias/informe-socioeconomico-del-sector-de-la-cerveza-en-espana-2021-ligero-crecimiento-en-2021-pero-aun-l>
13. Vasas, M., Tang, F., & Hatzakis, E. (2021). Application of NMR and Chemometrics for the Profiling and Classification of Ale and Lager American Craft Beer. *Foods (Basel, Switzerland)*, 10(4), 807. <https://doi.org/10.3390/foods10040807>
14. Iattici, F., Catallo, M., & Solieri, L. (2020). Designing new yeasts for craft brewing: When natural biodiversity meets biotechnology. *Beverages*, 6(1), 3. <https://doi.org/10.3390/beverages6010003>
15. Libkind, D., Hittinger, C. T., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., & Sampaio, J. P. (2011). Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 108(35), 14539–14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>
16. Sampaio J. P. (2018). Microbe Profile: *Saccharomyces eubayanus*, the missing link to lager beer yeasts. *Microbiology (Reading, England)*, 164(9), 1069–1071. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000677>

17. Peris, D., Langdon, Q. K., Moriarty, R. V., Sylvester, K., Bontrager, M., Charron, G., Leducq, J. B., Landry, C. R., Libkind, D., & Hittinger, C. T. (2016). Complex Ancestries of Lager-Brewing Hybrids Were Shaped by Standing Variation in the Wild Yeast *Saccharomyces eubayanus*. *PLoS genetics*, *12*(7), e1006155. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1006155>
18. Pavlsler, A., & Buiatti, S. (2009). Lager Beer. En *Beer in Health and Disease Prevention* (pp. 31–43). Elsevier.
19. De Roos, J., & De Vuyst, L. (2019). Microbial acidification, alcoholization, and aroma production during spontaneous lambic beer production. *Journal of the science of food and agriculture*, *99*(1), 25–38. <https://doi.org/10.1002/jsfa.9291>
20. Bongaerts, D., De Roos, J., & De Vuyst, L. (2021). Technological and Environmental Features Determine the Uniqueness of the Lambic Beer Microbiota and Production Process. *Applied and environmental microbiology*, *87*(18), e0061221. <https://doi.org/10.1128/AEM.00612-21>
21. De Roos, J., Verce, M., Weckx, S., & De Vuyst, L. (2020). Temporal Shotgun Metagenomics Revealed the Potential Metabolic Capabilities of Specific Microorganisms During Lambic Beer Production. *Frontiers in microbiology*, *11*, 1692. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01692>
22. Garduño-García, A., López-Cruz, I. L., Ruíz-García, A., & Martínez-Romero, S. (2014). Simulación del proceso de fermentación de cerveza artesanal. *Ingeniería Investigación y Tecnología*, *15*(2), 221–232. [https://doi.org/10.1016/s1405-7743\(14\)72212-7](https://doi.org/10.1016/s1405-7743(14)72212-7)
23. Simpson, Benjamin K. (2012). *Food Biochemistry and Food Processing (Simpson/Food Biochemistry and Food Processing) || Biochemistry of Beer Fermentation.*, [10.1002/9781118308035/](https://doi.org/10.1002/9781118308035/), 627–653. doi:10.1002/9781118308035.ch33
24. Iorizzo, M., Coppola, F., Letizia, F., Testa, B., & Sorrentino, E. (2021). Role of yeasts in the brewing process: Tradition and innovation. *Processes (Basel, Switzerland)*, *9*(5), 839. <https://doi.org/10.3390/pr9050839>

25. Dysvik, A., La Rosa, S. L., De Rouck, G., Rukke, E. O., Westereng, B., & Wicklund, T. (2020). Microbial Dynamics in Traditional and Modern Sour Beer Production. *Applied and environmental microbiology*, *86*(14), e00566-20. <https://doi.org/10.1128/AEM.00566-20>
26. Dysvik, A., La Rosa, S. L., Liland, K. H., Myhrer, K. S., Østlie, H. M., De Rouck, G., Rukke, E. O., Westereng, B., & Wicklund, T. (2020). Co-fermentation Involving *Saccharomyces cerevisiae* and *Lactobacillus* Species Tolerant to Brewing-Related Stress Factors for Controlled and Rapid Production of Sour Beer. *Frontiers in microbiology*, *11*, 279. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00279>
27. Colomer, M. S., Funch, B., & Förster, J. (2019). The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Current Opinion in Biotechnology*, *56*, 30-35. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2018.07.009>
28. Spitaels, Freek; Van Kerrebroeck, Simon; Wieme, Anneleen D.; Snauwaert, Isabel; Aerts, Maarten; Van Landschoot, Anita; De Vuyst, Luc; Vandamme, Peter (2015). Microbiota and metabolites of aged bottled gueuze beers converge to the same composition. *Food Microbiology*, *47*(), 1–11. doi:10.1016/j.fm.2014.10.004
29. De Rouck, G., De Clippeleer, J., Van Opstaele, F., De Ridder, M., & Aerts, G. (2014). Analytical profiling of Belgian Kriek beers. *EBC Symposium in Beer Mix Beverages, Date: 2014/09/08 - 2014/09/09, Location: Vienna*.
30. Zdaniewicz, M., Satora, P., Pater, A., & Bogacz, S. (2020). Low Lactic Acid-Producing Strain of *Lachancea thermotolerans* as a New Starter for Beer Production. *Biomolecules*, *10*(2), 256. <https://doi.org/10.3390/biom10020256>
31. Toh, D.W.K., Chua, J.Y., Lu, Y. and Liu, S.Q. (2020), Evaluation of the potential of commercial non-*Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspota delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. *Int J Food Sci Technol*, *55*: 2049-2059. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14399>
32. Iattici, F., Catallo, M., & Solieri, L. (2020). Designing New Yeasts for Craft Brewing: When Natural Biodiversity Meets Biotechnology. *Beverages*, *6*(1), 3. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/beverages6010003>



33. Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., & Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food microbiology*, 72, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
34. Gatto, V., Binati, R. L., Lemos Junior, W. J. F., Basile, A., Treu, L., de Almeida, O. G. G., Innocente, G., Campanaro, S., & Torriani, S. (2020). New insights into the variability of lactic acid production in *Lachancea thermotolerans* at the phenotypic and genomic level. *Microbiological Research*, 238(126525), 126525. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126525>
35. Kurtzman C. P. (2003). Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*, *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorulaspora*. *FEMS yeast research*, 4(3), 233–245. [https://doi.org/10.1016/S1567-1356\(03\)00175-2](https://doi.org/10.1016/S1567-1356(03)00175-2)
36. Burini, J. A., Eizaguirre, J. I., Loviso, C., & Libkind, D. (2021). Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza. *Revista Argentina de microbiología*, 53(4), 359–377. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2021.01.003>
37. Fernandes, T., Silva-Sousa, F., Pereira, F., Rito, T., Soares, P., Franco-Duarte, R., & Sousa, M. J. (2021). Biotechnological Importance of *Torulasporea delbrueckii*: From the Obscurity to the Spotlight. *Journal of fungi (Basel, Switzerland)*, 7(9), 712. <https://doi.org/10.3390/jof7090712>
38. Arja Laitila; Tuija Sarlin; Mari Raulio; Annika Wilhelmson; Erja Kotaviita; Timo Huttunen; Riikka Juvonen (2011). *Yeasts in malting, with special emphasis on Wickerhamomyces anomalus(synonymPichia anomala)*. , 99(1), 75–84. doi:10.1007/s10482-010-9511-8
39. Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., & Gibson, B. (2017). Novel brewing yeast hybrids: creation and application. *Applied microbiology and biotechnology*, 101(1), 65–78. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8007-5>
40. Canonico, L., Galli, E., Ciani, E., Comitini, F., & Ciani, M. (2019). Exploitation of Three Non-Conventional Yeast Species in the Brewing Process. *Microorganisms*, 7(1), 11. <https://doi.org/10.3390/microorganisms7010011>

41. Cubillos, FA, Gibson, B, Grijalva-Vallejos, N, Krogerus, K, Nikulin, J. Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast*. 2019; 36: 383– 398. <https://doi.org/10.1002/yea.3380>
42. Iturritxa, E., Hill, A. E., & Torija, M. (2023). Profiling potential brewing yeast from forest and vineyard ecosystems. *International Journal of Food Microbiology*, 394, 110187. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2023.110187>
43. Postigo, V., Esteban, S., & Arroyo, T. (2023). *Lachancea thermotolerans*, an Innovative Alternative for Sour Beer Production. *Beverages*, 9(1), 20. <https://doi.org/10.3390/beverages9010020>
44. Smart, K. A., Lawrence, S. J., Leclaire, J., & Davy, S. (2006). Brewing Yeast Flocculation: A Model For Onset And Control. *ResearchGate*. [https://www.researchgate.net/publication/254093220\\_Brewing\\_Yeast\\_Flocculation\\_A\\_Model\\_For\\_Onset\\_And\\_Control](https://www.researchgate.net/publication/254093220_Brewing_Yeast_Flocculation_A_Model_For_Onset_And_Control)