



Universidad de Concepción

Dirección de Postgrado

Facultad de Farmacia-Programa de Ciencias y Tecnología Analítica

Bioprospecting of wild yeast from Bio-Bio region for novel beer production

Tesis para optar al grado de doctor en Ciencias y Tecnología Analítica

PABLO ENRIQUE MURATH RIFO

CONCEPCIÓN-CHILE

2024

Profesor Guía: Dr. Luis Bustamante Salazar

Depto. de Ciencia y Tecnología Analítica, Facultad de Farmacia

Universidad de Concepción

Antes de comenzar mis estudios de doctorado, me preguntaron más de una vez: “¿Para qué vas a hacer un doctorado en cerveza, si ya está todo hecho?”

Con esta tesis, espero responder al menos en parte a esta interrogante y contribuir al conocimiento científico que impulsa el desarrollo y la innovación de la industria cervecera.

AGRADECIMIENTOS

Primero, doy gracias a Dios por la oportunidad de poder realizar mis estudios de doctorado de manera exitosa. Agradezco a mi papá Enrique Murath, mi mamá Cecilia Rifo, mi hermano Daniel Murath, mi tata Raúl, mi Mamirna, mi abuela Ana María y mi abuelo Arturo por todo su apoyo, respaldo y amor incondicional que siempre he tenido el privilegio de recibir.

Agradezco también a mi novia, Stephanie Hoffmann, por su inmenso amor, paciencia y apoyo durante todo el tiempo de desarrollo de esta tesis. Por ser mi compañera de vida, y por acompañarme en esta aventura científica, como coautora de ambas publicaciones generadas durante este trabajo y por creer siempre conmigo sobre el desarrollo exitoso de este proyecto.

A mis amigos, Marco, Camilo, Eduardo, Mario, Jonathan y Pato, por su comprensión cada vez que dije que no a sus invitaciones porque “estoy trabajando en la tesis” y por darme ánimo para finalizar esta etapa. A mi amiga de cuatro patas, Porter, por su compañía, cariño y alegría.

Al Dr. Mario Aranda por su apoyo para comenzar a desarrollar mis ideas en su laboratorio y, también, al Dr. Luis Bustamante por recibirme como tesista a mitad del proceso. Agradezco también a ANID, por el apoyo financiero de mi beca Doctorado Nacional 21171806.

Quisiera agradecer especialmente al Dr. Kevin Verstrepen por abrirme las puertas de su laboratorio para realizar mi pasantía. Por el conocimiento adquirido, tanto en el ámbito profesional como personal, que me impulsa a esforzarme para ser mejor investigador y compartir mi conocimiento con los demás. Al Dr. Jan Steensels, por ser mi guía en la parte central de esta tesis, por sus consejos, sugerencias, generosidad y tiempo para discutir ideas que permitieron mejorar el nivel de este trabajo. También a mis amigos Ruben, Michiel, Ping y Peter por hacer de mi pasantía un momento agradable.

Finalmente, agradezco a todos aquellos que, de alguna u otra forma, contribuyeron al desarrollo de este proyecto. Esta tesis no es sólo el resultado de mi trabajo, sino también de la colaboración y el apoyo de tantas personas valiosas que me han acompañado a lo largo de este proceso. Gracias a todos por ser parte fundamental de este logro alcanzado.

1. ÍNDICE DE CONTENIDOS	
2. ÍNDICE DE FIGURAS	viii
3. ÍNDICE DE TABLAS	xi
4. RESUMEN	xii
5. ABSTRACT.....	xv
6. CAPÍTULO I: Introducción y objetivos.....	17
1. INTRODUCCIÓN.....	2
1.1 Aspectos generales	2
1.2 Levaduras convencionales en la industria cervecera	3
1.2.1 Saccharomyces cerevisiae.....	3
1.2.2 Saccharomyces pastorianus.....	6
1.3 Levaduras no convencionales en la industria cervecera	8
1.3.1 Saccharomyces eubayanus.....	8
1.3.2 Brettanomyces.....	9
1.3.3 Torulaspora	10
1.3.4 Pichia.....	10
1.3.5 Otras levaduras no convencionales con prospección futura.....	11
1.4 Características importantes relacionadas con el uso de levaduras en la industria cervecera	11
1.4.1 Desempeño fermentativo	11
1.4.1.1 Factores claves para una adecuada fermentación/bioflavoring	12
1.4.2 Metabolización de fuentes de carbono	12
1.4.3 Capacidad de floculación	13
1.4.4 Síntesis de compuestos indeseables	13
1.4.5 Tolerancia al stress.....	13
1.4.6 Bioflavoring	13
1.5 Compuestos volátiles con actividad aromática relevante para la industria cervecera.....	14
1.5.1 Etanol	15
1.5.2 Acetaldehído	15
1.4.3 Alcoholes superiores	16
1.4.4 Ésteres	17
1.4.5 Cetonas vecinales	18

1.4.6	Compuestos sulfurados	19
1.4.7	Compuestos fenólicos	19
1.5	Estrategias para obtener un perfil aromático distintivo.....	21
1.5.1	Fermentación mixta.....	21
1.5.2	Generación de híbridos intraespecie e interespecie.....	21
1.5.2.1	Ciclo de vida de <i>Saccharomyces</i> y sus sistemas de apareamiento.....	21
1.5.2.2	Conceptos de ploidía y aneuploidía.....	23
1.5.2.3	Estrategias para la generación de híbridos no modificados genéticamente	24
1.5.2.3.1	Direct Mating.....	24
1.6.2.1.2	Rare mating	25
1.6.2.1.3	Mass mating and genome shuffling	25
1.7	Evolución dirigida.....	25
1.7	Determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos volátiles relevantes para la industria cervecera.....	26
1.7.1	Preparación de la muestra	27
1.7.1.1	Headspace gas chromatography coupled with a flame ionization detector (HS-GC-FID) .	27
1.7.1.2	Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME).....	27
1.7.2	Cromatografía gaseosa de compuestos de interés en la cerveza.....	28
1.7.3	Detectores utilizados para el análisis de compuestos volátiles.....	28
2.	HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	29
3.	ESTRATEGIA ANALÍTICA.....	30
3.1	Obtención de levaduras salvajes desde diversas fuentes naturales	30
3.2	Caracterización fenotípica del desempeño fermentativo de levaduras salvajes.....	30
3.3	Generación de híbridos interespecíficos	30
3.4	Estabilización del genoma en distintas condiciones y su relación con las características fenotípicas	31
4.	REFERENCIAS	32
7.	CAPÍTULO II: Resultados y Discusión.....	38
CAPÍTULO II SECCIÓN 1	39	
Title: Characterization of wild yeasts isolated from Chile and their potential applications in the brewing industry	39	
Abstract:.....	40	
1. Introduction	41	
2. Materials and Methods	43	

2.1 Sample collection and yeasts isolation.....	43
2.2 gDNA extraction and yeast identification	43
2.3 Laboratory-scale lager fermentations.....	44
2.4 Esters, higher alcohols and 4-VG analysis.....	44
2.6 Data analysis and data visualization.....	45
3. Results.....	45
3.1 Isolation and identification of wild yeasts.....	45
3.2 Evaluation of wild yeast in beer fermentations	47
4. Discussion	53
Acknowledgments.....	55
Conflict of Interest.....	55
References	56
CAPÍTULO II SECCIÓN 2	60
Title: Distinct genome stabilization procedures lead to phenotypic variability in newly generated interspecific yeast hybrids.....	60
Abstract	61
1 Introduction	62
2 Material and Methods	65
2.1 Yeast strains	65
2.2 Sporulation and tetrad dissection of possible parental strains	65
2.3 Hybrid generation through spore-to-spore mating	66
2.4 Interspecific hybrids confirmation	66
2.5 Exposure of interspecific hybrids to different environmental conditions.....	66
2.6 Absorbance-based POF measurement.....	67
2.7 Laboratory-scale lager fermentations.....	67
2.8 Higher alcohols, esters and 4-VG measurement	68
2.9 Data analysis and data visualization.....	68
3 Results.....	69
3.1 Generating interspecific hybrids through spore-to-spore mating	69
3.2 Selection of interspecific hybrids after being exposed in three different conditions.....	69
3.3 Stabilized hybrids show variability in maltotriose utilization and flavor production.....	71
4 Discussion	79
Acknowledgments.....	81
Conflict of Interest.....	81

References	82
Capítulo II Sección 2: Supplementary Materials.....	91
8. CAPÍTULO III: Conclusiones finales.....	96
Conclusiones	97

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1 Árbol filogenético de *Saccharomyces cerevisiae*. Los códigos de colores indican el origen (nombres) y el linaje (bandas circulares). Las divisiones basales de las cinco líneas industriales se indican con puntos de colores. Las cepas mosaico identificadas en este estudio se indican con puntos negros junto a los códigos de las cepas. 5
- Figura 2 Modelos que explican el origen de los linajes Frohberg y Saaz. a) Los grupos Frohberg y Saaz se originaron a partir de al menos dos eventos de hibridación independientes entre cepas parentales distintas de *S. cerevisiae* diploide y *S. eubayanus* diploide. b) Los grupos Frohberg y Saaz se originaron a partir de un único evento de hibridación entre un *S. cerevisiae* diploide y un *S. eubayanus* diploide. Las translocaciones ocurrieron en el híbrido ancestral antes de la divergencia de los linajes Saaz y Frohberg y son compartidas entre los dos grupos. Después de la hibridación, el linaje Frohberg experimentó una pérdida de variación entre los cromosomas intrahomólogos en el subgenoma de *S. cerevisiae* a través de la pérdida de heterocigosidad (LOH) y el linaje Saaz perdió aproximadamente la mitad de los cromosomas derivados de *S. cerevisiae*. c) Los grupos Frohberg y Saaz se originaron a partir de al menos un evento de hibridación compartido entre un *S. cerevisiae* haploide y un *S. eubayanus* diploide. El híbrido ancestral triploide divergió aún más en el linaje Saaz, y el linaje Frohberg surgió por otro evento de hibridación con un *S. cerevisiae* haploide distinto. 8
- Figura 3 Visión general de la producción de compuestos aromáticos. Esta figura ilustra los compuestos aromáticos generados durante la fermentación de levaduras, incluyendo etanol y dióxido de carbono del piruvato (verde/rojo), así como dicetonas vecinales (rosa) y alcoholes superiores y ésteres (púrpura) derivados del metabolismo de aminoácidos. Los compuestos fenólicos provienen del medio (naranja). Las líneas indican importación/exportación y reacciones bioquímicas. 14
- Figura 4 La ruta de Erlich. Esta figura muestra las rutas que dirigen compuestos de carbono a la producción de aminoácidos y alcoholes superiores a través de la vía de Ehrlich en tres etapas: transaminación, descarboxilación y reducción. 16
- Figura 5 Síntesis de ésteres en levaduras. Esta figura presenta un esquema general de la producción de ésteres, que resulta de reacciones de condensación entre un alcohol y un acetilo/acilo-CoA. Los ésteres de acetato se producen por las enzimas Atf1 y Atf2 (A), mientras que los ésteres de ácidos grasos son generados por Eeb1 y Eht1 (B). También se muestran ejemplos de los ésteres más comunes, con sus respectivos descriptores de aroma en cursiva. 18
- Figura 6 Producción de compuestos fenólicos. Los ácidos hidroxicinámicos se liberan durante el preprocesamiento de la biomasa. Las células de levadura, a través de la enzima Fdc1, pueden descarboxilar estos compuestos tóxicos en formas menos dañinas, con la ayuda del cofactor FMN producido por Pad1. Posteriormente, los compuestos son secretados y pueden ser reducidos por vinilfenol reductasas de levaduras o bacterias generalmente consideradas como contaminantes. 20
- Figura 7 Ciclo de vida de *S. cerevisiae*. Las células de levadura pueden existir en estado haploide o diploide. Las diploides son heterocigotas en el locus del tipo de apareamiento (*a*/alpha) y no pueden aparearse, mientras que las haploides, con tipos de apareamiento *a* o alpha, pueden aparearse con el tipo de apareamiento opuesto. Ambas pueden proliferar asexualmente por gemación en condiciones ricas en nutrientes. En condiciones de escasez, los diploides pueden esporular, generando cuatro esporas haploides que pueden germinar cuando las condiciones mejoran. En cepas homotalicas, los haploides pueden cambiar su tipo de apareamiento mediante el gen *HO*, permitiendo la formación de un diploide homocigoto. En cepas heterotalicas, el gen *HO* está inactivo, impidiendo este cambio. 22
- Figura 8 Estrategia analítica propuesta para cumplir con los objetivos planteados. 31
- Figura 9 Geographical location and identification of wild yeasts. Wild yeasts were isolated from three natural environments in Chile, as shown on the map (A): Nonguén National Park (yellow), Itata Valley (blue) and the Andean foothills (green). The wild yeasts strains were identified by ITS analysis (B) and *Saccharomyces* strains were subjected to whole-genome sequencing (C). (C) represents a “coverage plot” of the three *S. eubayanus* strains, where the number of sequence reads in each genomic location is visualized. This visualization provides information on the ploidy level of each chromosome. 46
- Figura 10 Fermentation kinetics and alcohol by volume. The fermentation kinetics (depicted as cumulative weight loss) (A) and the alcohol by volume produced by wild yeasts (B) corresponding to *Aureobasidium subglaciale* (green), *Teunomyces cretensis* (orange), *Candida boleticola* (blue), *Metschnikowia*

- pulcherrima* (violet), and *Saccharomyces eubayanus* (red) were measured daily and at the end of the fermentation, respectively. *S. cerevisiae* strain WY1214 and *S. pastorianus* W34/70 (black) were used as reference strains. Blank corresponds to the wort without yeast inoculation (grey). Results represent the mean value from two independent fermentations. 49
- Figura 11 Overall production of relevant brewing compounds. The mean values obtained from the production/measurement of isoamyl alcohol (A), isoamyl acetate (B), ethyl acetate (C), 4-vinyl guaiacol (D), pH (E), residual glucose (F) by wild yeast strains belonging to *Aureobasidium* (green), *Teunomyces* (orange), *Yamadazyma* (blue), *Metschnikowia* (violet), and *Saccharomyces* (red) is depicted. *S. cerevisiae* strain x1026 and *S. pastorianus* W34/70 (black) were used as reference strains. The asterisk indicates the level of significance (*, p<0.05; **, p<0.01; ***, p<0.001; ****, p<0.0001) 50
- Figura 12 Two-dimensional (2-D) principal component analysis (PCA) separated by Dim1 = PC1 and Dim2= PC2. Visualization of the metabolite production of *Aureobasidium subglaciale*, *Teunomyces cretensis*, *Candida boleticola*, *Metschnikowia pulcherrima*, and *Saccharomyces eubayanus* (A) and the metabolite production of only non-*Saccharomyces* wild yeasts (B). The component scores of the 13 compounds are depicted as pink lines numbers as follows: 1, isobutanol; 2, isoamyl alcohol; 3, 2-phenylethanol; 4, ethyl acetate; 5, isoamyl acetate; 6, 2-phenylethyl acetate; 7, ethyl hexanoate; 8, ethyl octanoate; 9, 4-vinyl guaiacol; 10, alcohol by volume; 11, pH; 12, residual glucose; 13, glycerol. 2-D PCA (A) and (B) explained 84.7% and 62.3% of the total variance, respectively. 52
- Figura 13 Screening of 4-vinyl guaiacol (4-VG) production The conversion of ferulic acid to 4-VG by the stabilized lineages was measured by absorbance, visualized with lineages of all hybrids grouped (A), or separated by hybrid (B). In (B), values for parental strains (stabilized in identical conditions as the hybrids) are also included. All the results were normalized to a scale of 0 to 1 based on performance of the POF⁻ (set at 0) and POF⁺ (set at 1) reference strains. Black dotted line represents the value of POF⁺ reference strain). The asterisk indicate the level of significance (*, p<0.05; ***, p<0.001) 71
- Figura 14 Heatmap representation of the metabolite production of stabilized isolates. Higher alcohols, esters, 4-VG and ABV produced after fermentation in lab-scale lager fermentations by stabilized isolates of interspecific hybrids H5 (red palette), H7 (blue palette) and the parental strains (BE011 and DR3) along with non-evolved hybrids (H5_G0 and H7_G0) (green) are given. Colors represent Z-scores (calculated over the rows). 74
- Figura 15 Production of higher alcohols and esters by stabilized isolates of H5 and H7. The average production of higher alcohols and their statistical differences observed between stabilized isolates of H5 (orange) and H7 (blue) is shown in (A). Similarly, the average concentration of esters is shown in (B). The asterisk indicate the level of significance (*, p<0.05; **, p<0.01; ****, p<0.0001) 75
- Figura 16 Production of acetate esters and 4-VG by stabilized isolates of H5 and H7. Production of ethyl acetate (A,B), isobutyl acetate (C,D), isoamyl acetate (E,F), 2-phenylethyl acetate (G,H) and 4-vinyl guaiacol (I,J) of the stabilized isolates of H5 (orange palette) and H7 (blue palette) is depicted. The parental strains BE011 (pink) and DR3 (turquoise), and non-stabilized hybrids H5_G0 and H7_G0 (grey) are also included. In A, C, E, G and I, the average of stabilized isolates of all 4 parallel lineages is given. In B,D,F,H and J, the technical replicates of each stabilized isolate are visualized. Statistical analyses were performed for A, C, E, G and I. The asterisk indicate the level of significance (*, p<0.05; **, p<0.01). 76
- Figura 17 Two-dimensional (2-D) principal component analysis (PCA) separated by Dim1 = PC1 and Dim2 = PC2. Visualization of the metabolite production of stabilized H5 and H7 linages, non-stabilized hybrids and parental strains (A) and the metabolite production of only stabilized H5 and H7 lineages (B). The component scores for the 13 volatile compounds are depicted as pink lines numbered as follows: 1, propanol; 2, butanol; 3, isobutanol; 4, isoamyl alcohol; 5, 2-phenylethanol; 6, ethyl acetate; 7, isobutyl acetate; 8, isoamyl acetate; 9, 2-phenylethyl acetate; 10, ethyl butyrate; 11, ethyl hexanoate; 12, ethyl octanoate; 13, 4-vinyl guaiacol; 14, alcohol by volume (ABV). 2-D PCA (A) and (B) explained 71.9% and 62.5% of the total variance, respectively. 78
- Figura 18 Interspecific hybridization and genome stabilization procedure. First, two *S. cerevisiae* strains (BE011 and BE031) were crossed with two *S. eubayanus* strains (DR1 and DR3) through spore-to-spore mating to generate seven newly formed interspecific hybrids (H1-H7_G0). Then, four parallel lines from these hybrids were submitted to three different genome stabilization conditions: high temperature (HT), low temperature (LT) and low temperature with ethanol 8% v/v (LT+Eth). Later, the ferulic acid

consumption from the stabilized hybrids pools was assessed and stabilized hybrids clones were selected for fermentation in lager-like brewing conditions..... 91

Figura 19 Species-specific PCR. Species-specific PCR shows bands at 150 and 250 bp corresponding to *S. cerevisiae* and *S. eubayanus*, respectively. The seven new interspecific hybrids H1 to H7 showed the bands of both parental species..... 92

Figura 20 Fermentation kinetics of H5 and H7. The weight loss (indicative of CO₂ production) of the individual lines of the interspecific hybrids H5 (colored triangles) (A) and H7 (colored diamonds) (B) after evolved in different environmental conditions: LT (blue), LT+Eth (purple) and HT (red) and non-devolved (uncolored); the parental strains *S. cerevisiae* BE011 (pink circle) and *S. eubayanus* DR3 (turquoise square); and the *S. pastorianus* reference strains Saaz (black circle) and Frohberg (black square) were daily monitored during 8 days..... 93

Figura 21 Alcohol by volume (ABV) produced by interspecific hybrids. The figure shows the ABV produced during fermentation by the interspecific hybrids after being exposed to three different environmental conditions: H5 (orange pallete) and H7 (blue pallete). The production of the non-volved hybrids (uncolored); the parental strains *S. cerevisiae* (pink) and *S. eubayanus* (turquoise); and the *S. pastorianus* reference strains Saaz (black circle) and Frohberg (black square) were also measured at the end of the fermentation. 94

ÍNDICE DE TABLAS

Table 1	Production of relevant parameters by wild yeasts during two independent fermentations (F1 and F2) under identical conditions. The WY1214 and W34/70 are commercial reference strains for ale and lager fermentations, respectively. Values represent the average of three technical replicates.	48
Table 2	Overview of <i>de novo</i> interspecific hybrid yeasts generated	69
Table 3	Overview of key compounds production from laboratory scale lager beer fermentation. CBS1513 and W34/70 are reference strains for Saaz- and Frohnerg-type lager yeasts, respectively. H5_G0 and H7_G0 are the hybrids prior to genome stabilization.	73
Table 4	Remaining sugars profile and ethanol production after fermentation of H5 isolates stabilized in HT. BE011 and DR3 are the <i>S. cerevisiae</i> and <i>S. eubayanus</i> parental strains, respectively. H5_G0 corresponds to H5 prior to genome stabilization. CBS1513 and W34/70 are reference strains of Saaz- and Frohberg-type lager yeasts, respectively.	95

RESUMEN

Con una producción global anual que ronda los 189 billones de litros, la cerveza se posiciona como la bebida fermentada más producida y consumida a nivel mundial. Además, ocupa el tercer lugar en consumo global de bebidas, después del agua y el té. Tradicionalmente, la cerveza se clasifica en dos estilos principales: cervezas de fermentación alta ("ale") y cervezas de fermentación baja ("lager").

Las cervezas lager representan aproximadamente el 90% de la producción total y su fermentación se realiza exclusivamente con la levadura *Saccharomyces pastorianus*. Esta levadura no corresponde una especie pura, sino que es el resultado de la hibridación entre la levadura cerveza y panificación, *Saccharomyces cerevisiae*, y una levadura salvaje tolerante al frío, *Saccharomyces eubayanus*. El sabor y aroma distintivamente limpio y fresco de las cervezas lager es uno de sus atributos más valorados. No obstante, la baja diversidad genética y aromática de estas levaduras se refleja en un restringido perfil aromático limitado en las cervezas lager.

En la actualidad, la demanda de cervezas con un perfil aromático y de sabor distintivos ha aumentado de manera importante durante los últimos años, generando un interés por la diversificación y diferenciación de las levaduras cerveceras utilizadas durante el proceso de elaboración. Además, las recientes iniciativas de salud pública que fomentan la reducción del consumo de alcohol para promover estilos de vida más saludables, junto con estrictas regulaciones sobre la conducción bajo los efectos del alcohol han impulsado la oferta y demanda de cervezas con un menor contenido de alcohol y un perfil de aroma y sabor deseables por el consumidor. En este escenario, el uso de levaduras no convencionales ha surgido como una alternativa prometedora para la producción de cervezas con un perfil aromático y de sabor más complejo y distintivo. Algunas de ellas, producen concentraciones de alcohol bajo el límite permitido y son consideradas cervezas de bajo contenido alcohólico.

En el capítulo uno, se presenta una revisión exhaustiva y detallada de la literatura sobre el papel de las levaduras convencionales y no convencionales en las fermentaciones industriales

de cerveza y su efecto en las propiedades aromáticas y el sabor del producto final, así como la historia, las propiedades genéticas y fenotípicas y sus perspectivas futuras.

En el capítulo dos, se aislaron levaduras salvajes desde distintas fuentes naturales que se encuentran en la región del Bío-Bío y alrededores. Se identificaron cinco géneros de las levaduras salvajes aisladas *Aureobasidium*, *Teunomyces*, *Yamadazyma*, *Metschnikowia* y *Saccharomyces*. Debido a la importancia de *Saccharomyces* en la industria cervecera, se realizó el análisis de su genoma completo y fueron identificadas como *Saccharomyces eubayanus*. Se evaluaron 14 levaduras salvajes aisladas en relación con su capacidad de fermentación, su producción de compuestos aromáticos, glicerol y consumo de glucosa en pruebas de fermentación a escala de laboratorio. La producción de etanol de las levaduras salvajes no *Saccharomyces* fueron menores que 1.0 % ABV mientras que la producción de las levaduras salvajes *Saccharomyces* fue cercano a 4.0%. La producción de aroma de las levaduras no *Saccharomyces* también difirió significativamente de las levaduras salvajes *Saccharomyces*. De acuerdo a los resultados obtenidos, las levaduras salvajes pertenecientes al género *Metschnikowia* mostraron el perfil de compuestos más interesante dentro de las levaduras salvajes no *Saccharomyces* para la producción de cervezas con bajo contenido de alcohol. Paralelamente, las cepas de *Saccharomyces eubayanus* demuestran el potencial de estas levaduras salvajes para la producción de cervezas con un contenido de alcohol menor que las cervezas convencionales y de estilos en los que la presencia de 4-vinil guaiacol es considerada deseable.

En el capítulo tres, se utilizó la estrategia de cruzamiento espora-a-espora con el fin de generar nuevos híbridos interespecíficos entre dos cepas salvajes de *S. eubayanus* con una cepa de *S. cerevisiae* domesticada. Los 7 híbridos interespecíficos generados fueron expuestos a tres condiciones distintas durante las etapas tempranas de la estabilización de su genoma durante 20-25 generaciones. Se investigó cómo las distintas condiciones influyen en la trayectoria de estabilización del genoma y pueden conducir a variantes con diferentes fenotipos industriales. Los híbridos con la menor capacidad de transformar ácido ferúlico (precursor de 4-VG), fueron seleccionados para posteriormente analizar sus características de fermentación y la producción de metabolitos. Nuestros resultados revelan cómo la

variación en el procedimiento de estabilización del genoma conduce a la variabilidad fenotípica y puede generar diversidad adicional después del proceso de hibridación inicial.

ABSTRACT

With a global annual production of around 189 billion liters, beer ranks as the most produced and consumed fermented beverage worldwide. Additionally, it occupies the third place in global beverage consumption, following water and tea. Traditionally, beer is classified into two main styles: top-fermented beers ("ale") and bottom-fermented beers ("lager").

Lager beers represent approximately 90% of total production, and their fermentation is carried out exclusively with the yeast *Saccharomyces pastorianus*. This yeast is not a pure specie but rather the result of hybridization between brewing and baking yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, and a cold-tolerant wild yeast, *Saccharomyces eubayanus*. The distinctly clean and fresh flavor and aroma of lager beers is one of their most valued attributes. However, the low genetic and aromatic diversity of these yeasts is reflected in a limited aromatic profile in lager beers.

Currently, the demand for beers with distinctive aromatic and flavor profiles has significantly increased in recent years, generating interest in the diversification and differentiation of brewing yeasts used during the production process. Furthermore, recent public health initiatives encouraging the reduction of alcohol consumption to promote healthier lifestyles, along with strict regulations on driving under the influence of alcohol, have driven the supply and demand for beers with lower alcohol content and desirable aroma and flavor profiles for consumers. In this context, the use of non-conventional yeasts has emerged as a promising alternative for producing beers with a more complex and distinctive aromatic and flavor profile. Some of these yeasts produce alcohol concentrations below the permitted limit and are considered low-alcohol beers.

In chapter one, a thorough and detailed review of the literature on the role of conventional and non-conventional yeasts in industrial beer fermentations and their influence on the aromatic properties and flavor of the final product is presented, along with the history, genetic and phenotypic properties, and future prospects.

In chapter two, wild yeasts were isolated from various natural sources found in the Bío-Bío region and its surroundings. Five genera of the isolated wild yeasts were identified: *Aureobasidium*, *Teunomyces*, *Yamadazyma*, *Metschnikowia*, and *Saccharomyces*. Due to the importance of *Saccharomyces* in the brewing industry, a complete genome analysis was performed, identifying them as *Saccharomyces eubayanus*. Fourteen isolated wild yeasts were evaluated for their fermentation capacity, production of aromatic compounds, glycerol, and glucose consumption in laboratory-scale fermentation tests. The ethanol production from non-*Saccharomyces* wild yeasts was less than 1.0% ABV, while the production from *Saccharomyces* wild yeasts was close to 4.0%. The aroma production from non-*Saccharomyces* yeasts also differed significantly from that of *Saccharomyces* wild yeasts. According to the results obtained, wild yeasts belonging to the genus *Metschnikowia* showed the most interesting compound profile among non-*Saccharomyces* wild yeasts for producing low-alcohol beers. At the same time, strains of *Saccharomyces eubayanus* demonstrate the potential of these wild yeasts to produce beers with lower alcohol content than conventional beers, especially in styles where the presence of 4-vinyl guaiacol is considered desirable.

In chapter three, a spore-to-spore crossing strategy was used to generate new interspecific hybrids between two wild strains of *S. eubayanus* and a domesticated strain of *S. cerevisiae*. The seven interspecific hybrids generated were exposed to three different conditions during the early stages of genome stabilization over 20-25 generations. The influence of different conditions on the genome stabilization trajectory was investigated to see how they could lead to variants with different industrial phenotypes. The hybrids with the lowest capacity to transform ferulic acid (a precursor of 4-VG) were selected for further analysis of their fermentation characteristics and metabolite production. Our results reveal how variations in the genome stabilization procedure lead to phenotypic variability and can generate additional diversity after the initial hybridization process.

CAPÍTULO I: Introducción y objetivos

1. INTRODUCCIÓN

1.1 Aspectos generales

Las levaduras tienen una participación fundamental en varios procesos industriales tales como la elaboración de pan, queso, vino, sidra y cerveza. Estos microorganismos unicelulares son capaces de sintetizar compuestos de interés deseables para generar productos únicos. En la industria cervecera, las levaduras participan en el proceso de fermentación produciendo sus metabolitos principales (etanol y CO₂) junto con un gran número de otros metabolitos secundarios con actividad aromática tales como alcoholes superiores, ésteres, compuestos fenólicos, entre otros con gran influencia sobre el perfil aromático y la calidad del producto final ¹.

Históricamente, desde el tiempo de los sumerios en la etapa final del cuarto milenio antes de Cristo (a.C.), la cerveza ha estado relacionada con el ser humano ². A pesar de que la levadura no fue considerada dentro de la primera ley de la pureza, establecida en 1.516, su relevancia en el proceso de fermentación es incuestionable. Los avances científicos, principalmente la invención del microscopio, permitió la visualización de las levaduras por primera vez por el científico Antoine van Leeuwenhoek. Luego, el científico Louis Pasteur confirmó que las levaduras corresponden a organismos vivos mientras que Emile Hansen fue el primer científico en lograr aislar una cepa de levadura. Posteriormente, debido al creciente interés de la industria cervecera por la generación de productos con perfiles aromáticos deseados de manera consistente, la comprensión de las rutas metabólicas involucradas en la síntesis de estos compuestos de interés aumentó considerablemente.

Se ha demostrado que existen ciertos factores que influyen de manera importante sobre el proceso de fermentación y, por lo tanto, en el balance del perfil aromático. Algunos de ellos son la temperatura, pH, oxígeno, composición del medio y el tiempo de fermentación, cuya modulación está asociada con la expresión de genes claves relacionados con la síntesis de compuestos con actividad aromática ³. Además, el uso de diferentes géneros, especies y cepas de levaduras durante el proceso de fermentación también influye significativamente en el perfil aromático que se puede obtener en una cerveza terminada ⁴. El reciente interés por la generación de perfiles aromáticos únicos y distintivos ha conducido a la evaluación y uso de levaduras no convencionales en la industria cervecera ⁵.

Durante las últimas décadas, el mercado cervecero ha experimentado un continuo crecimiento con un aumento en el número de cervezas artesanales e industriales ⁶. En este escenario altamente competitivo, el creciente interés de los cerveceros por desarrollar nuevos productos con perfiles aromáticos novedosos y distintivos, así como satisfacer la demanda de los consumidores ha promovido el uso de levaduras no convencionales. Los avances científicos y tecnológicos en química analítica y biotecnología combinado con el entendimiento profundo de los factores que influyen en la síntesis de compuestos con actividad aromática, permiten la búsqueda, selección y el uso de levaduras no convencionales para la producción de cervezas con características únicas. Sin duda, estas cervezas tienen un futuro prometedor satisfaciendo las demandas del mercado cervecero y, por lo tanto, futuras investigaciones en esta área de investigación son ciertamente necesarias.

1.2 Levaduras convencionales en la industria cervecera

1.2.1 *Saccharomyces cerevisiae*

La participación de *S. cerevisiae* en la historia de la humanidad se relaciona con el abandono del estilo de vida cazador-recolector y el comienzo de la horticultura durante el Neolítico alrededor de 8.000 años atrás. Durante este período observaron que la exposición de frutas y granos en el ambiente provocaba cambios positivos en las características de estos productos y que además prolongaban su vida útil. Desde entonces, la cerveza y otras bebidas alcohólicas tales como vino, sake, sidra e hidromiel comenzaron a ser parte de la dieta, como fuente nutricional, medicina, y como una fuente vital de agua libre de contaminación ⁷⁻⁹. Posteriormente, se descubrió al mezclar una pequeña parte de cerveza fermentada con un nuevo mosto no fermentado daba incluso mejores resultados y, sin tener conocimiento de lo que ocurría, comenzó la transferencia específica de microorganismos mejor adaptados desde un ciclo de fermentación al siguiente. De esta forma, varias levaduras mutantes y variantes con características superiores emergieron sin intención a través de la selección artificial mediante la reproducción y la evolución dirigida. Lo anterior condujo a la adaptación gradual de *Saccharomyces* en condiciones artificiales hechas por el ser humano, dando como resultados organismos especializados en fermentación en un ambiente específico, pero con comportamientos sub-óptimos en otros hábitats más naturales. Por lo tanto, *S. cerevisiae* es

uno de los organismos domesticados más antiguos en el planeta ^{10,11}. Además, las características consideradas como deseables son a menudo únicas para cada proceso de fermentación industrial. En este trabajo nos enfocaremos específicamente en la industria cervecera.

Las condiciones en las que se elabora cerveza son un nicho altamente selectivo. Por una parte, las levaduras de cerveza tienen una alta eficiencia de fermentación de maltosa, la fuente de carbono más abundante presente en el mosto. Esta característica está relacionada con la duplicación y la funcionalidad divergente de genes involucrados en el metabolismo de maltosa. Además, las levaduras de cerveza actuales tienen la capacidad de hidrolizar una variedad de azúcares mucho más eficientemente que sus ancestros ^{12,13}. Otra característica relevante de las levaduras cerveceras es su capacidad de floculación una vez que todos los azúcares fermentables han sido convertidos en dióxido de carbono y etanol, evitando fermentaciones ineficientes o estancadas y reduciendo los costos de producción relacionados con la separación entre las levaduras y el producto final ¹⁴. Una tercera característica es su incapacidad de producir 4-vinilguaiacol (4-VG). Análisis genéticos han demostrado que las levaduras cerveceras con mutaciones en los genes *PADI* y *FDC1* - involucrados en la síntesis de 4-VG - fueron seleccionadas para la elaboración de cerveza, mientras que esta característica nunca ha sido reportada en levaduras salvajes. Este gran proceso de adaptación a las condiciones de elaboración de cerveza ha hecho que las levaduras cerveceras también pierdan su resistencia a condiciones de estrés que son vitales para su sobrevivencia en ambientes naturales. Esta pérdida de capacidad de sobrevivir en un entorno natural es un claro signo de la intervención humana en la evolución de estos microorganismos.

El análisis filogenético realizado por Gallone et al. 2016, reveló la existencia de cinco linajes distintivos de cepas de *S. cerevisiae* exclusivamente industriales, que fueron genéticamente y fenotípicamente separadas de cepas salvajes (Figura 1). La gran mayoría de las levaduras cerveceras se agruparon en sólo dos linajes distantemente relacionados, mientras que las demás levaduras cerveceras que usualmente son utilizadas en la re-fermentación de botella de cervezas belgas fueron agrupadas junto con cepas utilizadas en la industria panadera en un mismo grupo. Estos resultados muestran que múltiples eventos de domesticación son responsables de las levaduras ale que existen actualmente. Además, los autores fueron capaces de estimar el origen de estos linajes de levaduras cerveceras, determinando que el

linaje llamado “Beer 1” se originó entre 1573-1604 a.C. mientras que el linaje “Beer 2” tuvo su origen 50 años más tarde. Esto demuestra que la domesticación de las levaduras cerveceras comenzó mucho después del primer registro de elaboración de cerveza (3000-4000 a.C.), pero antes de la primera aislación de levadura en el siglo XIX. Se observó que mientras que el nicho industrial específico tiene una gran influencia sobre la diversificación de las levaduras industriales, la ubicación geográfica también influye en el linaje “Beer 1”. Por el contrario, en el linaje “Beer 2” no se observó una sub-estructuración de las cepas en función de su ubicación geográfica. En resumen, la diversidad genética de las levaduras cerveceras que pertenecen a *S. cerevisiae* ha sido influenciada por la tecnología humana, cambios genéticos y la ubicación geográfica permitiendo la generación de poblaciones genéticamente diferentes.

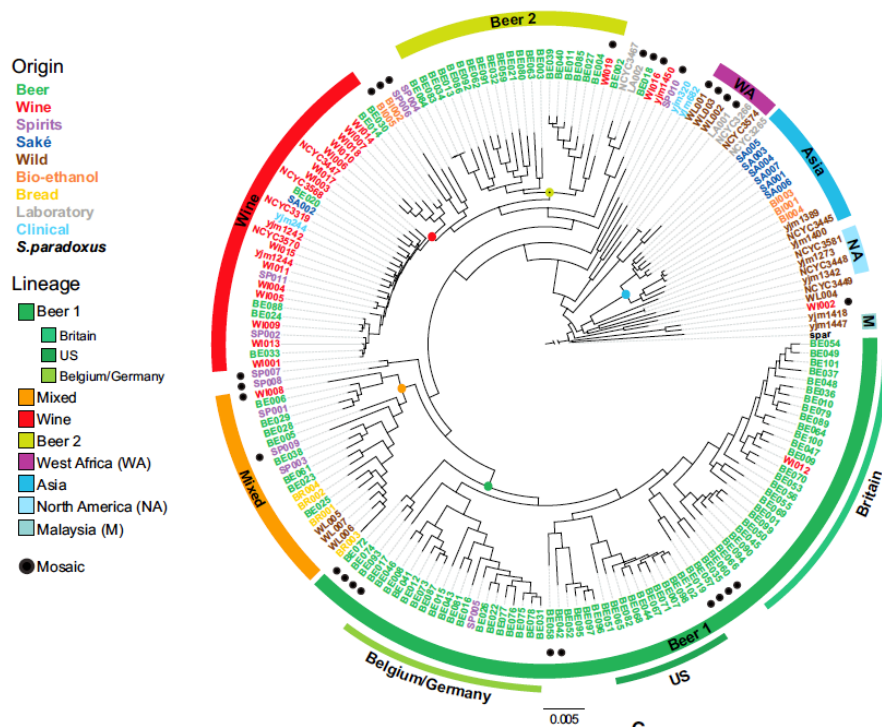


Figura 1 Árbol filogenético de *Saccharomyces cerevisiae*. Los códigos de colores indican el origen (nombres) y el linaje (bandas circulares). Las divisiones basales de las cinco líneas industriales se indican con puntos de colores. Las cepas mosaico identificadas en este estudio se indican con puntos negros junto a los códigos de las cepas.

1.2.2 *Saccharomyces pastorianus*

S. pastorianus es el híbrido interespecie, producto de la cruce entre *S. cerevisiae* x *S. eubayanus*, utilizado para la elaboración de cervezas lager cuya producción abarca cerca el 90% del mercado global. Estas cervezas son fermentadas a bajas temperaturas, normalmente entre 8°C - 15°C, seguido de un periodo de almacenamiento en frío (“lagering”) necesario para la obtener la calidad sensorial deseada. La producción de cervezas lager comenzó en el siglo quinto en Bavaria, debido a las restricciones legales de elaborar cerveza durante el período invernal como una forma de minimizar la posibilidad de contaminación microbiana. Más tarde, la invención del sistema de refrigeración (siglo XIX) permitió la elaboración de cervezas lagers durante todo el año. Las levaduras lagers tienen la característica de permanecer en el fondo del fermentador hacia el término de fermentación y, por consiguiente, también son llamadas “levadura de fermentación baja”. El trabajo realizado por Louis Pasteur en el siglo XIX estableció que las responsables de este fenómeno eran las levaduras¹⁵ y, como tributo a su contribución en el área, estas levaduras fueron llamadas de *S. pastorianus*. Pocos años después, Emil Hansen aisló por primera vez en la historia un cultivo de levaduras puro desde la fermentación de cerveza lager en el laboratorio de la cervecería Carlsberg. Además, clasificó tres linajes de levaduras aisladas como especies distintas: *S. pastorianus*, *S. carlsbergensis* y *S. monacensis*. Posterior al descubrimiento de Hansen, el uso de starters comenzó a ser una práctica común en las cervecerías y las levaduras de baja fermentación fueron clasificadas como *S. carlsbergensis*. Actualmente, análisis genéticos de varias cepas aisladas han demostrado que éstas comparten características prácticamente idénticas, resultando en la clasificación de todas las levaduras de fermentación baja como *S. pastorianus*.

En la actualidad, existen dos linajes de levaduras lager presentes en la industria cervecera. Uno de ellos corresponde ha llamado “grupo I” o Saaz” mientras que el segundo es conocido como “grupo II” o “Frohberg”^{7,13,16}. Ambos arqueotipos son muy similares, sin embargo, presentan interesantes diferencias a nivel genómico y fenotípico. En términos generales, el genoma de *S. pastorianus* tipo Saaz es considerado triploide mientras que Frohberg es considerado tetraploide. Existen distintas hipótesis que intentan explicar cómo se generaron sus respectivos genomas (Figura 2), sin embargo, su explicación aún es controversial¹⁷. Una de ellas (la más divulgada) se basa en dos eventos de hibridación completamente

independientes e involucra una cepa domesticada de *S. cerevisiae* y una cepa salvaje de *S. eubayanus*, seguido por un patrón de pérdida o retención de las regiones subteloméricas de la parte *cerevisiae* en el genoma de las levaduras lager. Una segunda hipótesis plantea una hibridación simple entre dos cepas diploides de cada especie, seguida de una translocación cromosómica en el híbrido original antes de la divergencia de ambos linajes. A continuación, el linaje Frohberg experimentó una pérdida de variación entre cromosomas intra-homólogos en el subgenoma de *S. cerevisiae* mediante la pérdida de heterocigosidad, mientras que el linaje Saaz perdió completamente la mitad de los cromosomas de *S. cerevisiae*. La última hipótesis, sugiere la hibridación entre una *S. cerevisiae* haploide y una *S. eubayanus* diploide que generó el híbrido original del linaje Saaz, seguido por una segunda hibridación entre una célula haploide distinta de *S. cerevisiae* que permitió la generación del primer híbrido del linaje Frohberg. Desde el punto de vista fenotípico, las levaduras Saaz tienen una capacidad de crecimiento mayor a 10°C respecto a las Frohberg¹⁸. Por otro lado, las levaduras Frohberg tienen un perfil de fermentación más veloz y un mayor grado de atenuación^{18,19}, diferencia que puede ser explicada por la incapacidad de metabolizar eficientemente maltotriosa por las levaduras Saaz. Además, las levaduras Saaz tienen una menor viabilidad celular, característica que se considera una desventaja debido a que comúnmente las levaduras lager se reutilizan durante varias rondas de fermentación. De acuerdo a su perfil aromático, las levaduras Frohberg producen concentraciones elevadas de acetato de etilo, acetato de isoamilo y alcohol isoamílico y también producen concentraciones más bajas de acetaldehído. Estas características fenotípicas explican la preferencia del uso de levaduras Frohberg respecto a Saaz.

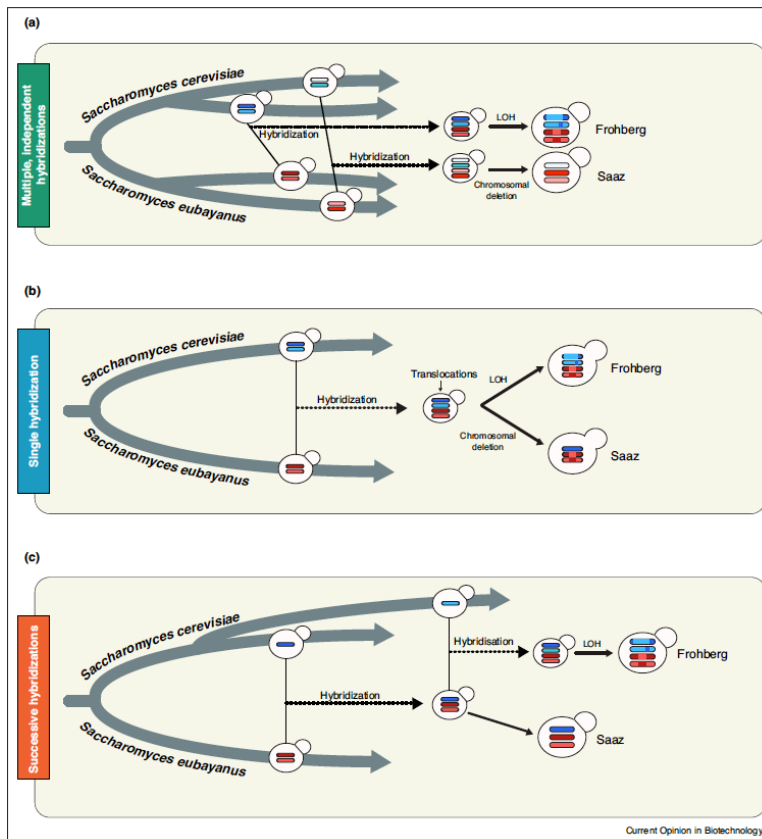


Figura 2 Modelos que explican el origen de los linajes Froberg y Saaz. a) Los grupos Froberg y Saaz se originaron a partir de al menos dos eventos de hibridación independientes entre cepas parentales distintas de *S. cerevisiae* diploide y *S. eubayanus* diploide. b) Los grupos Froberg y Saaz se originaron a partir de un único evento de hibridación entre un *S. cerevisiae* diploide y un *S. eubayanus* diploide. Las translocaciones ocurrieron en el híbrido ancestral antes de la divergencia de los linajes Saaz y Froberg y son compartidas entre los dos grupos. Después de la hibridación, el linaje Froberg experimentó una pérdida de variación entre los cromosomas intrahomólogos en el subgenoma de *S. cerevisiae* a través de la pérdida de heterocigosidad (LOH) y el linaje Saaz perdió aproximadamente la mitad de los cromosomas derivados de *S. cerevisiae*. c) Los grupos Froberg y Saaz se originaron a partir de al menos un evento de hibridación compartido entre un *S. cerevisiae* haploide y un *S. eubayanus* diploide. El híbrido ancestral triploide divergió aún más en el linaje Saaz, y el linaje Froberg surgió por otro evento de hibridación con un *S. cerevisiae* haploide distinto.

1.3 Levaduras no convencionales en la industria cervecera

1.3.1 *Saccharomyces eubayanus*.

Durante varios años, se pensó que *S. pastorianus* correspondía a un híbrido interespecie entre *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, sin embargo, posteriormente a la secuenciación del genoma completo de la levadura lager Weihenstephan 34/70 se observó que el subgenoma de *S. bayanus* mostraba una secuencia de identidad menor (92.7 %) respecto al subgenoma de *S. cerevisiae* (> 99 %) ²⁰. En el año 2011, científicos argentinos encontraron en la Patagonia

una nueva especie de *Saccharomyces*, llamada *S. eubayanus*, cuya identidad genética mostraba una elevada similitud (99.56% de acuerdo al resultado de secuenciación del genoma completo) respecto al subgenoma no-*cerevisiae* de las levaduras lager ⁹. Desde entonces, cinco poblaciones de *S. eubayanus* han sido descubiertos en distintas partes del mundo: dos de ellas en Sud América ²¹ y las otras tres en Asia, específicamente en Tibet, Sichuan y el oeste de China ²². Dentro de ellas, la población del Tibet ha reportado la mayor similitud de su secuencia (99.8 % de acuerdo al resultado obtenido de la secuenciación multilocus) respecto a la porción de genoma de *S. pastorianus* correspondiente a *S. eubayanus*. Sin embargo, debido a que *S. eubayanus* aún no ha sido encontrada en Europa el lugar y el momento en que *S. eubayanus* entró en contacto con el medio ambiente cervecero de cervezas lager continúa siendo controversial. Se postula que alrededor de 500-600 años atrás, la hibridación entre ambas especies ocurrió en un tanque de fermentación, dando como resultado un híbrido con una buena capacidad de fermentación (proveniente de *S. cerevisie*) y una elevada tolerancia a temperaturas bajas (proveniente de *S. eubayanus*). Estas especies debieron ser posteriormente seleccionadas por los cerveceros mediante la continua inoculación de una parte de un batch fermentado en un nuevo batch sin fermentar.

Las características del desempeño fermentativo de las cepas de *S. eubayanus* tienen mayor similitud con las cepas Saaz de *S. pastorianus* en comparación con las cepas Froberg. En general, las cepas de *S. eubayanus* tienen una buena tolerancia a bajas temperaturas (10°C) y son incapaz de metabolizar maltotriosa ¹⁸. Por otro lado, *S. eubayanus* también ha sido utilizada para la generación de nuevos híbridos inter-especie mediante cruza con cepas Ale como una estrategia para la producción de nuevas cepas lager con características distintivas respecto a las cepas lager disponibles en el mercado actualmente.

1.3.2 *Brettanomyces*.

La presencia de *Brettanomyces*, particularmente, *B. bruxellensis*, puede ser considerada tanto de manera positiva o negativa dependiendo del producto industrial. En cervezas de fermentación espontánea, la presencia de *Brettanomyces* es imperativa, mientras que en procesos de elaboración vitivinícolas es considerada un agente contaminante ²³. Lo anterior está directamente relacionado con la capacidad de sintetizar compuestos con actividad aromática que influyen en el perfil aromático del producto final. El término “Brett flavor”

resume diferentes aromas descritos como clavo de olor, especiado, corral, ahumado, plástico, fenólico, medicinal, venda adhesiva, cuero húmedo, cabra, frutal, floral, entre otros. Estos aromas son generados debido a la presencia de moléculas tales como ésteres etílicos (acetato de etilo y lactato de etilo); ésteres de acetato (acetato de isoamilo y acetato de 2-feniletilo), compuestos fenólicos volátiles ((4-etilguaicol (4-EG), 4-etilfenol (4-EP), 4 etilcatecol (4-EC) y sus precursores 4-vinilguaicol (4-VG), 4-vinilfenol (4-VP) y 4-vinilcatecol (4-VC)) y ácido acético²⁴⁻²⁶. Una característica interesante de las levaduras *Brettanomyces* es la presencia de la enzima vinilfenol reductasa, la cual cataliza la transformación de 4-VG, 4-VP y 4-VC en 4-EG, 4-EP y 4-EC, respectivamente.

1.3.3 *Torulaspora*.

Diferentes cepas de *Torulaspora delbrueckii* han sido investigadas en búsqueda de un potencial uso en la industria cervecera. Algunas cepas de *T. delbrueckii* son productoras de los siguientes compuestos aromáticos: acetato de etilo, alcoholes amílicos, diacetilo, 2-feniletanol, *n*-propanol, isobutanol, ácido hexanoico, ácido octanoico, entre otros. También se ha descrito que algunas cepas producen un agradable aroma y sabor frutal. La fermentación de azúcares de *T. delbrueckii* es dependiente de la cepa, siendo algunas capaces de producir un contenido de alcohol por volumen cercano al 4.0% (v/v) mientras que otras cepas sólo 0.94 % (v/v). Por lo tanto, algunas cepas de *T. delbrueckii* tienen el potencial para producir aromas y sabores frutales con un contenido de alcohol por volumen similar al que se encuentra en las cervezas promedio, mientras que otras podrían ser utilizadas como agentes bio saborizante-aromatizante para cervezas fermentadas con cepas de *Saccharomyces*^{27,28}.

1.3.4 *Pichia*.

La especie *Pichia anomala* ha sido aislada desde un amplio espectro de hábitats naturales en comparación con *S. cerevisiae*. Dentro de ellos es posible mencionar la cáscara de frutas, tejido humano, flores, productos lácteos, aguas residuales, entre otros. *Pichia anomala* es productora de compuestos volátiles tales como etil acetato, 2-feniletanol, acetato de 2-feniletilo, acetato de isobutilo, entre otros²⁹ y es capaz de metabolizar glucosa, fructosa, galactosa, arabinosa, xilosa, sucrosa y β -glucanos. En contraste con *S. cerevisiae*, *Pichia*

anómala puede crecer en condiciones aeróbicas con elevadas concentraciones de azúcar a una tasa de crecimiento relativamente elevada debido a que es una levadura Cabtree negativa, es decir, no tiene la necesidad de mantener niveles bajos de azúcar. A pesar de esta diferencia, ambas especies son incapaces de crecer bajo condiciones estrictamente anaerobias ³⁰. Además, *Pichia anómala* ha sido clasificada dentro del grupo de bioseguridad nivel 1 y es considerada segura para la salud de los individuos. De hecho, *P. anómala* ha sido declarada bajo el concepto de “qualified presumption of safety” (QPS) por la Autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA). Esta categoría tiene beneficios en términos de biotecnología de los alimentos y aceptación de microorganismos novedosos en los alimentos ³¹. Todas estas características sugieren un potencial uso de *P. anómala* en la industria cervecera.

1.3.5 Otras levaduras no convencionales con prospección futura

Un gran número de otras levaduras no convencionales tienen la capacidad de crecer en el proceso de elaboración de cerveza tales como *Candida tropicalis*, *Candida guilliermondii*, *Pichia fermentans*, *Issatchenkia orientalis*, *Zygosaccharomyces bailii*, *Kloeckera apiculata*, entre otras ³². Estas son comúnmente consideradas microorganismos contaminantes debido a que están relacionados con la síntesis de sabores y aromas indeseados (off-flavors), turbidez o sedimentación. Sin embargo, estas también podrían tener características beneficiosas que puedan contribuir a elaborar cervezas con un perfil de sabor y aroma deseado. Por esta razón, la evaluación de su potencial para ser utilizadas en la industria cervecera es necesario.

1.4 Características importantes relacionadas con el uso de levaduras en la industria cervecera

Si bien las levaduras mencionadas anteriormente son capaces de sintetizar compuestos con actividad aromática deseables, es necesario evaluar si ellas pueden satisfacer los requerimientos de la industria cervecera. Algunos de ellos son:

1.4.1 Desempeño fermentativo: La capacidad de producir una cerveza con un contenido de alcohol promedio, es decir, 5 % (v/v) puede ser considerado una característica favorable para varias industrias cerveceras, especialmente cuando perfiles aromáticos novedosos son obtenidos a través del uso de levaduras no convencionales tales como *T. delbrueckii*. Sin

embargo, la menor producción del alcohol en conjunto con la síntesis de compuestos volátiles deseados por levaduras no convencionales podría también ser considerado una ventaja cuando el interés de la industria es la producción de cervezas con bajo contenido alcohólico. El principal beneficio es evitar la extracción involuntaria de compuestos de aroma y sabor deseables que es un problema común cuando la extracción de alcohol se realiza posterior al término de la fermentación mediante procesos como destilación, osmósis reversa y diálisis ^{33,34}

1.4.1.1 Factores claves para una adecuada fermentación/bioflavoring

Durante el proceso de elaboración de cerveza, la participación más relevante de levaduras convencionales y no convencionales ocurre durante la fermentación/*bioflavoring*. En el caso de las levaduras convencionales, es decir, *S. pastorianus* y *S. cerevisiae* ambas cepas son productoras de etanol, uno de los principales productos de la fermentación, junto con la producción de un gran número de otros compuestos volátiles que contribuyen al perfil aromático de la cerveza. Se ha demostrado que existen varios parámetros que tienen un impacto relevante sobre la síntesis de compuestos con actividad aromática que pueden ser controlados durante el proceso de fermentación/*bioflavoring*. Algunos de ellos son la tasa de inoculación, composición del medio, temperatura de fermentación, pH, tiempo de fermentación, concentración de oxígeno disuelto, entre otros ²⁴.

1.4.2 Metabolización de fuentes de carbono: El potencial de metabolizar distintas fuentes de carbono es una característica cepa-dependiente y está directamente relacionada con la producción de alcohol durante la fermentación. Las fuentes de carbono más importantes presentes en el mosto cervecero son glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa, maltotetraosa y maltopentaosa ⁵. Por ejemplo, algunas cepas de levaduras nativas como *Torulaspota delbrueckii* son sólo capaces de metabolizar glucosa, fructosa y sacarosa, pero no pueden degradar maltosa, maltotriosa ni otros carbohidratos más complejos y, por lo tanto, podrían ser utilizadas para producir cervezas de baja graduación alcohólica. Por otro lado, algunas cepas de *Brettanomyces bruxellensis* pueden fermentar maltosa, fructosa, glucosa y también otros carbohidratos incapaces de ser fermentados por algunas especies de *Saccharomyces* como por ejemplo galactosa, celobiosa y dextrinas ²⁶. Estas características

de *B. bruxellensis* favorecen la producción de cervezas con menos calorías y con un contenido alcohólico ligeramente mayor³³.

1.4.3 Capacidad de floculación: Una característica deseable de las levaduras no convencionales es la capacidad de flocular en el momento adecuado durante el proceso de fermentación. La levadura cervecera ideal debiera exhibir una importante tasa de floculación hacia el término de la fermentación. Esta capacidad es de una importante consideración para la industria cervecera, ya que permite una manera eficiente, amistosa con el ambiente, simple y económicamente rentable para separar las células de las levaduras de la cerveza sin madurar al final de la fermentación³⁵.

1.4.4 Síntesis de compuestos indeseables: Las levaduras tienen mecanismos que permiten la síntesis de un amplio espectro de compuestos con actividad aromática mediante diversas reacciones bioquímicas. Algunos de estos compuestos pueden ser considerados deseables para un grupo específico de estilos de cerveza, mientras que otros son considerados indeseables sin importar el estilo que se elabore. En este contexto, el estudio de compuestos volátiles producidos por levaduras salvajes es relevante para la selección de levaduras no convencionales en la industria cervecera⁵.

1.4.5 Tolerancia al stress: La capacidad de las levaduras para resistir condiciones de stress relacionadas con cambios de temperatura, pH, composición del medio, entre otros factores sin provocar cambios negativos en el perfil de aroma y sabor de la cerveza terminada es una característica deseable en la industria cervecera. Además, ha sido demostrado que estos parámetros tienen el potencial de afectar la síntesis de determinados compuestos que son relevantes en el perfil aromático de la cerveza²⁴.

1.4.6 Bioflavoring: Cuando se utilizan levaduras no convencionales, éstas pueden producir compuestos con volátiles con actividad aromática, sin ser necesariamente productoras de etanol. Para estos casos lo más apropiado es utilizar el término *bioflavoring* en vez de fermentación (ya que no se produce alcohol ni dióxido de carbono). Debido a que las levaduras tienen un comportamiento que es dependiente de su género, especie y/o cepa, la estandarización de las condiciones de producción es de gran relevancia para el monitoreo y el análisis de las concentraciones de los compuestos volátiles sintetizados.

piruvato (verde/rojo), así como dicetonas vecinales (rosa) y alcoholes superiores y ésteres (púrpura) derivados del metabolismo de aminoácidos. Los compuestos fenólicos provienen del medio (naranja). Las líneas indican importación/exportación y reacciones bioquímicas.

1.5.1 Etanol

Etanol es el metabolito más importante producido por la levadura durante el proceso de fermentación. Su síntesis comienza con el ingreso de carbohidratos y su conversión en piruvato, la cual puede seguir dos rutas metabólicas diferentes dependiendo de la disponibilidad de oxígeno. Específicamente, respiración en condiciones aeróbicas o fermentación en condiciones anaeróbicas. Luego, el piruvato es convertido en acetaldehído por la enzima piruvato descarboxilasa (PDC). La reacción corresponde a una conversión reversible de acetaldehído en etanol por la enzima alcohol deshidrogenasa (ADH). Adh1 es la principal enzima responsable de la conversión de acetaldehído en etanol, mientras que Adh2 transforma etanol en acetaldehído cuando la fuente de carbono es necesaria. Aun cuando la producción de etanol es importante para la industria cervecera, su contribución sensorial en el perfil aromático de la cerveza no es tan relevante como la de otros compuestos producidos durante la fermentación. *Saccharomyces* spp. son las levaduras comúnmente más utilizadas en la industria cervecera debido a su elevada capacidad de acumular y tolerar concentraciones de etanol, sin embargo, también existen otras levaduras productoras de etanol tales como *Brettanomyces bruxellensis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Pichia kudriavzevii* y *Torulasporea delbrueckii*^{5,33}. Este conocimiento hace posible el uso de levaduras no convencionales para sintetizar etanol en la producción de cerveza.

1.5.2 Acetaldehído

Acetaldehído es el aldehído más abundante presente en la cerveza. Es sintetizado por la levadura a partir de piruvato y es el compuesto intermediario durante la síntesis de etanol. Por esta razón, además de su influencia en el perfil aromático de la cerveza, puede ser utilizado como un indicador indirecto de la producción de etanol. Su presencia en la cerveza puede estar relacionada con un aroma frutal deseable o con un indeseable aroma a manzana verde o pasto recién cortado. Su percepción es dependiente de la concentración de

acetaldehído presente en la cerveza, niveles menores a 10ug/g se relacionan con un efecto deseable ³⁶.

1.4.3 Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores más comunes presentes en cerveza con una participación relevante en el perfil aromático son 1-propanol (alcohol, dulce); isobutanol (solvente); alcohol isoamílico (plátano, frutal, alcohólico) y 2-feniletanol (rosas) ^{1,37}. En general, los alcoholes superiores están presentes en elevadas concentraciones respecto a los esterres, sin embargo, sus umbrales de concentración también son más altos. Respecto a su síntesis, puede ocurrir a través de rutas catabólicas y anabólicas. Las rutas catabólicas requieren de aminoácidos que son obtenidos desde el mosto. Esta ruta es conocida como la ruta de Erlich en honor al científico Felix Erlich quien estudió la relación entre el metabolismo de los aminoácidos y la síntesis de alcoholes superiores. La ruta de Erlich consiste en tres reacciones consecutivas. La primera, corresponde a la transaminación para generar moléculas estructurales (ácido alfa-ceto) necesarias para el crecimiento celular durante el proceso fermentativo. Luego, los ácidos alfa-ceto entran en una reacción de descarboxilación irreversible para generar su aldehído correspondiente. La tercera reacción corresponde a la reducción del aldehído en su alcohol superior correspondiente. La enzima alcohol deshidrogenasa puede participar en esta reacción. Por otro lado, los ácidos alfa-ceto también pueden ser sintetizados por la ruta anabólica llamada síntesis *de novo* de aminoácidos de cadena ramificada ³⁸.

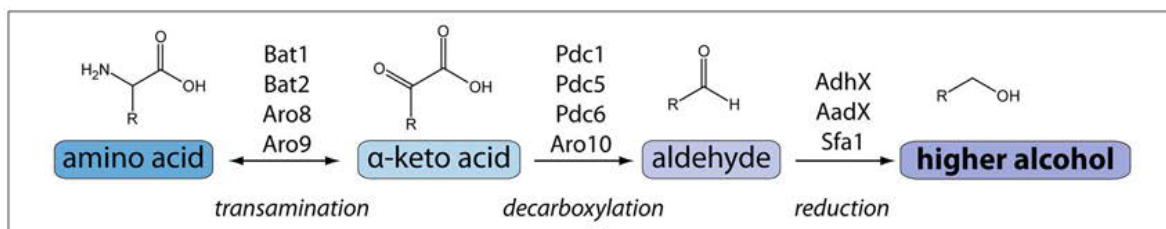


Figura 4 La ruta de Erlich. Esta figura muestra las rutas que dirigen compuestos de carbono a la producción de aminoácidos y alcoholes superiores a través de la vía de Ehrlich en tres etapas: transaminación, descarboxilación y reducción.

1.4.4 Ésteres

Los ésteres son considerados un grupo relevante de compuestos con actividad aromática en el perfil sensorial de la cerveza ³⁵. Estos compuestos están relacionados con aromas frutales y su concentración promedio es cercana a sus respectivos niveles de umbral de percepción. Aun cuando los ésteres son producidos en concentraciones menores que su concentración umbral, es posible percibir su aroma debido al efecto sinérgico comúnmente observado. Por este motivo, cambios menores en las concentraciones de los ésteres pueden producir efectos relevantes –positivos o negativos- sobre el perfil aromático de la cerveza. Los ésteres pueden ser clasificados en dos grupos diferentes de acuerdo a las rutas metabólicas necesarias para su síntesis. Los ésteres de acetato son generados a partir de la reacción de condensación entre acetyl-CoA y etanol o un alcohol superior ⁴. Los ésteres con actividad aromática que influyen de manera importante sobre el perfil de aroma y sabor de la cerveza son acetato de etilo (frutal, solvente); acetato de isoamilo (plátano, pera) y acetato de 2-feniletilo (rosas, miel, dulce) ^{1,35,37}. El otro grupo de ésteres es llamado ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media y son sintetizados a partir de acyl-CoA y etanol ³⁹. Los ésteres etílicos de ácidos grasos de cadena media con mayor contribución en el perfil aromático de la cerveza son hexanoato de etilo (manzana, anís) y octanoato de etilo (manzana) ³⁵. La cepa de la levadura es el factor más importante que influye en la síntesis de ésteres, sin embargo, otros parámetros también deben ser considerados, tales como la densidad del mosto y su perfil de azúcar, el contenido de nitrógeno y oxígeno en el mosto y la temperatura de fermentación ⁴⁰. Debido a la elevada complejidad involucrada en la síntesis de ésteres, resulta difícil predecir sus concentraciones en la cerveza terminada ³⁵.

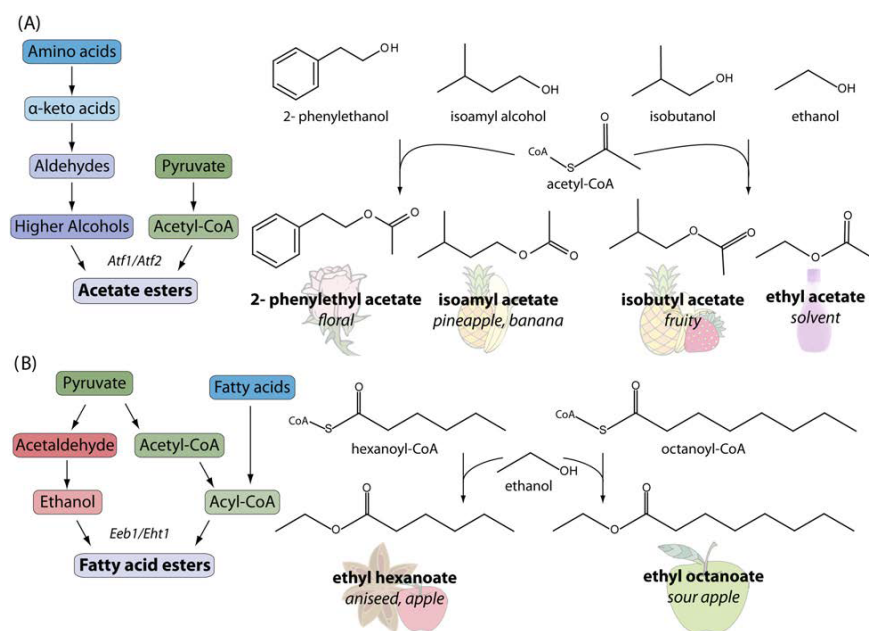


Figura 5 Síntesis de ésteres en levaduras. Esta figura presenta un esquema general de la producción de ésteres, que resulta de reacciones de condensación entre un alcohol y un acetilo/acilo-CoA. Los ésteres de acetato se producen por las enzimas Atf1 y Atf2 (A), mientras que los ésteres de ácidos grasos son generados por Eeb1 y Eht1 (B). También se muestran ejemplos de los ésteres más comunes, con sus respectivos descriptores de aroma en cursiva.

1.4.5 Cetonas vecinales

Las cetonas vecinales son compuestos que tienen dos enlaces dobles carbono-oxígeno adyacentes. Durante la fermentación, la levadura es capaz de producir dos cetonas vecinales: 2,3-butanodiona (diacetilo) y 2,3-pentanodiona, como sub-productos de la ruta biosintética de valina e isoleucina, respectivamente. De estas dos moléculas, diacetilo es la que tiene mayor influencia en el perfil aromático de la cerveza debido a su umbral de percepción (0.1 $\mu\text{g/g}$), el cual es diez veces menor respecto a la concentración umbral de 2,3-pentanodiona^{24,41}. Durante el crecimiento celular, la ruta biosintética de valina pierde eficiencia y en consecuencia acumula acetolactato que es liberado al medio extra celular. Posteriormente, a través de una descarboxilación no enzimática, el acetolactato es convertido en diacetilo, el cual contribuye con un sabor y aroma a mantequilla o caramelo⁴¹ que es comúnmente percibido como un aroma y sabor indeseable en la gran mayoría de los estilos de cerveza. Sin embargo, la presencia de diacetilo en bajas concentraciones es considerado deseable en estilos de cerveza específicos como bohemian pilsner y algunas ales inglesas.

1.4.6 Compuestos sulfurados

Los compuestos sulfurados pueden ser sintetizados por la levadura a través de dos rutas metabólicas que requieren una fuente de sulfuro en el medio extracelular. El sulfuro puede ser obtenido a partir de aminoácidos que contienen sulfuro en su estructura tales como cisteína y metionina, o a partir de la asimilación de sulfato y sus consecutivas reacciones de reducción. Debido a que el mosto muestra típicamente bajas concentraciones de aminoácidos azufrados, la segunda ruta metabólica es la más usada durante la fermentación. El sulfato es reducido a sulfito, el que es combinado con las fuentes de nitrógeno O-acetilserina y O-acetil-homoserina para generar cisteína y metionina, respectivamente. En este punto, los aminoácidos azufrados pueden ser incorporados en la formación de proteínas o nuevamente metabolizados para formar otros compuestos volátiles azufrados²⁴. Uno de los compuestos azufrados con actividad aromática que influye sobre el perfil aromático de la cerveza es el dimetilsulfuro (DMS), su síntesis está relacionada con la ruptura de cisteína y metionina y también con la reducción de dimetilsulfóxido por la enzima metionina sulfoxido reductasa. En las cervezas lagers cuando la concentración de DMS es usualmente mayor que su respectivo umbral de percepción y se encuentra entre 30-100 µg/L (típico aroma a repollo), esta molécula contribuye con un sabor deseable y distintivo para las cervezas de tipo lager. Sin embargo, cuando su concentración supera 100 µg/L es percibido como un compuesto indeseado que ha sido descrito como maíz dulce cocido⁴². Además, cuando las fuentes de nitrógeno son limitadas, el sulfuro es convertido en ácido sulfhídrico (H₂S) para facilitar su difusión hacia el exterior de la célula. Cuando la concentración de H₂S es mayor que 0.005 mg/L, esta molécula es percibida de manera indeseada con un característico aroma a huevo podrido⁴³.

1.4.7 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos tales como los ácidos hidroxicinámicos están comúnmente presentes en las cervezas^{44,45} y algunos de ellos pueden ser tóxicos para *S. cerevisiae*. En respuesta, las levaduras activan su maquinaria enzimática para convertir ácido ferúlico, ácido *p*-cumárico y ácido cafeico en compuestos menos tóxicos tales como 4-vinilguaiacol (4-VG), 4-vinilfenol (4-VF) y 4-vinilacatecol (4-VC), respectivamente. Existen dos enzimas que son necesarias para que ocurra la reacción de descarboxilación llamadas descarboxilasa del

ácido fenilacrílico que es codificada por el gen *PADI* y descarboxilasa del ácido ferúlico codificada por el gen *FDCI*. La primera de ellas produce un cofactor requerido para la actividad de descarboxilación de *FDCI*. De esta manera, estos compuestos pueden actuar como precursores para la síntesis de 4-etilguaiaicol (4-EG), 4-etilfenol (4-EP) y 4-etilcatecol (4-EC) por levaduras no *Saccharomyces* durante el proceso de fermentación debido a que el género *Saccharomyces* carece de la enzima vinilfenol reductasa. Por lo tanto, la presencia de estos compuestos en la cerveza sugiere una contribución directa de *Brettanomyces* durante la fermentación²⁶. Ambos compuestos, 4-VG y 4-EG, son percibidos como aromas especiados mientras que 4-VP y 4-EP están más relacionados con aromas medicinales²⁴. En general, los compuestos fenólicos son percibidos como indeseables en varios estilos de cerveza. Sin embargo, también son una parte fundamental de aromas deseados en algunos estilos de cerveza tales como hefeweizen, lámbicas, sour, entre otros. Indudablemente, la síntesis de estos aromas distintivos enriquece la complejidad de perfil de aroma y sabor de una cerveza y promueve la búsqueda de levaduras no convencionales para ser utilizadas en el proceso de elaboración de cerveza.

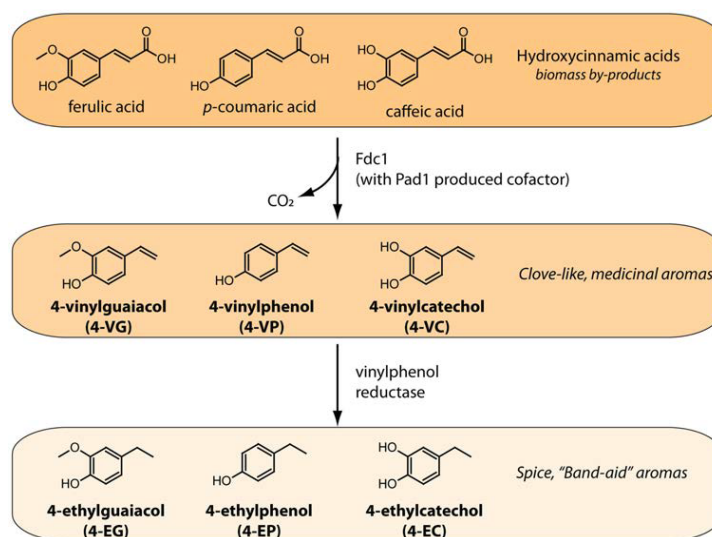


Figura 6 Producción de compuestos fenólicos. Los ácidos hidroxicinámicos se liberan durante el preprocesamiento de la biomasa. Las células de levadura, a través de la enzima Fdc1, pueden descarboxilar estos compuestos tóxicos en formas menos dañinas, con la ayuda del cofactor FMN producido por Pad1. Posteriormente, los compuestos son secretados y pueden ser reducidos por vinilfenol reductasas de levaduras o bacterias generalmente consideradas como contaminantes.

1.5 Estrategias para obtener un perfil aromático distintivo

1.5.1 Fermentación mixta

El potencial uso de levaduras salvajes en la industria cervecera amplía el espectro tanto de género, cepa y especies que no han sido explorados previamente en el proceso de elaboración de cerveza. Considerando todos los parámetros mencionados anteriormente, es posible que las levaduras no convencionales presenten algunas desventajas respecto a su contraparte *Saccharomyces cerevisiae*. Con el propósito de superar estas desventajas, se ha propuesto el uso de cultivos mixtos de levaduras *Saccharomyces* y levaduras no convencionales para combinar el mejor desempeño de fermentación de *Saccharomyces* con las características deseables de levaduras no *Saccharomyces*⁵. De esta forma, ha sido posible obtener cervezas con un perfil aromático deseable con mayor complejidad en comparación con el que se podría obtener mediante el uso de sólo una levadura por separado.

1.5.2 Generación de híbridos intraespecie e interespecie

El apareamiento entre cepas de una misma especie (intraespecie) o bien entre especies distintas (interespecie) con el propósito de obtener características genotípicas y, por lo tanto, fenotípicas superiores respecto a las cepas parentales. Dentro de las características relevantes para la industria cervecera es posible mencionar: la modificación o mejora de atributos en el sabor y/o aroma, disminución de la producción de etanol o calorías, modificación en la producción de compuestos fenólicos, entre otros. De este modo, es posible generar novedosos híbridos que no existían previamente en nichos naturales o artificiales. Algunos conceptos relacionados con el ciclo de vida de *Saccharomyces* y sus sistemas de apareamiento, así como de ploidía y aneuploidía se describen a continuación.

1.5.2.1 Ciclo de vida de *Saccharomyces* y sus sistemas de apareamiento

Las levaduras *Saccharomyces* son organismos unicelulares eucariontes cuyo genoma está organizado en cromosomas lineales contenidos dentro de su núcleo. Las cepas que se encuentran normalmente en la naturaleza tienen un genoma diploide que contiene dos copias de cada uno de sus 16 cromosomas distintos, es decir, 32 cromosomas en total en su genoma diploide. Las células haploides pueden existir brevemente dentro del ciclo sexual de apareamiento, o de manera indefinida como células libres si son incapaces de aparearse satisfactoriamente debido a mutaciones en el sistema de apareamiento.

En el ciclo de vida típico de las levaduras *Saccharomyces* están incluido una fase sexual y asexual, donde participan células diploides y, en algunos casos, haploides capaces de entrar en mitosis, es decir, con la capacidad de dividirse asexualmente de una manera ilimitada cuando se encuentran en un ambiente con los nutrientes suficientes. Sin embargo, especialmente cuando la fuente de nitrógeno se vuelve limitante, una célula diploide es capaz de entrar en meiosis para producir 4 esporas haploides con cromosomas recombinantes, es decir, que contienen porciones de ADN de cada parental. Dos pares de esporas con dos tipos de apareamiento distintos u opuestos, llamados “a” y “alpha”, resistentes a diferentes tipos de estrés en el medioambiente. Cuando la disponibilidad de los nutrientes se reestablece y existen las condiciones medioambientales favorables, las esporas haploides pueden germinar (volviéndose metabólicamente activas) y luego dividirse para continuar creciendo de manera asexual, o bien, si éstas entran en contacto con células con su tipo opuesto de apareamiento pueden experimentar fusión celular y apareamiento (conjugación) con la otra célula para formar una nueva célula diploide. De esta forma, se obtiene una célula diploide heterocigoto para el locus de apareamiento sexual, llamada a/alpha, situación que las hace ser incapaces de aparearse y que en condiciones de nutrientes favorables pueden proliferar asexualmente mediante división mitótica ⁴⁶.

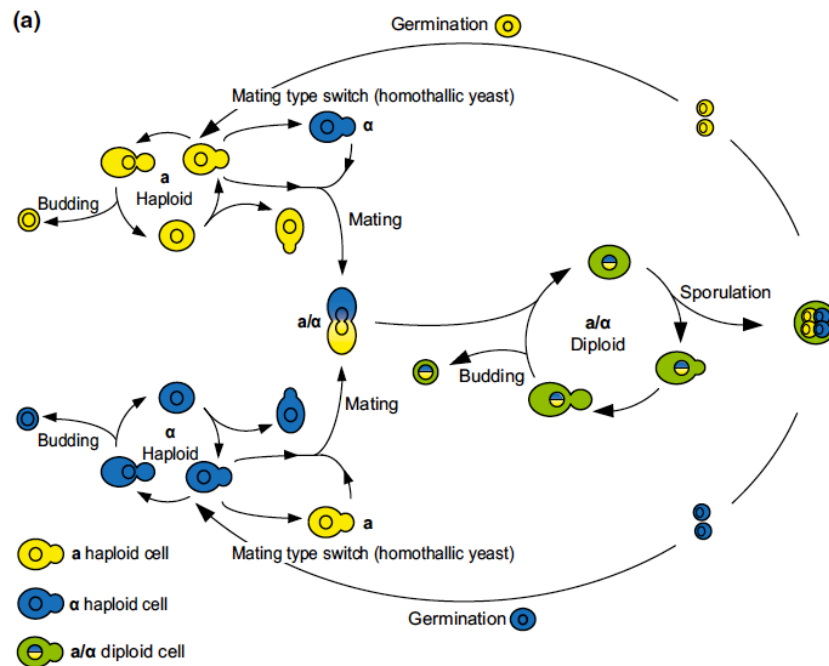


Figura 7 Ciclo de vida de *S. cerevisiae*. Las células de levadura pueden existir en estado haploide o diploide. Las diploides son heterocigotas en el locus del tipo de apareamiento (a/alpha) y no pueden aparearse, mientras

que las haploides, con tipos de apareamiento a o alpha, pueden aparearse con el tipo de apareamiento opuesto. Ambas pueden proliferar asexualmente por gemación en condiciones ricas en nutrientes. En condiciones de escasez, los diploides pueden esporular, generando cuatro esporas haploides que pueden germinar cuando las condiciones mejoran. En cepas homotalicas, los haploides pueden cambiar su tipo de apareamiento mediante el gen *HO*, permitiendo la formación de un diploide homocigoto. En cepas heterotalicas, el gen *HO* está inactivo, impidiendo este cambio.

1.5.2.2 Conceptos de ploidía y aneuploidía

Todas las especies que pertenecen al género *Saccharomyces* son capaces de aparearse con otra especie, es decir, las esporas haploides de una especie de *Saccharomyces* son capaces de aparearse, con esporas haploides que tengan el tipo de apareamiento opuesto, que pertenezcan a cualquier otra especie de *Saccharomyces* para formar un híbrido interespecie. Este proceso ocurre tanto en la naturaleza como en medio ambientes artificiales generados por el hombre. Estos híbridos interespecie son incapaces de entrar en la etapa de meiosis, pero si son capaces de reproducirse indefinidamente de una manera asexual (clonación). Además, las levaduras pueden llegar a tener más de dos copias de cada set haploide de 16 cromosomas, lo que se conoce como poliploidía, mediante mecanismos como rondas múltiples espontáneas de duplicación del genoma o apareamiento aberrante entre dos células diploides. Este apareamiento aberrante puede ocurrir entre las mismas especies mientras que el apareamiento aberrante de células con una ploidía mayor entre diferentes especies puede resultar en la generación de híbridos interespecie con niveles de ploidía variables. Una levadura diploide o con una ploidía mayor puede tolerar la pérdida o ganancia de un cromosoma, o incluso varios cromosomas. Lo anterior se denomina “aneuploidía”, donde dentro de una célula diferentes cromosomas pueden estar presentes en un número de copias distinto. Las levaduras ale son comúnmente cepas de *S. cerevisiae*, son diploides o más a menudo tienen una ploidía mayor y/o son aneuploides, dependiendo de la cepa en particular ^{12,47}. Por el contrario, las levaduras lager corresponden híbridos interespecie producto del apareamiento entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* ^{7,9,48} con distintos niveles de ploidía. En general, las levaduras lager que pertenecen al grupo Saaz son consideradas en general como triploides mientras que las del grupo Froberg son consideradas tetraploides.

1.5.2.3 Estrategias para la generación de híbridos no modificados genéticamente

Actualmente existen diversas técnicas que permiten la generación de híbridos intraespecie o interespecie considerados organismos libres de modificación genética. Algunas de estas técnicas basadas en el entrecruzamiento “natural” es posible mencionar: direct mating, rare mating, mass mating and genome shuffling.

1.5.2.3.1 Direct Mating

Consiste en el apareamiento controlado que ocurre entre dos esporas y, por lo tanto, requiere de dos cepas parentales que sean capaces de producir esporas con alta eficiencia. Si bien la eficiencia de esporulación y la viabilidad de las esporas de las cepas llamadas ale es variable y es dependiente de la cepa, por el contrario, las levaduras lagers en general son incapaces de producir esporas viables. Si bien la obtención de estas esporas puede ser un trabajo laborioso, una vez obtenidas las esporas aisladas, es posible el cultivo de líneas para realizar los experimentos de apareamiento. Distintos autores han obtenido resultados interesantes en el mejoramiento de las características aromáticas en levaduras ale ⁴⁹, obtención de nuevos híbridos interespecie de levaduras lagers ⁵⁰ a partir de mutantes autotróficas naturales de *S. cerevisiae* y *S. eubayanus*, obtención de nuevos híbridos tipo-lager mediante la manipulación directa de esporas de cepas de levadura ale ubicadas de manera contigua con esporas no alteradas de cepas de *S. eubayanus*, permitiendo así la fusión y el apareamiento sin ninguna etapa de selección previa ¹⁹. En estos últimos dos estudios, novedosos híbridos interespecie tipo lager mostraron características de fermentación y perfiles aromáticos distintivos respecto a las cepas comerciales de levaduras lager.

Una ventaja del uso de esta técnica es que permite la generación de híbridos intra o interespecie considerados libres de manipulación genética (non-GMO) facilitando así su uso en la industria cervecera. Por otro lado, una desventaja que presenta esta técnica es que las levaduras cerveceras son generalmente heterocigotos y, por lo tanto, la segregación mitótica puede resultar en esporas muy diversas genéticamente. Es decir, las esporas utilizadas en el apareamiento pueden contener características superiores o inferiores a las deseadas. De esta manera, se pueden obtener tanto características deseables como indeseables y es necesario evaluar el desempeño fermentativo de estos nuevos híbridos a escala de laboratorio e industrial.

1.6.2.1.2 Rare mating

Las levaduras diploides o con una ploidía mayor por lo general no expresan un mating type individual y, por lo tanto, no participan en el proceso de apareamiento. Sin embargo, con muy baja frecuencia, estas células pueden modificar su mating type y volverse homocigotas para el mating type “a” o “alpha”. De esta forma, estas células homocigotas son capaces de aparearse con una espora o célula que tenga el mating type opuesto. Estos eventos poco frecuentes ocurren en poblaciones grandes y cuando las células generadas producto del apareamiento son capaces de ser aisladas mediante un proceso selectivo o un análisis exploratorio, es posible obtener híbridos triploides, tetraploides o de una ploidía superior⁵¹.

1.6.2.1.3 Mass mating and genome shuffling

El uso de células parentales con la capacidad de generar esporas viables es fundamental para realizar esta técnica. Primero, un gran número de células o esporas de los parentales (uno, dos o incluso más) es generado para luego ser mezclados todos juntos, permitiendo un apareamiento aleatorio entre células haploides o esporas. De este modo, el genotipo las distintas poblaciones de los parentales son mezclados en células únicas, dando como resultado células con la combinación características de interés. Si la selección de dichas células es posible, varias rondas de mass mating y su respectiva selección posterior son realizados iterativamente para lograr una mayor expresión de las características fenotípicas deseadas. El uso de este método ha sido limitado en el uso de levaduras cerveceras debido a la frecuente dificultad en la eficiencia de esporulación y mating de estas cepas.

1.7 Evolución dirigida

La evolución dirigida (también llamada evolución adaptativa, evolución experimental o ingeniería evolutiva) consiste en métodos que permiten la selección a partir de una población celular de individuos que contienen mutaciones genéticas beneficiosas para una característica particular⁵². Esto puede ser obtenido a partir del crecimiento de una población de células por largos periodos de tiempo, es decir, mediante la división celular durante varias generaciones sometidas a condiciones que favorecen modificaciones en el genoma que son consideradas beneficiosas. De este modo, permite la obtención de una nueva población de células con mutaciones de interés. Estas mutaciones pueden existir desde un comienzo en una población

genéticamente mixta o bien pueden ocurrir de forma espontánea durante el proceso evolutivo. Es importante destacar que la probabilidad de variación genética de una población inicial puede ser favorecida mediante la recombinación genómica de una población antes del comienzo del proceso evolutivo, condición que ocurre en el momento de la generación de nuevos híbridos intraespecie o interespecie. Además, esta metodología también puede ser utilizada para incrementar una característica fenotípica existente en cepas individuales.

De acuerdo a lo anteriormente mencionado, la evolución dirigida posterior a la generación de híbridos interespecie, resulta como una interesante estrategia que se beneficia de la plasticidad genómica que tienen los híbridos recién generados para la obtención de nuevas levaduras con características, genotípicas y fenotípicas de interés para la industria cervecera. Una ventaja importante de las levaduras que se pueden obtener mediante esta estrategia es que no son considerados organismos genéticamente modificados y, por lo tanto, su aplicación industrial se encuentra libre de restricciones ⁵³.

1.7 Determinación cualitativa y cuantitativa de compuestos volátiles relevantes para la industria cervecera

Determinar la concentración de moléculas con actividad aromática presentes en la cerveza es muy relevante para entender el potencial de levaduras salvajes y/o no convencionales sobre el perfil aromático del producto final. Para este propósito, la selección adecuada y el uso de técnicas de química analítica es fundamental. Es de suma importancia considerar la naturaleza química de las moléculas de interés. En el caso de los compuestos más relevantes presentes en la cerveza pertenecen a diferentes familias tales como alcoholes, ésteres, cetonas, compuestos sulfurados y fenólicos. En general, estos compuestos pueden ser clasificados como compuestos volátiles, la mayoría de ellos son no polares, con una relación masa/carga entre 29 y 660 ^{54,55}.

Además, la separación de los analitos mediante cromatografía gaseosa tiene varias consideraciones tales como la temperatura del inyector para asegurar la volatilización de todos los analitos de la muestra, la composición química de la columna que debe interactuar con los analitos para lograr su separación y el detector que debe ser capaz de generar una señal para cada analito. El conocimiento previo de la naturaleza química de los compuestos

y su rango de concentración en la muestra es crítico para decidir el tipo de detector a ser usado. Para el análisis de compuestos volátiles presentes en alimentos, es posible encontrar en la literatura diferentes metodologías analíticas.

1.7.1 Preparación de la muestra

1.7.1.1 Headspace gas chromatography coupled with a flame ionization detector (HS-GC-FID)

El análisis de espacio de cabeza permite realizar un análisis exploratorio de diversas familias de compuestos. Es un método de elección cuando el coeficiente de partición del analito favorece la migración de éste desde la matriz al espacio de cabeza. Su desempeño depende de la cantidad de analito presente en el espacio de cabeza, el que a su vez depende de la volatilidad del compuesto, su relación con la matriz, temperatura y el volumen de ambas fases. Debido a que no involucra la pre-concentración del analito, su aplicación está restringida al análisis de compuestos muy volátiles, o bien, compuestos que están presentes en relativamente elevadas concentraciones)^{3,56}.

1.7.1.2 Headspace-solid phase microextraction (HS-SPME)

A diferencia de lo descrito recientemente (HS), el uso de headspace en combinación con microextracción en fase sólida (HS-SPME) permite preconcentrar los analitos de interés mediante el equilibrio entre los compuestos volátiles que están presentes en el espacio de cabeza y la fibra de SPME. Es importante tener en cuenta que la naturaleza de los compuestos volátiles de interés, así como la composición de la fibra de SPME utilizada son factores críticos relacionados con la selectividad de la extracción de los compuestos volátiles. En la actualidad, existen diversas composiciones de sorbentes de fibras con distintas polaridades. Específicamente, para el análisis de compuestos volátiles presentes en una matriz de cerveza han demostrado ser útil fibras de polidimetilsiloxano (PDMS)⁵⁴, así como también formas combinadas como por ejemplo polidimetilsiloxano/divilbenceno (PDMS/DVB)^{55,57} y divinilbenceno/carboxeno/polidimetilsiloxano (DVB/CAR/PDMS)⁵⁸.

1.7.2 Cromatografía gaseosa de compuestos de interés en la cerveza

La cromatografía gaseosa es la metodología más utilizada para la separación y cuantificación de compuestos volátiles. Dentro de las condiciones relevantes de los métodos de cromatografía gaseosa utilizadas para la determinación de compuestos volátiles presentes en una matriz de cerveza incluyen el uso de columnas capilares. Estas pueden estar compuestas por una fase estacionaria polar como por ejemplo polietilenglicol llamada DB-WAX^{49,54,59,60} o bien una fase estacionaria no polar compuesta por (5%-phenyl)-methylpolysiloxane, conocida como HP-5 o DB-5^{54,58}. Además, la temperatura de trabajo tiene un rol fundamental para lograr la separación de los compuestos volátiles. Debido a la diversa naturaleza química de los compuestos de interés dentro del perfil aromático de la cerveza, es muy común el uso de distintas temperaturas que van en aumento durante ciertos intervalos de tiempo para permitir una adecuada separación de los analitos.

1.7.3 Detectores utilizados para el análisis de compuestos volátiles

Actualmente, el detector de ionización de llama (FID) y el espectrómetro de masas (MS) son los detectores más comúnmente utilizados para evaluar un amplio espectro de metabolitos con actividad aromática presentes en cerveza^{19,49,50,54,58-60}. FID es un detector universal que un amplio rango lineal (10^6 - 10^7), característica que le permite ser una excelente alternativa para la detección y cuantificación de una amplia diversidad de compuestos volátiles, mientras que MS permite la identificación de los compuestos volátiles a través del uso de la base de datos *National Institute of Standards and Technology* (NIST) también permite su respectiva cuantificación. Por otro lado, el detector de captura de electrones (ECD) es el más utilizado para la detección y cuantificación de dicetonas vecinales, específicamente, 2,3-butanodiona y 2,3-pentanodiona^{58,60}.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

En base a los antecedentes planteados y discutidos en la sección previa, se formularon las siguientes hipótesis:

2.1 Hipótesis

2.1.1 Levaduras salvajes de la región del Bío-Bío poseen características fenotípicas favorables para el desarrollo de cervezas innovadoras con un perfil aromático distintivo.

2.1.2 Distintos procedimientos de estabilización del genoma conducen a una variabilidad fenotípica y generan una diversidad adicional posterior al proceso inicial de hibridación.

2.2 Objetivo general

Seleccionar levaduras salvajes desde la región del Bío-Bío con características deseables y propiedades de bioflavoring agradables para la producción industrial de cervezas con un perfil aromático novedoso

2.3 Objetivos específicos

2.3.1 Recolectar, aislar, purificar e identificar genotípicamente levaduras salvajes desde diversas fuentes naturales de la región del Bío-Bío y sus alrededores

2.3.2 Caracterizar fenotípicamente y seleccionar las levaduras salvajes mediante la evaluación de su desempeño fermentativo en condiciones simuladas de la industria cervecera a escala de laboratorio

2.3.3 Generar híbridos interespecíficos mediante la cruce de levaduras chilenas salvajes con levaduras domesticadas

2.3.4 Evaluar la influencia de diferentes parámetros sobre la trayectoria de estabilización del genoma y la formación de distintos fenotipos, y evaluar su aplicación industrial a escala de laboratorio.

3. ESTRATEGIA ANALÍTICA

3.1 Obtención de levaduras salvajes desde diversas fuentes naturales

La recolección de las muestras se realizó en terreno desde diversas fuentes naturales tales como frutos de arándano, uva, arrayán, maqui, cereza, guinda y el hongo macroscópico conocido comúnmente como digüeñe en bolsas estériles y transportadas en frío hasta el laboratorio. Para la aislación, se sembraron en placas diluciones seriadas y posteriormente las colonias fueron seleccionadas de acuerdo a su morfología y sembradas nuevamente durante dos rondas en placas para asegurar su purificación. Las levaduras purificadas fueron almacenadas a -80°C permitiendo la formación del criobanco de trabajo para el desarrollo inicial de esta tesis. Posteriormente, mediante el análisis de su genoma, las levaduras salvajes se identificaron y clasificaron de acuerdo a su género y especie. La metodología y los resultados obtenidos se presentan en el capítulo 2, sección 1.

3.2 Caracterización fenotípica del desempeño fermentativo de levaduras salvajes

Las levaduras salvajes fueron propagadas e inoculadas en condiciones similares a la industria a escala de laboratorio para evaluar distintos parámetros relacionados con su desempeño fermentativo. Se analizó la cinética de fermentación mediante el monitoreo de la pérdida de masa; la síntesis de compuestos volátiles mediante HS-GC-FID; la producción de alcohol a través de un método de absorción NIR; la producción de glicerol y consumo de glucosa mediante un análisis fotométrico enzimático; la determinación del pH mediante un análisis fotométrico colorimétrico. Los análisis realizados, las metodologías utilizadas y los resultados obtenidos se presentan en el capítulo 2, sección 1.

3.3 Generación de híbridos interespecíficos

Se generaron híbridos interespecíficos mediante la cruce de una levadura salvaje (obtenida en este trabajo) con una levadura domesticada para la obtención de una descendencia con características fenotípicas mejoradas. La cruce fue realizada entre esporas de *S. eubayanus* y *S. cerevisiae* mediante la técnica *spore-to-spore mating*. La confirmación de la generación de híbridos de distintas especies se realizó mediante el análisis de regiones específicas del ADN presente en cada especie. La metodología utilizada y los resultados obtenidos se presentan en el capítulo 2, sección 2.

3.4 Estabilización del genoma en distintas condiciones y su relación con las características fenotípicas

Cuatro líneas paralelas de cada híbrido interespecíficos fueron expuestas a tres condiciones distintas durante etapas tempranas de la estabilización de su genoma (20-25 generaciones). Luego, se realizó un análisis exploratorio de su capacidad de transformar ácido ferúlico como un indicador de la producción de 4-vinil guaiacol. Los mejores candidatos fueron seleccionados y se evaluó su desempeño fermentativo en condiciones industriales a escala de laboratorio. Se analizaron los parámetros de cinética de fermentación mediante el monitoreo de la pérdida de masa; la síntesis de compuestos volátiles mediante HS-GC-FID; la producción de alcohol a través de un método de absorción NIR; y la concentración de azúcares residuales en el mosto mediante cromatografía de intercambio iónico. Finalmente, se evaluó la relación entre las condiciones de estabilización del genoma y los parámetros fenotípicos analizados al término de la fermentación. Los análisis realizados, la metodología utilizada y los resultados obtenidos se presentan en el capítulo 2, sección 2.

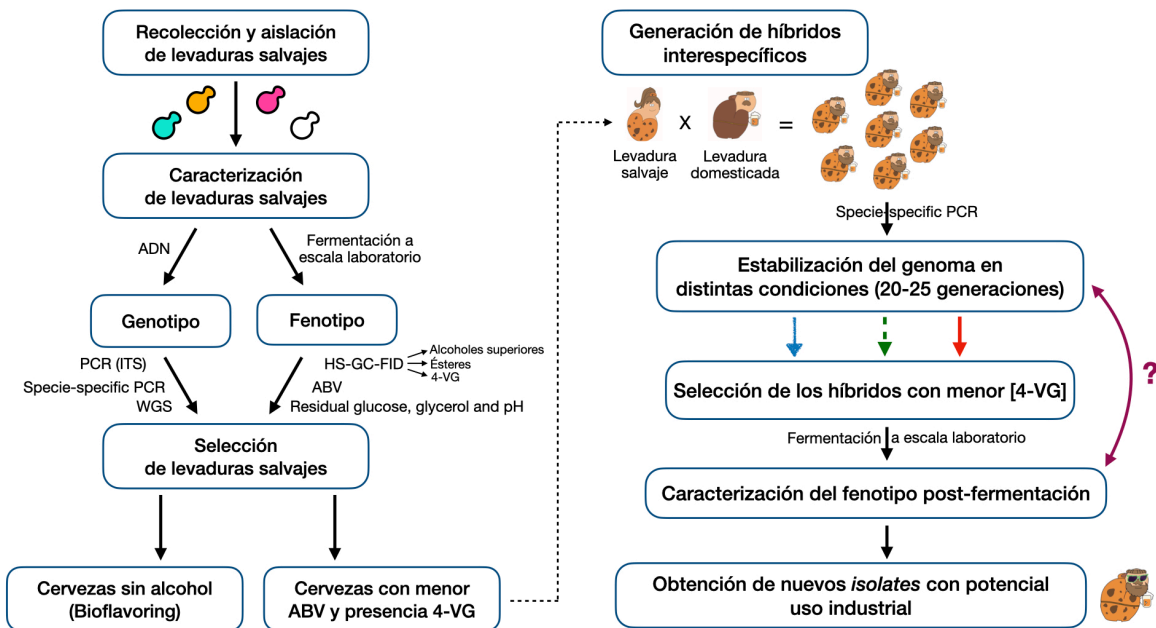


Figura 8 Estrategia analítica propuesta para cumplir con los objetivos planteados.

4. REFERENCIAS

1. Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T. & Vicente, A. A. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 98 1937–1949 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5470-0> (2014).
2. Michel, R. H., McGovern, P. E. & Badler, V. R. Chemical evidence for ancient beer. *Nature* **360**, 24–24 (1992).
3. Procopio, S., Sprung, P. & Becker, T. Effect of amino acid supply on the transcription of flavour-related genes and aroma compound production during lager yeast fermentation. *LWT* **63**, 289–297 (2015).
4. Procopio, S., Brunner, M. & Becker, T. Differential transcribed yeast genes involved in flavour formation and its associated amino acid metabolism during brewery fermentation. *European Food Research and Technology* **239**, 421–439 (2014).
5. Steensels, J. & Verstrepen, K. J. Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology* vol. 68 61–80 Preprint at <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025> (2014).
6. Colen, L. & Swinnen, J. Economic Growth, Globalisation and Beer Consumption. *J Agric Econ* **67**, 186–207 (2016).
7. Gibson, B. & Liti, G. *Saccharomyces pastorianus*: Genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast* **32**, 17–27 (2015).
8. Hornsey, I. S. *A History of Beer and Brewing*. (The Royal Society of Chemistry, 2003). doi:10.1039/9781847550026.
9. Libkind, D. *et al.* Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**, 14539–14544 (2011).
10. Liti, G. *et al.* Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* **458**, 337–341 (2009).

11. Sicard, D. & Legras, J. L. Bread, beer and wine: Yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Comptes Rendus - Biologies* vol. 334 229–236 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.crvi.2010.12.016> (2011).
12. Gallone, B. *et al.* Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell* **166**, 1397-1410.e16 (2016).
13. Dunn, B. & Sherlock, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res* **18**, 1610–1623 (2008).
14. Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H. & Delvaux, F. R. Yeast flocculation: What brewers should know. *Applied Microbiology and Biotechnology* vol. 61 197–205 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00253-002-1200-8> (2003).
15. Esslinger, H. Michael. *Handbook of Brewing : Processes, Technology, Markets*. (Wiley-VCH, 2009).
16. Walther, A., Hesselbart, A. & Wendland, J. Genome sequence of *saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. *G3: Genes, Genomes, Genetics* **4**, 783–793 (2014).
17. Gallone, B. *et al.* Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. *Current Opinion in Biotechnology* vol. 49 148–155 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005> (2018).
18. Gibson, B. R., Storgårds, E., Krogerus, K. & Vidgren, V. Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Frohberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast* **30**, 255–266 (2013).
19. Mertens, S. *et al.* A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Appl Environ Microbiol* **81**, 8202–8214 (2015).
20. Nakao, Y. *et al.* Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research* **16**, 115–129 (2009).
21. Peris, D. *et al.* Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Mol Ecol* **23**, 2031–2045 (2014).

22. Bing, J., Han, P. J., Liu, W. Q., Wang, Q. M. & Bai, F. Y. Evidence for a far east asian origin of lager beer yeast. *Current Biology* vol. 24 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.031> (2014).
23. Wedral, D., Shewfelt, R. & Frank, J. The challenge of Brettanomyces in wine. *LWT* vol. 43 1474–1479 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010> (2010).
24. Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B. & Verstrepen, K. J. Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS Microbiology Reviews* vol. 41 S95–S128 Preprint at <https://doi.org/10.1093/femsre/fux031> (2017).
25. Lentz, M. The impact of simple phenolic compounds on beer aroma and flavor. *Fermentation* vol. 4 Preprint at <https://doi.org/10.3390/fermentation4010020> (2018).
26. Steensels, J. *et al.* Brettanomyces yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology* vol. 206 24–38 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005> (2015).
27. Michel, M. *et al.* Screening for new brewing yeasts in the non-Saccharomyces sector with *Torulasporea delbrueckii* as model. *Yeast* **33**, 129–144 (2016).
28. Michel, M. *et al.* Review: Pure non-Saccharomyces starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *Journal of the Institute of Brewing* vol. 122 569–587 Preprint at <https://doi.org/10.1002/jib.381> (2016).
29. Kyoung, E. *et al.* Identification of Phenylethyl Alcohol and Other Volatile Flavor Compounds from Yeasts, *Pichia Farinosa SKM-1*, *Pichia Anomala SKM-T*, and *Galactomyces Geotrichum SJM-59*. *J. Microbiol. Biotechnol* vol. 13 (2003).
30. Walker, G. M. *Pichia anomala*: Cell physiology and biotechnology relative to other yeasts. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **99**, 25–34 (2011).
31. Sundh, I. & Melin, P. Safety and regulation of yeasts used for biocontrol or biopreservation in the food or feed chain. *Antonie van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology* **99**, 113–119 (2011).

32. Bokulich, N. A. & Bamforth, C. W. The Microbiology of Malting and Brewing. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **77**, 157–172 (2013).
33. Basso, R. F., Alcarde, A. R. & Portugal, C. B. Could non-Saccharomyces yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Research International* vol. 86 112–120 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002> (2016).
34. Erten, H. & Campbell, I. The Production of Low-Alcohol Wines by Aerobic Yeasts. *Journal of the Institute of Brewing* **59**, 207–215 (1953).
35. Verstrepen, K. J. *et al.* *Flavor-Active Esters: Adding Fruitness to Beer*. vol. 96 (2003).
36. Meilgaard, M. C. Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. *J Agric Food Chem* **30**, 1009–1017 (1982).
37. Procopio, S., Qian, F. & Becker, T. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *European Food Research and Technology* vol. 233 721–729 Preprint at <https://doi.org/10.1007/s00217-011-1567-9> (2011).
38. Dickinson, J. R. & Norte, V. A study of branched-chain amino acid aminotransferase and isolation of mutations affecting the catabolism of branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **326**, 29–32 (1993).
39. Saerens, S. M. G. *et al.* The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *Journal of Biological Chemistry* **281**, 4446–4456 (2006).
40. Saerens, S. M. G. *et al.* Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Environ Microbiol* **74**, 454–461 (2008).
41. Krogerus, K. & Gibson, B. R. 125th anniversary review: Diacetyl and its control during brewery fermentation. *Journal of the Institute of Brewing* **119**, 86–97 (2013).

42. Hansen, J., Bruun, S. V., Bech, L. M. & Gjermansen, C. The level of MXR1 gene expression in brewing yeast during beer fermentation is a major determinant for the concentration of dimethyl sulfide in beer. *FEMS Yeast Res* **2**, 137–149 (2002).
43. Oka, K., Hayashi, T., Matsumoto, N. & Yanase, H. Decrease in hydrogen sulfide content during the final stage of beer fermentation due to involvement of yeast and not carbon dioxide gas purging. *J Biosci Bioeng* **106**, 253–257 (2008).
44. Piazzon, A., Forte, M. & Nardini, M. Characterization of phenolics content and antioxidant activity of different beer types. *J Agric Food Chem* **58**, 10677–10683 (2010).
45. Quifer-Rada, P. *et al.* A comprehensive characterisation of beer polyphenols by high resolution mass spectrometry (LC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS). *Food Chem* **169**, 336–343 (2015).
46. Gonçalves, M. *et al.* Distinct Domestication Trajectories in Top-Fermenting Beer Yeasts and Wine Yeasts. *Current Biology* **26**, 2750–2761 (2016).
47. Peris, D. *et al.* Complex Ancestries of Lager-Brewing Hybrids Were Shaped by Standing Variation in the Wild Yeast *Saccharomyces eubayanus*. *PLoS Genet* **12**, (2016).
48. Steensels, J., Meersman, E., Snoek, T., Saels, V. & Verstrepen, K. J. Large-scale selection and breeding to generate industrial yeasts with superior aroma production. *Appl Environ Microbiol* **80**, 6965–6975 (2014).
49. Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V. & Gibson, B. New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *J Ind Microbiol Biotechnol* **42**, 769–778 (2015).
50. Barros Lopes, M., Bellon, J. R., Shirley, N. J. & Ganter, P. F. Evidence for multiple interspecific hybridization in *Saccharomyces sensu stricto* species. *FEMS Yeast Res* **1**, 323–331 (2002).
51. Fisher, K. J. & Lang, G. I. Experimental evolution in fungi: An untapped resource. *Fungal Genetics and Biology* vol. 94 88–94 Preprint at <https://doi.org/10.1016/j.fgb.2016.06.007> (2016).

52. Chambers, P. J., Bellon, J. R., Schmidt, S. A., Varela, C. & Pretorius, I. S. Non-genetic engineering approaches for isolating and generating novel yeasts for industrial applications. in *Yeast Biotechnology: Diversity and Applications* 433–457 (Springer Netherlands, 2009). doi:10.1007/978-1-4020-8292-4_20.
53. Kleinová, J. & Klejdus, B. *Determination of Volatiles in Beer Using Solid-Phase Microextraction in Combination with Gas Chromatography/Mass Spectrometry. Czech J. Food Sci* vol. 32 (2014).
54. Rossi, S., Sileoni, V., Perretti, G. & Marconi, O. Characterization of the volatile profiles of beer using headspace solid-phase microextraction and gas chromatography-mass spectrometry. *J Sci Food Agric* **94**, 919–928 (2014).
55. Procopio, S., Krause, D., Hofmann, T. & Becker, T. Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression. *LWT* **51**, 423–432 (2013).
56. Ma, C., He, Y., Cao, Y., Bai, X. & Li, H. Analysis of flavour compounds in beer with extruded sorghum as an adjunct using headspace solid-phase micro-extraction and gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of the Institute of Brewing* **122**, 251–260 (2016).
57. Da Silva, G. C. *et al.* Method development by GC-ECD and HS-SPME-GC-MS for beer volatile analysis. *Food Chem* **167**, 71–77 (2015).
58. Chen, S. *et al.* Breeding of New *Saccharomyces cerevisiae* Hybrids with Reduced Higher Alcohol Production for Light-Aroma-Type-Xiaoqu Baijiu Production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **81**, 233–241 (2023).
59. Kucharczyk, K., Zyla, K. & Tuszynski, T. Volatile esters and fusel alcohol concentrations in beer optimized by modulation of main fermentation parameters in an industrial plant. *Processes* **8**, (2020).

CAPÍTULO II: Resultados y Discusión

CAPÍTULO II SECCIÓN 1

Title: Characterization of wild yeasts isolated from Chile and their potential applications in the brewing industry

Pablo Murath ^{1,2}, Stephanie Hoffmann ², Beatriz Herrera-Malaver ^{3,4,5},
Brigida Gallone ^{3,4,5}, Jan Steensels ^{3,4,5,*}, Kevin Verstrepen ^{3,4,5,*}.

¹ Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, 4070386 Concepción, Chile

² Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Víctor Lamas 1290, 4070386 Concepción, Chile

³ Leuven Institute for Beer Research, Katholieke Universiteit Leuven, Bio-Incubator, Gaston Geenslaan 1, 3001 Leuven (Heverlee), Belgium

⁴ Laboratory for Systems Biology, VIB Centre for Microbiology, Bio-Incubator, Gaston Geenslaan 1, 3001 Leuven (Heverlee), Belgium

⁵ Laboratory for Genetics and Genomics, Centre of Microbial and Plant Genetics (CMPG), Katholieke Universiteit Leuven, Oude Markt 13, 3000 Leuven, Belgium

* Correspondence:

Kevin Verstrepen: kevin.verstrepen@kuleuven.be

Jan Steensels: jan.steensels@kuleuven.be

Abstract:

The demand for beers with lower alcohol content and distinctive flavor profiles has steadily risen in recent years. In this context, the use of non-conventional yeasts has emerged as a promising alternative to traditional dealcoholization methods. Research on various yeast genera, including *Brettanomyces*, *Pichia*, *Torulaspora*, *Wickeromyces*, and *Saccharomyces*, has shown that these yeasts—both in mono- and co-cultures with *Saccharomyces cerevisiae*—can enhance the complexity of beer flavor profiles. In the present study, 14 wild Chilean yeasts were isolated and identified as *Aureobasidium*, *Teunomyces*, *Candida*, *Metschnikowia*, and *Saccharomyces* spp. Fermentation speed and metabolite production during beer fermentation conditions was subsequently evaluated, with several strains showing promising results. Specifically, our findings indicate that wild *Saccharomyces*, *Metschnikowia* and *Teunomyces* strains hold potential for developing innovative beers with reduced alcohol content and unique flavor characteristics.

Keywords: wild yeasts, fermentation, flavor profile, low alcohol beers, brewing

1. Introduction

Yeasts play a pivotal role in various industrial fermentation processes, including brewing, baking, cheesemaking, winemaking, cider production and bioethanol manufacturing. Among these, species of the genus *Saccharomyces* are the most commonly used in industry, due to their long history of adaptation to man-made environments, referred to as “domestication”. For example, domestication of *Saccharomyces* brewing yeast began centuries ago, long before microorganisms were formally recognized, making these strains better adapted to wort fermentations¹⁻³. For example, these yeasts can efficiently convert maltose and maltotriose, the predominant sugars in beer wort but rarely encountered in nature, into ethanol, whereas most non-domesticated strains are unable to do so⁴. Similarly, wine yeasts have evolved in a way that allows them to withstand the predominant sterilization agents in the winery (sulfite) and vineyard (copper sulphate, the ‘Bordeaux mixture’)⁵.

The industrial brewing process primarily relies on only two *Saccharomyces* species: *S. cerevisiae* for ale production and *S. pastorianus* for lager fermentation. These yeasts species generally show good fermentation performance, high ethanol tolerance, do not produce significant concentrations of toxic by-products, and are able to synthesize pleasant flavor compounds⁶. However, the focus on just two species has greatly limited the flavor diversity in beer yeast. Moreover, these species, although well-suited for traditional ale and lager production, are not optimal for every beer style, especially more specialized ones such as sour beers or non- and low-alcoholic beers (nablabs). In response to this limitation, the brewing industry has increasingly turned to innovative strategies to identify or develop new yeasts that show improved fermentation properties, or generate beers with new flavor profiles. These strategies include the development of novel intra-⁷ and interspecific hybrids⁸⁻¹⁰, the use of mixed-cultured fermentations^{11,12}, and the exploration of non-conventional yeasts (NCY)^{6,13-18}.

In recent years, many NCYs have been tested for beer production, mostly to obtain new flavor profiles. For example, *Brettanomyces bruxellensis*, a yeast commonly found in spontaneously fermented beers, is known for its contribution to the synthesis of key aroma compounds, such as ethyl phenols (4-ethylphenol and 4-ethylguaiacol), which impart barnyard, medicinal, spicy and smoky notes^{18–21}. Other non-conventional yeasts, such as *Torulaspota delbrueckii*, have been explored for their ability to produce higher alcohols and esters while only producing moderate ethanol concentrations, offering new opportunities for fruity nablabs^{13,14}. Similarly, certain strains of *Lachancea thermotolerans* have shown promise as alternatives for the production of sour beers, where lactic acid production is desired^{22,23}. In addition, a variety of other non-conventional yeasts, including *Wickerhamomyces anomalus*, *Pichia anomala*, *Saccharomyces ludwigii*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Hanseniaspora uvarum*, *Zygotulaspota florentina*, *Zygosaccharomyces rouxii* strains^{6,12,14–16,24–26} have also been studied, yielding interesting findings for their potential use in beer production. Furthermore, even within the *Saccharomyces* species, there has been a significant interest in species that are currently not used yet in brewing. Most notably, the recently discovered *S. eubayanus*²⁷ received significant interest in its fermentation behavior under brewing conditions²⁸. Moreover, as it is one of the parental species of the hybrid *S. pastorianus* lager yeast, availability of this species opened new possibilities for generating novel interspecific hybrids, particularly for the production of lager-style beers with flavor profiles deviating from that of traditional lager yeasts^{10,29}.

Given the growing interest in NCYs, this study aims to isolate and identify wild yeast species from natural sources and evaluate their potential for use in the brewing industry. We collected samples from a variety of fruits and parasitic fungi on *Nothofagus* trees (*Cyttaria* spp.) in three biodiversity-rich regions of Chile: Nonguén Natinoal Park, Itata Valley and the Andean foothills. The yeasts isolated from these samples were genotyped and classified into the genera *Aureobasidium*, *Teunomyces*, *Candida*, *Metschnikowia* and *Saccharomyces*. These isolates were then subjected to wort fermentations, and their fermentation and flavor profiles was assessed. For many of these species (e.g. *Teunomyces cretensis*, *Candida boleticola*), this is the first time they are being evaluated for beer applications.

2. Materials and Methods

2.1 Sample collection and yeasts isolation

Samples were taken in triplicate from each of the different fruits (*Aristotelia chilensis*, *Vaccinium myrtillus*, *Prunus avium*, *Prunus cerasus*, *Luma apiculata*, *Vitis vinifera Muscat of Alexandria* and *Vitis vinifera Gewürztraminer*) and parasitic fungi of Nothofagus trees (*Cyttaria spp.*), resulting in a total of 24 samples. These samples were collected from Nonguén National Park (36°47'S - 73°04'W), Itata Valley (36°38'S-72°45'W) and Andean foothills in the central-southern zone of Chile (36°42'S - 71°55'W) due their abundant diversity of natural resources. Samples were transported to the laboratory into sterile Stomacher bags in a cool box containing ice pads. Each sample was transferred into Duran glass bottle containing sterile peptone water and shaken vigorously during 5 minutes. Next the solution was diluted (10^{-2} to 10^{-6}) and each dilution was plated on YEPD agar medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose and 2% agar w/v) with Penicillin-Streptomycin (1X, ThermoFisher) to inhibit bacterial growth, and incubated at 28°C for 2 days. Representatives of each colony morphology (4-6 of each) were isolated from plates and purified through two consecutive rounds of restreaking onto fresh agar plates. The isolates were maintained in a cryobank at -80°C in YP 20% glycerol.

2.2 gDNA extraction and yeast identification

Single colonies were inoculated into YEPD liquid medium (1% yeast extract, 2% peptone, 2% glucose w/v) and grown overnight. Then, 10µL of the cultures were inoculated into 30µL of NaOH 0.02M and heated at 100°C for 10 min. Samples were centrifuged at 3000 rpm for 3 min, and 1µL of the supernatant was used as template DNA. To verify the identity of the isolates and obtain the reference DNA sequence information required for further analyses, ITS1 and ITS2 regions, including 5.8S rDNA region, was amplified using the primers ITS5³⁰ and ITS4³¹. The polymerase chain reaction (PCR) conditions were as follows: 1 min at 95°C, 35 cycles of 20 s at 95°C, 30 s at 59°C, and 35 s of 72°C, followed

by a final cycle of 5 min at 72°C and subsequent cooling to room temperature (RT). A BLAST (Basic Alignment Search Tool) analysis was performed for the sequences obtained. The identification of each isolate was performed based on the closest relative sequence found in the database (GenBank). Further, *Saccharomyces* strains were subjected to the DNA extraction, whole genome sequencing and *de novo* assembly protocol previously described by Gallone and co-authors⁴.

2.3 Laboratory-scale lager fermentations

The fermentation protocol was designed to resemble traditional lager fermentations. First, yeast strains were propagated by inoculation into 5 mL YPD2% medium at room temperature and 300 rpm. After 16 h of incubation, 1 mL of the culture was transferred to 50 mL 4% yeast extract peptone-maltose (YPM; 2% [wt·vol⁻¹] Bacto peptone, 1% [wt·vol⁻¹] yeast extract, and 4% [wt·vol⁻¹] maltose) in a 250 mL Erlenmeyer flask and incubated at 20°C and 200 rpm for 3 overnights. Cell concentration of the pre-growths was measured (BioRad, TC20 automated cell counter), and used to inoculate 150 mL of an 12°P wort (17% [wt·vol⁻¹] Light spray malt extract (Brewferm)), supplemented with 0.005 mg·L⁻¹ Zn²⁺ (autoclaved for 10 minutes at 110°C) to a starting concentration of 1.0 X 10⁷ cells·mL⁻¹. The bottles were equipped with a water lock and stirring bar after which they were incubated at 16°C, agitated at 150 rpm. After 7 days, the fermentations were stopped and samples for gas chromatographic analysis, alcohol by volume (ABV), pH, residual glucose and glycerol measurements were taken. The weight loss of the samples was measured daily. Samples for ABV analysis were analyzed by AlcoLyzer beer ME (Anton Paar GmbH), following supplier recommendations. Samples for pH, residual glucose and glycerol analysis were analyzed by Gallery Plus Beermaster (Thermo Scientific), following supplier recommendations.

2.4 Esters, higher alcohols and 4-VG analysis

Headspace gas chromatography coupled with flame ionization detection (HS-GC-FID) was used for the quantification of yeast aroma production (Agilent Technologies), which was calibrated for the quantification of 9 important aroma compounds, including esters (ethyl octanoate, isoamyl acetate, 2-phenylethyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl acetate),

higher alcohols (isoamyl alcohol, 2-phenylethanol, isobutanol), and 4-vinyl guaiacol. The GC was equipped with a headspace autosampler (PAL system; CTC Analytics,) and contained a DB-WAXetr column (length, 30 m; internal diameter, 0.25 mm; layer thickness, 0.5 μm [Agilent Technologies]), and N_2 was used as the carrier gas. Samples were heated for 25 min at 70°C in the autosampler. The injector block and FID temperatures were both kept constant at 250°C. 5 mL of sample was collected in 15 mL glass tubes containing 1.75 g of sodium chloride each. These tubes were immediately closed and cooled to minimize evaporation of volatile compounds. The oven temperature was held at 50°C for 5 min, after which it was increased to 80°C at 4°C min^{-1} . Next, the temperature was increased to 200°C at 5°C min^{-1} and held at 200°C for 3 min. Results were analyzed with Agilent Chemstation software (Agilent) ^{4,7}.

2.6 Data analysis and data visualization

All the results were expressed as arithmetic means and standard deviation. Statistical analyses between the compounds of interest synthesized by the wild yeasts and reference strains were assessed by one-way analysis of variance (ANOVA) in combination with Tukey's multiple comparison test ($\alpha = 0.05$) using GraphPad Prism version 10.0 (GraphPad Software). Heatmap analysis and visualization was processed by MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>). Principal component analysis (PCA) analysis and visualization were performed in R using the FactoMineR package version 2.11, the factoextra package version 1.0.7 and ggplot2 package version 3.5.1.

3. Results

3.1 Isolation and identification of wild yeasts

Wild yeasts were isolated from three biodiverse in Chile: Nonguén National Park, the Itata Valley and the Andean foothills (Figure 9A)³². Samples included two fruits from Nonguén National Park (*Luma apiculata* and *Aristotelia chilensis*), five fruits from the Itata Valley

(*Vaccinium myrtillus*, *Gewurztraminer*, *Muscat of Alexandria*, *Prunus avium* and *Prunus cerasus*), and a parasitic fungus (*Cyttaria* spp.) of *Nothofagus* trees in the Andean foothills. Wild yeasts were successfully isolated from all samples and were identified through the amplification of their DNA sequences from the ITS1 and ITS2 regions. Five species (*Aureobasidium subglaciale*, *Teunomyces cretensis*, *Candida boleticola*, *Metschnikowia pulcherrima* and *Saccharomyces eubayanus*) were identified (Figure 9B). Since ITS analysis is often unable to distinguish between different *Saccharomyces* strains or differentiate between pure species and their hybrids, whole-genome sequencing was performed. The results showed that the isolated *Saccharomyces* strains were *S. eubayanus* (Figure 9C), which is one of the parental strains of traditional lager yeasts (*S. pastorianus*). Interestingly, aneuploidies in the chromosomes III, IX and XV were observed in the isolate Sac_3, while this was not observed in the other two isolates.

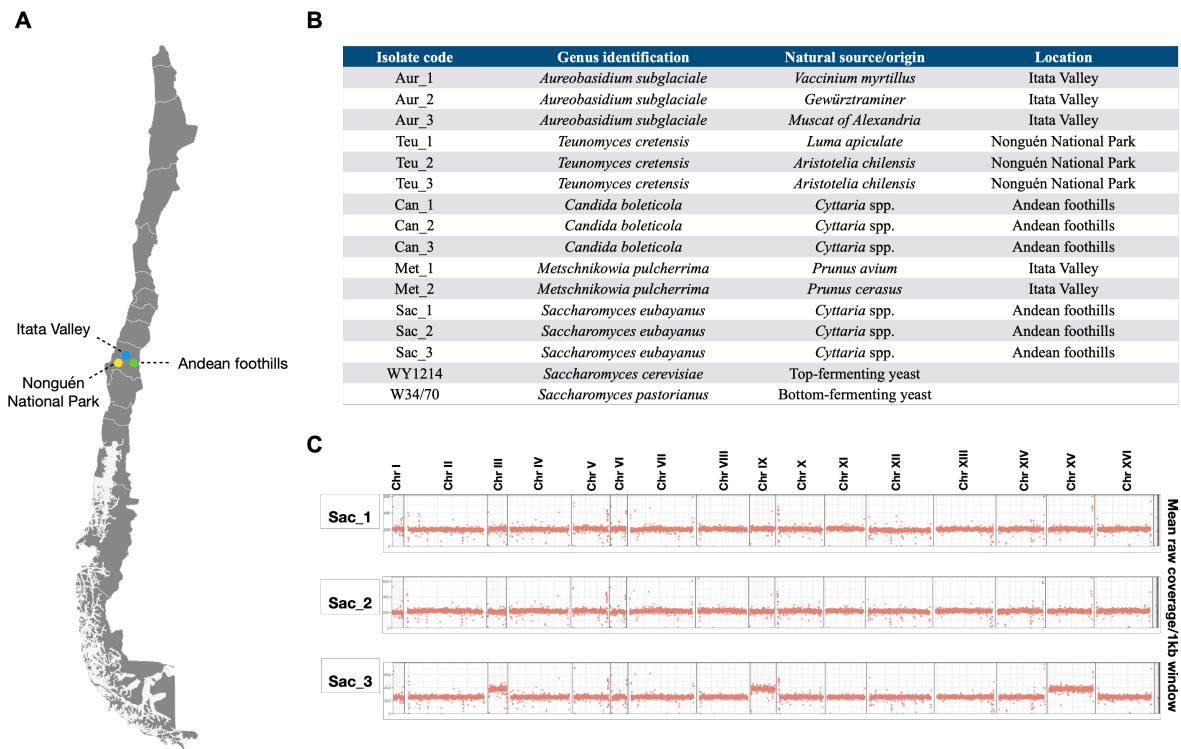


Figura 9 Geographical location and identification of wild yeasts. Wild yeasts were isolated from three natural environments in Chile, as shown on the map (A): Nonguén National Park (yellow), Itata Valley (blue) and the Andean foothills (green). The wild yeasts strains were identified by ITS analysis (B) and *Saccharomyces* strains were subjected to whole-genome sequencing (C). (C) represents a “coverage plot” of the three *S. eubayanus* strains, where the number of sequence reads in each genomic location is visualized. This visualization provides information on the ploidy level of each chromosome.

3.2 Evaluation of wild yeast in beer fermentations

Next, we investigate the production of industrially relevant phenotypic features by the wild yeasts after lab-scale fermentation (Table 1). The fermentation kinetics were monitored by daily tracking of the weight loss (% w/w) through the course of the fermentation (Figure 10A). From day 2 onward, a markedly higher weight loss was observed in the wild *Saccharomyces* isolates which reached nearly 3% w/w by the end of fermentation, compared to the non-*Saccharomyces* isolates whose total weight loss ranged between 0.1-0.6% w/w. Concurrently, ABV produced by the non-*Saccharomyces* isolates showed levels below 1% ABV while *Saccharomyces* isolates reached levels close to 4% ABV and, therefore, closer to the values obtained by the ale and lager reference strains, which were 4.63% and 4.62%, respectively (Figure 10B).

Table 1 Production of relevant parameters by wild yeasts during two independent fermentations (F1 and F2) under identical conditions. The WY1214 and W34/70 are commercial reference strains for ale and lager fermentations, respectively. Values represent the average of three technical replicates.

	Isobutanol (mg L ⁻¹)	Isoamyl alcohol (mg L ⁻¹)	2-phenylethanol (mg L ⁻¹)	Ethyl acetate (mg L ⁻¹)	Isoamyl acetate (mg L ⁻¹)	2-phenylethyl acetate (mg L ⁻¹)	Ethyl hexanoate (mg L ⁻¹)	Ethyl octanoate (mg L ⁻¹)	4-vinyl guaiacol (mg L ⁻¹)	Alcohol by volume (% v v ⁻¹)	Ph	Residual glucose (g L ⁻¹)	Glycerol (g L ⁻¹)
Aur_1_F1	5.04	1.98	1.99	0.82	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.24	4.94	6.12	0.16
Aur_1_F2	3.80	1.96	3.06	0.71	0.07	0.00	0.00	0.04	0.00	0.26	4.77	4.39	0.15
Aur_2_F1	2.90	2.21	2.12	0.82	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.08	4.85	7.85	0.19
Aur_2_F2	3.31	2.25	2.82	2.25	0.20	0.00	0.00	0.03	0.00	0.28	4.66	4.22	0.13
Aur_3_F1	4.19	2.07	2.14	0.81	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.26	4.57	5.63	0.29
Aur_3_F2	4.43	1.79	2.55	0.73	0.00	0.00	0.00	0.01	0.00	0.32	4.68	2.87	0.21
Teu_1_F1	5.62	6.21	2.25	1.29	0.23	0.00	0.00	0.01	0.00	0.62	4.27	0.03	0.42
Teu_1_F2	3.09	4.26	2.83	1.07	0.20	0.00	0.02	0.01	0.00	0.62	4.34	0.03	0.38
Teu_2_F1	6.51	7.66	2.58	1.43	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.65	4.30	0.03	0.39
Teu_2_F2	2.99	4.17	2.44	1.15	0.20	0.00	0.02	0.03	0.00	0.63	4.33	0.03	0.38
Teu_3_F1	5.94	8.87	2.86	1.81	0.23	0.00	0.00	0.00	0.00	0.64	4.25	0.03	0.39
Teu_3_F2	2.72	4.10	2.38	1.05	0.20	0.00	0.02	0.05	0.00	0.64	4.31	0.03	0.38
Can_1_F1	9.70	4.93	4.90	75.37	0.23	0.01	0.00	0.00	1.17	0.73	4.57	0.17	0.09
Can_1_F2	5.27	5.07	4.76	45.71	0.22	0.01	0.00	0.04	1.23	0.62	4.35	0.04	0.43
Can_2_F1	10.94	5.06	2.87	56.07	0.24	0.00	0.00	0.00	1.18	0.79	4.54	0.25	0.16
Can_2_F2	5.33	5.31	2.75	35.97	0.2	0.00	0.00	0.01	1.21	0.63	4.35	0.03	0.41
Can_3_F1	15.71	5.38	2.30	68.44	0.27	0.00	0.00	0.02	1.24	0.72	4.46	0.14	0.33
Can_3_F2	5.41	5.52	2.29	34.14	0.25	0.00	0.00	0.02	1.21	0.63	4.35	0.04	0.42
Met_1_F1	4.34	10.80	2.40	12.48	0.24	0.00	0.00	0.00	0.00	0.50	4.11	0.03	1.39
Met_1_F2	4.13	8.13	2.67	3.09	0.22	0.00	0.00	0.01	0.00	0.56	4.27	0.03	0.65
Met_2_F1	4.72	9.26	2.41	6.51	0.26	0.00	0.00	0.00	0.00	0.54	4.17	0.03	1.05
Met_2_F2	3.90	7.36	2.83	3.08	0.23	0.00	0.01	0.01	0.00	0.57	4.26	0.03	0.66
Sac_1_F1	15.67	43.70	19.23	4.61	0.45	0.16	0.07	0.23	0.52	3.94	3.96	0.02	2.75
Sac_1_F2	13.97	48.82	28.07	4.08	0.63	0.24	0.05	0.20	0.43	3.80	3.94	0.03	2.35
Sac_2_F1	14.11	38.68	18.88	5.70	0.38	0.15	0.08	0.23	0.65	3.90	3.97	0.02	2.89
Sac_2_F2	13.70	47.51	30.34	4.03	0.63	0.25	0.05	0.21	0.52	3.81	3.94	0.02	2.34
Sac_3_F1	17.72	41.29	19.15	6.50	0.39	0.16	0.07	0.14	0.70	3.85	3.97	0.02	3.02
Sac_3_F2	18.02	50.08	27.30	4.39	0.49	0.28	0.04	0.14	0.58	3.79	3.95	0.03	2.50
WY1214_F1	15.58	38.44	10.88	7.02	0.75	0.21	0.11	0.16	0.40	4.74	3.99	0.03	2.52
WY1214_F2	13.17	33.28	15.33	4.39	0.56	0.20	0.08	0.17	0.27	4.53	3.96	0.03	2.57
W34/70_F1	27.16	42.66	12.64	6.18	0.58	0.12	0.11	0.39	0.00	4.72	3.95	0.03	2.53
W34/70_F2	12.60	33.49	17.92	5.42	0.55	0.16	0.09	0.27	0.00	4.51	3.94	0.03	2.22
Blank_F1	0.00	1.49	1.89	0.00	0.00	0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	4.80	10.49	0.16

Blank_F2 0.97 1.38 3.09 0.69 0.20 0.00 0.00 0.04 0.00 0.00 4.74 9.91 0.13

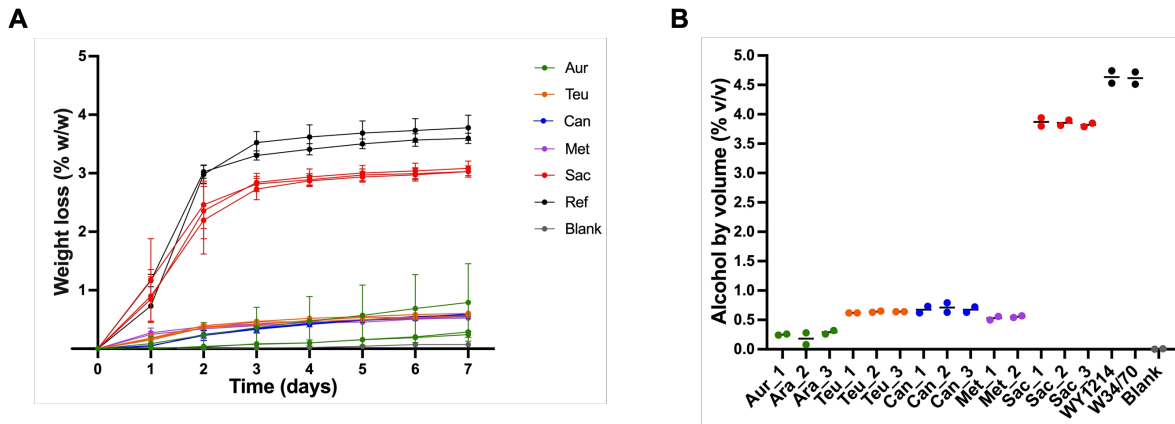


Figure 10 Fermentation kinetics and alcohol by volume. The fermentation kinetics (depicted as cumulative weight loss) (A) and the alcohol by volume produced by wild yeasts (B) corresponding to *Aureobasidium subglaciale* (green), *Teunomyces cretensis* (orange), *Candida boleticola* (blue), *Metschnikowia pulcherrima* (violet), and *Saccharomyces eubayanus* (red) were measured daily and at the end of the fermentation, respectively. *S. cerevisiae* strain WY1214 and *S. pastorianus* W34/70 (black) were used as reference strains. Blank corresponds to the wort without yeast inoculation (grey). Results represent the mean value from two independent fermentations.

In general, the overall production of higher alcohols, esters, ABV and glycerol by the wild *S. eubayanus* yeasts was higher in comparison to the overall production of each of the non-*Saccharomyces* wild yeasts genera, but was more similar to the reference strains (Figure 11A and B). However, *Candida boleticola* strains produced significant higher levels of ethyl acetate (52.62 vs 4.90 mg/L, $p < 0.0001$) and 4-VG (1.21 vs. 0.57 mg/L, $p < 0.0001$) compared to *S. eubayanus* (Fig 11C and D). *Aureobasidium* showed higher pH and residual glucose levels compared to the non-*Saccharomyces* and wild *Saccharomyces* isolates (Fig 11E and F), indicating that these strains were not growing efficiently in the wort environment. Further, when comparing the average production from the two independent fermentations of each wild isolate, results were in general very similar (Figure 11G).

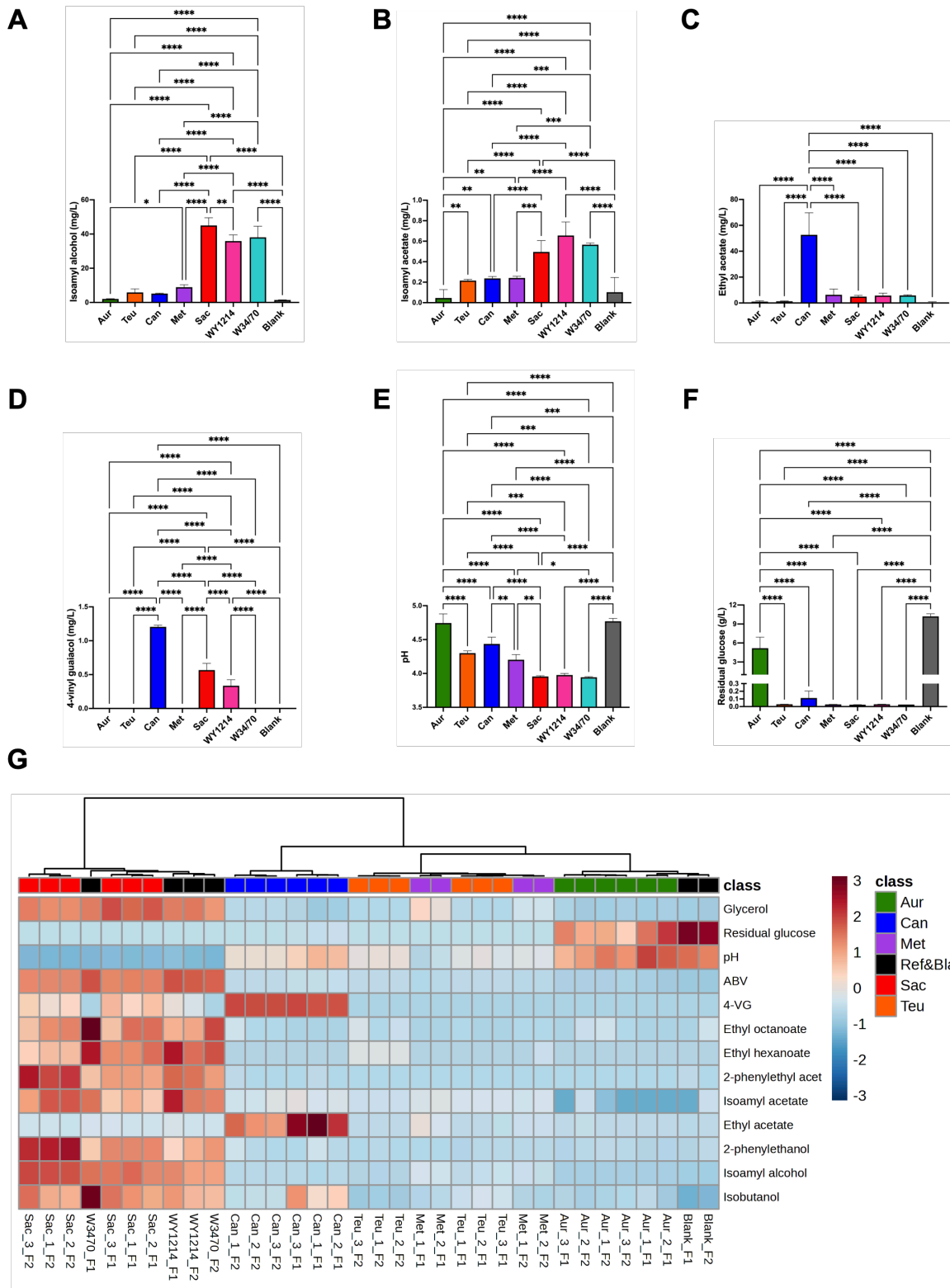


Figure 11 Measurement of fermentation parameters. The mean values obtained from the measurement of isoamyl alcohol (A), isoamyl acetate (B), ethyl acetate (C), 4-vinyl guaiacol (D), pH (E), residual glucose (F) by wild yeast strains belonging to *Aureobasidium subglaciale* (green), *Teunomyces cretensis* (orange), *Candida boleticola* (blue), *Metschnikowia pulcherrima* (violet), and *Saccharomyces eubayanus* (red) is depicted. S.

cerevisiae strain WY1214 and *S. pastorianus* W34/70 (black) were used as reference strains. “Blank” corresponds to the wort without yeast inoculation (grey). The asterisk indicates the level of significance (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). Heatmap analysis of higher alcohols, esters, 4-VG, ABV, pH, residual glucose and glycerol in wort fermented by wild yeasts corresponding to *A. subglaciale* (green), *T. cretensis* (orange), *C. boleticola* (blue), *M. pulcherrima* (violet), *S. eubayanus* (red) and reference strains and blank (black) is shown in (G). Pairwise similarities were calculated using Euclidean distance, and hierarchical clustering was performed using Ward’s method. Colors represent Z-scores (calculated over the rows).

Moreover, principal component analysis (PCA) revealed that wild yeast can be distinguished according to their metabolite production (Fig. 12). *Saccharomyces*, including wild and reference strains, showed clear differences compared to the other wild yeasts genera, mainly because of higher alcohols, esters and ABV production (Fig. 12A). Further, *C. boleticola* differed from the other wild yeasts genera due the higher ethyl acetate and 4-VG production, whilst *A. subglaciale* strains showed higher levels of residual glucose and were closest (but not identical) to the blank fermentations. *M. pulcherrima* and *T. cretensis* produced a similar profile, even when *Saccharomyces* yeasts are excluded from the PCA to increase the separation of non-*Saccharomyces* wild yeasts (Fig. 12B).

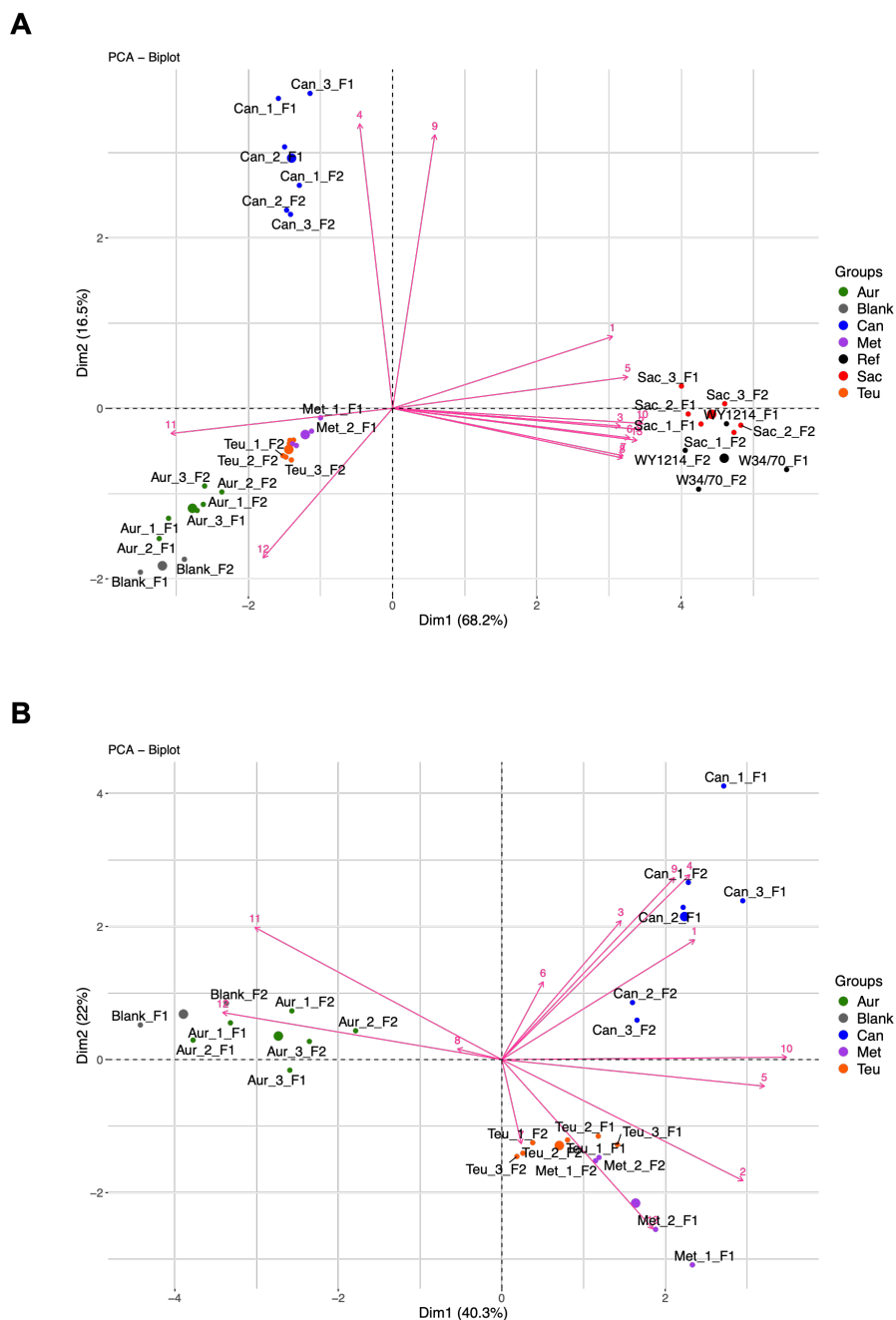


Figura 12 Two-dimensional (2-D) principal component analysis (PCA) separated by Dim1 = PC1 and Dim2= PC2. Visualization of the metabolite production of *Aureobasidium subglaciale*, *Teunomyces cretensis*, *Candida boleticola*, *Metschnikowia pulcherrima*, and *Saccharomyces eubayanus* (A) and the metabolite production of only non-*Saccharomyces* wild yeasts (B). The component scores of the 13 compounds are depicted as pink lines numbers as follows: 1, isobutanol; 2, isoamyl alcohol; 3, 2-phenylethanol; 4, ethyl acetate; 5, isoamyl acetate; 6, 2-phenylethyl acetate; 7, ethyl hexanoate; 8, ethyl octanoate; 9, 4-vinyl guaiacol; 10, alcohol by volume; 11, pH; 12, residual glucose; 13, glycerol. 2-D PCA (A) and (B) explained 84.7% and 62.3% of the total variance, respectively.

4. Discussion

The use of NCYs to enhance the flavor complexity of beers with moderate or low alcohol content is an interesting strategy to meet the increasing consumer's demands^{12,15,33}. In this study, we evaluated 14 wild yeasts isolated from different natural sources, corresponding to *Aureobasidium*, *Teunomyces*, *Candida*, *Metschnikowia* and *Saccharomyces* genera, isolated from natural environments in Nonguén National Park, Itata Valley and Andean foothills, three Chilean regions which have been reported to harbour a rich diversity of yeasts^{34,35}, yet underexplored for their applicability in the brewing industry.

Our results revealed distinct differences in the production of industrial relevant compounds among the different wild yeast strains assessed. It is perhaps not surprising that the wild *Saccharomyces* strains, which were identified as *S. eubayanus*, showed the higher similarity - among all the wild yeast strains - in the production of ethanol, higher alcohols (isoamyl alcohol, 2-phenylethanol), esters (isoamyl acetate, 2-phenylethyl acetate, ethyl hexanoate, ethyl octanoate) and glycerol compared to the reference beer strains. Nevertheless, the *S. eubayanus* strains produced higher levels of 4-VG, but lower levels of ethanol. The lower ethanol production is primarily attributed to the inability of *S. eubayanus* to ferment maltotriose^{28,36}, while high 4-VG production is due to the presence of active *PADI* and *FDC1* genes³⁶. As these characteristics are desired in some beer styles, several papers have described the use of this species (either as a pure species, but mostly as a parental strain in interspecific hybrids) to develop new, aromatic beers^{10,28,29}. Therefore, the strains isolated in this study further enrich the pool of available *S. eubayanus*, including a variant with unusual aneuploidies in chromosomes III, IX and XV (Sac_3).

To the best of our knowledge, there is no available research on *C. boleticola* performance in beer wort. This species is not commonly isolated, but has occasionally been found on beetles³⁷. Our results showed that the assessed strains exceed the levels 4-VG and ethyl acetate by 2.1 and 10.5 folds, respectively, in comparison with the wild *S. eubayanus* strains, despite having an almost 5.6-fold lower ABV production (0.69 ± 0.03 ABV). The levels of these flavor-active compounds surpassed both threshold values for ethyl acetate (30 mg/L)³⁸ and

4-VG (0.3 mg/L)³⁹ in pilsner beer, which could lead to undesirable solvent-like and clove-like aroma at the end of fermentation. However, a higher concentration of these compounds could still be desired in more complex beer styles (such as low-alcohol hefeweizen or IPA). Additionally, this high inherent capacity of *C. boleticola* to produce ethyl acetate might make it a potential candidate for the industrial production of this compound⁴⁰.

Research on *Metschnikowia* has primarily focused on its applications in the wine industry. Specifically, strains of *M. pulcherrima* have been shown to increase the total concentration of esters, promote the production of wines with lower ethanol content, and, due to its β -lyase activity, transform bonded terpenes into their free forms, thereby enhancing the aromatic profile when wines are sequentially fermented with *S. cerevisiae*. These characteristics may also have beneficial effects in brewing; however, there is limited information regarding its potential use in this area. Drosou et al.²⁶ explored the use of a commercial *M. pulcherrima* strain capable of metabolize maltose, both in monoculture and in mixed cultures with *S. cerevisiae*, for beer production. Their findings showed a satisfactory increase in fruity flavor complexity. These approaches highlight the potential of *M. pulcherrima* for producing beers with unique characteristics. In contrast, there is no available literature on the fermentation performance of *T. cretensis* under brewing-like conditions. Species of *Teunomyces* are mostly found associated with insects (Kurtzman et al. 2016), however, they have also been isolated from fermented food⁴². Since both the *Metschnikowia* and *Teunomyces* strains exhibit similar profiles of key flavor metabolites, investigating co-fermentation of *M. pulcherrima* or *T. cretensis* with *S. eubayanus* (or commercial beer yeast) would be valuable.

In conclusion, after the analysis of brewing-industrially relevant compounds produced by 14 strains of 5 different wild yeast species during laboratory-scale fermentation, we found several strains that could be interesting for further exploration in beer production. The *Saccharomyces* strains – identified as *S. eubayanus* – could be suitable to produce beer with a lower alcohol by volume concentration compared to average beers. And although complete consumption of all the wort sugars is desired in most cases, the presence of some residual sugars can benefit properties such as body, mouthfeel and maltiness. In combination with of

the high concentration of 4-VG produced by *S. eubayanus*, these strains could be suitable for styles such as Belgian white and German weizen beers³⁹). *M. pulcherrima*, *T. cretensis* and *C. boleticola* produced lower ethanol concentrations (between 0.50 - 0.79 ABV), and could therefore be further explored for nablabs, or in co-culture with *Saccharomyces* yeasts. However, further studies using different beer recipes, as well as experiments at pilot and industrial scale are needed to evaluate additional brewing parameters, such as fermentation performance at different temperatures, inoculation rates, hop-tolerance and flavor profile in mixed-cultures. These studies will be essential to fully understand the potential of these wild yeasts in the production of novel and distinct beers.

Acknowledgments: The authors thank Dr. Mario Aranda and Dr. Pedro Aqueveque for their help on technical issues to isolate the *Saccharomyces eubayanus* strains used in this work. The authors also thank Dr. Luis Bustamante for his help and suggestions.

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- (1) Gonçalves, M.; Pontes, A.; Almeida, P.; Barbosa, R.; Serra, M.; Libkind, D.; Hutzler, M.; Gonçalves, P.; Sampaio, J. P. Distinct Domestication Trajectories in Top-Fermenting Beer Yeasts and Wine Yeasts. *Current Biology* **2016**, *26* (20), 2750–2761. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2016.08.040>.
- (2) Gallone, B.; Mertens, S.; Gordon, J. L.; Maere, S.; Verstrepen, K. J.; Steensels, J. Origins, Evolution, Domestication and Diversity of Saccharomyces Beer Yeasts. *Current Opinion in Biotechnology*. Elsevier Ltd February 1, 2018, pp 148–155. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005>.
- (3) Sicard, D.; Legras, J. L. Bread, Beer and Wine: Yeast Domestication in the Saccharomyces Sensu Stricto Complex. *Comptes Rendus - Biologies*. Elsevier Masson SAS 2011, pp 229–236. <https://doi.org/10.1016/j.crv.2010.12.016>.
- (4) Gallone, B.; Steensels, J.; Pahl, T.; Soriaga, L.; Saels, V.; Herrera-Malaver, B.; Merlevede, A.; Roncoroni, M.; Voordeckers, K.; Miraglia, L.; Teiling, C.; Steffy, B.; Taylor, M.; Schwartz, A.; Richardson, T.; White, C.; Baele, G.; Maere, S.; Verstrepen, K. J. Domestication and Divergence of Saccharomyces Cerevisiae Beer Yeasts. *Cell* **2016**, *166* (6), 1397-1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>.
- (5) Steensels, J.; Gallone, B.; Voordeckers, K.; Verstrepen, K. J. Domestication of Industrial Microbes. *Current Biology*. Cell Press May 20, 2019, pp R381–R393. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2019.04.025>.
- (6) Steensels, J.; Verstrepen, K. J. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. *Annual Review of Microbiology*. Annual Reviews Inc. September 8, 2014, pp 61–80. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>.
- (7) Steensels, J.; Meersman, E.; Snoek, T.; Saels, V.; Verstrepen, K. J. Large-Scale Selection and Breeding to Generate Industrial Yeasts with Superior Aroma Production. *Appl Environ Microbiol* **2014**, *80* (22), 6965–6975. <https://doi.org/10.1128/AEM.02235-14>.
- (8) Krogerus, K.; Seppänen-Laakso, T.; Castillo, S.; Gibson, B. Inheritance of Brewing-Relevant Phenotypes in Constructed Saccharomyces Cerevisiae×Saccharomyces Eubayanus Hybrids. *Microb Cell Fact* **2017**, *16* (1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0679-8>.
- (9) Morales, L.; Dujon, B. Evolutionary Role of Interspecies Hybridization and Genetic Exchanges in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **2012**, *76* (4), 721–739. <https://doi.org/10.1128/membr.00022-12>.

- (10) Mertens, S.; Steensels, J.; Saels, V.; De Rouck, G.; Aerts, G.; Verstrepen, K. J. A Large Set of Newly Created Interspecific *Saccharomyces* Hybrids Increases Aromatic Diversity in Lager Beers. *Appl Environ Microbiol* **2015**, *81* (23), 8202–8214. <https://doi.org/10.1128/AEM.02464-15>.
- (11) Wang, C.; Mas, A.; Esteve-Zarzoso, B. The Interaction between *Saccharomyces Cerevisiae* and Non-*Saccharomyces* Yeast during Alcoholic Fermentation Is Species and Strain Specific. *Front Microbiol* **2016**, *7* (APR). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00502>.
- (12) Holt, S.; Mukherjee, V.; Lievens, B.; Verstrepen, K. J.; Thevelein, J. M. Bioflavoring by Non-Conventional Yeasts in Sequential Beer Fermentations. *Food Microbiol* **2018**, *72*, 55–66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>.
- (13) Michel, M.; Kopecká, J.; Meier-Dörnberg, T.; Zarnkow, M.; Jacob, F.; Hutzler, M. Screening for New Brewing Yeasts in the Non-*Saccharomyces* Sector with *Torulaspora Delbrueckii* as Model. *Yeast* **2016**, *33* (4), 129–144. <https://doi.org/10.1002/yea.3146>.
- (14) Michel, M.; Meier-Dörnberg, T.; Jacob, F.; Methner, F. J.; Wagner, R. S.; Hutzler, M. Review: Pure Non-*Saccharomyces* Starter Cultures for Beer Fermentation with a Focus on Secondary Metabolites and Practical Applications. *Journal of the Institute of Brewing*. John Wiley and Sons Inc October 1, 2016, pp 569–587. <https://doi.org/10.1002/jib.381>.
- (15) Basso, R. F.; Alcarde, A. R.; Portugal, C. B. Could Non-*Saccharomyces* Yeasts Contribute on Innovative Brewing Fermentations? *Food Research International*. Elsevier Ltd August 1, 2016, pp 112–120. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.06.002>.
- (16) Bellut, K.; Arendt, E. K. Chance and Challenge: Non-*Saccharomyces* Yeasts in Nonalcoholic and Low Alcohol Beer Brewing—A Review. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*. Taylor and Francis Inc. April 3, 2019, pp 77–91. <https://doi.org/10.1080/03610470.2019.1569452>.
- (17) Capece, A.; Romaniello, R.; Siesto, G.; Romano, P. Conventional and Non-Conventional Yeasts in Beer Production. *Fermentation*. MDPI AG June 1, 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020038>.
- (18) Steensels, J.; Daenen, L.; Malcorps, P.; Derdelinckx, G.; Verachtert, H.; Verstrepen, K. J. Brettanomyces Yeasts - From Spoilage Organisms to Valuable Contributors to Industrial Fermentations. *International Journal of Food Microbiology*. Elsevier B.V. August 3, 2015, pp 24–38. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.04.005>.
- (19) Dzialo, M. C.; Park, R.; Steensels, J.; Lievens, B.; Verstrepen, K. J. Physiology, Ecology and Industrial Applications of Aroma Formation in Yeast. *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press August 1, 2017, pp S95–S128. <https://doi.org/10.1093/femsre/fux031>.
- (20) Lentz, M. The Impact of Simple Phenolic Compounds on Beer Aroma and Flavor. *Fermentation*. MDPI AG March 19, 2018. <https://doi.org/10.3390/fermentation4010020>.

- (21) Spitaels, F.; Wieme, A. D.; Janssens, M.; Aerts, M.; Daniel, H. M.; Van Landschoot, A.; De Vuyst, L.; Vandamme, P. The Microbial Diversity of Traditional Spontaneously Fermented Lambic Beer. *PLoS One* **2014**, *9* (4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0095384>.
- (22) Postigo, V.; Esteban, S.; Arroyo, T. *Lachancea* Thermotolerans, an Innovative Alternative for Sour Beer Production. *Beverages* **2023**, *9* (1). <https://doi.org/10.3390/beverages9010020>.
- (23) Domizio, P.; House, J. F.; Joseph, C. M. L.; Bisson, L. F.; Bamforth, C. W. *Lachancea* Thermotolerans as an Alternative Yeast for the Production of Beer. *Journal of the Institute of Brewing* **2016**, *122* (4), 599–604. <https://doi.org/10.1002/jib.362>.
- (24) Nikulin, J.; Eerikäinen, R.; Hutzler, M.; Gibson, B. Brewing Characteristics of the Maltotriose-Positive Yeast *Zygorulasporea Florentina* Isolated from Oak. *Beverages* **2020**, *6* (4), 1–19. <https://doi.org/10.3390/beverages6040058>.
- (25) De Francesco, G.; Turchetti, B.; Sileoni, V.; Marconi, O.; Perretti, G. Screening of New Strains of *Saccharomyces Ludwigi* and *Zygosaccharomyces Rouxii* to Produce Low-Alcohol Beer. *Journal of the Institute of Brewing* **2015**, *121* (1), 113–121. <https://doi.org/10.1002/jib.185>.
- (26) Drosou, F.; Mamma, D.; Tataridis, P.; Dourtoglou, V.; Oreopoulou, V. *Metschnikowia Pulcherrima* in Mono or Co-Fermentations in Brewing. *BrewingScience* **2022**, *75* (7–8), 69–78. <https://doi.org/10.23763/BrSc22-09drosou>.
- (27) Libkind, D.; Hittinger, C. T.; Valefio, E.; Gonçalves, C.; Dover, J.; Johnston, M.; Gonçalves, P.; Sampaio, J. P. Microbe Domestication and the Identification of the Wild Genetic Stock of Lager-Brewing Yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **2011**, *108* (35), 14539–14544. <https://doi.org/10.1073/pnas.1105430108>.
- (28) Gibson, B. R.; Storgårds, E.; Krogerus, K.; Vidgren, V. Comparative Physiology and Fermentation Performance of Saaz and Froberg Lager Yeast Strains and the Parental Species *Saccharomyces Eubayanus*. *Yeast* **2013**, *30* (7), 255–266. <https://doi.org/10.1002/yea.2960>.
- (29) Krogerus, K.; Magalhães, F.; Vidgren, V.; Gibson, B. New Lager Yeast Strains Generated by Interspecific Hybridization. *J Ind Microbiol Biotechnol* **2015**, *42* (5), 769–778. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1597-6>.
- (30) White, T. J.; Bruns, T.; Lee, S.; Taylor, J. AMPLIFICATION AND DIRECT SEQUENCING OF FUNGAL RIBOSOMAL RNA GENES FOR PHYLOGENETICS. In *PCR Protocols*; Elsevier, 1990; pp 315–322. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-372180-8.50042-1>.
- (31) Waud, M.; Busschaert, P.; Ruyters, S.; Jacquemyn, H.; Lievens, B. Impact of Primer Choice on Characterization of Orchid Mycorrhizal Communities Using 454 Pyrosequencing. *Mol Ecol Resour* **2014**, *14* (4), 679–699. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12229>.
- (32) *Chile map*. <https://freevectormaps.com/>.

- (33) Ravasio, D.; Carlin, S.; Boekhout, T.; Groenewald, M.; Vrhovsek, U.; Walther, A.; Wendland, J. Adding Flavor to Beverages with Non-Conventional Yeasts. *Fermentation* **2018**, *4* (1). <https://doi.org/10.3390/fermentation4010015>.
- (34) Jara, C.; Laurie, V. F.; Mas, A.; Romero, J. Microbial Terroir in Chilean Valleys: Diversity of Non-Conventional Yeast. *Front Microbiol* **2016**, *7* (MAY). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00663>.
- (35) Nespolo, R. F.; Villarroel, C. A.; Oporto, C. I.; Tapia, S. M.; Vega-Macaya, F.; Urbina, K.; de Chiara, M.; Mozzachiodi, S.; Mikhalev, E.; Thompson, D.; Larrondo, L. F.; Saenz-Agudelo, P.; Liti, G.; Cubillos, F. A. An Out-of-Patagonia Migration Explains the Worldwide Diversity and Distribution of *Saccharomyces Eubayanus* Lineages. *PLoS Genet* **2020**, *16* (5). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008777>.
- (36) Gallone, B.; Steensels, J.; Mertens, S.; Dzialo, M. C.; Gordon, J. L.; Wauters, R.; Theßeling, F. A.; Bellinazzo, F.; Saels, V.; Herrera-Malaver, B.; Prah, T.; White, C.; Hutzler, M.; Meußdoerffer, F.; Malcorps, P.; Souffriau, B.; Daenen, L.; Baele, G.; Maere, S.; Verstrepen, K. J. Interspecific Hybridization Facilitates Niche Adaptation in Beer Yeast. *Nat Ecol Evol* **2019**, *3* (11), 1562–1575. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0997-9>.
- (37) Westerdijk Institute. *CBS and NCCB collections, and databases*. <https://wi.knaw.nl/Collection>.
- (38) Holt, S.; Miks, M. H.; De Carvalho, B. T.; Foulquié-Moreno, M. R.; Thevelein, J. M. The Molecular Biology of Fruity and Floral Aromas in Beer and Other Alcoholic Beverages. *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press May 1, 2019, pp 193–222. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuy041>.
- (39) Vanbeneden, N.; Gils, F.; Delvaux, F.; Delvaux, F. R. Formation of 4-Vinyl and 4-Ethyl Derivatives from Hydroxycinnamic Acids: Occurrence of Volatile Phenolic Flavour Compounds in Beer and Distribution of Pad1-Activity among Brewing Yeasts. *Food Chem* **2008**, *107* (1), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>.
- (40) Löser, C.; Urit, T.; Bley, T. Perspectives for the Biotechnological Production of Ethyl Acetate by Yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*. Springer Verlag 2014, pp 5397–5415. <https://doi.org/10.1007/s00253-014-5765-9>.
- (41) Kurtzman, C. P.; Robnett, C. J.; Blackwell, M. Description of *Teunomyces* Gen. Nov. for the *Candida* *Kruisii* Clade, *Suhomyces* Gen. Nov. for the *Candida* *Tanzawaensis* Clade and *Suhomyces* *Kilbournensis* Sp. Nov. *FEMS Yeast Res* **2016**, *16* (5). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow041>.
- (42) Quirós, M.; Martorell, P.; Querol, A.; Barrio, E.; Peinado, J. M.; De Silóniz, M. I. Four New *Candida* *Cretensis* Strains Isolated from Spanish Fermented Sausages (Chorizo): Taxonomic and Phylogenetic Implications. *FEMS Yeast Res* **2008**, *8* (3), 485–491. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00341.x>.

CAPÍTULO II SECCIÓN 2

Title: Distinct genome stabilization procedures lead to phenotypic variability in newly generated interspecific yeast hybrids

Pablo Murath^{1,2}, Stephanie Hoffmann², Beatriz Herrera-Malaver^{3,4,5}, Luis Bustamante¹,
Kevin Verstrepen^{3,4,5}, Jan Steensels^{3,4,5,*}

¹Departamento de Análisis Instrumental, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

²Departamento de Ciencia y Tecnología de los Alimentos, Facultad de Farmacia, Universidad de Concepción, Concepción, Chile

³Leuven Institute for Beer Research, Katholieke Universiteit Leuven, Bio-Incubator, Leuven (Heverlee), Belgium

⁴Laboratory for Systems Biology, VIB Centre for Microbiology, Bio-Incubator, Leuven (Heverlee), Belgium

⁵Laboratory for Genetics and Genomics, Centre of Microbial and Plant Genetics (CMPG), Katholieke Universiteit Leuven, Leuven, Belgium

*** Correspondence:**

Jan Steensels

jan.steensels@kuleuven.be

Keywords: Lager yeast, interspecific hybrids, genome stabilization, flavor production, brewing.

Abstract

Yeast cells sometimes engage in interspecific hybridization, i.e. crosses between different species. These interspecific yeast hybrids combine phenotypes of the two parental species and can therefore allow fast adaptation to new niches. This is perhaps most evident in beer yeasts, where a cross between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces eubayanus* led to the emergence of the lager yeast *Saccharomyces pastorianus*, which combines the fermentation capacity of *S. cerevisiae* with the cold tolerance of *S. eubayanus*, making the hybrid suitable for the typical cool lager beer fermentation conditions. Interestingly, however, merging two different genomes into one cell causes genomic instability and rearrangements, ultimately leading to a reorganized but more stable hybrid genome. Here, we investigate how different parameters influence this genome stabilization trajectory and ultimately can lead to variants with different industrial phenotypes. We generated seven *de novo* interspecific hybrids between two *S. eubayanus* strains and an ale *S. cerevisiae* strain, subsequently exposing them to three different genome stabilization procedures. Next, we analyzed the fermentation characteristics and metabolite production of selected stabilized hybrids. Our results reveal how variation in the genome stabilization procedure leads to phenotypic variability and can generate additional diversity after the initial hybridization process. Moreover, several stabilized hybrids showed phenotypes that are interesting for industrial applications.

1 Introduction

Interspecific hybridization has been identified as an important driver of yeast evolution. Crosses between different yeast species lead to hybrids that combine phenotypes of both parental species, which may allow them to thrive in new niches (Steensels et al., 2021). Whereas the resulting hybrids are typically sexually infertile, they can reproduce asexually through mitotic budding.

While interspecific hybridization occurred across the entire yeast phylogeny, many examples have been identified within the *Saccharomyces* species complex (Gallone et al., 2019; Morales & Dujon, 2012; Steensels et al., 2021). Despite the high sequence divergence between the species within this genus (up to 20% (Kellis et al., 2003)), prezygotic barriers are generally weak, and species can successfully cross-breed. Given that interspecific hybridization can act as an evolutionary fast-track towards adaptation to new environmental niches, it is perhaps not surprising that interspecific *Saccharomyces* hybrids are often encountered in novel niches created by humans. For example, interspecific hybrids were identified in Belgian traditional ales (Gallone et al., 2019; Peris et al., 2012, 2018), wine (Christine et al., 2007; González et al., 2006, 2007; Lopes et al., 2010; Masneuf et al., 1998) and bread (Marcet-Houben & Gabaldón, 2015). The most famous and industrially most relevant example is *S. cerevisiae* \times *S. eubayanus* (also referred to as *S. pastorianus*), which is used to produce lager-type beers (Bing et al., 2014; Eizaguirre et al., 2018; Libkind et al., 2011; Walther et al., 2014).

Beer is a fermented beverage that, according to archaeological evidence, has been brewed since the beginning of human civilization by Sumerians in the last half of the fourth millennium BC (Michel et al., 1992), possibly even dating back as far as 13.000 years ago (Liu et al., 2018). Today, beer is the most-produced fermented beverage, with an annual production of 189 billion liters in 2022 (Statista, 2024), with lager beer representing around 80-90% of that total beer volume (Cimini & Moresi, 2021). Lager beer originated in 16th century Bavaria, as a result of the Bavarian Beer Purity Law (Bayerisches Reinheitsgebot) (Hutzler et al., 2023). The primary objective of this law was to limit bacterial contaminations during beer production by establishing rules regarding ingredients and restricting brewing to the colder winter months. Hence, lager beers are typically fermented at lower temperatures

compared to the older, more traditional ale beers, which are fermented at higher temperatures by *S. cerevisiae* yeast cells. The adaptation of cooler fermentation temperatures instructed by the Rheinheitsgebot likely led to the emergence of *S. pastorianus*, when a cell of *S. cerevisiae* hybridized with a wild *S. eubayanus* cell. The resulting interspecific hybrid combined the ability of *S. cerevisiae* to thrive in the sugar-rich beer medium with the cold-tolerance of *S. eubayanus*, enabling it to outcompete its parents (B. Gibson & Liti, 2015; B. R. Gibson et al., 2013; Mertens et al., 2015). Interestingly, molecular clock analyses indicated this new species emerged not long after lager brewing was established (Gallone et al., 2019), highlighting how quickly interspecific hybrids can colonize new niches.

Genetic analyses have revealed that lager strains can be divided in two distinct lineages, which are called Saaz (Type 1) and Frohberg (Type 2) (Dunn & Sherlock, 2008; Liti et al., 2005; Monerawela et al., 2015). Although it is still unclear whether these two lineages originate from two distinct interspecific hybridization events, it is well known that the two types show distinct characteristics. Saaz strains are generally allotriploids with proportionally more DNA from the parental *S. eubayanus* (Gallone et al., 2019; Walther et al., 2014), while Frohberg strains are allotetraploids with predominantly DNA from the *S. cerevisiae* parent (Gallone et al., 2019; Nakao et al., 2009; Okuno et al., 2015). Despite the existence of these two lineages, genetic and phenotypic variability among lager yeasts is still very low, especially compared to that of ale yeasts (Gallone et al., 2019).

The discovery of the first pure *S. eubayanus* strain in 2011 (Libkind et al., 2011), provided the opportunity to mimic the original *S. pastorianus* hybridization event in the lab, resulting in new *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* hybrids (Hebly et al., 2015; Krogerus et al., 2015, 2018; Mertens et al., 2015). The resulting interspecific hybrids can show a higher fermentation capacity (i.e. faster fermentation and higher attenuation) than both parental strains in lager beer fermentations. Moreover, some of these novel hybrids produced flavour profiles differing drastically from those of currently available Frohberg or Saaz strains (Mertens et al., 2015).

In addition to the phenotypic variability generated by the hybridization process itself, several studies suggest that the resulting hybrids have unstable genomes, and that subsequent postzygotic evolution in selective conditions further influences the genetic and phenotypic

properties of the hybrids. Indeed, genomic redundancy after the hybridization event can cause chromosomal losses, duplications and recombination (Gorter De Vries et al., 2019; Krogerus et al., 2016; Lancaster et al., 2019; Piotrowski et al., 2012; Steensels et al., 2021; van den Broek et al., 2015), while the high level of heterozygosity introduced by hybridization further provides substrate for evolution to act on, for example by introducing regions of loss-of-heterozygosity, causing alleles of one of the parental species to become homozygous (D'Angiolo et al., 2020; Mozzachiodi et al., 2021; Smukowski Heil et al., 2017, 2019). Therefore, exposing newly formed interspecific hybrids to different stressors can result in variants with different phenotypic properties (Krogerus et al., 2018; Kunicka-Styczyńska & Rajkowska, 2011). In Saaz and Frohberg lager yeast, continuous evolution and selection during hundreds of years of beer fermentation cycles likely led to stabilized variants with properties differing from the initial hybrid cell. One particularly interesting example is the inability of lager yeast to convert ferulic acid to 4-vinylguaiacol (4-VG, also referred to as 'phenolic off-flavour', or POF). 4-VG production is caused by the combined activity of two genes, *PADI* and *FDCI*, and if at least one of these genes is absent or inactivated, 4-VG production does not occur (Gallone et al., 2019; Krogerus, Seppänen-Laakso, et al., 2017; Mukai et al., 2010). Interestingly, many domesticated yeasts, including Frohberg and Saaz lager strains, lost or acquired mutations in these genes, rendering them POF-negative (Gallone et al., 2018, 2019). In contrast, most wild yeast, including all *S. eubayanus* strains isolated so far, still have active variants of these genes (Gallone et al., 2019; Steensels & Verstrepen, 2014). Another example of postzygotic evolution in lager yeasts is the emergence of specific transporters for maltotriose, improving their fermentation efficiency in wort (Brickwedde et al., 2017). Interestingly, similar transporters were obtained after evolving *S. eubayanus* in medium with maltotriose as sole carbon source (Baker & Hittinger, 2019; Brouwers et al., 2019), showing the potential of mimicking the historical hybridization and postzygotic genome stabilization event in a lab environment to generate new strains for lager brewing.

In this study, we developed seven novel interspecific hybrids (H1-H7) and subjected them to genome stabilization in three distinct stress conditions (Figure S1). Specifically, beer wort of 12°P at 10°C (low temperature; LT), beer wort of 12°P at 10°C supplemented with 8% v/v ethanol (low temperature + high ethanol; LT+Eth) and beer wort of 12°P at 30°C (high

temperature; HT) were used. For each of the hybrids, four parallel lineages were evolved in each condition. A selected subset of the evolved lineages was subsequently evaluated in lager beer fermentation conditions, and their metabolite production was determined. It became apparent that genome stabilization indeed affects hybrid performance, albeit the observed differences are modest. Interestingly, two individual stabilized isolates (H5_HT_L3i and H5_HT_L4i) consistently showed trends of higher production of several higher alcohols (isobutanol, isoamyl alcohol) and esters (ethyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate and 2-phenylethyl acetate), as well as total ethanol production. In addition, H5_HT_L4i showed lower production of 4-VG compared to other stabilized isolates of H5, and could therefore be an interesting strain to explore industrially.

2 Material and Methods

2.1 Yeast strains

Two strains of domesticated *S. cerevisiae* were selected based on their production of desirable aromatic compounds, sporulation capacity, and spore viability. Both selected strains of *S. cerevisiae*, BE031 and BE011, belongs to different industrial yeast sublineage, classified as Beer 1 and Beer 2, previously described by Gallone and coworkers (Gallone et al., 2016). Also, two newly isolated wild *S. eubayanus* strains from Chile (36°52'S - 71°22'O) were used as parental strains. Two different *S. pastorianus* strains, corresponding to each type of lager yeasts - Saaz (CBS1513) and Frohberg (W34/70) - were included in the different experiments as reference strains.

2.2 Sporulation and tetrad dissection of possible parental strains

Sporulation of selected parental strains was induced on acetate medium (1% [wt vol⁻¹] potassium acetate, 0.05% [wt vol⁻¹] amino acid mix, and 2% [wt·vol⁻¹] agar) after 5 to 10 days at 25°C. Subsequently, sporulation capacity was assessed using a light microscope (magnification of X40). The ascus wall was digested in 8 mL 0.1 mg ml⁻¹ zymolyase (100 T, Amsbio) incubated overnight (35°C, 80 rpm). The suspension was centrifuged and resuspended in Triton X-100 1,5% [wt vol⁻¹]. Tetrads were sonicated (Branson Digital Sonifier) in three cycles with amplitude 20% for 30 seconds, with a pause of 30 s between each cycle. Spores were stored at -80°C in glycerol-yeast extract-peptone-dextrose (GYPD)

medium (2% [wt vol⁻¹] Bacto peptone, 1% [wt vol⁻¹] yeast extract, 2% [wt vol⁻¹] glucose, and 25% [wt vol⁻¹] glycerol).

2.3 Hybrid generation through spore-to-spore mating

Hybridization was induced by placing single spores from both parental strains together with a micromanipulator (MSM; Singer Instruments) on YPD agar (2% [wt vol⁻¹] Bacto peptone, 1% [wt vol⁻¹] yeast extract, 2% [wt vol⁻¹] glucose, and 1.5% [wt vol⁻¹] agar), followed by visual inspection of zygote formation after 6 to 8 h of incubation at room temperature. Candidate interspecific hybrids were purified by streaking on synthetic 12 degrees Plato (°P) malt agar medium (12% [wt vol⁻¹] synthetic malt extract [8EBC; Brouwland, Belgium] and 1.5% [wt vol⁻¹] agar).

2.4 Interspecific hybrids confirmation

The confirmation of the newly-generated interspecific hybrids was done by species-specific multiplex PCR analysis. Two primer pairs were used for the species-specific multiplex PCR, each targeting a specific part of one of the parental species genome (Muir et al., 2011; Pengelly & Wheals, 2013). Primers Scer F2 (5'-GCG CTT TAC ATT CAG ATC CCG AG-3') and Scer R2 (5'-TAA GTT GGT TGT CAG CAA GAT TG-3') amplify a 150-bp amplicon of the *S. cerevisiae* genome. Primers Seub F3 (5'-GTC CCT GTA CCA ATT TAA TAT TGC GC-3') and Seub R2 (5'-TTT CAC ATC TCT TAG TCT TTT CCA GAC G-3') generate a 228-bp *S. eubayanus*-specific amplicon. The PCR conditions were as follows: 3 min at 95°C, 30 cycles of 30 s at 95°C, 30 s at 58°C, and 30 s of 72°C, followed by a final cycle of 5 min at 72°C and subsequent cooling to room temperature (RT). Candidate hybrids showing two bands were considered to be interspecific hybrids. Single colonies of each interspecific hybrid were propagated in YPD growth medium (2% [wt vol⁻¹] Bacto peptone, 1% [wt vol⁻¹] yeast extract and 2% [wt vol⁻¹] glucose) and then stored at -80°C in GYPD medium.

2.5 Exposure of interspecific hybrids to different environmental conditions

The interspecific hybrids obtained were subjected to a genetic stabilization protocol. Four parallel lineages of each hybrid were individually inoculated into 100 µL of three different media conditions: 12°P wort medium at 10°C (LT), 12°P wort medium at 10°C with ethanol 8% (LT+Eth), 12°P wort medium at 30°C (HT) in a 96-well plate and incubated at 600 rpm

for 1-3 days. After incubation, cultures were diluted 10 times in 90 μL of each fresh medium described above. This incubation/dilution procedure was repeated 6 times until reach around 20-25 yeast generations, an amount reported to be sufficient to achieve genomic stabilization for interspecific hybrids (Pérez-Través et al., 2015). Thereafter, all the evolved cultures were stored at -80°C . Cultures were plated on synthetic 12 degrees Plato ($^{\circ}\text{P}$) malt agar medium (12% [wt vol⁻¹] synthetic malt extract [8EBC; Brouwland, Belgium] and 1.5% [wt vol⁻¹] agar, and for each culture, a single colony was isolated for phenotypic experiments.

2.6 Absorbance-based POF measurement

The ability of the yeasts to produce POF was tested via the absorbance-based detection method, described by Mertens and coworkers (Mertens et al., 2017). Yeasts were inoculated in 150 μL liquid YPD 2% growth medium, supplemented with 100 mg L^{-1} ferulic acid in a 96 well plate. In each plate, a POF⁻ (W34/70) and a POF⁺ (*S. mikatae* NCYC2888) control were included. 96-well plates were sealed with an aluminum cover foil and incubated for 5 days at 30°C , 200 rpm. After centrifugation (3 min, 3000 rpm), 100 μL of the supernatant was transferred to a new 96 well plate and remaining concentration of ferulic acid was measured at a wavelength of 325 nm (Tecan Infinite 200 PRO, Switzerland).

2.7 Laboratory-scale lager fermentations

Yeasts were propagated by inoculating in 5 mL YPD 2%, incubated at room temperature in a rotating wheel. After 16 h of incubation, 1 mL of the culture was transferred to 50 mL 4% yeast extract peptone-maltose (YPM; 2% [wt vol⁻¹] Bacto peptone, 1% [wt vol⁻¹] yeast extract, and 4% [wt vol⁻¹] maltose) in a 250 mL Erlenmeyer flask and incubated at 20°C and 200 rpm for 72h. Cell concentration was measured (BioRad, TC20 automated cell counter, USA), and 150 mL of an 12 $^{\circ}\text{P}$ wort (17% [wt vol⁻¹] Light spray malt extract (Brewferm, Belgium), supplemented with 0.005 mg L^{-1} Zn^{2+} (autoclaved for 10 minutes at 110°C) was inoculated with 10^7 cells mL^{-1} . The bottles were equipped with a water lock and stirring bar after which they were incubated at 14°C , agitated at 150 rpm. After 8 days, the fermentations were stopped and samples for chromatographic analysis and ethanol measurements were taken. The weight loss of the samples was measured daily. Samples for alcohol by volume analysis were analyzed by Alcolyzer beer ME (Anton Paar GmbH) according to the manufacturer recommendations. Sugar concentrations were determined by Dionex Liquid

Chromatography (Thermo Fisher Scientific, USA), which was calibrated for maltotriose, maltose, sucrose and glucose using raffinose as the internal standard.

2.8 Higher alcohols, esters and 4-VG measurement

Headspace gas chromatography coupled with flame ionization detection (HS-GC-FID) was used for the quantification of yeast aroma production (Agilent Technologies, USA), which was calibrated for the quantification of 13 important aroma compounds, including higher alcohols (propanol, butanol, isobutanol, isoamyl alcohol and 2-phenylethanol alcohol), esters (ethyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate, 2-phenylethyl acetate, ethyl butyrate, ethyl hexanoate and ethyl octanoate,.) and 4-vinyl guaiacol. The GC was equipped with a headspace autosampler (PAL system; CTC Analytics, Zwingen, Switzerland) and contained a DBWAXeter column (length, 30 m; internal diameter, 0.25 mm; layer thickness, 0.5 μ m [Agilent Technologies, Santa Clara, CA]), and N₂ was used as the carrier gas. Samples were heated for 25 min at 70°C in the autosampler. The injector block and FID temperatures were both kept constant at 250°C. 5 mL of sample was collected in 15 mL glass tubes containing 1.75 g of sodium chloride each. These tubes were immediately closed and cooled to minimize evaporation of volatile compounds. The oven temperature was held at 50°C for 5 min, after which it was increased to 80°C at 4°C min⁻¹. Next, the temperature was increased to 200°C at 5°C min⁻¹ and held at 200°C for 3 min. Results were analyzed with Agilent Chemstation software (Agilent, Santa Clara, CA).

2.9 Data analysis and data visualization

All the results were expressed as arithmetic means and standard error of the mean. Statistical analyses of the overall conversion of ferulic acid and statistical analyses between the parallel lineages and the overall production of higher alcohols, esters and 4-VG by the selected interspecific hybrids evolved in different conditions were assessed by Kruskal-Wallis one-way analysis of variance test in combination with Dunn's multiple comparison tests ($\alpha = 0.05$) using GraphPad Prism version 10.0 (GraphPad Software). Furthermore, the average production of the different higher alcohols and esters was assessed by multiple Mann-Whitney tests ($\alpha = 0.05$) using GraphPad Prism version 10.0 (GraphPad Software). Heatmap analysis and visualization was processed by freely accessible software MetaboAnalyst 5.0 (<https://www.metaboanalyst.ca>). Principal component analysis (PCA) analysis and

visualization were performed in R using the FactoMineR package version 2.11, the factoextra package version 1.0.7 and ggplot2 package version 3.5.1.

3 Results

3.1 Generating interspecific hybrids through spore-to-spore mating

New interspecific hybrids were developed using spore-to-spore mating. Spores of domesticated *S. cerevisiae* beer strains BE031 and BE011, were crossed with wild *S. eubayanus* strains from Chile, DR1 and DR3, to generate *de novo* interspecific hybrids (Figure 20 (S1)). A species-specific PCR assay was used to confirm both parental genomes were present in the hybrids (Figure 21 (S2)). However, whereas the mating procedure was the same for each pair of parental strains, the hybridization rates differed (Table 2). Most notably, we failed to isolate any viable interspecific hybrids from parental strain BE031. Therefore, the rest of this manuscript will only include hybrids developed from BE011, DR1 and DR3.

Table 2

Overview of *de novo* interspecific hybrid yeasts generated

Strain	Result for hybridization with strain:			
	DR1		DR3	
	No. of PCR-confirmed hybrids (designations)	Hybridization success rate (%)	No. of PCR-confirmed hybrids (designations)	Hybridization success rate (%)
BE031	0	0 (0/576)	0	0 (0/432)
BE011	4 (H1 to H4)	1.4 (4/288)	3 (H5 to H7)	1.0 (3/288)

3.2 Selection of interspecific hybrids after being exposed in three different conditions

Next, we aimed to exploit the genome plasticity of newly developed hybrids to generate additional variability. It has been suggested that newly formed interspecific hybrids have unstable genomes, showing elevated rates of structural changes, including loss of large parts of their DNA as well as duplication events. These events gradually decline in frequency over time and/or mitotic cycles, resulting in more complex but stable hybrid genomes. Newly

formed hybrids are therefore often grown for several generations to end up with variants that show more genetic and phenotypic stability, a procedure referred to as “genome stabilization”. We hypothesized that the short period of exceptional genome instability might offer an opportunity to rapidly generate further genetic and phenotypic diversity. We further hypothesized that carrying out the genome stabilization in specific environments might favor selection of those variants that are best adapted to the environment. To investigate if environmental conditions affect the result of the genome stabilization procedure and select for variants with different phenotypes, we subjected four parallel lineages of each hybrid to three different conditions (resulting in $7 \times 4 \times 3 = 84$ stabilized lineages). The three conditions included 12°P wort at 10°C (LT); 12°P wort with addition of 8% (v/v) ethanol at 10°C (LT+Eth); and 12°P wort at 30°C (HT). Hybrids were transferred for 6 consecutive rounds, equivalent to 20-25 yeast generations.

To select a subset of lineages to evaluate in mimicked lager beer fermentations, their capacity to metabolize ferulic acid, the precursor of the phenolic off-flavour 4-VG, after the stabilization procedure was assessed. We focus on this phenotype because 4-VG production has been reported to occur in all newly formed interspecific *S. pastorianus* lineages (Krogerus et al., 2015; Mertens et al., 2015), but is shown to have disappeared as a consequence of genome stabilization in Frohberg and Saaz yeasts (Gallone et al., 2019). On average, hybrids stabilized in LT+Eth showed significant higher levels of POF production in comparison with the results obtained from LT ($p < 0.001$) and HT lineages ($p < 0.05$) (Figure 15A). While none of the lineages completely lost the ability to convert ferulic acid to 4-VG, some seem to show reduced activity (Figure 15B). Specifically, stabilized lineages of H7 showed the lowest average POF production levels, with a high variability between the different stabilized lineages. This suggests that favorable changes might have occurred during genome stabilization in some, but not all, H7 lineages. Similarly, lineages of H5 showed high variability, with some lineages showing reduced POF production levels. Therefore, both H5 and H7 were selected for further investigation.

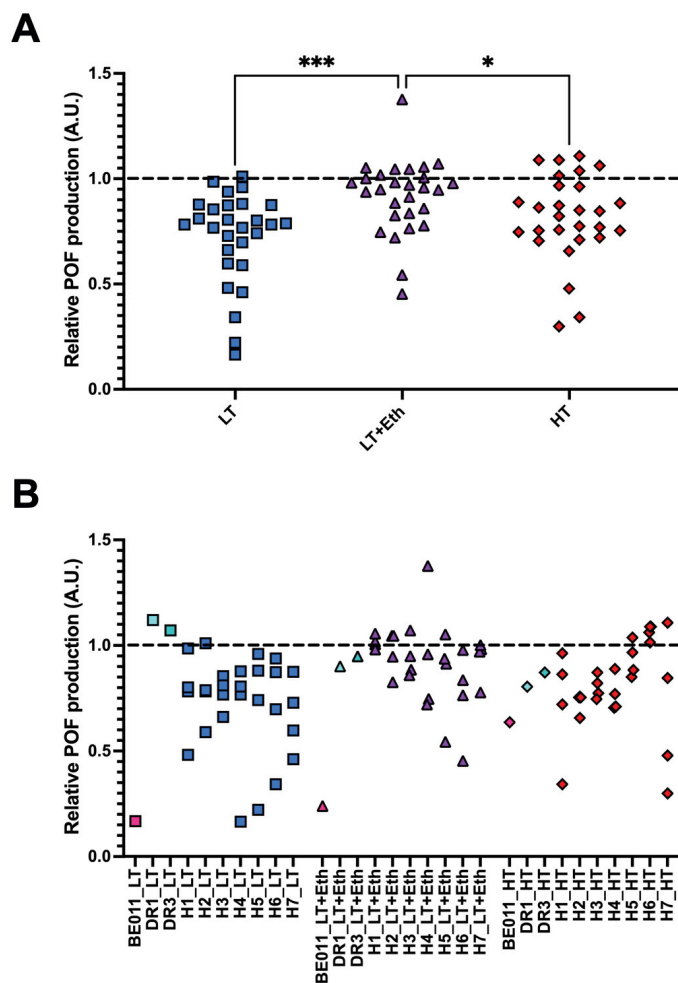


Figure 13 Screening of 4-vinyl guaiacol (4-VG) production. The conversion of ferulic acid to 4-VG by the stabilized lineages was measured by absorbance, visualized with lineages of all hybrids grouped (A), or separated by hybrid (B). In (B), values for parental strains (stabilized in identical conditions as the hybrids) are also included. All the results were normalized to a scale of 0 to 1 based on performance of the POF⁻ (set at 0) and POF⁺ (set at 1) reference strains. Black dotted line represents the value of POF⁺ reference strain. The asterisk indicates the level of significance (*, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

3.3 Stabilized hybrids show variability in maltotriose utilization and flavor production

To further investigate whether industrially relevant phenotypic differences emerged in stabilized lineages of H5 and H7, isolates of all these lineages (as well as the non-stabilized hybrids and parental strains) were subjected to lab-scale lager fermentation, and the concentrations of key fermentation metabolites were assessed (Table 3; Figure 16). Fermentation kinetics were monitored by daily tracking of the weight loss, which serves as a proxy for CO₂ production and thus fermentation progress (Figure 22 (S3)). Between

isolates, some variability in the CO₂ loss occurred during the first 3 days of the fermentation, but total CO₂ production at the end of the fermentation was similar for all isolates. Overall, alcohol by volume (% v/v) production of the stabilized isolates resemble those obtained with both *S. eubayanus* parental strains rather than the *S. cerevisiae* parents (Figure 23 (S4)). Interestingly, H5_HT_L3i and H5_HT_L4i showed slightly increased ABV production compared to the other stabilized isolates and its *S. eubayanus* parent. Analysis of the remaining sugar after fermentation showed that these strains are able to metabolize part of the maltotriose in the wort, while the non-stabilized hybrid (H5_G0) was unable to (Table 4 (S1)).

Table 3

Overview of key compounds production from laboratory scale lager beer fermentation. CBS1513 and W34/70 are reference strains for Saaz- and Frohnerg-type lager yeasts, respectively. H5_G0 and H7_G0 are the hybrids prior to genome stabilization.

	Propanol (mg L ⁻¹)	Butanol (mg L ⁻¹)	Isobutanol (mg L ⁻¹)	Isoamyl alcohol (mg L ⁻¹)	2-phenylethanol (mg L ⁻¹)	Ethyl acetate (mg L ⁻¹)	Isobutyl acetate (mg L ⁻¹)	Isoamyl acetate (mg L ⁻¹)	2-phenylethyl acetate (mg L ⁻¹)	Ethyl butyrate (mg L ⁻¹)	Ethyl hexanoate (mg L ⁻¹)	Ethyl octanoate (mg L ⁻¹)	4-vinyl guaiacol (mg L ⁻¹)	Ethanol (% v v ⁻¹)
H5_LT_L1i	11.90	0.29	17.86	71.50	32.61	5.32	0.02	0.31	0.12	0.04	0.03	0.02	0.67	4.17
H5_LT_L2i	11.69	0.28	16.93	66.61	29.14	4.99	0.02	0.25	0.10	0.04	0.03	0.02	0.72	4.13
H5_LT_L3i	12.27	0.30	16.50	62.23	30.37	4.75	0.02	0.25	0.09	0.04	0.03	0.02	0.84	4.14
H5_LT_L4i	12.06	0.28	18.03	67.49	27.76	5.27	0.02	0.26	0.09	0.04	0.03	0.02	0.73	4.14
H5_LT+Eth_L1i	12.82	0.30	17.45	64.65	29.18	4.95	0.02	0.27	0.10	0.04	0.03	0.02	0.73	4.16
H5_LT+Eth_L2i	13.14	0.31	18.01	67.84	44.76	5.50	0.02	0.26	0.11	0.04	0.03	0.02	0.75	4.19
H5_LT+Eth_L3i	12.30	0.29	17.42	66.47	34.95	4.67	0.02	0.25	0.10	0.04	0.03	0.02	0.71	4.14
H5_LT+Eth_L4i	13.19	0.28	19.93	72.65	29.67	4.59	0.02	0.30	0.11	0.04	0.03	0.05	0.66	4.17
H5_HT_L1i	11.95	0.29	16.50	64.36	32.00	4.63	0.02	0.28	0.11	0.04	0.03	0.02	0.74	4.14
H5_HT_L2i	13.71	0.30	19.99	69.22	34.84	5.77	0.02	0.31	0.12	0.05	0.03	0.02	0.85	4.14
H5_HT_L3i	15.66	0.32	22.04	71.71	35.43	6.24	0.02	0.38	0.14	0.05	0.03	0.02	0.85	4.28
H5_HT_L4i	13.15	0.29	19.00	69.52	28.17	5.44	0.02	0.37	0.15	0.04	0.03	0.06	0.62	4.30
H7_LT_L1i	14.43	0.29	15.83	57.42	30.36	3.25	0.01	0.22	0.07	0.04	0.03	0.05	0.55	4.13
H7_LT_L2i	14.48	0.29	17.21	60.51	34.42	4.35	0.01	0.24	0.08	0.04	0.03	0.03	0.70	4.16
H7_LT_L3i	14.31	0.25	15.70	60.42	30.86	4.18	0.02	0.30	0.12	0.04	0.03	0.05	0.63	4.18
H7_LT_L4i	13.18	0.27	14.79	62.81	39.16	4.32	0.02	0.30	0.12	0.04	0.04	0.04	0.81	4.18
H7_LT+Eth_L1i	14.36	0.28	15.53	59.12	32.51	4.14	0.01	0.29	0.10	0.04	0.03	0.03	0.67	4.16
H7_LT+Eth_L2i	14.02	0.28	15.23	61.67	32.95	4.04	0.01	0.26	0.09	0.04	0.03	0.03	0.70	4.15
H7_LT+Eth_L3i	14.50	0.30	15.63	55.69	30.28	4.23	0.01	0.21	0.06	0.04	0.03	0.03	0.67	4.12
H7_LT+Eth_L4i	14.40	0.26	15.44	57.71	27.42	3.79	0.01	0.26	0.09	0.04	0.03	0.03	0.54	4.16
H7_HT_L1i	15.78	0.27	16.17	53.35	32.79	4.10	0.01	0.22	0.06	0.04	0.03	0.03	0.73	4.13
H7_HT_L2i	13.27	0.29	15.42	62.70	35.09	4.37	0.01	0.28	0.10	0.04	0.04	0.03	0.73	4.15
H7_HT_L3i	13.33	0.28	15.22	60.42	33.02	3.89	0.01	0.25	0.09	0.04	0.03	0.03	0.65	4.14
H7_HT_L4i	11.92	0.26	13.70	62.74	35.06	3.71	0.02	0.32	0.14	0.04	0.03	0.06	0.69	4.14
BE011	34.22	0.18	16.14	64.88	34.47	12.58	0.02	0.34	0.09	0.06	0.07	0.13	0.17	5.22
DR3	7.66	0.31	17.82	69.81	48.44	4.65	0.01	0.24	0.21	0.04	0.03	0.04	0.77	4.10
H5_G0	17.06	0.37	21.20	69.34	35.40	7.59	0.02	0.34	0.08	0.05	0.03	0.02	0.43	4.15
H7_G0	15.54	0.26	16.68	59.30	37.52	4.44	0.01	0.26	0.09	0.04	0.03	0.02	0.51	4.16
CBS1513	9.51	0.13	28.62	46.37	31.48	3.98	0.03	0.36	0.26	0.05	0.06	0.49	0.00	5.10
W34/70	11.37	0.21	19.82	54.19	34.25	4.28	0.02	0.34	0.13	0.05	0.05	0.21	0.00	4.96

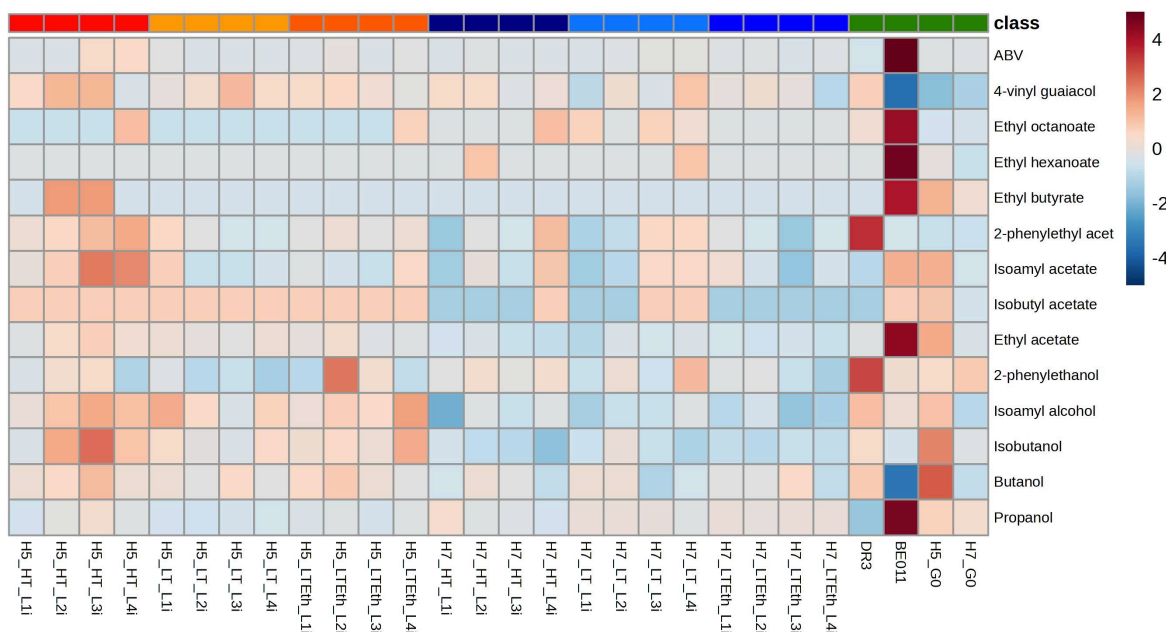


Figura 14 Heatmap representation of the metabolite production of stabilized isolates. Higher alcohols, esters, 4-VG and ABV produced after fermentation in lab-scale lager fermentations by stabilized isolates of interspecific hybrids H5 (red palette), H7 (blue palette) and the parental strains (BE011 and DR3) along with non-evolved hybrids (H5_G0 and H7_G0) (green) are given. Colors represent Z-scores (calculated over the rows).

Aroma production differed significantly between stabilized isolates originating from either H5 or H7. While both groups are the result of the same parental combination (DR3 and BE011), this difference is likely explained by genetic differences in the segregants that led to both hybrids. For example, stabilized H5 isolates produced on average more isoamyl alcohol (67.85 vs. 59.82 mg/L, $p < 0.0001$), ethyl acetate (5.18 vs. 4.03 mg/L, $p < 0.0001$) and isobutyl acetate (0.018 vs. 0.014 mg/L, $p < 0.0001$), while stabilized H7 isolates produced on average higher concentrations of ethyl hexanoate (0.032 vs. 0.029 mg/L, $p = 0.0269$) and ethyl octanoate (0.036 vs. 0.028, $p = 0.0035$) (Figure 17). When comparing different genome stabilization strategies within the same hybrid, differences were in general more subtle. Most notably, isolates of H5 evolved at HT (H5_HT_i) seem to generally produce more esters (e.g. isoamyl acetate) compared to isolates stabilized in the two other conditions, but the trend is not statistically significant (Figure 18). All stabilized isolates maintained their capacity to produce 4-VG in concentrations above the 4-VG odour threshold described in pilsner beer (0.294 mg/L, (Vanbeneden et al., 2008)) (Figure 18J). However, significant differences were

observed between 4-VG levels of H5 isolates stabilized in HT in comparison with H7 isolates after stabilization in LT+Eth (0.76 vs. 0.64 mg/L, $p < 0.05$).

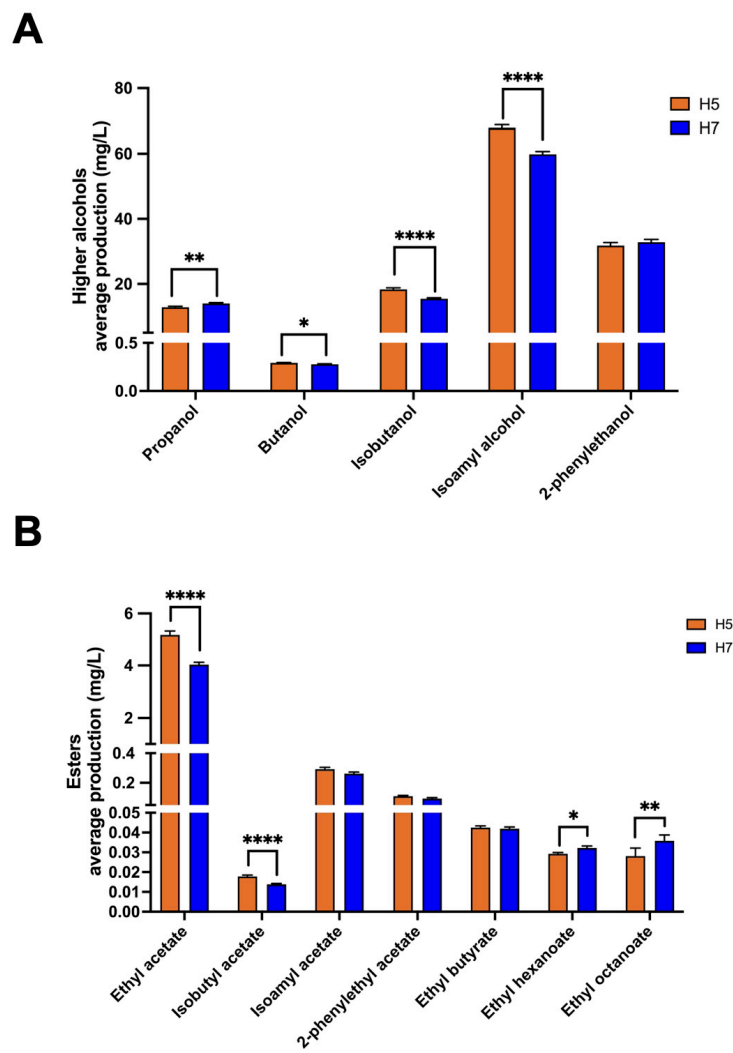


Figure 15 Production of higher alcohols and esters by stabilized isolates of H5 and H7. The average production of higher alcohols and their statistical differences observed between stabilized isolates of H5 (orange) and H7 (blue) is shown in (A). Similarly, the average concentration of esters is shown in (B). The asterisk indicate the level of significance (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ****, $p < 0.0001$)

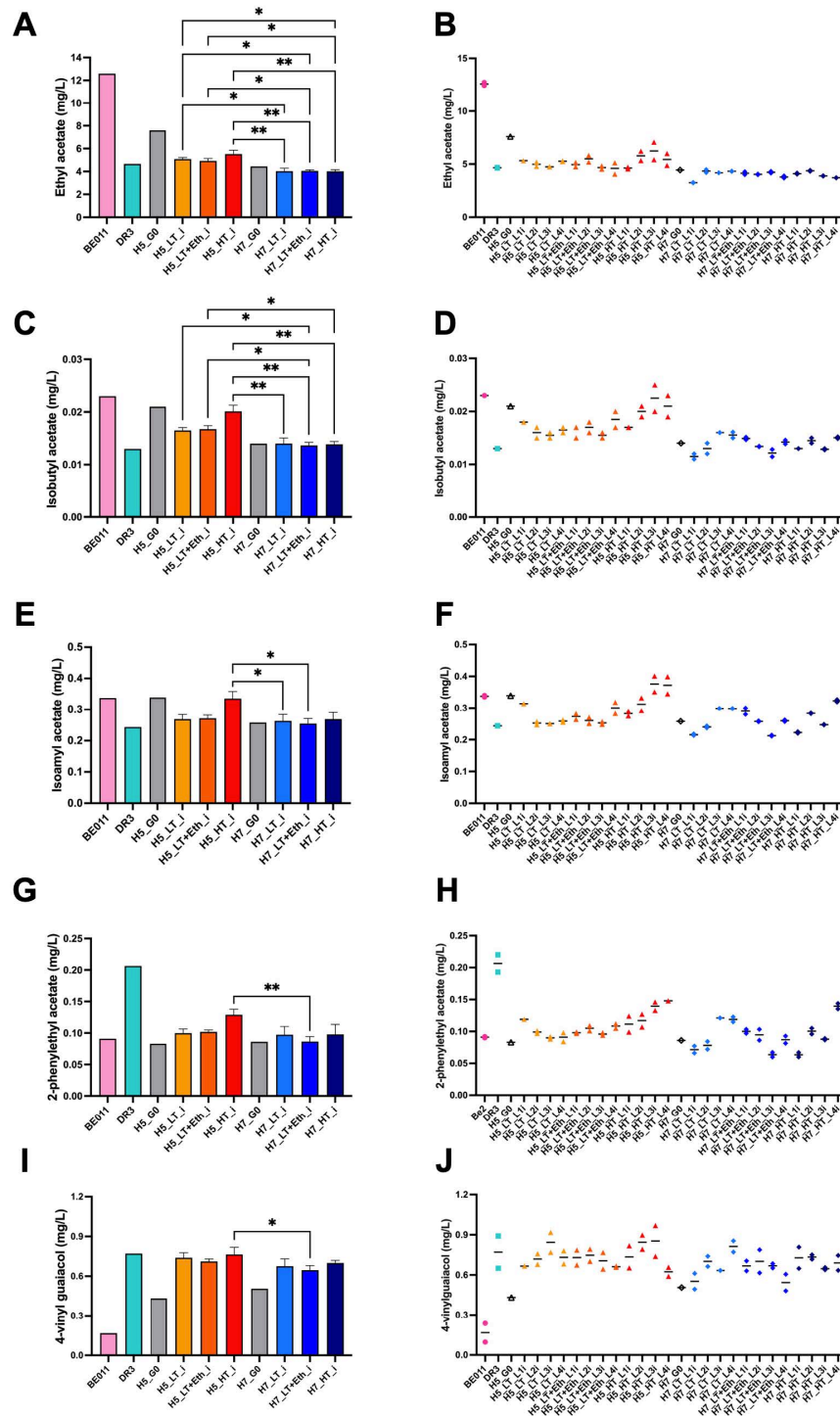


Figure 16 Production of acetate esters and 4-VG by stabilized isolates of H5 and H7. Production of ethyl acetate (A,B), isobutyl acetate (C,D), isoamyl acetate (E,F), 2-phenylethyl acetate (G,H) and 4-vinyl guaiacol (I,J) of the stabilized isolates of H5 (orange palette) and H7 (blue palette) is depicted. The parental strains BE011 (pink) and DR3 (turquoise), and non-stabilized hybrids H5_G0 and H7_G0 (grey) are also included. In A, C, E, G and I, the average of stabilized isolates of all 4 parallel lineages is given. In B, D, F, H and J, the technical replicates of each stabilized isolate are visualized. Statistical analyses were performed for A, C, E, G and I. The asterisk indicate the level of significance (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Lastly, we performed principal component analysis (PCA) to visualize the overall diversity in aroma production profiles of the stabilized isolates, which revealed several additional interesting trends (Figure 19). Firstly, the aroma profile of all stabilized isolates mainly resembled that of the *S. eubayanus* parent, especially those originating from H5. Secondly, stabilized isolates of H5 and H7 generally cluster separately, mainly because of differences in higher alcohols and acetate ester production. Thirdly, after stabilization, the aroma profile of the hybrids deviates from that of the respective non-stabilized hybrid (H5_G0 and H7_G0) (Figure 19A), with some stabilized isolates from H5 (e.g. H5_LT_L2i and H5_LT_L3i) starting to resemble those of H7. After excluding both parental strains and the non-stabilized hybrid from the PCA to increase separation of the stabilized isolates, H5_HT_L3i and H5_HT_L4i seemed to produce the most distinct aroma profile (Figure 19B). Interestingly, these were also the hybrids showing the increased ethanol production (Table 4), further indicating significant changes occurred in the metabolism of these stabilized isolates.

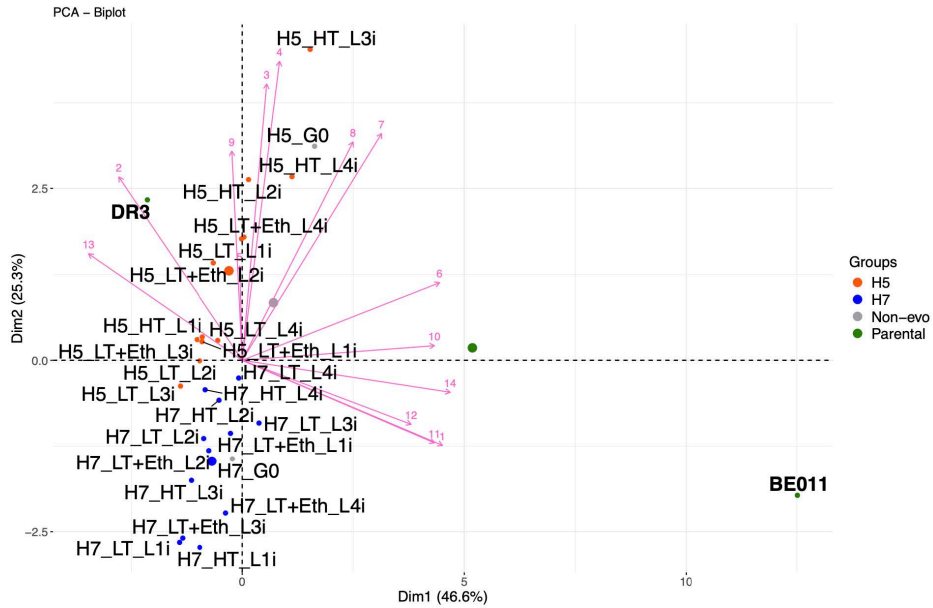
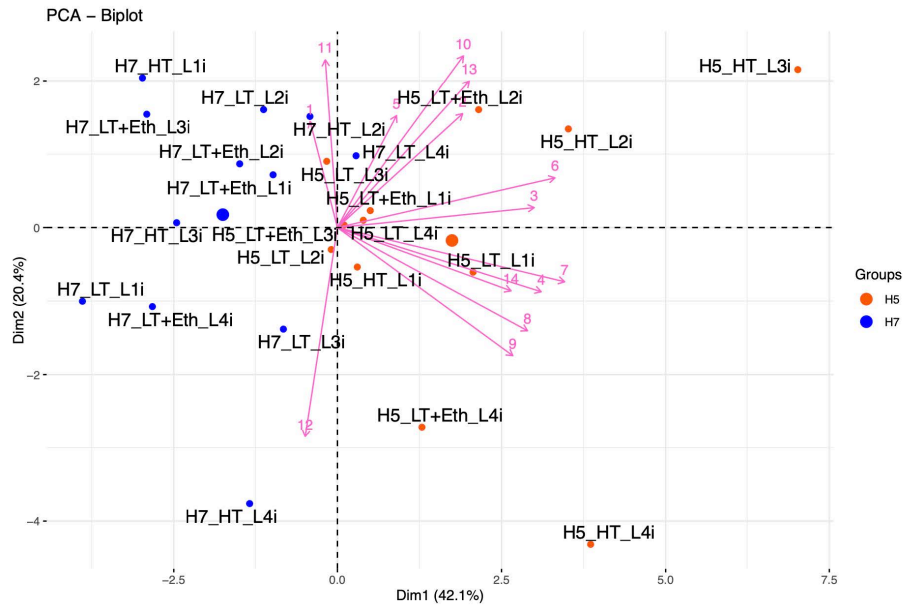
A**B**

Figura 17 Two-dimensional (2-D) principal component analysis (PCA) separated by Dim1 = PC1 and Dim2 = PC2. Visualization of the metabolite production of stabilized H5 and H7 lineages, non-stabilized hybrids and parental strains (A) and the metabolite production of only stabilized H5 and H7 lineages (B). The component scores for the 13 volatile compounds are depicted as pink lines numbered as follows: 1, propanol; 2, butanol; 3, isobutanol; 4, isoamyl alcohol; 5, 2-phenylethanol; 6, ethyl acetate; 7, isobutyl acetate; 8, isoamyl acetate; 9, 2-phenylethyl acetate; 10, ethyl butyrate; 11, ethyl hexanoate; 12, ethyl octanoate; 13, 4-vinyl guaiacol; 14, alcohol by volume (ABV). 2-D PCA (A) and (B) explained 71.9% and 62.5% of the total variance, respectively.

4 Discussion

The generation of interspecific hybrids that combine and improve specific properties of the parental strains is a promising strategy to obtain superior industrial yeast variants (Gallone et al., 2019; Steensels et al., 2021). So far, several studies have demonstrated the potential of exploiting the available biodiversity in parental species. Careful selection of parent yeast strains that show desirable characteristics often allows generating hybrids that not only combine different properties of the parents, but even excel in some of the phenotypes (“best parent heterosis”) (Bernardes et al., 2017; Chen et al., 2023; Krogerus, Magalhães, et al., 2017; Meersman et al., 2015; Wauters et al., 2022). Interestingly, apart from exploiting the biodiversity in parental strains, the genomic plasticity of newly formed interspecific hybrids creates an additional opportunity to generate diversity among hybrids (Brickwedde et al., 2017; Gorter De Vries et al., 2019; Krogerus et al., 2018; Lancaster et al., 2019; Piotrowski et al., 2012). In this study, we generated 7 new interspecific hybrids through spore-to-spore mating of the domesticated *S. cerevisiae* strain BE011 (ale yeast from the “Beer 2” clade, Gallone et al., 2016) and two newly isolated wild *S. eubayanus* strains from Chile. Spore-to-spore mating with *S. cerevisiae* strain (BE031, from the “Beer 1” clade) proved unsuccessful. This suggests that stronger pre- or postzygotic mating barriers might be present for certain strains, which agrees with previous reported results (Krogerus et al., 2015; Mertens et al., 2015; Pérez-Través et al., 2012).

As a study case, we focused on generating hybrids with new aroma profiles. Apart from general fermentation and aroma characteristics, we specifically focused on the production of 4-VG, an undesirable aroma compound that is formed by all newly generated *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* (lager) hybrids. Inspired by the fact that current industrial lager yeasts, which have been grown for hundreds of years since the hybridization event in the 16th century, have lost 4-VG production, we assessed whether specific genome stabilization procedures might cause changes in aroma profile in general, and 4-VG production in particular. We observed differences in aroma profile and 4-VG production between different stabilized isolates, with some showing lower 4-VG production. However, the stabilized isolates mostly showed an increase rather than decrease in 4-VG production compared to their non-stabilized ancestor (for example H5_HT_L4i, 44,4% increased). Further research is needed to elucidate if longer genome stabilization periods or different environments might better select for 4-VG negative

strains. Nevertheless, the levels of 4-VG produced by the stabilized isolates are suitable for specific brewing beer styles such as Belgian specialty beers and wheat beers (Langos et al., 2013; Vanbeneden et al., 2008).

Interestingly, our results do suggest that certain stabilization regimes might allow selecting for improved fermentation characteristics. Specifically, while most newly formed interspecific hybrids did not show improvement in ethanol production (likely caused by the known inability of *S. eubayanus* to metabolize maltotriose), two stabilized isolates of H5 (H5_HT_L3i and H5_HT_L4i) produced higher ethanol concentrations, caused by improved maltotriose utilization. Emergence of maltotriose utilization in *S. eubayanus* has been observed previously, caused by the emergence of specific transporters of maltotriose by recombination (Baker & Hittinger, 2019 and Brouwers et al., 2019). However, further studies are required to confirm if similar evolutionary events occurred in our hybrid lineages.

In addition, stabilized isolates showed differences in production of specific compounds compared to isolates stabilized in parallel, as well as compared to their parental strains. For example, H5_HT_L3i and H5_HT_L4i showed increased production of ethyl acetate, isobutyl acetate, isoamyl acetate and 2-phenylethyl acetate. This trend of increased acetate production after genome stabilization at increased temperature is intriguing. It has been suggested that fluidity of the plasma membrane (which is largely controlled by membrane lipid saturation) is affected by changes in temperature (Ferraz et al., 2021; Shinitzky & Henkart, 1979). At low temperature, the fluidity of the membrane is reduced and as a response, cells increase the degree of unsaturated fatty acids (Aguilera et al., 2007; B. R. Gibson et al., 2007), whereas the degree of unsaturation decreases at higher temperatures (Klose et al., 2012). Furthermore, it has been shown that high levels of unsaturated fatty acids repress the expression of *ATF1* and *ATF2* (alcohol acetyltransferases (AATase)) (Verstrepen et al., 2003), which catalyze the synthesis of acetate esters in *Saccharomyces* (Verstrepen et al., 2003). Therefore, it is tempting to speculate that the general trend of higher levels of the acetate esters in lineages evolved at high temperature (most notably H5_HT_L3i and H5_HT_L4i), can be explained by the lower levels of unsaturated fatty acids and subsequent increased gene expression of *ATF1* and *ATF2*.

In conclusion, by generating seven *de novo* interspecific yeast hybrids and stabilizing these in three different environmental conditions, we were able to demonstrate that diversity in the resulting hybrids is generated not only through the combination of the DNA of specific parental strains, but also during the mitotic cycles following the hybridization event. While we found that the overall effect of the different genome stabilization conditions that we used was rather subtle, we did find indications that genome stabilization at higher temperatures might increase acetate ester production, which could be a good strategy to produce strains for more fruity lager-type beers. Specifically, H5_HT_L3i and H5_HT_L4i might be the most interesting candidates due their 11,8% and 8,8% increase of isoamyl acetate production, and 3,1% and 3,6% increased ethanol production compared to their non-stabilized ancestor (H5_G0), while H5_HT_L4i also showed lower production of 4-VG in comparison to the other stabilized H5 isolates. However, whereas our study demonstrates the importance of the genome stabilization period for the development of the phenotypic characteristics of newly formed interspecific hybrids, several important questions merit further research. For example, incorporating current lager yeast strains could provide valuable insights into whether the adaptation speed is indeed accelerated in newly generated hybrids. Additionally, it would be interesting to investigate whether variation in hybrid ploidy influences adaptation, as ancestral lager strains were (likely) allotriploid or allotetraploid (Gallone et al., 2018). Moreover, following the genetic and phenotypic changes over a longer time, in more parallel lineages, and screening more isolates from each lineage, is needed to generate a better view on the extent, reproducibility and underlying molecular aspects of genome stabilization.

Acknowledgments

The authors thank Dr. Mario Aranda and Dr. Pedro Aqueveque for their help on technical issues to isolate the *Saccharomyces eubayanus* strains used in this work.

Conflict of Interest

The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

References

- Aguilera, J., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2007). Cold response in *Saccharomyces cerevisiae*: New functions for old mechanisms. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 31, Issue 3, pp. 327–341). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00066.x>
- Baker, E. C. P., & Hittinger, C. T. (2019). Evolution of a novel chimeric maltotriose transporter in *Saccharomyces eubayanus* from parent proteins unable to perform this function. *PLoS Genetics*, *15*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007786>
- Bernardes, J. P., Stelkens, R. B., & Greig, D. (2017). Heterosis in hybrids within and between yeast species. *Journal of Evolutionary Biology*, *30*(3), 538–548. <https://doi.org/10.1111/jeb.13023>
- Bing, J., Han, P. J., Liu, W. Q., Wang, Q. M., & Bai, F. Y. (2014). Evidence for a far east asian origin of lager beer yeast. In *Current Biology* (Vol. 24, Issue 10). Cell Press. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2014.04.031>
- Brickwedde, A., van den Broek, M., Geertman, J. M. A., Magalhães, F., Kuijpers, N. G. A., Gibson, B., Pronk, J. T., & Daran, J. M. G. (2017). Evolutionary engineering in chemostat cultures for improved maltotriose fermentation kinetics in *saccharomyces pastorianus* lager brewing yeast. *Frontiers in Microbiology*, *8*(SEP). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01690>
- Brouwers, N., Gorter de Vries, A. R., van den Broek, M., Weening, S. M., Elink Schuurman, T. D., Kuijpers, N. G. A., Pronk, J. T., & Daran, J. M. G. (2019). In vivo recombination of *Saccharomyces eubayanus* maltose-transporter genes yields a chimeric transporter that enables maltotriose fermentation. *PLoS Genetics*, *15*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007853>
- Chen, S., Perez-Samper, G., Herrera-Malaver, B., Zhu, L., Liu, Y., Steensels, J., Yang, Q., & Verstrepen, K. J. (2023). Breeding of New *Saccharomyces cerevisiae* Hybrids with Reduced Higher Alcohol Production for Light-Aroma-Type-Xiaoqu Baijiu Production. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *81*(2), 233–241. <https://doi.org/10.1080/03610470.2022.2033608>

- Christine, L. J., Marc, L., Catherine, D., Claude, E., Jean-Luc, L., Michel, A., & Isabelle, M. P. (2007). Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Research*, 7(4), 540–549. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2007.00207.x>
- Cimini, A., & Moresi, M. (2021). Circular economy in the brewing chain. In *Italian Journal of Food Science* (Vol. 33, Issue 3, pp. 47–69). Codon Publications. <https://doi.org/10.15586/ijfs.v33i3.2123>
- D'Angiolo, M., De Chiara, M., Yue, J. X., Irizar, A., Stenberg, S., Persson, K., Llored, A., Barré, B., Schacherer, J., Marangoni, R., Gilson, E., Warringer, J., & Liti, G. (2020). A yeast living ancestor reveals the origin of genomic introgressions. *Nature*, 587(7834), 420–425. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2889-1>
- Dunn, B., & Sherlock, G. (2008). Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Research*, 18(10), 1610–1623. <https://doi.org/10.1101/gr.076075.108>
- Eizaguirre, J. I., Peris, D., Rodríguez, M. E., Lopes, C. A., De Los Ríos, P., Hittinger, C. T., & Libkind, D. (2018). Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environmental Microbiology*, 20(10), 3732–3743. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14375>
- Ferraz, L., Sauer, M., Sousa, M. J., & Branduardi, P. (2021). The Plasma Membrane at the Cornerstone Between Flexibility and Adaptability: Implications for *Saccharomyces cerevisiae* as a Cell Factory. In *Frontiers in Microbiology* (Vol. 12). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.715891>
- Gallone, B., Mertens, S., Gordon, J. L., Maere, S., Verstrepen, K. J., & Steensels, J. (2018). Origins, evolution, domestication and diversity of *Saccharomyces* beer yeasts. In *Current Opinion in Biotechnology* (Vol. 49, pp. 148–155). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2017.08.005>
- Gallone, B., Steensels, J., Mertens, S., Dzialo, M. C., Gordon, J. L., Wauters, R., Theßeling, F. A., Bellinazzo, F., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Prahl, T., White, C., Hutzler, M., Meußdoerffer, F., Malcorps, P., Souffriau, B., Daenen, L., Baele, G., Maere, S., &

- Verstrepen, K. J. (2019). Interspecific hybridization facilitates niche adaptation in beer yeast. *Nature Ecology and Evolution*, 3(11), 1562–1575. <https://doi.org/10.1038/s41559-019-0997-9>
- Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., Merlevede, A., Roncoroni, M., Voordeckers, K., Miraglia, L., Teiling, C., Steffy, B., Taylor, M., Schwartz, A., Richardson, T., White, C., Baele, G., Maere, S., & Verstrepen, K. J. (2016). Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell*, 166(6), 1397-1410.e16. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>
- Gibson, B., & Liti, G. (2015). *Saccharomyces pastorianus*: Genomic insights inspiring innovation for industry. *Yeast*, 32(1), 17–27. <https://doi.org/10.1002/yea.3033>
- Gibson, B. R., Lawrence, S. J., Leclaire, J. P. R., Powell, C. D., & Smart, K. A. (2007). Yeast responses to stresses associated with industrial brewery handling. In *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 31, Issue 5, pp. 535–569). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00076.x>
- Gibson, B. R., Storgårds, E., Krogerus, K., & Vidgren, V. (2013). Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast*, 30(7), 255–266. <https://doi.org/10.1002/yea.2960>
- González, S. S., Barrio, E., Gafner, J., & Querol, A. (2006). Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 6(8), 1221–1234. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00126.x>
- González, S. S., Gallo, L., Climent, M. D., Barrio, E., & Querol, A. (2007). Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *International Journal of Food Microbiology*, 116(1), 11–18. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2006.10.047>
- Gorter De Vries, A. R., Voskamp, M. A., Van Aalst, A. C. A., Kristensen, L. H., Jansen, L., Van Den Broek, M., Salazar, A. N., Brouwers, N., Abeel, T., Pronk, J. T., & Daran, J. M. G. (2019). Laboratory evolution of a *Saccharomyces cerevisiae* × *S. eubayanus* hybrid under simulated lager-brewing conditions. *Frontiers in Genetics*, 10(MAR). <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00242>

- Hebly, M., Brickwedde, A., Bolat, I., Driessen, M. R. M., de Hulster, E. A. F., van den Broek, M., Pronk, J. T., Geertman, J. M., Daran, J. M., & Daran-Lapujade, P. (2015). *S. cerevisiae* × *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. *FEMS Yeast Research*, *15*(3), 1–14. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov005>
- Hutzler, M., Morrissey, J. P., Laus, A., Meussdoerffer, F., & Zarnkow, M. (2023). A new hypothesis for the origin of the lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. In *FEMS Yeast Research* (Vol. 23). Oxford University Press. <https://doi.org/10.1093/femsyr/foad023>
- Kellis, M., Patterson, N., Endrizzi, M., Birren, B., & Lander, E. S. (2003). *Sequencing and comparison of yeast species to identify genes and regulatory elements*. <http://genome-www.stanford.edu/Saccharomyces/>
- Klose, C., Surma, M. A., Gerl, M. J., Meyenhofer, F., Shevchenko, A., & Simons, K. (2012). Flexibility of a eukaryotic lipidome - insights from yeast lipidomics. *PLoS ONE*, *7*(4). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0035063>
- Krogerus, K., Arvas, M., De Chiara, M., Magalhães, F., Mattinen, L., Oja, M., Vidgren, V., Yue, J. X., Liti, G., & Gibson, B. (2016). Ploidy influences the functional attributes of de novo lager yeast hybrids. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(16), 7203–7222. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7588-3>
- Krogerus, K., Holmström, S., & Gibson, B. (2018). *Enhanced Wort Fermentation with De Novo Lager Hybrids Adapted to High-Ethanol Environments*. <https://doi.org/10.1128/AEM>
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., & Gibson, B. (2015). New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, *42*(5), 769–778. <https://doi.org/10.1007/s10295-015-1597-6>
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., & Gibson, B. (2017). Novel brewing yeast hybrids: creation and application. In *Applied Microbiology and Biotechnology* (Vol. 101, Issue 1, pp. 65–78). Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-8007-5>
- Krogerus, K., Seppänen-Laakso, T., Castillo, S., & Gibson, B. (2017). Inheritance of brewing-relevant phenotypes in constructed *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. *Microbial Cell Factories*, *16*(1). <https://doi.org/10.1186/s12934-017-0679-8>

- Kunicka-Styczyńska, A., & Rajkowska, K. (2011). Physiological and genetic stability of hybrids of industrial wine yeasts *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Applied Microbiology*, *110*(6), 1538–1549. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2011.05009.x>
- Lancaster, S. M., Payen, C., Heil, C. S., & Dunham, M. J. (2019). Fitness benefits of loss of heterozygosity in *Saccharomyces* hybrids. *Genome Research*, *29*(10), 1685–1692. <https://doi.org/10.1101/gr.245605.118>
- Langos, D., Granvogl, M., & Schieberle, P. (2013). Characterization of the key aroma compounds in two Bavarian wheat beers by means of the sensomics approach. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, *61*(47), 11303–11311. <https://doi.org/10.1021/jf403912j>
- Libkind, D., Hittinger, C. T., Valefio, 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>
- Liti, G., Peruffo, A., James, S. A., Roberts, I. N., & Louis, E. J. (2005). Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, *22*(3), 177–192. <https://doi.org/10.1002/yea.1200>
- Liu, L., Wang, J., Rosenberg, D., Zhao, H., Lengyel, G., & Nadel, D. (2018). Fermented beverage and food storage in 13,000 y-old stone mortars at Raqefet Cave, Israel: Investigating Natufian ritual feasting. *Journal of Archaeological Science: Reports*, *21*, 783–793. <https://doi.org/10.1016/j.jasrep.2018.08.008>
- Lopes, C. A., Barrio, E., & Querol, A. (2010). Natural hybrids of *S. cerevisiae* × *S. kudriavzevii* share alleles with European wild populations of *Saccharomyces kudriavzevii*: RESEARCH ARTICLE. *FEMS Yeast Research*, *10*(4), 412–421. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00614.x>
- Marcet-Houben, M., & Gabaldón, T. (2015). Beyond the whole-genome duplication: Phylogenetic evidence for an ancient interspecies hybridization in the baker's yeast lineage. *PLoS Biology*, *13*(8). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1002220>

- Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J., & Dubourdieu, D. (1998). New Hybrids between *Saccharomyces Sensu Stricto* Yeast Species Found among Wine and Cider Production Strains. In *APPLIED AND ENVIRONMENTAL MICROBIOLOGY* (Vol. 64, Issue 10).
- Meersman, E., Steensels, J., Paulus, T., Struyf, N., Saels, V., Mathawan, M., Koffi, J., Vrancken, G., & Verstrepen, K. J. (2015). Breeding strategy to generate robust yeast starter cultures for cocoa pulp fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(18), 6166–6176. <https://doi.org/10.1128/AEM.00133-15>
- Mertens, S., Steensels, J., Gallone, B., Souffriau, B., Malcorps, P., & Verstrepen, K. J. (2017). Rapid screening method for phenolic off-flavor (POF) production in yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, *75*(4), 318–323. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2017-4142-01>
- Mertens, S., Steensels, J., Saels, V., De Rouck, G., Aerts, G., & Verstrepen, K. J. (2015). A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Applied and Environmental Microbiology*, *81*(23), 8202–8214. <https://doi.org/10.1128/AEM.02464-15>
- Michel, R. H., McGovern, P. E., & Badler, V. R. (1992). Chemical evidence for ancient beer. *Nature*, *360*(6399), 24–24. <https://doi.org/10.1038/360024b0>
- Monerawela, C., James, T. C., Wolfe, K. H., & Bond, U. (2015). Loss of lager specific genes and subtelomeric regions define two different *Saccharomyces cerevisiae* lineages for *Saccharomyces pastorianus* Group I and II strains. *FEMS Yeast Research*, *15*(2). <https://doi.org/10.1093/femsyr/fou008>
- Morales, L., & Dujon, B. (2012). Evolutionary Role of Interspecies Hybridization and Genetic Exchanges in Yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, *76*(4), 721–739. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00022-12>
- Mozzachiodi, S., Tattini, L., Llored, A., Irizar, A., Škofljanc, N., D'Angiolo, M., De Chiara, M., Barré, B. P., Yue, J. X., Lutazi, A., Loeillet, S., Laureau, R., Marsit, S., Stenberg, S., Albad, B., Persson, K., Legras, J. L., Dequin, S., Warringer, J., ... Liti, G. (2021). Aborting meiosis allows recombination in sterile diploid yeast hybrids. *Nature Communications*, *12*(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-021-26883-8>

- Muir, A., Harrison, E., & Wheals, A. (2011). A multiplex set of species-specific primers for rapid identification of members of the genus *Saccharomyces*. *FEMS Yeast Research*, *11*(7), 552–563. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2011.00745.x>
- Mukai, N., Masaki, K., Fujii, T., Kawamukai, M., & Iefuji, H. (2010). PAD1 and FDC1 are essential for the decarboxylation of phenylacrylic acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, *109*(6), 564–569. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2009.11.011>
- Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M., & Ashikari, T. (2009). Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research*, *16*(2), 115–129. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsp003>
- Okuno, M., Kajitani, R., Ryusui, R., Morimoto, H., Kodama, Y., & Itoh, T. (2015). Next-generation sequencing analysis of lager brewing yeast strains reveals the evolutionary history of interspecies hybridization. *DNA Research*, *23*(1), 67–80. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsv037>
- Pengelly, R. J., & Wheals, A. E. (2013). Rapid identification of *Saccharomyces eubayanus* and its hybrids. *FEMS Yeast Research*, *13*(2), 156–161. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12018>
- Pérez-Través, L., Lopes, C. A., Barrio, E., & Querol, A. (2012). Evaluation of different genetic procedures for the generation of artificial hybrids in *Saccharomyces* genus for winemaking. *International Journal of Food Microbiology*, *156*(2), 102–111. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.03.008>
- Pérez-Través, L., Lopes, C. A., Barrio, E., & Querol, A. (2015). Stabilization process in *Saccharomyces* intra- and interspecific hybrids in fermentative conditions. *International Microbiology*, *17*(4), 213–224. <https://doi.org/10.2436/20.1501.01.224>
- Peris, D., Lopes, C. A., Belloch, C., Querol, A., & Barrio, E. (2012). Comparative genomics among *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* natural hybrid strains isolated from wine and beer reveals different origins. *BMC Genomics*, *13*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-407>

- Peris, D., Pérez-Torrado, R., Hittinger, C. T., Barrio, E., & Querol, A. (2018). On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *Yeast*, *35*(1), 51–69. <https://doi.org/10.1002/yea.3283>
- Piotrowski, J. S., Nagarajan, S., Kroll, E., Stanbery, A., Chiotti, K. E., Kruckeberg, A. L., Dunn, B., Sherlock, G., & Rosenzweig, F. (2012). Different selective pressures lead to different genomic outcomes as newly-formed hybrid yeasts evolve. *BMC Evolutionary Biology*, *12*(1). <https://doi.org/10.1186/1471-2148-12-46>
- Shinitzky, M., & Henkart, P. (1979). Fluidity of Cell Membranes—Current Concepts and Trends. *International Review of Cytology*, *60*(C), 121–147. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)61261-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)61261-9)
- Smukowski Heil, C. S., DeSevo, C. G., Pai, D. A., Tucker, C. M., Hoang, M. L., & Dunham, M. J. (2017). Loss of Heterozygosity Drives Adaptation in Hybrid Yeast. *Molecular Biology and Evolution*, *34*(7), 1596–1612. <https://doi.org/10.1093/molbev/msx098>
- Smukowski Heil, C. S., Large, C. R. L., Patterson, K., Hickey, A. S. M., Yeh, C. L. C., & Dunham, M. J. (2019). Temperature preference can bias parental genome retention during hybrid evolution. *PLoS Genetics*, *15*(9). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1008383>
- Statista. 2024. Beer production worldwide from 1998 to 2022. Available at: <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>. (n.d.).
- Steensels, J., Gallone, B., & Verstrepen, K. J. (2021). Interspecific hybridization as a driver of fungal evolution and adaptation. *Nature Reviews Microbiology*, *19*(8), 485–500. <https://doi.org/10.1038/s41579-021-00537-4>
- Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2014). Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. In *Annual Review of Microbiology* (Vol. 68, pp. 61–80). Annual Reviews Inc. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-091213-113025>
- van den Broek, M., Bolat, I., Nijkamp, J. F., Ramos, E., Luttik, M. A. H., Koopman, F., Geertman, J. M., de Ridder, D., Pronk, J. T., & Daran, J. M. (2015). Chromosomal copy number variation in *Saccharomyces pastorianus* is evidence for extensive genome dynamics

in industrial lager brewing strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 81(18), 6253–6267. <https://doi.org/10.1128/AEM.01263-15>

Vanbeneden, N., Gils, F., Delvaux, F., & Delvaux, F. R. (2008). Formation of 4-vinyl and 4-ethyl derivatives from hydroxycinnamic acids: Occurrence of volatile phenolic flavour compounds in beer and distribution of Pad1-activity among brewing yeasts. *Food Chemistry*, 107(1), 221–230. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2007.08.008>

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* (Vol. 96, Issue 2).

Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. M. P., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., & Delvaux, F. R. (2003). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes ATF1, Lg-ATF1, and ATF2 control the formation of a broad range of volatile esters. *Applied and Environmental Microbiology*, 69(9), 5228–5237. <https://doi.org/10.1128/AEM.69.9.5228-5237.2003>

Walther, A., Hesselbart, A., & Wendland, J. (2014). Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the world's first pure culture lager yeast. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 4(5), 783–793. <https://doi.org/10.1534/g3.113.010090>

Wauters, R., Herrera-Malaver, B., Schreurs, M., Bircham, P., Cautereels, C., Cortebeek, J., Duffin, P. M., Steensels, J., & Verstrepen, K. J. (2022). Novel *Saccharomyces cerevisiae* variants slow down the accumulation of staling aldehydes and improve beer shelf-life. *Food Chemistry*, 398. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133863>

Capítulo II Sección 2: Supplementary Materials

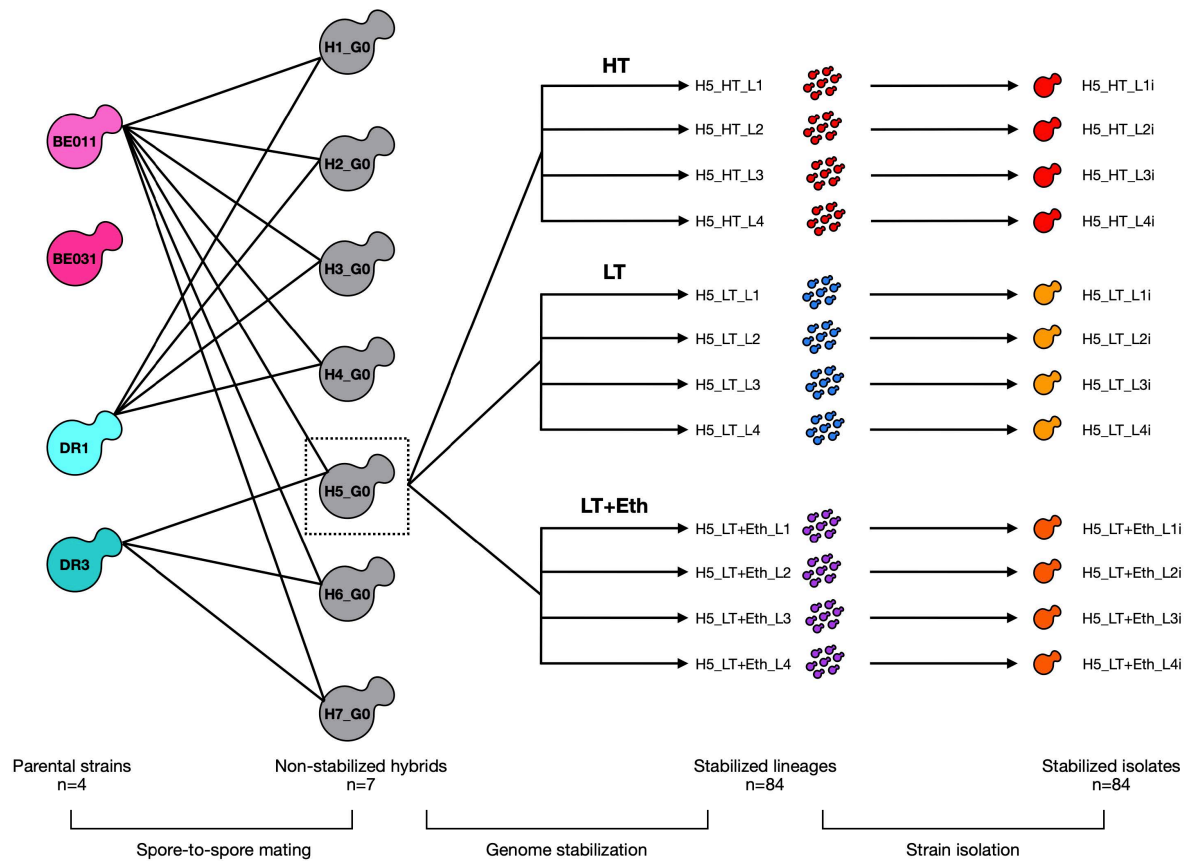


Figura 18 Interspecific hybridization and genome stabilization procedure. First, two *S. cerevisiae* strains (BE011 and BE031) were crossed with two *S. eubayanus* strains (DR1 and DR3) through spore-to-spore mating to generate seven newly formed interspecific hybrids (H1-H7_G0). Then, four parallel lines from these hybrids were submitted to three different genome stabilization conditions: high temperature (HT), low temperature (LT) and low temperature with ethanol 8% v/v (LT+Eth). Later, the ferulic acid consumption from the stabilized hybrids pools was assessed and stabilized hybrids clones were selected for fermentation in lager-like brewing conditions.

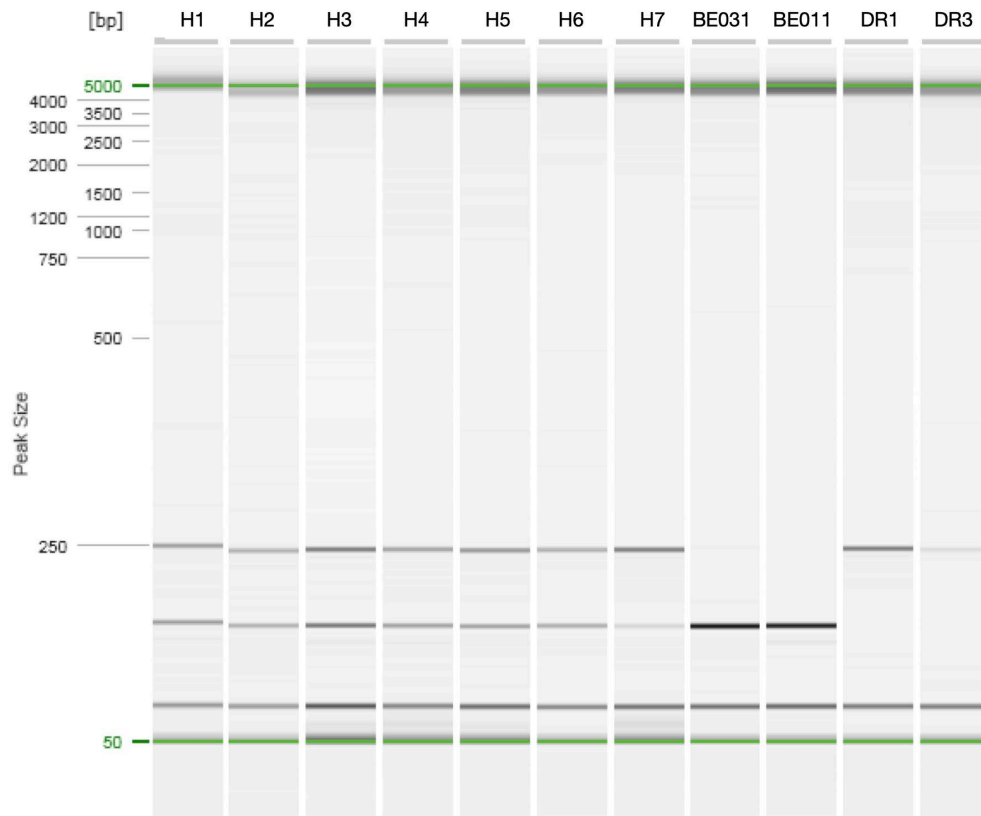


Figura 19 Species-specific PCR. Species-specific PCR shows bands at 150 and 250 bp corresponding to *S. cerevisiae* and *S. eubayanus*, respectively. The seven new interspecific hybrids H1 to H7 showed the bands of both parental species.

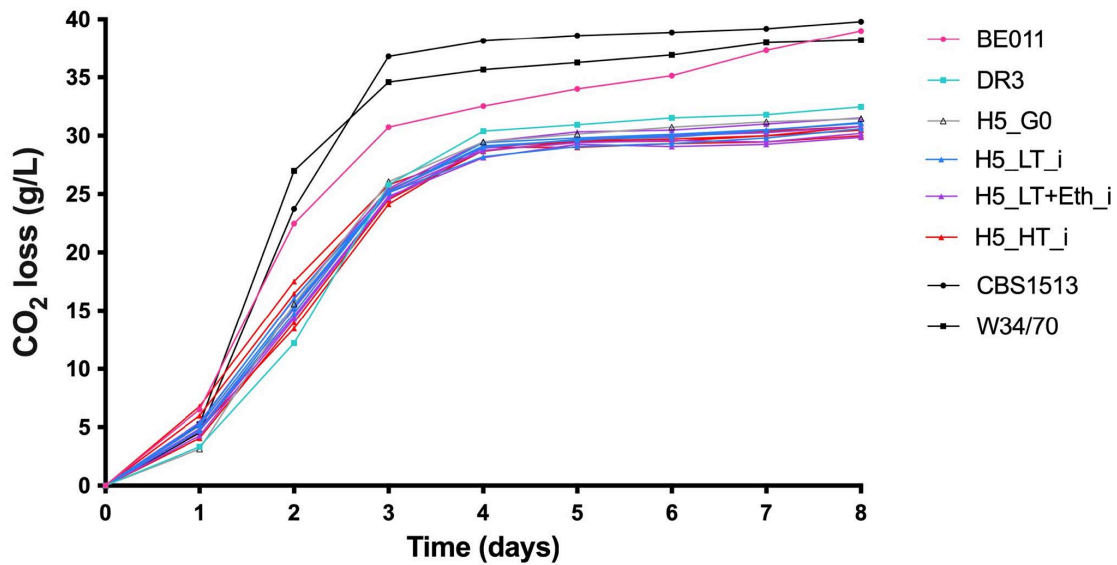
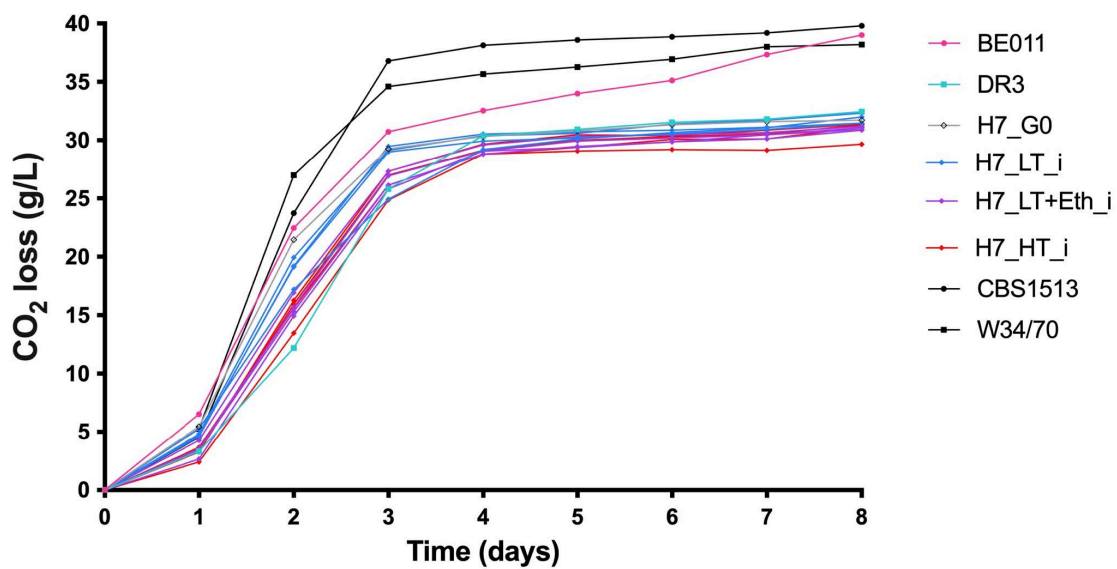
A**B**

Figure 20 Fermentation kinetics of H5 and H7. The weight loss (indicative of CO₂ production) of the individual lines of the interspecific hybrids H5 (colored triangles) (A) and H7 (colored diamonds) (B) after evolved in different environmental conditions: LT (blue), LT+Eth (purple) and HT (red) and non-devolved (uncolored); the parental strains *S. cerevisiae* BE011 (pink circle) and *S. eubayanus* DR3 (turquoise square); and the *S. pastorianus* reference strains Saaz (black circle) and Frohberg (black square) were daily monitored during 8 days.

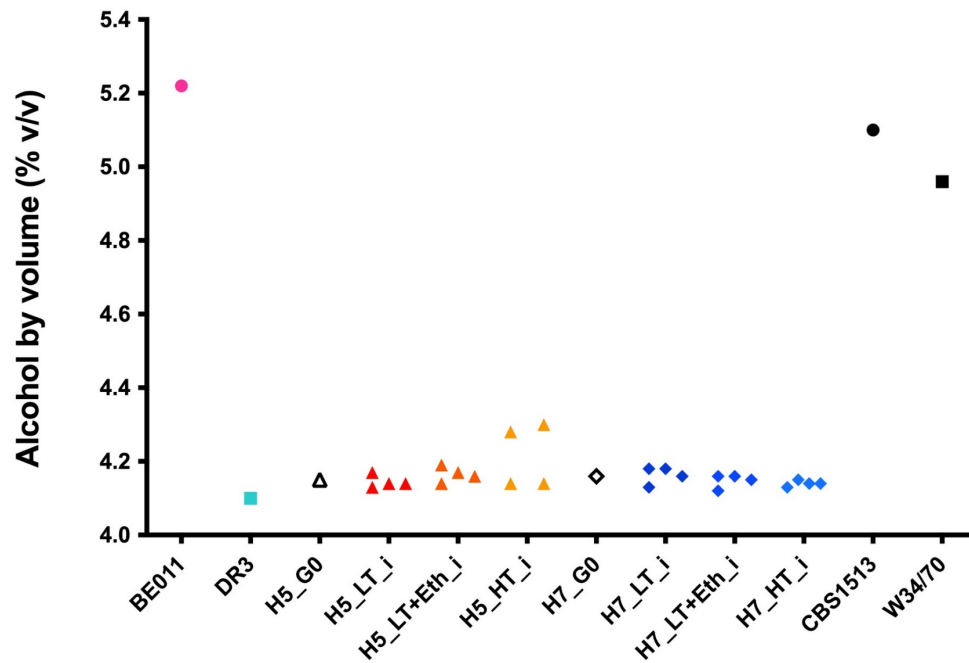


Figura 21 Alcohol by volume (ABV) produced by interspecific hybrids. The figure shows the ABV produced during fermentation by the interspecific hybrids after being exposed to three different environmental conditions: H5 (orange palette) and H7 (blue palette). The production of the non-volved hybrids (uncolored); the parental strains *S. cerevisiae* (pink) and *S. eubayanus* (turquoise); and the *S. pastorianus* reference strains Saaz (black circle) and Frohberg (black square) were also measured at the end of the fermentation.

Table 4

Remaining sugars profile and ethanol production after fermentation of H5 isolates stabilized in HT. BE011 and DR3 are the *S. cerevisiae* and *S. eubayanus* parental strains, respectively. H5_G0 corresponds to H5 prior to genome stabilization. CBS1513 and W34/70 are reference strains of Saaz- and Frohberg-type lager yeasts, respectively.

	Glucose (g/L)	Sucrose (g/L)	Maltose (g/L)	Maltotriose (g/L)	Ethanol (% v/v)
H5_HT_L1i	0.239	0.113	0.062	14.523	4.14
H5_HT_L2i	0.228	0.083	0.069	14.579	4.14
H5_HT_L3i	0.213	0.075	0.063	12.904	4.28
H5_HT_L4i	0.228	0.089	0.068	12.624	4.30
BE011	0.317	0.152	0.037	1.532	5.22
DR3	0.268	0.118	0.066	14.378	4.10
H5_G0	0.258	0.072	0.059	15.002	4.15
CBS1513	0.198	0.102	0.053	4.783	5.10
W34/70	0.245	0.131	0.050	6.050	4.96

CAPÍTULO III: Conclusiones finales

Conclusiones

En base a los resultados obtenidos a partir de la presente tesis doctoral y su relación con el potencial uso de levaduras aisladas desde la región del Bio-Bio así como su contribución a la industria cervecera para el desarrollo de productos novedosos y diferenciadores en el mercado, es posible mencionar lo siguiente:

1.- Levaduras salvajes de distintos géneros (*Saccharomyces*, *Teunomyces*, *Metschnikowia*, *Aureobasidium*, *Yamadazyma*) fueron recolectadas y aisladas desde distintas frutas (cereza, guinda, distintas variedades de uvas, arrayán, arándanos y maqui) y un parásito estricto (digüeño). De esta forma, queda en evidencia la amplia y variada riqueza de levaduras salvajes que están presentes en localidades cercanas a nuestra casa de estudios.

2.- *Saccharomyces eubayanus* demostró ser la levadura con mayor similitud respecto a las levaduras comerciales utilizadas en la industria cervecera. Sin embargo, nuestros resultados también demuestran que las levaduras salvajes *no-Saccharomyces* tienen un potencial uso para la elaboración de cervezas con bajo contenido de alcohol. Específicamente, las levaduras *Metschnikowia pulcherrima* y *Teunomyces cretensis*, demostraron tener un perfil de los parámetros evaluados interesante para la industria cervecera.

3.- La generación de híbridos inter-especie a partir de la cruce entre esporas de levaduras salvajes de *Saccharomyces eubayanus* y esporas de levadura domesticadas de *Saccharomyces cerevisiae* demostró que existen combinaciones cepa-dependientes que lograron superar las barreras pre-cigóticas y post-cigóticas de manera exitosa.

4.- Se demostró que durante los primeros estadios posterior a la generación de los híbridos inter-especie, éstos poseen una plasticidad genómica que les permite adaptarse a las distintas condiciones durante el procedimiento de estabilización del genoma a las que fueron expuestas de manera temprana durante las primeras 30 generaciones.

5.- Se demostró que la diversidad fenotípica observada en los híbridos inter-especie fue generada no solamente a través de la combinación del ADN de las cepas parentales en específico, sino también durante el proceso de estabilización del genoma en las tres condiciones medioambientales diferentes que fueron evaluadas. Además, se observó que la estabilización del genoma en condiciones de mayor temperatura tiene relación con un aumento sobre la producción de ésteres de acetato, lo cual podría resultar en una estrategia

útil para la producción de cepas de levaduras con un perfil más afrutado para cervezas de tipo lager.

6.- Los resultados obtenidos en esta investigación evidencian el potencial de las levaduras salvajes para la generación de productos con características únicas y distintivas en la industria cervecera. Además, estos hallazgos amplían el abanico de posibilidades para el uso de levaduras salvajes tanto en cultivos monoclonales como en cultivos mixtos, así como para el mejoramiento de levaduras industriales mediante la generación de híbridos intraespecíficos e interespecíficos, en combinación con la exposición temprana a condiciones ambientales selectivas. Estos enfoques no solo demuestran su potencial uso industrial en la cervecería, sino que también podrían ser aplicables en otras industrias basadas en procesos de fermentación, tales como la vitivinícola, panadera, quesera, de la sidra, del cacao y de biocombustibles, tanto a nivel nacional como en países vecinos.