

FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS
Departamento de Ciencias Biológicas



**UNIVERSIDAD
NACIONAL
DE LA PLATA**

Tesis doctoral

**Estudio de las propiedades tecnológicas, antimicrobianas,
antifúngicas y secuestrantes de aflatoxina
de los subproductos de la industria cervecera artesanal
y su potencial como aditivo en la alimentación para aves**

Tesista	Lic. Sofía Sampaolesi
Directora	Dra. Ángela M. León Peláez
Co Directora	Dra. Graciela L. De Antoni

Agradecimientos

A mi familia, por todo. Especialmente a Lu y Fran, mis hermanxs, compañerxs de camino.

A la Dra. Ángela León y la Dra. Graciela De Antoni, por darme la oportunidad de realizar este doctorado, por su buena predisposición a escuchar propuestas e ideas y por su guía, que enriquecieron mi formación.

A Rulo, por su excelente tutoría en los años que compartimos el laboratorio, por su “oreja” y su buen consejo. Que alegría que vuelvas, te extrañamos.

A la Profesora Investigadora Dra. Amparo Querol Simón, responsable del laboratorio 307 del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA-CSIC), por su generosidad al recibirme de estadía, al brindarme su tiempo, al compartir sus conocimientos y experiencia conmigo, tan importantes en la concreción de esta tesis. Por hacerme sentir parte de su grupo desde el primer día.

A todas y todos lxs maravillosxs compañerxs que conocí allí, Dolo, AnaCris, Thelma, Sebas, Javi, Lainy, Peris, Inés, Jessi, Carla, y a quienes ya conocía, Ceci y Cande, por los momentos compartidos dentro y fuera del laboratorio, por los almuerzos, asados, paellas, viajes y salidas. Tengo el mejor recuerdo de ustedes, espero encontrarnos pronto.

Muy especialmente a Roberto y Laura, por su guía cotidiana en el IATA y por animarme a seguir indagando y haciendo nuevos experimentos, por su excelente predisposición para enseñar, por su ayuda en la discusión de resultados. Por los momentos “de oficina” compartidos con Laura. Por abrirnos las puertas de su casa y por esa paella buenísima, a Roberto.

A la Profesora Laura Briand y los compañeros docentes de la comisión 9, Facu, Maxi, Juan y Juani. Por su sostén fundamental durante el año más duro, ustedes fueron imprescindibles. Por la vocación docente que compartimos, que trabajamos, que discutimos y maduramos juntxs. Especialmente a Laura, por trabajar con tanto compromiso y alegría, por contegarlos.

A las y los amigxs presentes a cada paso, en los buenos momentos y en el más difícil. A Carli, Celi, Jorge, Caro, Flor, Tulio, Mari, Pau, Loli, Mary, Aye, Guille y Silvi. Por la diversión y la desconexión, tan necesarias. Por el aguante. A Jorge y a Lu por mi ahijada hermosa Emi.

A mis médicxs, Fernanda, Ezequiel y Diego, por su buen criterio, su prudencia y diligencia, sus palabras contenedoras y de esperanza. Sobre todo, por su humanidad. A Cleli, por su contención, su cuidado y sus manos prodigiosas y amorosas. Gracias eternas a todxs por devolverme la salud.

A lxs compañerxs becarixs e investigadores del grupo de microbiología de la Cátedra de Microbiología General y del CIDCA-CONICET, Lina, Caro, Manu, Feli, Sabri, Agus, Meli, Vero, Simón, Anita, Ceci, Matías, Mariano y Marina. Por la mesada, los mates y los almuerzos compartidos. A Rober, María, Gaby, Fernando, Fernanda, Jessica y Pablo, por sus consejos y asistencia durante estos años.

Al grupo de secado del CIDCA, especialmente a Martin Torres, por su excelente predisposición y amabilidad.

A Ana Clara Sabione, por su amabilidad y asistencia en el laboratorio.

Al Programa de Extensión en Alimentos y Salud (PEAS-Facultad de Cs. Exactas), por propiciar los espacios y vínculos para que propuestas de tesis como ésta puedan desarrollarse en la universidad. Al grupo de extensionistas del Proyecto de Levaduras Cerveceras, especialmente a los productores artesanales, quienes contribuyeron con sus inquietudes y proporcionaron las muestras de levaduras, fundamentales para realizar este trabajo.

Al Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas, por sostener económicamente mis estudios. A mi país, por apostar a la formación de científicas y científicos y a la soberanía científico-tecnológica.

A la Comisión de Investigaciones Científicas de la Pcia. de Buenos Aires, por financiar el proyecto de investigación en el que se enmarcó la presente tesis.

A la Universidad pública, por brindar formación profesional de excelencia y accesible, por el orgullo que representa para el pueblo argentino. Especialmente a mi casa de estudios, la Universidad Nacional de La Plata, que me permitió obtener los títulos de grado, especialización y formarme como doctora. A quienes fueron mis docentes y a la comunidad universitaria, por lo vivido, por lo aprendido, por el amor y compromiso con mi país que imprimió el paso por estas aulas. Gracias.

Trabajos publicados en revistas científicas y congresos en el marco de la presente tesis:

Potentiality of yeasts obtained as beer fermentation residue to be used as probiotics

S. Sampaolesi, R. R. Gamba, G. L. De Antoni, A. M. León Peláez.
LWT - Food Science and Technology, 113, 108251. 2019.

Potentiality of yeast strains isolated from beer starters and brewing fermentation residues to be used as probiotics

S. Sampaolesi; R. R. Gamba; G. L. De Antoni; A. M. León Peláez.
Libro de Resúmenes (*Book of Abstracts*) del 34th International Specialized Symposium on Yeasts (ISSY34). Pp. 180-181. Con referato. San Carlos de Bariloche, 1 a 4 de Octubre de 2018.

Estudio de la inhibición fúngica, la capacidad de captura de AFB₁ y el efecto citoprotector de levaduras recuperadas de la producción microcervecera

S. Sampaolesi; G.L. De Antoni; A. M. León Peláez.
Libro de Resúmenes de las I Jornadas de Aplicaciones Biotecnológicas de Hongos y Levaduras. Libro digital. Pp. 15. Con referato. Montevideo, Uruguay, Noviembre de 2017.

Estudio de la capacidad de captura de AFB₁ y del efecto citoprotector de levaduras recuperadas de la producción microcervecera

S. Sampaolesi; R. Gamba-Villarroel; C. Valiente-Dmitruk; G. De Antoni; A. M. León-Peláez.
Libro de Resúmenes del IX Congreso Latinoamericano de Micología. Libro digital. Con referato. Lima, Perú, Agosto de 2017.

Caracterización *in vitro* de la tolerancia a las condiciones gastrointestinales del tracto de pollos de levaduras aisladas del subproducto de la industria cervecera

S. Sampaolesi; S. Mongi; G.L. De Antoni; A. M. León Peláez.
Libro de Resúmenes del XXIII Congreso Latinoamericano de Microbiología y XIV Congreso Argentino de Microbiología. Pp. 534. Con referato. Rosario, 26 a 30 de Septiembre de 2016.

Aislamiento y caracterización de levaduras para la construcción de un Banco de Levaduras Cerveceras. Estudios de floculación y criotolerancia

V. C. Borromelli, S. Sampaolesi, S. Mongi, V. Monopoli, P. De Urraza, G. De Antoni, A. León Peláez.
Libro de Resúmenes del IV Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (SAProBio). Libro digital, ISBN 978-987-558-428-0, pp. 274. Con referato. Centro Metropolitano de Diseño, CABA; 1 y 2 de Diciembre de 2016.

Índice

Abreviaturas	11
Contexto	12
Resumen	14
1 Introducción General	17
1.1 Producción avícola en Argentina	19
1.2 Nutrición de pollos de engorde	19
1.3 Riesgos sanitarios en la producción avícola	21
1.3.1 Riesgo de presencia de hongos micotoxigénicos en el alimento de pollos	21
1.3.2 Riesgo de micotoxicosis de aves	22
1.3.2.1 Aflatoxinas	24
1.3.3 Riesgo por enteropatógenos	25
1.4 Empleo de promotores de crecimiento en la producción avícola	27
1.5 Los probióticos como promotores de crecimiento de pollos	28
1.6 Levaduras probióticas	29
1.6.1 Levaduras <i>Saccharomyces</i> sp. potenciales probióticas	30
1.6.2 Levaduras no <i>Saccharomyces</i> sp. potenciales probióticas	31
1.7 Levaduras en la dieta de aves de cría	32
1.8 Levaduras como agentes biocontroladores de hongos filamentosos	33
1.9 Levaduras como agentes secuestrantes de micotoxinas	36
1.10 La levadura cervecera	37
1.10.1 Estilos de cerveza y el rol de las levaduras	38
1.11 El género <i>Saccharomyces</i>	39
1.11.1 Especies del género	39
1.11.2 Híbridos interespecíficos <i>Saccharomyces</i>	40
1.11.3 Caracterización taxonómica por métodos clásicos	41
1.11.4 Identificación de levaduras cerveceras por métodos moleculares	42
1.12 Levaduras no convencionales en la producción cervecera	44
1.12.1 <i>Saccharomyces no-cerevisiae</i> e híbridos interespecíficos <i>Saccharomyces</i>	45

1.12.2 Otros géneros de levaduras en la producción de cerveza	46
1.13 La fermentación del mosto de cebada por <i>Saccharomyces</i> sp.	48
1.13.1 Fase de latencia	48
1.13.2 Fase de crecimiento exponencial	49
1.13.3 Fase estacionaria	51
1.14 Mercado y consumo de cerveza	52
1.15 El residuo de levaduras subproducto de la elaboración de cerveza	54
Justificación del estudio	55
2.1 Objetivo General	58
2.2 Objetivos específicos	58
3 Materiales y métodos	59
3.1 Lodos cerveceros, <i>starters</i> y productos de fermentación de kefir de agua empleados en la etapa de aislamiento	60
3.1.1 Lodos subproducto de la fermentación cervecera	60
3.1.2 <i>Starters</i> cerveceros comerciales	60
3.1.3 <i>Starters</i> cerveceros líquidos	60
3.1.4 Kefir de agua	60
3.2 Microorganismos, líneas celulares y condiciones de cultivo	61
3.2.1 Patógenos bacterianos	61
3.2.2 Hongos filamentosos	61
3.2.3 Líneas celulares	61
3.3 Medios de cultivo y soluciones	62
3.4 Aislamiento de colonias de levaduras de morfología macroscópica diferencial	66
3.5 Identificación de los aislamientos por PCR y secuenciación	68
3.5.1 Extracción de ADN total	68
3.5.2 Amplificación de las regiones ITS1-ITS2 y D1/D2	68
3.5.3 Secuenciación de los amplicones e identificación	68
3.6 Diferenciación a nivel cepa por RFLP del ADN mitocondrial (ADNmt-RFLP)	69
3.6.1 Extracción de ADN total	69
3.6.2 Digestión enzimática y revelado por electroforesis en gel de agarosa	70
3.7 Identificación de cepas fermentadoras obligadas	70
3.8 Identificación de híbridos inter-específicos por RFLP de genes seleccionados	71
3.8.1 Extracción de ADN total y amplificación	71
3.8.2 Digestión enzimática de los amplicones	72
3.8.3 Identificación a nivel especie	72

3.9 Estudio de parámetros cinéticos de crecimiento en distintos medios	74
3.9.1 Cinéticas de crecimiento en microplaca	74
3.9.2 Modelo matemático de crecimiento microbiano y cálculo de los parámetros de crecimiento	74
3.9.3 Medios de cultivo ensayados	75
3.10 Micro-fermentaciones en mosto cervecero	75
3.10.1 Formulación del mosto cervecero	75
3.10.2 Pre-inóculo y siembra del mosto	75
3.10.3. Micro-fermentaciones	76
3.10.4 Determinación del contenido azúcares, glicerol, etanol y ácidos orgánicos del producto fermentado mediante HPLC	77
3.10.5 Construcción de la curva de fermentación y análisis estadístico	77
3.11 Tolerancia al pasaje por pH estomacal e intestinal de pollos (en suspensión de solución fisiológica)	77
3.12 Determinación de la resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos <i>in vitro</i> (temperatura, pH, enzimas digestivas y bilis)	78
3.12.1 Preparación de soluciones gástrica e intestinal	78
3.12.2 Incubaciones en soluciones del TGI de pollos simulado	78
3.13 Condiciones de cultivo de las levaduras aisladas y <i>starters</i> cerveceros seleccionados	78
3.14 Determinación de la resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos <i>in vitro</i> de levaduras cultivadas en mosto cervecero	79
3.15 Obtención de sobrenadantes libres de células de cultivos de levaduras cerveceras	79
3.16 Determinación del efecto bactericida y bacteriostático de los sobrenadantes libres de células frente a <i>S. Enteritidis</i> CIDCA 101 y <i>E. coli</i> EHEC 60169	80
3.17 Estudio de la capacidad de autoagregación de levaduras cerveceras	80
3.18 Determinación de la capacidad de las levaduras cerveceras de co-agregar con <i>S. Enteritidis</i> CIDCA 101 y <i>E. coli</i> ATCC 25922	81
3.19 Ensayo de adhesión de las levaduras cerveceras a células intestinales Caco-2/TC7	82
3.20 Determinación de la asociación e invasión de <i>S. Enteritidis</i> CIDCA 101 a monocapas de células Caco-2/TC7 pre-incubadas con levaduras cerveceras	82
3.20.1 Estudio de asociación	82
3.20.2 Estudio de invasión	83
3.20.3 Cálculo de bacterias asociadas y bacterias internalizadas	83
3.21 Determinación del daño celular producido por <i>S. Enteritidis</i> CIDCA 101 y <i>E. coli</i> EHEC 60169 sobre Caco-2/TC7 en presencia de levaduras cerveceras	83
3.22 Estudio de la inhibición de la germinación de conidios de <i>Aspergillus</i> sp. por SLC de cultivos de levaduras cerveceras	84

3.23 Estudio de la reducción del crecimiento de <i>Aspergillus</i> sp. co-incubado en medio sólido con levaduras cerveceras	84
3.24 Estudio de la reducción del crecimiento de <i>Aspergillus</i> sp. por compuestos volátiles producidos por levaduras cerveceras	86
3.25 Estudio del daño celular producido por AFB ₁ sobre la línea celular HepG2 en presencia/ausencia de levaduras cerveceras	87
3.26 Estudio de la capacidad de secuestro <i>in vitro</i> de aflatoxina B ₁ por levaduras cerveceras	87
3.26.1 Preparación de las soluciones de aflatoxina B ₁ (AFB ₁)	87
3.26.2 Ensayo de secuestro de AFB ₁	87
3.26.3 Cuantificación de AFB ₁ en sobrenadantes de incubación	88
3.27 Estudio de la composición de la pared celular de las levaduras cultivadas en diferentes condiciones	88
3.27.1 Condiciones de cultivo	88
3.27.2 Preparación de las muestras	88
3.27.3 Extracción de mananos de pared por hidrólisis ácida	89
3.27.4 Cuantificación de la manosa y glucosa liberadas por HPLC	89
3.28 Estudio de co-fermentaciones alternativas con un <i>starter</i> cervecero mixto	90
3.28.1 Co-fermentaciones simultáneas	90
3.28.2 Co-fermentaciones secuenciales	90
3.29 Obtención de residuo de levaduras cerveceras para producir alimento para pollos	91
3.30 Estudio de la capacidad del RLC de secuestrar y retener AFB ₁ a través del TGI de pollos simulado <i>in vitro</i>	92
3.31 Formulación de un alimento para pollos suplementado con RLC	92
3.31.1 Alimento para pollos	92
3.31.2 Diseño de un alimento adicionado con RLC	93
3.31.3 Formulación del alimento balanceado para pollos adicionado con RLC	94
3.32 Caracterización del alimento para pollos formulado por adición de RLC	95
3.32.1 Caracterización bromatológica del alimento para pollos formulado por adición de RLC	95
3.32.1.1 Determinación de proteínas totales por el método de Kjeldahl	95
3.32.1.2 Determinación de grasas por el método Soxhlet	96
3.32.1.3 Determinación de cenizas totales	99
3.32.1.4 Determinación de humedad	97
3.32.1.5 Determinación de carbohidratos totales y energía bruta	97
3.32.2 Caracterización microbiológica del alimento para pollos formulado por adición de RLC	98
3.32.2.1 Recuento de levaduras cerveceras	98
3.32.2.2 Estudio de la viabilidad de las levaduras cerveceras en alimento contaminado artificialmente con <i>Aspergillus</i> sp.	98

3.33 Estudio de la vida útil y capacidad bio-preservante del alimento para pollos formulado por adición de RLC	98
3.33.1 Estudio de la viabilidad de las levaduras cerveceras	98
3.33.2 Determinación del crecimiento de hongos filamentosos en el alimento adicionado con RLC	99
3.33.3 Determinación de la actividad acuosa (a_w)	99
3.34 Análisis estadístico	99
4 Aislamiento, identificación y caracterización fermentativa de cepas de levaduras cerveceras	100
4.1 Introducción	101
4.2 Hipótesis	103
4.3 Objetivos específicos	103
4.4 Resultados y discusión	104
4.4.1 Aislamiento de colonias de morfología macroscópica diferencial	
A) A partir de muestras cerveceras	104
B) A partir de muestras de kefir de agua	108
4.4.2 Identificación de los aislamientos por PCR y secuenciación	111
4.4.3 Diferenciación a nivel cepa por RFLP del ADN mitocondrial	116
4.4.4 Identificación de híbridos inter-específicos por RFLP de genes seleccionados	124
4.4.5 Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento en distintos medios	130
4.4.6 Micro fermentaciones. Estudio de cinéticas y de los productos de fermentación del mosto de cebada por levaduras aisladas de muestras cerveceras	150
A) Estudio de las cinéticas de fermentación del mosto cervecero	150
B) Estudio de los metabolitos solubles presentes en el mosto fermentado mediante HPLC	163
4.4.7 Micro fermentaciones. Estudio de cinéticas y de los productos de fermentación del mosto de cebada por levaduras aisladas de kefir de agua	176
4.5 Conclusiones	180
5 Caracterización probiótica y selección de cepas de interés. Caracterización <i>in vitro</i> de la capacidad de las cepas de levaduras seleccionadas de antagonizar con <i>Salmonella enterica</i> var. Enteritidis y <i>Escherichia coli</i>	182
5.1 Introducción	183
5.2 Hipótesis	184
5.3 Objetivos específicos	184
5.4 Resultados y discusión	185
5.4.1 Tolerancia de levaduras cerveceras al pasaje por pH estomacal e intestinal	185
5.4.2 Determinación de la resistencia a las condiciones del TGI <i>in vitro</i>	188
5.4.3 Selección de cepas de levaduras y estudio <i>in vitro</i> de la resistencia a las condiciones del TGI de cultivos en mosto cervecero	191

5.4.4 Estudio de la capacidad de autoagregación de levaduras cerveceras	193
5.4.5 Determinación de la capacidad de co-agregación de levaduras cerveceras con <i>S. Enteritidis</i> CIDCA 101 y <i>E. coli</i> ATCC® 25922™	195
5.4.6 Acción bacteriostática de los SLC de levaduras cerveceras frente a <i>S. enteritidis</i> CIDCA 101 y <i>E. coli</i> EHEC 60169	198
5.4.7 Ensayo de adhesión de las levaduras cerveceras a células intestinales Caco-2/TC7	200
5.4.8 Determinación de la asociación e invasión de <i>S. enteritidis</i> CIDCA 101 a monocapas Caco-2/TC7 pre-incubadas con levaduras cerveceras	204
5.4.9 Determinación del daño celular producido por <i>S. enteritidis</i> CIDCA 101 y <i>E. coli</i> EHEC 60169 sobre Caco-2/TC7 en presencia de levaduras cerveceras	206
5.5 Conclusiones	209
6 Estudio del potencial de las levaduras cerveceras como agentes biocontroladores de <i>Aspergillus</i> sp. y secuestrantes de aflatoxina B₁	212
6.1 Introducción	213
6.2 Hipótesis	214
6.3 Objetivos específicos	214
6.4 Resultados y discusión	214
6.4.1 Estudio de la reducción de la germinación de <i>Aspergillus</i> sp. por sobrenadantes libres de células (SLC) de cultivos de levaduras cerveceras	214
6.4.2 Estudio de la reducción del crecimiento de <i>Aspergillus</i> sp. co-incubado en medio sólido con levaduras cerveceras	217
6.4.3 Estudio de la reducción del crecimiento de <i>Aspergillus</i> sp. por compuestos volátiles producidos por levaduras cerveceras	233
6.4.4 Estudio del daño celular producido por AFB ₁ en presencia/ausencia de las levaduras sobre la línea celular HepG2	240
6.4.5 Estudio de la capacidad de secuestro <i>in vitro</i> de AFB ₁ por levaduras cerveceras	242
6.4.6 Estudio de la composición de pared celular de levaduras cerveceras cultivadas en diferentes condiciones	245
6.5 Conclusiones	248
7 Formulación de un alimento balanceado para pollos adicionado con residuo de levaduras cerveceras optimizado	251
7.1 Introducción	252
7.2 Hipótesis	253
7.3 Objetivos específicos	254
7.4 Resultados y discusión	254
Parte A. Fermentaciones alternativas con el <i>starter</i> M6 para la elaboración de cerveza	254
7.4.1 Optimización del diseño de fermentación para la obtención de cerveza y residuo de levaduras cerveceras (RLC)	254

Parte B. Formulación de un alimento balanceado para pollos adicionado con RLC del <i>starter</i> M6	261
7.4.2 Estudio de la capacidad del RLC de secuestrar y retener AFB ₁ a través del pasaje por el TGI de pollos simulado <i>in vitro</i>	261
7.4.3 Formulación de un alimento para pollos suplementado con RLC	263
7.4.4 Caracterización fisicoquímica del alimento para pollos formulado por adición de RLC	265
7.4.5 Caracterización microbiológica del alimento para pollos formulado por adición de RLC	268
7.4.6 Estudio de la capacidad bio-preservante de las levaduras cerveceras en el alimento para pollos formulado por adición de RLC	272
7.5 Conclusiones	277
8 Conclusiones generales y perspectivas	279
9 Referencias bibliográficas	293
ANEXO I. Medios de cultivo y soluciones	321

Abreviaturas

ADNmt: ADN mitocondrial

AFB₁: aflatoxina B₁

CIM: concentración inhibitoria mínima

CBM: concentración bactericida mínima

GI: gastrointestinal

LDH: lactato deshidrogenasa

OG: del inglés *original gravity*, concentración inicial de azúcares en el mosto cervecero

ON: del inglés *overnight*, cultivo de 24 h

PBS: del inglés *phosphate buffer saline*, *buffer* fosfato salino

RFLP: del inglés *restriction fragment length polymorphism*

RLC: residuo de levaduras cerveceras

Sc: *Saccharomyces cerevisiae*

Seu: *Saccharomyces eubayanus*

Sp: *Saccharomyces pastorianus*

Spar: *Saccharomyces paradoxus*

SF: solución fisiológica

SLC: sobrenadante libre de células

TGI: tracto gastrointestinal

VOCs: del inglés *volatile organic compounds*, metabolitos volátiles producidos por levaduras

Contexto de la presente tesis

La cerveza es la tercera bebida alcohólica de mayor consumo a nivel mundial. Se estima una producción de 1,95 billones de hectolitros por año (Statista, 2018), entre cervezas comerciales y cervezas producidas de forma artesanal. En la ciudad de La Plata y en el gran La Plata, el fenómeno de la cerveza artesanal ha crecido exponencialmente en los últimos 10 años hasta convertirla en un polo cervecero a nivel provincial y nacional.

El sector de los *homebrewers* o cerveceros artesanales se caracteriza por un modo de producción artesanal, a pequeña y mediana escala, con un grado de tecnificación del proceso bajo comparado con aquel de la industria de la cerveza embotellada. Esta forma de producir permite a los cerveceros experimentar más libremente con los ingredientes (agua, grano malteado, levadura y lúpulo) en la creación y perfeccionamiento de una variedad de estilos.

Un aspecto fundamental de la producción de cerveza es la levadura que se emplea. La que se comercializa en nuestro país es importada, en formato seco liofilizado y de variedad acotada. Esto impone ciertas condiciones a la cerveza que puede elaborarse: costos elevados de producción sujetos a insumos importados; susceptibilidad a obtener cervezas con una calidad sensorial inferior y presencia de *off-flavors*, debido al estado fisiológico subóptimo de la levadura que ha sufrido liofilización; y una variedad limitada de estilos, sabores y aromas plausibles de producirse, asociado a la restringida diversidad de cepas cerveceras disponibles. Otra problemática de la producción cervecera es el descarte de residuos: durante la fermentación del mosto, la levadura multiplica su biomasa, generando un subproducto denominado lodo de levaduras, constituido principalmente por levaduras metabólicamente activas, una pequeña proporción de levaduras muertas y sobrenadante de fermentación. El descarte sin tratamiento previo de este lodo de levaduras, de alto valor nutricional y carga orgánica, conlleva a deterioro ambiental.

Con estas inquietudes, un grupo de cerveceros artesanales organizados en una cooperativa se contactó con la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP (FCE-UNLP) a través de la Secretaría de Extensión. Desde las capacidades y competencias de nuestra casa de estudios se procuró dar respuesta a las demandas del sector de forma planificada. A corto plazo, se organizaron y brindaron cursos de buenas prácticas de manipulación para la producción de alimentos y bebidas y de manejo integral de la levadura liofilizada.

Del análisis de las problemáticas de los cerveceros asociadas a la levadura comercial liofilizada devino la necesidad de abordarlas desde un espacio que integrase las labores de la extensión y la investigación. A tal fin, se constituyó la línea de Levaduras Cerveceras dentro del grupo de Hongos Toxigénicos de la FCE, de la que participan investigadores, becarios, extensionistas y cerveceros, y que inició la investigación de temas innovadores y sin antecedentes en nuestra casa de estudios. Frente a la convocatoria de la Comisión de Investigaciones Científicas (CIC) de Proyectos de Innovación y Transferencia en Áreas Prioritarias de la Provincia de Buenos Aires (PIT-AP-BA, 2015), el grupo presentó un plan de soluciones a mediano y largo plazo para el sector de cerveceros artesanales, que fue adjudicado con un subsidio en 2016.

Como ejes principales, el proyecto propuso la constitución de un banco criopreservado de levaduras cerveceras caracterizadas tecnológicamente, que ampliase la variedad de levaduras disponibles para la producción local y aportase a la diferenciación competitiva del polo cervecero platense; la puesta a punto y escalado de la producción de levadura en formato líquido, que permitiese elaborar cervezas de calidad superior y superar los defectos organolépticos asociados al empleo de levadura liofilizada; y el estudio de las propiedades probióticas y biocontroladoras del lodo de levaduras subproducto del proceso, con vistas a valorizar este residuo como aditivo de alimento balanceado para la producción pecuaria.

En el marco de este último objetivo del proyecto, se desarrolló el trabajo de tesis doctoral que se presenta a continuación. Asimismo, se abordaron algunos aspectos de la caracterización tecnológica de cepas que constituyen el Banco de Levaduras Cerveceras y del asesoramiento a pequeños productores cerveceros locales.

Resumen:

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida a nivel mundial. En Argentina, su consumo se ha intensificado en las últimas décadas y diversificado en años recientes, de la mano del fenómeno de las cervecerías artesanales de pequeña y mediana escala, que se distribuyen a lo largo y ancho de nuestro país. Los cerveceros artesanales buscan mejorar su proceso de elaboración de forma permanente y ampliar la variedad de estilos de cerveza y de ingredientes incorporados a sus recetas.

Desde las inquietudes suscitadas en su quehacer artesanal en la cervecería, una cooperativa de productores locales platenses acudió a la Universidad en busca de asistencia técnica. Nuestro grupo de investigación adoptó el desafío de caracterizar *starters* cerveceros y sus levaduras aisladas respecto de sus propiedades tecnológicas y de estudiar la estabilidad de los *starters* mixtos con el objetivo de asesorar a los cerveceros respecto de su manipulación.

Por otro lado, la elaboración de esta bebida apareja la generación de residuos sólidos, como el bagazo de malta y las levaduras floculadas, que suponen un problema de descarte para los cerveceros artesanales. Los elevados costos de procesamiento que requieren los desechos de alta carga orgánica para su adecuado descarte son inasequibles para productores cerveceros de pequeña y mediana escala.

Sin embargo, es posible reutilizar estos residuos sólidos, de considerable valor nutritivo, como materia prima para la producción de alimento balanceado para animales. A la luz de las inquietudes y demandas del sector de los cerveceros artesanales locales y con la experiencia de nuestro grupo de investigación en el estudio de microorganismos probióticos y antifúngicos y su aplicación en alimentación animal, la presente tesis abordó de forma amplia la caracterización de levaduras cerveceras con potencial para ser empleadas como aditivo alimenticio en pequeños establecimientos avícolas.

A partir de la bibliografía consultada, surgieron múltiples hipótesis acerca de la funcionalidad de las levaduras activas presentes en el residuo de cervecería. Por un lado, numerosos estudios dan cuenta de las propiedades y los mecanismos probióticos de *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, especialmente en el antagonismo de enteropatógenos como *Escherichia coli* y *Salmonella* sp. Esta levadura guarda estrecha relación taxonómica con *S. cerevisiae* cervecera, lo que sugiere que ciertas cepas empleadas en la elaboración de cerveza y que forman parte del residuo de fermentación podrían compartir algunos aspectos probióticos con *S. boulardii*. Siguiendo esta hipótesis, un alimento balanceado formulado con el residuo de levaduras cerveceras podría redundar en propiedades probióticas antimicrobianas y tener efecto positivo en la sanidad de aves de cría.

Por otro lado, se ha reportado la capacidad biocontroladora sobre hongos filamentosos y secuestrante de micotoxinas de levaduras aisladas de diferentes nichos. La contaminación del alimento balanceado por hongos filamentosos reduce su calidad nutricional y se ve favorecida en condiciones inadecuadas de almacenamiento, como la alta humedad y la ventilación insuficiente frecuentes en silos. Muchos de estos hongos son capaces de producir micotoxinas, metabolitos tóxicos de alto impacto en la sanidad animal y en los parámetros zootécnicos. La contaminación fúngica, además de producir pérdidas económicas sustanciales para la actividad pecuaria, es riesgosa para la salud humana, ya que ciertas micotoxinas, como la aflatoxina B₁, sufren biotransformación y acumulación en el cuerpo del animal y pueden llegar a ser consumidas por personas a través de su carne. Otra de las hipótesis de este trabajo es que las levaduras vivas que componen el residuo cervecero podrían actuar como agentes de biocontrol fúngico y secuestrantes de micotoxinas en el alimento balanceado adicionado.

La presente tesis abordó la caracterización del desecho de levaduras floculadas de la fermentación cervecera sin pre-tratamientos de secado o inactivación. Este residuo incluye a la levadura activa y al sobrenadante de mosto fermentado, que contiene etanol y otros metabolitos potenciales antagonistas. Adicionalmente, se estudiaron aspectos tecnológicos de la producción cervecera vinculados a la manipulación de levaduras y de *starters* mixtos, de interés para los cerveceros artesanales locales.

El capítulo 4 detalla los resultados de la etapa de aislamiento e identificación a nivel de cepa de levaduras provenientes de la actividad cervecera, tanto de muestras provistas por productores artesanales locales como de muestras comerciales. Entre las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, se estudió la presencia de híbridos interespecíficos, particularmente *Saccharomyces pastorianus*, el híbrido natural propio del nicho cervecero, empleado en la producción de cerveza *lager*. Este capítulo también aborda la caracterización tecnológica de las levaduras aisladas a través del estudio de sus parámetros de crecimiento en sustratos de interés para la producción cervecera y de sus parámetros fermentativos del mosto de cebada, mediante la realización de micro-fermentaciones a escala de laboratorio. Adicionalmente, se estudió la capacidad de levaduras *S. cerevisiae* aisladas de kefir de agua de llevar a cabo la fermentación del mosto de cebada en las condiciones mencionadas, como estudio exploratorio de una fuente alternativa de potenciales nuevas cepas cerveceras.

En el capítulo 5 se inicia la caracterización funcional de las muestras cerveceras completas y de las cepas aisladas a partir de las mismas, evaluando su capacidad de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos emulado *in vitro*. A

continuación, se abordó el estudio de sus propiedades auto-agregantes y co-agregantes con enteropatógenos, de su capacidad de producir metabolitos con efecto bacteriostático y bactericida, de adherirse a un modelo celular de epitelio intestinal y el efecto del co-cultivo de levaduras y bacterias sobre la infectividad y el daño celular producido por enteropatógenos en el modelo intestinal.

En el capítulo 6 se describe la caracterización de levaduras cerveceras seleccionadas respecto de sus propiedades biocontroladoras de *Aspergillus* sp. y secuestrantes de aflatoxina B₁. Se estudió el efecto de la presencia de levaduras cerveceras y sus metabolitos solubles sobre la germinación y crecimiento de *Aspergillus flavus* y *Aspergillus parasiticus* toxigénicos; se determinó el efecto de metabolitos volátiles producidos por las levaduras sobre el desarrollo fúngico; se cuantificó la capacidad de las levaduras de secuestrar aflatoxina B₁ y su efecto citoprotector sobre una línea celular de hepatocitos expuesta a la micotoxina.

El capítulo 7 inicia con la producción de un residuo de levaduras en el laboratorio, explorando el proceso de elaboración de cerveza y el producto de fermentación del mosto obtenido al emplear un *starter* cervecero mixto en diferentes esquemas de co-fermentación. Se determinó la capacidad de dicho residuo de capturar y retener aflatoxina B₁ luego del pasaje por el tracto gastrointestinal de pollos simulado *in vitro*. Finalmente, se formuló y caracterizó fisicoquímica y microbiológicamente un alimento balanceado para pollos adicionado con el residuo de levaduras, y se estudió su capacidad de biocontrolar la micobiota natural presente en el alimento en condiciones de humedad y temperatura que favorecen el desarrollo de hongos filamentosos.

Introducción General

Introducción General

La presente tesis se desarrolló dentro de la línea de levaduras del grupo de Hongos Toxigénicos de la Facultad de Ciencias Exactas de la UNLP. Como objetivo principal, se buscó aislar y caracterizar levaduras de la producción cervecera con potencial para ser adicionadas al alimento utilizado en la actividad avícola. Tal caracterización abarcó el estudio de sus propiedades tecnológicas, antibacterianas, antifúngicas y secuestrantes de micotoxinas. En una primera instancia, se aislaron, identificaron a nivel de cepa y caracterizaron tecnológicamente levaduras *Saccharomyces* y no *Saccharomyces* a partir de *starters* cerveceros comerciales y de muestras del residuo de levaduras subproducto de la elaboración de cerveza. Se prosiguió con el estudio de su resistencia a las condiciones gastrointestinales de pollos y de sus propiedades antagónicas contra enteropatógenos como *Salmonella* Enteritidis y *E. coli*, bacterias con gran impacto en la sanidad animal, asociadas a grandes pérdidas económicas para la actividad avícola y reconocidos agentes zoonóticos. Posteriormente, se determinaron las propiedades antifúngicas de las levaduras cerveceras, específicamente su actividad contra *A. flavus* y *A. parasiticus*, dos especies micotoxigénicas comúnmente encontradas en alimentos y materias primas de producción alimenticia. Se estudió, además, su capacidad secuestrante de aflatoxina B₁, toxina carcinogénica producida por especies del género *Aspergillus* que se acumula en el hígado de animales expuestos al consumo de alimentos contaminados con el hongo y sus metabolitos. Finalmente, se iniciaron los estudios de aplicación del residuo de levaduras cerveceras como aditivo al alimento balanceado para pollos basado en grano.

Para abordar el conjunto de estas temáticas, a continuación se desarrollará una introducción que contempla las generalidades de la producción avícola en Argentina y algunos países latinoamericanos y las problemáticas asociadas a este sistema productivo; reportes acerca de las propiedades antibacterianas, antifúngicas y secuestrantes de micotoxinas de levaduras en general, y de *Saccharomyces* sp. en particular, plausibles de aplicarse a estrategias de superación de las problemáticas de la actividad avícola; la elaboración de cerveza a partir de *Saccharomyces* sp. y levaduras no sacaromicéticas, y la generación del subproducto de levaduras, mayormente descartado, con potenciales aplicaciones en alimentación de aves. Adicionalmente, se aborda una breve descripción del taxón *Saccharomyces* y de algunas de las técnicas desarrolladas para la identificación de especies y cepas dentro del género.

1.1 Producción avícola en Argentina

Brasil, Argentina y Colombia son los productores avícolas más importantes de Sudamérica, con más de 9430 millones de pollos parrilleros faenados en el año 2016 (Bueno y col., 2016). Según datos del Servicio de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria (SENASA, 2016), la actividad cuenta con más de 5504 unidades productivas avícolas dedicadas a actividades primarias e industriales integradas; entre ellas, 4452 son granjas de engorde para la producción de carne. En general, las empresas integradas abarcan gran parte de la cadena productiva; poseen plantales de reproductores, huevos fértiles, sector de incubación, pollos BB, alimento balanceado, plantas procesadoras de aves y ejecutan la comercialización (Bueno y col., 2016).

Nuestro país, junto a Brasil, Chile y Uruguay, destaca en la región por un buen *estatus* sanitario en la producción aviar. Además, cuenta con abundante y calificada mano de obra y la ventaja competitiva de ser productor de los cereales utilizados en alimentación animal (Bueno y col., 2016). Las líneas genéticas utilizadas por las empresas argentinas en la producción de pollos de engorde son Cobb, Ross y Arbor Acres (Ruiz, 2016).

1.2 Nutrición de pollos de engorde

La dieta equilibrada es sustancial en el mantenimiento de un estado sanitario adecuado de las aves y en la optimización de los parámetros de producción. Además, la calidad nutricional que aporta la carne de pollo se basa en su contenido de proteína, hierro, zinc, fósforo, niacina, ácido fólico y vitaminas A, B6 y B12, con gran dependencia del mantenimiento de una dieta adecuada durante la crianza del ave (Greco y col., 2014). Una deficiencia de nutrientes aparejaría un desarrollo subóptimo de los animales, atentando contra la productividad. En cambio, el exceso de nutrientes redundaría en su excreción, contribuyendo al deterioro del ambiente, el aumento de los costos de producción y la reducción de la rentabilidad (Bohórquez, 2014). Particularmente, el exceso de proteínas implica el catabolismo de sus aminoácidos y su utilización como fuente de energía en las dietas. Esta función no es recomendable debido a su elevado costo como fuente energética; las dietas para pollos de engorde deben ofrecer un nivel proteico que minimice el uso de aminoácidos como aporte de energía (Bertechini, 2012). Adicionalmente, el exceso de nutrientes ingeridos es utilizado por el metabolismo de pollos de engorde en la síntesis de grasa (Brumano, 2009); esto puede derivar en perjuicio económico, ya que un alto contenido de grasa

en la canal disminuye el valor comercial de los cortes y el rendimiento zootécnico debido a las pérdidas de tejido.

El desempeño productivo de las aves tiene relación directa con el nivel de energía y el contenido de proteína de la dieta (Santos y col., 2012; Torres-Novoa, 2018). La energía obtenida de la dieta a través del metabolismo es utilizada por las aves para el mantenimiento de procesos vitales, como la respiración, la termorregulación corporal y el flujo sanguíneo, entre otros. La proteína es un nutriente importante en la alimentación; se busca particularmente su conversión eficiente en proteína muscular mediante la utilización óptima de la energía de los alimentos (Torres-Novoa, 2018). Los costos de alimentación son los más onerosos de la producción avícola, particularmente la fuente proteica, por lo que los veterinarios nutricionistas enfocan sus estudios en los requerimientos nutricionales de proteína bruta y energía metabolizable para diseñar dietas balanceadas con mayor rentabilidad, sin afectar negativamente los parámetros zootécnicos (Arabi, 2015; Oliveira y col., 2011).

Algunas investigaciones reportan que dietas bajas en proteína no siempre reducen la ganancia de peso y la conversión alimenticia de pollos; la suplementación de dietas de estas características con determinados ácidos orgánicos incluso mejoran estos parámetros (Dehghani y Jahanian, 2016). En la actualidad, el concepto de requerimiento de proteína bruta está siendo sustituido por proteína ideal, especificando los niveles de aminoácidos esenciales y no esenciales que contiene la dieta (Torres-Novoa, 2018).

Un parámetro adicional a tener en cuenta en el diseño de la dieta es la edad del ave. Los pollos de engorde necesitan 47,8 g de proteína/kg de peso vivo en la primera semana de edad, mientras que entre los 43 a 46 días, esta necesidad disminuye a 11,5 g de proteína/kg (Rostagno y col., 2011). Makinde y Egbekun (2016) y Mahmoud y col. (2017) determinaron que un contenido de 22% de proteína bruta en la dieta mejora la ganancia de peso, la conversión alimenticia, la digestibilidad de proteína bruta y el rendimiento de la canal. En consonancia con estos resultados, Guilcapi (2013) observó que un 20% de proteína bruta logra la optimización de parámetros productivos como la ganancia de peso y la conversión alimenticia durante la etapa de crecimiento; en la etapa de engorde, los mejores promedios productivos se obtuvieron con dietas con un 18% de proteína bruta. El Manual Cobb para pollos de engorde recomienda un contenido de 23% de proteína bruta para dietas iniciadoras.

Varios autores estudiaron las ventajas del diseño de dietas con proteína bruta reducida suplementadas con aminoácidos sintéticos, que redundan en aumentos en la ganancia

de peso y en la conversión alimenticia (Miranda y col., 2015; Vasconcellos y col., 2015) y en la disminución en la excreción de nitrógeno (Awad y col., 2017; Gheorghe y col., 2013). Cevallos y Intriago (2014) determinaron que el contenido óptimo de proteína bruta para pollos Ross en fase inicial es de 20% con suplementación de 0,45% de lisina, 0,22% de metionina y 0,20% de treonina sintéticas; en fase de crecimiento, un contenido de 18% en proteína con 0,40% de lisina; 0,20% de metionina y 0,25% de treonina sintéticas adicionadas; y en fase final, una dieta con 16% de proteína suplementada con 0,42% de lisina, 0,20% de metionina y 0,28% de treonina sintéticas.

1.3 Riesgos sanitarios en la producción avícola

1.3.1 Riesgo de presencia de hongos micotoxigénicos en el alimento de pollos

Una importante problemática asociada a la producción aviar es la contaminación por hongos filamentosos del grano para alimento, causal de grandes pérdidas económicas en todo el mundo. Muchos hongos son reconocidos agentes de deterioro y pueden alterar las características organolépticas de los alimentos. Algunos de ellos tienen la capacidad de producir una variedad de metabolitos secundarios denominados micotoxinas (Pitt y Hocking, 2009).

Un gran número de los *commodities* empleados en la industria alimentaria y en alimentación animal son susceptibles a la contaminación por hongos micotoxigénicos y sus toxinas. Los alimentos más frecuentemente contaminados son los cereales, el maní, la leche y productos lácteos, el café, el vino, la cerveza, las semillas de algodón, las frutas frescas y secas, los vegetales y las nueces (Pascari y col., 2018). Las especies toxigénicas de mayor importancia pertenecen a los géneros *Aspergillus*, *Penicillium* y *Fusarium*. Durante su desarrollo, los mohos del género *Aspergillus* producen metabolitos altamente tóxicos denominados aflatoxinas, al tiempo que inhiben la germinación del grano y causan cambios de color, aumento de la temperatura, enmohecimiento, apelmazado y podredumbre de las semillas (Kozakiewicz, 1989).

Para mantener la sanidad de aves y mejorar los parámetros productivos, se requiere mantener una dieta con suficiente cantidad de carbohidratos, lípidos, proteínas, vitaminas y minerales (Gillespie y Flanders, 2009; Damerow, 2012). Los hongos son microorganismos que asimilan los nutrientes disponibles en los sustratos donde crecen, con la consecuente pérdida de un 5 a 100% de los nutrientes presentes

(Wilcox., 1988). Se ha encontrado que los valores de energía, proteína cruda y grasa cruda en maíz mohoso disminuyen en un 5, 7 y 63%, respectivamente (Di Constanzo y Murphy, 2012). Una investigación sobre la contaminación fúngica y su efecto en la calidad nutricional de alimentos para aves de varias regiones de Argentina evidenció algún tipo de deficiencia nutricional en el 90% de las muestras analizadas. Entre el 50% y el 77,5% no alcanzaron el contenido mínimo de proteína y lípidos necesarios, respectivamente, mientras que el 23,7% excedió el contenido de cenizas (Greco y col., 2014).

El biocontrol, también denominado biopreservación, hace referencia a estrategias que utilizan microorganismos o sus metabolitos antimicrobianos para extender la vida útil de los alimentos, inhibiendo o reduciendo el desarrollo de hongos alteradores, y aportar a la seguridad alimentaria. Entre las estrategias empleadas, se encuentran la adición al alimento de metabolitos antimicrobianos (en ausencia del microorganismo productor); la adición al alimento de un cultivo productor del antimicrobiano que no modifique la calidad del alimento; o la aplicación de microorganismos con propiedades tecnológicas para la producción de alimentos y bebidas que, además, expresan un efecto preservante (Muccilli y Restuccia, 2015).

1.3.2 Riesgo de micotoxicosis de aves

Las micotoxinas son las toxinas naturales que producen mayor impacto negativo en la actividad económica y en la salud pública (IARC, 2002; Pitt y Hocking, 2009). Se estima que más del 25% de las cosechas mundiales están contaminadas con algún subtipo de estos metabolitos tóxicos (Strosnider y col., 2006). Las micotoxinas con mayor impacto en la producción agroindustrial son las aflatoxinas (AFs), la patulina (PAT), los tricotecenos (deoxynivalenol DON, nivalenol NIV, toxina HT-2 y toxina T-2), la zearalenona (ZEA), las fumonisinas (FUs) y toxinas tremorgenicas (Hussein y Brassel, 2001). Entre ellas, las AFs representan el mayor perjuicio para la salud humana. Aún cuando la contaminación con AFs es mayor en los países tropicales, con condiciones de temperatura y humedad que favorecen el desarrollo fúngico y la producción de micotoxinas, dada la globalización del consumo de los alimentos, no existe región del planeta libre de AFs (IARC, 2002).

El maíz es una materia prima fundamental en la alimentación de aves; en Argentina se producen entre 13 y 22 millones de toneladas anuales de maíz (SAGPyA, 2005; INDEC, 2009), de las cuales 8 millones se emplean en la producción de aves (SAGPyA, 2005; ILSI, 2006). La contaminación de maíz y alimento para aves por

hongos filamentosos y micotoxinas se ha estudiado ampliamente en nuestro país (Dalcero y col., 1998; Magnoli y col., 1998, 1999, 2002; Monge y col., 2012, 2013). En la provincia de Córdoba, se encontró que *Aspergillus* sp. y *Fusarium* sp. son los hongos con mayor prevalencia. Dentro del género *Aspergillus*, *A. flavus* fue la especie más frecuentemente aislada y la aflatoxina B₁ (AFB₁) la micotoxina más prevalente, presente en el 48% de las muestras, en concentraciones de 10 a 123 ng/g. ZEA fue la segunda micotoxina de mayor prevalencia, con niveles mayores a 327 ng/g, mientras que DON no se detectó (Magnoli y col., 1998).

En un estudio desarrollado en Argentina entre 1999 y 2010 sobre muestras de maíz recién cosechado y maíz almacenado, Garrido y col. (2012) determinaron bajos niveles de AFs casi todos los años, con algunas excepciones. Los valores medios y la frecuencia de contaminación con ZEA y DON permanecieron bajos en todos los casos. Entre el 90 y el 100% de las muestras presentó contenido de FUs, con niveles más elevados detectados en maíz almacenado que en maíz recién cosechado. Los autores determinaron también la co-ocurrencia de AFs y FUs en un 4% y de ZEA y FUs en un 2% de las muestras analizadas (Garrido y col., 2012). Estudios sobre la contaminación del alimento para pollos llevados a cabo en la provincia de Entre Ríos reveló que los recuentos fúngicos totales se encontraban por debajo del máximo establecido (110 UFC/g) y que las únicas especies productoras de AFs identificadas fueron *A. parasiticus* y *A. flavus*. Además, se determinó la co-existencia de FUs y toxinas HT-2 y T-2 en el 100% de las muestras estudiadas. Un gran número de las muestras de alimento iniciador estaban también co-contaminadas con AFs (Monge y col., 2013). Se ha estudiado también la microbiota y el contenido de micotoxinas en alimento para aves en las provincias de Buenos Aires, La Pampa y Río Negro. En estos estudios se determinó la presencia generalizada de FUs, de DON en un 90% de las muestras y de bajos niveles de OTA. El 90% de los alimentos analizados presentaron elevados niveles de AFs, un 86% presentó ZEA y en el 78% se detectó toxina T-2 (Greco y col., 2014).

La contaminación por micotoxinas del cereal empleado en alimentación animal se asocia a la alteración y reducción de su calidad física y nutritiva; la mala absorción y/o la no utilización de los nutrientes en el cuerpo del animal; el rechazo del alimento, lo que se traduce en disminución de la ingesta y consecuente reducción de la productividad; el incremento de la susceptibilidad a las enfermedades infecciosas y el efecto sinérgico con otras toxinas (Weidenbömer, 2013). En aves, el consumo de micotoxinas puede causar daños de tipo carcinogénico, mutagénico, teratogénico, neurotóxico, inmunotóxico y estrogénico (McKean y col., 2006; Cegielska

Radziejewska y col., 2013), con el consecuente aumento de la morbi-mortalidad de las aves y el impacto económico asociado (Ciegler y col., 1981).

La mayor parte de las micotoxicosis de aves son causadas por una ingesta crónica de toxinas en baja concentración, observándose los síntomas crónicos típicos como crecimiento lento, baja eficiencia en la transformación de alimento y efectos negativos sobre los parámetros productivos, además del aumento en la mortalidad (Cegielska Radziejewska y col., 2013; Oguz y Kutoglu, 2000). El consumo de una dieta contaminada con micotoxinas puede inducir efectos tóxicos agudos y a largo plazo (Binder y col., 2007; Venancio y Paterson, 2007).

Como estrategia para abordar esta problemática, se ha propuesto el uso de microorganismos capaces de secuestrar micotoxinas y evitar sus efectos adversos en la producción (Fernandes de Oliveira y col., 2013). Otra estrategia consiste en el biocontrol de los hongos productores de micotoxinas en granos y alimento para producción ganadera.

1.3.2.1 Aflatoxinas

Como se describió, la contaminación por *Aspergillus* sp. afecta la producción de cereales y sus derivados. Dentro del género, *A. parasiticus* y *A. flavus* son las principales especies productoras del subtipo aflatoxina, también sintetizado por *A. nomius*, *A. tamari*, *A. pseudotamari*, *A. bombycis*, *A. ochraceus* y *A. australis* (IARC, 2002). Entre las aproximadamente 400 micotoxinas conocidas, las AFs son las más tóxicas y prevalentes en alimentos, por lo que han sido objeto de numerosas investigaciones.

Se conocen 18 tipos de AFs diferentes. Las más importantes en términos de su impacto en la salud humana y animal son la aflatoxina B₁ (AFB₁), aflatoxina B₂ (AFB₂), aflatoxina G₁ (AFG₁) y aflatoxina G₂ (AFG₂), que se identifican de acuerdo a su fluorescencia bajo luz ultravioleta: B (*blue*) presentan fluorescencia azul y G (*green*), fluorescencia verde. Entre ellas, AFB₁ es la más tóxica y ubicua (Oliveira y col., 1997). Cuando AFB₁ es ingerida por animales domésticos a través de alimento contaminado, sufre biotransformación hepática a su forma hidroxilada y menos mutagénica, la aflatoxina M₁ (AFM₁), o a AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), compuesto aún más carcinogénico que la micotoxina. AFM₁ es excretada en los fluidos biológicos de animales intoxicados, pudiendo llegar al consumo humano, por ejemplo, a través de la leche vacuna (Murphy y col., 2006). Las aflatoxinas y sus derivados hepáticos también

pueden ser consumidos en carne y huevos de animales de granja alimentados con productos contaminados con AFs (Strosnider y col., 2006; Bennet y Klich; 2003).

En humanos, la intoxicación por ingestión de cantidades moderadas a altas de aflatoxina (10 a 20 mg en adultos) se denomina aflatoxicosis y se caracteriza por la ictericia progresiva, edema de las extremidades, dolor, vómitos, necrosis, cirrosis y, en casos severos, falla hepática aguda y muerte. La exposición crónica a bajos niveles de aflatoxinas tiene efectos carcinogénicos, mutagénicos, teratogénicos, hepatotóxicos, inmunosupresores y otras condiciones patológicas vinculadas al hígado, órgano blanco primario (Kew, 2013; Pitt y Hocking, 2009). La Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer clasifica a AFB₁ y AFM₁ dentro del Grupo 1 de carcinógenos humanos, si bien AFM₁ es diez veces menos potente que AFB₁ como agente carcinogénico (IARC, 2002).

1.3.3 Riesgo por enteropatógenos

La producción de pollos parrilleros se lleva a cabo en construcciones de tipo galpón. Una práctica común en el sistema de producción avícola es la reutilización de la cama de pollos parrilleros, sustentada en la reducción del impacto ambiental, la escasez de este material y la disminución de los costos (Pandey y Soupir, 2011; Pote y col., 2011; Watts y col., 2011). Sin embargo, cuando esta reutilización no sigue los protocolos adecuados se generan riesgos sanitarios, tales como la infección de lotes de pollos por *Salmonella* sp.

El riesgo de infecciones generalizadas se incrementa cuando el estado sanitario de los alojamientos es deficiente, se descuida la salud de los animales y/o la calidad del alimento, el agua y el material de cama (Bueno y col., 2016). *Salmonella* sp. es difícil de eliminar de los criaderos avícolas debido a que permanece en la materia fecal y en el ambiente y es transmitida por roedores e insectos (Altekruse y col., 1997). Por otro lado, el uso de dietas suplementadas con proteína de origen animal ha contribuido a la existencia de animales en estado de portador asintomático en un gran porcentaje de granjas avícolas y a la presencia del enteropatógeno en sus instalaciones (Wilson y col., 1994).

Todos los países sudamericanos contemplan en sus Planes Nacionales de Sanidad Avícola diferentes regulaciones enfocadas al control de *S. Gallinarum*, *S. Pullorum*, *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Heidelberg* (Bueno y col., 2016). En Argentina, los sistemas de producción intensivos e integrados de pollos parrilleros tienen obligación

de notificar la ocurrencia de enfermedades aviares producidas por *Salmonella gallinarum* biovares Gallinarum y Pullorum, especies bacterianas responsables de la tifosis y pullorosis aviar, respectivamente. *S. Enteritidis*, *S. Typhimurium* y *S. Heidelberg* se conocen en conjunto como salmonelas paratíficas y son responsables principales de las enfermedades zoonóticas asociadas a aves. Estas se caracterizan por la colonización asintomática del aparato intestinal de pollos y pavos, que puede persistir hasta el momento del sacrificio y contaminar la carne de consumo (Bueno y col., 2016).

La infección por *Salmonella* sp. apareja grandes pérdidas económicas para la actividad. Cuando es detectada en cualquiera de las líneas de producción, debe procederse a la eliminación completa del lote de pollos, dado que no se cuenta con tratamiento antimicrobiano eficaz para eliminar completamente la infección y se arriesga la transmisión vertical, la perpetuación en plantas de incubación y en el área de cría. Tampoco puede vacunarse al plantel de reproductores con vacunas del microorganismo vivo o atenuado, ya que estos inmunógenos protegen contra el desarrollo de la enfermedad clínica pero no impiden la infección (Bueno y col., 2016).

Salmonella es uno de los patógenos zoonóticos más importantes, causante de millones de casos de enfermedad (Kiros y col., 2018). Debido a su capacidad de infectar a animales de sangre caliente, este enteropatógeno tiene un amplio espectro de hospedadores (Gut y col., 2018), lo que promueve su diseminación y permanencia en el ambiente. Sólo en los Estados Unidos, alrededor de un millón de personas por año son infectadas por *Salmonella* no tifoidea, y alrededor de 400 personas mueren por esta causa (Scallan y col., 2011). Muchos casos de salmonelosis en humanos se originan en el consumo de productos de granja contaminados (Kimura y col., 2004). *S. Enteritidis* y *S. Typhimurium* son las principales serovariedades causantes de enfermedad en humanos (Chai y col., 2012). *Salmonella* Heidelberg es la tercera serovariedad más frecuentemente aislada en pollos y es también un agente zoonótico de alto impacto (Folster y col., 2009).

Otro de los microorganismos que afectan la productividad de la industria avícola es *E. coli*, agente causal de varios brotes epidémicos documentados. *E. coli* se disemina fácilmente a través de las heces de las aves. En situaciones de estrés y bajo condiciones inadecuadas de cría y de bioseguridad del manejo, se comporta como un patógeno oportunista con un curso asintomático en el ave (Perello, 2009). Esto afecta directamente los índices productivos de la industria avícola (Hernández-Fillor y col.,

2017) y posibilita que el patógeno llegue a consumo humano a través de carne de pollo contaminada.

Se han reportado varios serotipos *E. coli* en pollos de cría y productos avícolas de diversos lugares del mundo; en Argentina, los más prevalentes son *E. coli* Shigatoxigénico O22:H8, O113:H21, O130:H11, O171:H2 y O178:H19 (Alonso y col., 2016). *E. coli* productor de toxina Shiga enterohemorrágico (EHEC) es un patógeno transmitido por alimentos que causa el síndrome urémico hemolítico (SUH), enfermedad con alta mortalidad en niños menores de 4 años. Se ha reportado un vínculo entre casos de SUH y el consumo de productos de pollo (Alonso y col., 2016).

Los antibióticos son el tratamiento más ampliamente utilizado contra patógenos como *Salmonella* y *E. coli* en la cría intensiva de pollos. Adicionalmente, los antibióticos son empleados en avicultura como promotores del crecimiento.

1.4 Empleo de promotores de crecimiento en la producción avícola

El principal aditivo de alimento para aves de cría es el promotor de crecimiento. La mayoría de estos promotores son de origen antibacteriano, administrados en dosis sub-terapéuticas. El uso de antibióticos en dosis sub-terapéuticas en la producción aviar tiene varios beneficios: 1) reduce la competencia por los nutrientes entre la microbiota nativa y la patógena, 2) disminuye los metabolitos microbianos que afectan el crecimiento, 3) contribuye a la reducción de patógenos oportunistas y de infecciones subclínicas. El antibiótico *per se* no se caracteriza por poseer funciones promotoras de crecimiento, sino que genera un efecto indirecto al mantener en concentraciones relativamente bajas a bacterias no benéficas (Barton, 2000).

En los últimos años, ha aumentado la preocupación por el alarmante incremento de la resistencia a antibióticos, debido al problema que esto supone en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Pese a que se confirmó que el uso agrícola de antibióticos genera resistencias bacterianas que se pueden transmitir a los humanos, en numerosos países se ha retrasado o impedido la puesta en práctica de medidas efectivas para reducir su uso innecesario en animales. El uso de antibióticos en la producción de aves y la selección de bacterias resistentes ha sido objeto de numerosos estudios (Angulo y col., 2000; Asai y col, 2005; Diarrassouba y col, 2007; Diarra y col, 2007). La presencia de residuos de estos compuestos en productos de origen animal destinados al consumo humano y la demanda emergente de productos

libres de residuos aditivos, genera la necesidad de la prospección de sustitutos a los antibióticos empleados como promotores de crecimiento.

La Unión Europea (UE), desde enero del 2006, impuso restricciones frente al uso de antibióticos como aditivos para promover el crecimiento de las aves de corral. Esta imposición, sumada a la demanda de productos alimenticios libres de residuos antimicrobianos y a la resistencia cruzada documentada en humanos (Santin y col., 2001), motivó a investigadores y productores a mancomunar esfuerzos para desarrollar promotores de crecimiento alternativos. Como una opción posible, numerosos trabajos han demostrado que los microorganismos probióticos tienen una influencia positiva en el incremento de los parámetros productivos y en el mejoramiento de las condiciones sanitarias; adicionalmente, no dejan residuos en el medio ambiente o en el cuerpo del ave y no causan resistencia cruzada (Nepomuceno y Andreatti, 2000).

1.5 Los probióticos como promotores de crecimiento de pollos

Los alimentos funcionales, también llamados probióticos, se presentan como una opción de reducción o reemplazo al uso de antibióticos, asociado su consumo a la prevención de enfermedades infecciosas y a la promoción de un buen estado de salud general. Los probióticos se definen como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedador (FAO, 2002). Al presente, muchos estudios han contribuido con el desarrollo e implementación en el uso de probióticos con el objetivo de sustituir los antibióticos (Vianna Nunes y col., 2012; Salim y col., 2013; Zhang y Kim, 2014).

Para que un microorganismo sea designado como probiótico debe cumplir ciertas características, resumidas por Ewing y Cole (1994): su consumo debe ser seguro, sin causar enfermedad ni toxicidad; debe sobrevivir al pH gástrico y a las sales biliares; ser capaz de colonizar el intestino para lograr una exclusión competitiva eficaz; capaz de inhibir el crecimiento de patógenos tanto Gram positivos como Gram negativos; entre otras. También deben contemplarse ciertas cuestiones tecnológicas, como la estabilidad durante el proceso de producción, comercialización y distribución que garantice que el probiótico llegue vivo al intestino, así como la estabilidad durante su almacenamiento hasta ser consumido por el animal.

Particularmente, la infección del epitelio intestinal por enteropatógenos como *Salmonella*, requiere de su adhesión a la superficie celular e internalización (Baron,

1996). La exclusión competitiva de bacterias enteropatógenas es uno de los mecanismos de acción descritos en probióticos. Esta se describe como la capacidad de la microbiota autóctona o de probióticos de limitar la colonización del TGI por patógenos, creando un medio fisiológicamente restrictivo mediante la producción de compuestos antagonistas y de la competencia por sitios de unión y nutrientes (Revolledo y col., 2009).

1.6 Levaduras como probióticos

Debido a su resistencia natural a muchos antibióticos, a la imposibilidad de transmitir resistencias adquiridas a bacterias patógenas (Palma y col., 2015; Czerucka y col., 2007; Mathur y Singh, 2006) y a que en muy pocas ocasiones se las ha asociado a brotes de enfermedades infecciosas en humanos (Mo y col., 2004; Psomas y col., 2003), el empleo de levaduras como probiótico se prefiere al uso de bacterias. Adicionalmente, se ha reportado la factibilidad del reemplazo de antibióticos por levaduras y pared celular de levaduras sin detrimento de los parámetros productivos en la cría de pollos (Ghosh y col., 2012).

Saccharomyces boulardii es la levadura probiótica más estudiada. Se emplea a nivel mundial en el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas (Czerucka y col., 2007; Czerucka y Rampal, 2002), y se aplica comúnmente en casos de diarreas causadas por *Clostridium difficile* o derivadas del uso continuo de antibióticos (Czerucka y col., 2007).

Existen numerosos reportes acerca de la capacidad antagónica contra bacterias patógenas de *S. boulardii*. Entre los mecanismos antagonistas comprobados por esta levadura se cuentan la producción de un factor anti-inflamatorio (SAIF, *S. boulardii* anti-inflammatory factor) responsable de la protección de las uniones estrechas entre células intestinales (Pothoulakis, 2009); la producción de proteasas que degradan toxinas bacterianas, como la toxina colérica (Pothoulakis, 2009; Czerucka y col., 1994) y las toxinas de *C. difficile* y *C. perfringens* (Czerucka y col., 2007); la producción de proteasas alcalinas que neutralizan al LPS bacteriano y reducen su toxicidad en modelos de ratón y rata (Buts y col., 2006); la adhesión a bacterias patógenas (Czerucka y col., 2007; Pontier-Bres y col., 2014); la reducción de la internalización de *S. Typhimurium* al modelo celular intestinal humano T84 (Martins y col., 2010); y la modulación de la respuesta inmune. Entre los mecanismos inmunomoduladores dilucidados en la levadura se encuentran la inducción de la secreción de inmunoglobulina A (IgA), factor de necrosis tumoral α (TNF- α), e

interleuquina 1 β (IL-1 β), IL-5, IL-6, IL-10 e IL-12, demostradas *in vitro* e *in vivo* (Kourelis y col., 2010; Foligné y col., 2010; Czerucka y col., 2007); la supresión parcial de la expresión de IL-8 en enterocitos sanos (Martins y col., 2013; Martins y col., 2010); y la reducción de los niveles de citoquinas pro-inflamatorias IL-6 y TNF- α en un modelo de colitis infectado con *E. coli* (Plaza-Díaz y col., 2014; Foligné y col., 2010; Dalmaso y col., 2006).

1.6.1 Levaduras *Saccharomyces* sp. potenciales probióticas

Aunque inicialmente se la clasificó como una especie diferente dentro del género *Saccharomyces*, publicaciones más recientes demuestran que el genoma de *S. boulardii* guarda un 95% de homología con el genoma de *S. cerevisiae* (Edwards-Ingram y col., 2007; Edwards-Ingram y col., 2004; Vaughan-Martini en Kurtzman y Fell, 1998) y que estas levaduras deben clasificarse como variedades co-específicas. Debido a la importante similitud entre los genomas de *S. boulardii* y *S. cerevisiae*, parece factible la existencia de otras levaduras dentro del género *Saccharomyces* con propiedades probióticas.

Algunas cepas *S. cerevisiae* aisladas de alimentos han sido evaluadas en cuanto a su capacidad probiótica. *S. cerevisiae* UFMG A-905, aislada de cachaça de Brasil, probó tener una resistencia a las condiciones gastrointestinales simuladas *in vitro* incluso mayor que la de *S. boulardii* (Martins y col., 2005); además incrementó los niveles de IL-10 e IgA en ratones sanos (Generoso y col., 2011; Martins y col., 2007). En un modelo de fiebre tifoidea en ratón, la cepa redujo los niveles de citoquinas inflamatorias (IL-6, TNF- α , IFN- γ) así como los niveles de IL-10 (Martins y col., 2011). La cepa de *S. cerevisiae* 982, aislada de queso feta, demostró actividad inmunomoduladora en el intestino delgado de ratón por estimulación de la secreción de IgA, TNF- α , IFN- γ , IL-5, IL-6, IL-10 y IL-12 (Kourelis y col., 2010). La cepa de *S. cerevisiae* LV02/CNCM I-3856 fue capaz de inducir la secreción de TNF- α e IL-10 en PBMCs humanos *in vitro* y de disminuir el nivel de IL-6 sérica en un modelo de colitis en ratón (Sivignon y col., 2015; Foligné y col., 2010). En una línea celular de epitelio intestinal porcino (IPEC-1), el tratamiento con *E. coli* enterotoxigénica y *S. cerevisiae* LV02/CNCM I-3856 logró inhibir a los mediadores inflamatorios IL-6 e IL-8 inducidos por infección bacteriana (Zanello y col., 2011). Esta cepa probiótica moduló la vía MAPK y aglutinó a *E. coli*, aunque no logró prevenir la pérdida de integridad de la monocapa de IPEC-1, indicativo de que no actúa sobre las enterotoxinas bacterianas (Zanello y col., 2011).

S. cerevisiae Sc47, un probiótico ampliamente utilizado en nutrición animal, es capaz de neutralizar a varias especies de *Salmonella* (Pérez-Sotelo y col., 2005). Santin y col. (2001) observaron que los manano-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos presentes en la pared celular de *S. cerevisiae* cervecera mantienen o restablecen las condiciones de eubiosis en el tubo digestivo. Las dietas balanceadas suplementadas con paredes celulares de levaduras cerveceras al 0,2% produjeron un aumento en la altura de los *microvilli* intestinales de pollos de 7 días de edad. Los autores asociaron el efecto trófico sobre la mucosa intestinal con el aumento en la ganancia de peso de los pollos alimentados con levaduras cerveceras respecto al grupo con dieta control.

Durante la fermentación del mosto cervecero, levaduras *Saccharomyces* sp. producen metabolitos como SO₂, CO₂ y etanol, compuestos que se postulan como efectores antagonistas contra bacterias enteropatógenas. El etanol es un compuesto tóxico para las células con efecto bactericida ampliamente reportado. El SO₂, producto de fermentación de ciertas levaduras, genera ácido sulfúrico al disolverse en el medio acuoso, reduciendo el pH y produciendo un efecto bacteriostático y bactericida. Además, se ha propuesto que este compuesto inhibe la actividad enzimática microbiana a través de la reducción de los enlaces disulfuro (Chichester y Tanner, 1972). Del mismo modo, el CO₂ al disolverse disminuye el pH del medio, con el consecuente efecto bacteriostático (White y Zainasheff, 2010).

De acuerdo a los antecedentes consultados, es posible proponer que levaduras *Saccharomyces* sp. aisladas de la producción cervecera son potenciales agentes probióticos y prebióticos con capacidad de antagonizar contra bacterias enteropatógenas como *Salmonella* sp. y *E. coli*.

1.6.2 Levaduras no *Saccharomyces* sp. potenciales probióticas

Asimismo, se han estudiado las capacidades probióticas de levaduras no sacaromicéticas. Al ensayarse *S. boulardii* y *Pichia pastoris* X-33 en co-incubación con *S. Typhimurium* sobre la línea celular colorectal humana HCT-116, la asociación bacteria-célula se redujo en un 37 y 47%, respectivamente (França y col., 2015). *Kluyveromyces marxianus* var. *marxianus* CIDCA 8154, aislada de suero de quesería fermentado con gránulos de kéfir, se utilizó junto con *Lactobacillus kefir* CIDCA 8348 y *L. plantarum* CIDCA 8327, para reducir la invasividad de *S. Enteritidis* CIDCA 101 sobre Caco-2/TC7 (Londero y col., 2015). Más recientemente, Menezes y col. (2020) reportaron el efecto antimicrobiano de *S. cerevisiae* y *P. kluyveri* aisladas de bebidas fermentadas artesanales (kefir y cocoa), capaces de coagregar con enteropatógenos y

de reducir la adhesión de *E. coli* EPEC, *Listeria monocytogenes* y *S. Enteritidis* a células Caco-2. Los autores no detectaron producción de compuestos antimicrobianos, por lo que concluyeron que el mecanismo de acción de las levaduras es la competencia por nutrientes o por receptores de adhesión a la mucosa intestinal.

1.7 Levaduras en la dieta de aves de cría

Como se mencionó previamente, el empleo de levaduras en reemplazo de antibióticos como promotores de crecimiento no produce detrimento en los parámetros productivos de aves. Ghosh y col. (2012) estudiaron los efectos de utilizar promotores de crecimiento antimicrobianos, *S. cerevisiae* o pared de levaduras cerveceras, en la *performance*, microbiología e histomorfología del intestino delgado de pollos Ross. Los autores concluyeron que los resultados de utilizar levadura o su pared celular son idénticos a aquellos obtenidos con promotores de crecimiento antimicrobianos, por lo que sería factible el reemplazo de antibióticos por dietas suplementadas con levadura *S. cerevisiae*.

Otros estudios han comprobado que la adición de levaduras viables incrementa la calidad nutritiva de la dieta de animales de cría (Glade y Sist, 1988; Martin y col., 1989). *S. cerevisiae* contiene proteínas de alto valor biológico, vitaminas del complejo B, minerales traza y varios factores únicos que aportan a la salud del hospedador. Se han reportado varias características beneficiosas de *S. cerevisiae*, como su capacidad de potenciar la disponibilidad de fósforo a nivel intestinal (Glade y Biesik, 1986; Brake, 1991) y su utilización por animales (Erdman, 1989; Pagan, 1990), la reducción de casos de enfermedades infecciosas (Line y col., 1997), además de la mejora en la eficiencia de alimentación (Day, 1997; Onifade y Babatunde, 1996).

Shareef y Al-Dabbagh (2009) estudiaron la adición a una dieta base de 0,5; 1,0; 1,5 y 2,0% de levadura de panadería (*S. cerevisiae*). Los pollos alimentados con dieta suplementada al 1,0; 1,5 y 2,0% con levadura tuvieron un peso total significativamente mayor que el grupo control (dieta base sin levadura), aumento en el consumo de alimento y mayor tasa de conversión alimenticia. Los autores no determinaron diferencias en el peso relativo de hígado, corazón, bazo, proventrículo y otros órganos entre los tratamientos y el control. Tampoco encontraron diferencia en varios parámetros hematológicos estudiados, con excepción de un incremento de la hemoglobina en pollos alimentados con 2,0% de levadura. Todos los tratamientos con levadura redujeron los triglicéridos séricos y las dieta suplementada al 2,0% también

redujo significativamente el colesterol; no se detectaron diferencias con el control en los niveles de calcio, ácido úrico y enzimas alanina y aspartato transaminasas.

En un estudio ya mencionado, Santin y col. (2001) observaron que los manano-oligosacáridos y fructo-oligosacáridos presentes en la pared celular de *S. cerevisiae* var. *Carlsberg* cervecera asisten al balance gastrointestinal de pollos Cobb. Las dietas balanceadas a base de maíz y soja suplementadas con paredes celulares de levaduras cerveceras al 0,2% produjeron un aumento en la ganancia de peso y una mejor conversión alimenticia. Otros autores evaluaron el efecto de la suplementación de la dieta de pollos Cobb con 0,1%, 0,15% y 0,2% de *S. cerevisiae* en los parámetros productivos, comprobando que el peso y la ganancia de peso, así como la eficiencia de alimentación, aumentaron significativamente en el grupo que recibió 0,2% de levaduras (Shankar y col., 2017). Yasan y Yegen (2017) arribaron a conclusiones similares respecto al peso final y la ganancia de peso de pollos Ross que fueron alimentados con dietas suplementadas con 5 y 10 g/kg de levaduras y con 5 g/kg del producto fermentado por levaduras libre de células. Sin embargo, no recomiendan la adición de 10,0 g/kg del producto fermentado libre de células, tratamiento en el cual determinaron una reducción en el rendimiento de la canal como resultado del incremento del peso de los órganos digestivos. En estudios más recientes, Sun y col. (2020) determinaron que la mayoría de los índices sanguíneos e inmunológicos de pollos Arbor Acres alimentados con dieta suplementada con levaduras se incrementaron significativamente, así como la ganancia de peso. Los autores reportan que los compuestos aportados por levaduras potencialmente más efectivos en la mejora de los parámetros productivos son la glicina, la fructosa, el inositol, la galactosa y la sacarosa, involucrados en el metabolismo de la serina, la treonina y la glicina.

Adicionalmente, se ha comprobado el efecto protector y de recuperación de los parámetros productivos de pollos alimentados con dietas contaminadas con AFB₁ cuando se adiciona levadura (Pizzolitto y col., 2013; Magnoli y col., 2017).

1.8 Levaduras como agentes biocontroladores de hongos filamentosos

Las levaduras se encuentran entre los microorganismos biocontroladores más estudiados. Sus características antagonistas se atribuyen principalmente a mecanismos de competencia por nutrientes; cambios en el pH del medio como resultado de la producción de ácidos orgánicos o intercambio iónico acoplado al crecimiento; tolerancia a altas concentraciones de etanol (Passoth y col., 2003); y la secreción de compuesto antimicrobianos, las micocinas, también llamadas toxinas

killer (Golubev, 2006; Suzuki y col., 2001). Se emplean tanto en la producción de alimentos y bebidas fermentados, como el vino, la cerveza, el yogurt y el pan, como en la biopreservación de alimentos no procesados, especialmente frutas y verduras durante el período de post-cosecha (Muccilli y Restuccia, 2015; Blevé y col., 2006).

La competencia por nutrientes es probablemente el mecanismo más prevalente en levaduras. Estas son capaces de consumir rápidamente la glucosa, fructosa y sacarosa disponibles en el medio y prevenir así el crecimiento de otros microorganismos, como hongos descomponedores y patógenos. Tal característica ha sido extensamente aprovechada en la producción de bebidas y alimentos por *S. cerevisiae* (Muccilli y Restuccia, 2015). *S. cerevisiae* tiene la particularidad de ser una levadura *Crabtree* positiva; esto significa que es capaz de fermentar rápidamente la glucosa en etanol y CO₂, tanto en condiciones anaeróbicas como aeróbicas. Mientras las levaduras *Crabtree* negativas respiran la glucosa en presencia de oxígeno produciendo biomasa y CO₂, las *Crabtree* positivas compiten por el nicho agotando la glucosa a gran velocidad, resignando en la estrategia su rendimiento energético y de biomasa y produciendo etanol, que actúa como compuesto tóxico antagonista contra microorganismos competidores (Dashko y col., 2014).

Otros compuestos antagonistas solubles producidos por algunas levaduras son las micocinas. Las toxinas *killer* o micocinas se definieron inicialmente como proteínas extracelulares, glicoproteínas o glicolípidos capaces de afectar a otras levaduras sensibles que poseen receptores de superficie para dichos compuestos (Golubev, 2006; Kulikovskaya y col., 2004). Su actividad tóxica está dirigida primariamente contra levaduras estrechamente relacionadas con la cepa productora de la micocina. Las primeras micocinas fueron identificadas en cepas *S. cerevisiae* aisladas de la industria cervecera (Bevan y Somers, 1969). La producción de toxinas *killer* se ha demostrado en especies *Saccharomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, *Torulopsis*, *Williopsis* y *Zygosaccharomyces*. Entre los mecanismos de acción de las micocinas se conocen la inhibición de la síntesis o la hidrólisis del β-glucano de pared celular fúngica (Muccilli y col., 2013; Comitini y col., 2009; İzgü y Altınbay, 2004), la interrupción de la división celular por bloqueo de la síntesis de ADN (Klassen y Meinhardt, 2005, 2002), el clivaje de ARNs (Klassen y col., 2008), el bloqueo de la captación de calcio (Brown, 2011; Klassen y Meinhardt, 2005, 2002) y la formación de canales desestabilizadores en la membrana plasmática (Santos y col., 2007).

Muccilli y col. (2013) reportaron actividad exo-β-1,3 glucanasa antagonista contra los hongos patógenos de fruta *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Penicillium*

digitatum y *Colletotrichum gloeosporioides* en los sobrenadantes libres de células de una cepa *Wickerhamomyces anomalus*. Pretschner y col. (2018) detectaron actividad antagonista no enzimática contra *B. cinerea* y la levadura patógena *Papiliotrema odontotermis* en los sobrenadantes filtrados de cultivos de levaduras aisladas de intestino de termitas. Blevé y col. (2006) aislaron levaduras *Issatchenkia orientalis*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Issatchenkia terricola* y *Candida incommunis* con capacidad *killer* contra los hongos micotoxigénicos *Aspergillus carbonarius* y *A. niger* que afectan la producción de uva.

El fenotipo *killer* se ha constatado en cepas biocontroladoras *S. cerevisiae* y *W. anomalus* empleadas en post-cosecha (Ullivarri y col., 2014; Platania y col., 2012), mientras que otras especies de levaduras desarrollan principalmente mecanismos antagonistas de competencia por nutrientes, producción de enzimas hidrolíticas o de compuestos orgánicos volátiles inhibidores (VOCs, de sus siglas en inglés *volatile organic compounds*) (Muccilli y Restuccia, 2015).

En cuanto al estudio de VOCs, se ha demostrado la actividad antifúngica del acetato de etilo producido por *W. anomalus* en granos almacenados herméticamente (Fredlund y col., 2004; Druvefors y col., 2005). Hua y col. (2014) determinaron la actividad antifúngica del 2-feniletanol producido por *P. kudriavzevii*, que afecta la germinación de esporas, el crecimiento, la producción de toxinas y la expresión génica de *A. flavus*. Otros autores identificaron la producción de VOCs como el mecanismo antagonista contra *A. carbonarius* de varias levaduras no fermentadoras (Fiori y col., 2014).

Otra de las propiedades asociadas a microorganismos biocontroladores es la reducción de la biodisponibilidad de micotoxinas concomitante a la prevención de la contaminación de alimentos y bebidas por hongos toxigénicos. Armando y col. (2013) reportaron que las cepas de *S. cerevisiae* RC008 y RC016 son agentes biocontroladores efectivos del desarrollo de *A. carbonarius* y *F. graminearum*, además capaces de reducir la producción de micotoxinas en condiciones ambientales similares a aquellas en las que se almacenan los cereales cosechados. Petersson y col. (1998) determinaron una reducción de la producción de ocratoxina A (OTA) por *Penicillium verrucosum* en presencia de *Pichia anomala* y *S. cerevisiae*, sin correlato de inhibición de la germinación fúngica. Los autores no detectaron adsorción ni biodegradación de la toxina y concluyeron que las levaduras actúan a nivel de la biosíntesis de OTA.

Otros mecanismos de neutralización del efecto de las micotoxinas sobre la salud animal se han descrito en levaduras. Entre ellos, la producción de metabolitos con

efecto supresor en la expresión de genes relacionados a la biosíntesis de micotoxinas (Hua y col., 2014); la inactivación o biodegradación de la toxina por acción directa sobre su estructura química para transformarla en derivados no tóxicos (Péteri y col., 2007; Garda y col., 2005) aplicada, por ejemplo, a la fermentación de mosto cervecero contaminado artificialmente con OTA y fumonisinas B₁ y B₂ (Scott y col., 1995); y el secuestro por adsorción o absorción, que impide la translocación a nivel intestinal de la aflatoxina ingerida (Moslehi-Jenabian y col. 2010; Shetty y col., 2007).

1.9 Levaduras como agentes secuestrantes de micotoxinas

El empleo de levaduras en la decontaminación de alimento para animales es una estrategia difundida, dada la comprobada disminución de la biodisponibilidad de aflatoxinas y la consecuente reducción de su adsorción a nivel intestinal en presencia de levaduras adicionadas (Śliżewska y Smulikowska, 2011). Se ha documentado ampliamente la inocuidad del empleo en alimentación animal de algunas cepas probióticas *S. cerevisiae* y su capacidad de secuestrar AFB₁ (González Pereyra y col., 2014, Pizzolitto y col., 2013). Los extractos de pared celular de levaduras también son efectivos en la adsorción de aflatoxina y otras micotoxinas, como ZEA (Pereyra y col., 2013). A este respecto, algunos investigadores han reportado la capacidad de levaduras cerveceras muertas de capturar diversas micotoxinas, como la aflatoxina B₁ (Campagnolo y col., 2015; Bovo y col., 2015).

Como se describió previamente, existe una gran cantidad de estudios *in vivo* que comprueban el efecto positivo de la inclusión de levaduras en la dieta de aves de cría (Shankar y col., 2017; Yasar y Yegen, 2017; Ghosh y col., 2012; Shareef y Al-Dabbagh, 2009; Santin y col., 2001). Adicionalmente, se han estudiado los beneficios en la detoxificación de AFB₁ al suplementar la dieta con levaduras. Santin y col. (2003) comprobaron la reducción del efecto tóxico de las aflatoxinas en pollos alimentados con dietas suplementadas con paredes celulares de levaduras cerveceras. La adición al 1% de *S. cerevisiae* a alimento balanceado contaminado con 5 ppm de AFB₁ previno la pérdida de peso, la hiperplasia de hígado y corazón y el decaimiento de seroalbúmina y proteínas totales en suero de pollos (Stanley y col., 1993). Otros autores comprobaron que la adición de levaduras al alimento balanceado contaminado con aflatoxinas disminuyó los efectos negativos sobre la tasa de consumo del alimento, la ganancia de peso y la conversión alimenticia en codornices japonesas. La adición de *S. cerevisiae* mejoró significativamente todos los parámetros productivos estudiados alrededor de un 40% (Parlat y col., 2001).

Pizzolitto y col. (2013) estudiaron el efecto de *S. cerevisiae* CECT 1891, aislada de vino, en pollos alimentados con dietas contaminadas con AFB₁ de forma controlada. El consumo de AFB₁ redujo significativamente la ganancia de peso, la tasa de consumo de alimento y la conversión alimenticia, además de disminuir las proteínas séricas e incrementar el daño en el hígado de los pollos. La adición de *S. cerevisiae* CECT 1891 en el agua de bebida alivió los efectos negativos de la micotoxina en los parámetros productivos, además de proteger a las aves de su efecto tóxico, demostrado a través del análisis histopatológico de hígado y de los parámetros bioquímicos estudiados. Más recientemente, Magnoli y col. (2017) demostraron que la adición de *P. kudriavzevii* nativa de pollos al alimento balanceado mejora los parámetros productivos y genera efectos protectivos en dietas contaminadas con AFB₁.

1.10 La levadura cervecera

Como se ha mencionado, existen numerosos reportes que dan cuenta de los beneficios del empleo de levaduras, particularmente sacaromicéticas, en la alimentación de aves de cría. *Saccharomyces* sp. es la levadura más utilizada por el ser humano en la producción de alimentos y bebidas, entre ellas, la cerveza. Desde hace siglos se la ha seleccionado para llevar a cabo fermentaciones controladas, con fundamento en tres características esenciales: su capacidad de producir etanol eficientemente, la utilización de la fermentación como vía metabólica preferencial y su alta tolerancia al etanol acumulado y otros estreses ambientales (Steensels y Verstrepen, 2014).

Durante la fermentación del mosto de cebada, *Saccharomyces* sp. se alimenta de los azúcares disponibles, como glucosa, maltosa y maltotriosa extraídos durante la cocción de la cebada malteada, y se reproduce, multiplicando su biomasa. Finalizada esta etapa, cuando la concentración de azúcares en el mosto ha disminuido ostensiblemente (atenuación del mosto) y se han acumulado etanol y CO₂ productos de su metabolización, la levadura sedimenta en el fondo del fermentador, fenómeno conocido como floculación. A continuación, la cerveza inmadura es separada del sedimento de levaduras, madurada en tanques, filtrada y embotellada (White y Zainasheff, 2010). La levadura floculada se considera un subproducto del proceso cervecero y es, en su mayor parte, desechada junto al bagazo de malta.

1.10.1 Estilos de cerveza y el rol de las levaduras

De acuerdo a las condiciones de fermentación y al tipo de levaduras utilizadas, las cervezas se clasifican en dos grandes categorías: estilos *lager* y estilos *ale*.

Las cervezas tipo *lager*, que representan el 90% de la cerveza del mercado (Petruzzi y col., 2016), se producen al fermentar el mosto cervecero a bajas temperaturas. La levadura que fermenta en estas condiciones se conoce como levadura *lager* o *Saccharomyces pastorianus*. Se trata de un híbrido inter-específico natural entre *S. cerevisiae* y *Saccharomyces eubayanus* (Libkind y col., 2011), que fue seleccionado y domesticado durante siglos de práctica cervecera artesanal. La levadura *lager* se aisló por primera vez de fermentadores de la cervecería artesanal Carlsberg, en Copenhague, Dinamarca; de allí que se la conozca también con el nombre de *Saccharomyces carlsbergensis*. La naturaleza tolerante al frío, heredada del parental *S. eubayanus*, le permite a *S. pastorianus* fermentar el mosto a bajas temperaturas, entre los 4 y los 15 °C, mientras que el sub genoma parental *S. cerevisiae* contribuye a su habilidad de fermentar maltotriosa (Hebly y col., 2015).

S. pastorianus se denomina también “bottom-fermenting yeast” (levadura de fermentación baja), ya que al finalizar el proceso sedimenta en el fondo del fermentador. Contrario a lo que sugiere tal observación, esto no significa que la levadura *lager* sea más floculante. Por el contrario, *S. pastorianus* es menos floculante que la mayoría de las cepas *S. cerevisiae* y tiende a permanecer en suspensión en el mosto durante mayor tiempo (White y Zainasheff, 2010). La fermentación llevada a cabo a bajas temperaturas disminuye la producción de metabolitos secundarios como ésteres y alcoholes superiores; los pocos subproductos generados son metabolizados por las mismas levaduras durante los prolongados tiempos en que permanecen suspendidas en el mosto. Estas características del proceso otorgan a la cerveza *lager* un típico sabor limpio, suave, seco y refrescante (White y Zainasheff, 2010).

Como contrapunto, la mayoría de las cervezas producidas artesanalmente por *homebrewers* o productores a pequeña escala son de tipo *ale* y representan el 5% de producción mundial total (Petruzzi y col., 2016). La cerveza *ale* se produce por fermentación del mosto cervecero a altas temperaturas, que pueden variar entre los 15 y los 26 °C, pero que en general rondan los 18 a 21 °C (White y Zainasheff, 2010). Este tipo de fermentaciones son generalmente llevadas a cabo por diferentes cepas de la especie *S. cerevisiae*.

Las cervezas tipo *ale* se caracterizan por una mayor complejidad de sabor y aroma respecto de los estilos *lager*, complejidad que dependerá fuertemente de la cepa

seleccionada para realizar la fermentación. Una característica de las levaduras *ale* es la formación de pequeños agrupamientos de células que se asocian a las burbujas de CO₂ y permanecen suspendidos en la superficie del fermentador, formando lo que se conoce en el mundo cervecero como *kraeusen*. Por este motivo, la levadura tipo *ale* se conoce también como “top-fermenting yeast” (levadura de fermentación alta) (White y Zainasheff, 2010).

1.11 El género *Saccharomyces*

La compleja diversidad del género *Saccharomyces*, que incluye cepas puras, introgradadas e híbridos interespecíficos, presentó desafíos para la definición de especie y dio origen a clasificaciones controversiales (Pérez-Través y col., 2014).

El complejo *Saccharomyces sensu stricto* fue descrito por primera vez en 1970 (Lodder, 1970) y llegó a incluir 21 especies de levaduras (Fernández-Espinar y col., 2003). Con la investigación, esta clasificación evolucionó, migrando varios taxones al grupo hermano *Saccharomyces sensu lato* (Alsammar y Delneri, 2020). Posteriormente, la incorporación de métodos moleculares en el estudio taxonómico de las levaduras permitió avanzar en la definición de especie y en la clasificación dentro del género. En 2003, se estableció que el complejo *Saccharomyces* es un grupo monofilético diferente del grupo heterogéneo de especies *Saccharomyces sensu lato* (Kurtzman y Robnett, 2003). La reclasificación de todas las especies del complejo *sensu lato* en otros géneros resultó en la pérdida de sentido y el desuso de las denominaciones *sensu stricto* y *sensu lato* (Kurtzman y Robnett, 2003).

1.11.1 Especies del género

Actualmente, el género *Saccharomyces* consiste en ocho especies, denominadas *S. cerevisiae*, *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola*, *S. eubayanus* y *S. uvarum*. Algunas de ellas son parentales de híbridos naturales que se han originado de forma espontánea en ambientes salvajes o bajo la presión de selección humana en ámbitos industrializados (Alsammar y Delneri, 2020).

Todas las especies *Saccharomyces* descritas inicialmente fueron aisladas de ambientes domesticados. La primera netamente vinculada a nichos salvajes fue *S. paradoxus*, la especie taxonómicamente más cercana a *S. cerevisiae*, aislada de roble en Rusia y de savia de abedul en Ucrania (Alsammar y Delneri, 2020). Luego de su

inclusión en el género, varias cepas identificadas originalmente como variedades *S. cerevisiae* fueron reclasificadas como *S. paradoxus*. Posteriormente, dos nuevas especies, denominadas *S. kudriavzevii* y *S. mikatae*, fueron aisladas de hojas en descomposición y de suelos en Japón (Naumov y col., 2000). En 2008, se aisló una nueva especie denominada *S. arboricola* a partir de la corteza de árboles en China (Wang y Bai, 2008).

La clasificación de *S. uvarum* y *S. bayanus* fue controversial. Inicialmente, se las clasificó como variedades dentro del taxón *S. bayanus*. Con el desarrollo de metodologías moleculares aplicadas a estudios taxonómicos, la otrora variedad *S. bayanus* var. *uvarum* se comprobó una cepa de linaje puro sin contribuciones genómicas de otras especies del género; actualmente se la clasifica como especie *S. uvarum* (Rainieri y col., 1999; Nguyen y col., 2000; Pulvirenti y col., 2000). El aislamiento de *S. eubayanus* de *Nothofagus* sp. en la Patagonia argentina permitió resolver la clasificación taxonómica del taxón *S. bayanus*. Un análisis genómico comparativo reveló que el genoma de la cepa tipo *S. bayanus* var. *bayanus* se compone en un 67% de secuencias *S. uvarum* y en un 33% de secuencias *S. eubayanus*, con introgresiones del genoma de *S. cerevisiae*, reclasificando a *S. bayanus* no como especie, sino como triple híbrido interespecífico (Libkind y col., 2011). La más reciente incorporación al género *Saccharomyces* es la especie *S. jurei*, aislada de corteza de roble en los pre-Alpes franceses (Naseeb y col., 2017).

Los híbridos *S. pastorianus* y *S. bayanus* no se han aislado de ambientes naturales, sino exclusivamente de ambientes cerveceros (Rainieri y col., 2006). Esto sugiere que se originaron y mantuvieron gracias a las presiones de selección relacionadas al proceso de elaboración de cerveza (Dunn y Sherlock, 2008; Libkind y col., 2011). *S. paradoxus*, *S. mikatae*, *S. jurei*, *S. kudriavzevii*, *S. arboricola* y *S. eubayanus* son especies puramente salvajes, mientras que *S. cerevisiae* y *S. uvarum* se han aislado tanto de ambientes salvajes como industrializados (Alsammar y Delneri, 2020).

1.11.2 Híbridos interespecíficos *Saccharomyces*

Las especies *Saccharomyces* tienen la propiedad de hibridar fácilmente debido a la ausencia de barreras precigóticas significativas y, dada la divergencia de secuencias entre especies, producen generalmente híbridos estériles (Morales y Dujon, 2012). Esta capacidad es ventajosa para *Saccharomyces*, pues introduce alta variabilidad genética, conduciendo al origen de nuevos linajes y a un mayor potencial de

adaptación (Gonzalez y col., 2007; Belloch y col., 2008). El híbrido industrial mejor conocido es *S. pastorianus*, productor de la cerveza *lager*.

El análisis de cepas aisladas de cerveza, vino y sidra permitió descubrir otros híbridos interespecíficos naturales de ambientes industrializados: *S. cerevisiae* x *S. uvarum*, *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* y triples híbridos *S. cerevisiae* x *S. uvarum* x *S. kudriavzevii* (Masneuf y col., 1998; Bradbury y col., 2006; González y col., 2006; Lopandic y col., 2007; González y col., 2008; Peris y col., 2012). *S. kudriavzevii* pura no ha sido aislada en ambientes fermentativos, lo que sugiere que los eventos de hibridación con *S. cerevisiae* ocurrieron en ambientes salvajes, previo a la domesticación de los híbridos (Belloch y col., 2009).

Los híbridos interespecíficos *Saccharomyces* son comunes en ambientes industriales, pero inusuales en ambientes salvajes (Barbosa y col., 2016) y muestras médicas (Peris y col., 2018). Los únicos híbridos encontrados hasta el momento en nichos salvajes son producto de entrecruzamientos *S. cerevisiae* x *S. paradoxus* (Barbosa y col., 2016). Recientemente, un número considerable de ORFs (del inglés *Open Reading Frames*, marcos abiertos de lectura) de *S. paradoxus* fueron detectados en introgradaciones del genoma de cepas *S. cerevisiae* (Peter y col., 2018). Los autores analizaron un total de 1011 aislamientos *S. cerevisiae*, y encontraron que todos ellos presentan al menos un ORF de *S. paradoxus*, con una media de 26 ORFs en la población analizada, indicando el flujo ubicuo de genes entre estas especies relacionadas. Las conclusiones del estudio indican que los aislamientos domesticados exhiben gran variación genética en términos de ploidía, aneuploidía y contenido genómico, mientras que la evolución del genoma de los aislamientos obtenidos de nichos salvajes se debe principalmente a la acumulación de polimorfismos de un nucleótido (SNPs, *Single Nucleotide Polymorphisms*) (Peter y col., 2018).

1.11.3 Caracterización taxonómica por métodos clásicos

Las levaduras se definen como hongos unicelulares cuyo crecimiento vegetativo resulta predominantemente de la reproducción no sexual, por gemación o fisión; sus estructuras sexuales (las esporas, contenidas en ascos o basidios) no se forman mientras dure el estadio de gemación/fisión (Kurtzman y Fell, 1998). La palabra levadura en inglés, “yeast”, y su equivalente en varios otros idiomas, tiene origen en palabras que significan “espuma” o “elevarse”, referencias directas a los procesos fermentativos que permiten obtener la cerveza y el pan. En general, el término levadura se asocia al hongo ascomiceto fermentativo *S. cerevisiae*.

De acuerdo a la descripción del género, *Saccharomyces* se caracteriza por una reproducción por gemación multilateral, que da lugar a dos o más células hijas de micro-morfología globosa, elipsoidal o cilindroide. Algunas especies forman pseudohifas, pero no forman hifas septadas o verdaderas. El género se propaga mayormente por la vía asexual, reservando su capacidad de apareamiento o *mating* seguido de meiosis para condiciones de escasez de recursos. La fase vegetativa es predominantemente diploide (o de mayor ploidía) y la conjugación ocurre inmediatamente luego de la germinación de las ascosporas; el género es capaz de formar ascosporas diploides. Las ascosporas son globosas o elipsoidales cortas, con una pared delgada y usualmente contienen una tétrada de esporas (Kurtzman y Fell, 1998). Metabólicamente hablando, el género se caracteriza por la fermentación vigorosa de azúcares. *Saccharomyces* sp. no es capaz de producir polímeros del tipo del almidón ni de crecer en nitrato como única fuente de nitrógeno.

La especie *S. cerevisiae* desarrolla colonias cremosas de color claro cuando crece en agar extracto de malta 5% a 20 °C durante 30 días (Kurtzman y Fell, 1998), de superficie suave o lisa, no texturada, usualmente chata, ocasionalmente convexa, y mate. En medio líquido, no forma películas en la superficie y tras un período suficiente de incubación, presenta sedimento. Puede o no formar pseudohifas rudimentarias.

El híbrido natural *S. pastorianus* crece en agar extracto de malta 5% a 20 °C y forma colonias de colores crema a tostado claro, chatas, de superficie suave o lisa, con bordes ligeramente ondulados o lobulados, en algunas ocasiones con flecos, en algunas ocasiones lisos. No forma películas en la superficie de medio líquido ni pseudohifas. A diferencia de *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* transporta activamente fructosa al interior de la célula y es incapaz de crecer a temperaturas mayores a 34 °C (Kurtzman y Fell, 1998).

1.11.4 Identificación de levaduras cerveceras por métodos moleculares

Teresa Orberá Ratón (2009) revisó las técnicas moleculares que han representado avances en el estudio taxonómico de las levaduras y que han permitido, entre otras cosas, distinguir cepas dentro de una misma especie.

El polimorfismo longitudinal de los cromosomas es una característica que se ha aprovechado en taxonomía. La digestión del ADN total con endonucleasas de restricción de corte poco frecuente y la electroforesis en gel del producto resultante resulta en la visualización de un patrón de bandas de ADN en el gel. En levaduras,

debido a fenómenos genéticos y evolutivos que han tenido lugar en sus cromosomas (inserciones, deleciones y translocaciones), este patrón de bandas es especie específico. Técnicas fundamentadas en dicha característica han sido útiles en la diferenciación de especies dentro de los géneros *Candida*, *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* y *Zygosaccharomyces* (Orberá Ratón, 2009).

El polimorfismo del ADN mitocondrial (ADNmt) también se ha empleado en la identificación y diferenciación de levaduras. Estos microorganismos presentan una amplia variabilidad en el tamaño de su ADNmt, entre los 6 y los 25 μm de longitud. Querol y col. (1992a), diseñaron un método que permite el análisis por restricción enzimática del ADNmt, sin necesidad de aislamiento o purificación previas del genoma mitocondrial. La técnica, desarrollada en *S. cerevisiae*, se basa en las diferencias en el contenido de GC existentes entre el ADN nuclear y el ADNmt (40% en el ADN nuclear *versus* 20% en el ADNmt). Empleando enzimas de restricción que reconocen regiones ricas en GC sobre una suspensión de ADN total, el ADN nuclear sufre una hiper-digestión, produciendo numerosos fragmentos de muy pequeño tamaño, indetectables en un gel de agarosa. Como resultado, en el gel sólo se visualiza el patrón de bandas especie específico generado por la digestión del ADNmt (Guillamón y col., 1994), que permite también la identificación de distintas cepas dentro de una misma especie (Querol y col., 1992a; Querol y col., 1992b; Belloch y col., 1997; Esteve-Zarzoso y col., 2001; Lopes y col., 2006; Martorell y col., 2006; Rodríguez y col., 2017).

La determinación del polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés), consiste en la diferenciación de organismos basada en los patrones de bandas de material genético que se generan en un sitio específico de su genoma o *locus*, cuando es digerido por enzimas de restricción. Cada endonucleasa generará un perfil de bandas diferente al ser aplicada al *locus* polimórfico. La similitud de los patrones generados permite establecer correlaciones entre especies y cepas, mientras que la existencia de patrones únicos permite la identificación. Este método se ha empleado para diferenciar entre especies de los géneros *Candida*, *Cryptococcus* y otras (Esteve-Zarzoso y col., 1999). El más amplio uso que se le ha dado a la técnica de RFLP ha sido en estudios de identificación y filogenia de levaduras de interés industrial. La región ITS (*Internal Transcribed Spacer*), no codificante e hiper variable, permite el reconocimiento de cepas a nivel inter-específico. El ITS-RFLP ha sido empleado, entre otras, en la identificación de especies del género *Kluyveromyces* (Belloch y col., 1998).

Estudios posteriores emplearon una variante de la técnica, conocida como PCR-RFLP, en la que se amplifican fragmentos específicos del ADN y los productos de PCR son tratados con endonucleasas de restricción para obtener perfiles de bandas específicos. Pérez-Través y col. (2014) estudiaron la complejidad del taxón *S. bayanus* mediante el análisis PCR-RFLP y la secuenciación de 34 regiones del genoma y un gen mitocondrial, aplicado a un panel de 46 cepas. Los autores hallaron distintos grados de homocigosis, hibridación e introgresión entre las levaduras estudiadas. A partir de sus resultados, propusieron un potencial camino evolutivo, que involucra dos eventos de hibridación diferentes entre una cepa *S. bayanus* var. *uvarum* y una cepa *S. eubayanus* europea, que explicaría la diversidad genómica entre las cepas *S. bayanus* estudiadas.

El análisis PCR-RFLP se ha empleado en la detección de híbridos naturales así como en la confirmación y monitoreo de híbridos artificiales en fermentaciones industriales. Bellon y col. (2013) utilizaron esta técnica para confirmar la estabilidad de un híbrido artificial *S. cerevisiae* x *S. mikatae* post fermentación de mosto de uva. Lairón-Peris y col. (2020) obtuvieron, mediante *rare-mating* y subsecuente esporulación, híbridos *S. cerevisiae* x *S. uvarum* que retienen o potencian propiedades de los parentales deseables para la producción de vinos. La confirmación de su naturaleza híbrida se realizó mediante PCR-RFLP de los genes UGA3 y GSY1. Empleando la misma estrategia, Origone y col. (2020) confirmaron la naturaleza híbrida de cuatro levaduras obtenidas artificialmente mediante *mass-mating* entre *S. cerevisiae* x *S. uvarum* y *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, y realizaron el monitoreo de la adaptación evolutiva de los híbridos luego de cinco fermentaciones vínicas consecutivas por PCR-RFLP de 33 genes nucleares.

1.12 Levaduras no convencionales en la producción cervecera

Como se ha mencionado, la elección de la levadura que fermenta el mosto tiene un gran impacto en las características de la bebida obtenida, vinculado a la producción de metabolitos de sabor y aroma, como son los ésteres de etilo, ésteres de acetato y alcoholes superiores, por parte de una determinada cepa. En los últimos años se ha impulsado particularmente la prospección y caracterización de levaduras novedosas, también denominadas no convencionales, para la producción de cervezas con bajo contenido de alcohol, cervezas funcionales y cervezas con sabor y aromas complejos (Varela, 2016). El empleo de levaduras no convencionales tiene el potencial de producir diversidad y diferenciación competitiva del producto, aportando a estrategias

de mercadeo basadas en identidad de marca (*branding*). El conjunto de metodologías diseñadas para adecuar el perfil sensorial de alimentos y bebidas a las demandas de los consumidores se conoce como *bioflavoring*.

1.12.1 *Saccharomyces no-cerevisiae* e híbridos interespecíficos *Saccharomyces*

S. cerevisiae forma parte de un género integrado por especies estrechamente relacionadas. Además de las levaduras cerveceras *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*, otras especies del género han sido evaluadas respecto de su capacidad de fermentar el mosto de cebada.

S. eubayanus, el parental no-*cerevisiae* del híbrido natural *S. pastorianus*, fue capaz de fermentar el mosto de cebada produciendo menor cantidad de etanol que otras cepas *lager* evaluadas (Gibson y col., 2013; Krogerus y col., 2015; Mertens y col., 2015) y exhibió incapacidad de fermentar la maltotriosa (Gibson y col., 2013; Krogerus y col., 2015). Respecto al perfil sensorial de su producto fermentado, se caracterizó por una baja producción de acetato de etilo y altas concentraciones de alcoholes superiores (Mertens y col., 2015), los cuales, al superar cierto umbral, confieren a la cerveza aromas alcohólicos y solventes no deseados (Meilgaard, 1982). Además, el análisis sensorial de las cervezas obtenidas por fermentación con *S. eubayanus* determinó la presencia de fuertes sabores azufrados (Mertens y col., 2015). A pesar de su pobre *performance* en la fermentación cervecera, *S. eubayanus* posee ciertas propiedades, como la capacidad de crecer a bajas temperaturas, el uso eficiente de la maltosa y la producción de ciertos sabores deseables, como el ahumado/simil clavo de olor, que pueden ser explotadas en fermentaciones innovadoras o podrían ser heredadas por nuevos híbridos creados en el laboratorio (Gibson y col., 2017; Gibson y col., 2013; Hebly y col., 2015; Krogerus y col., 2015, Mertens y col., 2015).

S. kudriavzevii es una especie sensible al etanol, que exhibe un crecimiento débil o no crece en absoluto en ambientes con un contenido de 5% o más del alcohol (Belloch y col., 2008). Varios autores comprobaron la exclusión competitiva de *S. kudriavzevii* del cultivos mixtos con otras especies *Saccharomyces* más tolerantes al etanol o mejor adaptadas a temperaturas moderadas (Sampaio y Goncalves, 2008; Arroyo-Lopez y col., 2011). De forma similar a *S. eubayanus*, el mayor aporte de *S. kudriavzevii* a procesos fermentativos se produce a través de sus híbridos. Con la implementación de tecnologías de secuenciación de genomas, muchas levaduras identificadas previamente como *S. cerevisiae* puras se han descubierto híbridos *S. kudriavzevii* x *S. cerevisiae*. González y col. (2008) determinaron que al menos la cuarta parte de un

panel de 24 levaduras cerveceras, originalmente identificadas *S. cerevisiae*, resultaron ser híbridos con un parental *S. kudriavzevii*, y la mitad de ellas se aislaron de cervezas de origen belga conocidas como cervezas Trapistas, producidas en monasterios trapistas.

El potencial en la elaboración de cerveza de otros miembros del género *Saccharomyces* aún está por explorarse. Los beneficios del empleo de híbridos interespecíficos generados *de novo* entre *S. cerevisiae* y cepas *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus* y *S. uvarum* son conocidos en la producción de vinos (Bellon y col. 2011, 2013, 2015). Sin embargo, la industria cervecera es aún reticente al empleo de levaduras no naturales ingenieras en laboratorios: por un lado, la cultura cervecera entraña un marcado apego por la tradición en la elaboración y el uso de ingredientes considerados naturales; por otro, existen objeciones de los consumidores respecto al empleo de organismos genéticamente manipulados (Gibson y col., 2017).

1.12.2 Otros géneros de levaduras en la producción de cerveza

La creciente demanda por cervezas que innoven ha dado origen a nuevas estrategias, como el aislamiento y caracterización de levaduras no sacaromícéticas (Varela, 2016; Vanderhaegen y col., 2003). En general, estas levaduras exhiben una menor capacidad fermentativa que *Saccharomyces* sp. y menor tolerancia al etanol (Di Maro y col., 2007), y son valoradas por la complejidad de aromas y sabores y las texturas y sensación en boca que pueden aportar a la bebida (Spitaels y col., 2014). La mayoría de los compuestos que aportan sabor y aroma son intermediarios de fermentación del mosto y subproductos metabólicos (Pires y col., 2014).

Como experiencia previa, la industria vitivinícola ha comprobado el potencial de levaduras *Candida* sp., *Hanseniaspora* sp., *Issatchenkia* sp., *Kazachstania* sp., *Lachancea* sp., *Pichia* sp., *Schizosaccharomyces* sp., *Torulaspota* sp., *Wickerhamomyces* sp., *Williopsis* sp. y *Zygosaccharomyces* sp., así como de especies *Saccharomyces* no-*cerevisiae*, de aportar a la complejidad de aromas y sabores de vinos en co-inóculo con *S. cerevisiae* (Jolly y col., 2014; Pérez-Torrado y col., 2017; Varela y Borneman, 2017; Ciani y Comitini, 2010; Ciani y col., 2010).

Las primeras cervezas producidas con levaduras no sacaromícéticas fueron las tradicionales cervezas lámbicas belgas, y sus descendientes en Estados Unidos, las *coolship ale* americanas. Estos particulares estilos de cerveza se producen sin inóculo de levaduras seleccionadas, a partir de fermentaciones espontáneas iniciadas por

microorganismos que entran en contacto con el mosto de cebada durante su enfriamiento en grandes tanques abiertos de poca profundidad (*coolships*) y durante su almacenamiento en barricas, tradicionalmente de roble (Verachtert, 1992). Estudios del microbioma de cervezas lámbicas y *coolship ales* (Bokulich y col., 2012) revelaron que los procesos de fermentación involucran fases sucesivas donde predominan diferentes levaduras o bacterias, y que dichas fases son dominadas por poblaciones microbianas similares en ambos tipos de cervezas, sugiriendo que el método de producción compartido crea nichos con selectividades similares (Bokulich y col., 2012; van Oevelen, 1979). Típicamente, la fase inicial de estas fermentaciones se caracteriza por una mayor variabilidad de la microbiota, donde prevalecen enterobacterias y levaduras no sacaromícéticas como *Kluyveromyces* sp., *Rhodotorula* sp. y *Pichia* sp. A continuación, debido a la disminución del pH y cambios en la composición química del mosto, *Saccharomyces* sp. logra dominar la fermentación etanólica, proceso que se prolonga por 3 a 4 meses y durante el cual se consumen la mayoría de los azúcares presentes (Steensels y Verstrepen, 2014). En esa fase coexisten levaduras y bacterias ácido lácticas y ácido acéticas (Verachtert, 1992). Cuando los azúcares que *Saccharomyces* sp. es capaz de fermentar se agotan, su población decae rápidamente y el nicho es ocupado por *Brettanomyces* sp., que permanece durante la larga etapa de maduración de la cerveza, que puede durar años. Esta levadura es altamente tolerante al etanol y capaz de consumir los azúcares remanentes, como maltotetrosas y maltopentosas, que no son consumidas por *Saccharomyces* sp. (Kumara y col., 1993). *Brettanomyces* sp. se caracteriza por la producción de compuestos volátiles fenólicos y ácidos orgánicos que confieren sabores ahumados, picantes y medicinales a la bebida, colectivamente descritos como carácter “Brett”, cuyos umbrales de aceptación y agradabilidad dependen del consumidor (Steensels y col., 2015).

Entre las levaduras no convencionales halladas junto a *Saccharomyces* sp. en estas fermentaciones espontáneas se han identificado *Meyerozyma guilliermondii*, *Debaryomyces* sp., *Pichia* sp., *Wickerhamomyces anomalus*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida krusei*, *Cryptococcus keuzingii* y *Rhodotorula mucilaginosa* (Bokulich y Bamforth, 2013; Steensels y col., 2015; Varela, 2016).

Como se mencionó, las levaduras no sacaromícéticas generalmente presentan muy baja producción de etanol comparadas con *S. cerevisiae*. La estrategia más conveniente para su incorporación a la producción es la co-inoculación simultánea o secuencial con *Saccharomyces* sp. La levadura no convencional más comúnmente

utilizada es *Brettanomyces* sp., que se inocula en fermentaciones de ciertas cervezas trapistas y de *sour beers* americanas (Varela, 2016). Holt y col. (2018) estudiaron los perfiles aromáticos y de sabor de cervezas producidas mediante la estrategia de fermentación secuencial. Los autores reportan un interesante incremento de acetato isoamílico (descriptor banana) y acetato etílico (descriptor frutal) cuando se utiliza *Pichia kluyverii*; un aumento de compuestos etil fenólicos (descriptor de aroma picante) al co-fermentar con *Brettanomyces* sp.; y mayor producción de 4-vinil guayacol (4VG, descriptor de clavo de olor) al emplear *Torulaspota delbrueckii*.

Ciertas especies de levaduras, incluidas algunas *Saccharomyces non-cerevisiae* (Sharp y col., 2017), *Debaryomyces* sp., *Hanseniaspora* sp. y *Pichia terricola* (Steensels y Verstrepen, 2014) son valoradas por su capacidad de producir considerables niveles del terpeno linalool, vinculado a sabores cítricos, florales y anisados, y de metil salicilato, que imparte sabores de menta y picantes (Winterhalter y Skouroumounis, 1997).

1.13 La fermentación del mosto de cebada por *Saccharomyces* sp.

Durante la fermentación cervecera las levaduras consumen azúcares disueltos en el mosto de cebada y producen etanol, dióxido de carbono (CO₂), compuestos carbonados asociados a sabores y aromas y nuevas células. El proceso consiste, esencialmente, en la consecución de tres fases desde la inoculación del mosto: la fase de latencia (entre las 0 y 15 h); la fase de crecimiento exponencial (entre las 15 h y los 4 días); y la fase estacionaria (entre los 3 y los 10 días) (White y Zainasheff, 2010).

1.13.1 Fase de latencia

Durante la fase de latencia, las levaduras se aclimatan a las condiciones de fermentación, tales como temperatura, estrés osmótico y disponibilidad de oxígeno disuelto en el mosto. Las células comienzan a consumir oxígeno, minerales y aminoácidos y a producir proteínas. El mosto de cebada malteada es una fuente excelente de nitrógeno y minerales, y provee de la mayoría de las vitaminas, como riboflavina, inositol y biotina, que la levadura necesita (White y Zainasheff, 2010). Contiene, además, todos los minerales esenciales para las levaduras, como fósforo, azufre, cobre, hierro, potasio y sodio, con excepción de cinc, que debe suplementarse cuando se prepara el mosto.

A medida que las células adquieren vitaminas y minerales, comienzan a sintetizar enzimas y otras proteínas. Además, consumen oxígeno para producir compuestos estructurales de la célula, principalmente, los esteroides de membrana plasmática. Es por ello que, durante la fabricación de cerveza, es importante garantizar la oxigenación del mosto al inicio de la fermentación.

Durante la fase de latencia, las levaduras no suelen producir compuestos que perjudiquen el sabor de la cerveza (denominados *off-flavors*), pero sí pueden producir ciertos precursores de estos compuestos, como el α -acetolactato, precursor de diacetilo. Tampoco se producen cantidades apreciables de etanol, por lo que no hay síntesis de ésteres asociados a *off-flavors* a partir de etanol y otros alcoholes (White y Zainasheff, 2010).

Sin embargo, la velocidad de adaptación de las levaduras al ambiente fermentativo durante esta fase tendrá influencia en el sabor de la cerveza lograda. La temperatura de incubación durante la fase de latencia tiene un efecto directo; temperaturas más elevadas permiten que la reproducción de las levaduras inicie antes, es decir, acortan la latencia. Sin embargo, el aumento desmesurado en la tasa de reproducción durante esta fase puede dar origen a células en condiciones fisiológicas subóptimas para la fermentación, con mayor predisposición a producir precursores de metabolitos *off-flavors*. Efectos similares se obtienen con inóculos de levadura excesivos (White y Zainasheff, 2010).

1.13.2 Fase de crecimiento exponencial

En la fase siguiente, las levaduras comienzan a consumir velozmente los azúcares disueltos y a producir CO₂, que se acumula en la superficie del fermentador, formando la espuma que contiene levaduras denominada *kraeusen*. El recuento celular se incrementa rápidamente y se producen activamente etanol y compuestos de sabor.

El consumo de azúcares disueltos ocurre en cierto orden: primero la glucosa, luego la fructosa, luego la sacarosa y maltosa. Estos azúcares simples pueden ingresar fácilmente a las células, mediante proteínas facilitadoras de transporte a través de membrana, y son metabolizados rápidamente. Mientras que la glucosa representa un 14% de los azúcares del mosto, la maltosa constituye en promedio un 59%. En presencia de maltosa, las levaduras producen la enzima maltasa, la cual hidroliza maltosa en unidades de glucosa fermentables (White y Zainasheff, 2010).

Los azúcares más complejos, como la maltotriosa y dextrinas de mayor número de unidades de glucosa, son las últimas en ser metabolizadas. Algunas levaduras cerveceras no pueden fermentar maltotriosa. La habilidad para hacerlo es lo que determina la capacidad de atenuación del mosto de cada cepa cervecera. El consumo de maltotriosa es una característica común a la mayoría de las cepas *lager* (Hough y col., 1982).

La síntesis de etanol por las células de levadura consta de varias reacciones metabólicas que pueden sintetizarse en dos grandes etapas: la ruptura de la glucosa y obtención de dos moléculas de piruvato y la fermentación del piruvato en etanol y CO₂. Todas estas reacciones ocurren en el citosol. Alternativamente, el piruvato podría dirigirse a mitocondrias y ser respirado en presencia de O₂, dando como productos ATP y agua; esta vía metabólica es energéticamente más favorable para la célula. La represión de la vía respiratoria por la presencia de altas concentraciones de glucosa en el mosto cervecero es el principal motivo por el cual las levaduras realizan fermentación y no respiración de los azúcares, aún en presencia de O₂. Esto se conoce como efecto *Crabtree*, y explica por qué la exposición a un exceso de oxígeno durante la fermentación no atenta contra la producción de etanol; sin embargo, puede promover la activación de metabolismos que dan origen a *off-flavors*, como la oxidación de etanol en acetaldehído (White y Zainasheff, 2010).

Entre los metabolitos producidos por las levaduras en la fase exponencial se encuentra el glicerol. El glicerol es un compuesto de 3 carbonos que aporta cuerpo, sensación de plenitud en boca y aumenta la intensidad de los sabores en bebidas como el vino y la cerveza (Zhao y col., 2015). Este subproducto del metabolismo de las levaduras actúa como osmoregulador y aporta al balance redox, siendo la principal competencia a la producción de etanol en la fermentación alcohólica. Así, al incrementarse el rendimiento en glicerol, aumenta la intensidad de sabores y se reduce el etanol en la bebida. En cervezas, se ha reportado un contenido de entre 1 y 3 g/L de glicerol (Zhao y col., 2015).

Durante la fase exponencial se producen también la mayoría de los compuestos volátiles de la cerveza: alcoholes superiores, ésteres y dicetonas vecinales (VDKs, por sus siglas en inglés). Mientras que los alcoholes superiores y ésteres son metabolitos deseables en la cerveza, los VDKs se consideran usualmente *off-flavors*. Los alcoholes superiores son los compuestos organolépticos más abundantes en la cerveza. Las levaduras toman los aminoácidos presentes en el mosto e incorporan el

grupo amino a sus propias estructuras; el α -ceto ácido residual es metabolizado a través de la vía de Ehrlich, formando un alcohol superior (Pires y col., 2014).

Los ésteres son compuestos que pueden considerarse traza, si se los compara con otros metabolitos producidos por levaduras. Sin embargo, estas sustancias poseen un umbral de percepción odora muy bajo (Meilgaard, 1975; Saison y col., 2009), por lo que constituyen los compuestos de aroma más importantes, que pueden definir el perfil sensorial de la cerveza (Saison y col., 2009). Es crucial durante la producción de esta bebida mantener las condiciones que permitan obtener un perfil de ésteres balanceado, ya que su exceso puede afectarla negativamente, otorgándole un sabor amargo y/o demasiado frutado (Pires y col., 2014).

Los ésteres se forman durante la fase de fermentación primaria por condensación de ácidos orgánicos y alcoholes mediada por enzimas. Aquellos presentes en cerveza pueden dividirse en dos grandes grupos: los ésteres de acetato y los etil ésteres de ácidos grasos de cadena media (MCFA, por sus siglas en inglés). Si bien se han identificado docenas de diferentes ésteres en cerveza (Meilgaard, 1975), los más relevantes como constituyentes aromáticos son: acetato de etilo (descriptor de solvente), acetato de isoamilo (descriptor de banana), acetato de isobutilo (descriptor frutal), acetato de fenil etilo (descriptor de miel y rosas), hexanoato de etilo (descriptor de manzana dulce) y octanoato de etilo (descriptor de manzana ácida) (Pires y col., 2014).

Cada estilo de cerveza tiene su propio aroma, que se consigue a partir de la elección de la levadura (Rossouw y col., 2008) y del control de las condiciones de fermentación (Dekoninck y col. 2012; Hiralal y col. 2013). Mientras que en la mayoría de las cervezas *lagers* únicamente el acetato de isoamilo (banana) se encuentra en concentraciones por encima del umbral de percepción, las cervezas *ales* también presentan acetato de etilo (solvente) y hexanoato de etilo (manzana) en su perfil de metabolitos perceptibles (Meilgaard, 1975; Álvarez y col., 1994). Otros compuestos químicos producidos por levaduras durante la fase exponencial son los ácidos orgánicos, los compuestos sulfurados y los aldehídos (Pires y col., 2014).

1.13.3 Fase estacionaria

Por último, sobreviene la fase estacionaria de la fermentación, que se define por una disminución en la velocidad de reproducción de las levaduras, hasta equilibrarse con la velocidad de muerte celular, logrando una población estable de células vitales. En este

estadio, las levaduras han producido la mayoría de los compuestos de sabor y aroma; sin embargo, esta cerveza inmadura, denominada “cerveza verde”, no ha alcanzado aún el balance sensorial adecuado.

Las cervezas maduran durante la fase estacionaria, denominada también de acondicionamiento. En este momento las levaduras reabsorben metabolitos como el acetaldehído y la 2,3-butanediona, mejor conocida como diacetilo, producidos durante la fermentación. El diacetilo es un compuesto volátil que afecta la calidad de la cerveza; en concentraciones superiores a 0,1 ppm puede generar *off-flavors*, con descriptores de manteca/rancio/solvente (White y Zainasheff, 2010). Aunque algunos estilos *ale*, como el Stout, Schotch ale y Pilsen, admiten cierta concentración de diacetilo, asociado a descriptor de caramelo, en cervezas tipo *lager* se prefiere su ausencia. Durante la fase estacionaria, ciertas levaduras reducen el diacetilo a 2,3-butanediol, un alcohol insípido que no perjudica el perfil sensorial de la cerveza producida.

Adicionalmente, durante esta etapa el sulfuro de hidrógeno, *off-flavor* asociado al aroma de huevo podrido, escapa como gas hacia la superficie. Hacia el final de la fase estacionaria se produce la caída del *kraeusen*, es decir, las levaduras sedimentan en el fondo del fermentador, cesando el metabolismo y dando por finalizada la fermentación del mosto.

1.14 Mercado y consumo de cerveza

La industria cervecera en 2018 produjo a nivel global 1,95 billones de hectolitros de cerveza (Statista, 2018). Ese año, el consumo de cerveza y cerveza sin alcohol alcanzó los 26,1 litros per cápita. Según el instituto de investigación de mercado Plato Logic (2019), el mercado mundial de cerveza creció un 1,4% en 2018, en comparación con sólo el 0,4% en 2017. En 2019 se clasificó a China, Estados Unidos, Brasil, Alemania, México, Rusia, Japón, Reino Unido, Vietnam y España como los diez mayores mercados de cerveza. Según este estudio, las seis naciones cerveceras más grandes, en conjunto, representan más del 55% del consumo global de esta bebida, con un crecimiento colectivo en 2018 del 0,8% (Plato Logic, 2019).

En la década de 1980 en Estados Unidos, los cerveceros artesanales comenzaron a producir a mayor escala. El mercado de las cervezas artesanales de ese país creció un 12,8% en 2015, incrementando sus exportaciones en un 16,3%, con la apertura de unas 620 microcervecerías (Kell, 2016). En 2019, mientras que el volumen total de

cerveza vendida descendió un 2%, las ventas en el mercado artesanal continuaron incrementándose en un 4%, llegando a representar el 13,6% del volumen total del mercado estadounidense (Brewers-Association, 2020). En Europa, entre 2009 y 2014, se observó un fortalecimiento del sector de las cervezas artesanales de entre el 300 y el 1000% (Basso y col., 2016). La cerveza es la bebida alcohólica de mayor consumo en Brasil, con aproximadamente 14 millones de kL consumidos por año, representando el 6,8% del mercado mundial. Entre 2002 y 2018, el número de microcervecías y productores de cerveza artesanal (“cervejas artesanais”) registrados aumentó de menos de 50 a más de 830 en Brasil (de Oliveira Dias y Falconi, 2018).

La migración al consumo de cervezas artesanales es una tendencia global. La producción de cerveza artesanal a nivel mundial llegó a 74,1 millones de hectolitros en 2018, equivalente a 3,8% del consumo total. Asimismo, los consumidores se están abriendo cada vez más al sub-mercado de cervezas sin alcohol, cervezas con bajo contenido de alcohol y mezclas de cerveza (Plato Logic, 2019).

En Argentina, en 2018 se consumieron más de 20 millones de hectolitros de cerveza y se facturaron alrededor de 900 millones de dólares (CLAVES, 2019). Además de ser una industria creciente en nuestro país, el sector cervecero tiene importancia para el mercado interno, ya que utiliza ingredientes nacionales producidos por economías regionales, como son la cebada y el lúpulo (Infocampo, 2019). El sector cervecero se ubica tercero en el ranking de alimentos y bebidas de mayor facturación en los canales minoristas. Sobre un consumo de bebidas alcohólicas de 3051 millones de litros, en el año 2009 la cerveza captó el 60% y el vino el 34%, cuando este último, hasta la década de 1980, absorbía casi el 90% del volumen agregado. Dentro del sector pueden distinguirse dos grandes categorías de productores, de acuerdo a la escala y nivel de tecnificación de su proceso de elaboración: los cerveceros industriales y los cerveceros artesanales o microcerveceros. Estos últimos han tenido gran desarrollo en décadas recientes, dado el incremento en la demanda por cervezas elaboradas artesanalmente que ofrezcan mayor variedad y complejidad de sabores y aromas.

Parte de este proceso de migración del consumo se explica en la creciente calidad de la cerveza artesanal producida localmente, la sustantiva diferencia de precio respecto al vino, y a las modificaciones en las preferencias del consumidor, que identificó a la cerveza en mayor medida con los jóvenes. En 2010 el consumo local de cerveza alcanzó los 44 litros per cápita (Ablin, 2012). En 2018, el consumo per cápita ascendió

a 45 litros, cerca del máximo histórico de 45,5 litros en 2011, y la producción nacional artesanal fue de 28,6 millones de litros (CLAVES, 2019).

1.15 El residuo de levaduras subproducto de la elaboración de cerveza

Con el incremento de los volúmenes de producción de cerveza, aumenta también la cantidad de residuos y subproductos, tanto sólidos como líquidos efluentes, que genera la industria cervecera. La reutilización de estos residuos agroindustriales es de interés tanto económico como ecológico (Fillaudeau y col., 2006; Mussatto, 2009).

Una vez finalizada la etapa de fermentación, el lodo de levaduras sedimentado en el fondo del fermentador es separado del sobrenadante de cerveza inmadura. Este lodo es el segundo mayor subproducto de la actividad cervecera, luego del bagazo de malta (Mathias y col., 2014). Se obtienen entre 1,5 y 3 kg de biomasa con 85 a 90% de humedad cada 100 L de cerveza producida (Hellborg y Piskur, 2009; Huige, 2006). Esta biomasa residual contiene entre un 10 y un 14% de sólidos totales, incluyendo levaduras, proteína del mosto y turba, y puede retener entre un 1,5 y un 2,5% de la cerveza total producida (Ferreira y col., 2010).

La cantidad de biomasa residual generada depende de los parámetros de fermentación, el tipo de levadura utilizada, la tasa de inóculo, la vitalidad y viabilidad de la levadura y la composición del mosto cervecero. Las grandes cantidades de levadura descartada aportan un alto contenido de materia orgánica a los efluentes de la industria cervecera, que trae como consecuencias elevadas demanda bioquímica (DBO, 2100 mg Oxígeno/L) y demanda química de oxígeno (DQO, 2700 mg Oxígeno/L) y un alto contenido de nitrógeno total medidos en aguas residuales (Escuela de Organización Industrial de Sevilla, 2008). Esto constituye un problema a nivel ambiental y económico, ya que las aguas residuales requieren de un tratamiento previo a su descarte, con altos costos para la producción (Briggs y col., 2004). Pero también refleja la alta susceptibilidad de este residuo de ser oxidado, es decir, su potencial como fuente de obtención de energía vía fermentación anaeróbica (Mathias y col., 2015).

Ferreira y col. (2010) han revisado los posibles destinos de reutilización de este subproducto: producción de bioetanol; sustrato para el cultivo microbiológico; sustrato para la extracción de diferentes compuestos de interés, como concentrados de proteínas para la industria alimentaria. Asimismo, se ha reportado el uso de biomasa de *Saccharomyces* en biorremediación, como biosorbente de los iones metálicos cinc, cobre, plomo y níquel. El empleo de levadura cervecera *Saccharomyces* desactivada

como tecnología de bajo costo para la biosorción tiene la ventaja de la fácil separación de las células floculantes luego de la remoción de los metales de aguas residuales (Machado y col., 2009; Machado y col., 2008).

Mayormente, el subproducto de levaduras cerveceras se reutiliza en alimentación animal (Dubey y col., 2010). Las levaduras *Saccharomyces* son fuente de nitrógeno de bajo costo y vitaminas del complejo B, con buenas propiedades nutritivas y calificadas como GRAS (*Generally Recognized As Safe, status* otorgado por la FDA, Bourdichon, 2012). Existen numerosos reportes de los efectos positivos de su empleo en acuicultura y producción pecuaria (compilados por Shurson, 2018). Se ha descrito el potencial de las levaduras cerveceras como sustitutas del alimento vivo en la producción de ciertas especies ictícolas (Nayar y col., 1998). Las levaduras pueden reemplazar hasta el 50% de la proteína de la dieta de peces sin efectos negativos en la *performance* productiva. Han sido incluidas en formulaciones de alimento comercial de varias especies acuícolas, entre ellas, los salmónidos. Adicionalmente, las levaduras cerveceras aportan compuestos inmunoestimulantes, como los β -glucanos, los ácidos nucleicos y manano oligosacáridos (White y col., 2002), que potencian la respuesta inmune (Ortuño y col., 2002; Siwicki y col., 1994) y el crecimiento de ciertas especies (Lara-Flores y col., 2002).

Se ha determinado que la levadura cerveza contiene aproximadamente el doble de lípidos y la mitad de la cantidad de fibra que contiene la harina de soja descascarada empleada como alimento para cerdos. Esto representa un mayor contenido de energía metabolizable por porcinos, además de un contenido incrementado de fósforo, lisina, metionina, treonina y vitaminas del complejo B en las levaduras respecto de la harina de soja (Shurson, 2018).

Contemplando las investigaciones acerca del empleo de levaduras cerveceras en alimentación animal y los reportes citados previamente acerca del efecto positivo de la inclusión de levaduras en la dieta de pollos de cría, es posible pensar en el potencial de la adición del residuo de levaduras de la elaboración de cerveza al alimento para aves.

Justificación del estudio

Dados los antecedentes consultados, el empleo de levaduras cerveceras en el diseño de estrategias que permitan mitigar problemáticas de la actividad avícola relativas a las infecciones por enteropatógenos comunes, como *Salmonella* sp. y *E. coli*, y a la presencia de hongos y sus micotoxinas en el alimento balanceado se presenta factible.

Adicionalmente, se ha reportado un impacto positivo en los parámetros zootécnicos y en la productividad cuando se utiliza levadura como fuente de proteína de bajo costo en la dieta de aves de cría. Por otro lado, la generación de volúmenes de levadura cervecera residual cada vez mayores suponen un problema para los pequeños cerveceros locales, que no cuentan con instalaciones adecuadas para su tratamiento y correcto descarte.

Se propone, en este contexto, identificar y evaluar las propiedades antibacterianas, antifúngicas y secuestrantes de micotoxinas del efluente de levaduras de la producción cervecera y su potencial como suplemento alimenticio animal, con perspectivas a revalorizar un subproducto de la industria cervecera como agente biopreservante del alimento y promotor de crecimiento alternativo en avicultura. Este enfoque de estudio pretende articular y fortalecer ambos eslabones de la cadena productiva local y regional, micro-cervecerías y pequeños productores avícolas.

Objetivo General y Específicos

2.1 Objetivo general

Revalorizar el subproducto de levaduras floculadas de la industria cervecera para su aprovechamiento como fuente de microorganismos probióticos aplicables en la producción de alimento para aves y como biocontrolador del desarrollo fúngico y agente secuestrante de micotoxinas en el alimento formulado.

2.2 Objetivos específicos

- Identificar y caracterizar las propiedades tecnológicas para la producción de cerveza de levaduras aisladas de muestras comerciales y artesanales.
- Producir conocimiento práctico que responda a las demandas de tecnificación de los cerveceros artesanales locales, plausibles de ser utilizados en asesorías a los productores. En particular, estudiar la estabilidad de *starters* cerveceros mixtos sub-cultivados o reutilizados en fermentaciones sucesivas.
- Caracterizar *in vitro* las propiedades antimicrobianas y probióticas del subproducto cervecero y de las levaduras aisladas a partir del mismo, contemplando la resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal, el antagonismo contra microorganismos patógenos y la capacidad de adhesión y de citoprotección de un modelo celular de epitelio intestinal.
- Caracterizar *in vitro* las propiedades antifúngicas y secuestrantes de micotoxinas del subproducto cervecero y de las levaduras aisladas a partir del mismo, contemplando su capacidad de inhibir o reducir el crecimiento de hongos toxigénicos, mediante competencia por nutrientes o producción de metabolitos antifúngicos, y de capturar aflatoxinas y prevenir sus efectos nocivos sobre un modelo celular hepático.
- Formular un alimento balanceado para aves adicionado con el efluente de levaduras cerveceras, y estudiar sus características microbiológicas, bromatológicas y biocontroladoras de la contaminación natural del alimento basado en grano.

Materiales y Métodos

Materiales y Métodos

3.1 Lodos cerveceros, starters y productos de fermentación de kefir de agua empleados en la etapa de aislamiento

3.1.1 Lodos subproducto de la fermentación cervecera

Los lodos de levaduras fueron amablemente proporcionados por cerveceros artesanales platenses independientes y por miembros de la Asociación de Cerveceros Artesanales Platenses (ACAP), que reúne cooperativamente a productores de pequeña escala. Estos lodos incluyen a las levaduras cerveceras viables y al sobrenadante de la fermentación cervecera.

Se ha reportado que la porción media del lodo acumulado en el fondo del fermentador contiene levaduras que comparten las características de ser floculantes y de conservar un buen estado metabólico. Las levaduras que se encuentran en el fondo del fermentador son aquellas que floculan primero, asociado este comportamiento a inviabilidad celular o a un estado metabólico sub-óptimo y una pobre capacidad de atenuar el mosto; las levaduras que se depositan en la porción superior, las últimas en extraerse del fermentador, son aquellas poco floculantes, característica no deseable en el proceso cervecero (White y Zainasheff, 2010). Por este motivo, se solicitó a los cerveceros que recolectaran muestras de la porción media del lodo depositado en el fermentador en las condiciones asépticas, para reducir las posibilidades de contaminación. A tal fin, se les proporcionó recipientes plásticos estériles.

3.1.2 Starters cerveceros comerciales

Los *starters* (inóculos iniciadores de la fermentación) comerciales de *Saccharomyces* sp. liofilizada (Fermentis, Francia; Lallemand, Canadá; Muntions Plc., EEUU; Coopers, Australia) fueron adquiridos de proveedores locales de insumos para cervecería. Antes de ser utilizados, se re-hidrataron en solución fisiológica estéril (SF) durante 30 min a temperatura ambiente.

3.1.3 Starters cerveceros líquidos

Se contó con muestras de *starters* líquidos producidos por cerveceros locales en pequeños laboratorios de sus fábricas (LALEAR, La Plata, Argentina).

3.1.4 Kefir de agua

Como estrategia alternativa durante la etapa de prospección de levaduras, se llevó a cabo el aislamiento de colonias con características macroscópicas sacaromycéticas a partir de kefir de agua. El kefir se produjo en fermentaciones independientes a temperatura ambiente de soluciones acuosas 5,0% p/V de azúcar de mascabo, empleando tres gránulos de kefir de agua diferentes de la colección conservada en la Cátedra de Microbiología de la Facultad de Ciencias Exactas de la Universidad

Nacional de La Plata. Los gránulos se denominan CMUNLP1, originario de India, CMUNLP2 y CMUNLP3, ambos proporcionados por usuarios de la bebida de La Plata, Argentina.

3.2 Microorganismos, líneas celulares y condiciones de cultivo

3.2.1 Patógenos bacterianos

Salmonella enterica var. Enteritidis CIDCA 101 y *Escherichia coli* EHEC 60169, de la colección del CIDCA-CONICET (Centro de Investigación y Desarrollo en Criotecnología de Alimentos, La Plata, Argentina), y *Escherichia coli* ATCC® 25922™ fueron mantenidas en pico de flauta de agar nutritivo (Biokar, Francia) a 4 °C. Para los experimentos, las cepas se activaron en cultivos en caldo nutritivo (Biokar, Francia) ON a 37 °C.

3.2.2 Hongos filamentosos

A. parasiticus CMUNLP7, aislada de cereales en Colombia (Gamba y col., 2015b; León, 2013) y *A. flavus* CMUNLP15, aislada de alimento para pollos en base a granos, son cepas productoras de AFB₁ de la colección de la Cátedra de Microbiología, FCE-UNLP. La cepa *A. flavus*, antes denominada PJA, es originaria de la Universidad de la República, Uruguay, y fue re-denominada de acuerdo a las instrucciones de la colección de la Cátedra de Microbiología.

Los hongos se cultivaron en agar papa inclinado (PDA -Potato Dextrose Agar-, Britania, Buenos aires, Argentina) por 7 días a 30 °C para inducir su esporulación previo a los experimentos.

3.2.3 Líneas celulares

La línea celular humana de cáncer de colon Caco-2/TC7 fue mantenida como describen Zavala y col. (2016). Las monocapas celulares se prepararon en placas de cultivo de 24 fosas (Greiner Bio One, Frickenhausen, Germany) por siembra de 2,5 x 10⁵ células/fosa. Los ensayos y el mantenimiento de los cultivos se llevaron a cabo en Dulbecco's Modified Eagle's Minimal Essential Medium (DMEM) (GIBCO BRL Life Technologies Rockville, USA) y atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Los experimentos se realizaron por triplicado con células diferenciadas post confluencia.

La línea de carcinoma hepatocelular HepG2 se obtuvo del Instituto Multidisciplinario de Biología Celular (IMBICE, Buenos Aires, Argentina). Estas células han demostrado un fenotipo estable en condiciones de cultivo controladas y conservan algunas funciones hepáticas (Gutierrez-Ruiz y col., 1999). El cultivo y mantenimiento de las células se llevó a cabo como describen Gamba y col. (2015b). Se prepararon monocapas en placas de cultivo celular de 48 fosas (Greiner Bio One, Frickenhausen, Alemania), sembrando 0,25 mL por fosa de una suspensión de 10⁶ células/mL. Las monocapas

así obtenidas se utilizaron en los bioensayos de acuerdo a lo reportado por Ou y col. (2012).

3.3 Medios de cultivo y soluciones

El cultivo de levaduras se llevó a cabo en caldo YPD o en mosto cervecero preparado a partir de cebada malteada por un cervecero artesanal local, cuyos concentración y pH se ajustaron a las condiciones requeridas por cada ensayo previo a su esterilización en autoclave durante 15 min a 121 °C. Alternativamente, se cultivaron en caldo GPY.

Para el estudio de cinéticas de fermentación, el mosto se preparó en el laboratorio a partir de malta de cebada en polvo, como se describe en el apartado correspondiente. Los pre-inóculos de levadura para las micro-fermentaciones cerveceras a escala laboratorio se realizaron en caldo extracto de malta.

Las tinciones para observación microscópica de levaduras se llevaron a cabo con azul de metileno o cristal violeta.

Para realizar los recuentos de levaduras se empleó agar YPD (caldo YPD adicionado con 15 g/L de agar agar); alternativamente, cuando el experimento lo requirió, se utilizó agar YGC® (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia).

El cultivo de bacterias se realizó en caldo nutritivo (Laboratorios Britania, Argentina) y su recuento en agar nutritivo (caldo nutritivo adicionado con 15,0 g/L de agar agar calidad microbiológica).

Las diluciones de cultivos de levaduras y bacterias se llevaron a cabo en solución fisiológica (SF) estéril. Alternativamente, en buffer fosfato salino pH 7,0 (PBS, por sus siglas en inglés) estéril.

El cultivo de hongos filamentosos se realizó en agar papa (PDA, Biokar Diagnostics). Para dispersar las esporas fúngicas y realizar diluciones se utilizó una “solución de esporas”, formulada a partir del surfactante lauril sulfato de sodio y glucosa.

Los cultivos celulares eucariotas se realizaron y mantuvieron en medio Dulbecco Modified Eagle's Medium (DMEM, GIBCO, Grand Island N.Y, USA), adecuado a cada línea celular y requerimiento del experimento. El lavado de los cultivos celulares se llevó a cabo con PBS estéril.

La composición de los medios y soluciones mencionados se detallan en la Tabla 1, partes I y II.

Tabla 1. Parte I. Composición de los medios y soluciones acuosas empleados*

Caldo YPD		
Extracto de levadura	10,0 g/L	pH 6,5 ± 0,2
Peptona	20,0 g/L	
Dextrosa	20,0 g/L	
Caldo GPY		
Extracto de levadura	5,0 g/L	pH 3,8 ± 0,2
Peptona de carne	5,0 g/L	
Glucosa	40,0 g/L	
Caldo extracto de malta		
Extracto de malta	30,0 g/L	pH 5,4 ± 0,1
Peptona de carne	3,0 g/L	
Caldo Nutritivo (Laboratorios Britania, CABA, Argentina)**		
Pluripeptona	5 g/L	pH 7,0 ± 0,2
Extracto de carne	3 g/L	
Mosto de cebada rubia molida		
Extracto de malta cervecera rubia en polvo	180,0 g/L	pH 4,5 ± 0,1
ZnSO ₄	0,25 g/L	
Extracto de lúpulo isomerizado estéril	417 µL/L	
Caldo YNB (BD Difco™) suplementado con glucosa 0,5% p/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Glucosa	5,0 g/L	

Caldo YNB (BD Difco™) suplementado con maltosa 0,5% p/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Maltosa	5,0 g/L	
Caldo YNB (BD Difco™) suplementado con extracto de malta 0,5% p/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Extracto de malta de calidad microbiológica	5,0 g/L	
Caldo YNB (BD Difco™) suplementado con maltosa 0,1% p/V y maltotriosa 0,5% p/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Maltosa	1,0 g/L	
Maltotriosa	5,0 g/L	
Agar YNB (BD Difco™) suplementado con glucosa 2,0% p/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Glucosa	20 g/L	
Agar agar	15 g/L	
Agar YNB (BD Difco™) suplementado con glicerol 3,0% V/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Glicerol	30 mL/L	
Agar agar	15 g/L	
Agar YGC (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia)**		
Extracto de levadura	5 g/L	pH 6,5 ± 0,2
Glucosa	20 g/L	
Cloranfenicol	0,1 g/L	

Agar agar	15 g/L	
Agar papa (PDA, Biokar Diagnostics, Francia)**		
Extracto de papa	4 g/L	pH 5,5 ± 0,2
Glucosa	20 g/L	
Agar agar	15 g/L	
Solución de esporas		
Lauril Sulfato de Sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)	0,1 g/L	-
Glucosa	10,0 g/L	
Solución reguladora fosfato salino (PBS)		
NaCl	8,0 g/L	pH 7,5 ± 0,2
KCl	0,2 g/L	
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/L	
KH ₂ PO ₄	0,24 g/L	
Solución fisiológica (SF)		
NaCl	9,0 g/L	pH 7,0 ± 0,2
Solución de azúcar de mascabo		
Azúcar de mascabo	50,0 g/L	-
Solución de azul de metileno		
Colorante azul de metileno	1,0 g/L	-
Solución de cristal violeta		
Colorante violeta de genciana	20 g/L	-
Oxalato de amonio	8,0 g/L	

Etanol	20% V/V	
--------	---------	--

*Los medios de cultivo y soluciones se prepararon por disolución de sus componentes en agua destilada y se esterilizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, a excepción de la solución de azúcar de mascabo y de los colorantes azul de metileno y cristal violeta. **Los medios microbiológicos indicados se prepararon por disolución del formulado y se esterilizaron de acuerdo a las indicaciones del proveedor; en la tabla se indica la composición del medio comercial. ***El caldo YNB y las soluciones de azúcares se prepararon como soluciones concentradas, 10X y 5X, respectivamente, en agua destilada y se esterilizaron por filtración por poro de 0,22 µm; el agar agar se preparó como una solución 2X en agua destilada y se esterilizó por autoclave a 121 °C durante 15 min.

Tabla 1. Parte II. Medios utilizados en el cultivo celular (Gamba, 2015)

Ingrediente	DMEM Completo A	DMEM Completo B	DMEM Adhesión C
DMEM ^a	1 sobre	1 sobre	1 sobre
Penicilina/estreptomicina (1000 m, 1000 µg/mL) ^b	13 mL	13 mL	-
Aminoácidos no esenciales ^c	13 mL	13 mL	-
Gentamicina (50 mg/mL)	10 mL	10 mL	-
NaHCO ₃	2,0 g	2,0 g	2,0 g
L-glutamina	0,3 mg	0,3 mg	-
Suero fetal bovino inactivado ^d	120 mL	180 mL	-
Agua miliQ	1000 mL	1000 mL	1000 mL
pH	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1

^aDulbecco Modified Eagle's Medium, GIBCO (Grand Island N.Y., Estados Unidos); ^bGIBCO (Grand Island N.Y., Estados Unidos); ^cMEM Non-essential amino acids solution (IOOX), GIBCO, (Grand Island N.Y., Estados Unidos); ^dBIOSER (Argentina). El suero fue inactivado térmicamente, incubando 30 minutos a 60 °C. El DMEM A se utilizó para las células HepG2 y el DMEM B se utilizó para las células Caco-2/TC7. El DMEM C se adhesión se empleó en los ensayos de adhesión de microorganismos a la línea Caco-2/TC7.

3.4 Aislamiento de colonias de levaduras de morfología macroscópica diferencial

Se siguió el protocolo basado en aislamiento de colonias gigantes envejecidas, descrito por White y Zainasheff (2010). El mismo propone el inóculo de suspensiones diluidas de levaduras en medio sólido y su incubación a tiempos prolongados, con el objetivo de obtener pocas colonias por placa que se desarrollen sin condicionamiento por falta de nutrientes, hasta morfología de colonia diferenciable. El tiempo de incubación puede variar entre 7 y 45 días.

La concentración de levaduras en los lodos cerveceros artesanales, *starters* comerciales reconstituidos y kefir de agua se determinó por recuento en cámara de Neubauer. Se realizaron diluciones seriadas en solución fisiológica estéril y 100 μ L de suspensiones de 50 UFC/mL se sembraron en superficie de placas de agar YGC, a razón de tres réplicas por muestra. Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 7 días.

Se seleccionaron aquellas placas con un recuento de entre 5 y 15 colonias, para garantizar que las levaduras no sufrieran carencia nutricional durante la incubación. La figura 1 ilustra una placa obtenida empleando la metodología descrita.

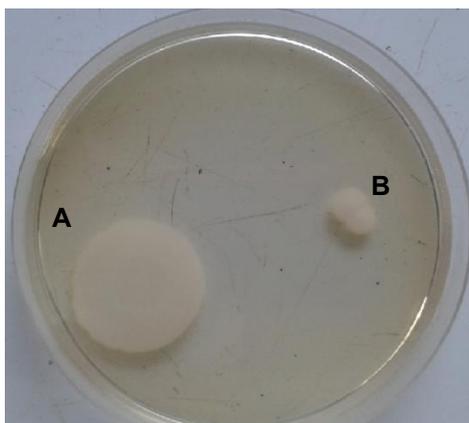


Fig. 1. Colonias de *Pichia* sp. (A) y *Saccharomyces* sp. (B) en agar YPD obtenida por siembra de altas diluciones de una suspensión de un lodo cervicero.

Las características morfológicas de colonia consideradas en la descripción y diferenciación de levaduras se resumen en la Tabla 2.

Tabla 2. Características macro-morfológicas consideradas en la etapa de aislamiento

CARACTERÍSTICA OBSERVADA	CATEGORÍAS
Tamaño	Pequeña/Mediana/Grande
Color	Crema/Tostado/Blanco
Consistencia	Cerosa/Rígida/Mucosa
Borde	Continuo/Discontinuo; Regular/Irregular
Superficie	Lisa/Rugosa; Brillante/Mate
Geometría de colonia	Redonda/Apiculada/Oval; Cónca/Convexa/Plana;

Colonias con diferentes morfologías detectadas en cada placa fueron aisladas mediante repiques sucesivos en agar YGC, empleando la técnica de agotamiento en superficie por estría. Las levaduras que presentaron morfología única luego de tres repiques sucesivos se conservaron en agar YPD inclinado a 4 °C.

La morfología microscópica de los aislamientos se estudió en microscopio óptico (Leica), por observación de extendidos frescos o de fijaciones teñidas con cristal violeta bajo objetivo de inmersión.

3.5 Identificación de los aislamientos por PCR y secuenciación

3.5.1 Extracción de ADN total

Se suspendió una colonia de levadura en 100 µL de solución 200 mM LiC₂H₃O₂, 1% p/V SDS, y se incubó a 70 °C por 15 min. Se agregaron 300 µL de etanol 96° y se homogeneizó utilizando vortex. La suspensión se centrifugó 3 min a 15000 g, se lavó el *pellet* con etanol 70% V/V y se dejó secar a temperatura ambiente. Luego, el *pellet* se resuspendió en 150 µL de agua miliQ y se realizó un *spin down* para precipitar el debris celular (15 seg a 15000 g).

3.5.2 Amplificación de las regiones ITS1-ITS2 y D1/D2

Se amplificaron la región ITS1-ITS2 empleando los cebadores ITS1 5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3' e ITS4 5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3' (White y col., 1990) y el dominio D1/D2 empleando los cebadores NL1 (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG-3') y NL4 (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG-3') (Kurtzman y Robnett, 1997) (Invitrogen Company, Thermo Fisher Scientific Inc®, MA USA).

Las amplificaciones se llevaron a cabo en volúmenes finales de 50 µL, empleando 2 µL del sobrenadante de extracción de ADN (1-50 ng/mL); 5 µL de buffer 10X; 2,5 mmol/L de MgCl₂; 200 µmol/L de cada dNTP; 0,5 µmol/L de cada cebador y 25 U/mL de Taq ADN polimerasa (Inbio Highway, Tandil, Argentina. BioTools, B&M Labs, Madrid, España). Se empleó un ciclador Techgene and Touchgene (Techne, Cambridge, UK) programado como se describe a continuación: 5 min de desnaturalización inicial a 95 °C; seguido de 40 ciclos de 1 min de desnaturalización a 95 °C, 1 min de hibridación de cebadores a 55,5 °C, 2 min de extensión a 72 °C; y extensión final de 10 min a 72 °C.

Se comprobó la amplificación de fragmentos del tamaño esperado mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8% p/V teñido con SYBR Safe (Invitrogen Company, Thermo Fisher Scientific Inc®) bajo luz UV.

3.5.3 Secuenciación de los amplicones e identificación

Los amplicones del tamaño adecuado se enviaron al Servicio de Genómica de la Universitat de Valencia (Valencia, España) para ser secuenciadas desde ambos extremos. Alternativamente, se enviaron a MacroGen (Seúl, Corea). Se analizó la calidad de los cromatogramas obtenidos y se obtuvo la secuencia consenso utilizando el software libre BioEdit Sequence Alignment Editor para Windows. La identidad de los aislamientos se determinó empleando el algoritmo BLASTn de la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Los aislamientos identificados se conservaron en crioviales a -80 °C como suspensiones concentradas de células en leche UTH (Mastellone Hnos. S.A., Argentina).

3.6 Diferenciación a nivel cepa por RFLP del ADN mitocondrial (ADNmt-RFLP)

La restricción del ADN total con la endonucleasa HinfI durante 2 h es un proceso que conlleva la digestión total del ADN genómico y parcial del ADN mitocondrial. Al resolver en gel de agarosa el producto de esta digestión, se obtiene un patrón de bandas correspondiente al ADN mitocondrial, que permite distinguir cepas diferentes dentro de un panel de levaduras *Saccharomyces* sp.

3.6.1 Extracción de ADN total

La extracción de ADN de calidad adecuada para esta técnica requiere la inclusión de pasos de precipitación de proteínas y ulteriores pasos de purificación, descritos por Querol y col. (1992). A partir de un cultivo ON del aislamiento en 5 mL de caldo GPY, se cosechó el *pellet* celular y se lavó dos veces con solución fisiológica estéril. A continuación, se resuspendió en 0,5 mL de solución 1 mol/L sorbitol, 0,1 mol/L EDTA y pH 7,5 y se transfirió a un tubo de 1,5 mL, al cual se agregaron 20 µL de una solución de zimoliasa 2,5 mg/mL (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc®). El tubo se incubó a 37 °C durante 30-60 min para obtener los esferoplastos. Los esferoplastos se cosecharon por centrifugación (1 min a 12000 g) y resuspendieron en 0,5 mL de solución 50 mmol/L Tris-HCl, 20 mmol/L EDTA y pH 7,4. Se agregaron 50 µL de solución 10% V/V de SDS a la suspensión y se incubó a 65 °C durante 5 min. Inmediatamente luego de la incubación, se agregaron 200 µL de KCH₃CO₂ 5 mol/L a 0 °C y se incubó por 30 min en hielo. A continuación, se centrifugó a 15000 g por 5 min y el sobrenadante se transfirió a un tubo limpio con 1 volumen de isopropanol a 0 °C. Se incubó en hielo durante 20 min para permitir la precipitación del ADN y se centrifugó a 15000 g por 10 min.

El *pellet* de ADN obtenido se lavó con etanol absoluto, luego etanol 70% V/V y se secó en vacío (SpeedVac Vacuum Concentrator, Thermo Fisher Scientific Inc®) para eliminar

el etanol por completo. Finalmente, se resuspendió en agua miliQ estéril y se cuantificó el ADN en espectrofotómetro NanoDrop (Thermo Fisher Scientific Inc®).

3.6.2 Digestión enzimática y revelado por electroforesis en gel de agarosa

El análisis RFLP de ADN mitocondrial requiere de una concentración mínima de 3000 ng/μL de ADN total limpio. 20 μL de ADN total de dicha concentración fueron digeridos con la endonucleasa HinfI FD (*Fastdigest*, Roche Molecular Biochemicals) en un volumen final de 25 μL, incubando por 2 h a 37 °C. Los fragmentos de restricción se separaron en gel de agarosa 0,8% p/V en buffer TAE 1X teñido con SYBR Safe. Como marcador de peso molecular se empleó el ADN del fago λ digerido con endonucleasa PstI (fago λ/PstI) (Roche Molecular Biochemicals).

3.7 Identificación de cepas fermentadoras obligadas

Las levaduras no son capaces de metabolizar glicerol mediante la vía fermentativa. La conversión de glicerol a etanol produciría una molécula de NADH extra, que no podría ser re-oxidada a NAD⁺ en condiciones de anaerobiosis. Este desbalance redox es la causa de que el glicerol no sea una fuente de carbono fermentable por las levaduras, aunque sí pueden asimilarlo a través de otras vías metabólicas. En aerobiosis, las levaduras que poseen mitocondrias son capaces de respirar este sustrato. Por otro lado, existen mutantes carentes de mitocondrias que no crecen en glicerol, aun en presencia de oxígeno.

Con fundamento en esta condición metabólica, se ensayó la capacidad de ciertos aislamientos de crecer en aerobiosis en un medio que contiene glicerol como única fuente de carbono. Se sembraron diluciones seriadas de un cultivo ON en caldo GPY del aislamiento sospechado mutante en agar YNB (BD Difco™ Yeast Nitrogen Base, Thermo Fisher Scientific) suplementado con glicerol 3% V/V y se incubó durante 10 días a 30 °C. Como control del medio se incluyó la cepa aislada de kefir de agua *S. cerevisiae* Ka25, de perfil mitocondrial conocido. Como control del estado metabólico de las cepas se sembraron placas de YNB suplementadas con glucosa 20% p/V.

En la figura 2 se muestra una fotografía ejemplo de las placas obtenidas luego de 10 días de incubación a 30 °C (amablemente brindada por la Lic. María Candela Moure).

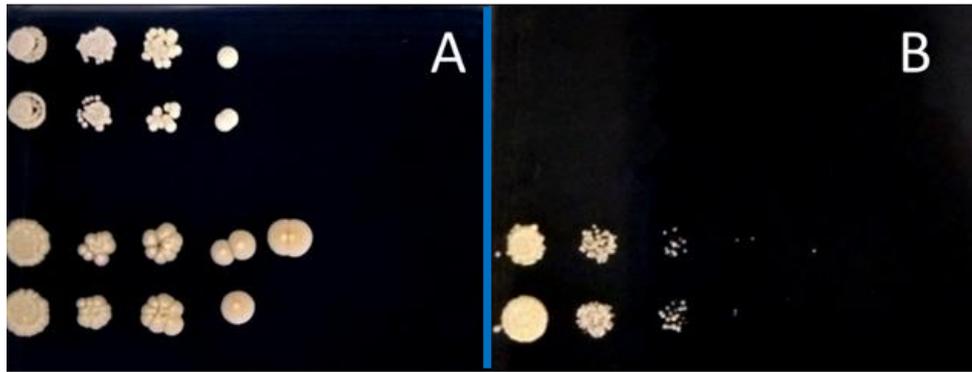


Fig. 2. **A.** Placa de YNB suplementada con glucosa 20% p/V. **B.** Placa de YNB suplementada con glicerol 3% V/V. En la fila superior se sembraron diluciones seriadas de una levadura que no es capaz de respirar la fuente de carbono (carece de mitocondrias), por lo que puede crecer fermentando glucosa, pero no puede hacerlo en el sustrato no fermentable glicerol. En la fila inferior se sembraron diluciones seriadas de una levadura control capaz de respirar.

Aquellas levaduras capaces de crecer en glucosa pero incapaces de desarrollarse en glicerol como única fuente de carbono se clasificaron como mutantes *petit*, levaduras que carecen de mitocondrias.

3.8 Identificación de híbridos inter-específicos por RFLP de genes seleccionados

La técnica conocida como PCR-RFLP consiste en la amplificación de fragmentos específicos de ADN por PCR, que luego son tratados con endonucleasas de restricción. Las diferencias en las secuencias nucleotídicas entre diferentes especies de levaduras dan lugar a fragmentos de distintos tamaños que son examinados por electroforesis, obteniéndose patrones de bandas especie-específicos. La identificación de cepas y detección de híbridos inter-específicos de levaduras *Saccharomyces* sp. cerveceras requiere del análisis RFLP de genes específicos, descritos por Pérez Través y col. (2014).

3.8.1 Extracción de ADN total y amplificación

La extracción de ADN total y las amplificaciones se llevaron a cabo como se describió en la *sección* 3.5, empleando los cebadores detallados en la Tabla 3 para amplificar los genes MAG2, UBP7 y GSY1. En el caso del gen UBP7, se utilizó un programa de PCR con temperatura de hibridación de los cebadores de 50 °C.

Tabla 3. Genes seleccionados para PCR-RFLP y cebadores empleados para su amplificación por PCR

Crom*	Gen (ORF)	Cebador	Secuencia
VI	GSY1 (YFR015c)	Forward	5'-ATTGGAAAAAGAATTTTCGAGCAYACRATGAG
		Reverse	5'-AATTTCTTGCCACCGGCAAGGGTATTCATATT
IX	UBP7 (YIL156w)	Forward	5'-CCTCTTAGGTGGGTATGAAAAATGGAARAARAC
		Reverse	5'-CCATTAACAATTACGTTTTTTRTCAAACCARTG
XII	MAG2 (YLR427w)	Forward	5'-ATGGTAGAACCGGATATGCAGAARAARGC
		Reverse	5'-AGCTCCAAGGAATTAGATACACCRCAYTTCAT

*Indica el cromosoma donde se encuentra el ORF (*Open Reading Frame*); las posiciones de los genes corresponden al genoma de *S. cerevisiae*. Las secuencias de los cebadores fueron publicadas por Pérez Través y col. (2014).

3.8.2 Digestión enzimática de los amplicones

Las digestiones de cada producto de PCR se realizaron en volúmenes finales de 20 µL, empleando 15 µL del ADN amplificado. Las endonucleasas de restricción (Roche Molecular Biochemicals, Mannheim, Alemania) utilizadas en cada caso se detallan en la Tabla 4, extraída de Pérez Través y col. (2014). Las incubaciones se llevaron a cabo de acuerdo a las instrucciones del proveedor. Los fragmentos de restricción se separaron en geles de agarosa 3% p/V en buffer TAE 1X, utilizando una mezcla de marcadores de peso molecular de 50 pb + 100 pb (Roche Molecular Biochemicals) para determinar los tamaños de banda.

3.8.3 Identificación a nivel especie

Se llevó a cabo comparando el patrón de bandas obtenido en cada caso con los patrones publicados por Pérez Través y col. (2014), sintetizados en la Tabla 4.

Tabla 4. Tamaños de bandas generados por RFLP de los genes amplificados según la especie dentro del género *Saccharomyces*

Cromosoma	XII	IX	IX	VI
GEN/Endonucleasa de corte	MAG2/Mspl	GSY1/Mspl	GSY1/Hinfl	UBP7/TaqI
Tamaño amplificado	1000	770	770	990
<i>S. cerevisiae</i>	490, 400, 100, 10	600, 160, 10	290, 180, 180, 60, 50	350, 340, 300
<i>S. kudriavzevii</i>	600, 225, 175	325, 270, 160, 15	290, 180, 180, 60, 40, 10	410, 270, 95, 95, 80, 50
<i>S. uvarum</i>	835, 175	380, 320, 50, 10	320, 240, 90, 70, 50	275, 275, 160, 150, 80, 50
<i>S. eubayanus</i>	600, 235, 175	380, 320, 50, 10	320, 240, 200	310, 275, 275, 80, 50
<i>S. paradoxus</i>	350, 225, 115, 115, 75, 65, 60	300, 220, 190, 50	290, 240, 180, 50	380, 265, 180, 80, 80
<i>S. mikatae</i>	490, 225, 175, 115	575, 190	290, 240, 180, 50	380, 270, 140, 120, 80
<i>S. arboricolus</i>	no evaluado	425, 190, 150	290, 180, 180, 60, 50	550, 260, 90, 80

Tabla adaptada de los datos publicados por Pérez Través y col. (2014). Los tamaños de los fragmentos se indican en pares de bases (pb).

Adicionalmente, para identificar a nivel especie las cepas *Meyerozyma* sp. se realizó un análisis de restricción de la región ITS1-ITS2 de acuerdo a Romi y col. (2014). Según lo reportado por los autores, la digestión de este amplicón con la endonucleasa TaqI genera patrones de bandas que permiten diferenciar cepas *M. caribbica* de cepas *M. guilliermondii*. Los productos de restricción se analizaron en gel de agarosa, como se describió previamente, y se identificó a las cepas cerveceras comparando con los patrones de banda reportados por Romi y col. (2014), sintetizados en la Tabla 5.

Tabla 5. Tamaños de bandas ITS-RFLP de *M. guilliermondii* y *M. caribbica*

Amplicón/Endonucleasa de corte	ITS1-ITS2/TaqI
Tamaño amplificado	607
<i>M. guilliermondii</i>	240, 170, 60
<i>M. caribbica</i>	240, 170, 130, 60

Datos publicados por Romi y col. (2014). Los tamaños de los fragmentos se indican en pares de bases (pb).

3.9 Estudio de parámetros cinéticos de crecimiento en distintos medios

Las curvas de crecimiento se llevaron a cabo de acuerdo a lo descrito por Alonso del Real y col. (2017), con algunas modificaciones.

3.9.1 Cinéticas de crecimiento en microplaca

Pre-cultivos ON en caldo GPY (sección 3.3) de las levaduras se cosecharon, lavaron con solución fisiológica estéril y diluyeron a una DO_{600} inicial de 4. 20 μ L de cada suspensión se sembraron una placa estéril de 48 fosas de fondo plano (Falcon™, Fisher Scientific SL, Madrid, España) en triplicado por cada tratamiento. A continuación, se completaron las fosas con 380 μ L de cada medio. La evolución de la DO_{600} se monitoreó en un equipo SPECTROstar Omega (BMG Labtech, Offenburg, Germany) durante 72 h, programado para incubar a 20 °C y medir cada 30 min, de forma de obtener suficientes mediciones para lograr un ajuste estadísticamente significativo al modelo matemático propuesto por Zwietering y col. (1990).

3.9.2 Modelo matemático de crecimiento microbiano y cálculo de los parámetros de crecimiento.

Se realizó un ajuste a la ecuación de Gompertz re-parametrizada (Zwietering y col., 1990) empleando el soporte en línea GCAT (<http://www.glbrc.org/gcat-vm/>, Genomes for life). Este modelo matemático de crecimiento microbiano establece:

$$y = D \times \exp \{-\exp [((\mu_{\max} \times e) / D) \times (\lambda - t) + 1]\} \quad (1.0)$$

Donde $y = \ln (DO_t/DO_0)$; DO_0 es la DO_{600} inicial; DO_t es la DO_{600} a tiempo t ; D es el máximo asintótico, equivalente a $\ln (DO_{\max}/DO_0)$; μ_{\max} es la velocidad máxima específica de crecimiento [h^{-1}]; y λ es el tiempo de latencia [h].

Aquellas cinéticas de crecimiento que ajustaron adecuadamente al modelo se seleccionaron para el cálculo de sus parámetros de crecimiento. La cosecha máxima, DO_{\max} , se obtuvo como el máximo asintótico de la curva DO_{600} vs tiempo. La velocidad máxima específica de crecimiento, μ_{\max} , se calculó como la pendiente de la porción lineal de la curva, correspondiente a la etapa de crecimiento exponencial. El tiempo de latencia, λ , se calculó como la intersección con el eje de abscisas de la porción lineal de la curva que describe la etapa exponencial de crecimiento extrapolada:

$$\lambda = -b / \mu_{\max} \quad (1.1)$$

Donde λ es el tiempo de latencia [h]; μ_{\max} es la velocidad máxima específica de crecimiento [h^{-1}]; y b es la ordenada al origen de la curva lineal que describe la etapa de crecimiento microbiano exponencial.

3.9.3 Medios de cultivo ensayados

Los medios evaluados fueron caldo YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V; caldo YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V; caldo YNB suplementado con maltosa 0,1% p/V y maltotriosa 0,5% p/V; caldo YNB suplementado con extracto de malta microbiológico 0,5% p/V; caldo YPD; y mosto cervecero estéril, de concentración de azúcares (OG, de sus siglas en inglés *Original Gravity*; densidad específica) 9,98 °Bx y pH 5,5. El contenido de azúcares del mosto se determinó utilizando un refractómetro manual (Master 20T, Atago, Tokyo, Japan).

3.10 Micro-fermentaciones en mosto cervecero

Una cepa representante de cada perfil mitocondrial obtenido en etapas previas del estudio, mediante la técnica descrita en la *sección 3.6*, se seleccionó para realizar micro-fermentaciones de mosto de cebada controladas y estudiar sus parámetros fermentativos.

3.10.1 Formulación del mosto cervecero

Se disolvieron 90,0 g de extracto de malta cervecera rubia en polvo (Brewferm, Bélgica) en 500 mL de agua destilada, se adicionaron 0,9 mg/L de $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (0,25 mg/L de $ZnSO_4$, Sigma Aldrich, Merck, Alemania) y se llevó pH a $4,5 \pm 0,1$ con ácido láctico, de acuerdo a lo reportado por Holt y col. (2018). Se esterilizó por autoclave a 110 °C por 15 min.

Se obtuvo un mosto de 17,0 °Bx, medidos con refractómetro manual (Master 20T, Atago). Se separó por filtrado en vacío la fracción de proteína sedimentada durante el autoclavado y la concentración de azúcares en la fracción líquida recuperada se ajustó por agregado de solución de $ZnSO_4$ 0,25 mg/L estéril pH $4,5 \pm 0,1$ cuando se lo requirió. Se adicionaron 417 μ L/L de extracto de lúpulo isomerizado (Bélgica), previamente filtrado por poro de 0,22 μ m.

El mosto obtenido se alicuotó en botellas de 100,0 mL (SCHOTT AG, Hattenbergstrasse, Mainz, Alemania) estériles a razón de 70,0 mL por botella.

3.10.2 Pre-inóculo y siembra del mosto

El pre-inóculo de las levaduras se realizó en 50,0 mL de caldo extracto de malta estéril incubados ON a 28 °C.

Las células en el preinóculo se cuantificaron empleando Muse® Cell Analyzer (Merck Millipore, Alemania) y se ajustó para obtener una concentración final de 2×10^6 células/mL en botellas de 70,0 mL de mosto. Se inocularon las botellas rotuladas y se

taparon con válvulas Muller esterilizadas bajo luz UV (Fig 3A). Se registró el peso a tiempo cero de fermentación de cada botella.

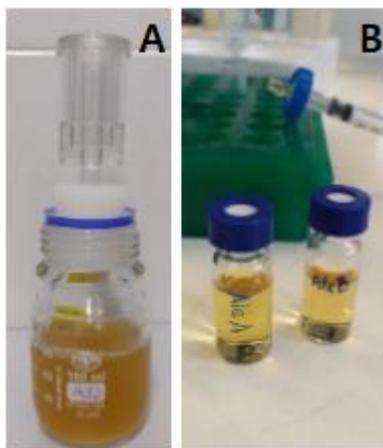


Fig. 3. Micro-fermentaciones. **A.** Botella con mosto cervecero estéril y válvula para gases Muller preparada para micro-fermentación. **B.** Viales para HPLC conteniendo el producto de micro-fermentación cervecera filtrado (adelante); jeringa con filtro de nylon de 0,22 μm (atrás).

3.10.3. Micro-fermentaciones

Las botellas se incubaron a 20 °C en agitador orbital (140 rpm) para lograr la aireación que ocurre naturalmente en el fermentador cervecero por efecto del burbujeo de CO₂ durante la fermentación. Cada cepa de levadura se ensayó por triplicado y se incluyeron controles de esterilidad (botellas con mosto sin inocular) y controles positivos de fermentación (botellas sembradas con pre inóculo de levadura comercial SafaleT-58, Fermentis, Francia), ambos por triplicado.

Las fermentaciones se monitorearon por pérdida de peso (Pérez-Través y col., 2014) hasta el registro de dos pesadas consecutivas con diferencias inferiores a 0,10 g, momento en el cual se consideró finalizada la fermentación y se procesaron las muestras.

El lodo de levaduras se cosechó por centrifugación en esterilidad y se conservó a 4 °C hasta ulteriores ensayos. El sobrenadante de fermentación se filtró por poro de nylon de 0,22 μm (Symta, Madrid, España) y se dispuso en viales aptos para HPLC (Fig. 3B).

3.10.4 Determinación del contenido azúcares, glicerol, etanol y ácidos orgánicos del producto fermentado mediante HPLC

Se empleó un cromatógrafo Thermo (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) equipado con detector de índice de refracción y columna HyperREZTM XP Carbohydrate H⁺ 8µm (Thermo Fisher Scientific), protegida por un HyperREZTM XP Carbohydrate Guard (Thermo Fisher Scientific). Como eluyente se utilizó H₂SO₄ 1,5 mmol/L, el flujo fue de 0,6 mL/min y la temperatura del horno de 50 °C. Cada muestra se inyectó por duplicado.

3.10.5 Construcción de la curva de fermentación y análisis estadístico

Para construir la curva de fermentación, el incremento en la pérdida de masa se corrigió por el porcentaje de azúcar consumido, según Pérez-Través y col. (2014):

$$C = \{(m \times [S-R]) / (m_f \times S)\} \times 100 \quad (2)$$

Donde C es el porcentaje de azúcar consumido al tiempo t; m es la masa perdida [g] al tiempo t; S es la concentración inicial de azúcar en el mosto [g/L]; R es la concentración de azúcar residual en el mosto fermentado (glucosa + fructosa) [g/L]; y m_f es la masa perdida acumulada al final de la fermentación [g]. El valor R se obtuvo mediante análisis HPLC del mosto fermentado.

Se graficaron la pérdida de peso [g/L] vs tiempo y el porcentaje de glucosa inicial consumido vs tiempo, y se verificó el ajuste de las curvas a la ecuación de Gompertz re-parametrizada, propuesta por Zwietering y col. (1990) (ecuación 1.0). Los parámetros cinéticos de máximo peso perdido, velocidad máxima de fermentación y tiempo de latencia, calculados como se describe en la sección 3.9.2, y los datos obtenidos mediante análisis HPLC de los productos de fermentación se evaluaron para detectar diferencias significativas mediante ANOVA y test de Tukey (P < 0,05), empleando el software libre InfoStat (Universidad Nacional de Córdoba, Argentina).

3.11 Tolerancia al pasaje por temperatura y pH estomacal e intestinal de pollos (en suspensión de solución fisiológica)

Cultivos de 48 h a 30 °C en caldo YPD de las levaduras o *starters* comerciales liofilizados re-constituidos en PBS estéril durante 30 min, fueron lavados dos veces con SF, contados en cámara de Neubauer y re-suspendidos a concentraciones finales de 10⁶–10⁷ UFC/mL en SF estéril de pH 2,5 (gástrico), ajustado con HCl 3 mol/L y termostatizada a 41 °C. Las suspensiones se incubaron durante 2 h a 41 °C y se cosecharon y lavaron dos veces con SF. A continuación, se re-suspendieron en SF estéril de pH 8,0 (intestinal), ajustado con NaOH 1 mol/L y termostatizada a 41 °C. Las

suspensiones se incubaron durante 6 h a 41 °C. Se tomaron alícuotas de las suspensiones de levaduras a tiempo inicial, post incubación gástrica y post incubación intestinal para realizar recuentos en agar YPD.

3.12 Determinación de la resistencia a las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos *in vitro* (temperatura, pH, enzimas digestivas y bilis)

La técnica se realizó siguiendo los lineamientos publicados por Minekus y col. (2014), con las modificaciones necesarias para adaptarlos al modelo de tracto gastrointestinal (TGI) de pollo.

3.12.1 Preparación de soluciones gástrica e intestinal

Las soluciones se prepararon por disolución de sus componentes en SF y posterior esterilización mediante filtrado por poro de 0,22 µm.

Solución gástrica (SG)	3,0 g/L de pepsina (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, USA) pH 2,5 ajustado con HCl 3 mol/L
Solución intestinal (SI)	1 g/L de pancreatina porcina (Sigma-Aldrich) 70 g/L de sales biliares (Britania S.A., CABA, Argentina) pH 8,0 ajustado con NaOH 1 mol/L

3.12.2 Incubaciones en soluciones del TGI de pollos simulado

Cultivos de levaduras cerveceras en caldo YPD fueron lavados dos veces con SF estéril, contados en cámara de Neubauer y re suspendidos a concentraciones finales de 10⁶–10⁷ UFC/mL en SG termostatzada a 41 °C. Se incubó las suspensiones gástricas durante 2 h a 41 °C.

Luego, se cosecharon y lavaron dos veces los *pellets* de levaduras con SF y se re-suspendieron en SI termostatzada a 41 °C. Se incubó las suspensiones intestinales durante 6 h a 41 °C. Se tomaron alícuotas de las suspensiones de levaduras a tiempo inicial, post incubación gástrica y post incubación intestinal para realizar recuentos en agar YPD.

3.13 Condiciones de cultivo de las levaduras aisladas y starters cerveceros seleccionados

Se determinaron tres condiciones de cultivo para el estudio comparativo de ciertas propiedades probióticas, antimicrobianas y antifúngicas de las levaduras, que se describen a continuación:

- a) 10,0 mL de caldo YPD a 30 °C por 48 h.
- b) 10,0 mL de mosto cervecero estéril, OG 9,98 °Bx a 30 °C por 72 h.

- c) Micro-fermentaciones de 700,0 mL de mosto cervecero estéril, OG 9,98 °Bx a 18 °C hasta atenuación.

La condición (a) establece un medio de cultivo nutricionalmente óptimo para las levaduras. La condición (b) permite estudiar los efectos del cultivo de las levaduras en un medio osmóticamente estresante como el mosto de cebada.

La condición (c), denominada micro-fermentación, emula las condiciones de producción de lodo de levaduras en la cervecería a escala laboratorio, incluyendo tiempo y temperatura de incubación. El punto de atenuación, definido como el final de la fermentación, se midió a través del consumo de azúcar disuelto en el mosto. Para ello, cada 24 h se tomó una alícuota del sobrenadante de fermentación en esterilidad y se midió su contenido de azúcares utilizando un refractómetro manual (Master 20T, Atago, Tokyo, Japan). La fermentación se consideró finalizada al determinar idénticos valores de concentraciones de azúcares en dos muestras sucesivas del sobrenadante de micro-fermentación.

El mosto cervecero utilizado no fue producido en el laboratorio, sino donado por un productor artesanal local, ajustado a $9,98 \pm 0,02$ °Bx, esterilizado por autoclave durante 15 min a 121 °C y decantado para eliminar el exceso de proteína floculada.

3.14 Determinación de la resistencia a las condiciones del TGI de pollos *in vitro* de levaduras cultivadas en mosto cervecero

A partir de los resultados obtenidos en estudios previos (*sección 3.12*), se seleccionó un subgrupo de levaduras cerveceras en base a su capacidad de tolerar las condiciones gastrointestinales de pollos emuladas *in vitro*.

Se estudió la capacidad de las levaduras seleccionadas, cultivadas en las condiciones b y c descritas en la *sección 3.13*, de resistir el pasaje por el TGI de pollos empleando un protocolo análogo al descrito en la *sección 3.12*.

3.15 Obtención de sobrenadantes libres de células de cultivos de levaduras cerveceras

Sobrenadantes libres de células (SLC) de cultivos en caldo YPD y sobrenadantes de micro-fermentación (condiciones a y c, respectivamente, *sección 3.13*) de las levaduras se obtuvieron por centrifugación y posterior filtración de los sobrenadantes obtenidos con filtros de nylon estériles de 0,22 µm de poro (Sartorius™, Goettingen, Germany). La ausencia de células viables se verificó por ausencia de crecimiento en placas de agar YPD sembradas con los SLC obtenidos.

3.16 Determinación del efecto bactericida y bacteriostático de los sobrenadantes libres de células frente a *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169

Cultivos ON de las bacterias patógenas en caldo nutritivo se cosecharon, lavaron dos veces con SF estéril y resuspendieron para obtener suspensiones de turbidez comparable al patrón McFarland 0.5, equivalentes a 10^8 bacterias/mL.

En tubos cónicos estériles de 1,5 mL se dispusieron los SLC de levaduras, obtenidos como se describe en la sección 3.15, de acuerdo al siguiente esquema:

Tratamiento	Composición en volúmenes
Tubo 100%	1 mL de SLC
Tubo 90%	900 μ L de SLC + 100 μ L de caldo nutritivo
Tubo 80%	800 μ L de SLC + 200 μ L de caldo nutritivo
Tubo 70%	700 μ L de SLC + 300 μ L de caldo nutritivo
Tubo 60%	600 μ L de SLC + 400 μ L de caldo nutritivo
Tubo 50%	500 μ L de SLC + 500 μ L de caldo nutritivo
Control positivo	1 mL de caldo nutritivo
Control negativo	1 mL de SLC

Se sembraron todos los tubos, a excepción del control negativo, con 10 μ L de la suspensión bacteriana y se incubaron ON a 37 °C.

Para determinar la concentración inhibitoria mínima (CIM), asociada al efecto bacteriostático, se verificó presencia/ausencia de desarrollo bacteriano por observación de turbidez en la suspensión. Aquellas suspensiones que no evidenciaron turbidez fueron sembradas en agar nutritivo para determinar su poder bactericida y la concentración bactericida mínima (CBM).

3.17 Estudio de la capacidad de autoagregación de levaduras cerveceras

Cultivos de 10,0 mL en caldo YPD y en mosto cervecero (condiciones a y b, sección 3.13) de las levaduras se cosecharon, lavaron dos veces con SF estéril y contaron en cámara de Neubauer. Los *pellets* resultantes se resuspendieron para obtener suspensiones de 10^8 células/mL en SF. Las suspensiones se dejaron decantar y su DO_{600} se midió a tiempo inicial y transcurridas 1 y 3 h en espectrofotómetro Spectronic 20 (Thermo Scientific, USA), cuidando de no alterar la suspensión de microorganismos. El coeficiente de auto-agregación (C_{AA}) de cada levadura se calculó de acuerdo a Del Re y col. (2000):

$$C_{AA} = 1 - (DO_{600} t_3 / DO_{600} t_0) \quad (3)$$

Donde $DO_{600} t_3$ es la DO_{600} medida transcurridas 3 h de ensayo y $DO_{600} t_0$ es la DO_{600} inicial.

3.18 Determinación de la capacidad de las levaduras cerveceras de co-agregar con *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* ATCC 25922

Levaduras obtenidas en las condiciones de cultivo descritas en la *sección 3.13* se cosecharon, lavaron dos veces con SF estéril, contaron en cámara de Neubauer y re-suspendieron a concentraciones finales de 10^8 células/mL en SF.

Cultivos ON de las bacterias patógenas se cosecharon, lavaron dos veces con SF estéril y re-suspendieron para obtener suspensiones de turbidez comparable al patrón McFarland 0.5, equivalente a 10^8 bacterias/mL.

Se mezclaron 750 μ L de la suspensión de levaduras y 750 μ L de la suspensión del patógeno, previamente homogeneizadas, en cubetas de vidrio aptas para espectrofotómetro y se homogeneizaron durante 3 min en vortex. Se incluyó un control de auto-agregación del patógeno, consistente en 750 μ L de la suspensión del patógeno y 750 μ L de SF estéril. Se midió la DO_{600} a tiempo inicial y transcurridas 1, 2 y 3 h en espectrofotómetro Spectronic 20. El coeficiente de co-agregación (C_{CA}) se calculó de acuerdo a Zavala y col. (2016):

$$C_{CA} = 1 - (DO_{600} t_3 / DO_{600} t_0) - C_{patx} \quad (4)$$

Donde $DO_{600} t_3$ es la DO_{600} de la suspensión microbiana transcurridas 3 h de co-incubación, $DO_{600} t_0$ es la DO_{600} inicial de la suspensión microbiana y C_{patx} es el coeficiente de auto-agregación del patógeno evaluado a 3 h, calculado como se indica en la *sección 3.15*, ecuación 3.

Finalizados los tiempos de co-incubación de levaduras y patógenos, se tomaron muestras de los microorganismos sedimentados en el fondo de las cubetas de vidrio para realizar extendido, secado, fijación sobre portaobjeto y tinción de Gram y observar los flóculos bajo microscopio óptico bajo objetivo de inmersión (100X).

3.19 Ensayo de adhesión de las levaduras cerveceras a células intestinales Caco-2/TC7

La capacidad de las levaduras cerveceras de adherirse a enterocitos se estudió siguiendo el protocolo publicado por Diosma y col. (2013). Estos autores reportaron que el porcentaje de adhesión de levaduras de diferentes géneros a la línea celular Caco-2/TC7 fue independiente del inóculo inicial, cuando se inocularon concentraciones de 10^8 , 10^7 , 10^6 y 10^5 UFC/mL. De acuerdo a sus resultados, se decidió estudiar una única concentración de inóculo de levaduras cerveceras, 10^8 UFC/mL.

Cultivos de las levaduras fueron cosechados, lavados con SF estéril y resuspendidos en suficiente volumen de DMEM de adhesión (GIBCO BRL Life Technologies, EEUU, Tabla 1, Parte II, sección 3.3) para obtener suspensiones de 10^8 levaduras/mL. Las monocapas celulares se incubaron con 500 μ L/fosa de la suspensión de levadura durante 1 h a 37 °C en una atmósfera de 5% CO₂. Posteriormente, se lavaron las monocapas 3 veces con PBS para eliminar las levaduras no adheridas y se lisaron por incubación de 30 min a 37 °C con 500 μ L/fosa de agua destilada estéril. Todos los ensayos se realizaron por triplicado.

Diluciones apropiadas de las suspensiones de células lisadas fueron plaqueadas en agar YPD para cuantificar las levaduras adheridas. El porcentaje de levaduras adheridas se calculó respecto del número de levaduras inoculadas.

3.20 Determinación de la asociación e invasión de *S. Enteritidis* CIDCA 101 a monocapas de células Caco-2/TC7 pre-incubadas con levaduras cerveceras

La capacidad de *S. Enteritidis* CIDCA 101 de asociarse e invadir la línea celular Caco-2/TC7 fue determinada en presencia y ausencia de levaduras cerveceras, de acuerdo al protocolo descrito por López y col. (2013).

3.20.1 Estudio de asociación

Cultivos de *Salmonella* y de las levaduras (condiciones a, b y c, sección 3.13) fueron cosechados, lavados y resuspendidos en DMEM de adhesión (GIBCO BRL Life Technologies, EEUU, Tabla 1, Parte II, sección 3.3) a una concentración final de 10^8 microorganismos/mL. Las monocapas de Caco-2/TC7 se lavaron dos veces con PBS estéril y se incubaron 1 h con la suspensión de levadura en una atmósfera de 5% de CO₂ a 37 °C. Luego, las monocapas se lavaron 3 veces con PBS estéril y se incubaron por 1 h con la suspensión de *Salmonella*. Como controles se incluyeron fosas sin microorganismos (incubadas con 500 μ L de DMEM estéril) y fosas que fueron incubadas únicamente con *Salmonella*, sin tratamiento previo con levaduras. Cada tratamiento se realizó por triplicado.

Para cuantificar la cantidad de bacterias asociadas (adheridas en superficie e internalizadas), las monocapas se lavaron con PBS y se incubaron por 30 min con 1 mL/fosa de agua destilada estéril, estimulando la lisis celular. Alícuotas de los sobrenadantes celulares lisados fueron sembradas en diluciones apropiadas en agar nutritivo para la cuantificación de *Salmonella* asociada (incubación ON a 37 °C).

3.20.2 Estudio de invasión

Las bacterias internalizadas se cuantificaron por el protocolo de protección por aminoglicósido (López y col., 2013), empleando gentamicina para eliminar las bacterias adheridas no internalizadas. Se siguió el protocolo descrito en 3.20.1 y, luego de la incubación con *Salmonella*, las monocapas celulares se lavaron 3 veces con PBS estéril y se incubaron durante 2 h con 1 mL/fosa de gentamicina (200 µg/mL en PBS) a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂. Luego, se reiteraron los 3 lavados con PBS estéril y las monocapas se lisaron con 1 mL/fosa de agua destilada estéril durante 30 min. Diluciones adecuadas de las suspensiones celulares lisadas se sembraron en agar nutritivo e incubaron ON a 37 °C para recuento de *Salmonella* internalizada.

3.20.3 Cálculo de bacterias asociadas y bacterias internalizadas

Todos los tratamientos se ensayaron, al menos, por triplicado. El porcentaje de bacteria asociada/internalizada se calculó respecto de la cantidad de bacteria inoculada como:

$$\% = \frac{\text{UFC/mL recuento final} \times 100}{\text{UFC/mL inicial}} \quad (5)$$

3.21 Determinación del daño celular producido por *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169 sobre Caco-2/TC7 en presencia de levaduras cerveceras

Para evaluar el daño celular producido por *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169 sobre la línea celular Caco-2/TC7, se cuantificó la actividad lactato deshidrogenasa (LDH) en los sobrenadantes de cultivo. La actividad LDH correlaciona cuantitativamente con la cantidad de enzima liberada al medio de cultivo por la permeabilización de la membrana celular eucariota, la cual se asocia al grado de daño celular (Legrand y col., 1992).

El ensayo de incubación de la línea celular con suspensiones de levaduras cerveceras y de los patógenos se llevó a cabo como se describe en la sección 3.20.1, con un inóculo inicial de *E. coli* EHEC 60169 de 10⁶ UFC/mL de DMEM. Finalizadas las incubaciones, se tomaron alícuotas del sobrenadante de cultivo de cada fosa, preservando la integridad de la monocapa. La actividad LDH en sobrenadantes fue cuantificada empleando el kit LDH-P Unitest (Wiener Lab, Argentina), siguiendo las

instrucciones del proveedor. La cinética enzimática fue monitoreada en espectrofotómetro Beckman DU-650 UV-Vis (Palo Alto, USA).

3.22 Estudio de la inhibición de la germinación de conidios de *Aspergillus sp.* por SLC de cultivos de levaduras cerveceras

Los SLC se obtuvieron como se describe en la sección 3.15 a partir de cultivos de levaduras en caldo YPD y micro-fermentaciones (condiciones a y c, sección 3.13).

A partir de cultivos esporulados de *A. parasiticus* CMUNLP7 y *A. flavus* CMUNLPI5 en agar papa inclinado, se prepararon suspensiones de 10^4 conidios/mL en solución de esporas (sección 3.3), cuya concentración se determinó por recuento de conidios en cámara de Neubauer.

Microplacas estériles de 96 fosas de fondo plano (Greiner Bio One) se inocularon con 190 μ L de SLC y 10 μ L de la suspensión de conidios. Como controles positivos de germinación fúngica, fosas con 190 μ L de caldo YPD estéril o mosto cervecero estéril se sembraron con 10 μ L de la suspensión de esporas. Como controles negativos, fosas con 190 μ L de caldo YPD o mosto cervecero estéril se sembraron con 10 μ L de solución de esporas estéril.

La microplaca se incubó a 30 °C durante 48 h y se determinó espectrofotométricamente el desarrollo fúngico (Beckman DU 650, 580 nm). El porcentaje de inhibición/reducción de la germinación fúngica se calculó de acuerdo a Gerez y col. (2009) como:

$$A = [1 - (B-D) / (C-D)] \times 100 \quad (6)$$

Donde A es el porcentaje de reducción de la germinación; B es la DO_{580} de la fosa tratamiento; C es el respectivo control positivo; y D es el respectivo control negativo.

3.23 Estudio de la reducción del crecimiento de *Aspergillus sp.* co-incubado en medio sólido con levaduras cerveceras

Los experimentos se adecuaron a partir del protocolo publicado por Vero y col. (2013), introduciendo modificaciones con el objetivo de estudiar aspectos adicionales del antagonismo de las levaduras cerveceras contra *Aspergillus sp.*

Suspensiones de *Aspergillus sp.* de 10^4 conidios/mL se obtuvieron como se describe en la sección 3.22. Cultivos densos de levaduras cerveceras en caldo YPD se obtuvieron luego de incubar por 48 h a 30 °C.

El esquema de siembra en placa de Petri de 90 mm que se ilustra en la figura 4, se adoptó de Vero y col. (2013). Una estría de la levadura se sembró a 20 mm de uno de

los bordes y 10 μL de suspensión de conidios de *Aspergillus* sp. a 20 mm del borde opuesto de una placa de PDA, dejando secar bajo flujo laminar hasta absorción completa del líquido.

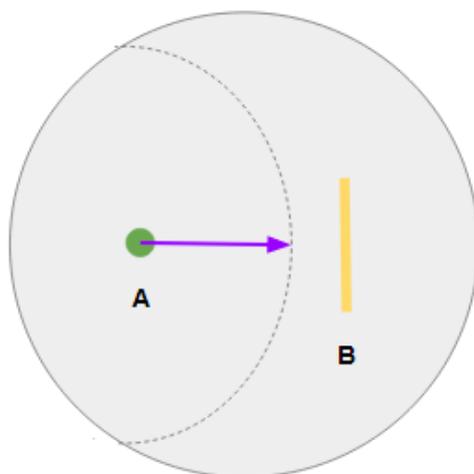


Fig. 4. Esquema de siembra de co-cultivo de levaduras y *Aspergillus* sp. en medio sólido. En la placa de PDA se sembraron 10 μL de la suspensión de *Aspergillus* sp. a 20 mm de un borde (**A**) y una estría de levadura a 20 mm del borde opuesto (**B**). La flecha violeta indica la dirección en la que se realiza la medida del radio fúngico, desde el centro del inóculo hacia el límite del micelio. La línea punteada representa el perímetro fúngico.

Las placas se incubaron a 30 °C, con la tapa hacia arriba para evitar la dispersión de conidios fúngicos, y se realizaron medidas con calibre de los radios de crecimiento fúngico a diferentes tiempos, desde el punto de siembra de *Aspergillus* sp. hacia el límite del micelio, en dirección a la estría de levadura cervecera (Fig. 4).

Se incluyeron controles de crecimiento fúngico positivo en ausencia de levadura con el mismo esquema de siembra en placa. Las medidas continuaron hasta el momento en que el control positivo respectivo alcanzó el borde de la placa de Petri más alejado del punto de siembra (70 mm). Cada tratamiento y cada control se ensayó por triplicado.

Al graficar los datos de radio fúngico [cm] vs tiempo [h] se obtuvieron curvas de crecimiento sigmoideas, a partir de las cuales se calcularon los parámetros de crecimiento fúngico, según Armando y col. (2013). Tomando la porción lineal de la curva, asociada al crecimiento exponencial, se calculó la máxima velocidad de crecimiento fúngico como su pendiente y la fase de latencia como la intersección entre el eje de abscisas y la regresión lineal extrapolada.

3.24 Estudio de la reducción del crecimiento de *Aspergillus sp.* por compuestos volátiles producidos por levaduras cerveceras

Los experimentos se realizaron de acuerdo a los protocolos publicados por Vero y col. (2013), con algunas modificaciones. A partir de cultivos esporulados de *A. parasiticus* y *A. flavus* en agar papa inclinado, se prepararon suspensiones de 10^4 conidios/mL como se describe en la sección 3.22.

Una placa de PDA se inoculó en el centro con 10 μ L de la suspensión de conidios y se dejó secar. Otra placa de PDA se sembró en superficie con un cultivo denso de levaduras en caldo YPD, empleando perlas de vidrio estériles para generar un césped, y se dejó secar. Bajo flujo laminar, las placas inoculadas se enfrentaron y sellaron por los bordes con Parafilm[®]M (Marienfeld Superior, Alemania) para evitar la pérdida de compuestos volátiles durante la incubación, como se ilustra en la figura 5.

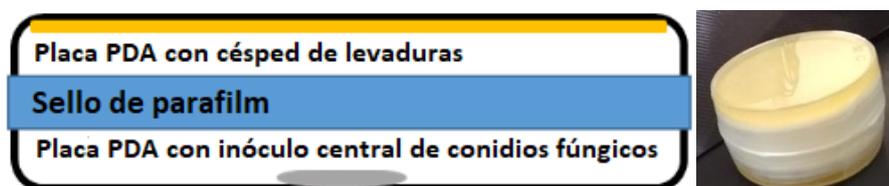


Fig. 5. Esquema de co-incubación de levaduras cerveceras y *Aspergillus sp.* para el estudio del efecto de los compuestos volátiles de levaduras sobre la germinación de conidios y crecimiento fúngico. A la izquierda se muestra un esquema de la disposición de las placas de PDA inoculadas con los microorganismos. A la derecha, una fotografía de la cámara de co-cultivo ensamblada.

Las placas enfrentadas se incubaron a 30 °C, colocando el agar inoculado con el hongo por debajo, para impedir la contaminación de la placa de levadura con esporas fúngicas. El esquema de co-incubación impide el contacto directo entre las levaduras y el hongo, que comparten una misma micro-atmósfera (Fig. 5).

Se realizaron controles positivos de crecimiento fúngico en ausencia de volátiles de levaduras, enfrentando una placa PDA inoculada con la solución de esporas y una placa PDA estéril. Se incluyeron también controles de crecimiento de las levaduras en ausencia de hongos, enfrentando una placa PDA inoculada con césped de levaduras y una placa PDA estéril. Los tratamientos y controles se realizaron por triplicado.

A diferentes tiempos se tomó la medida del diámetro de crecimiento fúngico con calibre, hasta que los controles positivos de crecimiento alcanzaron el borde de la placa. A partir de las gráficas de diámetro fúngico [cm] vs tiempo [h] se determinaron los parámetros de crecimiento fúngico en presencia y ausencia de compuestos volátiles de levaduras, como se describe en la sección 3.23.

3.25 Estudio del daño celular producido por AFB₁ sobre la línea celular HepG2 en presencia/ausencia de levaduras cerveceras

Se cuantificó el daño celular producido por AFB₁ sobre la línea celular de hepatocitos humanos HepG2, de acuerdo a Gamba y col. (2015b). Cultivos de levaduras cerveceras en caldo YPD y de micro-fermentación (condiciones a y c, sección 3.13) fueron cosechados, lavados con PBS estéril y su recuento determinado en cámara de Neubauer. Las levaduras cosechadas se resuspendieron en medio DMEM adicionado con AFB₁ (500 ppb) a una concentración final de 10⁸ UFC/mL y se incubaron durante 30 min a 30 °C en agitación.

Monocapas confluentes de células de la línea HepG2 fueron incubadas con las suspensiones de levadura cervecera en DMEM adicionado con AFB₁ durante 24 h a 37 °C en atmósfera de 5% de CO₂. Se incluyeron fosas control positivo de daño celular, incubadas con solución de AFB₁ 500 ppb en DMEM, sin levadura; y fosas control negativo de daño celular, incubadas con DMEM estéril, sin AFB₁ ni levadura.

Luego de las incubaciones, se recuperaron alícuotas de los sobrenadantes de cultivo, procurando no dañar la monocapa celular. La actividad LDH en los sobrenadantes, medida indirecta del daño celular, se cuantificó empleando el kit LDH-P UV Unitest (Wiener Lab) y espectrofotómetro (Beckman DU 650), como se describe en la sección 3.21.

3.26 Estudio de la capacidad de secuestro in vitro de aflatoxina B₁ por levaduras cerveceras

3.26.1 Preparación de las soluciones de aflatoxina B₁ (AFB₁)

La solución stock de aflatoxina B₁ (AFB₁) se preparó por solubilización de la toxina cristalina (Sigma Aldrich, St Louis, MO, EEUU) en acetonitrilo/benceno (98/2). Las soluciones de trabajo se prepararon por evaporación de la mezcla acetonitrilo/benceno y re-suspensión de la toxina en metanol. La concentración final de AFB₁ se determinó espectrofotométricamente a 354 nm ($\epsilon_{354}=19,800 \text{ mol/L}\cdot\text{cm}$) y las soluciones metanólicas se conservaron a -20 °C.

Para llevar a cabo los experimentos, soluciones de concentración adecuada fueron preparadas por dilución de la solución metanólica en PBS estéril.

3.26.2 Ensayo de secuestro de AFB₁

El ensayo de secuestro de AFB₁ se realizó de acuerdo al protocolo reportado por Bueno y col. (2007), con pequeñas modificaciones.

Cultivos de levaduras cerveceras (condiciones a, b y c, sección 3.13) se cosecharon, lavaron dos veces con PBS estéril, contaron en cámara de Neubauer y fueron resuspendidos en solución 300 ppb de AFB₁ en PBS, para obtener suspensiones de

10⁸ UFC/mL. Las suspensiones se incubaron a 30 °C en agitación (300 rpm) durante 30 min. Luego, se cosecharon las levaduras por centrifugación y los sobrenadantes conteniendo AFB₁ no secuestrada se recuperaron y guardaron a -20 °C hasta su cuantificación.

3.26.3 Cuantificación de AFB₁ en sobrenadantes de incubación

Para determinar la cantidad de AFB₁ en los sobrenadantes se empleó un ELISA competitivo directo (Aflatoxin competitive direct ELISA test Veratox[®], Neogen Corporation, Lansing, USA), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se incluyeron controles positivos (solución de AFB₁ 300 ppb en PBS, sin levaduras) y controles negativos (sobrenadantes de suspensiones de levaduras en PBS, sin AFB₁). Todos los tratamientos y controles se realizaron por triplicado.

El porcentaje de micotoxina secuestrada por levadura cervecera se calculó de acuerdo a Campagnollo y col. (2015):

$$A = (B - C - D) / B \times 100 \quad (7)$$

Donde A es el porcentaje de AFB₁ secuestrada por la levadura cervecera; B es la concentración inicial de AFB₁ en PBS (300 ppb); C es la concentración de AFB₁ en el sobrenadante luego de la incubación con levadura cervecera; y D es la concentración de sustancias interferentes determinadas en el control negativo de ELISA.

3.27 Estudio de la composición de pared celular de levaduras cerveceras cultivadas en diferentes condiciones

3.27.1 Condiciones de cultivo

Levaduras cerveceras fueron cultivadas en las condiciones descritas en la sección 3.13, bajo el inciso a, y en micro-fermentaciones llevadas a cabo en mosto cervecero estéril a 20 °C en dos condiciones de estrés osmótico y ácido diferentes: 17,0 °Bx, pH 4,5 (mayor estrés) y 15,0 °Bx, pH 5,5 (menor estrés). Cada condición de cultivo se ensayó por triplicado.

3.27.2 Preparación de las muestras

La extracción de mananos y glucosa de pared se realizó de acuerdo a Quirós y col. (2011). Se pesaron tubos de tapa rosca de 2 mL vacíos en balanza analítica, dato necesario para determinar posteriormente el peso seco de levadura. En cada tubo se cosecharon 4,0 mL de cultivo de levadura por centrifugación (en alícuotas de 2,0 mL por vez), los *pellets* se lavaron con agua destilada estéril dos veces y se secaron al vacío (Savant[™] SpeedVac concentrator, Thermo Scientific) a 65 °C hasta peso constante.

3.27.3 Extracción de mananos de pared por hidrólisis ácida

Los *pellets* obtenidos se resuspendieron en 100 µL de solución de H₂SO₄ 1 mol/L y se hidrolizaron a 100 °C durante 5,5 h. Finalizada la hidrólisis, se mezcló el contenido de los tubos en vortex y se juntó la totalidad de la suspensión en el fondo del tubo realizando un spin en microcentrífuga (Eppendorf, Hamburgo, Alemania). Cada muestra de hidrólisis se diluyó con 900 µL de agua miliQ.

3.27.4 Cuantificación de la manosa y glucosa liberadas por HPLC

Para eliminar los restos de H₂SO₄ antes del análisis por HPLC, se pasaron las muestras por columnas Strata NH₂ 500 mg/3 mL (Phenomenex, USA, Fig. 6), previamente acondicionadas por lavado con 15 mL de agua miliQ. Las fracciones eluidas se filtraron por filtro de nylon de 0,22 µm de poro y se reservaron a -20 °C hasta análisis HPLC.



Fig. 6. Elución de los hidrolizados de pared celular por columnas Strata NH₂ 500 mg/3 mL (Phenomenex, Estados Unidos) en sistema de vacío.

La glucosa y manosa libres se cuantificaron en HPLC equipado con columna de plomo PL Hi-Plex Pb 8 µm (Varian, Inc., UK) y detector de índice de refracción. Como fase móvil se utilizó agua miliQ con un flujo de 0,6 mL/min a 70 °C. Cada muestra se corrió por 20 min y se analizó por duplicado.

La curva estándar se preparó por dilución de manano comercial de *S. cerevisiae* (Sigma-Aldrich) en agua miliQ, produciendo 10 soluciones de concentraciones diferentes dentro del rango de 250 a 25 mg/L, que fueron sometidas a la doble hidrólisis descrita.

Los resultados determinados a partir de la curva estándar de manosa comercial se normalizaron considerando el peso seco de levadura, que se calculó como la diferencia entre el peso del tubo con levadura seca y el peso del tubo vacío.

3.28 Estudio de co-fermentaciones alternativas con un starter cervecero mixto

Contemplando la composición mixta de algunos *starters*, se decidió llevar a cabo el estudio de las condiciones de co-fermentación que permiten obtener el mejor producto de fermentación. Se llevaron a cabo co-fermentaciones simultáneas y secuenciales con un *starter* mixto seleccionado y cepas aisladas a partir del mismo. Las fermentaciones de mosto de cebada se monitorearon por pérdida de peso, como se describió en la *sección 3.10.3*, y sus productos de fermentación se analizaron mediante HPLC, en las condiciones descritas en la *sección 3.10.4*.

3.28.1 Co-fermentaciones simultáneas

Se realizaron las co-fermentaciones simultáneas con todas las cepas que componen al *starter* mixto seleccionado, inoculando un pre-cultivo del *starter* a razón de 2×10^6 levaduras/mL de mosto de cebada.

Las fermentaciones se llevaron adelante como se describe en la *sección 3.10* y se monitoreó su avance por pérdida de peso. Una vez detenidas, sus productos fermentados se filtraron y reservaron para posterior análisis HPLC.

3.28.2 Co-fermentaciones secuenciales

Se realizaron las co-fermentaciones secuenciales con *starter* mixto seleccionado y una cepa *S. cerevisiae* aislada a partir del mismo. Las fermentaciones se iniciaron inoculando un pre-cultivo del *starter* a razón de 2×10^6 levaduras/mL de mosto.

Cuando las fermentaciones se detuvieron, es decir, cuando se registraron dos valores consecutivos de peso con diferencias inferiores a 0,10 g, se co-inocularon con un pre-cultivo de la cepa *S. cerevisiae*. Para ello, se cuantificaron las células de levadura presentes en las fermentaciones en curso y en el pre-cultivo, empleando Muse® Cell Analyzer. Con estos datos, se ajustó el preinóculo de *S. cerevisiae* para co-inocular la fermentación a razón del 1% del recuento de levaduras del *starter* presentes en cada frasco, de acuerdo al protocolo publicado por Alonso del Real y col. (2017).

La incubación continuó en las condiciones descritas en la *sección 3.10* hasta que las fermentaciones se detuvieron nuevamente. En ese momento, se recuperaron los productos fermentados y se los procesó de acuerdo a la *sección 3.10.4* para su posterior análisis mediante HPLC.

3.29 Obtención de residuo de levaduras cerveceras para producir alimento para pollos

El residuo de levaduras cerveceras (RLC) se obtuvo por co-fermentación secuencial a escala laboratorio de mosto cervecerero de maltas rubias de 8,0 °Bx y pH inicial $4,98 \pm 0,02$, amablemente donado por un cervecerero artesanal local. Las características de este mosto garantizaron condiciones de menor estrés inicial para las levaduras, facilitando una mejor adaptación y fermentación del mosto cervecerero por las cepas no sacaromicéticas.

El mosto se esterilizó por autoclave y se estacionó para permitir la decantación de la proteína floculada. Se separó el sobrenadante líquido por trasvasado a frascos erlenmeyer de 1 L estériles y registrando el volumen total trasvasado por diferencia entre el volumen inicial contenido en la botella y el volumen remanente luego de la operación. Cada erlenmeyer se llenó con 700 a 750 mL de mosto, dejando una cámara de aire en la parte superior que facilitó la aireación durante la fermentación.

El preinóculo de *starter* cervecerero se realizó en frascos con 50,0 mL de caldo YPD, incubado ON a 30 °C. Las levaduras se cosecharon por centrifugación, se lavaron con SF estéril y se contaron en cámara de Neubauer. Finalmente, se inocularon los frascos erlenmeyer a razón de 2×10^6 levaduras/mL de mosto, y se incubaron a 18 °C en esquema estático.

El seguimiento de la fermentación se realizó midiendo el consumo de los azúcares disueltos cada 24 h con refractómetro portátil (Master 20T, Atago). Una vez detenida la fermentación (medidas consecutivas de azúcares disueltos iguales), se co-inocularon los frascos erlenmeyer con un pre-inóculo de la cepa *S. cerevisiae* aislada a partir del *starter*, a razón del 1% del recuento de levaduras totales en cada frasco erlenmeyer (Alonso del Real y col., 2017), previamente cuantificadas en cámara de Neubauer. Las fermentaciones co-inoculadas se incubaron en las mismas condiciones y se monitorearon a través del contenido de azúcares disueltos, como se describió.

Una vez finalizada la fermentación, el RLC decantado se cosechó por trasvasamiento del sobrenadante de mosto fermentado, recuperando las levaduras con una cantidad de sobrenadante reducido en tubos tipo falcon de 50,0 mL estériles.

Los sobrenadantes de mosto fermentado fueron centrifugados y filtrados por poro de 0,22 μm para obtener mosto fermentado estéril para ensayos ulteriores.

3.30 Estudio de la capacidad del RLC de secuestrar y retener AFB₁ a través del TGI de pollos simulado *in vitro*

Luego de realizar el ensayo de secuestro de AFB₁ como se describe en la sección 3.26, la levadura cervecera cosechada por centrifugación se sometió al pasaje GI de pollo simulado *in vitro*.

El pasaje GI se ensayó como se describe en la sección 3.12, con algunas modificaciones. Para evitar posibles lavados de la toxina adsorbida en la superficie de la levadura, se sortearon los lavados con solución fisiológica entre la incubación gástrica y la incubación intestinal. Inmediatamente luego de cada incubación, se centrifugaron las levaduras y se tomaron alícuotas de los sobrenadantes para cuantificación de la toxina de-adsorbida.

Para determinar la cantidad de AFB₁ en los sobrenadantes post incubación se empleó un ELISA competitivo directo (Aflatoxin competitive direct ELISA test Veratox®), siguiendo las recomendaciones del fabricante. Se incluyeron controles positivos (solución de AFB₁ 300 ppb en PBS, sin levaduras) y controles negativos (sobrenadantes de suspensiones de levaduras en PBS, sin AFB₁). Todos los tratamientos y controles se realizaron por triplicado.

El porcentaje de micotoxina liberada en cada paso de incubación se calculó como sigue:

$$A = (B / C) \times 100 \quad (8)$$

Donde A es el porcentaje de AFB₁ de-adsorbida de la superficie de la levadura cervecera; B es la concentración de AFB₁ determinada en el sobrenadante post incubación (gástrica o intestinal); y C es la concentración de AFB₁ en el control positivo (300 ppb).

3.31 Formulación de un alimento para pollos suplementado con RLC

3.31.1 Alimento para pollos

Se empleó alimento balanceado completo Prenut para pollo casero BB (PRENUT S.A., Argentina), certificado SENASA N° 03-347/A, cuya composición centesimal se detalla a continuación:

Componente	g cada 100 g de alimento balanceado	
Tenor mín. de proteína bruta	15,0	
Tenor mín. de extracto etéreo	2,0	
Tenor máx. de fibra cruda	7,0	
Tenor máx. de minerales totales	10,0	
Tenor máx. de humedad	13,0	
Tenor de calcio	Mín.:0,8	Máx.:1,2
Tenor de fósforo	Mín.:0,4	Máx.:0,6
Energía metabolizable	2500 kcal/kg	

El alimento se esterilizó en autoclave a 121 °C durante 15 min en bolsas de papel madera adecuadas y cerradas.

3.31.2 Diseño de un alimento adicionado con RLC

El alimento estéril se suplementó con el RLC obtenido por micro-fermentación de mosto cervecero, que incluye la biomasa de levaduras cosechada post fermentación y el sobrenadante de fermentación (cerveza inmadura).

De acuerdo a lo reportado por Pizzolitto y col. (2013), quienes comprobaron la reducción de los efectos nocivos del consumo de dietas contaminadas con AFB₁ cuando se adiciona *S. cerevisiae* en concentraciones de 10¹⁰ células/kg de alimento para pollos, se determinó una adición de RLC que asegurase un recuento de entre 10⁷ y 10⁸ levaduras cerveceras por gramo de alimento.

Se realizó el recuento de levaduras viables en el RLC obtenido como se describe en la sección 3.29, utilizando cámara de Neubauer y tinción vital con azul de metileno. El recuento se refirió al peso húmedo del RLC. A partir de esta determinación, se llevaron a cabo los cálculos para obtener el alimento suplementado, de acuerdo a la ecuación:

$$R_{to_{alimento}} = \frac{R_{to_{RLC}} \times Masa_{RLC}}{100 \text{ g alimento} - Masa_{RLC}} \quad (9)$$

Donde $R_{to_{alimento}}$ es el recuento de levaduras cerveceras en el alimento formulado [UFC/g]; $R_{to_{RLC}}$ es el recuento de levaduras cerveceras en el RLC; $Masa_{RLC}$ y es la masa de RLC que deberá adicionarse al alimento para garantizar el $R_{to_{alimento}}$ buscado. Considerando que se obtuvo un recuento de levaduras en el RLC de $4,6 \pm 0,4 \times 10^8$ UFC/g y que se desea obtener un recuento de 1×10^8 UFC/g en el alimento adicionado, se llevó a cabo el cálculo:

$$1 \times 10^8 \text{ UFC/g} = \frac{4,5 \times 10^8 \text{ UFC/g RLC} \times \text{Masa}_{\text{RLC}}}{(100 \text{ g alimento} - \text{Masa}_{\text{RLC}})}$$

$$\text{Masa}_{\text{RLC}} = 18,2 \text{ g}$$

Para garantizar el recuento de levaduras esperado, se determinó que el alimento tendrá una composición centesimal en RLC del 20% p/p (20 g de RLC cada 100 g de alimento formulado).

3.31.3 Formulación del alimento balanceado para pollos adicionado con RLC

Se produjeron dos alimentos balanceados suplementados con el RLC. Por un lado, se adicionó el alimento Prenut para pollo casero BB (PRENUT S.A.) tal y como se adquirió, para producir alimento NO ESTERILIZADO (NE) suplementado. Se formularon réplicas biológicas del alimento NE, suplementados con RLC obtenidos a partir de fermentaciones independientes realizadas en idénticas condiciones.

Además, se produjo alimento NE suplementado al 20% p/p con el sobrenadante de mosto fermentado filtrado por poro de 0,22 μm . La ausencia de microorganismos se verificó por ausencia de crecimiento en agar YPD sembrado con el filtrado e incubado ON a 30 °C. Este alimento constituyó el control NE adicionado libre de levaduras cerviceras. También se produjo un alimento NE control adicionado con agua destilada estéril.

Por otro lado, alimento Prenut para pollo casero BB del mismo lote se esterilizó por autoclave, previo a adicionarse con RLC, para producir alimento ESTÉRIL (E) suplementado. Se formularon réplicas biológicas del alimento E, suplementados con RLC obtenidos a partir de fermentaciones independientes realizadas en idénticas condiciones.

Además, se produjo alimento E suplementado al 20% p/p con el sobrenadante de mosto fermentado libre de células, como se describió previamente. Este alimento constituyó el control E adicionado libre de levaduras cerviceras. También se produjo el alimento E control adicionado con agua destilada estéril.

Todo el alimento suplementado se secó en horno de convección a 50,0 °C hasta actividad acuosa (a_w) constante de $0,95 \pm 0,02$, medida a 20,0 °C con equipo AquaLab Series 3 TE meter (AquaLab, Pullman, WA, USA). Los tratamientos se resumen en la Tabla 6.

Tabla 6. Tratamientos realizados sobre un lote de alimento Prenut para pollo casero BB (PRENUT S.A., Argentina)

Alimento para pollos BB	
Sin acondicionamiento previo (NE)*	Autoclavado a 121 °C, 15 min (E)**
<ul style="list-style-type: none"> - Adicionado con RLC. Réplicas biológicas A y B. - Adicionado con mosto fermentado filtrado - Adicionado con agua destilada estéril 	<ul style="list-style-type: none"> - Adicionado con RLC. Réplicas biológicas A y B. - Adicionado con mosto fermentado filtrado - Adicionado con agua destilada estéril

*NE: N esterilizado. **E: esterilizado por autoclave.

3.32 Caracterización del alimento para pollos formulado por adición de RLC

Para caracterizar físico-química y microbiológicamente el alimento formulado, se llevaron a cabo las determinaciones que se describen a continuación.

3.32.1 Caracterización bromatológica del alimento para pollos formulado por adición de RLC

3.32.1.1 Determinación de proteínas totales por el método de Kjeldahl

Se evaluó el contenido de nitrógeno total realizando una digestión del alimento por el método de Kjeldahl; se pesaron 2,0000 g de alimento en balanza analítica, se trituraron con ayuda de un mortero y se colocaron dentro del balón de Kjeldahl. El amoníaco liberado a partir de la reacción con ácido sulfúrico concentrado y posterior tratamiento alcalino de la muestra, se transportó por medio de una destilación en corriente de vapor y se determinó su contenido de nitrógeno mediante valoración ácido-base con ácido sulfúrico 0,2000 N. Además, se realizó un blanco de reactivos valorando el contenido del balón en ausencia de muestra de alimento. El contenido de proteína total del alimento se calculó de acuerdo a la ecuación:

$$\%P = [(V_{\text{muestra}} - V_{\text{blanco}}) \times N \times 0,014 \times F \times 100] / W \quad (10)$$

Donde %P es el contenido de proteínas totales, expresado como g cada 100 g de alimento; V_{muestra} es el volumen de ácido consumido en la valoración de la muestra, en [mL]; V_{blanco} es el volumen de ácido consumido en la valoración del blanco, en [mL]; $N_{\text{ácido}}$ es la normalidad del ácido sulfúrico empleado como titulante; el factor 0,014 corresponde al peso de un miliequivalente de nitrógeno, en [g/miliek]; F es el factor de conversión de nitrógeno a proteína; y W es el peso de la alícuota de muestra procesada, en [g].

3.32.1.2 Determinación de grasas por el método Soxhlet

Este método consiste en una extracción de lípidos semi-continua con un solvente o mezcla de solventes orgánicos adecuada, según el tipo de grasa a extraer. Se pesaron 5,0000 g de alimento en balanza analítica, se trituraron con mortero y se colocaron dentro de un cartucho de papel de filtro, que se ubicó dentro del tubo extractor del equipo de Soxhlet. Se calentó durante 2 h, permitiendo que se produzcan 7 ciclos de llenado y sifonado del tubo extractor del equipo. Posteriormente, se extrajo el cartucho de papel de filtro con la muestra y se llevó a cabo la separación del solvente mediante su evaporación por calentamiento. Finalmente, se secó el balón con el extracto graso en estufa, 30 minutos a 100 °C, se dejó enfriar en desecador y se pesó. El contenido de lípidos, libre de solvente orgánico, se calculó mediante la siguiente ecuación:

$$\%G = [(m_2 - m_1) / W] \times 100 \quad (11)$$

Donde %G es el contenido de grasas totales, expresado como g cada 100 g de alimento; m_1 es la masa del balón del equipo de Soxhlet vacío, en [g]; m_2 es la masa del balón con grasa, post secado, en [g]; y W es el peso de la muestra procesada, en [g].

3.32.1.3 Determinación de cenizas totales

Las cenizas son el residuo obtenido tras la combustión (incineración) completa de los componentes orgánicos de un alimento. Una vez que se eliminan otras posibles impurezas y partículas del carbono procedentes de una combustión incompleta, este residuo se corresponde con el contenido en minerales del alimento. Para la determinación de cenizas totales se calcinó primero una cápsula de porcelana vacía a 550 °C en mufla. Se dejó enfriar en desecador y luego se pesó. A continuación, se pesaron 3,0000 g del alimento en balanza analítica, se colocaron en la cápsula pesada y se trituraron con mortero. La muestra se secó a 130 °C durante 90 min; a continuación, se incineró en mufla a 550 °C hasta peso constante. Las cenizas obtenidas se enfriaron en desecador, se pesaron a temperatura ambiente y se calculó:

$$\%C = [(m_2 - m_1) \times 100] / W \quad (12)$$

Donde %C es el contenido de cenizas totales, expresado como g cada 100 g de alimento; m_1 es la masa de la cápsula vacía, en [g]; m_2 es la masa de la cápsula con la muestra calcinada, en [g]; y W es la masa de muestra procesada, en [g].

3.32.1.4 Determinación de humedad

Para determinar el contenido de agua del alimento, se pesaron 3,0000 g en balanza analítica y se colocaron en una cápsula de porcelana previamente tarada, triturando con mortero lo más finamente posible. La muestra se secó en estufa a 130 °C durante 90 min; luego se dejó enfriar en desecador y se pesó. El cálculo del contenido de humedad se realizó según la siguiente ecuación:

$$\%H = 100 - \%SS \quad (13)$$

Siendo %SS el contenido de sustancia seca:

$$\%SS = [(m_3 - m_1) / (m_2 - m_1)] \times 100 \quad (13.1)$$

Donde %H es el contenido de agua, expresado cada 100 g de alimento; m_1 es el peso de la cápsula vacía, en [g]; m_2 es el peso de la cápsula con la muestra, previo al secado, en [g]; m_3 es el peso de la cápsula con la muestra, post secado, en [g].

3.32.1.5 Determinación de carbohidratos totales y energía bruta

El valor de carbohidratos totales se obtuvo por diferencia respecto de los demás componentes de la muestra, según la siguiente ecuación:

$$\%CHid = 100 - \%P - \%G - \%C - \%H \quad (14)$$

Donde %CHid es el contenido de carbohidratos totales, expresado como g cada 100 g de alimento; %P se calculó de acuerdo a la ecuación (10); %G se calculó de acuerdo a la ecuación (11); %C se calculó de acuerdo a la ecuación (12); y %H se calculó de acuerdo a la ecuación (13).

La energía bruta de la muestra se calculó a partir de sus componentes productores de energía, utilizando los factores de conversión de 4 kcal/g para proteínas y carbohidratos y 9 kcal/g para lípidos, de acuerdo a la ecuación:

$$\%Kcal = (\%P \times 4) + (\%CHid \times 4) + (\%G \times 9) \quad (15)$$

Donde %Kcal son las kilocalorías contenidas en 100 g de alimento; %P se calculó según la ecuación (10); %G se calculó de acuerdo a la ecuación (11); y %CHid se calculó según la ecuación (14).

3.32.2 Caracterización microbiológica del alimento para pollos formulado por adición de RLC

3.32.2.1 Recuento de levaduras cerveceras

Durante la formulación del alimento y posterior a la adición del RLC, se tomaron alícuotas duplicadas de 5,0 g antes y después de someterlo al secado en horno a 50,0 °C. Cada alícuota se suspendió en 45,0 mL de solución fisiológica estéril y se homogeneizó en stomacher (Stomacher® 400 Circulator, Seward, UK). Posteriormente se sembraron diluciones adecuadas de los homogenatos en agar YPD en el caso de alimento E y en agar YGC en el caso de alimento NE adicionado con RLC.

3.32.2.2 Estudio de la viabilidad de las levaduras cerveceras en alimento contaminado artificialmente con *Aspergillus sp.*

Se obtuvo una suspensión de 10^5 conidios/mL de *Aspergillus sp.*, tal y como se describe en la sección 3.22, con la cual se inoculó el alimento adicionado para obtener una concentración final de 10^4 conidios/g de alimento. El alimento E (sección 3.30.4) contaminado con *Aspergillus sp.* se alicuotó en cajas de Petri de 55,0 cm de diámetro a razón de 5,0 g por caja y se incubó a 30 °C durante 10 días. Se incluyeron las réplicas biológicas del alimento E adicionado con RLC, el control adicionado con mosto fermentado filtrado y el control adicionado con agua estéril (Tabla 6).

A los tiempos 0, 5 y 10 días de incubación, duplicados de cada tratamiento se homogeneizaron en 45,0 mL de SF estéril en stomacher y diluciones adecuadas se sembraron en agar YPD. Luego de incubar ON a 30 °C se realizó el recuento de levaduras cerveceras.

3.33 Estudio de la vida útil y capacidad bio-preservante del alimento para pollos formulado por adición de RLC

El alimento NE producido se alicuotó en cajas de Petri de 55,0 cm de diámetro a razón de 5,0 g por caja y se incubó a temperatura ambiente durante 11 días. Se incluyeron las réplicas biológicas del alimento NE adicionado con RLC, el control adicionado con mosto fermentado filtrado y el control adicionado con agua estéril. En los días 0, 5 y 11 se realizaron las siguientes determinaciones:

3.33.1 Estudio de la viabilidad de las levaduras cerveceras

Duplicados de cada tratamiento se homogeneizaron en 45,0 mL de SF estéril en stomacher y diluciones adecuadas se sembraron en agar YGC. Luego de incubar ON a 30 °C, se realizó el recuento de colonias de levaduras.

3.33.2 Determinación del crecimiento de hongos filamentosos en el alimento adicionado con RLC

Se determinó el crecimiento de hongos filamentosos a cada tiempo por observación directa del alimento (visualización de micelio, percepción de compactación). En muestras donde no se detectó crecimiento fúngico macroscópico, se llevaron a cabo recuentos en agar DRBC (Diclorán Rosa de Bengala Cloranfenicol, Biokar, Francia). Para ello, duplicados de cada tratamiento se homogeneizaron en 45,0 mL de SF estéril en stomacher y se sembraron diluciones del homogenato. Luego de incubar por 5 días a 30 °C se realizó el recuento de hongos filamentosos.

3.33.3 Determinación de la actividad acuosa (a_w)

Se llevó a cabo a cada tiempo en aquellos tratamientos en los que no se observó desarrollo fúngico, para garantizar una $a_w \geq 0,95$. Se empleó equipo AquaLab Series 3 TE meter (AquaLab, Pullman, WA, USA).

3.34 Análisis estadístico

Los resultados se presentan como el promedio \pm la desviación estándar de al menos tres réplicas. Los estudios con líneas celulares y las micro-fermentaciones se llevaron a cabo en triplicado de ensayos independientes. La significatividad de las diferencias encontradas entre las medidas experimentales se evaluó mediante análisis de la varianza (ANOVA) y test de Tukey ($P < 0,05$), empleando el software libre Infostat (Universidad Nacional de Córdoba, Córdoba, Argentina). Previamente, se evaluó la factibilidad de aplicar ANOVA sobre los datos experimentales, comprobando una distribución normal, la homogeneidad de la varianza y la independencia de las muestras en cada caso. La representación gráfica de los resultados se llevó a cabo utilizando el software OriginPro® 8.5 (OriginLab® Corporation, Northampton, Estados Unidos).

**Aislamiento, identificación y caracterización
de la capacidad fermentativa
de cepas de levaduras cerveceras**

Aislamiento, identificación y caracterización de la capacidad fermentativa de cepas de levaduras cerveceras

4.1 Introducción

La cerveza tipo *lager* representa el 90% del mercado mundial de esta bebida (Varela, 2016). Producido con la levadura *S. pastorianus*, el estilo *lager* es el mejor adaptado y adoptado por la industria, que produce alrededor de 1,95 billones de hectolitros de cerveza por año (Statista, 2018). *S. pastorianus* es un híbrido interespecífico natural entre *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (Libkind y col., 2011), que fue seleccionado y domesticado durante siglos de práctica cervecera artesanal para llevar a cabo la fermentación del mosto cervecero entre los 4 y 15 °C (White y Zainasheff, 2010).

Por otro lado, las cervezas producidas artesanalmente por *homebrewers* (cerveceros caseros artesanales) son en su mayoría estilos *ale* y representan el 5% de producción mundial total (Varela, 2016). La cerveza *ale* se produce por fermentación del mosto cervecero con diferentes cepas de levadura *S. cerevisiae* a altas temperaturas, que pueden variar entre los 15 y los 26 °C, pero que en general rondan los 18 a 21 °C (White y Zainasheff, 2010).

La elección de la levadura que fermenta el mosto tiene un gran impacto en las cualidades sensoriales de la cerveza obtenida. Las levaduras no sacaromicéticas, también denominadas especies no convencionales, tienen el potencial de producir diversidad y diferenciación competitiva en el perfil sensorial de la cerveza. Entre las levaduras no convencionales halladas junto a *Saccharomyces* sp. en fermentaciones denominadas espontáneas, como las empleadas en la producción de cervezas lámbicas belgas y las Gueuze (Bokulich y Bamforth, 2013; Steensels y col., 2015), se reportan *Meyerozyma guilliermondii*, *Debaryomyces* sp., *Pichia* sp., *Wickerhamomyces anomalus*, *Brettanomyces anomalus*, *Brettanomyces custersii*, *Brettanomyces bruxellensis*, *Candida krusei*, *Cryptococcus keutzingii* y *Rhodotorula mucilaginosa* (Varela, 2016). La levadura no convencional más comúnmente utilizada es *Brettanomyces* sp., que se inocula en fermentaciones de ciertas cervezas trapistas y de sour beers americanas. Las levaduras no sacaromicéticas generalmente presentan muy baja producción de etanol comparadas con *S. cerevisiae*. La estrategia más conveniente para su incorporación a la producción es la co-inoculación, simultánea o secuencial, con la levadura cervecera *Saccharomyces* sp.

La prospección e identificación de nuevas levaduras sacaromicéticas y no sacaromicéticas y su caracterización respecto de su capacidad de fermentar el mosto de cebada malteada y producir etanol y compuestos de sabor y aroma resulta de mayor interés para la industria cervecera. La comunidad científica puede realizar

aportes en este sentido, complementando las técnicas clásicas de aislamiento de microorganismos con técnicas de biología molecular que permiten identificar las levaduras aisladas (Orberá Ratón, 2009) y técnicas analíticas para caracterizar en profundidad sus productos de fermentación y las capacidades tecnológicas de las levaduras.

Durante la producción de cerveza, la levadura *Saccharomyces* sp. se alimenta de los azúcares disponibles en el mosto cervecero (glucosa, fructosa, maltosa y maltotriosas extraídos durante la cocción de la cebada malteada) y se reproduce, multiplicando su biomasa. Finalizada la fermentación, cuando la concentración de azúcares en el mosto ha disminuido ostensiblemente (atenuación del mosto) y se han acumulado etanol y CO₂ productos de su metabolización, la levadura sedimenta en el fondo del fermentador. Esta levadura es la que constituye el denominado lodo de levaduras cerveceras y es descartada, en general, sin los tratamientos previos necesarios para ser desechada de forma responsable con el medioambiente.

Una ulterior demanda del sector de los productores cerveceros se vincula al desarrollo de tratamientos de bajo costo para este residuo. El subproducto de lodo cervecero, compuesto principalmente por levadura viable, es altamente nutritivo y plausible de emplearse en alimentación animal. Por este motivo, la alternativa de la recuperación y revalorización del residuo de la industria cervecera es interesante y se constituyó en el objetivo de la presente tesis, que busca en última instancia diseñar un alimento balanceado para pollos de engorde suplementado con levaduras cerveceras con propiedades probióticas, es decir, el diseño de un alimento balanceado funcional.

En este capítulo se desarrollará la etapa inicial del estudio de tesis, que abordó dos estrategias de prospección de levaduras cerveceras con capacidades tecnológicas novedosas. La principal estrategia consistió en el aislamiento de levaduras a partir de muestras de la industria cervecera, entre ellas lodos de levaduras reutilizados en fermentaciones artesanales y *starters* comerciales. Este abordaje garantiza el aislamiento de levaduras capaces de fermentar el mosto cervecero y que serán luego caracterizadas respecto de sus potenciales propiedades funcionales y sus capacidades tecnológicas en la producción de cervezas con perfiles sensoriales novedosos.

Una segunda estrategia en la prospección de nuevas levaduras fue recurrir a nichos fermentativos diferentes del mosto cervecero. El kefir de agua es una bebida fermentada, producida a partir de gránulos de kefir y solución acuosa de sacarosa, adicionada con frutas frescas o secas. El resultado de la fermentación, que se realiza a temperatura ambiente, es una bebida carbonatada, de sabor ácido y astringente, baja en azúcar y con un leve contenido de alcohol (Gulitz y col., 2011). Existen varios

reportes acerca de la composición de la microbiota de los gránulos de kefir de agua, que incluye bacterias ácido acéticas, bacterias ácido lácticas y levaduras, entre ellas, *S. cerevisiae* (Gulitz y col., 2011). Se ha publicado también respecto al potencial probiótico de esta bebida (Gamba y col. 2019; Fiorda y col., 2017; Zamberi y col., 2016).

Por tratarse de levaduras que comúnmente fermentan sacarosa y toleran el estrés osmótico, se postuló que los aislamientos sacaromicéticos obtenidos de kefir de agua serán capaces de adaptarse y fermentar el mosto cervecero. De lograrse fermentaciones exitosas, este enfoque podría aportar tanto a la producción de un lodo de levaduras residual con potencial probiótico, de mayor valor agregado para la formulación de un alimento balanceado para animales, como a la incorporación de cepas de levadura novedosas en la producción cervecera.

4.2 Hipótesis

El subproducto residual de levaduras floculadas de la fermentación cervecera artesanal y los *starters* cerveceros comerciales podrían estar constituidos por más de una cepa de levadura.

Las cepas de levaduras presentes en una muestra o *starter* cervecero tendrían comportamientos fermentativos distintos y producirían bebidas fermentadas con características sensoriales diferentes.

Levaduras sacaromicéticas con características tecnológicas interesantes para la elaboración de cerveza podrían aislarse a partir de nichos diferentes del cervecero, como la bebida fermentada kefir de agua.

4.3 Objetivos específicos

- Aislar levaduras cerveceras a partir del residuo subproducto de la industria cervecera denominado “lodo de levaduras” y de *starters* cerveceros comerciales.
- Aislar levaduras de características sacaromicéticas a partir del producto fermentado con gránulos de kefir de agua de diversos orígenes.
- Identificar los aislamientos a nivel especie y diferenciar cepas entre los aislamientos identificados como *S. cerevisiae*.
- Caracterizar las diferentes cepas identificadas respecto a su cinética de crecimiento y sus propiedades tecnológicas en la fermentación del mosto cervecero.

4.4 Resultados y discusión

4.4.1 Aislamiento de colonias de morfología macroscópica diferencial

A) A partir de muestras cerveceras

Con el objetivo de aislar cepas de levaduras novedosas para la producción cervecera y de caracterizarlas en cuanto a sus características tecnológicas, se inició el aislamiento e identificación de levaduras a partir de *starters* cerveceros comerciales y de residuos subproducto de fermentaciones cerveceras artesanales. A partir de 6 muestras de lodos de levaduras, un *starter* líquido producido por un cervecero local y 7 sobres de levaduras comerciales liofilizadas (Fermentis, Francia; Lallemand, Canadá), se aislaron un total de 35 levaduras con colonias de morfología diferente y morfología microscópica tipo *Saccharomyces* sp. (Tabla 1). Se consideró morfología microscópica tipo *Saccharomyces* sp. o sacaromicética, a células grandes globosas, elipsoidales o cilindroidales, con presencia de estructuras de gemación multilaterales (Kurtzman y Fell, 1998), tal como ilustra la figura 1A mediante una microfotografía del aislamiento denominado MBELGA62.

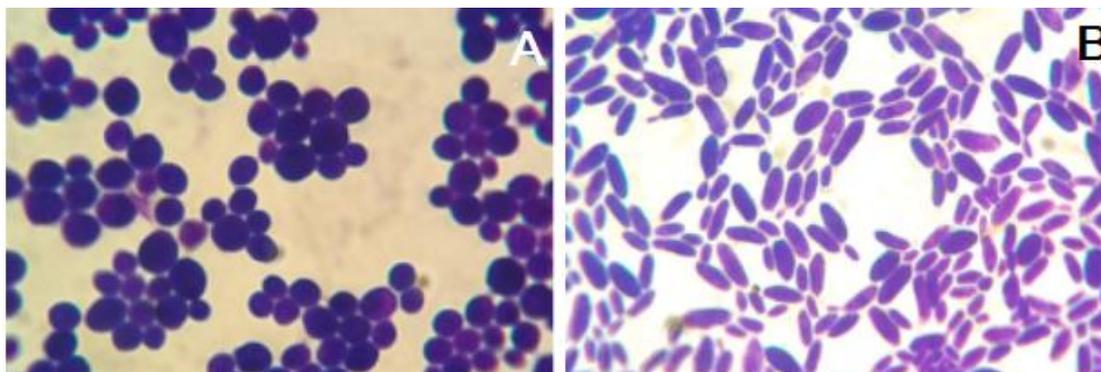


Fig. 1. Fotografías microscópicas de levaduras aisladas a partir de un lodo artesanal de producción de cerveza *ale* estilo trigo belga denominado M6. Las levaduras se fijaron a la llama y se tiñeron con solución de cristal violeta (sección 3.3) antes de su observación al microscopio bajo objetivo 100X. **A.** Levadura de morfología tipo *Saccharomyces* sp., denominada MBELGA62. **B.** Levadura de morfología no sacaromicética denominada MBELGA61.

Además de las levaduras de morfología sacaromicética mencionadas, se aisló una colonia cuya morfología macro y microscópica se diferencia claramente de aquella correspondiente al género *Saccharomyces*, que se denominó MBELGA61 y cuya fotografía microscópica se muestra en la figura 1B. Esta levadura se aisló a partir de un lodo artesanal de producción de cerveza *ale* estilo trigo belga, junto con la levadura sacaromicética denominada MBELGA62 (Fig. 1A). Esta fue la primera oportunidad durante esta tesis en que se verificó la co-existencia de al menos dos levaduras en

una misma muestra cervecera, comprobando que los *starters* pueden estar constituidos por más de una levadura, y marcando diferencia respecto de lo referido por los cerveceros que proveyeron las muestras, quienes aseguraban que se encontraban produciendo cerveza con *starters* mono-cepa.

A continuación, en la Tabla 1, se sintetizan los resultados obtenidos de los aislamientos de levaduras a partir de los lodos de fermentación cervecera y *starters* empleados para el aislamiento, su descripción macroscópica y microscópica. Cada aislamiento fue registrado en el cepario de levaduras cerveceras de nuestro grupo con la leyenda CMUNLP, indicando que fueron aisladas en la Cátedra de Microbiología de la Universidad Nacional de La Plata, seguida del código alfanumérico que se detalla en la Tabla 1.

Tabla 1. Lodos cerveceros artesanales, *starters* artesanales y comerciales y levaduras aisladas

Muestra	Origen	Aislamiento CMUNLP	Macro morfología	Micro morfología
Safbrew S-33	Liofilizado Fermentis (Francia)	SAFS331	Grande, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		SAFS332	Mediana, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		SAFS333	Mediana, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo irregular	<i>Sacch.</i>
Windsor	Liofilizado Lallemmand (Canadá)	WIND1	Grande, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		WIND2	Mediana, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
LagerMV	Lodo artesanal de una cerveza <i>lager</i> *	LAGMV1	Mediana, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		LAGMV2	Pequeña, redonda, convexa, color blanca, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
Safbrew T-58	Liofilizado Fermentis (Francia)	SAFT581	Mediana, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo irregular	<i>Sacch.</i>
		SAFT582	Grande, apiculada, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
Saflager S-23	Liofilizado Fermentis (Francia)	SAFS231	Mediana, redonda, convexa, centro protuyente, color crema, serosa, rugosa, brillante, borde discontinuo	<i>Sacch.</i>
		SAFS234	Mediana, redonda, convexa, centro protuyente, color crema, serosa, rugosa, brillante, borde continuo	<i>Sacch.</i>

			irregular	
		SAFS235	Pequeña, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
Muntons	Liofilizado Muntons Plc. (EEUU)	Muntons1	Grande, redonda, convexa, centro protruyente, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
Safbrew Abbaye	Liofilizado Fermentis (Francia)	SAFABB1	Mediana, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo irregular	<i>Sacch.</i>
		SAFABB2	Mediana, redonda, plana, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		SAFABB3	Pequeña, redonda, convexa, color blanco, serosa, rugosa, brillante, borde continuo irregular	<i>Sacch.</i>
Muestra	Origen	Aislamiento CMUNLP	Macro morfología	Micro morfología
Diy Beer Coopers	Liofilizado Coopers Brewery (Australia)	COOP1	Grande, apiculada, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo irregular	<i>Sacch.</i>
		COOP20	Mediana, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		COOP21	Pequeña, redonda, convexa, color blanco, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		COOP3	Pequeña, redonda, convexa, color blanco, serosa, rugosa, brillante, borde continuo irregular	<i>Sacch.</i>
		COOP4	Grande, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
LA-001	Starter líquido LALEAR (La Plata, Argentina)	MLA11	Pequeña, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		MLA12	Grande, oval, convexa, color crema, lisa, brillante, borde continuo regular	Células redondas pequeñas
M2	Lodo artesanal producido con starter LA-001*	MLA21	Pequeña, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
M4	Lodo artesanal de una cerveza Belgian Ale*	MTEMPLA41	Mediana, redonda, convexa, color blanco, serosa, lisa, brillante, borde continuo irregular	<i>Sacch.</i>
		MTEMPLA42	Mediana, redonda, convexa, color tostado, serosa, rugosa, mate, borde discontinuo	<i>Sacch.</i>
		MTEMPLA43	Mediana, redonda, convexa, color blanco, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>

M6	Lodo artesanal de una cerveza <i>ale</i> estilo Trigo Belga*	MBELGA61	Grande, plana, color blanco, serosa, lisa, mate, borde continuo irregular. Se observa crecimiento de los bordes coherente con capacidad de formar pseudo-hifas	Cel. pequeñas alargadas, no <i>Sacch.</i>
		MBELGA62	Mediana, redonda, convexa, color blanco, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
M13	Lodo artesanal de una cerveza <i>ale</i> , 2da re utilización*	MSAF132	Mediana, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		MSAF133	Grande, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo irregular	<i>Sacch.</i>
		MSAF134	Pequeña, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
Muestra	Origen	Aislamiento CMUNLP	Macro morfología	Micro morfología
M12	Lodo artesanal de una cerveza <i>ale</i> , 2da re utilización*	MUS121	Muy grande, redonda, plana, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		MUS122	Mediana, apiculada, plana, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>
		MUS123	Mediana, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo irregular	<i>Sacch.</i>
		MUS124	Pequeña, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch.</i>

*Todos los lodos artesanales fueron provistos por pequeñas cervecerías de la ciudad de La Plata, Buenos Aires, Argentina. La forma abreviada *Sacch.* indica morfología microscópica tipo *Saccharomyces* sp.

El método de las colonias gigantes envejecidas (White y Zainasheff, 2010) utilizado en el aislamiento de levaduras a partir de muestras cerveceras, garantiza el desarrollo de las colonias con tiempo y cantidad de nutrientes suficientes para alcanzar el tamaño y características macro-morfológicas propias de cada cepa. Contemplando estas particularidades del método, el criterio de selección y aislamiento de colonias tuvo en consideración pequeñas diferencias entre las colonias. De acuerdo a este registro, la mayoría de las muestras cerveceras analizadas, incluyendo los *starters* comerciales liofilizados, contienen más de una levadura plausible de ser diferenciada a partir de sus características macro-morfológicas.

Más allá de las diferencias encontradas, prácticamente todas las levaduras aisladas forman colonias serosas, de color crema a tostado, de superficie lisa y bordes definidos correspondientes con la morfología típica de colonia sacaromycética (Tabla

1). El estudio de la morfología microscópica de las levaduras confirmó esta primera descripción.

El aislamiento MBELGA61 fue la única levadura aislada a partir de una muestra cervecera que presentó una morfología de colonia y microscópica diferentes a aquellas descritas en el género *Saccharomyces* (Tabla 1, Fig. 1B). Se profundizó el estudio de las características de los cultivos de esta levadura. El aislamiento MBELGA61 cultivado en agar YPD formó colonias de color blanco-tostado, de aspecto seco-polvoso, cremosas, levemente convexas con un centro chato-deprimido, con bordes que varían de lisos a lobulados y con flecos, posiblemente debido a la formación de pseudohifas. El cultivo también presentó un aroma débilmente ácido. Los cultivos en caldo YPD del aislamiento evidenciaron formación de películas en superficie que trepan por las paredes del tubo, atribuibles a la presencia de pseudohifas. Al microscopio se confirmó la formación de pseudohifas en diferentes medios líquidos y agarificados, observándose mayor ramificación de las mismas cuando la levadura se cultivó en mosto cervecero estéril.

El aislamiento cervecero denominado MLA12 desarrolló colonias blancas de aspecto liso y márgenes lisos o lobulados en agar YPD, similares a las colonias sacaromícéticas. Sin embargo, la observación microscópica de sus extendidos arrojó información que sugirió que esta levadura podría no ser *Saccharomyces* sp. Sus cultivos líquidos no presentaron película en superficie y al ser estudiados en el microscopio se detectaron células ovoides que no forman pseudohifas.

B) A partir de muestras de kefir de agua

En etapas posteriores de la prospección de levaduras, se abordó la estrategia de aislar levaduras sacaromícéticas a partir de la bebida fermentada probiótica conocida como kefir de agua y evaluar su capacidad de llevar a cabo la fermentación del mosto cervecero. El kefir de agua es una bebida efervescente y alcohólica (aproximadamente 10% V/V de etanol) (Fiorda y col., 2017) obtenida a partir de la fermentación de una solución de azúcar de caña poco refinada, adicionada de frutas (fuente de nitrógeno).

El aislamiento de levaduras con características sacaromícéticas a partir de kefir de agua obtenido con gránulos de kefir de la colección de la Cátedra de Microbiología, se llevó adelante mediante la técnica de colonias gigantes envejecidas (Fig. 2), empleada previamente con las muestras cerveceras.



Fig. 2. Etapa de aislamiento de levaduras de kefir de agua. Fotografías de placas de agar YGC (Biokar Diagnostics) obtenidas por siembra de diluciones adecuadas del producto fermentado con gránulos de kefir de agua, incubadas durante 7 días a 30 °C.

Los productos de fermentación a partir de los cuales se llevó a cabo el aislamiento se obtuvieron por fermentaciones independientes con tres gránulos de kefir de agua diferentes. Los aislamientos obtenidos a partir de cada uno se detallan en la Tabla 2.

Tabla 2. Gránulos de kefir de agua empleados y levaduras aisladas

Muestra*	Origen	Aislamiento CMUNLP	Macro morfología	Micro morfología
Fermento obtenido con el gránulo CMUNLP1	India	ka11	Grande, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch</i>
		ka121	Pequeña puntiforme, color crema, serosa, lisa, brillante	<i>Sacch</i>
		ka122	Pequeña, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo irregular	Células alargadas, no sacaromictica
		ka131	Grande, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular, con rugosidades en la cara que crece sobre el agar	<i>Sacch</i>
		ka132	Pequeña, convexa de centro protruyente y periferia deprimida, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular con formas de abanico	<i>Sacch</i>
		ka14	Pequeña, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde discontinuo irregular	No sacaromictica
Fermento obtenido con el gránulo	La Plata, Buenos Aires, Argentina	ka21	Pequeña, convexa, color crema, serosa, poco rugosa, mate, borde continuo regular	No sacaromictica
		ka22	Grande, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch</i>

CMUNLP2		ka23	Mediana, redonda, convexa, color crema con centro tostado, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular	<i>Sacch</i>
		ka24	Grande, redonda, plana, color crema con centro tostado, serosa, muy rugosa, brillante, borde continuo regular	No sacaromictica
		ka25	Grande, redonda, convexa con centro protruyente y periferia deprimida, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular, con rugosidades en la cara que crece sobre el agar	<i>Sacch</i>
Fermento obtenido con el gránulo CMUNLP3	La Plata, Buenos Aires, Argentina	ka31	Grande, redonda, convexa, color crema, serosa, lisa, brillante, borde continuo regular con formas de abanico	<i>Sacch</i>
		ka32	Grande, redonda, convexa, color crema, serosa, rugosa, mate, borde continuo irregular	No sacaromictica

*Los fermentos fueron obtenidos en el laboratorio por fermentación de soluciones de azúcar de mascabo 5,0% p/V en agua destilada a temperatura ambiente con los gránulos de kefir de agua. La forma abreviada *Sacch.* indica morfología microscópica coincidente con aquella descrita para *Saccharomyces* sp.

La figura 3 ilustra diferentes morfologías microscópicas observadas durante el proceso de aislamiento de levaduras a partir de kefir de agua.

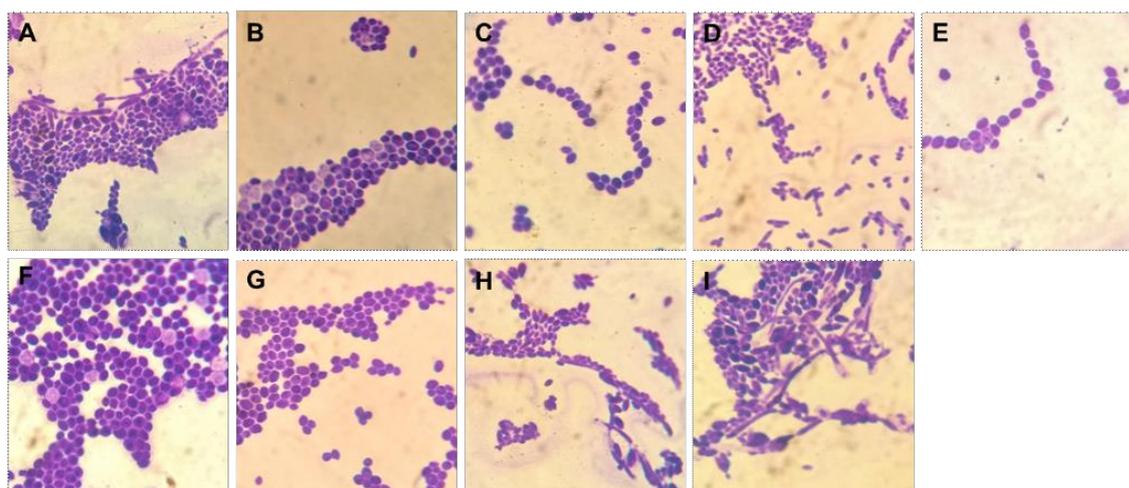


Fig. 3. Micromorfología de levaduras aisladas de kefir de agua. Los extendidos de colonias se fijaron a la llama y se tiñeron con cristal violeta antes de observarse bajo lente objetivo 100X. **A.** CMUNLPka21. **B.** CMUNLPka22. **C.** CMUNLPka23. **D.** CMUNLPka24. **E.** CMUNLPka25. **F.** CMUNLPka31. **G.** CMUNLPka131. **H.** CMUNLPka122. **I.** CMUNLPka14.

En ciertos aislamientos, cuya descripción microscópica no coincide con aquella de *Saccharomyces* sp., se detectó formación de pseudohifas (Fig. 3A, 3H y 3I). La pseudohifa de levaduras se describe como un filamento compuesto de células que permanecen unidas luego de la gemación; puede ser rudimentaria, formada por

células de similar tamaño y forma, o pueden estar diferenciadas en células elongadas, cada una de las cuales puede producir blastosporas en un arreglo más o menos regular (Kurtzman y Fell, 1998). Su forma puede verse marcadamente afectada por las condiciones de cultivo.

Únicamente los aislamientos cuya micromorfología se corresponde con la descrita en el género *Saccharomyces* fueron seleccionados para continuar su identificación mediante técnicas moleculares.

4.4.2 Identificación de los aislamientos por PCR y secuenciación

El espaciador transcrito interno (ITS, de sus siglas en inglés Internal Transcribed Spacer) es un fragmento de ADN no codificante e hiper variable, situado entre las regiones que codifican para la subunidad ribosomal menor (ARNr) y la subunidad ribosomal mayor, presente en el ADN cromosomal y en el correspondiente transcrito precursor de ARNr. Existen dos ITSs en organismos eucariotas: el ITS1, ubicado entre los genes que codifican para el ARNr 18S y el ARNr 5,8S; y el ITS2, ubicado entre los genes que codifican para el ARNr 5,8S y el ARNr 28S. Cada cluster ribosomal eucariota contiene la secuencia transcrita externa 5' (5'ETS, de sus siglas en inglés External Transcribed Sequence), el gen ARNr 18S, el ITS1, el gen ARNr 5,8S, el ITS2, el gen ARNr 28S y la 3'ETS (Fig. 4).

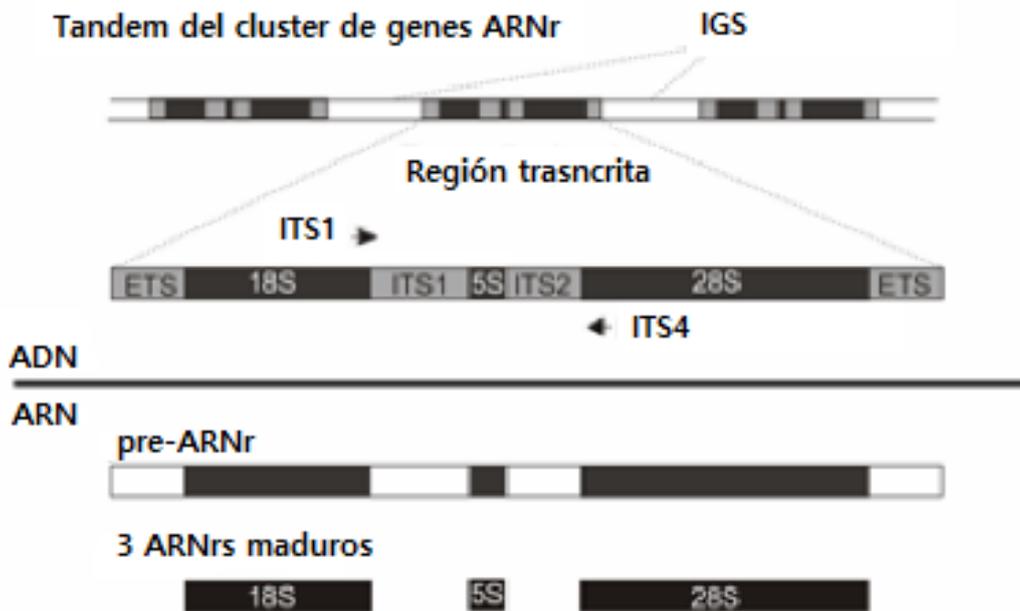


Fig. 4. Representación esquemática de la región del ADN de levaduras, con los sitios de pegado de los cebadores ITS1 e ITS4 indicados con flechas. ITS: espaciador transcrito interno (de sus siglas en inglés Internal Transcribed Spacer). IGS: espaciador no-transcrito intergénico (de sus siglas en inglés non-transcribed InterGenic Spacer). ETS: secuencia transcrita externa (de sus siglas en inglés External Transcribed Sequence). Adaptada de Korabecna (2007).

El fragmento que incluye el ITS1, el ARNr 5,8S y el ITS2 se conoce como región ITS1-ITS2, y se emplea comúnmente para la identificación de levaduras a nivel especie (Orberá Ratón, 2004), al igual que el dominio D1/D2. El tamaño del fragmento amplificado con los cebadores ITS1 e ITS4 (Fig. 4) varía en cada especie; en *Saccharomyces* sp. es de 880 pb.

El dominio D1/D2 es una región de 600 pb que se encuentra en el extremo 5' de la subunidad ribosomal mayor (ARNr 28S), también denominada LSU (de sus siglas en inglés, Large Subunit). Kurtzmann y Robnett (1998, 1997) reportaron que la mayoría de las levaduras pueden identificarse a nivel especie por secuenciación de este dominio. Estudios sobre más de 500 especies demostraron que cepas co-específicas poseen menos de un 1% de sustitución de nucleótidos en el dominio, mientras que especies diferentes presentan divergencias mucho mayores. Los cebadores más comúnmente empleados para la amplificación del dominio son NL-1 y NL-4 (O'Donnell, 1993) (Fig 5).

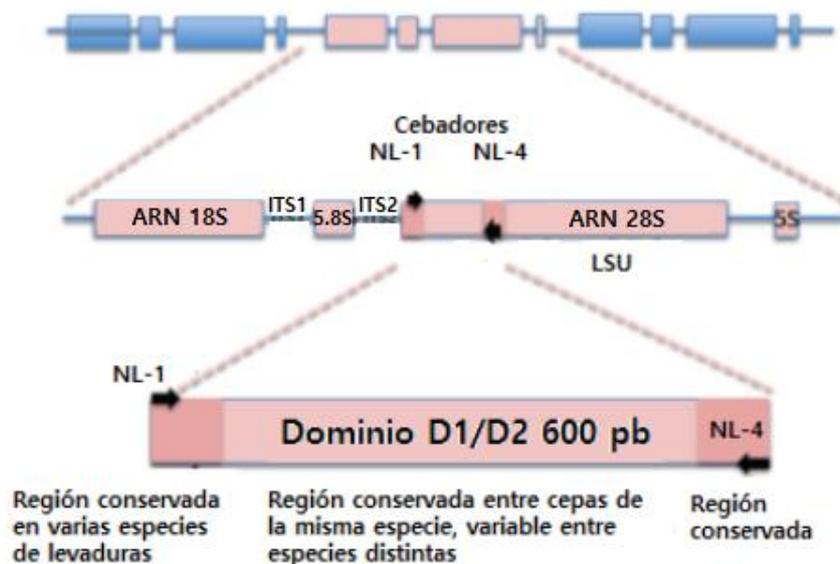


Fig. 5. Representación esquemática del dominio D1/D2 en la región del ADNr de levaduras, con los sitios de pegado de los cebadores NL-1 y NL-4 indicados con flechas. LSU: subunidad ribosomal mayor (ARNr 28S) (de sus siglas en inglés, Large SubUnit). ITS: espaciador transcrito interno (de sus siglas en inglés Internal Transcribed Spacer). pb: pares de bases. Adaptada de <https://www.studyblue.com/notes/n/yeast-molecular-taxonomy/deck/9823159>

Los aislamientos de levaduras cerveceras y de kefir de agua con macro y micromorfología coincidente con la descrita en *Saccharomyces* sp. fueron identificados por amplificación y secuenciación del fragmento ITS1-ITS2 y/o del dominio D1/D2.

Adicionalmente, se identificó la levadura cervecera no sacaromícética denominada MBELGA61. La figura 6 ilustra el estudio a través de geles de agarosa.

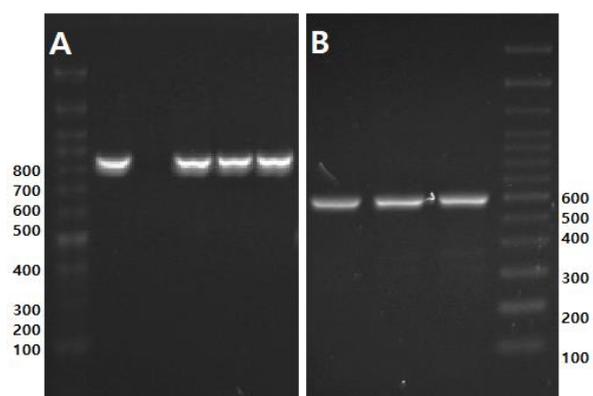


Fig. 6. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de PCR obtenidos por amplificación de la región ITS1-ITS2 de **A.** Colonias *Saccharomyces* sp. **B.** Colonias no *Saccharomyces* sp.

Los resultados obtenidos en términos del tamaño de los fragmentos amplificados con cada par de cebadores y de su secuenciación se detallan en la Tabla 3.

Tabla 3. Identificación de aislamientos a nivel especie por amplificación y secuenciación de regiones nucleares

Aislamiento CMUNLP	Tamaño amplificado ITS1/ITS2	Secuenciación ITS1/ITS2	Tamaño amplificado D1/D2	Secuenciación D1/D2	Acceso en GenBank*
Levaduras cerveceras					
SAFABB1	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
SAFABB3	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	KF141697.1
MBELGA62	850	<i>S. cerevisiae</i>	600	<i>S. cerevisiae</i>	KJ781353.1
MBELGA61	550	<i>Pichia kudriavzevii</i>	600	<i>P. kudriavzevii</i>	KY283159.1
MUS121	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
MUS122	600	ns	600	<i>M. caribbica/ guilliermondii</i>	EU809436.1
MUS123	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
MUS124	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
SAFS231	850	<i>S. cerevisiae</i>	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT322857.1
SAFS234	850	<i>S. cerevisiae</i>	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT322857.1
SAFS235	850	<i>S. cerevisiae</i>	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT322857.1

Aislamiento CMUNLP	Tamaño amplificado ITS1/ITS2	Secuenciación ITS1/ITS2	Tamaño amplificado D1/D2	Secuenciación D1/D2	Acceso en GenBank*
LAGMV1	850	ns	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
LAGMV2	850	ns	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
SAFS331	850	<i>S. cerevisiae</i>	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
SAFS332	850	<i>S. cerevisiae</i>	na	-	MK973014.1
SAFS333	850	<i>S. cerevisiae</i>	na	-	MK973014.1
TEMPLA41	850	<i>S. cerevisiae</i>	na	-	MT072178.1
TEMPLA42	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT072178.1
TEMPLA43	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT072178.1
WIND1	850	<i>S. cerevisiae</i>	na	-	CP006402.1
WIND2	850	<i>S. cerevisiae</i>	na	-	CP006402.1
MLA11	600	ns	600	<i>M. caribbica/ guilliermondii</i>	EU285513.1
MLA12	600	ns	600	<i>M. caribbica/ guilliermondii</i>	EU285513.1
MLA21	na	-	600	<i>M. caribbica/ guilliermondii</i>	EU285513.1
Levaduras de kefir de agua					
ka11	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT449154.1
ka121	500	ns	600	<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	MH930866.1
ka131	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
ka132	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT449154.1
ka22	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
ka23	850	<i>S. cerevisiae</i>	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
ka25	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1
ka31	na	-	600	<i>S. cerevisiae</i>	MT649488.1

La secuenciación de los amplicones fue llevada a cabo en la plataforma Illumina (Illumina Inc., EEUU) y los cromatogramas enviados por el servicio se analizaron y ensamblaron con el software BioEdit Sequence Alignment Editor para Windows. Los tamaños de los amplicones, determinados en gel de agarosa por comparación con un patrón de bandas de tamaños conocidos, se expresan en pares de bases (pb). na: no amplificado, ya que se realizó la identificación empleando el amplicón alternativo. ns: amplicón no secuenciado. *Se indica la clave de acceso (*Accession*) del mejor *match* obtenido mediante el algoritmo BLASTn del NCBI (National Center for Biotechnology Information, EEUU).

Todas las secuencias obtenidas permitieron identificar a los aislamientos con cobertura mayor al 99% e identidad superior al 99,37%, datos obtenidos a partir del algoritmo BLASTn (Basic Local Alignment Search Tool, nucleotids) de la base de datos

del NCBI (National Center for Biotechnology Information). La mayor parte de los aislamientos se identificó como fue previsto y en coherencia con la morfología observada en la etapa previa, como *S. cerevisiae*.

Además, entre los aislamientos obtenidos de muestras cerveceras se identificaron levaduras no convencionales en la producción de esta bebida: *Pichia kudriavzevii* MBELGA61, *Meyerozyma* sp. MLA11, *Meyerozyma* sp. MLA12, *Meyerozyma* sp. MLA21 y *Meyerozyma* sp. MUS122. Ambos géneros de levaduras han sido aislados e identificados previamente en la producción de cervezas estilos *ale* (Varela, 2016).

El aislamiento MBELGA61, cuya morfología de colonia y microscópica y su comportamiento en cultivos líquidos se habían determinado diferentes a los de *Saccharomyces* sp., se identificó finalmente como *Pichia kudriavzevii* MBELGA61. Kurtzman y Fell (1998) describen a la especie *P. kudriavzevii*, antes denominada *Issatchenkia orientalis* Kudryavtsev, como ascomicetos que desarrollan colonias cremosas y de color claro en agar extracto de malta 5% a 25 °C luego de 3 días. Sus células son ovoides alargadas. En medio líquido crecen formando películas densas que trepan por las paredes del tubo. Establece abundantes pseudohifas moderadamente ramificadas y sus cultivos tienen un aroma ácido característico. La descripción de los cultivos del aislamiento MBELGA61 (sección 4.4.1) es coherente con lo referido en la bibliografía (Kurtzman y Fell, 1998).

Los aislamientos identificados como *Meyerozyma* sp. a partir de los métodos moleculares se habían presumido aislamientos *Saccharomyces* sp. en la primera etapa de este estudio, a excepción del aislamiento MLA12 (sección 4.4.1). De acuerdo a Kurtzman y Fell (1998), *Meyerozyma guilliermondii*, antes *Pichia guilliermondii* Wickerham, es un ascomiceto que desarrolla colonias lisas o levemente arrugadas de un color blanco-tostado en agar extracto de malta 5% a 25 °C luego de 3 días; sus células son ovoides alargadas; no forma películas en medio líquido; desarrolla abundantes y muy ramificadas pseudohifas, pero no hifas verdaderas. Llamativamente, los cultivos del aislamiento MLA12 no formaron pseudohifas en grado apreciable y sus características micro-morfológicas no concuerdan con lo descrito en bibliografía (sección 4.4.1).

Entre los aislamientos obtenidos de kefir de agua con características macro y microscópicas coincidentes con la descripción de *Saccharomyces* sp., la mayoría confirmó pertenecer al género luego del análisis de las secuencias del dominio D1/D2 (Tabla 2). El aislamiento denominado CMUNLPka121 fue la excepción, con un tamaño de amplicón ITS1-ITS2 de 500 pb (Tabla 2), que coincide con el tamaño del amplicón ITS1-ITS2 descrito en *Brettanomyces* sp. (Orberá Ratón, 2004). *Brettanomyces* sp. se ha identificado como parte de la microbiota natural de fermentaciones cerveceras no

tradicionales (Varela, 2016) y de kefir de agua (Marsh y col., 2013), así como contaminante en fermentaciones vínicas (Wedral y col., 2010). La secuenciación del fragmento amplificado D1/D2 confirmó la identidad del aislamiento CMUNLPka121 como *B. bruxellensis*.

4.4.3 Diferenciación a nivel cepa por RFLP del ADN mitocondrial

El análisis de restricción enzimática del ADN mitocondrial (ADNmt-RFLP) se acepta como método para la diferenciación de cepas de levaduras (Lee y col. 1985), con fundamento en la rápida tasa de evolución del ADNmt. Debido a la tasa de evolución significativamente más lenta del ADN nuclear, la aplicación del ADNmt-RFLP tiene mayor sensibilidad en la diferenciación de cepas co-específicas que el análisis RFLP de ADN genómico total. La aplicación del ADNmt-RFLP ha revelado diferencias entre cepas *Saccharomyces* de laboratorio que no pudieron detectarse por otros métodos y entre cepas cerveceras *ale* y *lager* (Lee y col., 1985).

La técnica ADNmt-RFLP desarrollada por Querol y col. (1992) y adaptada por López y col. (2001) se utilizó en este estudio para contrastar los resultados de la etapa de aislamiento, durante la cual se obtuvieron levaduras identificadas como *S. cerevisiae* (secciones 4.4.1 y 4.4.2) de características macro morfológicas diferentes, que sugieren la posibilidad de que se trate de cepas *Saccharomyces* distintas. López y col. (2001) comprobaron la utilidad de esta metodología en la diferenciación de cepas *S. cerevisiae* provenientes de la industria alimenticia y sostienen que el método puede emplearse en la identificación de levaduras de los géneros *Debaryomyces*, *Kluyveromyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*, frecuentemente caracterizadas como contaminantes de alimentos.

La técnica referida consiste en el análisis por restricción enzimática del ADNmt, sin necesidad de aislamiento ni purificación previas del genoma mitocondrial. El método, desarrollado en *S. cerevisiae*, se basa en las diferencias en el contenido de G+C existentes entre el ADN nuclear y el ADNmt (40% en el ADN nuclear *versus* 20% en el ADNmt). Empleando enzimas de restricción que reconocen regiones ricas en G+C sobre una suspensión de ADN total, el ADN nuclear sufre una hiper-digestión, produciendo numerosos fragmentos de muy pequeño tamaño, indetectables en un gel de agarosa. De este modo, en el gel sólo se visualiza el patrón de bandas cepa específico generado por la digestión del ADNmt.

El aislamiento MBELGA61 no se incluyó en este análisis por tratarse de una cepa no sacaromícetica, identificada en la etapa previa como *P. kudriavzevii*, al igual que se excluyó a los aislamientos MUS122, MLA11, MLA12 y MLA21, identificados como *Meyerozyma* sp. y a CMUNLPka121 identificada como *B. bruxellensis* (sección 4.4.2).

En las figuras 7, 8, 9, 10 y 11 se muestran los resultados de la electroforesis del ADNmt digerido con la enzima HinfI de todas las levaduras estudiadas. En la figura 7 se observaron tres perfiles mitocondriales idénticos (calles 1-3) correspondientes a los aislamientos SAFT581, SAFST582 y MBELGA62. En la figura siguiente (Fig. 8), se detectaron tres perfiles idénticos en las calles 1-3, correspondientes a los aislamientos SAFS331, SAFS332 y SAFS333; otros tres perfiles idénticos entre sí, en las calles 5-7, y diferentes de los perfiles en las calles 1-3, que corresponden a los aislamientos TEMPLA41, TEMPLA42 y TEMPLA43; un perfil único del aislamiento SAFABB1 (calle 8) y otro perfil único del aislamiento SAFABB3 (calle 9), ambos obtenidos a partir de una misma muestra cervecera.

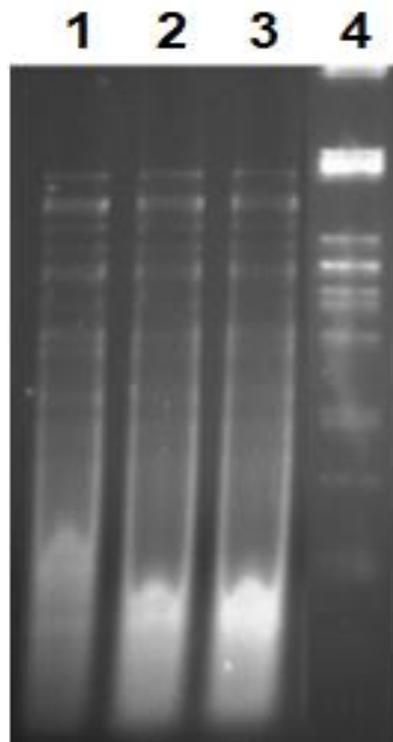


Fig. 7. ADNmt-RFLP de levaduras cerveceras aisladas. Calles: **1:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **2:** *S. cerevisiae* SAFT581. **3:** *S. cerevisiae* SAFT582. **4:** Marcador de peso molecular, fago λ digerido con endonucleasa PstI.

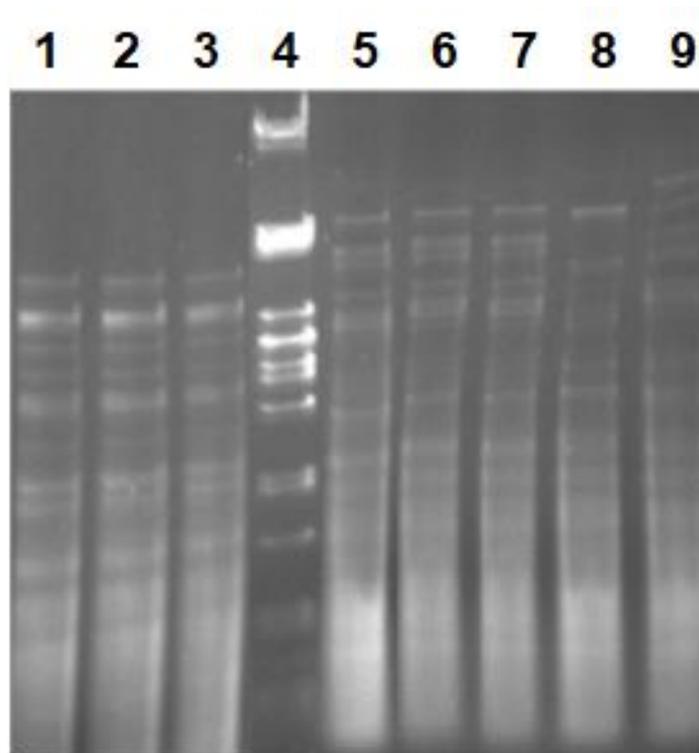


Fig. 8. ADNmt-RFLP de levaduras cerveceras aisladas. Calles: 1: *S. cerevisiae* SAFS331. 2: *S. cerevisiae* SAFS332. 3: *S. cerevisiae* SAFS333. 4: Marcador de peso molecular, fago λ digerido con endonucleasa PstI. 5: *S. cerevisiae* TEMPLA41. 6: *S. cerevisiae* TEMPLA42. 7: *S. cerevisiae* TEMPLA43. 8: *S. cerevisiae* SAFABB1. 9: *S. cerevisiae* SAFABB3.

A partir de estos resultados, se determinó la coincidencia de los perfiles de ADNmt digerido con HinfI de algunos aislamientos obtenidos a partir de una misma muestra cervecera: TEMPLA41, TEMPLA42 y TEMPLA43, aislados del lodo artesanal M4 (Fig. 8, calles 5-7); SAFS331, SAFS332 y SAFS333, aislados del *starter* comercial Safbrew S-33 (Fermentis) (Fig. 8, calles 1-3); SAFT581 y SAFST582, aislados del *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis) (Fig. 7, calles 2-3). A pesar de las diferencias macro-morfológicas encontradas en la etapa inicial de estudio, puede concluirse que estos aislamientos corresponden a la misma cepa de levadura.

Además, el patrón de digestión del ADNmt que se observa en la Fig. 7, calles 1-3, coincide con aquel observado en la Fig. 8, calles 1-3. Las levaduras que exhibieron este perfil mitocondrial fueron aisladas a partir de tres fuentes diferentes: el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis), el *starter* comercial Safbrew S-33 (Fermentis) y el lodo artesanal provisto por un cervecero local denominado M6, a partir del cual se aisló *S. cerevisiae* MBELGA62. El patrón único obtenido a partir de la digestión realizada con HinfI sugiere fuertemente que estas levaduras, que pertenecen a la población específica y reducida de levaduras cerveceras, son la misma cepa. Para

confirmar esta hipótesis, podrían emplearse técnicas moleculares complementarias al ADNmt-RFLP, como el análisis de los elementos δ del genoma de los aislamientos descrito por Pérez-Través y col. (2014).

La Fig. 9 muestra 5 perfiles mitocondriales únicos, diferentes entre sí y diferentes de los perfiles mostrados en las Fig. 7 y 8, correspondientes a levaduras aisladas a partir de dos muestras cerveceras, el lodo artesanal LagerMV y el *starter* comercial liofilizado Saflager S-23 (Fermentis).

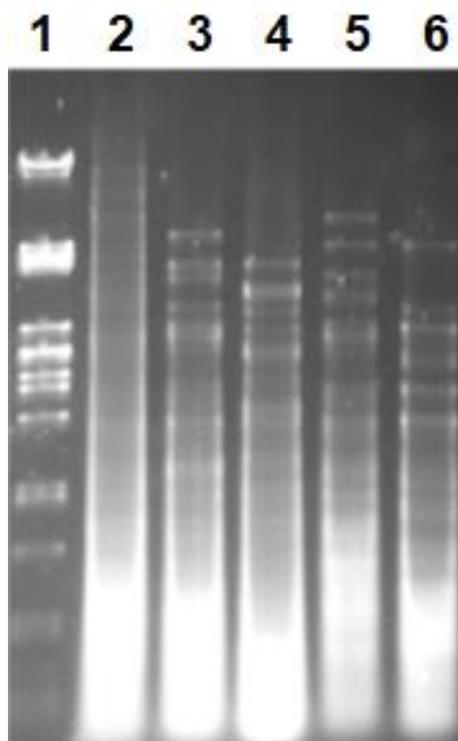


Fig. 9. ADNmt-RFLP de levaduras cerveceras aisladas. Calles: 1: Marcador de peso molecular, fago λ digerido con endonucleasa PstI. 2: *S. cerevisiae* LAGMV1. 3: *S. cerevisiae* LAGMV2. 4: *S. cerevisiae* SAFS231. 5: *S. cerevisiae* SAFS234. 6: *Saccharomyces* sp. SAFS235.

A fin de continuar con la comparación de perfiles mitocondriales de aislamientos *Saccharomyces* sp., en la figura 10 se observan los ADNmt-RFLP coincidentes de *S. cerevisiae* SAFS331 y *S. cerevisiae* MBELGA62 (calles 1-2); los perfiles coincidentes de *S. cerevisiae* TEMPLA42 y *S. cerevisiae* TEMPLA43 (calles 3-4), a su vez diferentes de aquellos desarrollados en las calles 1 y 2; y dos perfiles (calle 5-6) diferentes entre sí y diferentes de los perfiles analizados previamente, correspondientes a los aislamientos *S. cerevisiae* SAFABB1 y *S. cerevisiae* SAFABB3. Además, se observó la diferencia entre los perfiles de tres aislamientos (calles 8-10)

obtenidos a partir del lodo artesanal M12. Entre estos perfiles, el desarrollado en la calle 8 coincide con los patrones observados en las calles 1 y 2 y el perfil desarrollado en la calle 10 coincide con los perfiles de las calles 3 y 4 (Fig. 10). Es decir, el lodo M12 está constituido por más de una cepa *S. cerevisiae*, y entre ellas, *S. cerevisiae* MUS121 (Fig. 10, calle 8) y *S. cerevisiae* MUS124 (Fig. 10, calle 10) comparten perfil mitocondrial con levaduras aisladas de otras muestras cerveceras.

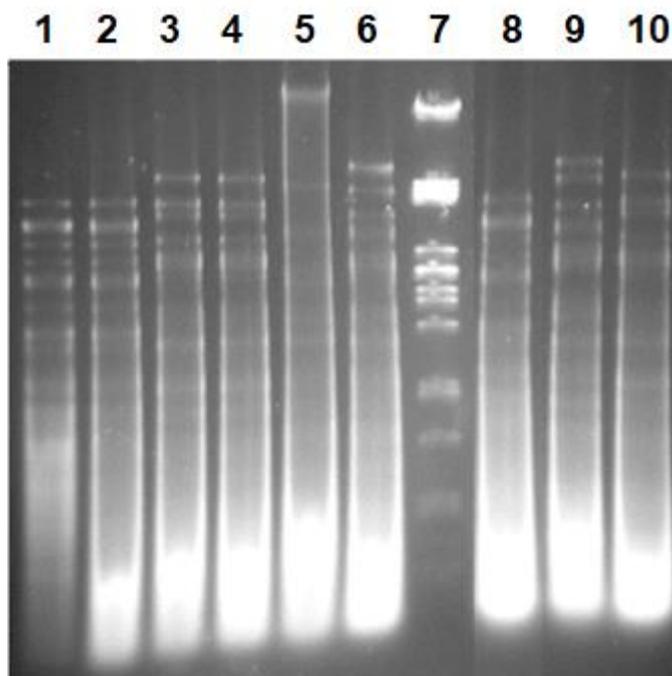


Fig. 10. ADNmt-RFLP de levaduras cerveceras aisladas. Calles: 1: *S. cerevisiae* SAFS331. 2: *S. cerevisiae* MBELGA62. 3: *S. cerevisiae* TEMPLA42. 4: *S. cerevisiae* TEMPLA43. 5: *S. cerevisiae* SAFABB1. 6: *S. cerevisiae* SAFABB3. 7: Marcador de peso molecular, fago λ digerido con endonucleasa PstI. 8: *S. cerevisiae* MUS121. 9: *S. cerevisiae* MUS123. 10: *S. cerevisiae* MUS124.

Al comparar entre diferentes geles y utilizando el patrón de peso molecular para determinar los tamaños de las bandas, se confirmó que *S. cerevisiae* MUS123 (Fig. 10, calle 9) y *S. cerevisiae* SAFS234 (Fig. 9, calle 5) comparten el mismo patrón de bandas resultado de la digestión del ADMmt con HinfI, al igual que *S. cerevisiae* MUS124 (Fig. 10, calle 10) y *S. cerevisiae* LAGMV2 (Fig. 9, calle 3).

A partir de los resultados de las figuras 9 y 10 puede concluirse que la técnica de aislamiento de levaduras potencialmente diferentes a partir de una muestra cervecera con criterio en sus diferencias macro-morfológicas es efectiva, ya que se logró aislar más de una cepa a partir de una muestra. Es el caso de las cepas *S. cerevisiae*

MUS121, *S. cerevisiae* MUS123 y *S. cerevisiae* MUS124, aisladas del lodo artesanal M12 (Fig. 10, calles 8 a 10); las cepas *S. cerevisiae* SAFABB1 y *S. cerevisiae* SAFABB3, aisladas del *starter* comercial liofilizado Safbrew Abbaye (Fermentis) (Fig. 10, calles 5 y 6, y Fig. 8, calles 8 y 9); las cepas LAGMV1 y LAGMV2, aisladas del lodo artesanal LagerMV (Fig. 9, calles 2 y 3); las cepas SAFS231, SAFS234 y SAFS235, aisladas del *starter* comercial liofilizado Saflager S-23 (Fermentis) (Fig. 9, calles 4 a 6). Además, en etapas previas del estudio, se confirmó el aislamiento de las levaduras *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62 a partir del lodo artesanal M6; y de *Meyerozyma* sp. MUS122 entre las levaduras sacaromícéticas del lodo artesanal M12.

Retomando y sintetizando el análisis de las figuras anteriores, se detectó que algunos aislamientos obtenidos a partir de diferentes muestras cerveceras comparten un mismo perfil mitocondrial, lo que sugiere que se trataría de la misma cepa *S. cerevisiae*. Es el caso de *S. cerevisiae* MBELGA62, aislada del lodo artesanal M6; *S. cerevisiae* MUS121, aislada del lodo artesanal M12; *S. cerevisiae* SAFS331, *S. cerevisiae* SAFS332 y *S. cerevisiae* SAFS333, aisladas de *starter* comercial Safbrew S-33 (Fermentis); y *S. cerevisiae* SAFT581 y *S. cerevisiae* SAFT582, aisladas de *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis) (Fig. 7, calles 1 a 3; Fig. 10, calles 1, 2 y 8). También el caso de *S. cerevisiae* MUS124 (Fig. 10, calle 10), aislada del lodo artesanal M12, y de los aislamientos *S. cerevisiae* MTEMPLA41, *S. cerevisiae* MTEMPLA42 y *S. cerevisiae* MTEMPLA43 (Fig. 10, calles 3 a 4, y Fig. 8), obtenidos a partir del lodo artesanal M4, y *S. cerevisiae* LAGMV2 (Fig. 9, calle 3), aislada del lodo artesanal LagerMV.

Confirmar tal supuesto requeriría complementar el estudio de las levaduras mencionadas con otras técnicas de biología molecular, como un análisis de los elementos δ o un análisis RAPD-PCR de su genoma. Con el grado de profundidad en el estudio de identidad logrado durante esta tesis, se decidió seleccionar un subgrupo de aislamientos con criterio en la observación de patrones ADNmt-RFLP distintos. Este subgrupo incluyó a las levaduras aisladas a partir de una misma muestra que presentaron perfiles mitocondriales diferentes, garantizando la presencia de cepas diferentes en un mismo *starter* o lodo.

Simultáneamente, se llevó a cabo el estudio de los perfiles mitocondriales de las levaduras sacaromícéticas aisladas a partir de kefir de agua (Fig. 11). El análisis comparativo de estos perfiles sugiere que todos los aislamientos obtenidos a partir de kefir de agua, aún aquellos aislados de fermentos realizados con diferentes gránulos de kefir (Tabla 2), corresponden a la misma cepa *S. cerevisiae* (Fig. 11). Este resultado no esperado advierte sobre un posible origen común de los gránulos de kefir,

puesto que las poblaciones *S. cerevisiae* de los diferentes gránulos no evidenciaron diversificación.

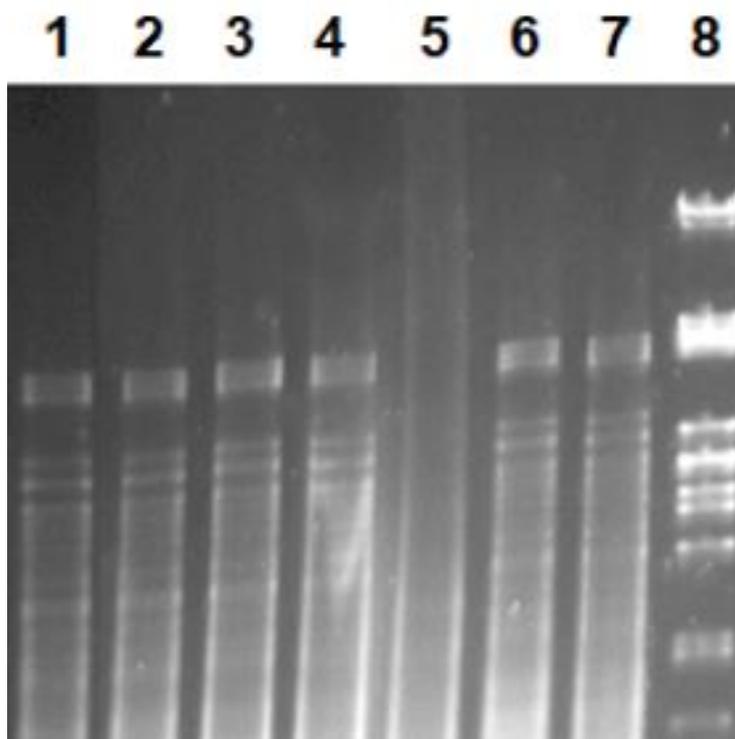


Fig. 11. ADNmt-RFLP de aislamientos de kefir de agua. Calles: 1: *S. cerevisiae* CMUNLPka11. 2: *S. cerevisiae* CMUNLPka131. 3: *S. cerevisiae* CMUNLPka132. 4: *S. cerevisiae* CMUNLPka22. 5: *S. cerevisiae* CMUNLPka23. 6: *S. cerevisiae* CMUNLPka25. 7: *S. cerevisiae* CMUNLPka31. 8: Marcador de peso molecular, fago λ digerido con endonucleasa PstI.

Excepcionalmente, no logró revelarse un patrón de bandas luego de la digestión del ADN total de CMUNLPka23 (Fig 11, calle 5). Esto podría tener explicación en la carencia de mitocondrias del aislamiento en discusión. Para corroborar dicha hipótesis, se ensayó la capacidad de *S. cerevisiae* CMUNLPka23 de crecer en aerobiosis en el sustrato no fermentable glicerol.

La levadura fue capaz de crecer en agar YNB (Yeast Nitrogen Base, BD Difco™) suplementado con glucosa (control de vitalidad), pero no así en agar YNB suplementado con glicerol. En el mismo ensayo, la cepa *S. cerevisiae* CMUNLPka25 aislada de kefir y seleccionada como control del medio por tener un perfil mitocondrial conocido, creció en YNB suplementado con glicerol e YNB suplementado con glucosa. A partir de estos resultados, se concluyó que la cepa *S. cerevisiae* CMUNLPka23 carece de mitocondrias. La ocurrencia de este tipo de mutantes incapaces de respirar

(ρ^0), denominados *petite*, se ha reportado previamente en ambientes fermentativos limitados en oxígeno, como los fermentadores cerrados sin sistema de aireación frecuentemente utilizados en la producción de cerveza a pequeña escala (White y Zainasheff, 2010).

A continuación, la figura 12 reúne los diferentes perfiles mitocondriales encontrados en cada muestra cervecera analizada, con un total de 8 perfiles mitocondriales únicos detectados en el panel de levaduras cerveceras *S. cerevisiae* (calles 1 a 14). Además, se incluyó el perfil mitocondrial característico de los aislamientos *S. cerevisiae* obtenidos de kefir de agua (calle 15), también único y diferente a todos los perfiles identificados en levaduras cerveceras.

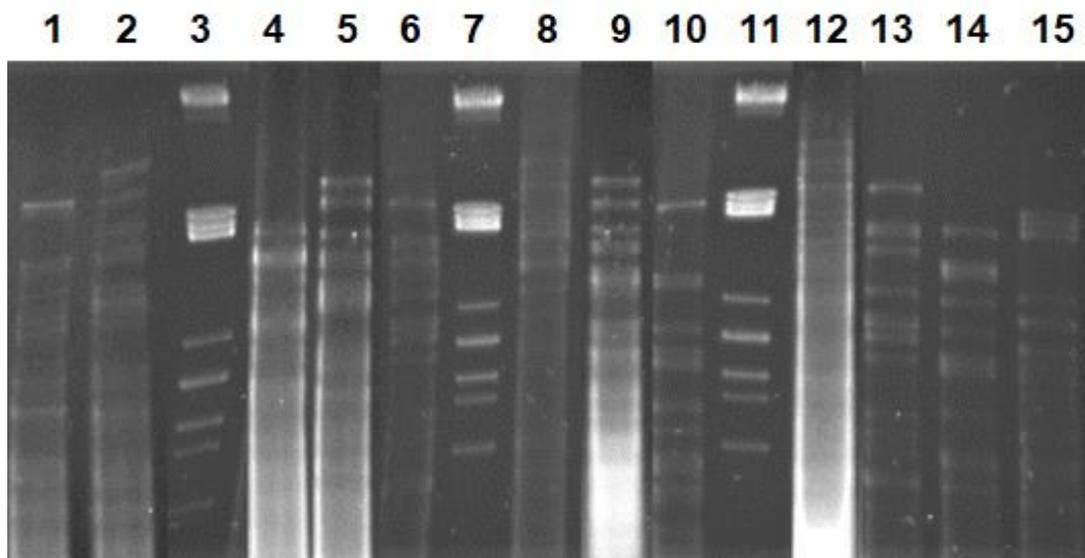


Fig. 12. ADNmt-RFLP de levaduras cerveceras aisladas. Calles: **1:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **2:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **3:** Marcador de peso molecular, fago λ digerido con endonucleasa PstI (PM λ /PstI). **4:** *S. cerevisiae* MUS121. **5:** *S. cerevisiae* MUS123. **6:** *S. cerevisiae* MUS124. **7:** PM λ /PstI. **8:** *S. cerevisiae* SAFS231. **9:** *S. cerevisiae* SAFS234. **10:** *Saccharomyces* sp. SAFS235. **11:** PM λ /PstI. **12:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **13:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **14:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **15:** *S. cerevisiae* CMUNLPka25. Puede observarse la coincidencia entre los perfiles de *S. cerevisiae* MUS123 (calle 5) y *S. cerevisiae* SAFS234 (calle 9); los perfiles de *S. cerevisiae* MUS121 (calle 4) y *S. cerevisiae* MBELGA62 (calle 14); y los perfiles de *S. cerevisiae* MUS124 (calle 6) y *S. cerevisiae* LAGMV2 (calle 13).

En total, se aislaron 9 levaduras *Saccharomyces* sp. con perfiles mitocondriales diferentes, entre muestras cerveceras y de kefir de agua, lo cual confirma la existencia de cepas *S. cerevisiae* diferentes dentro del panel estudiado. Este interesante resultado genera nuevos interrogantes acerca del proceso de divergencia y evolución de las levaduras cerveceras. Además, respalda el uso de la técnica clásica de cultivo de colonias gigantes envejecidas (White y Zainasheff, 2010) para el aislamiento de

cepas de levaduras sacaromycéticas. En algunos casos pudieron aislarse levaduras con patrones idénticos de digestión de su ADNmt a partir de diferentes muestras, que se presume corresponden a una misma cepa, resultado previsible en el contexto del proceso de domesticación al que ha sido sometida esta población a través de cientos de años de práctica cervecera.

Adicionalmente, el patrón de bandas presentado por las levaduras aisladas de kefir de agua es diferente de todos los patrones hallados entre las levaduras cerveceras (Fig. 12). Esta observación determinó la continuidad del estudio de la levadura de kefir, que se presume una cepa única, como potencial cepa cervecera novedosa, para lo cual fue caracterizada respecto de sus capacidades tecnológicas en la fermentación del mosto de cebada (resultados discutidos en secciones ulteriores).

4.4.4 Identificación de híbridos inter-específicos por análisis RFLP de genes seleccionados

Existen numerosos reportes de cepas híbridas entre los miembros del género *Saccharomyces* (*S. cerevisiae*, *S. mikatae*, *S. kudriavzevii*, *S. uvarum*, *S. paradoxus*, *S. arboriculus*, *S. eubayanus* y *S. jurei*). La detección de híbridos naturales en diferentes fermentaciones y entre *starters* empleados en la producción de vino llamaron la atención acerca de su importancia en los procesos fermentativos (Pérez-Través y col., 2014). Estos híbridos contienen un juego casi completo de cromosomas de las especies parentales constituyendo genomas alodiploides o alotetraploides o bien, sólo porciones de los genomas parentales, constituyendo aloaneuploides o cepas con cromosomas quiméricos (Belloch y col., 2009; Querol y Bond, 2009; Sipiczki, 2008).

S. pastorianus, la levadura *lager*, es una levadura alotetraploide parcial que resultó de la hibridación de *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (Libkind y col., 2011). Fernández-Espinar y col. (2003) determinaron que las fracciones genómicas provenientes de cada cepa parental que constituyen a distintas cepas *S. pastorianus* son variables. Se ha verificado la naturaleza de triple híbrido *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* x *S. kudriavzevii* de *S. bayanus*, aislada de ambientes cerveceros (Libkind y col., 2011).

El análisis RFLP de genes específicos permite identificar cepas de genoma híbrido, constituido por juegos de cromosomas de al menos dos especies diferentes miembros del género *Saccharomyces*. El ITS-RFLP ha sido empleado, entre otras, en la identificación de especies del género *Kluyveromyces* (Belloch y col., 1998). Pérez-Través y col. (2014) estudiaron la complejidad del taxón *S. bayanus* mediante el análisis PCR-RFLP y la secuenciación de 34 regiones del genoma y un gen mitocondrial aplicado a 46 cepas diferentes.

El presente estudio empleó el análisis PCR-RFLP de los genes MAG2, GSY1 y UBP7 de *Saccharomyces* sp. con el objetivo de identificar híbridos interespecíficos dentro de un subgrupo de cepas cerveceras que incluye los diferentes perfiles mitocondriales aislados a partir de cada muestra cervecera y determinados en la etapa previa (sección 4.4.3). La figura 13 muestra la fotografía del gel de agarosa obtenido luego de la corrida electroforética de algunos de los productos de digestión estudiados. La primer serie de 7 calles muestra los productos de digestión del amplicón MAG2 con la endonucleasa MspI; la segunda serie de 7 calles muestra los productos de digestión del amplicón GSY1 digerido con la enzima MspI; y la tercera serie de 7 calles muestra los productos de digestión del amplicón GSY1 con la endonucleasa HinfI (Fig. 13).

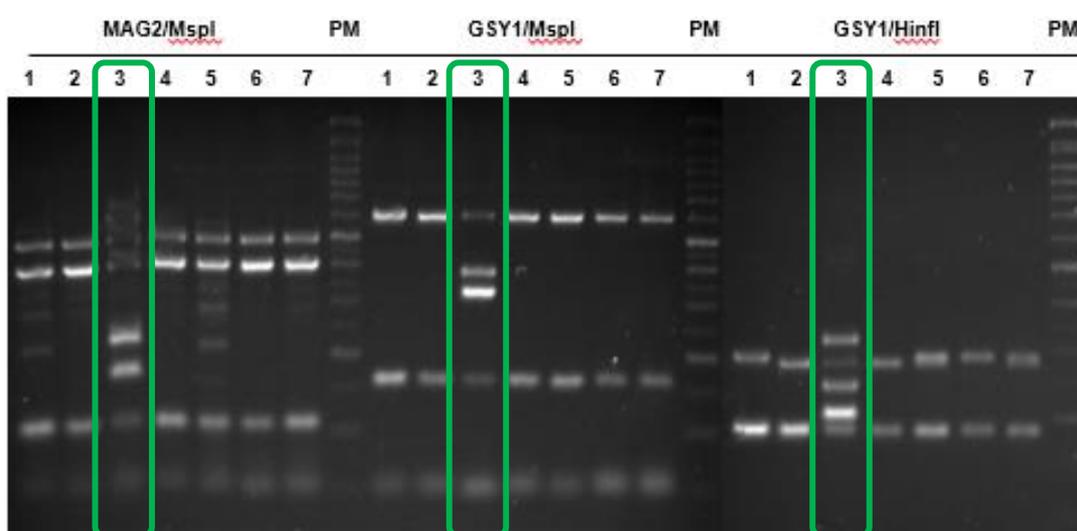


Fig. 13. PCR-RFLP de genes seleccionados para la identificación de híbridos *Saccharomyces* interespecíficos. Cada serie corresponde a la digestión del amplicón con la endonucleasa de restricción mencionada: AMPLICÓN/Endonucleasa. Calles: 1: *S. cerevisiae* SAFS231. 2: *S. cerevisiae* SAFS234. 3: *Saccharomyces* SAFS235. 4: *S. cerevisiae* LAGMV1. 5: *S. cerevisiae* LAGMV2. 6: *S. cerevisiae* MUS121. 7: *S. cerevisiae* MUS123. **PM:** patrón de peso molecular 50 + 100 (Roche Molecular Biochemicals).

Los marcos verdes (calle 3) resaltan los perfiles de digestión de la cepa *Saccharomyces* SAFS235, que presentan un juego adicional de bandas respecto al juego de bandas que aparecen en las restantes calles (Fig. 13). A continuación, se determinaron los tamaños de los fragmentos de digestión utilizando el patrón de peso molecular y se consignaron en la Tabla 4. A partir de la comparación con los datos publicados por Pérez Trávés y col. (2014), sintetizados en la sección 3.8.3, se identificó el origen homocigoto o híbrido de cada cepa según su perfil PCR-RFLP.

Tabla 4. Identificación de híbridos *Saccharomyces* interespecíficos mediante análisis PCR-RFLP de genes seleccionados

Cepa CMUNLP	AMPLICÓN/Endonucleasa ^a				Identificación
	MAG2/Mspl	UBP7/TaqI	GSY1/Mspl	GSY1/Hinfi	
SAFABB1	490; 400; 100 (Sc)	350; 340; 300 (Sc)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i>
SAFABB3	490; 400; 100 (Sc)	380; 265; 180; 80; 80 (Spar)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i> ^β
MBELGA62	490; 400; 100 (Sc)	350; 340; 300 (Sc)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i>
MUS121	490; 400; 100 (Sc)	350; 340; 300 (Sc)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i>
MUS123	490; 400; 100 (Sc)	350; 340; 300 (Sc)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i>
MUS124	490; 400; 100 (Sc)	350; 340; 300 (Sc)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i>
SAFS231	490; 400; 100 (Sc)	350; 340; 300 (Sc)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i>
SAFS234	490; 400; 100 (Sc)	380; 265; 180; 80; 80 (Spar)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i> ^β
SAFS235	490; 400; 100 (Sc); 600; 235; 175 (Seu)	350; 340; 300 (Sc); 310; 275; 275; 80 (Seu)	600; 160; 10 (Sc); 380; 320; 50 (Seu)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc); 320; 240; 200 (Seu)	<i>S. pastorianus</i> [<i>S. cerevisiae</i> x <i>S. eubayanus</i>]
LAGMV1	490; 400; 100 (Sc)	380; 265; 180; 80; 80 (Spar)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i> ^β
LAGMV2	490; 400; 100 (Sc)	350; 340; 300 (Sc)	600; 160; 10 (Sc)	290; 180; 180; 60; 50 (Sc)	<i>S. cerevisiae</i>

^aLos tamaños de los fragmentos de digestión se informan en pares de bases (pb). Sc: *S. cerevisiae*. Seu: *S. eubayanus*. Spar: *S. paradoxus*. ^βCepa *S. cerevisiae* con introgresión *S. paradoxus* en el locus UB7.

De todas las levaduras analizadas, únicamente SAFS235 presentó constitución híbrida inter-específica *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* de todos los genes analizados (Fig. 13, calle 3, marcos verdes. Tabla 4). A partir de este análisis se pudo identificar a la cepa como *S. pastorianus* SAFS235.

Los restantes perfiles mitocondriales corresponden a cepas *S. cerevisiae* homocigotas (Tabla 4). Las figuras 14 y 15 a continuación ilustran, junto a la figura 13, los resultados del análisis PCR-RFLP.

La figura 14 muestra las digestiones de los amplicones MAG2 con endonucleasa MspI (calle 1), GSY1 con endonucleasa MspI (calle 2) y GSY1 con endonucleasa Hinfi de

varias cepas de levadura sembradas en series. Se puede comprobar visualmente que las cepas *S. cerevisiae* SAFABB1, *S. cerevisiae* SAFABB3, *S. cerevisiae* CMUNLPka25 y *S. cerevisiae* MBELGA62 son levaduras *S. cerevisiae* homocigotas en los *loci* estudiados (Fig. 14, Tabla 4).

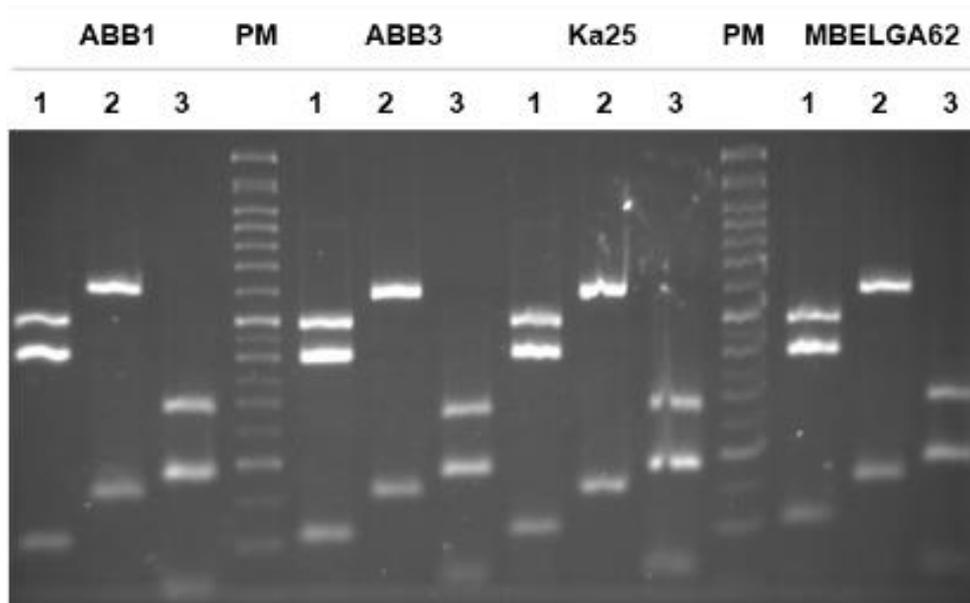


Fig. 14. PCR-RFLP de genes seleccionados para la identificación de híbridos *Saccharomyces* interespecíficos. Cada serie de 3 calles corresponde a la cepa indicada en la fila superior. ABB1: *S. cerevisiae* SAFABB1. ABB3: *S. cerevisiae* SAFABB3. Ka25: *S. cerevisiae* CMUNLPka25. MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. El orden de siembra de las digestiones AMPLICÓN/Endonucleasa es el siguiente. Calles: **1:** MAG2/MspI. **2:** GSY1/MspI. **3:** GSY1/Hinfl. **PM:** patrón de peso molecular 50 + 100 (Roche Molecular Biochemicals).

La figura 15 ilustra las digestiones del amplicón UBP7 con la endonucleasa TaqI. Entre las cepas *S. cerevisiae* homocigotas estudiadas, se detectaron algunas con un patrón de bandas diferente exclusivamente en este *locus*, que se identificó como una introgresión del genoma de *S. paradoxus* en el gen UBP7, que codifica para una ubiquitina fosforilasa (Pérez Través y col., 2014), en un *background* de *S. cerevisiae* (Fig. 15, marcos azules. Tabla 4).

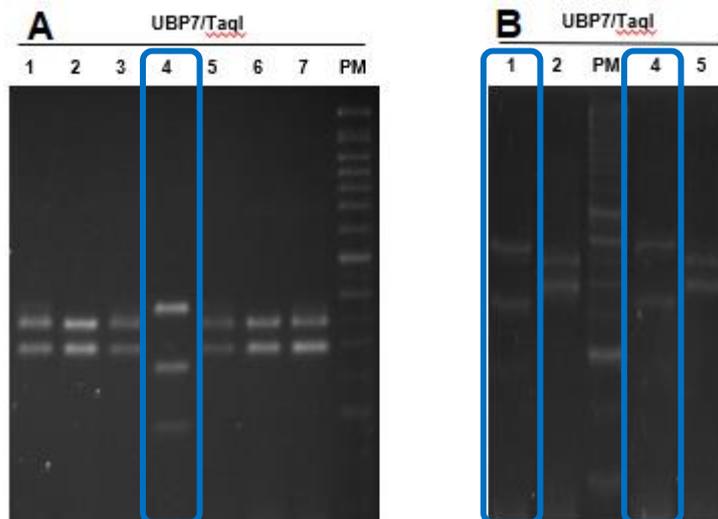


Fig. 15. PCR-RFLP del amplicón UBP7 con la endonucleasa TaqI. **Calles A:** 1: *S. cerevisiae* MBELGA62. 2: *S. cerevisiae* CMUNLPka25. 3: *S. cerevisiae* SAFABB1. 4: *S. cerevisiae* SAFABB3. 5: *S. cerevisiae* MUS121. 6: *S. cerevisiae* MUS123. 7: *S. cerevisiae* MUS124. **Calles B:** 1: *S. cerevisiae* SAFS234. 2: *Saccharomyces* sp SAFS235. 4: *S. cerevisiae* LAGMV1. 5: *S. cerevisiae* LAGMV2. **PM:** patrón de peso molecular 50 + 100 (Roche Molecular Biochemicals).

La introgresión detectada en las cepas *S. cerevisiae* SAFABB3, *S. cerevisiae* SAFS234 y *S. cerevisiae* LAGMV1 (Fig. 15, calles resaltadas con marcos azules), implica que su genoma presenta composición híbrida en algunas regiones, pero no contiene el juego de cromosomas completo de la especie que intrograda, *S. paradoxus*. Por este motivo, sólo se encontró composición híbrida en el *locus* UBP7, pero no así en los otros *loci* analizados, MAG2 y GSY1.

La introgresión podría no limitarse a esta región del genoma, y sería de interés profundizar el estudio de estas cepas a través de la secuenciación de su genoma completo. El fenómeno de introgresión no es extraño entre especies del género. Peter y col. (2018) analizaron más de 1000 genomas de *Saccharomyces* sp., encontrando en todas las cepas *S. cerevisiae* al menos un gen con introgresión de *S. paradoxus*.

Este hallazgo cobra un significado particular para la levadura *S. cerevisiae* SAFS234, cuyo análisis de perfil mitocondrial sugiere que se trata de la misma cepa que *S. cerevisiae* MUS123. Sin embargo, *S. cerevisiae* MUS123 no evidenció introgresión en el *locus* UBP7. Esto permite afirmar que las levaduras no son idénticas y que podrían tener diferencias en el comportamiento fermentativo y en sus propiedades tecnológicas para la producción de cerveza. Como resultado de esta observación, las levaduras *S. cerevisiae* MUS123 y *S. cerevisiae* SAFS234 se trataron como cepas diferentes en estudios ulteriores.

Adicionalmente, se aplicó el análisis PCR-RFLP a la región ITS1-ITS2 de las cepas *Meyerozyma* sp., aisladas de tres muestras cerveceras diferentes, para determinar su identidad a nivel especie de acuerdo a la metodología reportada por Romi y col. (2014). La Fig. 16 muestra el gel de electroforesis del amplicón ITS1-ITS2 digerido con endonucleasa TaqI.

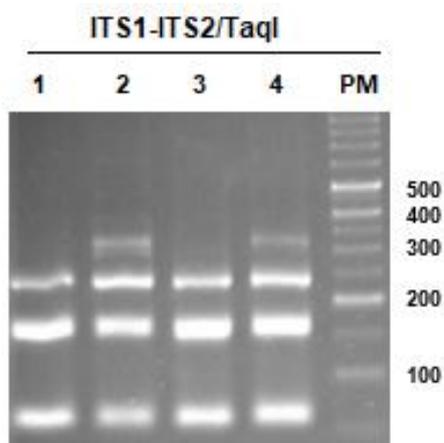


Fig. 16. PCR-RFLP de cepas *Meyerozyma* sp. Se muestra la electroforesis de los productos de digestión del amplicón ITS1-ITS2 con la endonucleasa TaqI. Calles: 1. *Meyerozyma* sp. MLA11. 2: *Meyerozyma* sp. MLA12. 3: *Meyerozyma* sp. MLA21. 4: *Meyerozyma* sp. MUS122. **PM:** patrón de peso molecular 50 + 100 (Roche Molecular Biochemicals).

A partir de este análisis de restricción pudo identificarse a todos los aislamientos como *M. guilliermondii* (Tabla 5), especie reportada como productora de *flavors* complejos en co-fermentaciones *ale* con *S. cerevisiae* (Varela, 2016).

Tabla 5. Resultados ITS1-ITS2-RFLP de aislamientos *Meyerozyma* sp.

Origen	Cepa	Tamaño ITS1-ITS2	ITS1-ITS2/TaqI*	Especie
LA-001 ^α	MLA11	600 pb	240; 170; 60	<i>M. guilliermondii</i>
	MLA12	600 pb	240; 170; 60	<i>M. guilliermondii</i>
M2 ^β	MLA21	600 pb	240; 170; 60	<i>M. guilliermondii</i>
M12 ^μ	MUS122	600 pb	240; 170; 60	<i>M. guilliermondii</i>

*Se indica AMPLICÓN/Endonucleasa de restricción empleados. Los tamaños de los fragmentos de digestión se informan en pares de bases (pb). ^αStarter líquido LALEAR (La Plata, Argentina). ^βLodo artesanal subproducto de la fermentación cervecera llevada a cabo con el *starter* líquido LA-001. ^μLodo artesanal subproducto de la fermentación de una cerveza *ale*, de 2da re-utilización de levadura comercial (Fermentis, Francia).

Dado que esta especie ha sido reportada como levadura no convencional utilizada en la producción cervecera, se decidió conservar un aislamiento *M. guilliermondii* obtenido de cada muestra, los denominados MUS122 y MLA12, como parte del panel de levaduras no sacaromicéticas que se caracterizarán respecto de sus propiedades tecnológicas.

4.4.5 Determinación de parámetros cinéticos de crecimiento en distintos medios

Durante la fermentación del mosto cervecero, en la fase exponencial de crecimiento, las levaduras consumen velozmente los azúcares disueltos y producen CO₂, etanol y compuestos de sabor.

Mientras que la glucosa representa un 14% de los azúcares del mosto, la maltosa constituye en promedio un 59%. El consumo de azúcares disueltos ocurre en cierto orden; las levaduras consumen primero la glucosa, luego la fructosa, luego la sacarosa y la maltosa. Estos azúcares simples pueden ingresar fácilmente a las células, mediante proteínas facilitadoras de transporte a través de membrana, y son metabolizados rápidamente. La presencia de maltosa en el medio induce en las levaduras la producción de enzima maltasa, la cual hidroliza maltosa en unidades de glucosa fermentables (White y Zainasheff, 2010). Los azúcares más complejos de mayor número de unidades de glucosa, como las maltotriosas y dextrinas, son las últimas en ser metabolizadas. No todas las levaduras son capaces de fermentar maltotriosas. La habilidad para hacerlo es una propiedad buscada en cepas cerveceras, ya que es determinante de su capacidad para atenuar el mosto de cebada.

Como etapa previa a la caracterización de la capacidad fermentativa del mosto cervecero de las levaduras identificadas en la etapa anterior (secciones 4.4.3 y 4.4.4), se estudió la cinética de crecimiento de cada una de ellas en medios de cultivo formulados con azúcares presentes en el mosto cervecero como principales fuentes de carbono, así como en mosto cervecero y en un medio nutricional completo como el caldo YPD. A continuación, se examinarán los parámetros cinéticos determinados y las diferencias observadas entre las cepas aisladas de una misma muestra cervecera.

Del análisis de las cinéticas de *S. cerevisiae* SAFABB1 y *S. cerevisiae* SAFABB3, ambas aisladas del *starter* comercial Safbrew Abbaye (Fermentis, Francia), no surgieron diferencias apreciables entre las velocidades máximas y los tiempos de latencia en los distintos medios de cultivo estudiados. Únicamente se observó diferencia en caldo YNB suplementado con glucosa o suplementado con maltosa, donde *S. cerevisiae* SAFABB3 logró una cosecha máxima superior (Fig. 16).

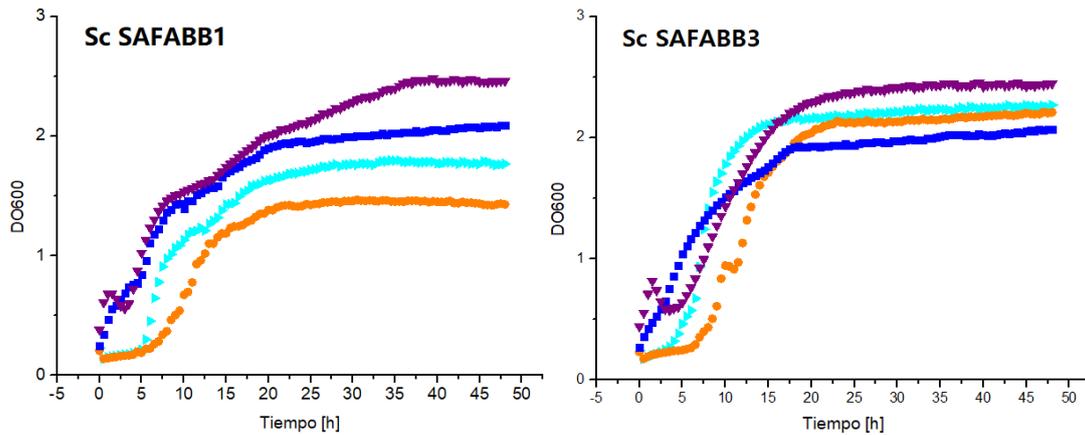


Fig. 16. Cinéticas de crecimiento de cepas aisladas del *starter* comercial Safbrew Abbaye (Fermentis, Francia), gráficos DO_{600} vs Tiempo [h] de cepas *S. cerevisiae* cultivadas en diferentes medios. Se grafica el promedio de los triplicados de cada condición de cultivo. Sc SAFABB1: *S. cerevisiae* SAFABB1. Sc SAFABB3: *S. cerevisiae* SAFABB3. \blacktriangleright YNB con glucosa 0,5% p/V. \bullet YNB con maltosa 0,5% p/V. \blacksquare Caldo YPD. \blacktriangledown Mosto cervecero estéril de 10,0 °Bx y pH 5,5.

Los parámetros cinéticos calculados a partir de estas curvas se sintetizan en la Tabla 6A. La diferencia en las cosechas máximas se comprobó significativamente superior en cultivos de la cepa *S. cerevisiae* SAFABB3 ($P < 0,05$, Tabla 6A).

Tabla 6A. Parámetros cinéticos en diferentes medios de cultivo

Origen	Cepa	Medio de cultivo	DO_{max}	Velocidad _{max} [DO ₆₀₀ /h]	Fase de latencia [h]
Safbrew Abbaye ^β	<i>S. cerevisiae</i> SAFABB1	Caldo YPD	$2,18 \pm 0,10^a$	$0,20 \pm 0,02^{AB^a}$	$1,26 \pm 0,38^{A^a}$
		Mosto 9,98 °Bx	$2,48 \pm 0,03^a$	$0,25 \pm 0,03^{BC^a}$	$1,26 \pm 0,42^{A^a}$
		YNBglu	$1,79 \pm 0,17^a$	$0,31 \pm 0,03^{C^a}$	$4,45 \pm 0,58^{B^a}$
		YNBmaltosa	$1,42 \pm 0,04^a$	$0,14 \pm 0,01^{A^a}$	$5,34 \pm 0,47^{B^a}$
	<i>S. cerevisiae</i> SAFABB3	Caldo YPD	$2,14 \pm 0,08^a$	$0,17 \pm 0,01^{A^a}$	$0 \pm 0^{A^a}$
		Mosto 9,98 °Bx	$2,45 \pm 0,04^a$	$0,17 \pm 0,04^{A^a}$	$2,23 \pm 0,98^{B^a}$
		YNBglu	$2,27 \pm 0,02^b$	$0,34 \pm 0,03^{B^a}$	$4,11 \pm 0,29^{C^a}$
		YNBmaltosa	$2,21 \pm 0,02^b$	$0,17 \pm 0,02^{A^a}$	$5,12 \pm 0,15^{C^a}$

^βStarter liofilizado comercial, Fermentis (Francia). YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20 g/L, dextrosa 20 g/L. Mosto 9,98 °Bx: mosto cervecero estéril de concentración 9,98 °Bx (1040 g/mL) y pH 5,5. YNBglu: medio YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V. YNBmaltosa: YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V. Los valores se expresan como el promedio de cada parámetro de crecimiento \pm la desviación estándar medidos en al menos tres experimentos independientes. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones de cultivo distintas aplicadas a una misma levadura. Letras minúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las levaduras cultivadas en idénticas condiciones.

Entre las cepas aisladas del *starter* cervecero comercial Saflager S-23 (Fermentis, Francia), *S. cerevisiae* SAFS231, *S. cerevisiae* SAFS234 y *S. pastorianus* SAFS235, inicialmente no se observaron diferencias en la velocidad de crecimiento y en la fase

de latencia de los cultivos en mosto cervecero. La figura 17 ilustra las curvas de DO₆₀₀ versus tiempo de estas tres cepas en los diferentes medios evaluados.

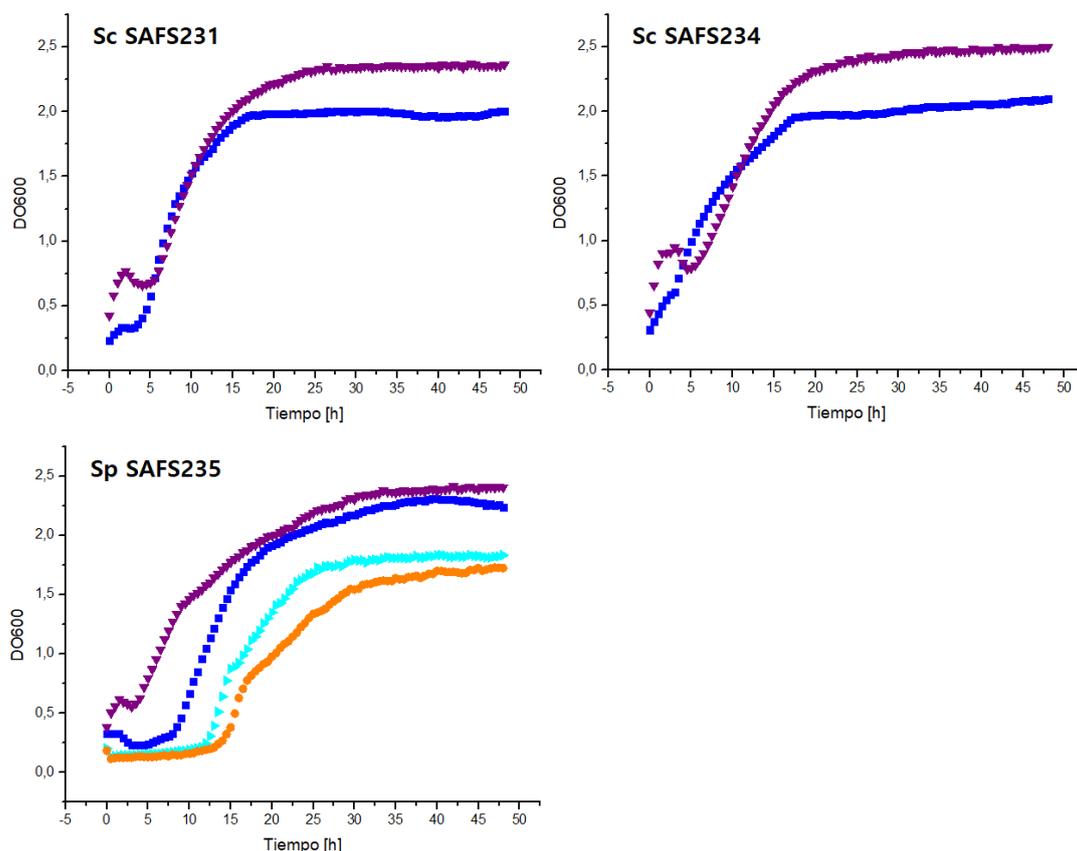


Fig. 17. Cinéticas de crecimiento de cepas aisladas del *starter* comercial Saflager S-23 (Fermentis, Francia), gráficos DO₆₀₀ vs Tiempo [h] de cepas *S. cerevisiae* cultivadas en diferentes medios. Se grafica el promedio de los triplicados de cada condición de cultivo. Sc SAFS231: *S. cerevisiae* SAFS231. Sc SAFS234: *S. cerevisiae* SAFS234. Sp SAFS235: *S. pastorianus* SAFS235. ▶ YNB con glucosa 0,5% p/V. ● YNB con maltosa 0,5% p/V. ■ Caldo YPD. ▼ Mosto cervecero estéril de 9,98 °Bx y pH 5,5. Las cinéticas de *S. cerevisiae* SAFS234 y *S. cerevisiae* SAFS231 en YNB suplementado con glucosa o maltosa no se determinaron por falta de tiempo.

Los parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de la figura 17 se sintetizan en la Tabla 6B. En cuanto a los cultivos llevados a cabo en caldo YPD, *S. cerevisiae* SAFS231 presentó la mayor tasa de crecimiento. Sin embargo, *S. pastorianus* SAFS235, que desarrolló una menor tasa de crecimiento en este medio y tuvo la fase de latencia más prolongada, fue la cepa que logró la mayor cosecha. Los datos comprueban que en caldo YPD, la cepa *S. cerevisiae* SAFS234 alcanzó una cosecha máxima significativamente superior a las otras cepas de este grupo y que *S. cerevisiae* SAFS231 presentó la mayor velocidad de crecimiento ($P < 0,05$, Tabla 6B).

Tabla 6B. Parámetros cinéticos en diferentes medios de cultivo

Origen	Cepa	Medio de cultivo	DO _{max}	Velocidad _{max} [DO ₆₀₀ /h]	Fase de latencia [h]
Saflager S-23 ^β	<i>S. pastorianus</i> SAFS235	Caldo YPD	2,30 ± 0,01 ^b	0,18 ± 0,01 ^{B a}	6,37 ± 0,94 ^{B c}
		Mosto 9,98 °Bx	2,404 ± 0,006 ^a	0,17 ± 0,02 ^{AB a}	1,02 ± 0,66 ^{A a}
		YNBglu	1,83 ± 0,03	0,132 ± 0,003 ^A	9,44 ± 0,03 ^C
		YNBmaltosa	1,72 ± 0,04	0,162 ± 0,031 ^{AB}	12,26 ± 0,99 ^D
	<i>S. cerevisiae</i> SAFS234	Caldo YPD	2,18 ± 0,02 ^{ab}	0,14 ± 0,02 ^{A a}	0 ± 0 ^{A a}
		Mosto 9,98 °Bx	2,50 ± 0,02 ^b	0,17 ± 0,04 ^{A a}	1,39 ± 0,63 ^{B a}
	<i>S. cerevisiae</i> SAFS231	Caldo YPD	2,10 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,05 ^{A b}	2,26 ± 0,26 ^{A b}
		Mosto 9,98 °Bx	2,36 ± 0,02 ^a	0,20 ± 0,01 ^{A a}	1,75 ± 0,09 ^{A a}

^βStarter liofilizado comercial, Fermentis (Francia). YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20 g/L, dextrosa 20 g/L. Mosto 9,98 °Bx: mosto cervecero estéril de concentración 9,98 °Bx (1040 g/mL) y pH 5,5. YNBglu: medio YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V. YNBmaltosa: YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V. Los valores se expresan como el promedio de cada parámetro de crecimiento ± la desviación estándar medidos en al menos tres experimentos independientes. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre condiciones de cultivo distintas aplicadas a una misma levadura. Letras minúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre las levaduras cultivadas en idénticas condiciones.

Se destacan los tiempos de latencia prolongados de *S. pastorianus* SAFS235 cultivada en YNB suplementado con glucosa e YNB suplementado con maltosa, registrados en la Tabla 6B. Los extensos tiempos de adaptación metabólica de esta cepa podrían estar relacionados con la temperatura de incubación de los experimentos (20 °C), que es óptima para levaduras *S. cerevisiae* pero podría resultar elevada para la levadura criotolerante *S. pastorianus*, adaptada a ambientes fermentativos de temperaturas entre 4 y 15 °C (White y Zainasheff, 2010).

Al comparar las cepas aisladas del lodo cervecero LagerMV, *S. cerevisiae* LAGMV1 y *S. cerevisiae* LAGMV2, no se observaron diferencias en las curvas de crecimiento en caldo YPD y mosto cervecero. A continuación, la figura 18 ilustra las cinéticas de crecimiento de ambas cepas, a partir de las cuales se detectó una mejor capacidad de adaptación de *S. cerevisiae* LAGMV1 a los diferentes sustratos evaluados.

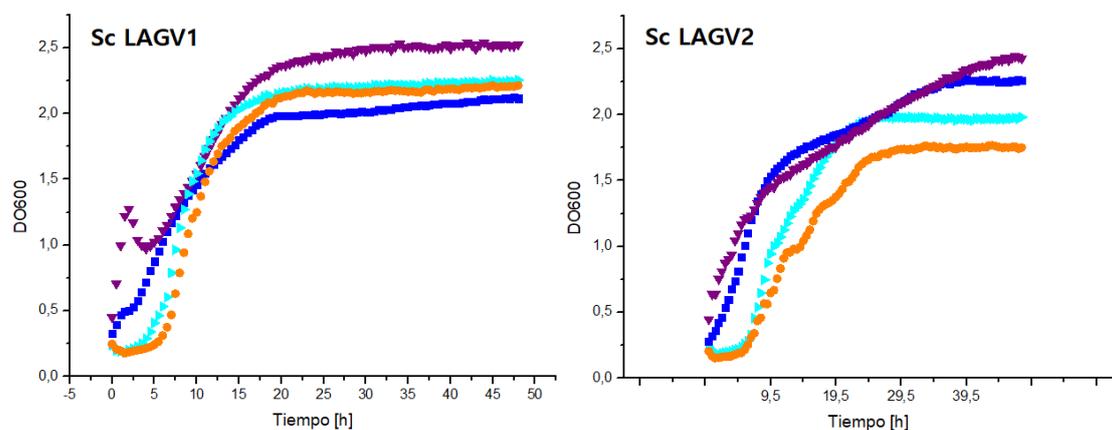


Fig. 18. Cinéticas de crecimiento de cepas aisladas del lodo de cerveza artesanal LagerMV, gráficos DO_{600} vs Tiempo [h] de cepas *S. cerevisiae* cultivadas en diferentes medios. Se grafica el promedio de los triplicados de cada condición de cultivo. Sc LAGMV1: *S. cerevisiae* LAGMV1. Sc LAGMV2: *S. cerevisiae* LAGMV2. \blacktriangleright YNB con glucosa 0,5% p/V. \bullet YNB con maltosa 0,5% p/V. \blacksquare Caldo YPD. \blacktriangledown Mosto cervecero estéril de 9,98 °Bx y pH 5,5.

Es posible distinguir dos tramos con pendientes diferentes en las cinéticas de crecimiento de la cepa *S. cerevisiae* LAGMV2 en caldo YPD y mosto cervecero (Fig. 18), siendo la segunda pendiente menor que la primera. Esto es reflejo de cambios metabólicos durante la incubación, posiblemente asociados a dificultades en la adaptación de la cepa a dichos medios de cultivo. Los parámetros cinéticos calculados a partir de estas curvas se sintetizan en la Tabla 6C.

Tabla 6C. Parámetros cinéticos en diferentes medios de cultivo

Origen	Cepa	Medio de cultivo	DO_{max}	Velocidad $_{max}$ [DO_{600}/h]	Fase de latencia [h]
Lodo LagerMV	<i>S. cerevisiae</i> LAGMV1	Caldo YPD	$2,12 \pm 0,04^a$	$0,14 \pm 0,01^{Aa}$	0 ± 0^{Aa}
		Mosto 9,98 °Bx	$2,52 \pm 0,03^a$	$0,145 \pm 0,001^{Aa}$	$0,40 \pm 0,26^{Aa}$
		YNBglu	$2,30 \pm 0,02^b$	$0,27 \pm 0,02^{Ba}$	$2,74 \pm 0,46^{Ba}$
		YNBmaltosa	$2,213 \pm 0,007^b$	$0,24 \pm 0,03^{Bb}$	$4,66 \pm 0,54^{Ca}$
	<i>S. cerevisiae</i> LAGMV2	Caldo YPD	$2,26 \pm 0,03^a$	$0,18 \pm 0,06^{Aa}$	$0,06 \pm 0,08^{Aa}$
		Mosto 9,98 °Bx	$2,53 \pm 0,04^a$	$0,17 \pm 0,06^{Aa}$	0 ± 0^{Aa}
		YNBglu	$1,98 \pm 0,02^a$	$0,23 \pm 0,01^{Aa}$	$5,26 \pm 0,01^{Cb}$
		YNBmaltosa	$1,76 \pm 0,03^a$	$0,118 \pm 0,005^{Aa}$	$3,91 \pm 0,16^{Ba}$

YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20 g/L, dextrosa 20 g/L. Mosto 9,98 °Bx: mosto cervecero estéril de concentración 9,98 °Bx (1040 g/mL) y pH 5,5. YNBglu: medio YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V. YNBmaltosa: YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V. Los valores se expresan como el promedio de cada parámetro de crecimiento \pm la desviación estándar medidos en al menos tres experimentos independientes. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones de cultivo distintas aplicadas a una misma levadura. Letras minúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las levaduras cultivadas en idénticas condiciones.

En principio, se comprobó la ausencia de diferencias significativas entre los parámetros cinéticos evaluados en cultivos en caldo YPD y mosto cervecero ($P < 0,05$).

Al estudiar los cultivos en caldo YNB suplementado con glucosa, se obtuvo una mayor cosecha máxima con *S. cerevisiae* LAGMV1, mientras que *S. cerevisiae* LAGMV2, además de alcanzar cosechas inferiores, demostró mayor dificultad de adaptación a este medio, reflejada en una fase de latencia significativamente más prolongada ($P < 0,05$, Tabla 6C). También en caldo YNB suplementado con maltosa la levadura *S. cerevisiae* LAGMV1 presentó una mejor *performance*, desarrollando una tasa de crecimiento mayor y alcanzando una cosecha máxima superior ($P < 0,05$, Tabla 6C).

Cuando se estudiaron los parámetros cinéticos de las cepas sacaromícéticas aisladas del lodo cervecero M12, *S. cerevisiae* MUS121, *S. cerevisiae* MUS123 y *S. cerevisiae* MUS124, se encontraron algunas diferencias entre los cultivos en mosto cervecero. Este análisis comparativo no incluyó a la cepa *M. guilliermondii* MUS122, aislada de la misma muestra cervecera, por tratarse de una levadura no sacaromícética que presentó un comportamiento muy diferente de las otras cepas aisladas. Su *performance* se evaluará más adelante en comparación con otra levadura de la misma especie aislada de una muestra diferente, *M. guilliermondii* MLA12.

En la figura 19 se ilustran las curvas de crecimiento de las cepas sacaromícéticas aisladas del lodo cervecero M12. Destacan las fases de latencia más prolongadas cuando se emplea medio YNB suplementado con maltosa como sustrato y las cosechas máximas superiores logradas en mosto cervecero.

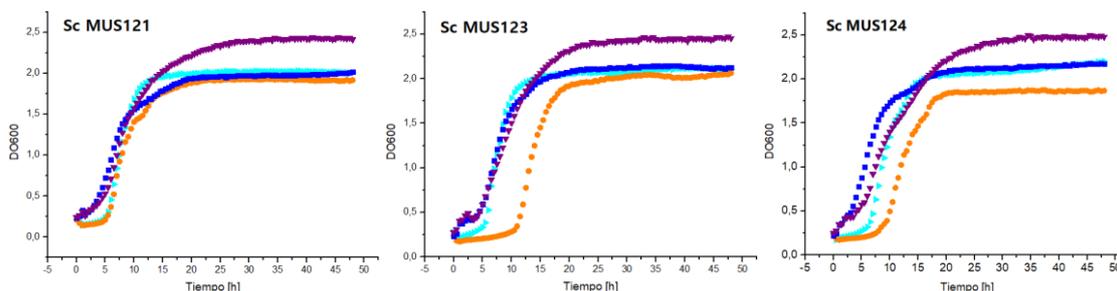


Fig. 19. Cinéticas de crecimiento de cepas aisladas del lodo de cerveza artesanal M12, gráficos DO_{600} vs Tiempo [h] de cepas *S. cerevisiae* cultivadas en diferentes medios. Se grafica el promedio de los triplicados de cada condición de cultivo. Sc MUS121: *S. cerevisiae* MUS121. Sc MUS123: *S. cerevisiae* MUS123. Sc MUS124: *S. cerevisiae* MUS124. \blacktriangle YNB con glucosa 0,5% p/V. \bullet YNB con maltosa 0,5% p/V. \blacksquare Caldo YPD. \blacktriangledown Mosto cervecero estéril de 9,98 °Bx y pH 5,5.

Los parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de la figura 19 se sintetizan en la Tabla 6D.

Tabla 6D. Parámetros cinéticos en diferentes medios de cultivo

Origen	Cepa	Medio de cultivo	DO _{max}	Velocidad _{max} [DO ₆₀₀ /h]	Fase de latencia [h]
Lodo M12	<i>S. cerevisiae</i> MUS121	Caldo YPD	2,15 ± 0,03 ^a	0,235 ± 0,006 ^{AB a}	1,40 ± 0,41 ^{A ab}
		Mosto 9,98 °Bx	2,41 ± 0,01 ^a	0,183 ± 0,005 ^{A a}	1,10 ± 0,12 ^{A b}
		YNBglu	2,02 ± 0,02 ^a	0,346 ± 0,006 ^{D b}	4,87 ± 0,26 ^{B a}
		YNBmaltosa	1,93 ± 0,01 ^a	0,28 ± 0,01 ^{B^C a}	4,48 ± 0,03 ^{B a}
	<i>S. cerevisiae</i> MUS123	Caldo YPD	2,12 ± 0,03 ^a	0,23 ± 0,01 ^{AB a}	1,85 ± 0,21 ^{A b}
		Mosto 9,98 °Bx	2,47 ± 0,03 ^a	0,19 ± 0,02 ^{A a}	1,45 ± 0,16 ^{A b}
		YNBglu	2,11 ± 0,12 ^a	0,36 ± 0,01 ^{C b}	4,35 ± 0,22 ^{B a}
		YNBmaltosa	2,06 ± 0,04 ^b	0,29 ± 0,03 ^{BC a}	9,78 ± 0,65 ^{C c}
	<i>S. cerevisiae</i> MUS124	Caldo YPD	2,18 ± 0,03 ^a	0,21 ± 0,01 ^{B a}	0,44 ± 0,46 ^{A a}
		Mosto 9,98 °Bx	2,492 ± 0,002 ^a	0,148 ± 0,003 ^{A a}	0,23 ± 0,16 ^{A a}
		YNBglu	2,28 ± 0,04 ^{ab}	0,26 ± 0,01 ^{C a}	4,93 ± 0,13 ^{B a}
		YNBmaltosa	1,87 ± 0,02 ^a	0,239 ± 0,005 ^{C a}	8,07 ± 0,04 ^{C b}

YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20 g/L, dextrosa 20 g/L. Mosto 9,98 °Bx: mosto cervecero estéril de concentración 9,98 °Bx (1040 g/mL) y pH 5,5. YNBglu: medio YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V. YNBmaltosa: YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V. Los valores se expresan como el promedio de cada parámetro de crecimiento ± la desviación estándar medidos en al menos tres experimentos independientes. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones de cultivo distintas aplicadas a una misma levadura. Letras minúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las levaduras cultivadas en idénticas condiciones.

Si bien las tasas de crecimiento en mosto cervecero no presentaron diferencias significativas entre las levaduras ($P < 0,05$), la fase de latencia de *S. cerevisiae* MUS124 fue significativamente menor que las latencias observadas en las otras cepas ($P < 0,05$), comenzando la fase exponencial inmediatamente luego de iniciada la incubación (Tabla 6D).

Al estudiar el comportamiento de las cepas en caldo YNB suplementado con glucosa, se encontró que la velocidad de crecimiento de *S. cerevisiae* MUS121 y *S. cerevisiae* MUS123 fue significativamente mayor que la velocidad de *S. cerevisiae* MUS124 ($P < 0,05$, Tabla 6D).

Respecto al medio YNB suplementado con maltosa, se observaron diferencias en la fase de latencia y en la cosecha máxima. *S. cerevisiae* MUS123 obtuvo una cosecha máxima significativamente superior, al mismo tiempo que evidenció la fase de latencia más prolongada de las tres cepas ($P < 0,05$, Tabla 6D). Aparentemente, un mayor tiempo de adaptación metabólica habilitó un mejor aprovechamiento de los nutrientes por parte de esta levadura para generar biomasa. *S. cerevisiae* MUS124 también presentó una fase de latencia prolongada, significativamente superior a aquella de *S. cerevisiae* MUS121, pero en este caso no hubo correlato con mejoras en los restantes parámetros cinéticos.

A continuación, se comparan las cinéticas entre las dos levaduras *M. guilliermondii* seleccionadas, aisladas a partir de muestras cerveceras aportadas por diferentes cerveceros artesanales de La Plata. La figura 20 ilustra las cinéticas de crecimiento de ambas levaduras en los diferentes medios.

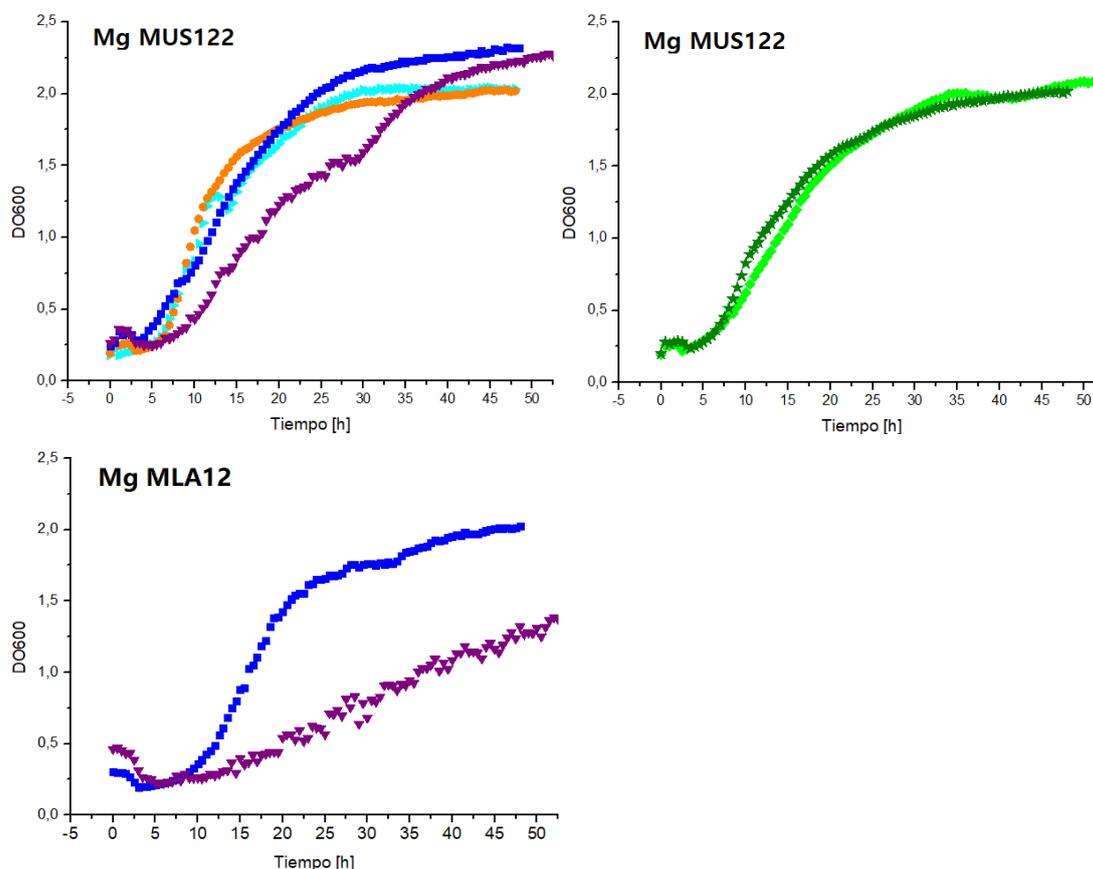


Fig. 20. Cinéticas de crecimiento de *M. guilliermondii* MUS122, aislada del lodo de cerveza artesanal M12, y *M. guilliermondii* MLA12, aislada del *starter* líquido LA-001 (LALEAR, Argentina), gráficos DO₆₀₀ vs Tiempo [h] de las cepas cultivadas en diferentes medios. Se grafica el promedio de los triplicados de cada condición de cultivo. Mg MUS122: *M. guilliermondii* MUS122. Mg MLA12: *M. guilliermondii* MLA12. ► YNB con glucosa 0,5% p/V. ● YNB con maltosa 0,5% p/V. ■ Caldo YPD. ▼ Mosto cervecero estéril de 9,98 °Bx y pH 5,5. ◆ YNB con extracto de malta de calidad microbiológica 0,5% p/V. ★ YNB con maltotriosa 0,5% p/V y maltosa 0,1% p/V.

Pudo observarse un crecimiento errático de *M. guilliermondii* MLA12 en mosto cervecero. Además, se determinó la capacidad de *M. guilliermondii* MUS122 de crecer en los sustratos maltosa, extracto de malta y maltotriosa. Los parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de la figura 20 se sintetizan en la Tabla 6E.

Tabla 6E. Parámetros cinéticos en diferentes medios de cultivo

Origen	Cepa	Medio de cultivo	DO _{max}	Velocidad _{max} [DO ₆₀₀ /h]	Fase de latencia [h]
Lodo M12	<i>M. guilliermondii</i> MUS122	Caldo YPD	2,34 ± 0,04 ^a	0,099 ± 0,008 ^{A a}	0,39 ± 0,15 ^{A a}
		Mosto 9,98 °Bx	2,36 ± 0,08 ^b	0,076 ± 0,004 ^{A a}	3,27 ± 0,47 ^{B a}
		YNBglu	2,14 ± 0,05	0,16 ± 0,01 ^C	4,27 ± 0,32 ^{BCD}
		YNBmaltosa	2,26 ± 0,04	0,21 ± 0,02 ^D	5,22 ± 0,27 ^D
		YNBmtriosa	2,33 ± 0,07	0,131 ± 0,003 ^B	3,73 ± 0,17 ^{BC}
		YNBextmalta	2,24 ± 0,05	0,106 ± 0,004 ^{AB}	4,30 ± 0,22 ^{CD}
LA-001 ^β	<i>M. guilliermondii</i> MLA12	Caldo YPD	2,17 ± 0,10 ^a	0,12 ± 0,01 ^{B a}	7,93 ± 0,63 ^{A b}
		Mosto 9,98 °Bx	1,60 ± 0,14 ^a	0,06 ± 0,01 ^{A a}	11,80 ± 3,35 ^{A b}

^βStarter líquido artesanal, LALEAR (Argentina). YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20 g/L, dextrosa 20 g/L. Mosto 9,98 °Bx: mosto cervecero estéril de concentración 9,98 °Bx (1040 g/mL) y pH 5,5. YNBglu: medio YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V. YNBmaltosa: YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V. YNBmtriosa: YNB suplementado con maltosa 0,1% p/V y maltotriosa 0,5% p/V. YNBextmalta: YNB suplementado con extracto de malta microbiológico 0,5% p/V. Los valores se expresan como el promedio de cada parámetro de crecimiento ± la desviación estándar medidos en al menos tres experimentos independientes. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre condiciones de cultivo distintas aplicadas a una misma levadura. Letras minúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre las levaduras cultivadas en idénticas condiciones.

Al estudiar su crecimiento en mosto cervecero, *M. guilliermondii* MUS122 alcanzó una cosecha máxima significativamente mayor y un tiempo de latencia menor (P < 0,05, Tabla 6E). Si bien ambos aislamientos *M. guilliermondii* tienen baja tasa de crecimiento, comparada con las tasas de crecimiento de *S. cerevisiae* (Tablas 6A, 6B, 6C y 6D), *M. guilliermondii* MUS122 se adaptó mejor al mosto cervecero que *M. guilliermondii* MLA12. Incluso en caldo YPD, un medio nutricionalmente completo para levaduras, *M. guilliermondii* MLA12 presentó una fase de latencia superior respecto de *M. guilliermondii* MUS122 (P < 0,05, Tabla 6E). En términos generales, *M. guilliermondii* MLA12 no parece ser una levadura adecuada para la producción de cerveza.

Por ser entre las dos levaduras evaluadas la mejor adaptada al crecimiento en mosto cervecero, *M. guilliermondii* MUS122 se seleccionó para estudiar su cinética en caldo YNB suplementado con extracto de malta, maltosa y maltotriosa como únicas fuentes de carbono, con el objetivo de indagar en su capacidad de fermentar azúcares más complejos presentes en los mostos de cervecería. Esta levadura fue capaz de crecer tanto en maltosa como en extracto de malta y en maltotriosa (Tabla 6E).

Al crecer en maltosa como única fuente de carbono, su velocidad de crecimiento fue significativamente mayor que en YNB suplementado con glucosa, y las tasas de crecimiento en glucosa, maltosa y maltotriosa fueron significativamente superiores a

sus tasas de crecimiento en mosto cervecero y caldo YPD ($P < 0,05$). Los tiempos de latencia en estos medios fueron, por otro lado, significativamente mayores a la fase de latencia registrada en caldo YPD ($P < 0,05$), lo que refleja la necesidad de la levadura de adaptar su metabolismo a las nuevas fuentes de carbono antes de pasar a la etapa exponencial de crecimiento (Tabla 6E).

La capacidad de *M. guilliermondii* MUS122, una levadura no convencional, de crecer en azúcares complejos presentes en el mosto, puede resultar una característica de interés para la industria cervecera. En combinación con cepas *S. cerevisiae*, podría emplearse en la producción de cervezas muy atenuadas, donde la fermentación de las maltotriosas presentes en el mosto de cebada sería finalizada por *M. guilliermondii* MUS122.

Las levaduras *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61, aisladas a partir del lodo cervecero M6, se analizaron conjuntamente, a pesar de pertenecer a especies diferentes, con el objetivo de realizar predicciones respecto al comportamiento del lodo M6, considerando el aporte de cada levadura. La figura 21 ilustra sus curvas de crecimiento en los diferentes medios de cultivo estudiados.

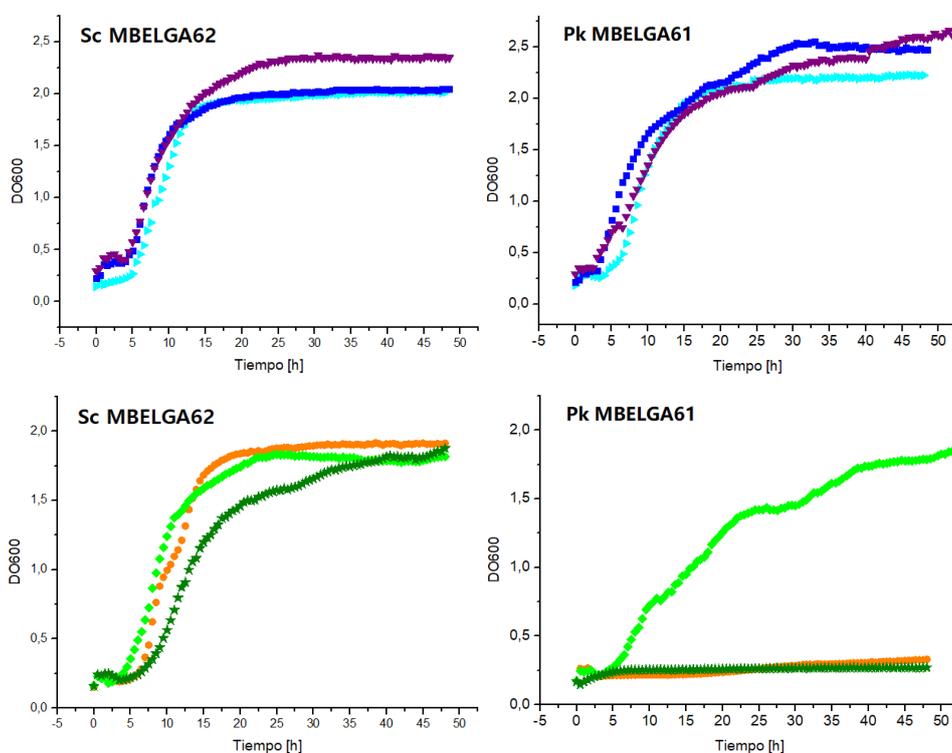


Fig. 21. Cinéticas de crecimiento de las levaduras aisladas a partir del lodo artesanal M6, gráficos DO_{600} vs Tiempo [h] de las levaduras cultivadas en diferentes medios. Se grafica el promedio de los triplicados de cada condición de cultivo. Pk MBELGA61: *P. kudriavzevii* MBELGA61. Sc MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. \blacktriangleright YNB con glucosa 0,5% p/V. \bullet YNB con maltosa 0,5% p/V. \blacksquare Caldo YPD. \blacktriangledown Mosto cervecero estéril de 9,98 °Bx y pH 5,5. \blacklozenge YNB con extracto de malta de calidad microbiológica 0,5% p/V. \star YNB con maltotriosa 0,5% p/V y maltosa 0,1% p/V.

Destaca la mejor capacidad de *S. cerevisiae* MBELGA62 de crecer en mosto cervecero y su propiedad de crecer en maltosa y maltotriosa, sustratos que *P. kudriavzevii* MBELGA61 no pudo metabolizar. Los parámetros cinéticos calculados a partir de estas curvas se sintetizan en la Tabla 6F.

Tabla 6F. Parámetros cinéticos en diferentes medios de cultivo

Cepa	Medio de cultivo	DO _{max}	Velocidad _{max} [DO ₆₀₀ /h]	Fase de latencia [h]
<i>S. cerevisiae</i> MBELGA62	Caldo YPD	2,11 ± 0,04 ^a	0,23 ± 0,02 ^{Ba}	2,01 ± 0,35 ^{Ab}
	Mosto 9,98 °Bx	2,37 ± 0,02 ^a	0,23 ± 0,02 ^{Bb}	2,33 ± 0,21 ^{ABb}
	YNBglu	2,02 ± 0,02 ^a	0,201 ± 0,006 ^{Ba}	3,23 ± 0,14 ^{Ba}
	YNBmaltosa	1,91 ± 0,03	0,208 ± 0,005 ^B	5,06 ± 0,21 ^C
	YNBmtriosa	2,06 ± 0,05	0,132 ± 0,007 ^A	5,61 ± 0,38 ^C
	YNBextmalta	2,138 ± 0,002 ^a	0,201 ± 0,008 ^{Bb}	2,96 ± 0,13 ^{Bb}
<i>P. kudriavzevii</i> MBELGA61	Caldo YPD	2,49 ± 0,10 ^b	0,210 ± 0,002 ^{Ca}	0,97 ± 0,22 ^{Aa}
	Mosto 9,98 °Bx	2,83 ± 0,06 ^b	0,124 ± 0,008 ^{Ba}	0 ± 0 ^{Aa}
	YNBglu	2,28 ± 0,11 ^b	0,29 ± 0,04 ^{Db}	7,70 ± 0,52 ^{Bb}
	YNBmaltosa	no crece	no crece	no crece
	YNBmtriosa	no crece	no crece	no crece
	YNBextmalta	2,04 ± 0,08 ^a	0,066 ± 0,008 ^{Aa}	0,90 ± 0,66 ^{Aa}

YPD: extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20 g/L, dextrosa 20 g/L. Mosto 9,98 °Bx: mosto cervecero estéril de concentración 9,98 °Bx (1040 g/mL) y pH 5,5. YNBglu: medio YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V. YNBmaltosa: YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V. YNBmtriosa: YNB suplementado con maltosa 0,1% p/V y maltotriosa 0,5% p/V. YNBextmalta: YNB suplementado con extracto de malta microbiológico 0,5% p/V. Los valores se expresan como el promedio de cada parámetro de crecimiento ± la desviación estándar medidos en al menos tres experimentos independientes. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones de cultivo distintas aplicadas a una misma levadura. Letras minúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre las levaduras cultivadas en idénticas condiciones.

Ambas levaduras fueron capaces de crecer en mosto cervecero, presentando *S. cerevisiae* MBELGA62 una velocidad de crecimiento y una fase de latencia significativamente mayores ($P < 0,05$, Tabla 6F). En cuanto a la cosecha máxima, fue significativamente superior en el caso de *P. kudriavzevii* MBELGA61. Si bien *S. cerevisiae* MBELGA62 logró crecer más rápidamente, *P. kudriavzevii* MBELGA61 se adaptó y comenzó a crecer en menor tiempo, lo cual explica parcialmente la capacidad de estas levaduras de coexistir en el lodo M6.

En un medio nutricional completo como el caldo YPD, los aislamientos crecieron a velocidades similares entre sí y comparables con la velocidad a la que *S. cerevisiae* MBELGA62 crece en mosto cervecero ($P < 0,05$, Tabla 6F). Nuevamente, la fase de latencia de *S. cerevisiae* MBELGA62 superó significativamente la latencia de *P.*

kudriavzevii MBELGA61 ($P < 0,05$, Tabla 6F). También en caldo YPD, la cosecha máxima alcanzada por la levadura no sacaromícética fue significativamente superior.

Hasta aquí, *P. kudriavzevii* MBELGA61 se presentó como una levadura de rápida adaptación al medio de cultivo y capaz de alcanzar elevadas cosechas (Tabla 6E). Esta levadura se reprodujo en mosto cervecero desde el principio de la incubación, y esta característica debe tenerse en cuenta en el diseño de co-fermentaciones con levaduras sacaromícéticas, ya que *P. kudriavzevii* MBELGA61 podría invadir el mosto y dificultar la concreción de la fermentación etanólica por *S. cerevisiae*.

Al estudiar otros sustratos, sólo *S. cerevisiae* MBELGA62 fue capaz de crecer en maltosa y maltotriosa, con fases de latencia más prolongadas pero una velocidad de crecimiento comparable a aquella observada en mosto cervecero ($P < 0,05$). *P. kudriavzevii* MBELGA61 no creció en estos sustratos (Tabla 6F).

Estos resultados demuestran que la levadura que lleva a cabo la fermentación del mosto cervecero es *S. cerevisiae* MBELGA62. Esta cepa es interesante por su capacidad de utilizar maltotriosas como fuente de carbono. *P. kudriavzevii* MBELGA61 aparentemente no realiza metabolismo fermentativo; es posible que esta levadura aporte compuestos de sabor y aroma a la cerveza producida, a través de otras vías metabólicas. Se requiere profundizar los estudios de fermentación y de composición de los productos fermentados de *P. kudriavzevii* MBELGA61 para arribar a conclusiones.

El análisis global de las cinéticas permite concluir que no existen diferencias significativas entre las velocidades de crecimiento de los cultivos en caldo YPD y en mosto cervecero de 9 de las 14 levaduras estudiadas (64%). Estos datos, que se grafican en la figura 22, indican que las especies de *Saccharomyces* sp. estudiadas adquieren del mosto cervecero los nutrientes necesarios para reproducirse a tasas comparables a aquellas que se observan en un medio nutricionalmente completo como el caldo YPD. Todas las levaduras que muestran este comportamiento son candidatas a fermentar adecuadamente el mosto de cebada.

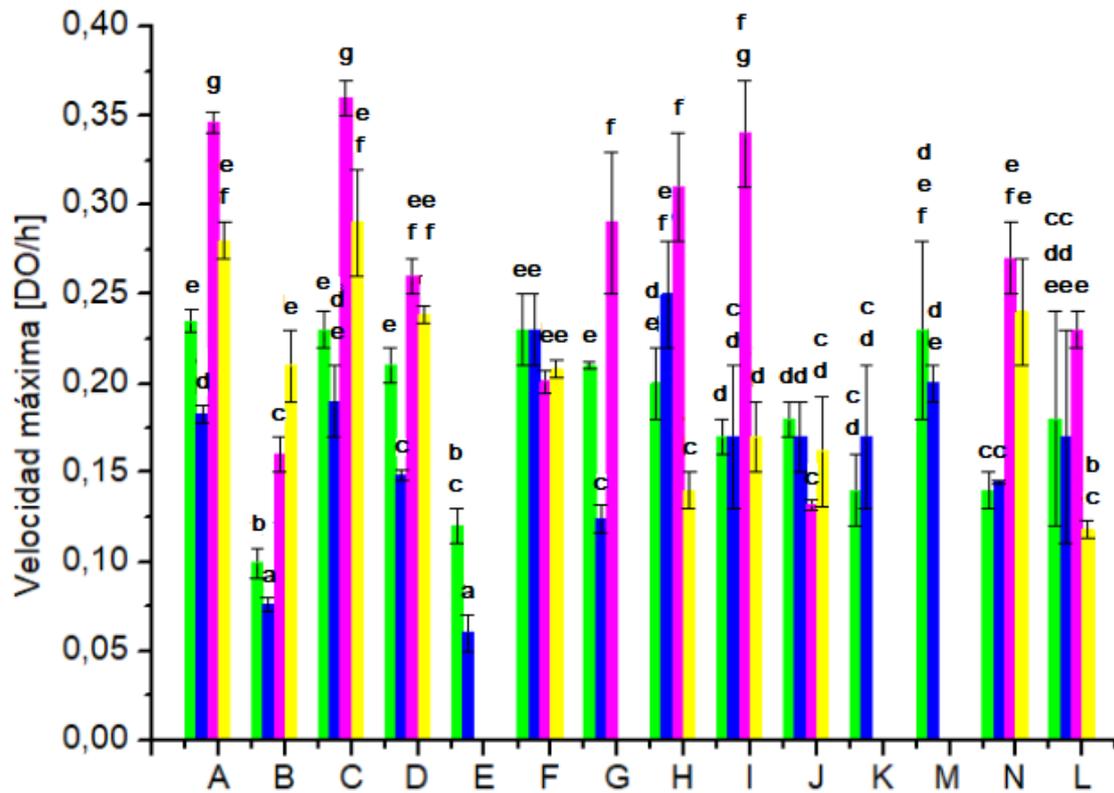


Fig. 22. Velocidad máxima de crecimiento [DO/h] de levaduras cerveceras evaluadas en diferentes medios de cultivo. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Barras con letras idénticas no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* MUS121. **B:** *M. guilliermondii* MUS122. **C:** *S. cerevisiae* MUS123. **D:** *S. cerevisiae* MUS124. **E:** *M. guilliermondii* MLA12. **F:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **G:** *P. kudriavzevii* MBELGA61. **H:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **I:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **J:** *S. pastorianus* SAFS235. **K:** *S. cerevisiae* SAFS234. **M:** *S. cerevisiae* SAFS231. **N:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **L:** *S. cerevisiae* LAGMV2. ■ Caldo YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20g/L, dextrosa 20 g/L). ■ Mosto de cebada estéril de concentración 9,98 °Bx (1040 g/mL) y pH 5,5. ■ Caldo YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V. ■ Caldo YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V.

Adicionalmente, no se detectaron diferencias significativas en las fases de latencia observadas en caldo YPD y en mosto cervecero, con excepción de las levaduras no sacaromicéticas *M. guilliermondii* MUS122 y *M. guilliermondii* MLA12 y de las cepas *S. cerevisiae* SAFABB3 y *S. cerevisiae* SAFS231, cuyas fases de latencia fueron más prolongadas en mosto ($P < 0,05$), y de *S. pastorianus* SAFS235, cuya fase de latencia fue más prolongada en caldo YPD ($P < 0,05$). Los tiempos de latencia calculados a partir de las curvas de crecimiento se grafican en la figura 23.

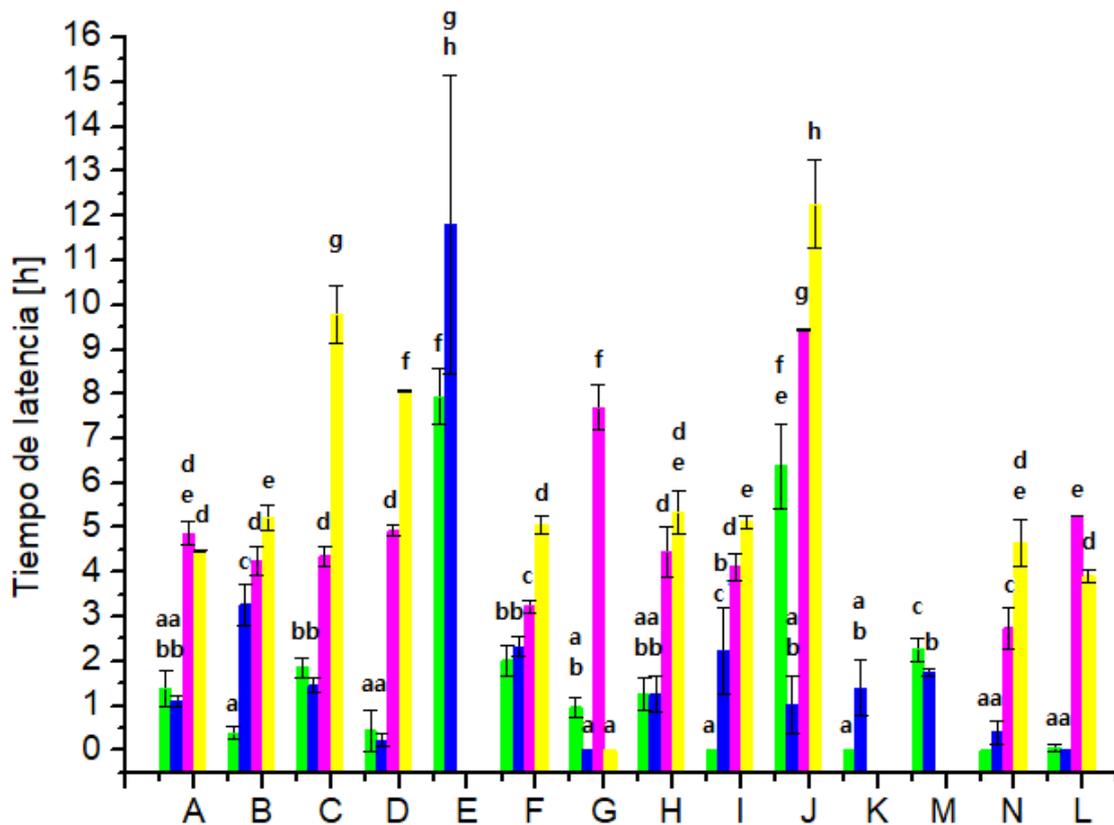


Fig. 23. Tiempo de latencia [h] de levaduras cerveceras evaluadas en diferentes medios de cultivo. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Barras con letras idénticas no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* MUS121. **B:** *M. guilliermondii* MUS122. **C:** *S. cerevisiae* MUS123. **D:** *S. cerevisiae* MUS124. **E:** *M. guilliermondii* MLA12. **F:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **G:** *P. kudriavzevii* MBELGA61. **H:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **I:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **J:** *S. pastorianus* SAFS235. **K:** *S. cerevisiae* SAFS234. **M:** *S. cerevisiae* SAFS231. **N:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **L:** *S. cerevisiae* LAGMV2. ■ Caldo YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20g/L, dextrosa 20 g/L). ■ Mosto de cebada estéril de concentración 9,98 °Bx (1040 g/mL) y pH 5,5. ■ Caldo YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V. ■ Caldo YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V.

Estas diferencias pueden explicarse a partir de la composición del medio de cultivo del pre-inóculo de levaduras, el caldo GPY, muy similar a la composición del caldo YPD. En varios casos, se detectó una fase de latencia nula al estudiar cinéticas de crecimiento en caldo YPD, pues las levaduras se encontraban metabólicamente adaptadas al medio desde la etapa de pre-inóculo. El hecho de observar fases de latencia en mosto cervicero similares a las observadas en caldo YPD ($P < 0,05$), indica que el medio de cultivo empleado en los pre-inóculos, caldo GPY, es adecuado para realizar el pre-cultivo de los *starters* de levaduras antes de la fermentación del mosto de cebada.

Las excepciones al comportamiento descrito fueron las cepas *S. cerevisiae* MUS121, *S. cerevisiae* MUS124, y las levaduras no sacaromicéticas *M. guilliermondii* MUS122,

M. guilliermondii MLA12 y *P. kudriavzevii* MBELGA61, levaduras que presentaron mejores tasas de crecimiento en caldo YPD que en mosto cervecero ($P < 0,05$, Fig. 22).

Las cepas con mejores aptitudes para crecer en mosto cervecero, que presentaron las mayores tasas de crecimiento ($P < 0,05$), fueron *S. cerevisiae* SAFABB1, *S. cerevisiae* MBELGA62 y *S. cerevisiae* SAFS231 (Fig. 22). Adicionalmente, *S. cerevisiae* SAFABB1 y *S. cerevisiae* MBELGA62 presentaron los tiempos de latencia más breves en mosto (Fig. 23).

Las cosechas máximas determinadas durante las cinéticas en distintos medios se grafican en la figura 24.

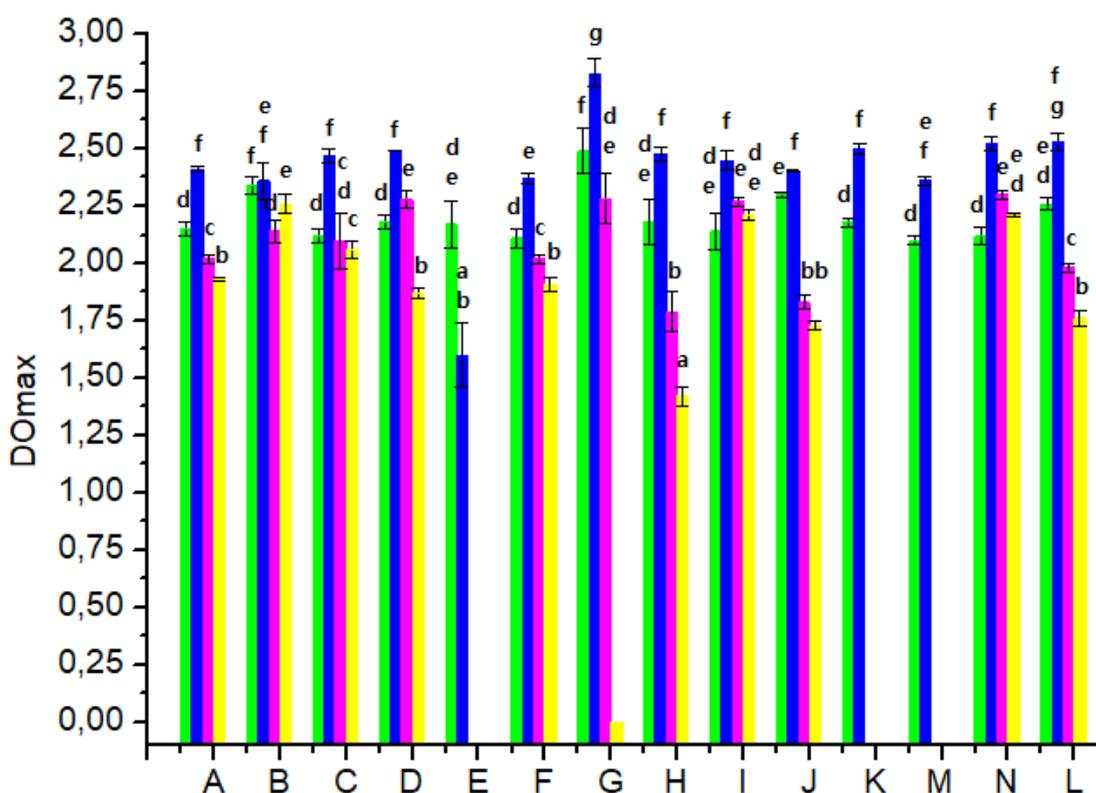


Fig. 24. Máxima cosecha [DOmax] de levaduras cerveceras evaluadas en diferentes medios de cultivo. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Barras con letras idénticas no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* MUS121. **B:** *M. guilliermondii* MUS122. **C:** *S. cerevisiae* MUS123. **D:** *S. cerevisiae* MUS124. **E:** *M. guilliermondii* MLA12. **F:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **G:** *P. kudriavzevii* MBELGA61. **H:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **I:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **J:** *S. pastorianus* SAFS235. **K:** *S. cerevisiae* SAFS234. **M:** *S. cerevisiae* SAFS231. **N:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **L:** *S. cerevisiae* LAGMV2. ■ Caldo YPD (extracto de levadura 10 g/L, peptona bacteriológica 20g/L, dextrosa 20 g/L). ■ Mosto de cebada estéril de concentración 9,98 °Bx (1040 g/mL) y pH 5,5. ■ Caldo YNB suplementado con glucosa 0,5% p/V. ■ Caldo YNB suplementado con maltosa 0,5% p/V.

Al analizar estos resultados, las cosechas en mosto resultaron significativamente mayores ($P < 0,05$) respecto a las cosechas en caldo YPD en todo los ensayos con levaduras sacaromicéticas.

Las levaduras *M. guilliermondii* fueron la excepción a este comportamiento. Destaca, además, la *performance* de *P. kudriavzevii* MBELGA61, que logró cosechas máximas en caldo YPD y mosto cervecero significativamente superiores a las cosechas de las levaduras sacaromicéticas estudiadas ($P < 0,05$, Fig. 24).

El aislamiento menos apto para el crecimiento en mosto cervecero fue *M. guilliermondii* MLA12, que presentó la velocidad de crecimiento, la cosecha máxima y la fase de latencia significativamente menos favorables de todo el panel de levaduras estudiadas ($P < 0,05$, Fig. 22, 23 y 24). La levadura *M. guilliermondii* MUS122 tampoco creció en mosto a tasas aceptables, pero su fase de latencia fue significativamente menor que la de *M. guilliermondii* MLA12. Asimismo, *P. kudriavzevii* MBELGA61 tuvo tasas de crecimiento bajas, pero superiores a las de *M. guilliermondii* ($P < 0,05$, Fig. 22), y exhibió una fase de latencia nula en mosto cervecero (Fig. 23). Estos datos dan cuenta de por qué las cepas no sacaromicéticas no logran, en general, dominar el nicho fermentativo cervecero, ya que sus velocidades de crecimiento son significativamente menores a la velocidad de cepas *S. cerevisiae*. En este sentido, la fase de latencia nula que presentó *P. kudriavzevii* MBELGA61 le da cierta ventaja competitiva, que garantizaría su presencia en el mosto en co-fermentaciones con *S. cerevisiae*.

Las velocidades de crecimiento de la mayoría de las levaduras en caldo YNB suplementado con glucosa fueron significativamente mayores que las tasas de crecimiento en caldo YPD y mosto cervecero ($P < 0,05$, Fig. 22). Este resultado era previsible, ya que la glucosa es el azúcar más sencillo de fermentar para las levaduras (White y Zainasheff, 2010). Sin embargo, las fases de latencia en este medio de cultivo fueron, de forma general, más prolongadas que en caldo YPD y en mosto (Fig. 23). Esto puede explicarse a partir de la composición del medio de cultivo de pre-inóculo de las levaduras, que como se mencionó anteriormente, es muy similar a la composición del caldo YPD. Al cambiar el medio de cultivo a YNB suplementado con glucosa, las levaduras requirieron un cierto tiempo de adaptación para iniciar el crecimiento exponencial.

La única levadura que no verificó este comportamiento en YNB suplementado con glucosa fue *S. pastorianus* SAFS235, que desarrolló tasas de crecimiento significativamente inferiores y tiempos de latencia más prolongados en este medio que en caldo YPD o en mosto cervecero ($P < 0,05$, Fig. 22 y 23).

Continuando con el análisis, la mayoría de las levaduras estudiadas presentó velocidades de crecimiento en caldo YNB suplementado con maltosa similares o inferiores a las velocidades registradas en YNB suplementado con glucosa, pero fases de latencia significativamente mayores ($P < 0,05$, Fig. 22 y 23). Esto es coherente con lo descrito en bibliografía, ya que las levaduras en medio con maltosa como única fuente de carbono deben primero sintetizar la enzima hidrolítica maltasa para luego poder consumir este sustrato. Tal necesidad de adaptar su metabolismo se refleja en la prolongación de las fases de latencia de las levaduras sacaromycéticas. La única excepción a este comportamiento fue la levadura no convencional *M. guilliermondii* MUS122, cuya tasa de crecimiento en maltosa fue superior a aquella detectada en glucosa ($P < 0,05$, Fig. 22). Por otro lado, *P. kudriavzevii* MBELGA61 no fue capaz de crecer en maltosa.

Respecto a las cosechas máximas en maltosa, no presentaron diferencias o fueron significativamente menores que las cosechas en caldo YNB suplementado con glucosa ($P < 0,05$, Fig. 24).

Al analizar la capacidad de ciertas levaduras de fermentar azúcares más complejos, como la maltotriosa, se detectaron competencias comparables entre *S. cerevisiae* MBELGA62 y la levadura no convencional *M. guilliermondii* MUS122, con velocidades de crecimiento similares y una fase de latencia de *M. guilliermondii* MUS122 significativamente menor ($P < 0,05$). Los parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de crecimiento observadas en caldo YNB suplementado con maltotriosa se grafican en la figura 25.

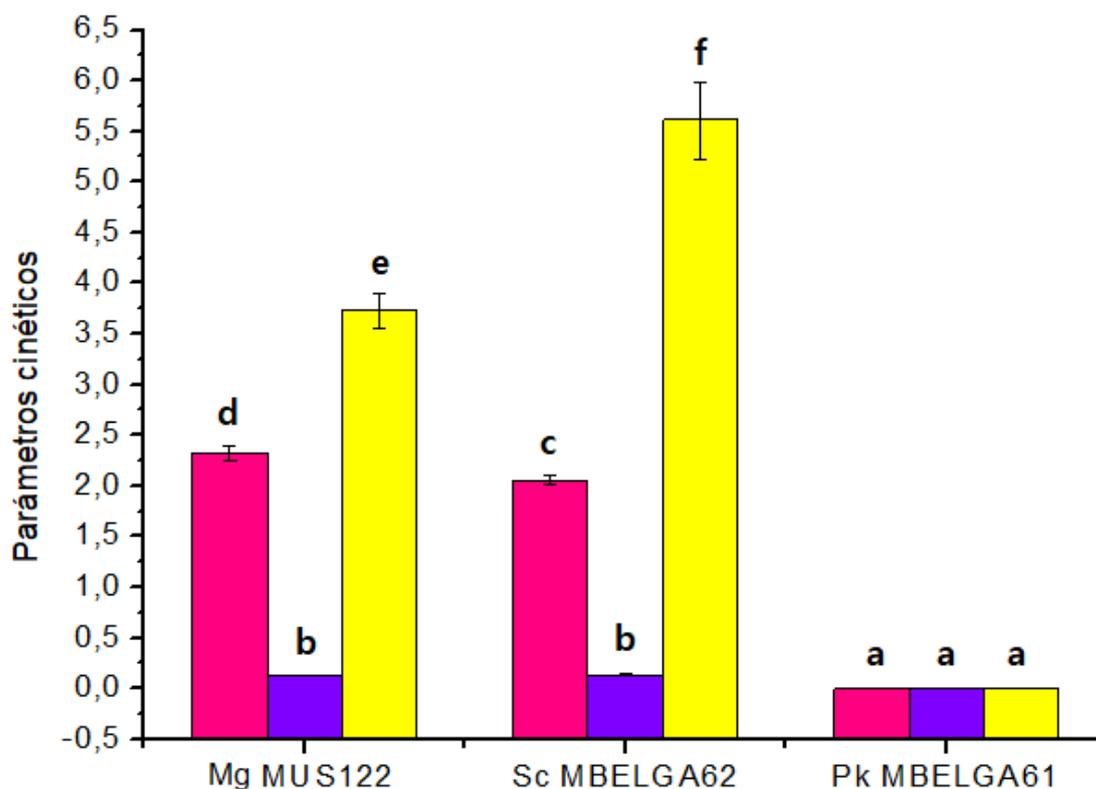


Fig. 25. Parámetros de crecimiento en caldo YNB suplementado con maltosa 0,1% p/V y maltotriosa 0,5% p/V. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Barras con letras idénticas no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). ■ Máxima cosecha [DOMax]. ■ Velocidad máxima [DO/h]. ■ Tiempo de latencia [h]. Mg MUS122: *M. guilliermondii* MUS122. Sc MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. Pk MBELGA61: *P. kudriavzevii* MBELGA61.

Estos interesantes resultados indican que una fermentación cervecera iniciada por una cepa *S. cerevisiae* incapaz de fermentar maltotriosas podría ser completada hasta atenuación por *M. guilliermondii* MUS122. El diseño de la co-inoculación de las levaduras en este caso debe contemplar que *M. guilliermondii* MUS122 co-inoculada desde el inicio podría no sobrevivir a la competencia por el nicho con *S. cerevisiae*, de acuerdo a los datos de su tasa de crecimiento en mosto cervecero (Fig. 22). En caso de utilizar *M. guilliermondii* MUS122 junto a *S. cerevisiae*, sería oportuno diseñar una co-fermentación secuencial.

La otra levadura no convencional estudiada, *P. kudriavzevii* MBELGA61, fue incapaz de crecer en maltotriosa (Fig. 25). Es decir, esta levadura es incapaz de crecer en maltosa y en maltotriosa (Fig. 22 y 25), dependiendo fundamentalmente de la glucosa presente en el mosto cervecero para reproducirse.

Al estudiar el medio YNB suplementado con extracto de malta, la única levadura capaz de utilizar este sustrato fue *S. cerevisiae* MBELGA62. Esta cepa presentó una tasa de crecimiento, una fase de latencia y una cosecha máxima con valores similares ($P <$

0,05) a aquellos registrados durante su cultivo en caldo YPD y en mosto cervecero (Fig. 22, 23 y 24). Los parámetros calculados a partir de estas curvas de crecimiento se grafican en la figura 26.

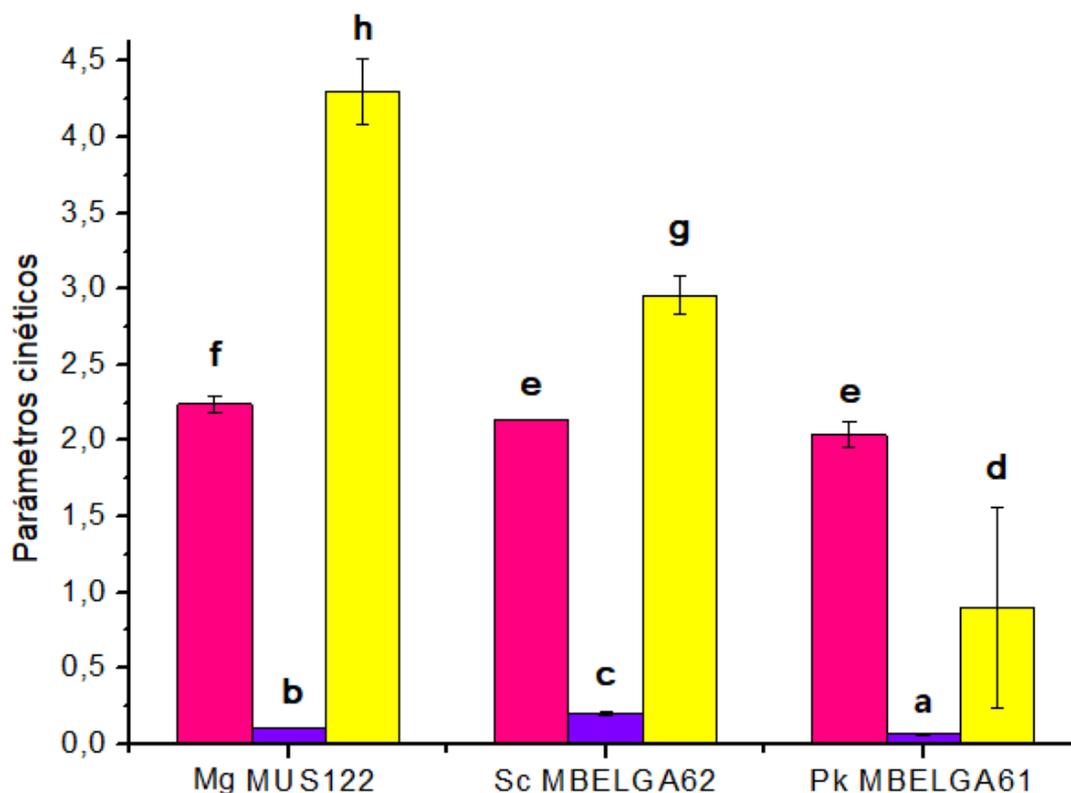


Fig. 26. Parámetros de crecimiento en caldo YNB suplementado con extracto de malta microbiológico 0,5% p/V. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Barras con letras idénticas no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). ■ Máxima cosecha [DOMax]. ■ Velocidad máxima [DO/h]. ■ Tiempo de latencia [h]. Mg MUS122: *M. guilliermondii* MUS122. Sc MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. Pk MBELGA61: *P. kudriavzevii* MBELGA61.

En cuanto a las levaduras no convencionales estudiadas, el extracto de malta resultó inadecuado para el cultivo de *P. kudriavzevii* MBELGA61, que presentó velocidades de crecimiento significativamente menores ($P < 0,05$) en comparación con las tasas de crecimiento obtenidas en caldo YPD y en mosto cervecero (Fig. 22 y 26). *M. guilliermondii* MUS122 mostró una tasa de crecimiento en este sustrato similar a las bajas tasas obtenidas en caldo YPD y mosto cervecero, y significativamente inferior a la tasa obtenida en YNB suplementado con glucosa o maltosa ($P < 0,05$, Fig. 22 y 26). Su fase de latencia fue significativamente más prolongada que aquella exhibida en mosto cervecero o caldo YPD ($P < 0,05$, Fig. 23 y 26), por lo cual, si bien la cosecha máxima obtenida es comparable a la que se obtuvo con *S. cerevisiae* MBELGA62 (Fig.

26), se concluye que el extracto de malta no es adecuado para el cultivo de *M. guilliermondii* MUS122.

A continuación se presenta un cuadro de síntesis de las cinéticas de crecimiento de las levaduras estudiadas, que facilita el análisis comparativo entre levaduras que comparten el mismo patrón de digestión de su ADN mitocondrial (potenciales cepas idénticas) y que fueron aisladas a partir de diferentes muestras cerveceras. Los datos hasta aquí recabados demuestran que las levaduras con un mismo perfil mitocondrial pueden comportarse de forma diferente en idénticas condiciones de cultivo (sustrato, temperatura, agitación).

Cepa^α (definida según perfil ADNmt-RFLP)	Fuente de aislamiento	Crecimiento en diferentes sustratos^β
<i>S. cerevisiae</i> SAFABB1	Safbrew Abbaye (Fermentis)	Presentó una vel_{max} entre las mayores del panel y un breve tiempo de latencia en mosto.
<i>S. cerevisiae</i> SAFABB3	Safbrew Abbaye (Fermentis)	Presentó tiempo de latencia prolongado en mosto y logró elevadas cosechas en el sustrato maltosa.
<i>S. cerevisiae</i> MBELGA62 (MUS121, SAFS331 ^δ , SAFT581 ^δ)	Lodo artesanal M6 Lodo artesanal M12 Safbrew S-33 (Fermentis) Safbrew T-58 (Fermentis)	MBELGA62 presentó una vel_{max} entre las mayores del panel y un breve tiempo de latencia en mosto. Además, fue capaz de crecer en el sustrato maltotriosa ^μ . MUS121 presentó una vel_{max} menor en mosto que en caldo YPD y reducida respecto a MBELGA62.
<i>S. cerevisiae</i> MUS124 (LAGMV2, MTEMPLA41 ^δ)	Lodo artesanal M12 Lodo artesanal LAGMV Lodo artesanal M4	MUS124 presentó una vel_{max} menor en mosto; LAGMV2 presentó una vel_{max} menor en el sustrato maltosa. LAGMV2 presentó un comportamiento diferente que evidencia dificultades de adaptación al mosto y al caldo YPD.
<i>S. cerevisiae</i> LAGMV1	Lodo artesanal LAGMV	Presentó una vel_{max} y cosecha en el sustrato maltosa entre las mayores. Su tiempo de latencia en mosto fue nulo.
<i>S. cerevisiae</i> SAFS231	Saflager S-23 (Fermentis)	Presentó un tiempo de latencia prolongado y entre las mayores velocidades de crecimiento en mosto.
<i>S. cerevisiae</i> SAFS234 (MUS123)	Saflager S-23 (Fermentis) Lodo artesanal M12	SAFS234 y MUS123 presentaron parámetros cinéticos similares en mosto y caldo YPD.
<i>S. pastorianus</i> SAFS235	Saflager S-23 (Fermentis)	Tiempos de latencia prolongados en el sustrato maltosa a 20 °C.

^αEntre paréntesis se indican los nombres de levaduras aisladas de otras fuentes que comparten el mismo perfil mitocondrial (sección 4.4.3) con la cepa consignada, es decir, se trata de la misma cepa aislada a partir de diferentes muestras. ^βSe estudiaron las cinéticas de crecimiento en los medios descritos en la sección 4.4.5. ^δSe estudió el perfil mitocondrial de este aislamiento pero no sus cinéticas de crecimiento en diferentes sustratos. ^μÚnica cepa sacaromycética estudiada en este sustrato. **vel_{max}** : velocidad máxima o exponencial de crecimiento.

4.4.6 *Micro-fermentaciones. Estudio de cinéticas y de los productos de fermentación del mosto de cebada por levaduras aisladas de muestras cerveceras*

Como se expuso previamente, la caracterización de las levaduras cerveceras va más allá de su identificación y clasificación taxonómica; interesan especialmente sus cualidades tecnológicas en la producción de cerveza. Durante la fermentación cervecera, las levaduras consumen los azúcares disueltos en el mosto de cebada y producen etanol, dióxido de carbono (CO₂), compuestos carbonados asociados a sabores y aromas y nuevas células. El proceso de fermentación puede dividirse en tres grandes etapas: la fase de latencia (entre las 0 y 15 h); la fase de crecimiento exponencial (entre las 15 h y los 4 días); y la fase estacionaria (entre los 3 y los 10 días) (White y Zainasheff, 2010).

En respuesta a las demandas del sector de los cerveceros artesanales locales, parte de esta tesis se dedicó a la caracterización tecnológica de las cepas de levaduras aisladas en la etapa inicial, con el objetivo de hallar cepas novedosas para la producción de cervezas con cualidades sensoriales interesantes.

A) Estudio de las cinéticas fermentativas en mosto cervecero inoculado con las levaduras

El estudio de la capacidad de fermentar el mosto cervecero se llevó a cabo sobre el panel de levaduras seleccionado previamente (*sección 4.4.5*) de acuerdo a sus perfiles mitocondriales.

Las fermentaciones con cepas cerveceras se llevaron a cabo en mosto cervecero formulado en el laboratorio a partir de malta de cebada molida (*sección 3.10.1*), de OG 17,0 °Bx, a 20 °C y en agitación para emular la aireación que ocurre naturalmente en los fermentadores cerveceros por burbujeo del CO₂ producto de la fermentación. Se registró periódicamente la pérdida de peso de las micro-fermentaciones, asociada a la liberación del CO₂ producido por la fermentación de la glucosa del mosto. A mayor pérdida de peso acumulada, mayor es la capacidad de una levadura de fermentar el mosto de cebada y, dependiendo del tipo de metabolismo fermentativo que lleve a cabo, mayor es su capacidad de producir etanol.

A continuación, se muestran las cinéticas de incremento de masa perdida y de porcentaje de azúcar consumido (*sección 3.10.5*, ecuación 2) registradas durante las micro-fermentaciones cerveceras. La figura 27 ilustra las curvas correspondientes a las fermentaciones de las cepas aisladas del *starter* comercial Safbrew Abbaye (Fermentis, Francia).

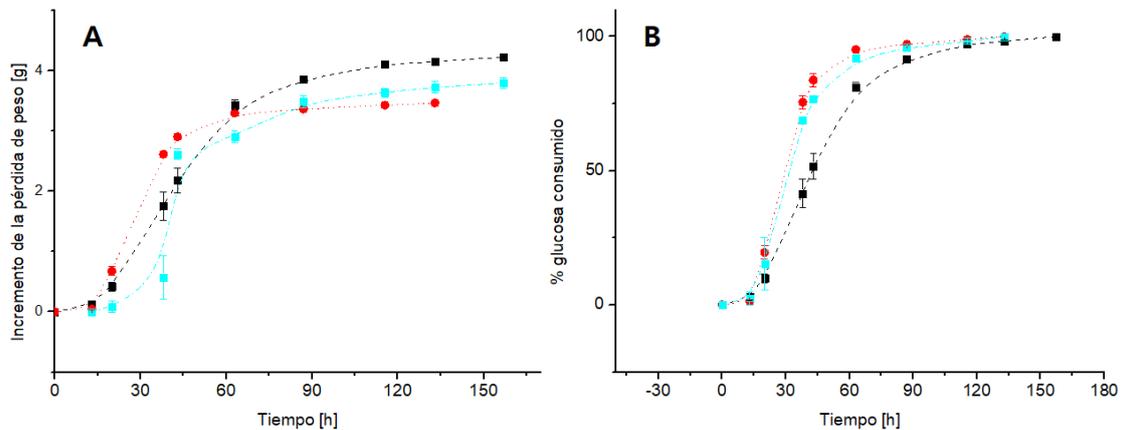


Fig. 27. Micro-fermentaciones. **A.** Curvas de incremento de peso perdido [g] en el tiempo [h]. **B.** Curvas ajustadas al porcentaje de azúcares consumidos en el tiempo [h]. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis, Francia). ■ *S. cerevisiae* SAFABB1. ● *S. cerevisiae* SAFABB3. ■ Control positivo de fermentación.

A partir de estas cinéticas, se confirmó la capacidad de las cepas *S. cerevisiae* SAFABB1 y *S. cerevisiae* SAFABB3 de fermentar el mosto de cebada. Se registraron diferencias entre ambas, como una mayor capacidad de fermentación (mayor pérdida de peso acumulada) de la cepa *S. cerevisiae* SAFABB1, que supera tanto a *S. cerevisiae* SAFABB3 como al control positivo. Sin embargo, la velocidad de fermentación de *S. cerevisiae* SAFABB3 pareció superar a la de *S. cerevisiae* SAFABB1, aproximándose a la del control (Fig. 27A). Ambas cepas aisladas a partir de este *starter* comercial mostraron una fase de latencia menor que el control positivo empleado.

Al estudiar la curva de consumo de glucosa, se registraron cinéticas idénticas para el control positivo y *S. cerevisiae* SAFABB3, mientras que *S. cerevisiae* SAFABB1 atenuó el mosto a menor velocidad (Fig. 27B), verificando ambas levaduras una atenuación total del mosto. De acuerdo a las curvas de pérdida de peso registradas (Fig. 27A), *S. cerevisiae* SAFABB1 dirige a la vía fermentativa una mayor proporción de la glucosa consumida que *S. cerevisiae* SAFABB3, motivo por el cual acumula mayor peso perdido en forma de CO₂. Según los datos de máxima cosecha en mosto cervecero, obtenidos en la etapa previa del estudio (sección 4.4.5, Fig. 24), estas cepas no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$), por lo que la vía alternativa a la que *S. cerevisiae* SAFABB3 dirige la energía obtenida de la glucosa consumida no es la producción de biomasa. Posiblemente, esta levadura produzca metabolitos de sabor y aroma interesantes para la producción cervecera.

A continuación, la figura 28 muestra las cinéticas de fermentación del mosto de cebada de cepas aisladas a partir del *starter* comercial Saflager S-23 (Fermentis, Francia).

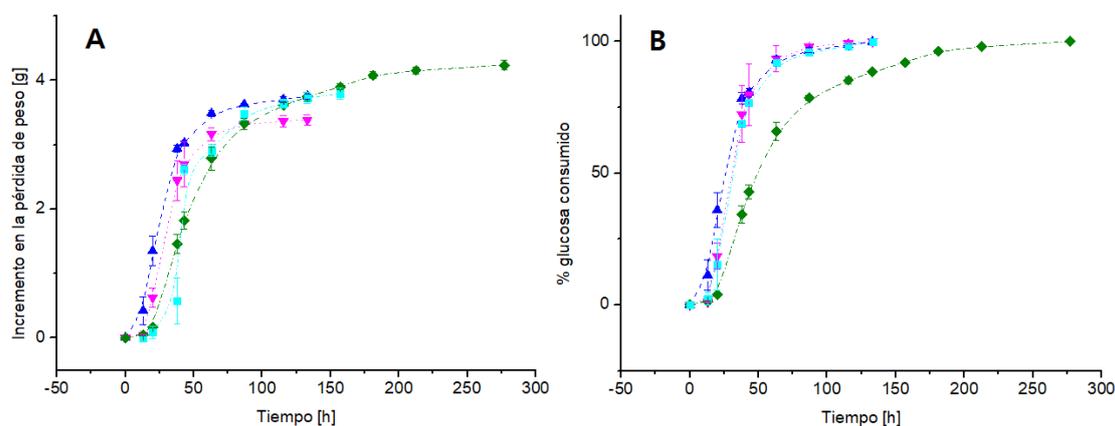


Fig. 28. Micro-fermentaciones. **A.** Curvas de incremento de peso perdido [g] en el tiempo [h]. **B.** Curvas ajustadas al porcentaje de azúcares consumidos en el tiempo [h]. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Saftbrew T-58 (Fermentis, Francia). ▲ *S. cerevisiae* SAFS231. ▼ *S. cerevisiae* SAFS234. ◆ *S. pastorianus* SAFS235. ■ Control positivo de fermentación.

Al analizar estas cinéticas, se observaron claras diferencias entre las cepas *S. cerevisiae* y la cepa *S. pastorianus*. *S. cerevisiae* SAFS231 y *S. cerevisiae* SAFS234 presentaron curvas de pérdida de peso muy similares entre sí, con mayor pérdida de peso acumulada en fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae* SAFS231 (Fig. 28A). Ambas levaduras fermentaron el mosto a una velocidad similar a aquella observada en el control positivo, e incluso presentaron fases de latencia menos prolongadas, por lo que sus aptitudes para llevar adelante la fermentación cervecera son interesantes. La cepa *S. pastorianus* SAFS235, que fermentó el mosto a menor velocidad que el control y que las cepas *S. cerevisiae*, y que presentó la fase de latencia más prolongada, fue también la levadura que manifestó mayor pérdida de peso total acumulada (Fig.28A). Al analizar la curva ajustada por consumo de glucosa, se registró que todas las cepas atenuaron el mosto por completo, aunque *S. pastorianus* SAFS235 lo hizo a menor velocidad (Fig. 28B). Esta observación refleja el comportamiento metabólico de *S. pastorianus* SAFS235, que dirige una mayor proporción de la glucosa consumida a vías metabólicas fermentativas, a partir de las cuales produce y libera CO₂, que se registra como peso perdido. Aparentemente, las cepas *S. cerevisiae* dirigen parte de la glucosa que *S. pastorianus* SAFS235 fermenta

a otras vías metabólicas, con lo cual registran menor peso perdido en forma de CO₂ a igual tasa de consumo de glucosa (Fig. 28A y B).

De acuerdo a las cinéticas de crecimiento en mosto estudiadas en la etapa previa (sección 4.4.5, Fig. 24), las tres levaduras tuvieron cosechas máximas similares, siendo la cosecha de *S. cerevisiae* SAFS234 un poco mayor ($P < 0,05$). Es decir, la glucosa que no fue fermentada por las cepas *S. cerevisiae*, tampoco fue dirigida a la producción de biomasa. Posiblemente, estas levaduras producen metabolitos de sabor y aromáticos que *S. pastorianus* no produce. Esta hipótesis es coherente con los reportes de bibliografía, que asocian a la levadura *lager* *S. pastorianus* con la producción de cervezas de cualidades sensoriales limpias, con un sabor más suave y refrescante, y a la levadura *ale* *S. cerevisiae* con cervezas más aromáticas y complejas (White y Zainasheff, 2010).

En la figura 29 se muestran las cinéticas de fermentación de mosto cervecero de las levaduras aisladas a partir del lodo artesanal LagerMV.

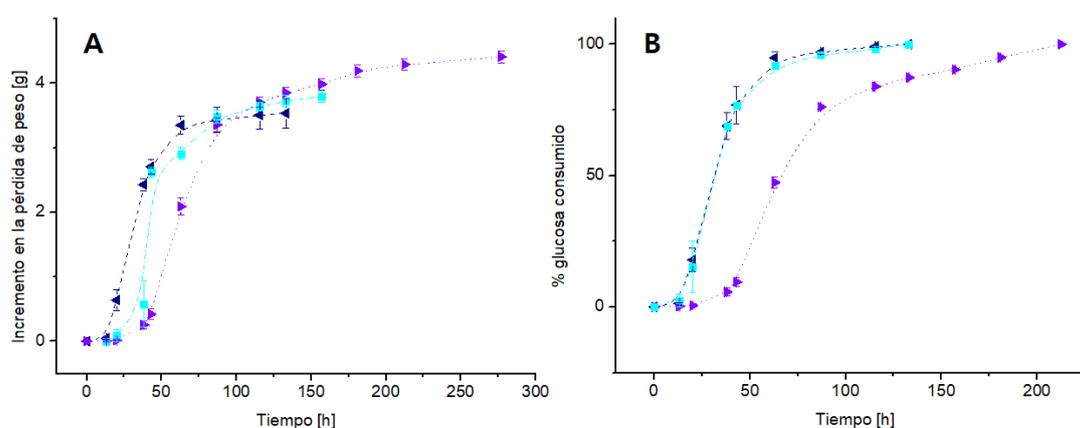


Fig. 29. Micro-fermentaciones. **A.** Curvas de incremento de peso perdido [g] en el tiempo [h]. **B.** Curvas ajustadas al porcentaje de azúcares consumidos en el tiempo [h]. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis, Francia). ◀ *S. cerevisiae* LAGMV1. ▶ *S. cerevisiae* LAGMV2. ■ Control positivo de fermentación.

Las cepas *S. cerevisiae* LAGMV1 y *S. cerevisiae* LAGMV2 mostraron diferencias fermentativas importantes. Mientras que *S. cerevisiae* LAGMV1 fermentó el mosto con una fase de latencia más breve y una pérdida de peso acumulada menor que la del control positivo, *S. cerevisiae* LAGMV2 presentó un tiempo de latencia más prolongado y un peso perdido acumulado mayor respecto del mencionado control (Fig. 29A). Ambas cepas presentaron velocidades de fermentación menores que la referencia. De acuerdo las cinéticas en mosto cervecero realizadas en la etapa previa

(sección 4.4.5, Fig. 24), estas levaduras no presentaron diferencia significativa en la máxima cosecha alcanzada ($P < 0,05$). Es decir, la glucosa que *S. cerevisiae* LAGMV1 no fermentó con producción de CO_2 , tampoco fue dirigida a la producción de biomasa. Al observar la curva de consumo de glucosa durante la fermentación, se confirmó que ambas cepas alcanzaron un 100% de consumo, aunque *S. cerevisiae* LAGMV2 lo hizo a una velocidad sensiblemente menor y con una latencia más prolongada (Fig. 29B). Es notable la similitud del comportamiento fermentativo de *S. cerevisiae* LAGMV2 a aquel registrado por la levadura *S. pastorianus* SAFS235; tal observación coincide con otras previas, realizadas respecto de su comportamiento en cultivo, que inicialmente indujo a pensar que LAGMV2 era una cepa *S. pastorianus*. Esta hipótesis fue rebatida durante los estudios moleculares que confirmaron su identidad como *S. cerevisiae* (secciones 4.4.2 y 4.4.4).

La figura 30 a continuación ilustra las cinéticas de fermentación de las levaduras aisladas a partir del lodo artesanal M6.

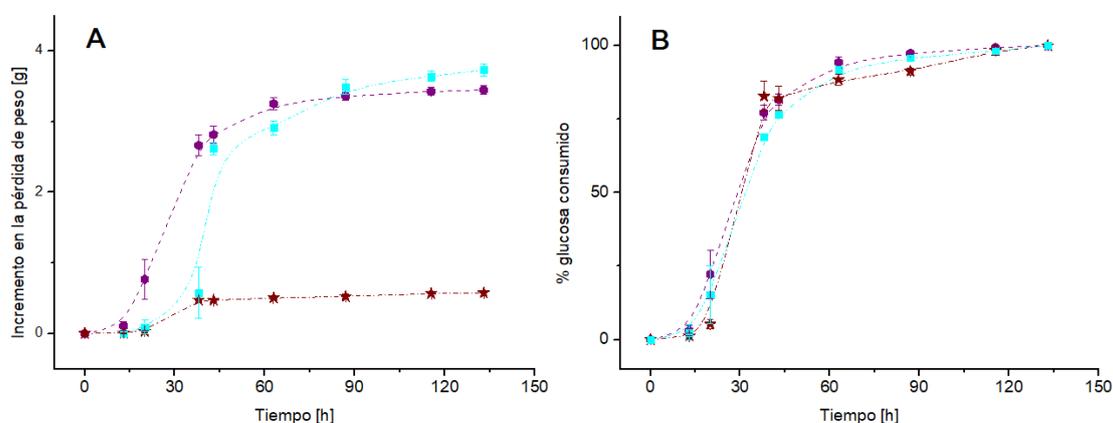


Fig. 30. Micro-fermentaciones. **A.** Curvas de incremento de peso perdido [g] en el tiempo [h]. **B.** Curvas ajustadas al porcentaje de azúcares consumidos en el tiempo [h]. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis, Francia). ● *S. cerevisiae* MBELGA62. ★ *P. kudriavzevii* MBELGA61. ■ Control positivo de fermentación.

El comportamiento fermentativo de las levaduras *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61 presentó grandes diferencias (Fig. 30A). *S. cerevisiae* MBELGA62, a comparación con el control positivo, que es también *S. cerevisiae*, presentó una fase de latencia reducida, menor velocidad de fermentación y una pérdida de peso levemente menor. Respecto al consumo de glucosa, las cinéticas de *S. cerevisiae* MBELGA62 y el control fueron idénticas. Considerando que *S. cerevisiae* MBELGA62 es capaz de crecer en maltotriosa como principal fuente de carbono (Fig.

25), esta levadura es buena candidata a realizar fermentaciones completas para la obtención de cervezas atenuadas.

P. kudriavzevii MBELGA61 comprobó ser capaz de crecer en mosto cervecero (sección 4.4.5), pero no lo fermentó, ya que apenas se registró pérdida de peso asociada a la producción y liberación de CO₂ durante este estudio (Fig. 30A). Al analizar las curvas de consumo de glucosa, se observa que *P. kudriavzevii* MBELGA61 consumió el 100% de la glucosa disponible en el mosto (Fig. 30B). Es decir, esta levadura dirige la mayor proporción de glucosa a vías metabólicas no fermentativas. Probablemente, gran parte de esta fuente de energía es dirigida a la producción de biomasa, puesto que *P. kudriavzevii* MBELGA61 registró la cosecha máxima en mosto más elevada del panel de levaduras estudiadas en la etapa previa ($P < 0,05$, sección 4.4.5, Fig. 24).

En la figura 31 se aprecian las cinéticas de fermentación de mosto cervecero de levaduras aisladas a partir del lodo artesanal M12 y de *M. guilliermondii* MLA12.

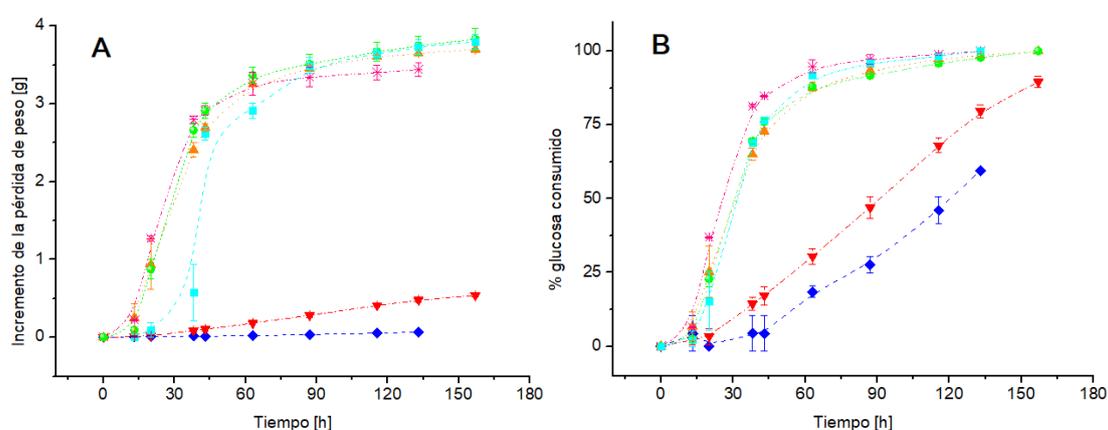


Fig. 31. Micro-fermentaciones. **A.** Curvas de incremento de peso perdido [g] en el tiempo [h]. **B.** Curvas ajustadas al porcentaje de azúcares consumidos en el tiempo [h]. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis, Francia). ♦ *M. guilliermondii* MLA12. ▲ *S. cerevisiae* MUS121. ▼ *M. guilliermondii* MUS122. * *S. cerevisiae* MUS123. ● *S. cerevisiae* MUS124. ■ Control positivo de fermentación.

Las cepas sacaromycéticas aisladas de esta muestra, *S. cerevisiae* MUS121, *S. cerevisiae* MUS123 y *S. cerevisiae* MUS124, registraron cinéticas fermentativas muy similares entre sí, destacando como diferencia una pérdida de peso acumulado reducida de *S. cerevisiae* MUS123, respecto de las otras dos. Todas ellas presentaron una fase de latencia más breve y una velocidad de fermentación menor que el control

positivo (Fig. 31A). En relación a la producción de biomasa, todas exhibieron cosechas máximas similares en mosto cervecero (sección 4.4.5, Fig. 24).

En cuanto a las levaduras no convencionales de este grupo, *M. guilliermondii* MLA12 y *M. guilliermondii* MUS122, presentaron comportamientos diferentes, aunque se puede generalizar que ninguna es apta para fermentar el mosto cervecero. *M. guilliermondii* MLA12 no registró pérdida de peso alguna. *M. guilliermondii* MUS122 registró una pérdida de peso reducida y una fase de latencia muy prolongada (Fig. 31A). Esto es coherente con lo observado durante los estudios de cinéticas de crecimiento en mosto cervecero, en los que *M. guilliermondii* MUS122 alcanzó una cosecha máxima similar a la registrada por cepas sacaromícéticas y *M. guilliermondii* MLA12 logró una cosecha máxima significativamente inferior a todas las levaduras de este grupo ($P < 0,05$, sección 4.4.5, Fig. 24).

Al estudiar las curvas de consumo de glucosa, todas las cepas sacaromícéticas comprobaron el consumo del 100% del azúcar disponible, con cinéticas muy similares a la del control positivo (Fig. 31B). Las levaduras no convencionales mostraron una velocidad de consumo de la glucosa del mosto (en su mayor parte disponible en forma de maltosa) mucho más lenta que las cepas sacaromícéticas y el control positivo. *M. guilliermondii* MLA12 fue la levadura más lenta en el consumo de glucosa de todo el panel y no llegó a consumirla al 100% (Fig. 31B). Los datos recabados sugieren que *M. guilliermondii* MUS122 podría ser productora de metabolitos que aportan complejidad a la cerveza, ya que la glucosa consumida por la levadura no fue dirigida a la producción de biomasa ni fue fermentada.

A partir de las cinéticas de fermentación del mosto cervecero, se calcularon los parámetros de interés tecnológico: máxima pérdida de peso, asociada a la producción y liberación de CO₂ y a la capacidad fermentativa de una cepa; la velocidad exponencial o velocidad máxima de fermentación; y el tiempo de latencia, que corresponde a la etapa inicial de adaptación de la levadura al mosto cervecero. Los parámetros fermentativos de *M. guilliermondii* MLA12, *M. guilliermondii* MUS122 y *P. kudriavzevii* MBELGA61 no fueron calculados, ya que sus cinéticas de fermentación no se ajustaron al modelo de curva sigmoidea a partir del cual se realizó este análisis (Fig. 30A y 31A). Los datos calculados sobre las cinéticas fermentativas de las restantes levaduras estudiadas se sintetizan en la Tabla 7.

Tabla 7. Parámetros cinéticos de fermentación del mosto cervecero

Origen	Cepa/Starter*	Máxima pérdida de peso [g/L]	Velocidad máxima [g/L.h]	Tiempo de latencia [h]
Lodo M6	Sc MBELGA62	48,4 ± 0,79 ^A	1,41 ± 0,07 ^D	11,7 ± 3,2 ^{BCD}
Saflager S-23 †	Sc SAFS231	52,4 ± 0,57 ^{BC}	1,20 ± 0,07 ^{BCD}	6,9 ± 2,1 ^{AB}
	Sc SAFS234	47,87 ± 1,19 ^A	1,38 ± 0,30 ^{CD}	13,1 ± 1,1 ^{CD}
	Sp SAFS235	57,11 ± 0,53 ^D	0,61 ± 0,06 ^A	19,4 ± 1,8 ^E
Lodo LagerV	Sc LAGMV1	49,96 ± 3,16 ^{ABC}	1,26 ± 0,17 ^{CD}	12,8 ± 2,2 ^{BCD}
	Sc LAGMV2	59,24 ± 1,21 ^D	0,72 ± 0,03 ^A	34,5 ± 1,1 ^F
Lodo M12	Sc MUS121	51,45 ± 0,47 ^{ABC}	1,003 ± 0,165 ^{ABC}	9,0 ± 3,4 ^{ABC}
	Sc MUS123	47,96 ± 1,65 ^A	1,43 ± 0,06 ^D	5,1 ± 0,2 ^A
	Sc MUS124	52,38 ± 1,79 ^{BC}	1,19 ± 0,03 ^{BCD}	10,1 ± 1,5 ^{ABC}
Safbrew Abbaye †	Sc SAFABB1	59,60 ± 0,03 ^D	0,80 ± 0,05 ^{AB}	13,2 ± 1,8 ^{CD}
	Sc SAFABB3	48,7 ± 0,6 ^{AB}	1,46 ± 0,05 ^D	13,0 ± 0,9 ^{CD}
Safbrew T-58 †	Control positivo	52,93 ± 1,03 ^{BC}	1,32 ± 0,22 ^{CD}	16,5 ± 1,0 ^{DE}

*Las micro-fermentaciones se realizaron en mosto cervecero de OG 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C, volumen de 70,0 mL en agitación (140 rpm). †Starter comercial liofilizado, Fermentis (Francia). *Pk*: *P. kudriavzevii*. *Sc*: *S. cerevisiae*. *Sp*: *S. pastorianus*. Los valores dentro de cada columna fueron comparados por ANOVA y test de Tukey; letras diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

A partir de los parámetros calculados es posible comparar los comportamientos fermentativos de aquellos aislamientos considerados potenciales cepas idénticas por compartir un mismo perfil mitocondrial (sección 4.4.3). Las levaduras *S. cerevisiae* MUS123 y *S. cerevisiae* SAFS234, mostraron parámetros fermentativos muy similares, a excepción del tiempo de latencia que fue significativamente más prolongado en fermentaciones llevadas a cabo por *S. cerevisiae* SAFS234 ($P < 0,05$, Tabla 7). Esta diferencia podría estar vinculada a la existencia de introgresiones del genoma de *S. paradoxus* en el genoma de *S. cerevisiae* SAFS234 (sección 4.4.3), que no se detectaron en *S. cerevisiae* MUS123. Si bien es necesario secuenciar el genoma completo de ambas levaduras para relacionar de forma concreta la existencia o no existencia de introgresiones en distintos *loci* con las diferencias en su *performance* fermentativa, es una posibilidad que no debe descartarse prematuramente.

S. cerevisiae MUS121 y *S. cerevisiae* MBELGA62, que también comparten un perfil mitocondrial común, mostraron comportamientos diferentes durante fermentaciones llevadas a cabo en condiciones idénticas. *S. cerevisiae* MUS121 logró una pérdida de peso acumulada significativamente superior, mientras que en términos de velocidad de fermentación, fue *S. cerevisiae* MBELGA62 la levadura que expresó valores

significativamente mayores ($P < 0,05$, Tabla 7). Estas levaduras no presentaron diferencias respecto del tiempo de latencia.

Al analizar las cinéticas de fermentación de *S. cerevisiae* MUS124 y *S. cerevisiae* LAGMV2, el tercer par de levaduras con un perfil mitocondrial compartido, se detectaron diferencias importantes entre los parámetros estudiados. Mientras que *S. cerevisiae* MUS124 fermentó el mosto a una velocidad significativamente mayor, *S. cerevisiae* LAGMV2 registró una pérdida de peso acumulada y una fase de latencia significativamente superiores ($P < 0,05$, Tabla 7). Estos resultados plantean el interrogante por el criterio para definir qué es una cepa cervecera y cómo distinguir entre cepas empleadas en la producción de esta bebida ¿Deben identificarse con criterio genético, a partir de sus perfiles de restricción del ADN mitocondrial? ¿Es fundamental profundizar su caracterización empleando técnicas complementarias, como el análisis de elementos δ de su genoma? ¿Deben identificarse exclusivamente por sus propiedades fermentativas sobre el mosto de cebada? ¿Debe ser el criterio de identificación una combinación de características tanto genéticas como fermentativas? Existen clasificaciones de cepas cerveceras de acuerdo a su carácter fermentativo. Fix y Fix (1997) elaboraron categorías para levaduras *ale* que consideran las características organolépticas de sus productos de fermentación: limpia/neutral, maltosa/productora de ésteres o especiada. Para las levaduras *lager* propusieron las categorías seca/refrescante o maltosa. Con el mismo criterio de clasificación, White y Zainasheff (2010) establecieron para cepas *ale* las categorías limpia, frutada, híbrida, fenólica o excéntrica y para cepas *lager* las categorías seca y maltosa. Esta forma de clasificación, más aplicada al hacer cotidiano de los maestros cerveceros, podría emplearse en la constitución de un nuevo criterio de diferenciación y clasificación de cepas cerveceras que contemple tanto las características genéticas de las levaduras como las propiedades sensoriales de sus productos de fermentación, asociadas a sus características tecnológicas.

Continuando con las etapas de la fermentación cervecera, durante la fase de latencia las levaduras se aclimatan a las condiciones de temperatura, estrés osmótico y disponibilidad de oxígeno disuelto. Las células comienzan a consumir oxígeno, minerales y aminoácidos y a producir proteínas. El mosto de cebada malteada es una fuente excelente de nitrógeno y minerales, y provee de la mayoría de las vitaminas, como riboflavina, inositol y biotina, que la levadura necesita (White y Zainasheff, 2010). Contiene, además, todos los minerales esenciales para las levaduras, como fósforo, azufre, cobre, hierro, potasio y sodio, con excepción de cinc, que debe suplementarse cuando se prepara el mosto.

A medida que las células adquieren vitaminas y minerales, comienzan a sintetizar enzimas y otras proteínas. Además, consumen oxígeno para producir compuestos estructurales de la célula, principalmente, los esteroides de membrana plasmática. Es por ello que, durante la fabricación de cerveza, es importante garantizar la oxigenación del mosto al inicio de la fermentación. Durante la fase de latencia, las levaduras no suelen producir compuestos que perjudiquen el sabor de la cerveza (comúnmente denominados *off-flavors*), pero sí pueden producir ciertos precursores de estos compuestos, como el α -acetolactato, precursor de diacetilo. Tampoco se producen cantidades apreciables de etanol, por lo que no hay síntesis de ésteres (algunos asociados a *off-flavors*) apreciable a partir de etanol y otros alcoholes (White y Zainasheff, 2010). Sin embargo, la velocidad de adaptación de las levaduras al ambiente fermentativo durante esta fase tendrá influencia en el sabor de la cerveza lograda.

Respecto a los **tiempos de latencia** del panel de levaduras estudiado, la figura 32 presenta los registros realizados durante las micro-fermentaciones.

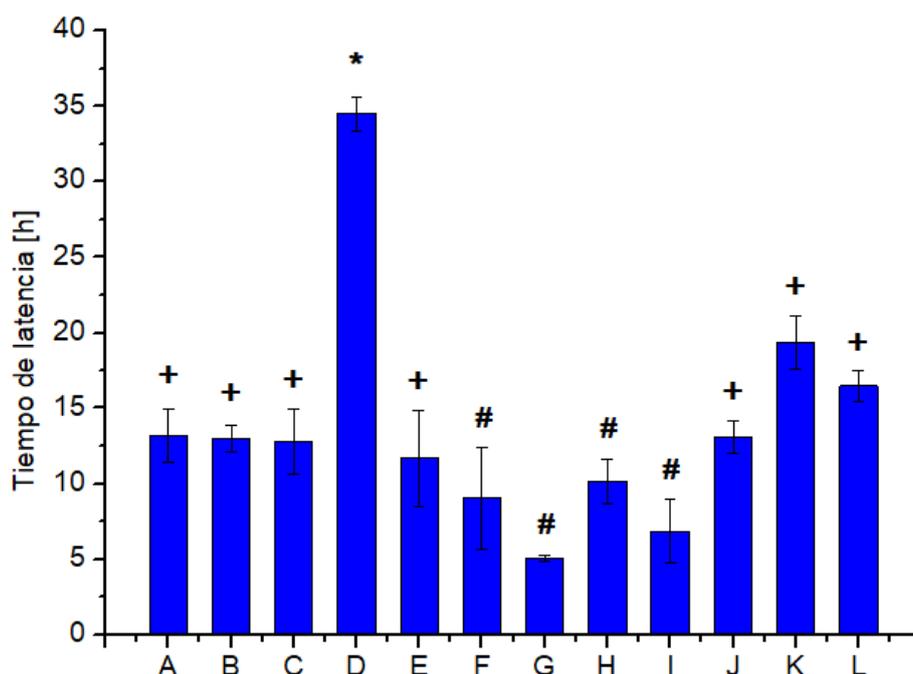


Fig. 32. Valores de tiempo de latencia [h] detectados durante la micro-fermentación de mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis, Francia). Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Barras con símbolos idénticos (*,+,#) no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **B:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **C:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **D:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **E:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **F:** *S. cerevisiae* MUS121. **G:** *S. cerevisiae* MUS123. **H:** *S. cerevisiae* MUS124. **I:** *S. cerevisiae* SAFS231. **J:** *S. cerevisiae* SAFS234. **K:** *S. pastorianus* SAFS235. **L:** Control positivo Safbrew T-58.

Se observó que las cepas *S. cerevisiae* MUS121, *S. cerevisiae* MUS123, *S. cerevisiae* MUS124 y *S. cerevisiae* SAFS231 presentaron tiempos significativamente menores que el control positivo Safbrew T-58 ($P < 0,05$, Tabla 7). *S. cerevisiae* LAGMV2 fue la única que tuvo una fase de latencia significativamente más prolongada que el control ($P < 0,05$, Tabla 7) y las restantes levaduras evaluadas no presentaron diferencia significativa respecto a la referencia.

Es interesante resaltar que la levadura criofílica *S. pastorianus* SAFS235, que llevó a cabo la fermentación del mosto a una temperatura de 20 °C, condición subóptima para su especie (White y Zainasheff, 2010), no presentó un tiempo de latencia excesivamente prolongado respecto a los tiempos del control y las cepas *S. cerevisiae* (Fig. 32, Tabla 7).

Durante la siguiente fase, el crecimiento exponencial, las levaduras comienzan a consumir velozmente los azúcares disueltos y a producir CO₂, compuesto gaseoso que es liberado del micro-fermentador y permite realizar el seguimiento de la fermentación por determinación de peso perdido en el tiempo. En esta etapa, el recuento celular se incrementa rápidamente y se producen activamente etanol y compuestos de sabor (White y Zainasheff, 2010).

Finalmente, sobreviene la fase estacionaria de la fermentación, que se define por una disminución en la velocidad de reproducción de las levaduras, hasta equilibrarse con la velocidad de muerte celular, logrando una población estable de células activas. En este estadio, las levaduras han producido la mayoría de los compuestos de sabor y aroma, incluidos los alcoholes superiores, ésteres y compuestos azufrados; la maduración de esta cerveza “verde” se completará durante la fase estacionaria, denominada también fase de acondicionamiento (White y Zainasheff, 2010).

Estas etapas de la fermentación pueden caracterizarse a través de los parámetros cinéticos denominados velocidad máxima y máxima pérdida de peso acumulada. En cuanto a la **velocidad máxima de fermentación** de las levaduras estudiadas, los valores registrados durante las micro-fermentaciones se grafican en la figura 33.

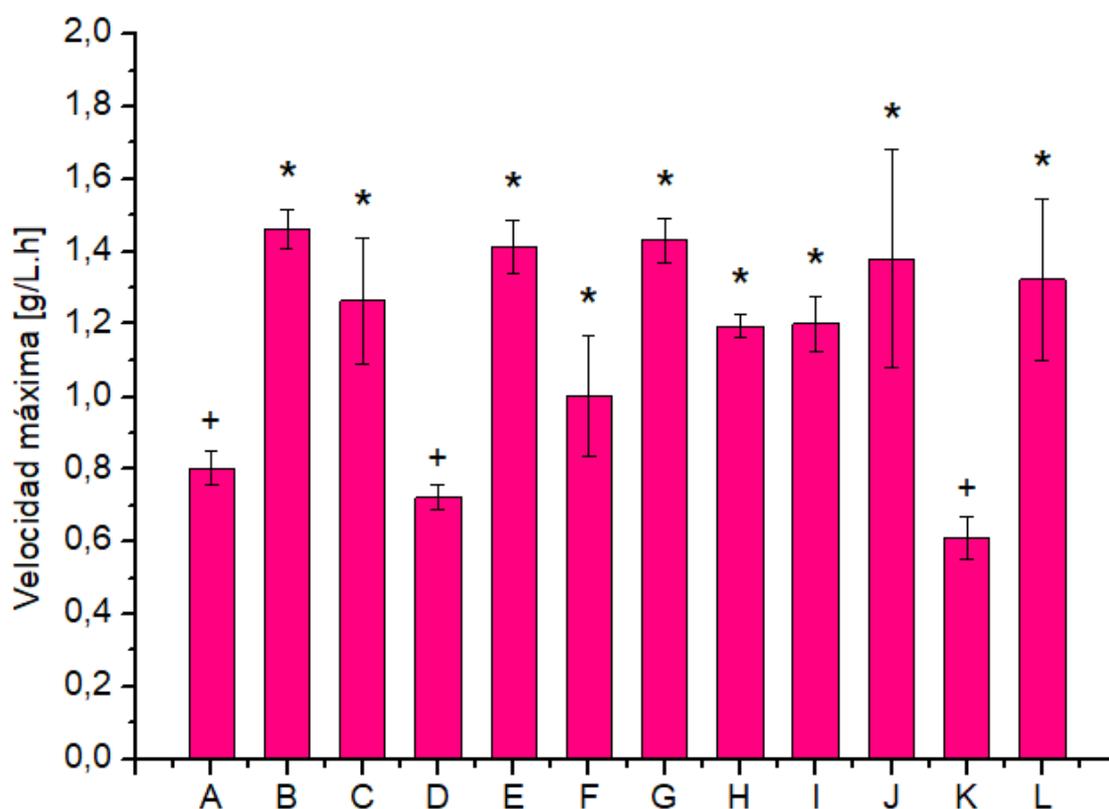


Fig. 33. Valores de velocidad máxima de fermentación [g/L.h] del mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis, Francia). Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Barras con símbolos idénticos (*,+) no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **B:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **C:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **D:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **E:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **F:** *S. cerevisiae* MUS121. **G:** *S. cerevisiae* MUS123. **H:** *S. cerevisiae* MUS124. **I:** *S. cerevisiae* SAFS231. **J:** *S. cerevisiae* SAFS234. **K:** *S. pastorianus* SAFS235. **L:** Control positivo Safbrew T-58.

Las cepas que registraron los mayores valores para este parámetro fueron *S. cerevisiae* SAFABB3, *S. cerevisiae* LAGMV1, *S. cerevisiae* MUS121, *S. cerevisiae* MUS123, *S. cerevisiae* MUS124, *S. cerevisiae* MBELGA62, *S. cerevisiae* SAFS231 y *S. cerevisiae* SAFS234, cuyas velocidades de fermentación no presentaron diferencia significativa con la velocidad del control positivo ($P < 0,05$, Tabla 7, Fig. 33). *S. cerevisiae* SAFABB1, *S. cerevisiae* LAGMV2 y *S. pastorianus* SAFS235 presentaron velocidades máximas significativamente inferiores a la del *starter* control ($P < 0,05$, Tabla 7, Fig. 33).

Respecto a la **máxima pérdida de peso** del panel de levaduras estudiado, la figura 34 grafica los valores registrados durante las micro-fermentaciones.

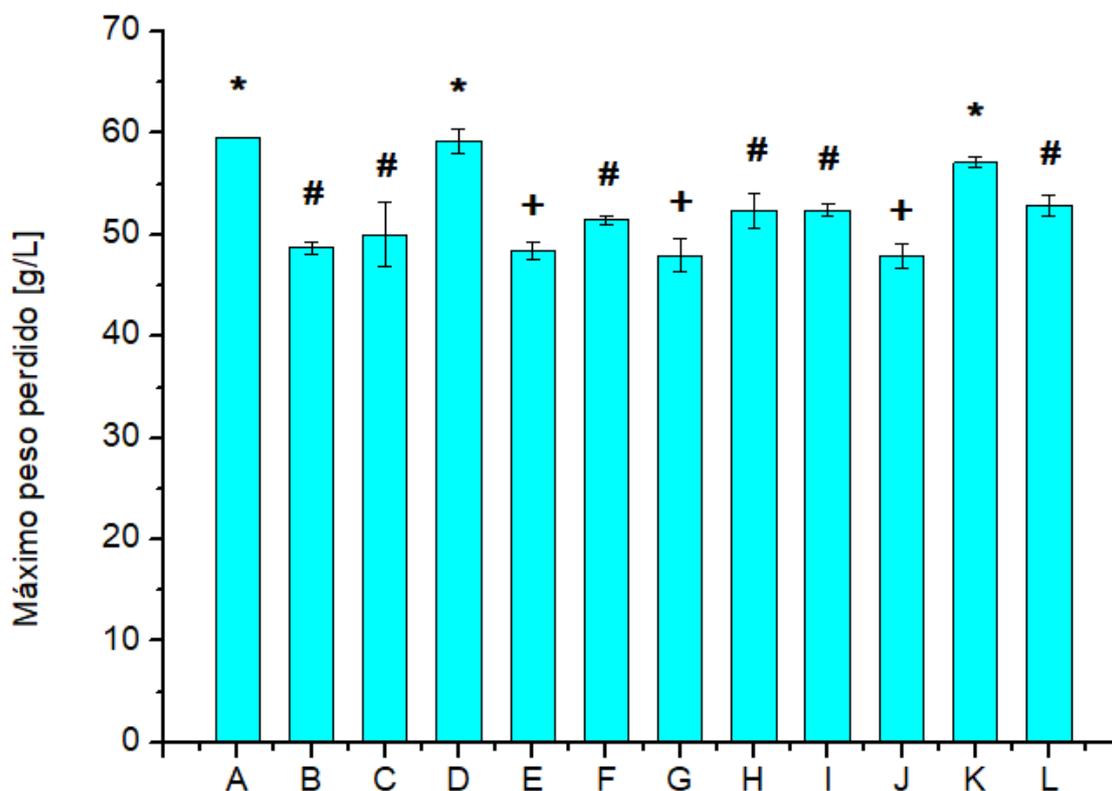


Fig. 34. Valores de máximo peso perdido [g/L] durante la micro-fermentación de mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis, Francia). Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Barras con símbolos idénticos (*,+,#) no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **B:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **C:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **D:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **E:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **F:** *S. cerevisiae* MUS121. **G:** *S. cerevisiae* MUS123. **H:** *S. cerevisiae* MUS124. **I:** *S. cerevisiae* SAFS231. **J:** *S. cerevisiae* SAFS234. **K:** *S. pastorianus* SAFS235. **L:** Control positivo Safbrew T-58.

Las cepas *S. cerevisiae* SAFABB1, *S. cerevisiae* LAGMV2 y *S. pastorianus* SAFS235 fueron las únicas en presentar un valor del parámetro significativamente mayor al registrado por el *starter* control positivo, SafbrewT-58 (Fermentis, France) ($P < 0,05$, Tabla 7). Estas levaduras fueron también aquellas que exhibieron los mayores valores de velocidad de fermentación ($P < 0,05$, Tabla 7, Fig. 33).

Por otro lado, *S. cerevisiae* MUS121, *S. cerevisiae* MUS124 y *S. cerevisiae* SAFS231, *S. cerevisiae* LAGMV1 y *S. cerevisiae* SAFABB3 presentaron valores de pérdida de peso acumulado similares al control ($P < 0,05$, Tabla 7, Fig. 34), mientras que las restantes levaduras estudiadas presentaron valores de máximo peso perdido significativamente inferiores.

A partir de estos resultados, puede afirmarse que las cepas *S. cerevisiae* SAFABB1, *S. cerevisiae* LAGMV2 y *S. pastorianus* SAFS235, de diferentes orígenes, presentan

un comportamiento similar entre sí y que las distingue del resto de las levaduras estudiadas (Tabla 7). Al fermentar el mosto cervecero a 20 °C, desarrollaron cinéticas en las que el tiempo de latencia es mayor y la velocidad de fermentación es inferior, en comparación con el control positivo y las restantes cepas cerveceras, pero que, al cabo de un tiempo más prolongado de fermentación, lograron pérdidas de peso acumulado superiores ($P < 0,05$). Es decir, estas levaduras demostraron mayor capacidad de fermentar el mosto de cebada que las demás.

En términos de producción de cervezas tipo *a/e*, estas cepas serían capaces de lograr cervezas muy atenuadas, característica deseable para la elaboración de estilos limpios y refrescantes, como el estilo Kölsch. Al fermentar más lentamente, estas levaduras permanecen en suspensión en el mosto por más tiempo, metabolizando subproductos y logrando una mejor atenuación y acondicionamiento de la cerveza (White y Zainasheff, 2010).

Sin embargo, si sus tiempos de latencia y de fermentación son demasiado prolongados, podrían resultar perjudiciales. Un mayor tiempo de exposición de las levaduras al estrés relacionado a la limitación de oxígeno y la acumulación de etanol en el medio pueden derivar en la producción de metabolitos no deseados. Para indagar en este aspecto, es necesario estudiar la composición del producto de fermentación del mosto llevada a cabo por estas levaduras. A continuación, se profundizará en el estudio de los metabolitos solubles presentes en el mosto fermentado por las levaduras del panel. Como perspectiva, sería interesante estudiar también sus metabolitos volátiles.

B) Estudio de los metabolitos solubles presentes en el mosto fermentado

Entre los metabolitos producidos por levaduras durante la fermentación del mosto cervecero, el más reconocido es el etanol. El etanol es producido por las levaduras mediante el metabolismo anaeróbico de la glucosa. La glucosa que ingresa a la célula es catabolizada en dos moléculas de piruvato y cada piruvato es oxidado a etanol y CO_2 . Existe una importante variabilidad en la cantidad de etanol que diferentes cepas de levaduras son capaces de producir. Una de las características que determina la producción de etanol es la habilidad de una levadura de fermentar eficientemente la maltotriosa del mosto de cebada. Krogerus y col. (2017) reportaron que cepas que producen menos de 5% V/V de etanol fermentan entre el 50 y el 60% de la maltotriosa disponible, mientras que cepas que producen niveles superiores de etanol, fermentan más del 70% de la maltotriosa presente en el mosto.

Además del etanol, las levaduras producen varios otros metabolitos responsables de las características sensoriales de la cerveza. Entre ellos, se encuentra el glicerol, un

compuesto de 3 carbonos que aporta cuerpo, sensación de plenitud en boca y aumenta la intensidad de los sabores en bebidas como el vino y la cerveza (Zhao y col., 2015). Este subproducto del metabolismo de las levaduras actúa como osmoregulador y aporta al balance redox celular, compitiendo en términos metabólicos con la producción de etanol por fermentación alcohólica. Así, al incrementarse el rendimiento en glicerol, aumenta la intensidad de sabores y se reduce el contenido de etanol en la bebida. En cervezas, se reporta un rango de 1 a 3 g/L de glicerol (Zhao y col., 2015).

Como se mencionó previamente, las cervezas maduran durante la fase estacionaria o fase de acondicionamiento. En este momento, las levaduras reabsorben metabolitos no deseados producidos durante la fermentación, como el acetaldehído y la 2,3-butanediona (también conocida como diacetilo). El diacetilo es un compuesto volátil que afecta la calidad de la cerveza; en concentraciones superiores a 0,1 ppm puede generar sabores no deseados, con descriptores de manteca/rancio/solvente (White y Zainasheff, 2010). Aunque algunos estilos *ale*, como el *Stout*, *Schotch ale* y *Pilsen*, admiten cierta concentración de diacetilo, asociado a un descriptor de caramelo, en cervezas rubias y en estilos *lager* se prefiere su ausencia. Durante la fase estacionaria, ciertas levaduras reducen el diacetilo a 2,3-butanediol, un alcohol insípido que no perjudica el perfil sensorial de la cerveza producida.

Adicionalmente, durante esta fase el sulfuro de hidrógeno, compuesto *off-flavor* asociado al aroma de huevo podrido, escapa como gas hacia la superficie. Hacia el final de la fase estacionaria se produce la caída del *kraeusen* o espuma de levaduras *ale* floculadas y las levaduras sedimentan en el fondo del fermentador, cesando el metabolismo y dando por finalizada la fermentación y acondicionamiento de la cerveza (White y Zainasheff, 2010).

Para determinar la presencia y cuantificar los metabolitos solubles presentes en los productos fermentados por el panel de levaduras estudiado, se realizó un análisis HPLC. Mediante esta técnica pudo determinarse tanto la capacidad de atenuación de cada cepa (capacidad de reducir los azúcares disueltos en el mosto) como sus propiedades tecnológicas en cuanto a la producción de etanol y otros metabolitos. Los productos de fermentación de levaduras no convencionales se incluyeron en esta etapa para profundizar su caracterización y determinar si serían interesantes como levaduras que aporten *flavors* alternativos y/ novedosos en la elaboración de cerveza. Los resultados del análisis se sintetizan en la Tabla 8.

Tabla 8. Análisis HPLC de los productos de micro-fermentación

Cepa/ Starter	Glicerol [g/L]	2,3-butanediol [g/L]	Eritritol [g/L]	Etanol [% V/V]	Glucosa [g/L]	Fructosa [g/L]
<i>Mg</i> MLA12	0,16 ± 0,02 ^J	0,08 ± 0,00 ^H	0,03 ± 0,00 ^K	0,21 ± 0,02 ^H	2,57 ± 0,08 ^B	5,28 ± 0,10 ^A
<i>Mg</i> MUS122	0,28 ± 0,02 ^I	0,17 ± 0,01 ^G	0,03 ± 0,00 ^K	1,19 ± 0,04 ^G	0,3 ± 0,71 ^C	1,75 ± 0,20 ^C
<i>Sc</i> MUS 121	2,56 ± 0,02 ^{FG}	0,34 ± 0,01 ^B	0,08 ± 0,00 ^{EF}	6,95 ± 0,03 ^D	0,00 ± 0,62 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sc</i> MUS123	2,65 ± 0,02 ^{EF}	0,2 ± 0,01 ^G	0,09 ± 0,00 ^D	6,16 ± 0,04 ^F	0,00 ± 0,71 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sc</i> MUS124	2,74 ± 0,02 ^{DE}	0,29 ± 0,01 ^D	0,1 ± 0,00 ^C	7,01 ± 0,04 ^D	0,00 ± 0,71 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sc</i> LAGMV1	2,41 ± 0,02 ^G	0,26 ± 0,01 ^{EF}	0,07 ± 0,00 ^H	6,44 ± 0,03 ^E	0,00 ± 0,62 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sc</i> LAGMV2	3,16 ± 0,02 ^B	0,4 ± 0,01 ^A	0,13 ± 0,00 ^B	7,99 ± 0,03 ^A	0,00 ± 0,62 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sc</i> MBELGA62	2,54 ± 0,02 ^G	0,3 ± 0,01 ^{CD}	0,06 ± 0,00 ^I	6,48 ± 0,04 ^E	0,00 ± 0,71 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Pk</i> MBELGA61	0,77 ± 0,02 ^H	0,1 ± 0,01 ^H	0,04 ± 0,00 ^J	1,19 ± 0,04 ^G	0,00 ± 0,66 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sp</i> SAFS235	2,7 ± 0,02 ^E	0,4 ± 0,00 ^A	0,07 ± 0,00 ^H	7,7 ± 0,03 ^B	0,00 ± 0,51 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sc</i> SAFS234	2,48 ± 0,02 ^G	0,25 ± 0,01 ^{EF}	0,07 ± 0,00 ^{GH}	6,42 ± 0,03 ^E	0,00 ± 0,55 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sc</i> SAFS231	2,9 ± 0,02 ^C	0,36 ± 0,01 ^B	0,09 ± 0,00 ^{DE}	7,31 ± 0,03 ^C	0,00 ± 0,62 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sc</i> SAFABB1	3,49 ± 0,01 ^A	0,28 ± 0,00 ^{DE}	0,14 ± 0,00 ^A	8,03 ± 0,02 ^A	0,00 ± 0,38 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
<i>Sc</i> SAFABB3	2,54 ± 0,02 ^G	0,24 ± 0,00 ^F	0,08 ± 0,00 ^{FG}	6,58 ± 0,03 ^E	0,00 ± 0,53 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
Control T-58*	2,81 ± 0,02 ^{CD}	0,33 ± 0,01 ^{BC}	0,08 ± 0,00 ^{EF}	7,05 ± 0,04 ^D	0,00 ± 0,71 ^C	0,00 ± 0,00 ^D
Mosto 17,0 °Bx no fermentado	0,17 ± 0,04 ^{IJ}	0,07 ± 0,01 ^H	0,03 ± 0,00 ^K	0,00 ± 0,07 ^I	15,22 ± 1,24 ^A	4,46 ± 0,00 ^B

Sc: *S. cerevisiae*. *Sp*: *S. pastorianus*. *Mg*: *M. guilliermondii*. *Pk*: *P. kudriavzevii*. *Safbrew T-58, starter comercial liofilizado, Fermentis (Francia). Micro-fermentaciones realizadas a 20 °C en 70,0 mL de mosto elaborado en laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,2. Los resultados se expresan como el promedio de las medidas realizadas sobre 3 fermentaciones por cada cepa ± la desviación estándar. Cada producto de fermentación se midió por duplicado en HPLC. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa (P < 0,05) entre los valores de una misma columna.

En principio, se determinó que todas las cepas sacaromycéticas del panel estudiado, así como la levadura no convencional *P. kudriavzevii* MBELGA61, lograron consumir por completo la glucosa y fructosa presentes en el mosto cervecero inicial (Tabla 8). Las levaduras no convencionales *M. guilliermondii* fueron las únicas cuyos sobrenadantes de cultivo en mosto registraron concentraciones de azúcares superiores a cero.

Los resultados del análisis HPLC del contenido de glucosa y fructosa de los productos de fermentación se representan en la figura 35.

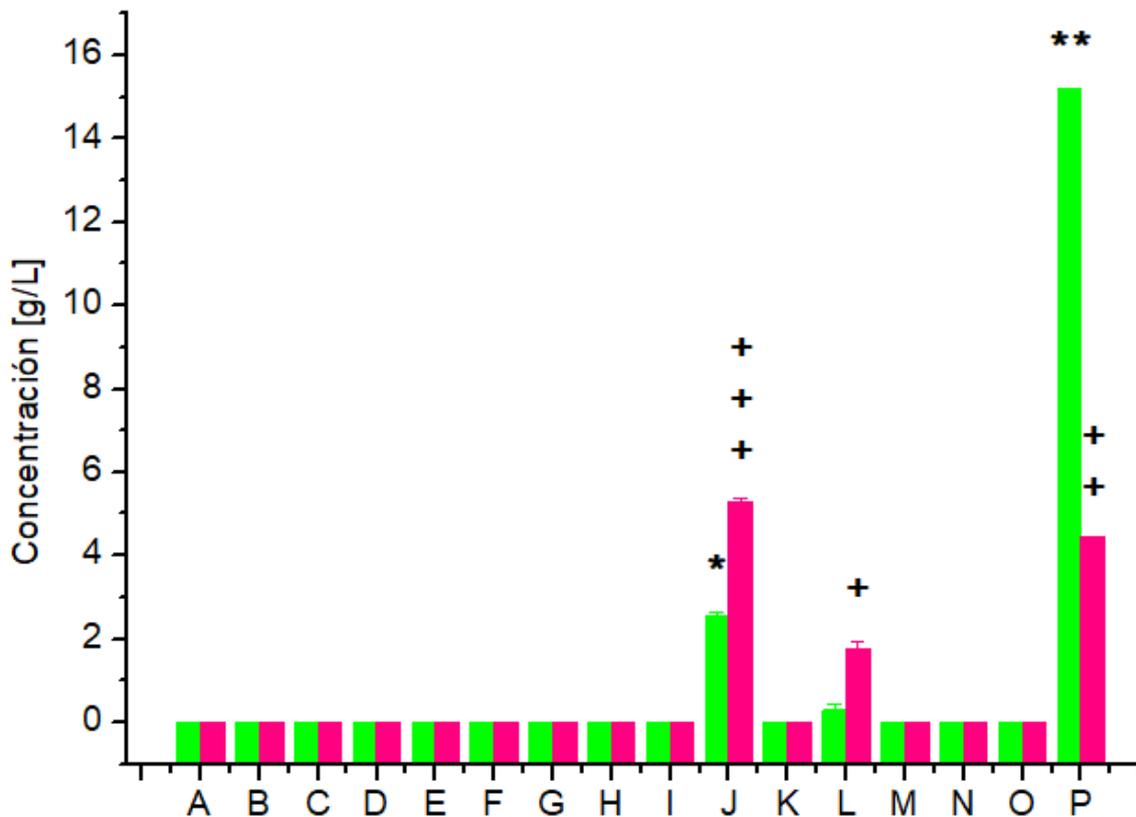


Fig. 35. Azúcares disueltos en el mosto fermentado. Las barras son el promedio del triplicado de cada tratamiento, y las barras de error representan la desviación estándar de estos triplicados. Las barras no signadas corresponden al valor 0 g/L, y barras con símbolos (*,+) indican diferencia significativa ($P < 0,05$) con el valor 0 g/L, y barras con distintos símbolos presentan diferencia significativa entre sí. **A:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **B:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **C:** *S. cerevisiae* SAFS231. **D:** *S. cerevisiae* SAFA234. **E:** *S. pastorianus* SAFS235. **F:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **G:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **H:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **I:** *P. kudriavzevii* MBELGA61. **J:** *M. guilliermondii* MLA12. **K:** *S. cerevisiae* MUS121. **L:** *M. guilliermondii* MUS122. **M:** *S. cerevisiae* MUS123. **N:** *S. cerevisiae* MUS124. **O:** Control positivo Safbrew T-58. **P:** mosto no fermentado. ■ Glucosa [g/L]. ■ Fructosa [g/L].

Los comportamientos observados entre las levaduras no atenuantes fueron muy diferentes. *M. guilliermondii* MUS122 logró reducir la glucosa y la fructosa a valores de concentración significativamente inferiores a los valores registrados en el mosto no fermentado ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 35, L), aunque no logró atenuarlo por completo. Por otro lado, al analizar las réplicas de las micro-fermentaciones de *M. guilliermondii* MLA12, se registró un consumo de glucosa promedio fue significativamente inferior al consumo determinado en el caso de *M. guilliermondii* MUS122 ($P < 0,05$, Tabla 8). En cuanto a la fructosa, en el producto de fermentación de *M. guilliermondii* MLA12 se determinó un aumento significativo respecto del mosto no fermentado ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 35, J). Es decir, esta cepa no es capaz de consumir fructosa, y aquella fructosa que se produce por desdoblamiento de azúcares más complejos presentes en el mosto, se acumulan en el producto de micro-fermentación de *M. guilliermondii* MLA12.

Cabe destacar que en la mayoría de los cromatogramas se detectaron dos picos no identificados que, de acuerdo a la cantidad de carbonos estimada, posiblemente correspondan a maltotriosas u otras dextrinas de mayor número de unidades de glucosa (no determinado).

En general, se concluyó que todas las cepas sacaromycéticas estudiadas y *P. kudriavzevii* MBELGA61, atenúan adecuadamente el mosto cervecero.

Respecto a los metabolitos solubles analizados, los valores registrados en la Tabla 8 se representan en la figura 36.

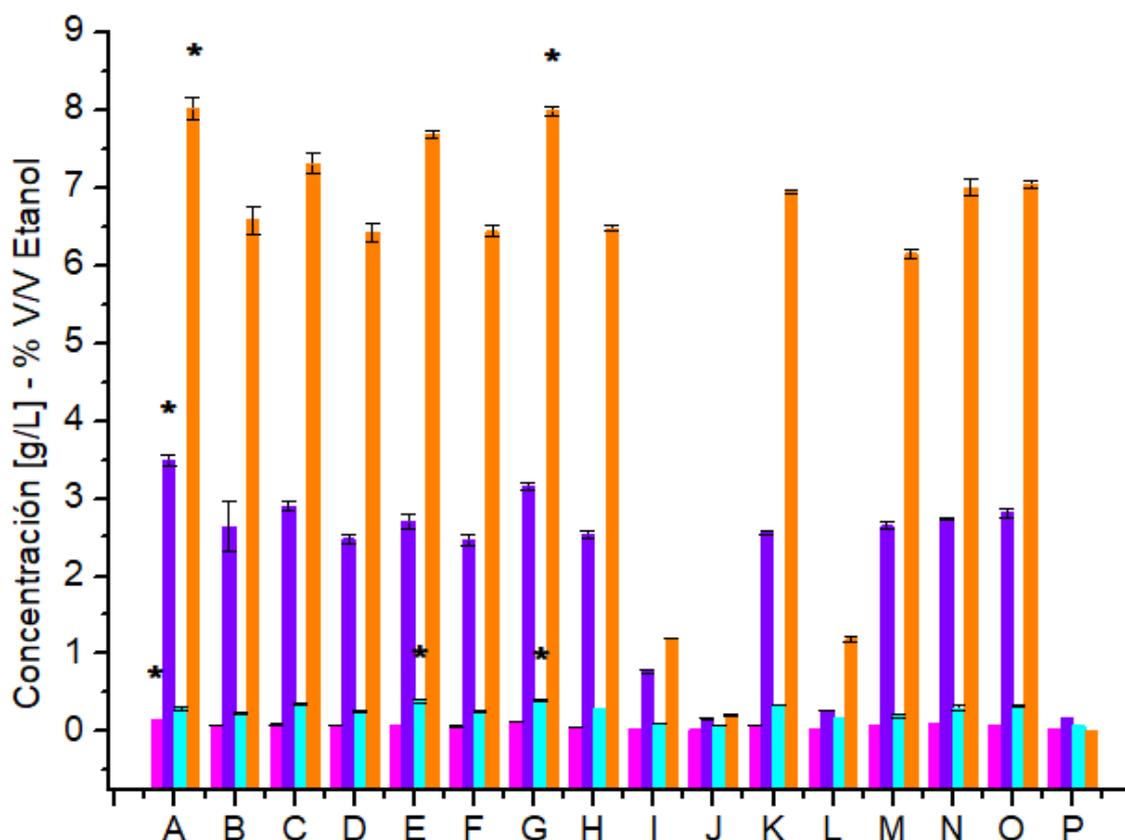


Fig. 36. Productos metabólicos de la fermentación del mosto cervecero. Las barras son el promedio del triplicado de cada tratamiento, y las barras de error representan la desviación estándar de estos triplicados. Se señalan con el símbolo (*) los valores significativamente mayores ($P < 0,05$) de cada producto medido. **A:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **B:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **C:** *S. cerevisiae* SAFS231. **D:** *S. cerevisiae* SAFA234. **E:** *S. pastorianus* SAFS235. **F:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **G:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **H:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **I:** *P. kudriavzevii* MBELGA61. **J:** *M. guilliermondii* MLA12. **K:** *S. cerevisiae* MUS121. **L:** *M. guilliermondii* MUS122. **M:** *S. cerevisiae* MUS123. **N:** *S. cerevisiae* MUS124. **O:** Control positivo Safbrew T-58. **P:** mosto no fermentado. ■ Eritritol [g/L]. ■ Glicerol [g/L]. ■ 2,3-butanediol [g/L]. ■ Etanol [% V/V].

Al realizar un análisis comparativo de todo el panel, destacaron las cepas *S. cerevisiae* SAFABB1, *S. cerevisiae* LAGMV2 y *S. pastorianus* SAFS235. *S. cerevisiae* SAFABB1

(Fig. 36, A) produjo cantidades significativamente superiores de etanol, glicerol y eritritol a las producidas por las restantes levaduras estudiadas ($P < 0,05$, Tabla 8). La cepa *S. cerevisiae* LAGMV2 (Fig. 36, G), produjo cantidades significativamente superiores de etanol y 2,3-butanediol, siendo su producción de etanol similar a la registrada por *S. cerevisiae* SAFABB1 ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig.36). Por último, *S. pastorianus* SAFS235 (Fig. 36, E) produjo la concentración más elevada de 2,3-butanediol, similar a la producida por *S. cerevisiae* LAGMV2 ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 36).

A continuación, se analizará cada metabolito tomando como referencia el control positivo de fermentación, el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis). La figura 37 representa el contenido de etanol determinado por HPLC en los productos de fermentación del mosto cervecero.

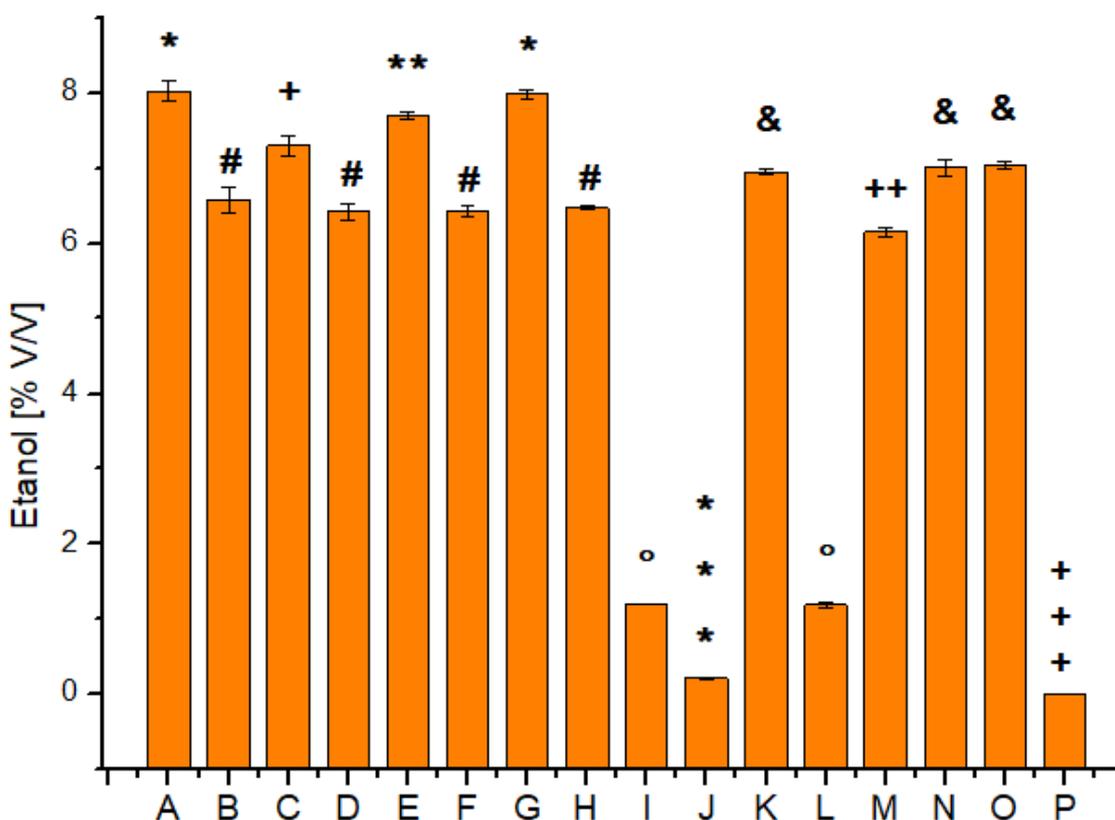


Fig. 37. Etanol medido [% V/V] en los productos de la fermentación del mosto cervecero. Las barras son el promedio del triplicado de cada tratamiento, y las barras de error representan la desviación estándar de estos triplicados. Barras con símbolos diferentes (*,+,#,&°,°) representan valores significativamente distintos ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **B:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **C:** *S. cerevisiae* SAFS231. **D:** *S. cerevisiae* SAFA234. **E:** *S. pastorianus* SAFS235. **F:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **G:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **H:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **I:** *P. kudriavzevii* MBELGA61. **J:** *M. guilliermondii* MLA12. **K:** *S. cerevisiae* MUS121. **L:** *M. guilliermondii* MUS122. **M:** *S. cerevisiae* MUS123. **N:** *S. cerevisiae* MUS124. **O:** Control positivo Safbrew T-58. **P:** mosto no fermentado.

Todos los productos de fermentación presentaron contenidos de etanol significativamente superiores al contenido del mosto no fermentado (Fig. 37, P), por lo que todas las levaduras del panel producen etanol en diferentes medidas (Tabla 8, Fig. 37).

Las cepas sacaromícéticas produjeron etanol en cantidades significativamente superiores respecto de las levaduras no convencionales estudiadas ($P < 0,05$). Como se mencionó, *S. cerevisiae* SAFABB1 (8,03% V/V) y *S. cerevisiae* LAGMV2 (7,99% V/V) fueron las mayores productoras de etanol, seguidas por *S. pastorianus* SAFS235, que produjo este metabolito en cantidades significativamente inferiores a las mencionadas cepas *S. cerevisiae*, pero aún elevadas (7,7% V/V) (Tabla 8). *S. cerevisiae* SAFS231 (7,31% V/V) también produjo etanol en cantidades más elevadas que el control positivo, pero significativamente menores a las producidas por las anteriores ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 37).

Las cepas *S. cerevisiae* MUS121 (6,95% V/V) y *S. cerevisiae* MUS124 (7,01% V/V) produjeron etanol en cantidades similares al control positivo (7,05% V/V) ($P < 0,05$), mientras que las demás cepas sacaromícéticas estudiadas generaron cantidades de etanol significativamente inferiores que el control ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 37).

Entre las levaduras no convencionales estudiadas, *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *M. guilliermondii* MUS122 produjeron cantidades de etanol similares (1,19% V/V) y significativamente mayores que *M. guilliermondii* MLA12 (0,21% V/V) ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 37). Estos resultados son coherentes con lo esperado de acuerdo a la bibliografía, que reporta que las levaduras no convencionales en general no aportan etanol a la cerveza elaborada, sino otros compuestos de sabor y aroma.

Entre tales compuestos se encuentra el glicerol. Este metabolito fue producido en cantidades significativamente superiores al control positivo (2,8 g/L) por las cepas *S. cerevisiae* LAGMV2 (3,16 g/L) y *S. cerevisiae* SAFABB1 (3,49 g/L) ($P < 0,05$, Tabla 8). Estas mismas levaduras presentaron los niveles más elevados de etanol en sus productos de fermentación. Si bien la síntesis de más glicerol puede indicar una menor proporción de la fuente de carbono dirigida a la producción de etanol vía formación de piruvato (Zhao y col., 2015), en este caso puede interpretarse que el flujo de carbono fue en general más elevado a través de ambas vías metabólicas, aumentando la producción tanto de etanol como de glicerol. Estos resultados podrían indicar que *S. cerevisiae* LAGMV2 y *S. cerevisiae* SAFABB1 utilizaron sustratos como maltotriosas y dextrinas, presentes en el mosto cervecero, que no todas las levaduras cerveceras tienen la habilidad de metabolizar.

Las concentraciones de glicerol determinadas se grafican en la figura 38.

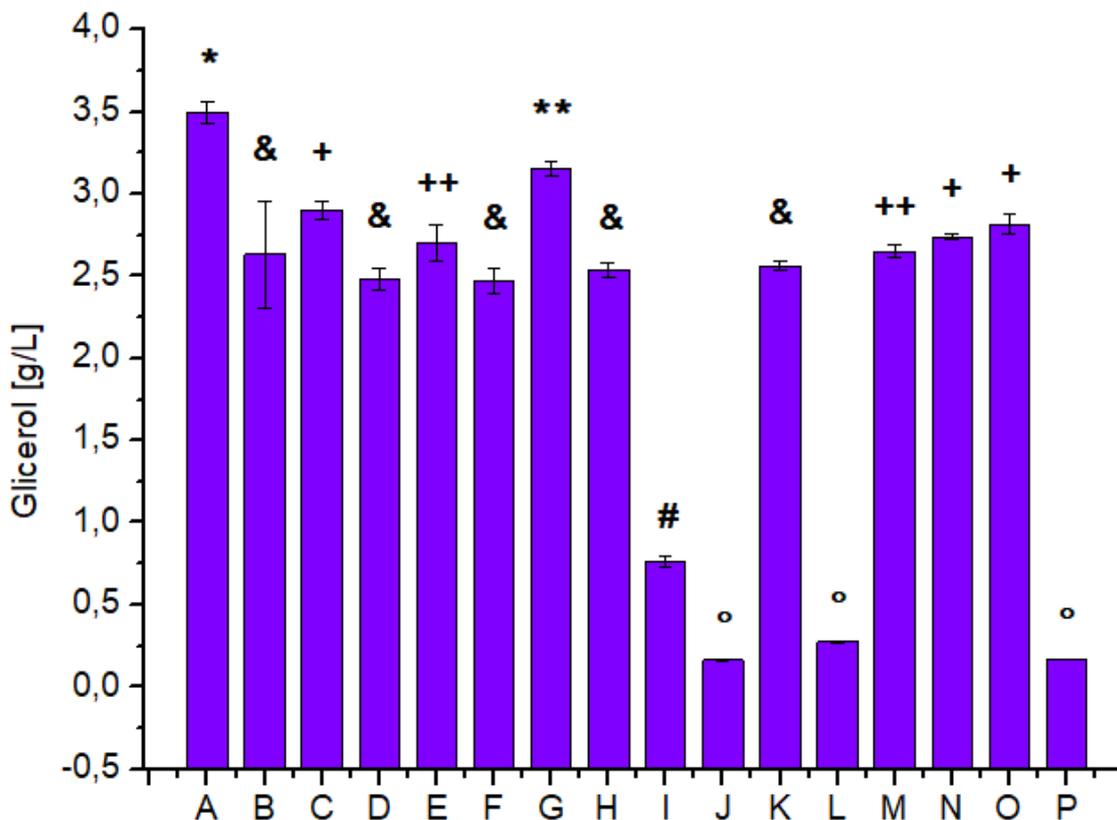


Fig. 38. Glicerol medido [g/L] en los productos de la fermentación del mosto cervecero. Las barras son el promedio del triplicado de cada tratamiento, y las barras de error representan la desviación estándar de estos triplicados. Barras con símbolos diferentes (*,+,#,&°,°) representan valores significativamente distintos ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **B:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **C:** *S. cerevisiae* SAFS231. **D:** *S. cerevisiae* SAFA234. **E:** *S. pastorianus* SAFS235. **F:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **G:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **H:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **I:** *P. kudriavzevii* MBELGA61. **J:** *M. guilliermondii* MLA12. **K:** *S. cerevisiae* MUS121. **L:** *M. guilliermondii* MUS122. **M:** *S. cerevisiae* MUS123. **N:** *S. cerevisiae* MUS124. **O:** Control positivo Safbrew T-58. **P:** mosto no fermentado.

Las únicas cepas que produjeron niveles similares de glicerol que el control fueron *S. cerevisiae* MUS124 (2,74 g/L) y *S. cerevisiae* SAFS231 (2,9 g/L) ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 38). Entre las levaduras no convencionales, las *M. guilliermondii* no produjeron cantidades detectables de este metabolito. Únicamente *P. kudriavzevii* MBELGA61 generó glicerol (0,77 g/L), aunque en cantidades significativamente menores a las producidas por las levaduras sacaromycéticas ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 38).

Otro de los metabolitos analizados fue el 2,3-butanediol. Un aumento del 2,3-butanediol, respecto de su contenido en el mosto no fermentado, se vincula a la reducción enzimática durante la fase estacionaria del volátil diacetilo, compuesto considerado *off flavor* (White y Zainasheff, 2010). Los resultados de su determinación por HPLC en los productos de fermentación se representan en la figura 39.

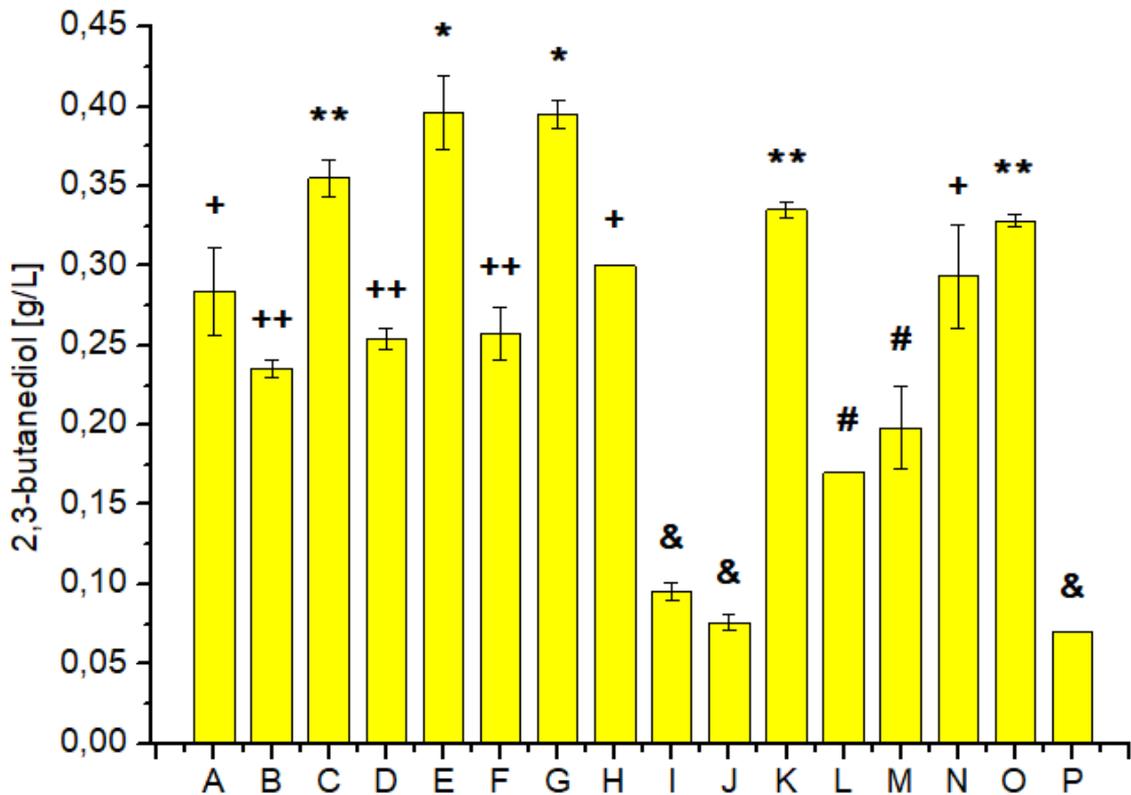


Fig. 39. 2,3-butanediol medido [g/L] en los productos de la fermentación del mosto cervecero. Las barras son el promedio del triplicado de cada tratamiento, y las barras de error representan la desviación estándar de estos triplicados. Barras con símbolos diferentes (*,+,#,&) representan valores significativamente distintos ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **B:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **C:** *S. cerevisiae* SAFS231. **D:** *S. cerevisiae* SAFA234. **E:** *S. pastorianus* SAFS235. **F:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **G:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **H:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **I:** *P. kudriavzevii* MBELGA61. **J:** *M. guilliermondii* MLA12. **K:** *S. cerevisiae* MUS121. **L:** *M. guilliermondii* MUS122. **M:** *S. cerevisiae* MUS123. **N:** *S. cerevisiae* MUS124. **O:** Control positivo Safbrew T-58. **P:** mosto no fermentado.

Dentro del panel de levaduras estudiado, las cepas *S. pastorianus* SAFS235 y *S. cerevisiae* LAGMV2, de comportamientos fermentativos muy similares, con fases de latencia prolongadas y velocidades de fermentación reducidas respecto del control Safbrew T-58, fueron las que presentaron una producción significativamente mayor de este alcohol (0,4 g/L) ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 39). Luego, el *starter* control (0,33 g/L), *S. cerevisiae* SAFS231 (0,36 g/L), *S. cerevisiae* MUS121 (0,34 g/L) y *S. cerevisiae* MBELGA62 (0,3 g/L) produjeron cantidades de 2,3-butanediol similares ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 39).

Las restantes levaduras sacromicéticas del panel produjeron 2,3-butanediol, pero en cantidades significativamente inferiores a la generada por el control. Entre las levaduras no convencionales, sólo *M. guilliermondii* MUS122 produjo cantidades significativamente superiores al contenido de 2,3-butanediol del mosto no fermentado ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 39).

Por último, se analizó el contenido de eritritol de los productos fermentados. El eritritol es un alcohol de cuatro carbonos, edulcorante natural extensamente utilizado en la industria alimentaria y farmacéutica, producido por microorganismos osmo-resistentes al fermentar la sacarosa (Yang y col., 2014). Las cantidades detectadas por HPLC se representan en la figura 40.

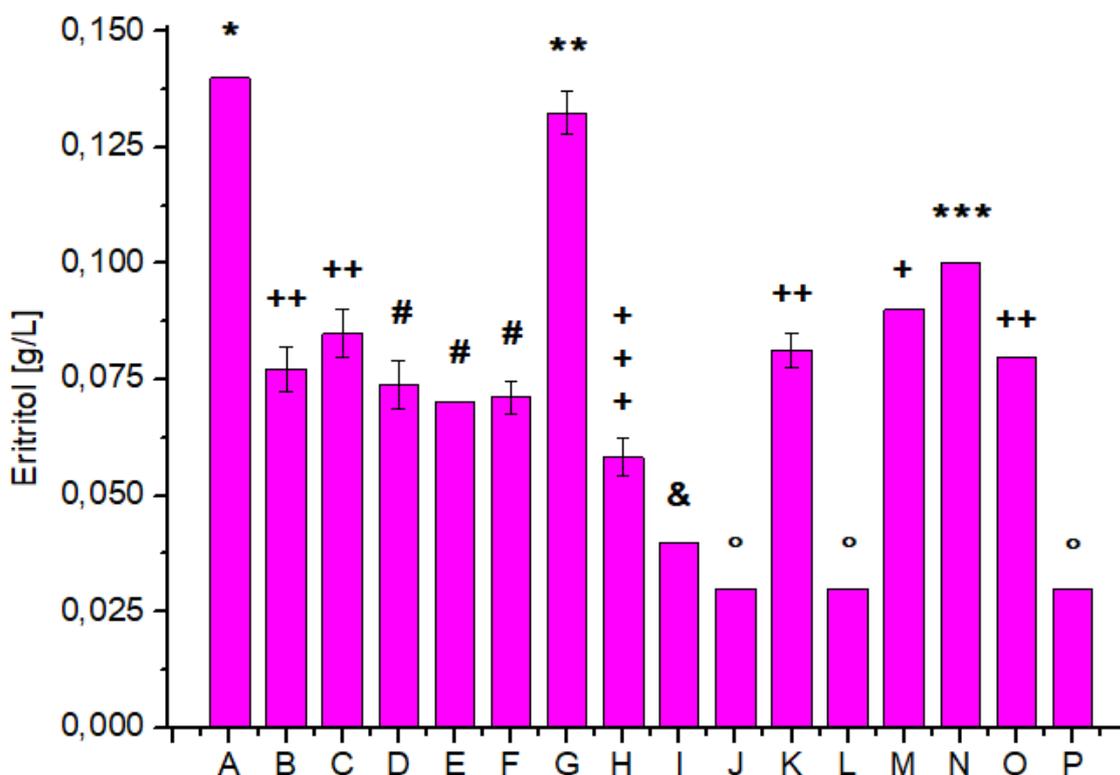


Fig. 40. Eritritol medido [g/L] en los productos de la fermentación del mosto cervecero. Las barras son el promedio del triplicado de cada tratamiento, y las barras de error representan la desviación estándar de estos triplicados. Barras con símbolos diferentes (*,+,#,&,°) representan valores significativamente distintos ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* SAFABB1. **B:** *S. cerevisiae* SAFABB3. **C:** *S. cerevisiae* SAFS231. **D:** *S. cerevisiae* SAFA234. **E:** *S. pastorianus* SAFS235. **F:** *S. cerevisiae* LAGMV1. **G:** *S. cerevisiae* LAGMV2. **H:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **I:** *P. kudriavzevii* MBELGA61. **J:** *M. guilliermondii* MLA12. **K:** *S. cerevisiae* MUS121. **L:** *M. guilliermondii* MUS122. **M:** *S. cerevisiae* MUS123. **N:** *S. cerevisiae* MUS124. **O:** Control positivo Safbrew T-58. **P:** mosto no fermentado.

La producción de eritritol de las cepas *S. cerevisiae* MUS123, *S. cerevisiae* MUS124, *S. cerevisiae* SAFABB1 (0,14 g/L) y *S. cerevisiae* LAGMV2 (0,13 g/L) superó significativamente a la del control (0,08 g/L) ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 40). Las cepas *S. cerevisiae* SAFS231, *S. cerevisiae* SAFABB3 y *S. cerevisiae* MUS121 produjeron cantidades de eritritol comparables con el mismo ($P < 0,05$, Tabla 8).

La cepa *S. pastorianus* SAFS235 presentó una producción (0,07 g/L) significativamente inferior a la del control, diferenciándose en este aspecto de la cepa

S. cerevisiae LAGV2, a cuyo comportamiento fermentativo se asimila en todos los aspectos previamente analizados ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 40).

Entre las levaduras no convencionales estudiadas, únicamente *P. kudriavzevii* MBELGA61 generó eritritol, aunque en cantidades significativamente inferiores a las producidas por las cepas sacaromícéticas ($P < 0,05$, Tabla 8, Fig. 40). Las levaduras *M. guilliermondii* no generaron una cantidad detectable del metabolito.

A partir del análisis de las fermentaciones realizadas por cepas distintas aisladas a partir de una misma muestra, ya fuere *starter* comercial o lodo de levaduras cerveceras artesanal, pudieron confirmarse diferencias significativas en los comportamientos fermentativos de dichas cepas y en los metabolitos solubles presentes en sus productos de fermentación del mosto cervecero.

Además, pudieron confirmarse diferencias en las concentraciones de metabolitos presentes en el mosto fermentado por levaduras aisladas de diferentes muestras cerveceras que comparten un mismo perfil mitocondrial. *S. cerevisiae* MUS123 produjo niveles significativamente superiores de glicerol y eritritol que la levadura con idéntico perfil mitocondrial *S. cerevisiae* SAFS234, mientras que esta última produjo cantidades significativamente superiores de 2,3-butanediol y de etanol que la primera ($P < 0,05$, Tabla 8). Otro par de levaduras que comparten perfil mitocondrial, *S. cerevisiae* MUS121 y *S. cerevisiae* MBELGA62, se diferenciaron en la composición de su producto fermentado, presentando *S. cerevisiae* MBELGA62 niveles significativamente menores de 2,3-butanediol, eritritol y etanol que *S. cerevisiae* MUS121 ($P < 0,05$, Tabla 8). Por último, al analizar los metabolitos solubles presentes en los productos de fermentación de *S. cerevisiae* MUS124 y *S. cerevisiae* LAGMV2, se confirmó una producción significativamente inferior de todos los metabolitos estudiados por parte de *S. cerevisiae* MUS124 ($P < 0,05$, Tabla 8).

A modo de resumen, a continuación se presenta un cuadro que reúne las características del proceso fermentativo llevado a cabo por levaduras aisladas a partir de diferentes fuentes que comparten un mismo perfil mitocondrial (*sección 4.4.3*) y de su producto fermentado.

Cepa^α (definida según perfil ADNmt-RFLP)	Fuente de aislamiento	Parámetros fermentativos^β	Análisis HPLC del producto de fermentación
<i>S. cerevisiae</i> MBELGA62 (MUS121 , SAFS331^δ , SAFT581^δ)	Lodo artesanal M6 Lodo artesanal M12 Safbrew S-33 (Fermentis) Safbrew T-58 (Fermentis)	MBELGA62 presentó una velocidad de fermentación significativamente superior. MUS121 presentó la mayor capacidad fermentativa ^μ .	MUS121 produjo cantidades significativamente superiores de etanol, 2,3-butanediol y eritritol.
<i>S. cerevisiae</i> MUS124 (LAGMV2 , MTEMPLA41^δ)	Lodo artesanal M12 Lodo artesanal LAGMV Lodo artesanal M4	MUS124 exhibió la mayor velocidad de fermentación. LAGMV2 presentó una fase de latencia más prolongada y una capacidad fermentativa superior ^μ .	LAGMV2, la levadura de fermentación más lenta entre las <i>S. cerevisiae</i> , produjo cantidades significativamente mayores de etanol, glicerol, 2,3-butanediol y eritritol que MUS124.
<i>S. cerevisiae</i> SAFS234 (MUS123)	Saflager S-23 (Fermentis) Lodo artesanal M12	SAFS234 presentó una fase de latencia más prolongada.	Entre ambas, MUS123 produjo más glicerol y eritritol y SAFS234 produjo significativamente más etanol y 2,3-butanediol

^αEntre paréntesis se indican los nombres de levaduras aisladas de otras fuentes que comparten el mismo perfil mitocondrial (sección 4.4.3) con la cepa consignada, es decir, se trata de la misma cepa aislada a partir de diferentes muestras. ^βCalculados a partir de micro-fermentaciones de mosto cervecero llevadas a cabo como se describe en la sección 4.4.6, A. ^δSe estudió el perfil mitocondrial de este aislamiento pero no sus cinéticas de crecimiento en diferentes sustratos. ^μAsociada a la pérdida de peso lograda por fermentación del mosto en etanol y CO₂. El análisis de la varianza para determinar diferencias significativas entre los parámetros que se describen en el cuadro se realizó con P < 0,05.

A partir de los estudios realizados, es posible afirmar que levaduras cuyos perfiles de digestión del ADNmt las clasifican como cepas idénticas, realizan fermentaciones significativamente diferentes. Recuperando las interpelaciones suscitadas luego del análisis de las cinéticas de crecimiento (sección 4.4.5), se postula que para identificar y caracterizar a una cepa de levadura cervecera deben estudiarse tanto su genética como su capacidad de fermentar el mosto de cebada y las características del producto de su fermentación.

Respecto a la producción de etanol, cuatro de las levaduras estudiadas, *S. pastorianus* SAFS235, *S. cerevisiae* SAFS231, *S. cerevisiae* LAGMV2 y *S. cerevisiae* SAFABB1, superaron de forma significativa el nivel de etanol alcanzado por el *starter* control (Tabla 8), por lo que se las califica como las cepas con mayor capacidad de realizar fermentación cervecera. Además, *S. cerevisiae* SAFS231 produjo niveles de glicerol, 2,3-butanediol y eritritol comparables a los niveles producidos por el control Safbrew T-58, mientras que *S. pastorianus* SAFS235 y *S. cerevisiae* LAGMV2 lo superaron en producción de 2,3-butanediol y *S. cerevisiae* SAFABB1 lo hizo en la producción de glicerol y eritritol (P < 0,05, Tabla 8, Fig. 36).

Además, al contemplar los parámetros cinéticos de fermentación exhibidos por el panel de levaduras (Tabla 7), las cepas *S. cerevisiae* LAGMV1 y *S. cerevisiae* SAFS231 fueron mejores fermentadoras que el *starter* control, logrando una mayor pérdida de peso, mayor velocidad de fermentación y, en el caso de *S. cerevisiae* SAFS231, un tiempo de latencia menos prolongado que el control ($P < 0,05$, Tabla 7). *S. cerevisiae* MUS124 y *S. cerevisiae* MUS121, ambas aisladas del lodo cervecero artesanal M12, presentaron mayor pérdida de peso que el control, reflejo de una mayor capacidad fermentativa del mosto, pero una velocidad menor de fermentación, que podría ocasionar producción de sabores y aromas *off-flavors* (Tabla 7). En cuanto a los metabolitos solubles analizados, no se observaron diferencias significativas con el control (Tabla 8). A partir de este análisis, *S. cerevisiae* LAGMV1 se incluye entre las cepas de interés para la producción de cerveza, y *S. cerevisiae* MUS124 y *S. cerevisiae* MUS121 podrían considerarse como levaduras seleccionables, a condición de estudiar los metabolitos volátiles de sus productos de fermentación.

Si bien no pudo analizarse por HPLC el contenido de maltotriosas y otras dextrinas en los productos de fermentación, sí pudo determinarse en cinéticas de crecimiento en caldo YNB suplementado con maltotriosa (*sección 4.4.5*) la capacidad de *S. cerevisiae* MBELGA62 de utilizar y crecer en maltotriosa (Fig. 25). Esta característica resulta de mayor interés para la elaboración de cerveza, ya que esta levadura podría lograr una mejor atenuación del mosto de cebada. Adicionalmente, *S. cerevisiae* MBELGA62 no estuvo entre las levaduras con mayor producción de los compuestos edulcorantes glicerol y eritritol (Tabla 8), por lo que podría seleccionarse como cepa especial para la producción de estilos de cerveza secos, refrescantes, no maltosos.

Del mismo modo, se comprobó la capacidad de la levadura no convencional *M. guilliermondii* MUS122 de crecer en maltotriosa. Si bien esta levadura no fermenta el mosto cervecero, en combinación con cepas *Saccharomyces* sp. podría constituir *starters* cerveceros o esquemas de fermentación mixta que logren atenuación y otorguen características novedosas en cuanto sabor y aroma a la cerveza producida. La levadura no produjo cantidades de glicerol o eritritol detectables, por lo que tiene potencial para ser empleada en la producción de cervezas secas y refrescantes. Además, produjo 2,3-butanediol, por lo que podría aportar al acondicionamiento de la cerveza en las etapas finales de elaboración. Sería oportuno realizar un estudio de los metabolitos volátiles del producto de fermentación de *M. guilliermondii* MUS122 para profundizar en el conocimiento de su perfil organoléptico.

Asimismo, es de interés estudiar el perfil de compuestos volátiles de *P. kudriavzevii* MBELGA61. Capaz de adaptarse velozmente al mosto cervecero, pero no de fermentarlo, esta levadura consume los azúcares presentes a gran velocidad, produce

cierta cantidad de etanol, glicerol y eritritol (Tabla 8) y podría ser una especie no sacaromícetica interesante en la producción de sabores y aromas.

4.4.7 Micro-fermentaciones. Estudio de cinéticas y de los productos de fermentación del mosto de cebada por levaduras aisladas de kefir de agua

Las levaduras aisladas de kefir de agua presentaron un único patrón de bandas resultante de la digestión de su ADN mitocondrial, diferente de aquellos determinados en levaduras cerveceras (sección 4.4.3). El hallazgo de un único perfil mitocondrial dentro de una población tan específica, sugiere que todos los aislamientos de kefir de agua corresponden a una única cepa *S. cerevisiae*. Sería conveniente contrastar dicha hipótesis mediante técnicas moleculares complementarias, como se mencionó previamente. Dado el alcance del presente estudio, se asumió que las levaduras sacaromícéticas aisladas de kefir son la misma cepa y se seleccionó al aislamiento *S. cerevisiae* CMUNLPKa131 como representante del conjunto.

Para evaluar la capacidad de las levaduras de kefir de agua de fermentar el mosto de cebada malteada, se utilizaron *S. cerevisiae* CMUNLPKa131 y la levadura *S. cerevisiae* CMUNLPKa23, también aislada de kefir de agua, que comprobó carecer de mitocondrias (sección 4.4.3). Esta última posee la particularidad de ser una cepa fermentadora obligada. Las curvas obtenidas se grafican en la figura 41.

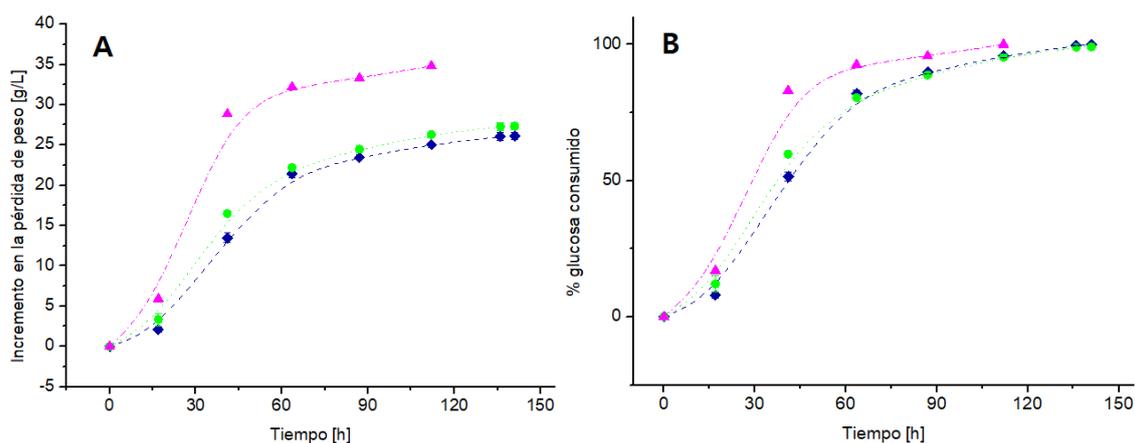


Fig. 41. Micro-fermentaciones. **A.** Curvas de incremento de peso perdido [g] en el tiempo [h]. **B.** Curvas ajustadas al porcentaje de azúcares consumidos en el tiempo [h]. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento. Las barras de error representan la desviación estándar de los triplicados. Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto cervicero formulado en el laboratorio de 11,0 °Bx y pH 4,6 ± 0,05 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis, Francia). ◆ *S. cerevisiae* MUS123. ● *S. cerevisiae* CMUNLPKa131. ▲ Control positivo de fermentación.

Las levaduras *S. cerevisiae* de kefir de agua fueron estudiadas en un mosto de 11,0 °Bx y pH 4,60 ± 0,05, condiciones de menor estrés osmótico que las utilizadas en la micro-fermentaciones con levaduras cerveceras, con el objetivo de facilitar su adaptación a un ambiente fermentativo que no es el propio.

Estas levaduras exhibieron comportamientos fermentativos muy similares entre sí (Fig. 41). Al compararlas con la *performance* del control, el *starter* comercial Safbrew T-58, se observó una pérdida de peso acumulado sustancialmente menor, una velocidad de fermentación reducida y un aumento significativo en el tiempo de latencia de las cepas aisladas de kefir (Fig. 41A). La reducción en la pérdida de peso acumulada observada en las levaduras de kefir respecto del control, sugieren el desarrollo de metabolismos alternativos a la fermentación etanólica. Ambas fueron capaces de atenuar el mosto cervecero hasta un contenido de glucosa nulo, con conversión a CO₂ (Fig. 41B). De acuerdo a las cinéticas, *S. cerevisiae* de kefir consumieron glucosa a velocidades menores que la velocidad de consumo del control.

Los parámetros cinéticos calculados a partir de las curvas de fermentación del mosto cervecero se sintetizan en la Tabla 9.

Tabla 9. Parámetros cinéticos de fermentación de cepas aisladas de kefir de agua

Micro-fermentación*	Máxima pérdida de peso [g/L]	Velocidad exponencial [g/L.h]	Tiempo de latencia [h]
CMUNLPKa23**	25,74 ± 0,4 ^A	0,42 ± 0,01 ^A	10,9 ± 0,8 ^A
CMUNLPKa131***	26,77 ± 0,41 ^A	0,55 ± 0,04 ^B	10,8 ± 1,8 ^A
Control positivo[†]	33,75 ± 1,01 ^B	0,96 ± 0,03 ^C	10,8 ± 0,9 ^A

*Llevadas a cabo en mosto cervecero de 11,0 °Bx y pH 4,6, en volumen de 70 mL a 20 °C y en agitación (140 rpm). **Cepa *S. cerevisiae* aislada de kefir de agua que carece de mitocondrias. ***Cepa *S. cerevisiae* aislada de kefir de agua con perfil mitocondrial idéntico al hallado en otros aislamientos obtenidos de kefir de agua. [†]*Starter* comercial Safbrew T-58, Fermentis (Francia).

En coincidencia con lo observado en las curvas de fermentación, el peso perdido acumulado del control positivo resultó ser significativamente superior al peso perdido acumulado por las levaduras aisladas de kefir. Los tiempos de latencia no presentaron diferencia con el control ($P < 0,05$, Tabla 9, Fig. 41A).

Respecto a la velocidad de fermentación del mosto cervecero, ambos aislamientos de kefir de agua presentaron velocidades significativamente reducidas en comparación con la velocidad registrada por el control positivo ($P < 0,05$, Tabla 9, Fig. 41A). Entre ellos, *S. cerevisiae* CMUNLPKa131 mostró una velocidad de fermentación

significativamente superior a la velocidad exhibida por *S. cerevisiae* CMUNLPKa23, la levadura fermentadora obligada.

Los productos de fermentación de las levaduras aisladas de kefir fueron analizados por HPLC, y los resultados se sintetizan en la figura 42.

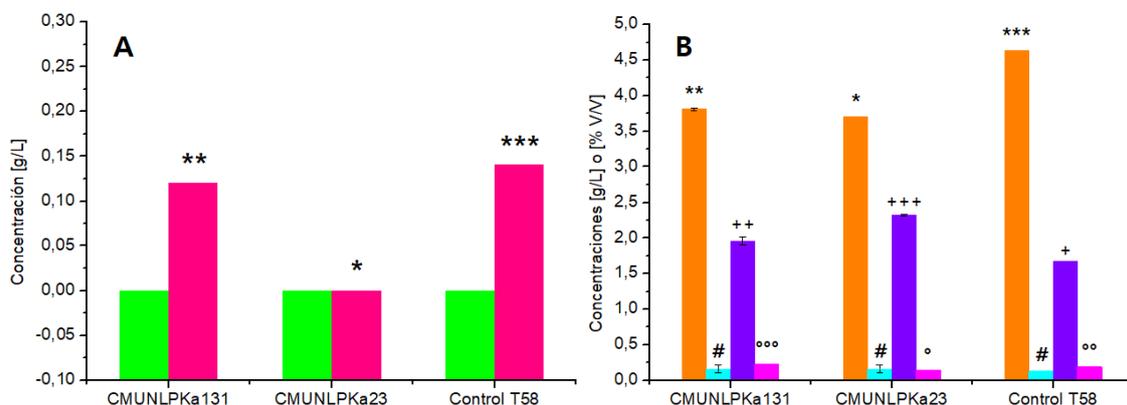


Fig. 42. Análisis HPLC de los productos de fermentación de levaduras aisladas de kefir de agua. Las barras son el promedio del triplicado de cada tratamiento, y las barras de error representan la desviación estándar de estos triplicados. Barras con símbolos idénticos (*,+,#,) representan valores sin diferencias significativas ($P < 0,05$). **CMUNLPKa131:** *S. cerevisiae* CMUNLPKa131. **CMUNLPKa23:** *S. cerevisiae* CMUNLPKa23. **Control T58:** control positivo *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis). **A.** Azúcares disueltos en el mosto fermentado: ■ Glucosa [g/L]. ■ Fructosa [g/L]. **B.** Productos metabólicos de la fermentación del mosto cervecero: ■ Eritritol [g/L]. ■ Glicerol [g/L]. ■ 2,3-butanediol [g/L]. ■ Etanol [% V/V].

El análisis de los productos fermentados permitió verificar el completo consumo de la glucosa presente en el mosto cervecero (Fig. 42A). Respecto al contenido de fructosa, únicamente *S. cerevisiae* CMUNLPKa23 logró reducirla a cero; *S. cerevisiae* CMUNLPKa131 redujo el contenido de fructosa a niveles significativamente inferiores a los que logró el control positivo ($P < 0,05$, Fig. 42A).

El análisis HPLC también confirmó una producción significativamente reducida de etanol por parte de las levaduras de kefir de agua al compararse con el control ($P < 0,05$, Fig. 42B), resultado esperado a partir de las cinéticas de fermentación exhibidas (Fig. 41A). La producción de glicerol superó significativamente a la producción del control, indicio del direccionamiento de la glucosa consumida a vías metabólicas alternativas a la fermentación etanólica, previsto por la reducción en la cantidad de CO_2 producido (Tabla 9).

Asimismo, es interesante la diferencia significativa observada en la producción de glicerol y etanol entre las *S. cerevisiae* de kefir de agua, que se diferencian en que CMUNLPKa23 no posee mitocondrias, mientras que CMUNLPKa131 sí las tiene; es decir, CMUNLPKa23 no es capaz de realizar metabolismo respiratorio, es fermentadora obligada. *S. cerevisiae* CMUNLPKa23 produjo mayores niveles de

glicerol, pero menos etanol que *S. cerevisiae* CMUNLPKa131 ($P < 0,05$, Fig. 42B). El CO_2 liberado (pérdida de peso) fue similar en ambos casos ($P < 0,05$) (Tabla 9, Fig. 41A). Aparentemente, la levadura fermentadora obligada utiliza con mayor frecuencia vías metabólicas alternativas a la fermentación etanólica que la levadura capaz de respirar.

S. cerevisiae CMUNLPKa131 superó significativamente al control en la producción de eritritol, mientras que *S. cerevisiae* CMUNLPKa23 produjo niveles significativamente inferiores a los registrados por el control ($P < 0,05$, Fig. 42B). La Tabla 10 resume los datos obtenidos a partir del análisis HPLC de los productos de fermentación del mosto cervecero.

Tabla 10. Análisis HPLC de los productos de fermentación de levaduras de kefir

Cepa CMUNLP	Glicerol [g/L]	2,3- butanediol [g/L]	Eritritol [g/L]	Etanol [% V/V]	Glucosa [g/L]	Fructosa [g/L]
Sc ka23	2,32 ± 0,01 ^A	0,16 ± 0,06 ^A	0,15 ± 0,00 ^C	3,70 ± 0,00 ^C	0,00 ± 0,00 ^A	0,00 ± 0,00 ^C
Sc 9B	1,96 ± 0,05 ^B	0,16 ± 0,06 ^A	0,23 ± 0,00 ^A	3,81 ± 0,02 ^B	0,00 ± 0,00 ^A	0,12 ± 0,00 ^B
Control T-58*	1,67 ± 0,01 ^C	0,13 ± 0,02 ^A	0,19 ± 0,00 ^B	4,63 ± 0,01 ^A	0,00 ± 0,00 ^A	0,14 ± 0,00 ^A

Sc: *S. cerevisiae*. *Safbrew T-58, *starter* comercial liofilizado, Fermentis (Francia). Micro-fermentaciones realizadas a 20 °C en 70,0 mL de mosto elaborado en laboratorio de OG 11,0 °Bx y pH 4,60 ± 0,05. Los resultados se expresan como el promedio de las medidas realizadas sobre 3 fermentaciones por cada cepa ± la desviación estándar. Cada producto de fermentación se midió por duplicado en HPLC. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores de una misma columna.

En principio, las cinéticas registradas por estas levaduras no son indicativas de características adecuadas para la producción de cerveza, ya que los tiempos prolongados de fermentación y la evidencia del direccionamiento de fuente de carbono hacia vías metabólicas distintas de la fermentación, son plausibles de asociarse a la producción de metabolitos *off flavors* (White y Zainasheff, 2010).

Luego del estudio de sus productos de fermentación, se confirmó un comportamiento fermentativo diferencial entre las levaduras de kefir de agua, que en ninguno de los casos se considera adecuado para la producción de cerveza. Como resultado del análisis, se decidió descartar la aproximación de emplear levaduras aisladas de kefir de agua para elaborar cerveza.

4.5 Conclusiones

- La técnica clásica de aislamiento de colonias morfológicamente diferentes permite la separación de cepas *Saccharomyces* sp. distintas.
- La técnica PCR-RFLP aplicada a determinados genes permite la detección de híbridos *Saccharomyces* sp. inter-específicos, así como la detección de introgresiones interespecie. Por esta técnica pudo determinarse que la cepa SAFS235 es un híbrido *S. cerevisiae*/ *S. eubayanus*, conocido como *S. pastorianus*. Además, se encontraron introgresiones del genoma de *S. paradoxus* en el genoma de *S. cerevisiae* en el gen UBP7 de las cepas LAGMV1, SAFABB3 y SAFS234.
- Los *starters* y lodos cerveceros frecuentemente se constituyen a partir de dos o más cepas de levadura.
- Las cepas aisladas a partir de un mismo *starter* o lodo presentan diferencias en su capacidad de crecer en diferentes sustratos, en su comportamiento fermentativo en mosto de cebada y en los metabolitos que producen durante la fermentación cervecera. Esto es coherente con la composición multi-cepa encontrada en las muestras cerveceras estudiadas; posiblemente el conjunto de levaduras actúe como un consorcio, donde cada una aporta diferentes propiedades para lograr una bebida de determinadas características (grado de atenuación, producción de etanol y CO₂, producción de compuestos de sabor y aroma, re-absorción y conversión de compuestos *off-flavors*).
- Entre las cepas cerveceras estudiadas, se seleccionó a *S. cerevisiae* SAFABB1, *S. cerevisiae* LAGMV2, *S. cerevisiae* SAFS231, *S. pastorianus* SAFS235, *S. cerevisiae* MBELGA62, *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *M. guilliermondii* MUS122 como levaduras interesantes con ventajas para la producción cervecera, vinculadas a su capacidad de fermentar el mosto y/o de producir sabores y aromas novedosos.
- En nichos que promueven el metabolismo fermentativo, como el kefir de agua, es posible encontrar levaduras *Saccharomyces* sp. mutantes incapaces de respirar. De acuerdo a la búsqueda bibliográfica realizada, no existen reportes previos del aislamiento de mutantes *Saccharomyces* sp. con deficiencia respiratoria a partir de kefir de agua.
- Las levaduras sacaromícéticas aisladas de kefir de agua de distintos orígenes comparten un mismo perfil mitocondrial, que es además diferente a todos los perfiles encontrados en levaduras cerveceras. Al estudiar una representante de este grupo en fermentaciones de mosto a escala laboratorio, se determinó que no es adecuada para la producción de cerveza.

- Levaduras identificadas como una misma cepa con criterio en un perfil mitocondrial común, presentaron comportamientos fermentativos sustancialmente diferentes; se postula que la identificación y diferenciación de cepas de levaduras cerveceras debe contemplar tanto los criterios genéticos como los criterios fenotípicos vinculados a su capacidad fermentativa y a las características sensoriales de sus productos de fermentación.

**Caracterización probiótica y selección
de cepas cerveceras de interés.
Caracterización *in vitro* de su capacidad de resistir
las condiciones del tracto gastrointestinal
y de antagonizar con *Salmonella enterica* var. Enteritidis
y *Escherichia coli***

**Caracterización probiótica y selección de cepas cerveceras de interés.
Caracterización *in vitro* de su capacidad de resistir las condiciones del tracto
gastrointestinal y de antagonizar con *Salmonella enterica* var. Enteritidis y
*Escherichia coli***

5.1 Introducción

Los antibióticos son el tratamiento más ampliamente utilizado contra patógenos como *Salmonella* y *E. coli* en la cría intensiva de pollos. Además de sus efectos preventivos y terapéuticos, los antibióticos actúan como promotores del crecimiento en pollos jóvenes (Engberg y col., 2000; Paradis y col., 2016). Sin embargo, debido al desarrollo y selección de bacterias patógenas resistentes a los antibióticos y a la posibilidad de que estas cepas sean zoonóticas, el empleo de antibióticos de forma generalizada en la cría de aves está siendo cuestionado y gradualmente reemplazado por otras prácticas (Chang y col., 2014).

Los alimentos funcionales, también llamados probióticos, se presentan como una opción de reducción o reemplazo del uso de antibióticos, su consumo está asociado a la prevención de enfermedades infecciosas y a la promoción de un buen estado de salud general. Los probióticos se definen como microorganismos vivos que administrados en cantidades adecuadas confieren beneficios a la salud del hospedador (FAO, 2002). Para que un microorganismo sea designado como probiótico debe cumplir ciertas características, resumidas por Ewing y Cole (1994): su consumo debe ser seguro, sin causar enfermedad ni toxicidad; debe sobrevivir al pH gástrico y a las sales biliares; ser capaz de colonizar el intestino para lograr una exclusión competitiva eficaz; entre otras.

S. boulardii es la levadura probiótica más estudiada. Se emplea a nivel mundial en el tratamiento de enfermedades infecciosas humanas (Czerucka y col., 2007; Czerucka y Rampal, 2002), y se aplica comúnmente en casos de diarreas causadas por *Clostridium difficile* o derivadas del uso continuo de antibióticos (Czerucka y col., 2007). El empleo de levaduras como probiótico se prefiere al uso de bacterias debido a su resistencia natural a muchos antibióticos, a la imposibilidad de transmitir resistencias adquiridas a bacterias patógenas (Palma y col., 2015; Czerucka y col., 2007; Mathur y Singh, 2006) y a que en muy pocas ocasiones se las ha asociado a brotes de enfermedades infecciosas en humanos (Mo y col., 2004; Psomas y col., 2003).

Aunque inicialmente se la clasificó como una especie diferente dentro del género *Saccharomyces*, publicaciones más recientes demuestran que el genoma de *S. boulardii* guarda un 95% de homología con el genoma de *S. cerevisiae* (Edwards-

Ingram y col., 2007; Edwards-Ingram y col., 2004; Vaughan-Martini en Kurtzman y Fell, 1998) y que estas levaduras deben clasificarse como variedades co-específicas. Debido a la importante similitud entre los genomas de *S. boulardii* y *S. cerevisiae*, parece factible la existencia de otras especies dentro del género *Saccharomyces* con propiedades probióticas. Varias de estas especies y sus híbridos interespecíficos, *S. pastorianus* y *S. bayanus*, han sido aislados de la producción de cerveza (Alsammar y Delneri, 2020; White y Zainasheff, 2010).

Numerosas publicaciones reportan el potencial probiótico de cepas de *S. cerevisiae* aisladas de alimentos con base en sus capacidades de resistir las condiciones gastrointestinales *in vitro* (Martins y col., 2005); de inmunomodular a nivel de intestino delgado de ratón (Generoso y col., 2011; Martins y col., 2007; Kourelis y col., 2010), en líneas celulares mononucleares humanas, a nivel sérico en ratones (Sivignon y col., 2015; Foligné y col., 2010) y en una línea celular de epitelio intestinal porcino (IPEC-1) desafiada con *E. coli* enterotoxigénica (Zanello y col., 2011); de aglutinar a *E. coli* (Zanello y col., 2011); y de neutralizar a *Salmonella* sp. (Pérez-Sotelo y col., 2005).

De acuerdo a los antecedentes consultados, es posible estimar que levaduras *Saccharomyces* sp. aisladas de la producción cervecera tengan potencial como agentes probióticos antagonistas contra bacterias enteropatógenas como *S. Enteritidis* y *E. coli*, causantes de enfermedad en aves y efectores de brotes zoonóticos en todo el mundo. Este capítulo inicia con el estudio de la capacidad de las levaduras aisladas de tolerar las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos y de adherirse a células de un modelo de epitelio intestinal, para luego profundizar en su caracterización como agentes antibacterianos.

5.2 Hipótesis

Las levaduras *S. cerevisiae* aisladas de muestras cerveceras guardan estrecha relación taxonómica con *S. cerevisiae* var. *boulardii* y podrían compartir algunos de sus aspectos probióticos y propiedades antagonistas contra bacterias enteropatógenas.

Las muestras cerveceras completas y sus levaduras aisladas serían capaces de tolerar las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos y llegar viables y en concentraciones elevadas al intestino animal.

5.3 Objetivos específicos

- Caracterizar cepas de levaduras en cuanto a su capacidad de tolerar las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos simuladas *in vitro*.

- Caracterizar un subgrupo de levaduras cerveceras en su capacidad de antagonizar contra bacterias enteropatógenas de pollos *in vitro*.

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Selección de levaduras de acuerdo a su tolerancia al pasaje por temperatura y pH estomacal e intestinal de pollos

Por definición, un microorganismo probiótico debe ser capaz de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal (TGI) del hospedador y llegar vivo y en concentraciones apreciables al intestino (FAO, 2002; Ewing y Cole, 1994). Con fundamento en esta condición, se diseñó un esquema de pre-selección de levaduras cerveceras con potencial probiótico mediante la evaluación de su capacidad de tolerar el pH (gástrico: 2,5; intestinal: 8,0), la temperatura (41 °C) y los tiempos de exposición a las condiciones del TGI de pollos emuladas *in vitro* (sección 3.11).

En primer lugar, se estudiaron los *starters* comerciales liofilizados, reconstituídos en solución fisiológica estéril, y los lodos de levaduras cerveceras completos, tal y como se los obtuvo por donación de cerveceros locales. Puesto que el objetivo de esta tesis es caracterizar al residuo de levaduras en cuanto a sus capacidades probióticas y bio-preservantes, el estudio de las muestras completas es una estrategia que permite evaluar comunidades de levaduras similares a aquellas que se obtendrían como subproductos de fermentación.

Los recuentos obtenidos a partir del estudio de la tolerancia de los *starters* comerciales liofilizados y los lodos cerveceros a las condiciones de pH y temperatura gastrointestinales de pollos se sintetizan en la Tabla 1.

Tabla 1. Recuento de *starters* cerveceros y muestras completas de levaduras post pasaje por temperatura (41 °C) y pH gastrointestinal de pollos

Muestra cervecera	Recuentos [UFC/mL]		
	Inicial	Post pasaje gástrico ^a	Post pasaje gastrointestinal ^b
LA-001 ^δ	8,30 ± 4,24 x 10 ⁶ A	7,40 ± 1,41 x 10 ⁶ A	3,30 ± 2,83 x 10 ⁶ B
Lodo M4 ^μ	3,45 ± 0,24 x 10 ⁷ A	5,38 ± 0,67 x 10 ⁷ A	2,75 ± 0,14 x 10 ⁷ A
Lodo M6 ^μ	4,81 ± 0,25 x 10 ⁷ A	3,55 ± 0,63 x 10 ⁷ A	3,15 ± 0,70 x 10 ⁷ A
Safbrew S-33 [†]	4,65 ± 0,87 x 10 ⁸ A	6,75 ± 0,55 x 10 ⁸ A	4,70 ± 1,35 x 10 ⁸ A
Safbrew WB-06 [†]	2,88 ± 0,34 x 10 ⁸ A	3,80 ± 0,35 x 10 ⁸ A	3,16 ± 0,21 x 10 ⁸ A
Safbrew Abbaye [†]	1,27 ± 0,16 x 10 ⁸ A	8,65 ± 0,26 x 10 ⁷ A	2,29 ± 1,42 x 10 ⁷ A
Safbrew T-58 [†]	5,45 ± 0,58 x 10 ⁸ A	5,05 ± 0,36 x 10 ⁸ A	3,75 ± 1,05 x 10 ⁸ A

Saflager S-23[†]	$5,85 \pm 1,23 \times 10^{7A}$	$4,87 \pm 0,88 \times 10^{7B}$	$2,75 \pm 0,56 \times 10^{6C}$
DIY Beer Coopers[*]	$6,5 \pm 1,45 \times 10^{7A}$	$4,58 \pm 0,78 \times 10^{7A}$	$1,10 \pm 0,35 \times 10^{7A}$
Muntons^{**}	$1,34 \pm 0,76 \times 10^{9A}$	$6,75 \pm 1,24 \times 10^{8B}$	$9,30 \pm 1,02 \times 10^{8C}$
Windsor[‡]	$3,95 \pm 1,27 \times 10^{8A}$	$3,45 \pm 0,86 \times 10^{8A}$	$3,40 \pm 0,55 \times 10^{8A}$
Saflager W-34/70[†]	$1,16 \pm 0,19 \times 10^{7A}$	$4,70 \pm 1,41 \times 10^{6B}$	$5,50 \pm 6,36 \times 10^{6B}$

Los recuentos se realizaron en agar YPD (composición descrita en *sección 3.3*). ^aRecuento post incubación a pH 2,5 y 41 °C durante 2 h. ^bRecuento post incubación gástrica + incubación intestinal a pH 8,0 y 41 °C durante 6 h. [†]M4 y M6 son lodos de levaduras de producción artesanal donados por productores locales activados en caldo YPD. [‡]LA-001 es un *starter* líquido producido por un cervecero artesanal local activado en caldo YPD. Las restantes muestras son liofilizados comerciales: [†]Fermentis (France), ^{*}Coopers Brewery (Australia), ^{**}Muntons plc (EEUU) y [‡]Lallemand (Canadá), re-hidratados en solución fisiológica estéril para realizar este estudio. Letras superíndices diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los recuentos antes y después de las incubaciones descritas en la *sección 3.11*.

Excepto algunos casos, los *starters* y lodos de levaduras cerveceras demostraron buena capacidad de sobrevivir a la incubación en condiciones de pH y temperatura del TGI de pollos (Tabla 1).

Los *starters* comerciales Saflager W-34/70, Saflager S-23, Safbrew Abbaye y Muntons redujeron en un orden decimal sus recuentos en agar YPD luego del tratamiento. De acuerdo al análisis estadístico de la varianza (ANOVA), los recuentos del *starter* LA-001 también se redujeron significativamente ($P < 0,05$), si bien el orden decimal de recuento no varió.

Las restantes 7 muestras ensayadas no presentaron reducción significativa de sus recuentos luego del pasaje por pH y temperatura gastrointestinales de pollos, por lo que es posible concluir que los *starters* y lodos de levaduras cerveceras presentan, en general, buena resistencia a estas condiciones, característica necesaria para continuar su evaluación como potenciales microorganismos probióticos.

A continuación, se abordó el estudio de las levaduras aisladas a partir de cada una de estas muestras cerveceras, con el objetivo de determinar si su resistencia a las condiciones GI se debe al conjunto de las levaduras que las constituyen y/o a sus interacciones o se debe a alguna/s de las levaduras en particular. Además, contemplando los fines de aplicación de este estudio, se buscó precisar si todas las cepas aisladas de una muestra cervecera logran llegar viables al intestino de pollos para ejercer sus potenciales efectos benéficos o si sólo algunas levaduras lo harán. Los resultados de estos experimentos se sintetizan en la Tabla 2.

Tabla 2. Recuento de levaduras aisladas de muestras cerveceras post pasaje por temperatura (41 °C) y pH gastrointestinal de pollos

Muestra cervecera*	Aislamiento	Recuentos [UFC/mL]		
		Inicial	Post pasaje gástrico ^a	Post pasaje gastrointestinal ^β
Starter M6	<i>Pk</i> MBELGA61	6,5 ± 1,41 x 10 ^{7A}	5,65 ± 0,50 x 10 ^{7A}	1,07 ± 0,54 x 10 ^{8A}
	<i>Sc</i> MBELGA62	1,31 ± 0,12 x 10 ^{7A}	8,67 ± 1,9 x 10 ^{6A}	1,23 ± 0,10 x 10 ^{7A}
Safbrew S-33	<i>Sc</i> SAFS331	7,58 ± 1,3 x 10 ^{6A}	5,72 ± 0,39 x 10 ^{6A}	4,42 ± 0,81 x 10 ^{6A}
	<i>Sc</i> SAFS332	8,05 ± 1,48 x 10 ^{6A}	1,05 ± 0,64 x 10 ^{7A}	4,62 ± 1,24 x 10 ^{6A}
Safbrew WB-06	WB1	2,31 ± 0,06 x 10 ^{7A}	1,33 ± 0,16 x 10 ^{7B}	6,85 ± 1,20 x 10 ^{6C}
	WB2	6,85 ± 1,48 x 10 ^{7A}	3,72 ± 0,81 x 10 ^{6B}	2,1 ± 0,42 x 10 ^{6B}
Safbrew T-58	<i>Sc</i> SAFT581	1,34 ± 0,08 x 10 ^{7A}	6,22 ± 1,73 x 10 ^{6B}	1,25 ± 0,13 x 10 ^{6C}
	<i>Sc</i> SAFT582	1,44 ± 0,01 x 10 ^{7A}	5,92 ± 0,81 x 10 ^{6B}	4,05 ± 0,35 x 10 ^{6B}
Saflager S-23	<i>Sc</i> SAFS231	2,55 ± 1,48 x 10 ^{4A}	5,5 ± 0,70 x 10 ^{2B}	< 10 ^C
	<i>Sc</i> SAFS234	1,11 ± 0,23 x 10 ^{6A}	1,6 ± 0,14 x 10 ^{5B}	1,79 ± 0,13 x 10 ^{4B}
	<i>Sp</i> SAFS235	2,51 ± 1,05 x 10 ^{6A}	1,93 ± 0,45 x 10 ^{6A}	9,15 ± 5,16 x 10 ^{4B}
Windsor	<i>Sc</i> WIND1	1,51 ± 0,27 x 10 ^{7A}	7,85 ± 0,92 x 10 ^{6B}	5,62 ± 0,18 x 10 ^{6B}
	<i>Sc</i> WIND2	1,12 ± 0,19 x 10 ^{7A}	6,7 ± 0,42 x 10 ^{6AB}	5,37 ± 0,88 x 10 ^{6B}

Los recuentos se realizaron en agar YPD (composición descrita en sección 3.3). *Se indica el *starter* o lodo cervecero del cual se obtuvo el aislamiento. *Sc*: *S. cerevisiae*. *Pk*: *Pichia kudriavzevii*. *Sp*: *S. pastorianus*. ^aRecuento post incubación a pH 2,5 y 41 °C durante 2 h. ^βRecuento post incubación gástrica + incubación intestinal a pH 8,0 y 41 °C durante 6 h. Letras superíndices diferentes indican diferencia significativa (P < 0,05) entre los recuentos antes y después de las incubaciones descritas en la sección 3.11.

En algunos casos, se comprobaron comportamientos diferentes al evaluar los *starters* (Tabla 1) y las levaduras aisladas a partir de ellos (Tabla 2). El aislamiento WB1 y el aislamiento WB2, ambos aislados a partir del *starter* comercial Safbrew WB-06, mostraron una reducción del orden de recuento post tratamiento, distinto del comportamiento que presentó el *starter* (Tabla 1). Lo mismo se observó al estudiar a *S. cerevisiae* WIND1 y *S. cerevisiae* WIND2, aisladas del *starter* tolerante Windsor (Tabla 1). Esto podría explicarse a partir de un efecto sinérgico de los aislamientos cuando se encuentran juntos en el *starter*, que les permite resistir mejor las condiciones de pH y temperatura del tracto GI de pollos. Otra posible explicación sería la existencia de otra cepa de levadura resistente al tracto GI que forma parte del *starter* pero que no fue aislada durante la etapa inicial de este estudio. De estas levaduras, sólo las aisladas a partir del *starter* Safbrew WB-06 se seleccionaron para continuar su estudio.

Similar es el caso de las levaduras *S. cerevisiae* SAFT581 y *S. cerevisiae* SAFT582, aislados a partir del *starter* comercial Safbrew T-58, que presentan una reducción en el orden de recuento post tratamiento, aunque el *starter* no mostró variación significativa de sus recuentos. El análisis ADNmt-RFLP determinó que ambos aislamientos corresponden a una misma cepa *S. cerevisiae* (sección 4.4.3). Por lo tanto, la tolerancia reducida de los aislamientos al tracto GI podría explicarse a partir de un estado metabólico subóptimo previo a ser sometidos a las condiciones del ensayo o bien a la existencia de una cepa resistente constituyente del *starter* que no fue aislada en las etapas iniciales de este estudio. Se descartó la continuidad de la caracterización probiótica de estas levaduras en etapas posteriores.

El análisis ADNmt-RFLP permitió comprobar que todos los aislamientos obtenidos a partir del *starter* comercial Saflager S-23 son cepas diferentes (sección 4.4.3). Estas cepas presentaron una pobre o nula capacidad de resistir el pasaje de pH y temperatura GI de pollos (Tabla 2), coherente con el comportamiento del *starter*, el cual redujo significativamente sus recuentos luego de las incubaciones (Tabla 1). Por este motivo, estas levaduras no se seleccionaron para continuar su estudio.

Los aislamientos *S. cerevisiae* SAFS331 y *S. cerevisiae* SAFS332, ambos aislados a partir del *starter* comercial Safbrew S-33, presentan un comportamiento similar entre sí y comparable al del *starter*, sin disminución significativa de su recuento luego del tratamiento. Estos resultados son coherentes con el hecho de que, de acuerdo al análisis ADNmt-RFLP, ambos aislamientos son en realidad la misma cepa *S. cerevisiae* (sección 4.4.3).

Finalmente, el lodo artesanal M6 y sus aislamientos, *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62, presentaron muy buena resistencia a las condiciones ensayadas, sin reducción significativa en sus recuentos. Particularmente la cepa *P. kudriavzevii* MBELGA61 aumentó sus recuentos durante el pasaje por pH y temperatura GI de pollos. Este resultado puede deberse a la disociación en estas condiciones de incubación de células que previamente formaban una pseudohifa, comprobada la capacidad de *P. kudriavzevii* MBELGA61 de formar pseudohifas en caldo YPD.

5.4.2 Determinación de la resistencia *in vitro* a las condiciones del TGI de pollos, incluyendo temperatura, pH, enzimas digestivas y bilis

Para avanzar en la etapa de selección de levaduras resistentes se intensificó la severidad de las condiciones de desafío. Levaduras pre-seleccionadas en la sección 5.4.1 fueron sometidas a la simulación *in vitro* de las condiciones del TGI de pollos en presencia de bilis y de enzimas digestivas, además de pH, temperatura, y tiempo de

exposición correspondientes a las etapas gástrica e intestinal. Los resultados obtenidos se sintetizan en la Tabla 3.

Tabla 3. Recuento de levaduras en starters cerveceros y muestras completas de levaduras post pasaje por temperatura, pH, contenido de enzimas y bilis del TGI de pollos

Muestra cervecera*	Muestras/Aislamiento	Recuentos [UFC/mL]		
		Inicial	Post pasaje gástrico ^α	Post pasaje gastrointestinal ^β
Lodo M6	Lodo M6	1,34 ± 0,30 x 10 ^{7A}	1,30 ± 0,21 x 10 ^{7A}	1,75 ± 0,35 x 10 ^{7A}
	<i>Pk</i> MBELGA61	1,21 ± 0,13 x 10 ^{7A}	9,35 ± 1,63 x 10 ^{6A}	1,67 ± 0,04 x 10 ^{7A}
	<i>Sc</i> MBELGA62	1,63 ± 0,11 x 10 ^{7A}	2,57 ± 0,26 x 10 ^{7B}	6,10 ± 1,27 x 10 ^{6C}
Lodo M4	Lodo M4	5,17 ± 0,12 x 10 ^{7A}	5,38 ± 0,67 x 10 ^{7A}	1,55 ± 0,14 x 10 ^{7B}
	<i>Sc</i> TEMPLA41	8,15 ± 0,25 x 10 ^{7A}	7,18 ± 0,11 x 10 ^{7A}	1,70 ± 0,22 x 10 ^{7B}
	<i>Sc</i> TEMPLA42	4,66 ± 0,20 x 10 ^{7A}	5,62 ± 0,33 x 10 ^{7B}	1,10 ± 0,72 x 10 ^{7C}
Starter Safbrew S-33	Starter Safbrew S-33	7,15 ± 1,20 x 10 ^{6A}	1,90 ± 0,42 x 10 ^{7A}	5,30 ± 2,55 x 10 ^{6B}
	<i>Sc</i> SAFS331	1,94 ± 0,01 x 10 ^{7A}	2,06 ± 0,06 x 10 ^{7A}	8,15 ± 3,04 x 10 ^{6B}
	<i>Sc</i> SAFS332	1,53 ± 0,25 x 10 ^{7A}	1,82 ± 0,25 x 10 ^{7A}	6,95 ± 1,34 x 10 ^{6B}
Starter Safbrew WB-06	Starter Safbrew WB-06	1,66 ± 0,42 x 10 ^{7A}	1,85 ± 0,35 x 10 ^{7A}	1,16 ± 0,21 x 10 ^{7A}
	WB1	1,22 ± 0,38 x 10 ^{7A}	1,37 ± 0,11 x 10 ^{7A}	3,35 ± 0,92 x 10 ^{6B}
	WB2	1,26 ± 0,34 x 10 ^{7A}	1,02 ± 0,10 x 10 ^{7A}	7,75 ± 4,60 x 10 ^{6A}

Los recuentos de levaduras se realizaron en agar YPD (composición descrita en sección 3.3). *Se indica el starter o lodo cervecero del cual se obtuvieron los aislamientos. *Sc*: *S. cerevisiae*. *Pk*: *Pichia kudriavzevii*. ^αRecuento post incubación a pH 2,5 y 41 °C durante 2 h en presencia de pepsina. ^βRecuento post incubación gástrica + incubación intestinal a pH 8,0 y 41 °C durante 6 h en presencia de pancreatina y bilis. Letras superíndices diferentes indican diferencia significativa (P < 0,05) entre los recuentos antes y después de las incubaciones descritas en la sección 3.12.

A partir de estos ensayos se confirmó la tolerancia al pasaje por el TGI de pollos del lodo M4 y de sus aislamientos, *S. cerevisiae* MTEMPLA41 y *S. cerevisiae* MTEMPLA42 (Tabla 3). Este resultado es coherente con los resultados obtenidos por análisis ADNmt-RFLP (sección 4.4.3), que determinaron que ambos aislamientos son la misma cepa, por lo que se esperaba observar comportamientos similares en las condiciones GI.

Los aislamientos *S. cerevisiae* SAFS331 y *S. cerevisiae* SAFS332, que comprobaron ser la misma cepa (sección 4.4.3), presentaron un comportamiento similar entre sí y con el starter Safbrew S-33 del cual fueron aislados. Todas las levaduras redujeron

significativamente sus recuentos post tratamiento (Tabla 3), aunque en la etapa de selección previa habían logrado resistir las condiciones de incubación (Tabla 2). Esto sugiere que las levaduras del *starter* Safbrew S-33 son afectadas por la presencia de enzimas digestivas y bilis.

Los aislamientos WB1 y WB2 evidencian reducción del orden de recuento post tratamiento, mientras que el *starter* Safbrew WB-06, a partir del cual se aislaron ambas levaduras, demostró tolerancia a las condiciones GI (Tabla 3). Estos comportamientos coinciden con los resultados del ensayo de pasaje por pH y temperatura GI de pollos (sección 5.4.1, Tablas 1 y 2). Posiblemente, exista una cepa tolerante que constituye el *starter* Safbrew WB-06 y que no fue aislada en las etapas iniciales de esta tesis.

El lodo artesanal M6 y el aislamiento *P. kudriavzevii* MBELGA61 demostraron tener muy buena resistencia a las condiciones del TGI de pollos (Tabla 3). Sin embargo, *S. cerevisiae* MBELGA62, también aislada del *starter* M6, evidenció cierto grado de sensibilidad a la presencia de bilis y enzimas digestivas, reduciendo significativamente su recuento post tratamiento ($P < 0,05$, Tabla 3). Además, la cepa *P. kudriavzevii* MBELGA61 no aumentó sus recuentos durante el pasaje por el tracto GI de pollos simulado. Esta observación puede asociarse a un efecto sensibilizante de la bilis y las enzimas digestivas sobre *Pichia*.

Entre las muestras cerveceras ensayadas, únicamente el *starter* comercial liofilizado Safbrew WB-06 y el lodo artesanal M6 fueron capaces de atravesar el tracto GI de pollos simulado *in vitro* sin disminuir significativamente ($P < 0,05$) sus recuentos iniciales (Tabla 3).

Al estudiar el efecto del tracto GI de pollos sobre los aislamientos obtenidos a partir de dichas muestras, todas las levaduras mostraron buena tolerancia; la única levadura capaz de resistir el pasaje GI sin variaciones significativas fue *P. kudriavzevii* MBELGA61 ($P < 0,05$, Tabla 3). Como conclusión de esta etapa, todas las levaduras estudiadas son afectadas por la presencia de bilis y enzimas gastrointestinales bajo condiciones de pH y temperatura GI de pollos. Sin embargo, a los fines del presente estudio, las levaduras cerveceras resisten adecuadamente el estrés al que fueron sometidas, y son plausibles de emplearse como potenciales probióticos incorporados en alimento para pollos.

A partir de estos resultados, se seleccionaron para continuar con la caracterización de sus capacidades probióticas al lodo M6 y sus cepas aisladas, *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61. *S. cerevisiae* es la levadura cervecera por excelencia, empleada en la producción de cervezas tipo *ale*. *P. kudriavzevii* es una levadura no convencional, pero conocida entre cerveceros productores de estilos de cerveza *ale* alternativos, con sabores y aromas frutados, cítricos, etc. Tanto el lodo M6

como las cepas ensayadas individualmente demostraron buena capacidad de resistir al TGI de pollos simulado *in vitro*, condición necesaria para considerar a un microorganismo con potencial probiótico.

Adicionalmente, la selección de estas levaduras en particular se justifica en la posibilidad de estudiar cepas cerveceras pertenecientes a diferentes géneros y el efecto de su interacción en el lodo M6, empleado como *starter*, sobre sus potenciales capacidades probióticas. A partir de este punto, se denominará al lodo artesanal M6 como *starter* M6, para diferenciarlo de los lodos de levaduras producto de micro-fermentaciones, condición de cultivo que se estudiará en las próximas secciones y que se describió como *condición c* en la *sección 3.13*.

Es oportuno señalar que, de acuerdo a la *Food, Drug and Cosmetic Act* (FDA), la cual establece el *status* de *Generally Recognized As Safe* (GRAS, generalmente reconocido como seguro) (FDA, 2010) para designar a aquellos alimentos y sustancias que han demostrado adecuadamente ser seguras bajo ciertas condiciones de uso establecidas, *P. kudriavzevii* y *S. cerevisiae* son especies microbianas seguras para la elaboración de alimentos fermentados (“Inventory of Microbial Food Cultures” de la FDA, en Bourdichon, 2012).

5.4.3 Estudio de la resistencia a las condiciones del TGI in vitro de cultivos en mosto cervecero de starter M6 y sus aislamientos

Al fermentar el mosto de cebada, las levaduras producen principalmente etanol, compuesto tóxico que se acumula en el medio, y CO₂, que disminuye el pH. Estas condiciones, sumadas al estrés osmótico asociado a la alta concentración inicial de azúcares en el mosto, constituyen un ambiente estresante para las levaduras, muy diferente de aquel que representa el cultivo en caldo YPD.

Para continuar con la caracterización y contemplando el objetivo de estudiar el potencial probiótico del residuo de la elaboración de cerveza, se presentó pertinente estudiar la capacidad de sobrevivir al TGI de pollos de cultivos de las levaduras en mosto de cebada. Estas condiciones de cultivo permiten obtener células en un estado fisiológico que se asemeja más al de aquellas levaduras obtenidas como subproducto de la actividad cervecera. Los resultados de este estudio se sintetizan en la Tabla 4.

Tabla 4. Recuento de levaduras cultivadas en mosto cervecero y de lodos de micro-fermentación post pasaje por temperatura (41 °C), pH, contenido de enzimas y bilis del TGI de pollos

Starter/Cepa	Recuentos [UFC/mL]		
	Inicial	Post pasaje gástrico ^α	Post pasaje gastrointestinal ^β
Mosto <i>Pk</i> MBELGA61 ^δ	4,87 ± 0,17 x 10 ^{7A}	1,72 ± 0,03 x 10 ^{7B}	7,62 ± 1,24 x 10 ^{6C}
Microf <i>Pk</i> MBELGA61 ^μ	1,40 ± 0,00 x 10 ^{7A}	5,07 ± 0,67 x 10 ^{6B}	2,00 ± 0,64 x 10 ^{6C}
Mosto <i>Sc</i> MBELGA62 ^δ	4,15 ± 0,14 x 10 ^{7A}	1,60 ± 0,49 x 10 ^{7B}	4,15 ± 1,13 x 10 ^{6C}
Microf <i>Sc</i> MBELGA62 ^μ	1,13 ± 0,14 x 10 ^{8A}	1,55 ± 0,49 x 10 ^{6B}	7,00 ± 7,78 x 10 ^{4B}
Mosto <i>starter</i> M6 ^δ	3,87 ± 0,32 x 10 ^{7A}	2,22 ± 0,46 x 10 ^{7B}	1,52 ± 0,39 x 10 ^{7B}
Microf <i>starter</i> M6 ^μ	2,42 ± 0,88 x 10 ^{7A}	5,87 ± 4,42 x 10 ^{6B}	2,65 ± 0,92 x 10 ^{6B}

Los recuentos se realizaron en agar YPD. ^αRecuento post incubación a pH 2,5 y 41 °C durante 2 h en presencia de pepsina. ^βRecuento post incubación gástrica + incubación intestinal a pH 8,0 y 41 °C durante 6 h en presencia de pancreatina y bilis. *Sc*: *S. cerevisiae*. *Pk*: *P. kudriavzevii*. ^μLevaduras obtenidas a partir de cultivos en mosto cervecero OG 9,98 °Bx de 72 h a 30 °C (condición b, sección 3.13). ^δLevaduras obtenidas a partir de micro-fermentaciones en mosto cervecero OG 9,98 °Bx a 18 °C hasta atenuación (condición c, sección 3.13). Letras superíndices diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los recuentos antes y después de las incubaciones descritas en la sección 3.12.

Tanto el *starter* M6 como sus cepas aisladas redujeron su tolerancia a las condiciones del TGI de pollos cuando fueron obtenidas a partir de cultivos en mosto cervecero (condiciones b y c, sección 3.13) (Tabla 4) respecto de cuándo se obtuvieron a partir de cultivos en caldo YPD (Tabla 3).

En el caso de *P. kudriavzevii* MBELGA61, la reducción en el recuento post pasaje GI fue de un orden decimal. *S. cerevisiae* MBELGA62 obtenida a partir de cultivos en mosto cervecero exhibió una disminución notable de sus recuentos por efecto del pasaje por el TGI de pollos.

El *starter* M6 obtenido a partir de cultivos de 72 h (condición b) presenta diferencia significativa entre los recuentos iniciales y post tratamiento de acuerdo al análisis ANOVA efectuado, si bien los órdenes de recuento se mantuvieron. Este resultado podría indicar un efecto sinérgico de tolerancia entre *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62 cuando coexisten en un mismo cultivo. En cuanto al lodo obtenido por micro-fermentación realizada por el *starter* M6, se observó una disminución significativa ($P < 0,05$) de un orden decimal en los recuentos post tratamiento gástrico y el recuento se mantuvo post incubación en las condiciones intestinales (Tabla 4).

El efecto del pasaje por el TGI es aún mayor en levaduras obtenidas por micro-fermentación (condición c, sección 3.13) (Tabla 4). Esta sensibilidad más pronunciada a las condiciones GI de los lodos de micro-fermentación puede explicarse a partir de un estado fisiológico más débil de las levaduras, asociado a un tiempo de exposición mayor al estrés osmótico del mosto cervecero; en el caso de *S. cerevisiae* MBELGA62, debe también contemplarse el estrés adicional atribuible a una exposición prolongada al etanol que la misma levadura produce al fermentar el mosto cervecero.

5.4.4 Acción bacteriostática de los SLC de levaduras cerveceras frente a *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169

Entre los mecanismos de inhibición del crecimiento bacteriano reportados en levaduras, se incluyen la producción de altas concentraciones de etanol, la síntesis de toxinas, la modificación del pH del medio, la producción de ácidos orgánicos, la competencia por nutrientes (Muccilli y Restuccia, 2015) y la producción de micocinas.

Si bien las micocinas son toxinas dirigidas a competir con otras levaduras taxonómicamente relacionadas, Bajaj y col. (2013) demostraron que *P. kudriavzevii* RY55 produce micocinas que inhiben el crecimiento de patógenos bacterianos como *E. coli*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Pseudomonas alcaligenes*. Una toxina *killer* producida por una cepa *Candida krusei* aislada de vegetales fermentados, demostró efecto inhibitorio sobre *E. coli*, *S. Typhimurium*, *S. aureus* y *Bacillus cereus* (Waema y col., 2009).

La mayoría de los metabolitos inhibidores producidos por las levaduras son secretados al espacio extracelular. Se postula que el CO₂ producido durante el metabolismo fermentativo acidifica el medio al disolverse (White y Zainasheff, 2010), mientras que el otro producto de la fermentación alcohólica, el etanol, ejerce su efecto antagonista a través de la desnaturalización de las proteínas y disolución de los lípidos de las membranas celulares, induciendo la lisis bacteriana *in vitro* (McDonnell y Russell, 1999).

Contemplando la alta capacidad de producción de etanol y CO₂ de las levaduras cerveceras, y su potencial en la producción de micocinas y/o ácidos orgánicos antibacterianos, se decidió evaluar la capacidad de sus SLC de inhibir el crecimiento de los enteropatógenos *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169. Los resultados de la incubación de los patógenos en SLCs se registran en la Tabla 5.

Tabla 5. Efecto bacteriostático de los SLCs de levaduras cerveceras sobre *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169

Dilución de SLC [% V/V]	Turbidez del cultivo					
	SLC de cultivos de levaduras en caldo YPD			SLC de micro-fermentaciones de levaduras cerveceras		
	<i>Starter</i> M6	<i>Pk</i> MBELGA61	<i>Sc</i> MBELGA62	<i>Starter</i> M6	<i>Pk</i> MBELGA61	<i>Sc</i> MBELGA62
	Inoculado con <i>S. Enteritidis</i> CIDCA 101					
100%	+	+	+	-	-	-
90%	+	+	+	+	+	+
80%	+	+	+	+	+	+
70%	+	+	+	+	+	+
60%	+	+	+	+	+	+
50%	+	+	+	+	+	+
Control positivo	+	+	+	+	+	+
Control negativo	-	-	-	-	-	-
Dilución de SLC [% V/V]	SLC de cultivos de levaduras en caldo YPD			SLC de micro-fermentaciones de levaduras cerveceras		
	<i>Starter</i> M6	<i>Pk</i> MBELGA61	<i>Sc</i> MBELGA62	<i>Starter</i> M6	<i>Pk</i> MBELGA61	<i>Sc</i> MBELGA62
	Inoculado con <i>E. coli</i> EHEC 60169					
	100%	+	+	+	-	-
90%	+	+	+	+	+	-
80%	+	+	+	+	+	+
70%	+	+	+	+	+	+
60%	+	+	+	+	+	+
50%	+	+	+	+	+	+
Control positivo	+	+	+	+	+	+
Control negativo	-	-	-	-	-	-

Pk MBELGA61: *P. kudriavzevii* MBELGA61. *Sc* MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. *Starter* M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62. Control positivo: patógeno inoculado en caldo nutritivo estéril. Control negativo: SLC sin inóculo. Se determinó presencia/ausencia de turbidez por observación directa de tubos con SLC inoculados con el patógeno post incubación ON a 37 °C, de acuerdo al esquema descrito en la sección 3.16. (+): se observó turbidez en la suspensión. (-): no se observó turbidez en la suspensión.

A partir de este ensayo se determinó la capacidad bacteriostática de los SLC 100% de levaduras cerveceras obtenidos de micro-fermentaciones de mosto cervecero (Tabla 5). Los SLC diluidos con caldo nutritivo estéril evidenciaron turbidez asociada a crecimiento bacteriano tras 24 h de incubación post inóculo, con excepción del SLC de micro-fermentación de *S. cerevisiae* MBELGA62 diluido al 90% V/V inoculado con *E. coli* EHEC 60169.

A continuación, se estudió el potencial bactericida de los SLC sembrando en agar nutritivo los tubos incubados con patógeno que no desarrollaron turbidez. Asimismo, se sembraron los respectivos controles negativos. Luego de incubación ON a 37 °C de las placas se determinó crecimiento bacteriano en todos los sobrenadantes 100%, mientras que los controles negativos confirmaron ausencia de crecimiento.

Estos resultados indican que los SLC de levaduras cerveceras sin diluir, obtenidos de cultivos en caldo YPD y de micro-fermentaciones de mosto de cebada (condiciones a y c, sección 3.13), presentan propiedades bacteriostáticas contra *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169. Ningún SLC demostró efecto bactericida.

Resulta interesante recuperar el trabajo de Fakruddin y col. (2017), quienes reportaron que *S. cerevisiae* IFXT62013, aislada de fruta, demostró un efecto antimicrobiano moderado y dirigido contra bacterias Gram-negativas en un estudio comparado con el antibiótico doxiciclina. Los autores estudiaron el efecto de células completas, lisados celulares y sobrenadantes de la levadura, y comprobaron mayor capacidad bactericida de los lisados celulares, lo que sugiere que el efecto antibacteriano más potente procede de componentes celulares y no de secreciones extracelulares. Sus resultados interpelan el enfoque abordado durante la presente tesis, sugiriendo que las levaduras *S. cerevisiae* cerveceras podrían albergar propiedades antimicrobianas en sus componentes intracelulares más efectivas que el etanol y el CO₂ secretados.

5.4.5 Estudio de la capacidad de autoagregación de levaduras cerveceras

Varios estudios reportan la correlación existente entre la capacidad de un microorganismo de autoagregar (formar cúmulos de células asociadas superficialmente con otros microorganismos de su misma cepa) y su competencia en la adhesión a células del epitelio intestinal (Kos y col., 2003; Pérez y col., 1998), característica relevante a determinar en potenciales probióticos.

Dada la sencillez y reproducibilidad de los ensayos de autoagregación *in vitro* (del Re y col., 2000), en especial cuando se los contrasta con los laboriosos experimentos en líneas celulares, se decidió constatar la capacidad de las levaduras cerveceras seleccionadas de autoagregar, como etapa previa al estudio de adhesión celular. Además, se estudiaron las posibles diferencias en la autoagregación entre levaduras

cultivadas en el medio completo caldo YPD y cultivadas en mosto cervecero estéril. Los resultados de estos experimentos se presentan en la figura 1, que grafica la variación de la densidad óptica (DO₆₀₀) relativa de las suspensiones de levaduras en el tiempo.

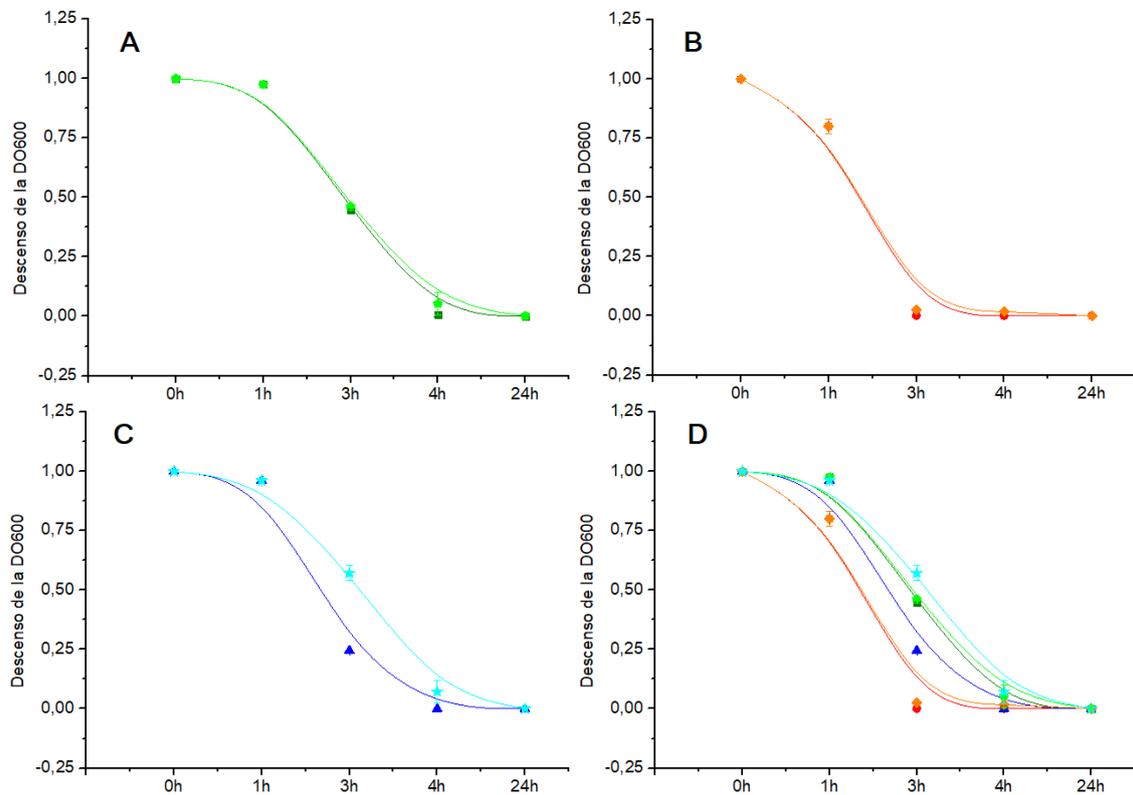


Fig. 1. Descenso relativo de la DO₆₀₀ de suspensiones de levaduras cerveceras en el tiempo. Se grafica el promedio de las DO₆₀₀ normalizadas respecto de la DO₆₀₀ inicial de cada suspensión de levaduras. Cada condición se ensayó por duplicado y se representa el promedio de las réplicas. Las barras de error representan la desviación estándar. **A.** *P. kudriavzevii* MBELGA61: ■ cultivada en caldo YPD (condición a, sección 3.13); ◆ cultivada en mosto cervecero (condición b, sección 3.13). **B.** *S. cerevisiae* MBELGA62: ● cultivada en caldo YPD; ◆ cultivada en mosto cervecero. **C.** *starter* M6: ▲ cultivado en caldo YPD; ★ cultivado en mosto cervecero. **D:** todas las levaduras, cultivadas en caldo YPD y en mosto cervecero.

Al observar las curvas de descenso de la DO por autoagregación y sedimentación de las levaduras, no se detectan diferencias entre *S. cerevisiae* MBELGA62 o *P. kudriavzevii* MBELGA61 cuando se las obtiene a partir de condiciones de cultivo distintas (Fig. 1A y 1B). En el caso del *starter* M6, por otro lado, los cultivos en caldo YPD fueron sensiblemente más autoagregantes que los cultivos en mosto cervecero (Fig. 1C).

Al comparar entre las levaduras estudiadas, *S. cerevisiae* MBELGA62 se manifiesta como una cepa con mayor capacidad autoagregante que *P. kudriavzevii* MBELGA61 (Fig. 1D). El *starter* M6 evidenció un comportamiento de sedimentación intermedio al

de las levaduras aisladas cuando se los cultivó en caldo YPD. En cambio, cuando el *starter* M6 fue obtenido en cultivos en mosto cervecero, mostró la capacidad de autoagregación más baja de todos los tratamientos evaluados (Fig. 1D). Esto sugiere que el cultivo en un medio de mayor estrés osmótico y nutricional que el caldo YPD modifica el comportamiento de sedimentación de este consorcio de levaduras, pero no modifica el comportamiento de los aislamientos obtenidos del *starter*, *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61, cuando se los cultiva en idénticas condiciones. Posiblemente, la interacción entre ambas levaduras en el *starter* tenga un efecto negativo en la autoagregación de cultivos en mosto cervecero. Otra hipótesis para explicar este fenómeno es la coexistencia de otras levaduras en el *starter* M6 que no fueron aisladas en la etapa inicial de estudio, y que cuando son cultivadas en mosto de cebada tienden a no sedimentar.

A partir de los datos de descenso de la DO_{600} registrados luego de 3 horas de incubación estática se calcularon los coeficientes de autoagregación (C_{AA}), sintetizados en la Tabla 6. De acuerdo con la clasificación propuesta por Del Re y col. (2000), las levaduras se caracterizaron como fuertemente autoagregantes (+), con un C_{AA} que supera el 0,80; no autoagregantes (-), con un C_{AA} inferior al 0,10; y de comportamiento mixto ($\pm AA$), con un C_{AA} que oscila entre 0,10 y 0,80. Del Re y col. (2000) interpretan esta última categoría como cultivos de fenotipo mixto, con subpoblaciones autoagregantes y no autoagregantes, que macroscópicamente exhiben formación de precipitado y un sobrenadante turbio luego de 2 h de incubación estática.

Tabla 6. Coeficientes de autoagregación (C_{AA}) de levaduras cerveceras

Cepa/ <i>Starter</i>	C_{AA}^{α}		
	Caldo YPD ^β	Mosto cervecero ^δ	Clasificación ^μ
<i>P. kudriavzevii</i> MBELGA61	0,553 ± 0,004 ^C	0,539 ± 0,001 ^C	$\pm AA$
<i>S. cerevisiae</i> MBELGA62	1,0 ± 0 ^A	0,974 ± 0,004 ^A	+
<i>Starter</i> M6	0,754 ± 0,003 ^B	0,429 ± 0,031 ^D	$\pm AA$

^αLos C_{AA} se calcularon de acuerdo a la ecuación 3, sección 3.17, considerando las medidas de DO_{600} registradas transcurridas 3 h de incubación. ^βLevaduras obtenidas a partir de cultivos en caldo YPD de 48 h a 30 °C (condición a, sección 3.13). ^δLevaduras obtenidas a partir de cultivos en mosto cervecero OG 9,98 °Bx de 72 h a 30 °C (condición b, sección 3.13). ^μAcorde a la clasificación propuesta por Del Re y col. (2000). (+): cepa autoagregante positiva ($C_{AA} > 80\%$). $\pm AA$: comportamiento mixto ($80\% < C_{AA} < 10\%$). Letras superíndices diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$).

Todas las levaduras ensayadas autoagregaron completamente cumplidas las 4 h de iniciado el ensayo. *S. cerevisiae* MBELGA62 fue la cepa más autoagregante, comprobando sedimentación completa transcurridas 3 h (Fig. 1B, Tabla 6).

En el caso de *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61, no se observaron diferencias significativas en los coeficientes de autoagregación calculados al modificar las condiciones de cultivo ($P < 0,05$, Tabla 6). Al estudiar el *starter* M6, que contiene a ambas cepas, se comprobó una disminución significativa en el coeficiente de autoagregación cuando se obtuvo a partir de cultivos en mosto cervecero ($P < 0,05$, Tabla 6).

Al analizar los coeficientes de autoagregación de las diferentes levaduras cultivadas en caldo YPD, se corroboró el comportamiento de sedimentación del *starter* M6 observado en las curvas de descenso de la DO (Fig. 1D). Su C_{AA} presentó un valor intermedio entre los C_{AA} de los aislamientos *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61 (Tabla 6), describiendo una capacidad autoagregante que resulta de la combinación de ambas levaduras, sin efecto sinérgico asociado a la interacción entre cepas.

De acuerdo a la escala propuesta por Del Re y col. (2000), únicamente *S. cerevisiae* MBELGA62 clasifica como fuertemente autoagregante, con un coeficiente de autoagregación que supera el 80% (Tabla 6). *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6 clasifican como levaduras \pm autoagregantes ($\pm AA$), con un coeficiente que oscila entre el 80% y el 10%.

Si bien los autores reportan una correlación entre la capacidad de autoagregación y la hidrofobicidad de un microorganismo y su habilidad de adherirse a la línea celular Caco-2, sus resultados demuestran que las cepas clasificadas como $\pm AA$ fueron las más adhesivas (Del Re y col., 2000). Contemplando estos datos, todas las levaduras cerveceras ensayadas son potenciales cepas adhesivas a líneas celulares de epitelio intestinal.

5.4.6 Ensayo de adhesión de las levaduras cerveceras a células intestinales Caco-2/TC7

La habilidad de adherirse al epitelio intestinal es un criterio ampliamente utilizado en la selección de microorganismos potencialmente probióticos (Kourelis y col., 2010; van der Aa Kühle y col., 2005). Por un lado, se postula que la ocupación de sitios y receptores de adhesión del epitelio intestinal por la microbiota autóctona o microorganismos probióticos impediría su ocupación por patógenos. Por otro, se conoce que la capacidad probiótica de un microorganismo de inmunomodular la respuesta del hospedador frente a enteropatógenos requiere de su interacción con las

células epiteliales. Romanin y col. (2010) comprobaron que la modulación de la respuesta inflamatoria de la mucosa intestinal frente a flagelina bacteriana por levaduras probióticas necesita del contacto entre éstas y las células epiteliales.

Dada la importancia de caracterizar las levaduras cerveceras en cuanto a su capacidad de adherirse al epitelio intestinal, se avanzó en el estudio de la adhesión a la línea celular Caco-2/TC7. Los datos obtenidos se sintetizan en la Tabla 7.

Tabla 7. Adhesión de levaduras cerveceras a la línea celular Caco-2/TC7

Cepa/Starter	% de levaduras adheridas ^α	
	Caldo YPD ^β	Micro-fermentación ^δ
Starter M6	0,59 ± 0,08 ^{A,a}	0,10 ± 0,02 ^{A,b}
<i>P. kudriavzevii</i> MBELGA61	3,40 ± 0,19 ^{B,a}	0,09 ± 0,04 ^{A,b}
<i>S. cerevisiae</i> MBELGA62	0,74 ± 0,08 ^{A,a}	0,13 ± 0,0 ^{A,b}

^αLos resultados se expresan como porcentajes de levaduras adheridas respecto de la cantidad de levaduras inoculadas. Los recuentos se realizaron en agar YPD. Se informa el promedio ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes en cuadruplicado. ^βLevaduras obtenidas a partir de cultivos en caldo YPD de 48 h a 30 °C (condición a, sección 3.13). ^δLevaduras obtenidas a partir de cultivos en mosto cervecerero OG 9,98 °Bx a 18 °C hasta atenuación (condición c, sección 3.13). Letras minúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas (P < 0,05) entre condiciones de cultivo aplicadas a una misma levadura. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencia significativa (P < 0,05) entre levaduras obtenidas en las mismas condiciones de cultivo.

Al evaluar la capacidad de adhesión de las levaduras cerveceras al modelo celular intestinal, se encontró que las levaduras cultivadas en caldo YPD tienen mayor capacidad de adherirse que aquellas obtenidas como lodos de micro-fermentación (Tabla 7), las cuales evidencian bajos porcentajes de adhesión. Entre las levaduras cosechadas a partir de caldo YPD, *P. kudriavzevii* MBELGA61 resulta ser la más adhesiva (P < 0,05).

Diosma y col. (2013) reportaron las habilidades adhesivas de levaduras aisladas de kefir, una bebida fermentada artesanal con propiedades probióticas. Independientemente de la concentración de levaduras inoculadas sobre Caco-2/TC7, *K. marxianus* CIDCA 8154 mostró un 3,0 ± 0,9%, *S. cerevisiae* CIDCA 8112 un 0,5 ± 0,1% y una cepa control comercial *S. boulardii* un 1,5 ± 0,4%. De acuerdo a los resultados de esta tesis, la levadura cervecera *S. cerevisiae* MBELGA62 cultivada en caldo YPD presentó una capacidad de adhesión muy similar a la que presenta la cepa *S. cerevisiae* CIDCA 8112 (0,74 ± 0,08), y la levadura cervecera *P. kudriavzevii* MBELGA61 cosechada en las mismas condiciones demostró una capacidad de

adhesión comparable a la de la levadura probiótica *K. marxianus* CIDCA 8154 (Diosma y col., 2013; Romanin y col., 2010).

Kumura y col. (2004) reportaron previamente adhesiones entre 0,2 y 40% en varias especies de levaduras aisladas de kefir y queso azul. Un panel de 18 cepas *S. cerevisiae* estudiadas por van der Aa Kühle y col. (2005) expresaron capacidades de adhesión celular que variaron entre 1,9 y 16,8%.

Según los estudios citados y en concordancia con las conclusiones a las que arribaron Diosma y col. (2013), las levaduras cerveceras seleccionadas se adhirieron con muy baja eficacia al epitelio intestinal. Resulta interesante destacar que las levaduras obtenidas como lodo de micro-fermentación, condición de cultivo que mejor emula el proceso de la industria cervecera, demostraron los menores porcentajes de adhesión a las células intestinales ($P < 0,05$, Tabla 7).

Esta característica del residuo de levaduras cerveceras podría ser funcional. Algunos autores sostienen que el criterio de adhesividad a epitelio intestinal de un microorganismo probiótico debe revisarse en casos específicos que involucren mecanismos de probiosis como la coagregación con enteropatógenos (Tiago y col., 2012) o la captura de toxinas (Shetty y Jespersen, 2006). Estas propiedades se verían potenciadas por un tránsito veloz por el TGI para lograr la rápida excreción de los agentes patógenos, y la adhesión del microorganismo al epitelio intestinal podría, en cambio, revertir en efectos nocivos para el hospedador.

En este sentido, se ha reportado que la levadura probiótica *S. boulardii* se asocia de forma irreversible a bacterias enteropatógenas, incluyendo *Salmonella* sp. y *E. coli* (Posadas y col., 2017; Tiago y col., 2012), y que no se adhiere eficientemente a la mucosa intestinal humana. Esta incapacidad de adherirse al epitelio garantiza que las bacterias asociadas a la levadura atraviesen el tracto sin causar infección y sean excretadas en las heces (Czerucka y col., 2007).

Los resultados de baja adhesión a epitelio intestinal presentados y los reportes sobre *S. boulardii* sugieren la importancia de estudiar las potenciales propiedades de las levaduras cerveceras como agentes co-agregantes con enteropatógenos y secuestrantes de toxinas.

5.4.7 Determinación de la capacidad de co-agregación de levaduras cerveceras con *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* ATCC® 25922™

Las interacciones enteropatógeno-hospedador que desencadenan la infección requieren de la previa adhesión bacteriana al epitelio intestinal. La capacidad de un microorganismo de co-agregar con bacterias enteropatógenas se considera una característica probiótica, puesto que la interacción probiótico-patógeno podría reducir

significativamente la asociación patógeno-hospedador y contribuir a la defensa contra la infección (Kos y col., 2003).

Se propone en esta sección complementar la caracterización realizada sobre los SLC con el estudio de la capacidad de las levaduras cerveceras de co-agregar con *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* ATCC 25922, cepas descritas en la sección 3.2. Los coeficientes de co-agregación (C_{CA}) calculados a partir de los resultados de estos experimentos se sintetizan en las Tablas 8 y 9.

Tabla 8. Coeficiente de co-agregación de levaduras cerveceras con *S. Enteritidis* CIDCA 101 (C_{CASE})

Cepa/Starter	C_{CASE}^{α}			
	Caldo YPD ^β	Mosto ^δ	Microfermentación ^μ	Clasificación [‡]
Starter M6	7,44 ± 1,40 ^{A,a}	0 ^{B,a}	0 ^{B,a}	-
Pk MBELGA61	7,30 ± 1,07 ^{A,a}	0,85 ± 1,20 ^{B,a}	4,42 ± 2,77 ^{C,b}	-
Sc MBELGA62	22,48 ± 0,12 ^{A,b}	15,88 ± 0,19 ^{B,b}	21,21 ± 1,25 ^{A,c}	m

^αLos valores se expresan como el promedio de los C_{CASE} determinados por duplicado ± la desviación estándar, calculados de acuerdo a la ecuación 4, sección 3.18, transcurridas 3 h de ensayo. ^βLevaduras obtenidas a partir de cultivos en caldo YPD de 48 h a 30 °C (condición a, sección 3.13). ^δLevaduras obtenidas a partir de cultivos en mosto cerveceros OG 9,98 °Bx de 72 h a 30 °C (condición b, sección 3.13). ^μLevaduras obtenidas a partir de cultivos en mosto cerveceros OG 9,98 °Bx a 18 °C hasta atenuación (condición c, sección 3.13). [‡]De acuerdo a la clasificación propuesta por Pizzolitto y col. (2012). (+): cepa co-agregante positiva. m: cepa co-agregante moderada. (-): cepa no co-agregante. *Pk* MBELGA61: *P. kudriavzevii* MBELGA61. *Sc* MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones de cultivo distintas aplicadas a una misma levadura. Letras minúsculas superíndice distintas indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre levaduras cultivadas en idénticas condiciones.

S. cerevisiae MBELGA62 demostró ser la levadura más eficiente en la coagregación con *S. Enteritidis* CIDCA 101 (15,9 - 22,5%), clasificando como moderadamente co-agregante de acuerdo a Pizzolitto y col. (2012). Los cultivos en caldo YPD de *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6 co-agregaron pobremente con *S. Enteritidis* (< 10%), y sus cultivos en mosto cerveceros demostraron aún menor capacidad co-agregante (Tabla 8).

Tabla 9. Coeficiente de co-agregación de levaduras cerveceras con *E. coli* ATCC 25922 (C_{CAEC})

Cepa/Starter	C_{CAEC}^{α}			
	Caldo YPD ^β	Mosto ^δ	Micro-fermentación ^μ	Clasificación ^ψ
Starter M6	52,36 ± 1,15 ^{A,a}	15,22 ± 2,06 ^{B,a}	23,71 ± 2,79 ^{B,a}	+
Pk MBELGA61	56,42 ± 0,95 ^{A,b}	5,01 ± 2,42 ^{B,b}	34,92 ± 0,49 ^{C,b}	+
Sc MBELGA62	66,97 ± 0,55 ^{A,c}	41,06 ± 1,38 ^{B,c}	43,68 ± 0,43 ^{B,c}	+

^αLos valores se expresan como el promedio de los $C_{CAEC} \pm$ la desviación estándar, calculados de acuerdo a la ecuación 4, sección 3.18, transcurridas 3 h de ensayo. ^βLevaduras obtenidas a partir de cultivos en caldo YPD de 48 h a 30 °C (condición a, sección 3.13). ^δLevaduras obtenidas a partir de cultivos en mosto cervecero OG 9,98 °Bx de 72 h a 30 °C (condición b, sección 3.13). ^μLevaduras obtenidas a partir de cultivos en mosto cervecero OG 9,98 °Bx a 18 °C hasta atenuación (condición c, sección 3.13). ^ψDe acuerdo a la clasificación propuesta por Pizzolitto y col. (2012). (+): cepa co-agregante positiva. Pk MBELGA61: *P. kudriavzevii* MBELGA61. Sc MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$) entre condiciones de cultivo distintas aplicadas a una misma levadura. Letras minúsculas superíndice distintas indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre levaduras cultivadas en idénticas condiciones.

Las levaduras cerveceras demostraron, en general, una habilidad de co-agregar con *E. coli* ATCC 25922 significativamente mayor cuando se compara con los resultados de coagregación con *S. Enteritidis* CIDCA 101 ($P < 0,05$, Tablas 8 y 9).

En todos los casos, los cultivos de levaduras en caldo YPD presentaron una capacidad superior de co-agregar con los enteropatógenos ($P < 0,05$). Asimismo, la condición de cultivo en mosto cervecero durante 72 h (condición b, sección 3.13) resultó ser la menos estimulante de la co-agregación de levaduras y bacterias patógenas. Las levaduras obtenidas como lodos de micro-fermentación cervecera superaron el umbral de la co-agregación moderada ($> 25\%$) de la clasificación propuesta por Pizzolitto y col. (2012) (Tabla 9).

Nuevamente, *S. cerevisiae* MBELGA62 fue la levadura que demostró mayor capacidad de co-agregar con el patógeno en todas las condiciones de cultivo ensayadas. El *starter* M6 presentó los coeficientes de co-agregación más bajos de las tres levaduras, indistintamente de las condiciones de cultivo o del patógeno ensayado ($P < 0,05$, Tablas 8 y 9). Este resultado sugiere que la presencia de varias levaduras en el *starter* tiene efectos negativos en la interacción con bacterias.

Pizzolitto y col. (2012) reportaron el aislamiento de varias cepas *S. cerevisiae* de heces de pollos capaces de co-agregar eficientemente con *Staphylococcus aureus*, pero sólo una de ellas, *S. cerevisiae* 08, fue capaz de co-agregar también con los

patógenos de pollos *E. coli*, *Enterobacter cloacae* y *S. enterica* subsp. *enterica*. En estudios previos publicados por Peng y col. (2001) se describe la co-agregación de *Candida utilis*, *Dekkera bruxellensis*, *Hanseniaspora guilliermondii*, *Kloeckera apiculata* y *Schizosaccharomyces pombe* con bacterias de relevancia médica e industrial como *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *S. aureus*. Entre estas levaduras, *C. utilis* fue la de mayor capacidad co-agregante de bacterias. Hirayama y col. (2012) determinaron que la coagregación entre *S. cerevisiae* y *Lactobacillus plantarum* requiere de la integridad estructural del entramado de mananos de la pared celular de la levadura para que la interacción de superficie sea efectiva.

Tiago y col. (2012) estudiaron la adhesión de 11 bacterias enteropatógenas a la pared celular de *S. boulardii* y 3 cepas de *S. cerevisiae*, y encontraron que sólo *E. coli*, *S. Typhimurium* y *S. enterica* var. *Typhi* se adhieren a la superficie de las levaduras. Comprobaron que la adhesión no depende de la viabilidad de las levaduras; que la presencia de manosa en el medio inhibe el efecto adhesivo; y que la adhesión ocurre tanto *in vitro* como *in vivo* en modelo de ratón (Tiago y col., 2012). Estos autores visualizaron microscópicamente el fenómeno, similar a la floculación, e identificaron levaduras rodeadas de varias bacterias. Al estudiar el sistema mediante microscopía de escaneo electrónico, observaron con claridad la adhesión y no adhesión de diferentes cepas *S. cerevisiae* con *S. Typhimurium* y *E. coli*.

De acuerdo a los resultados aquí presentados, la levadura cervecera *S. cerevisiae* MBELGA62 es capaz de co-agregar eficientemente con los enteropatógenos *E. coli* y *S. Enteritidis*. Cuando se estudiaron bajo microscopio óptico los flóculos recuperados tras 24 h de co-incubación con *S. enteritidis*, se detectaron cúmulos de levaduras cerveceras rodeados por bacterias, como las reportadas por Tiago y col. (2012) (Fig. 2).

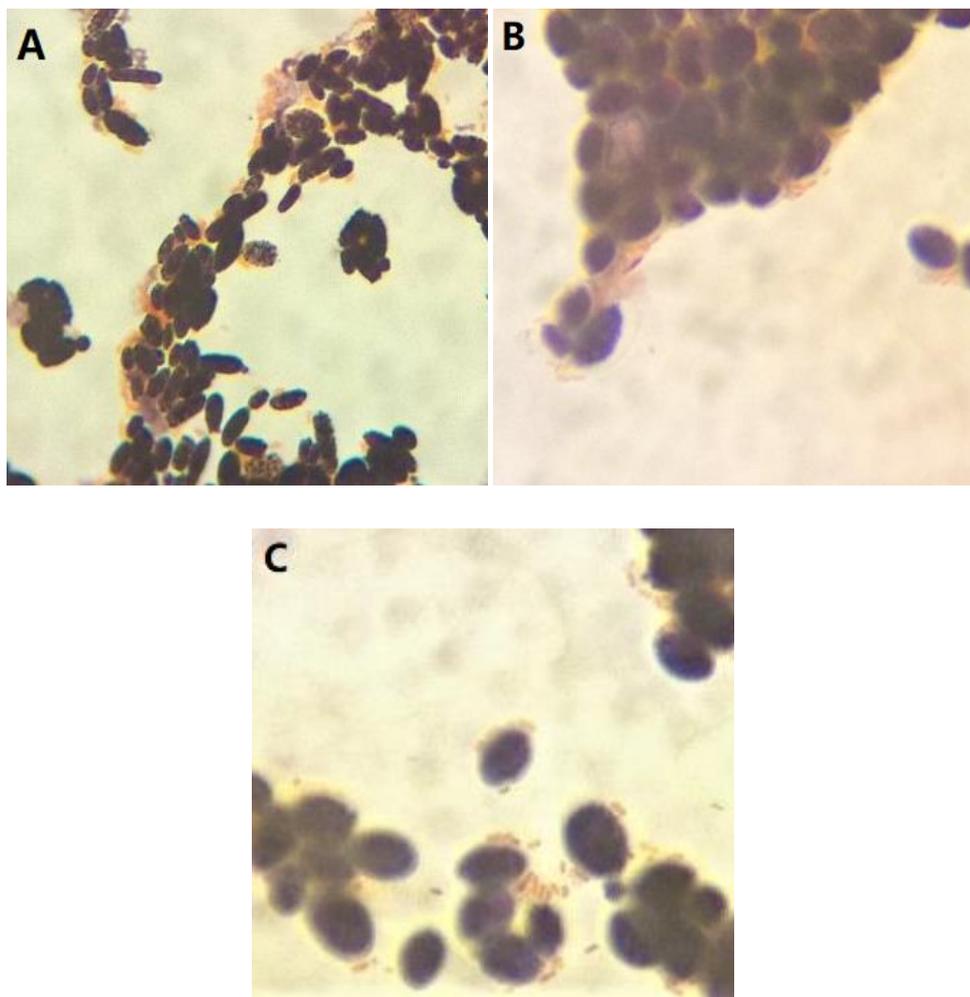


Fig. 2. Fotografía de flóculos de co-incubaciones tratados con tinción de Gram bajo microscopio óptico. **A.** *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. Enteritidis* CIDCA 101. **B, C.** *S. cerevisiae* MBELGA62 y *S. Enteritidis* CIDCA 101.

A modo de ejemplo, la figura 2A muestra el extendido de un flóculo de levaduras *P. kudriavzevii* MBELGA61 teñidas con cristal violeta, en cuya superficie se detectaron bacilos gram negativos *S. Enteritidis* CIDCA 101 co-agregados; en la figura 2C se aprecia la asociación de bacilos gram negativos *S. Enteritidis* CIDCA 101 a la superficie de una levadura *S. cerevisiae* MBELGA62 en gemación teñida con cristal violeta. La evidencia microscópica constata la capacidad de las levaduras cerveceras de co-agregar con bacterias enteropatógenas.

5.4.8 Determinación de la asociación e invasión de *S. Enteritidis* CIDCA 101 a monocapas Caco-2/TC7 pre-incubadas con levaduras cerveceras

La infección del epitelio intestinal por enteropatógenos como *Salmonella*, requiere de su adhesión a la superficie celular e internalización (Baron, 1996). Los microorganismos probióticos desarrollan diferentes mecanismos que impiden la

asociación bacteria-epitelio, como la competencia por nutrientes, la competencia por sitios de adhesión a la mucosa intestinal o el establecimiento de interacciones probiótico-patógeno preferenciales a la interacción epitelio-patógeno (Gut y col., 2018). Existen reportes del efecto antagonista de levaduras contra enteropatógenos bacterianos. Martins y col. (2010) reportaron que *S. boulardii* redujo significativamente la internalización de *S. Typhimurium* cuando estos microorganismos fueron co-incubados sobre la línea celular colónica humana T84. Otros autores estudiaron a *S. boulardii* y *Pichia pastoris* X-33 en co-incubación con *S. Typhimurium* sobre la línea celular colorectal humana HCT-116, y encontraron que la asociación bacteria-célula se redujo en un 37 y 47%, respectivamente (França y col., 2015). Más recientemente, Menezes y col. (2020) reportaron la capacidad de *S. cerevisiae* y *Pichia kluyveri* aisladas de bebidas fermentadas artesanales (kefir y cocoa), de coagregar con enteropatógenos y de reducir la adhesión de *E. coli* EPEC, *Listeria monocytogenes* y *S. Enteritidis* a células Caco-2.

Comprobada la capacidad de las levaduras cerveceras de co-agregar con *S. Enteritidis* CIDCA 101 *in vitro* (sección 5.4.7) y su baja adhesividad al modelo celular de epitelio intestinal Caco-2/TC7 (sección 5.4.6), se decidió contrastar la hipótesis de que *Salmonella* retenida en la pared de las levaduras reducirá su infectividad sobre la línea celular. Los resultados de evaluar el grado de asociación e invasión de *S. Enteritidis* CIDCA 101 a Caco-2/TC7 en presencia de levaduras cerveceras se sintetizan en la Tabla 10.

Tabla 10. Asociación e invasión de *S. Enteritidis* CIDCA 101 sobre Caco-2/TC7

Tratamiento	Caldo YPD		Mosto		Micro-fermentación	
	Aso ^α	Inv ^β	Aso ^α	Inv ^β	Aso ^α	Inv ^β
<i>P. kudriavzevii</i> MBELGA61 + SE	8,20 ± 1,02 x 10 ⁶	4,00 ± 0,87 x 10 ⁴	4,35 ± 0,98 x 10 ⁶ *	3,78 ± 1,08 x 10 ⁴	8,90 ± 2,19 x 10 ⁶	4,42 ± 1,94 x 10 ⁴
<i>S. cerevisiae</i> MBELGA62 + SE	8,78 ± 2,16 x 10 ⁶	2,44 ± 0,62 x 10 ⁴	7,21 ± 2,65 x 10 ⁶	1,18 ± 0,56 x 10 ⁴	7,71 ± 0,90 x 10 ⁶	4,43 ± 2,54 x 10 ⁴
Starter M6 + SE	7,64 ± 1,82 x 10 ⁶	3,99 ± 0,45 x 10 ⁴	4,01 ± 0,52 x 10 ⁶ *	3,77 ± 0,46 x 10 ⁴	7,94 ± 1,10 x 10 ⁶	2,75 ± 0,95 x 10 ⁴
<i>S. Enteritidis</i> CIDCA 101	Asociación			Invasión		
	7,11 ± 1,5 x 10 ⁶			3,38 ± 0,69 x 10 ⁴		

Los recuentos de *S. Enteritidis* CIDCA 101 se realizaron en agar nutritivo (Biokar). Los resultados se informan como el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos independientes en cuadruplicado. SE: *S. Enteritidis* CIDCA 101. ^αAso: asociación bacteriana, determinada mediante protocolo descrito en la sección 3.20.1. ^βInv: invasión celular bacteriana, determinada mediante protocolo descrito en la sección 3.20.2. *Los valores presentan diferencia significativa (P < 0,05) con el respectivo control incubado con *S. Enteritidis* CIDCA 101.

En cuanto a la asociación, los cultivos en mosto cervecero de *P. kudriavzevii* MBELGA61 y del *starter* M6 demostraron una reducción significativa en los recuentos del enteropatógeno ($P < 0,05$, Tabla 10). Sin embargo, esta observación no guarda correlato con una reducción de la infectividad de *Salmonella* sobre Caco-2/TC7, por lo que no puede interpretarse efecto probiótico a partir de estos resultados.

Los resultados obtenidos no evidenciaron capacidad de las levaduras de reducir la invasión de Caco-2/TC7 por *S. Enteritidis* CIDCA 101 en ninguna de las condiciones de cultivo ensayadas (Tabla 10).

Previamente, se comprobó que las levaduras cultivadas en mosto cervecero no son efectivas en la coagregación con *S. Enteritidis* CIDCA 101, por lo que no podía preverse un efecto reductor en la asociación del enteropatógeno al epitelio intestinal en presencia de estas levaduras. Adicionalmente, se constató que el cultivo en mosto cervecero reduce significativamente la adhesión de las levaduras cerveceras a Caco-2/TC7, hasta niveles despreciables. Comprobado que las levaduras no compiten con las bacterias por los sitios de adhesión al epitelio intestinal y no interfieren en la asociación epitelio-bacteria a través de una interacción levadura-bacteria preferencial, los resultados encontrados en los experimentos con el modelo de epitelio intestinal no pueden interpretarse a partir de la caracterización realizada durante esta tesis.

5.4.9 Determinación del daño celular producido por S. Enteritidis CIDCA 101 y E. coli EHEC 60169 sobre Caco-2/TC7 en presencia de levaduras cerveceras

Durante los ensayos con la línea celular Caco-2/TC7, se decidió evaluar el efecto de la presencia de levaduras cerveceras sobre el daño celular inducido por los enteropatógenos *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* enterohemorrágica EHEC 60169. El daño celular se determinó indirectamente a través de la actividad enzimática lactato deshidrogenasa (LDH) cuantificada en sobrenadantes celulares (Legrand y col., 1992), como se describió en la *sección 3.21*. Los resultados de estas determinaciones se informan en la Tabla 11.

Tabla 11. Actividad LDH de sobrenadantes de cultivo de Caco-2/TC7 co-incubadas con levaduras cerveceras y enteropatógenos

Levadura/bacteria	Actividad LDH ^β		
	Caldo YPD	Mosto	Micro-fermentación
Control sin microorganismos	13,27 ± 3,07 ^A		
<i>S. Enteritidis</i> CIDCA 101	27,23 ± 3,20 ^B		
<i>P. kudriavzevii</i> MBELGA61 + SE	22,88 ± 1,04 ^{AB}	13,61 ± 3,73 ^A	19,35 ± 6,35 ^{AB}
<i>S. cerevisiae</i> MBELGA62 + SE	15,25 ± 1,70 ^{AB}	21,16 ± 6,62 ^{AB}	19,36 ± 1,50 ^{AB}
Starter M6 + SE	24,85 ± 3,83 ^{AB}	13,78 ± 2,78 ^A	20,50 ± 5,17 ^{AB}
<i>E. coli</i> EHEC 60169	51,01 ± 3,20 ^D		
<i>P. kudriavzevii</i> MBELGA61 + <i>Ec</i>	49,70 ± 0,70 ^{CD}	n/d	45,44 ± 7,30 ^{CD}
<i>S. cerevisiae</i> MBELGA62 + <i>Ec</i>	36,91 ± 4,18 ^C	n/d	39,12 ± 1,74 ^{CD}
Starter M6 + <i>Ec</i>	44,29 ± 4,18 ^{CD}	n/d	46,91 ± 1,86 ^{CD}

Los resultados se informan como el promedio ± la desviación estándar de 3 experimentos independientes en cuadruplicado. Los resultados con *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169 corresponden a ensayos independientes. SE: *S. Enteritidis* CIDCA 101. n/d: no determinado. ^βEl análisis de la varianza se aplicó para comparar la actividad LDH de tratamientos de cada patógeno en presencia y ausencia de levaduras cerveceras y la actividad LDH en ausencia total de microorganismos (control negativo). Letras superíndice distintas indican que existe diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los valores de actividad enzimática analizados.

Al evaluar el daño celular producido por *E. coli* EHEC 60169 sobre Caco-2/TC7, se detectaron niveles muy superiores al daño producido por *S. Enteritidis*. La única cepa capaz de reducir significativamente la actividad LDH frente al patógeno fue *S. cerevisiae* MBELGA62 cultivada en caldo YPD ($P < 0,05$, Tabla 11).

Es interesante recordar que en ensayos previos de coagregación con patógenos (sección 5.4.7) fue *S. cerevisiae* MBELGA62 la levadura que demostró mayor eficiencia de coagregación con la cepa *E. coli* ATCC 25922, particularmente cuando se obtuvo en cultivo en caldo YPD (Tabla 9). Sería conveniente realizar ensayos de coagregación con *E. coli* EHEC 60169 y estudios de la asociación Caco-2/TC7- *E. coli* EHEC 60169 en presencia de las levaduras cerveceras para arribar a conclusiones robustas respecto de este resultado, pero inicialmente puede asociarse la protección del epitelio intestinal del daño producido por *E. coli* EHEC 60169 observada en presencia de *S. cerevisiae* MBELGA62 a una potencial asociación levadura-bacteria que reduce la interacción del patógeno con las células intestinales.

Las levaduras que redujeron significativamente la actividad LDH de sobrenadantes de células desafiadas con *S. Enteritidis* CIDCA 101 ($P < 0,05$, Tabla 11) fueron las mismas que demostraron reducción en los recuentos de *Salmonella* asociada a Caco-

2/TC7; *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6 cultivados en mosto cervecero durante 72 h (Tabla 10). Estas levaduras redujeron la actividad LDH a los niveles basales detectados en el control negativo sin microorganismos, aunque no afectaron los recuentos del patógeno internalizado (Tabla 10), es decir, no afectaron la infectividad de *S. Enteritidis* CIDCA 101. Para mayor claridad, en la figura 3 se grafica la actividad LDH de los sobrenadantes registrados en la Tabla 11.

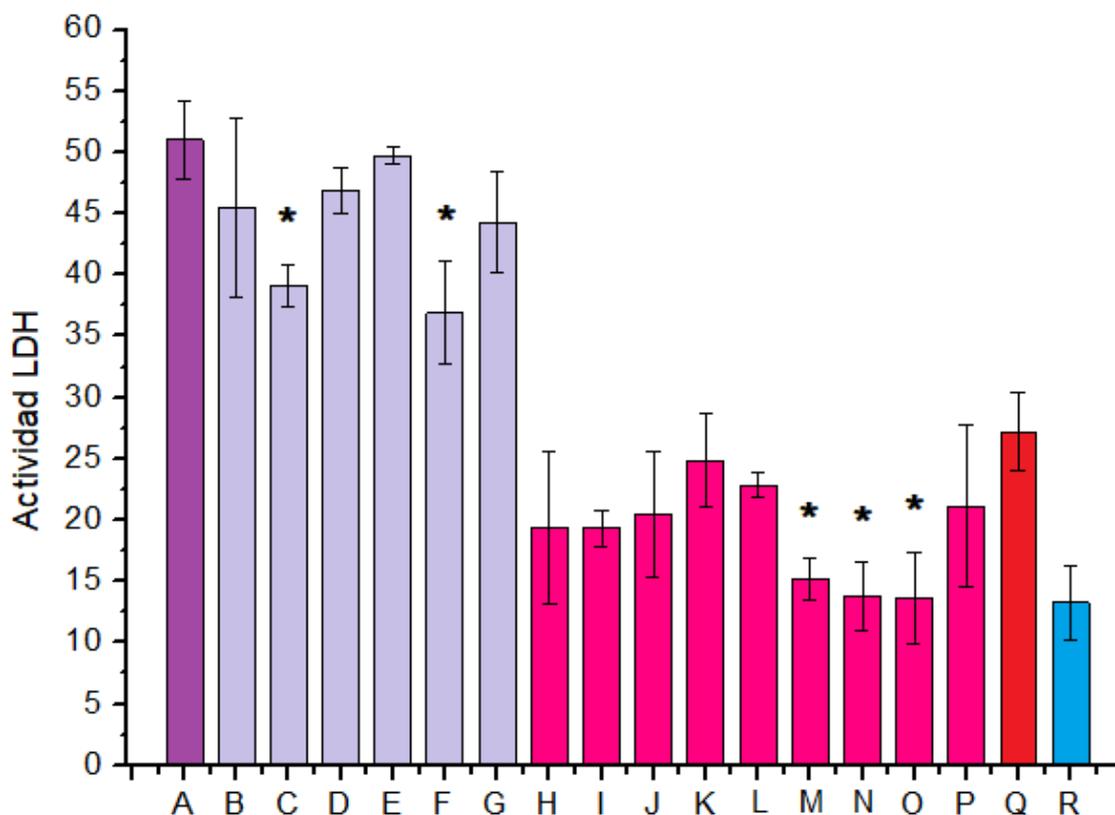


Fig. 3. Actividad LDH determinada en sobrenadantes de células Caco-2/TC7 incubadas con enteropatógenos y levaduras cerveceras. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos independientes en cuadruplicado. Barras con el símbolo (*) presentan diferencia significativa ($P < 0,10$) con la actividad LDH del respectivo control con patógeno. **A:** *E. coli* EHEC 60169. **B:** *E. coli* EHEC 60169 + *P. kudriavzevii* MBELGA61 de micro-fermentación. **C:** *E. coli* EHEC 60169 + *S. cerevisiae* MBELGA62 de micro-fermentación. **D:** *E. coli* EHEC 60169 + *starter* M6 de micro-fermentación. **E:** *E. coli* EHEC 60169 + *P. kudriavzevii* MBELGA61 de caldo YPD. **F:** *E. coli* EHEC 60169 + *S. cerevisiae* MBELGA62 de caldo YPD. **G:** *E. coli* EHEC 60169 + *starter* M6 de caldo YPD. **H:** *S. Enteritidis* CIDCA 101 + *P. kudriavzevii* MBELGA61 de micro-fermentación. **I:** *S. Enteritidis* CIDCA 101 + *S. cerevisiae* MBELGA62 de micro-fermentación. **J:** *S. Enteritidis* CIDCA 101 + *starter* M6 de micro-fermentación. **K:** *S. Enteritidis* CIDCA 101 + *starter* M6 de caldo YPD. **L:** *S. Enteritidis* CIDCA 101 + *P. kudriavzevii* MBELGA61 de caldo YPD. **M:** *S. Enteritidis* CIDCA 101 + *S. cerevisiae* MBELGA62 de caldo YPD. **N:** *S. Enteritidis* CIDCA 101 + *starter* M6 de mosto cervecero. **O:** *S. Enteritidis* CIDCA 101 + *P. kudriavzevii* MBELGA61 de mosto cervecero. **P:** *S. Enteritidis* CIDCA 101 + *S. cerevisiae* MBELGA62 de mosto cervecero. **Q:** *S. Enteritidis* CIDCA 101. **R:** control basal sin microorganismos adicionados. **Caldo**

YPD: condición de cultivo a, *sección 3.13*. **Mosto cervecero:** condición de cultivo b, *sección 3.13*.

Micro-fermentación: condición de cultivo c, *sección 3.13*.

Se conoce que *S. boulardii*, la levadura probiótica más estudiada, exhibe un importante efecto inmunomodulador sobre líneas celulares humanas. Varios estudios comprobaron que induce la expresión de inmunoglobulina A (IgA), el factor de necrosis tumoral α (TNF- α) y varias interleuquinas (ILs), así como reduce la expresión de IL-8 en enterocitos no infectados, e inmunomodula las vías efectoras de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y de la proteína activadora AP-1 en enterocitos infectados con *S. Typhimurium* (Palma y col., 2015; Pontier-Bres y col., 2014). Palma y col. (2015) observaron una reducción en la producción de factores pro-inflamatorios y la prevención de la apoptosis de células de colon T84 infectadas por una cepa *E. coli* patógena inducidas por *S. boulardii*.

Romanin y col. (2010) reportaron que levaduras *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* e *Issatchenkia* aisladas de kefir de leche modularon la respuesta inmune innata de epitelio intestinal cuando la línea celular Caco-2 CCL20:LUC se desafió con ligandos de receptores TLR, como flagelina de *Salmonella* y LPS de *E. coli*. Esta propiedad inmunomoduladora de las levaduras se comprobó dosis-dependiente y activa únicamente en levaduras viables, ya que levaduras tratadas térmicamente o con radiación UV perdieron por completo su efecto modulador.

Estos reportes dan cuenta de la capacidad inmunomoduladora de levaduras aisladas de alimentos sobre líneas celulares intestinales humanas y nos interpelan acerca de la posibilidad de que los resultados aquí presentados puedan explicarse en efectos moduladores de las levaduras cerveceras sobre enterocitos Caco-2/TC7. Una modulación de la respuesta inmune inflamatoria podría reflejarse en una reducción de la impermeabilización de las células epiteliales y, por lo tanto, en una disminución de la cantidad de enzima LDH liberada al medio. La contrastación de esta hipótesis requiere profundizar en estudios específicos de las propiedades inmunomoduladoras de las levaduras cerveceras, por lo que no podemos profundizar en conclusiones a este respecto.

5.5 Conclusiones

En esta primera etapa de caracterización probiótica, se comprobó que varias de las levaduras cerveceras aisladas son capaces de sobrevivir a las condiciones de pH, temperatura, presencia de bilis y enzimas digestivas del tracto gastrointestinal de pollos simuladas *in vitro*. Entre las cepas evaluadas, *P. kudriavzevii* MBELGA61 destacó por ser capaz de mantener su recuento de viables e incluso aumentarlo durante el pasaje por el TGI. Con el objetivo de profundizar en la caracterización

probiótica de *S. cerevisiae*, la levadura cervecera por excelencia, y de *P. kudriavzevii*, una levadura no convencional en la elaboración de cerveza, se seleccionó a las cepas *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61 y al *starter* M6, a partir del cual fueron aisladas, para continuar su estudio.

Se ensayó la capacidad bacteriostática y bactericida de sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de cultivos en caldo YPD y de micro-fermentaciones de mosto de cebada llevadas a cabo con las levaduras seleccionadas. Los SLC de micro-fermentaciones demostraron capacidad bacteriostática sobre los enteropatógenos de pollos y agentes zoonóticos *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169. Debido a que estos SLC se obtuvieron en condiciones de cultivo que emulan el proceso cervecero, el resultado sugiere el potencial bacteriostático de una cerveza producida con las levaduras seleccionadas.

A continuación, se abordó el estudio de las propiedades probióticas asociadas a la presencia de las levaduras. Como etapa previa a los ensayos de adhesión sobre una línea celular de epitelio intestinal, se comprobó la capacidad de las levaduras seleccionadas de autoagregar, de forma eficiente *S. cerevisiae* MBELGA62 y de forma moderada *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6. Al estudiar la adhesión sobre células Caco-2/TC7, las levaduras demostraron una baja capacidad de adherirse al epitelio intestinal. Consultada bibliografía especializada en probióticos, varios autores reportan que la incapacidad de adherirse al intestino puede ser un rasgo funcional en microorganismos que establecen fuertes interacciones con enteropatógenos o que adsorben compuestos tóxicos en su superficie. En estos casos, el efecto probiótico radica en la eliminación del patógeno o la toxina mediante un veloz transcurrir por el tracto intestinal asociados al microorganismo benéfico y evitando su interacción con las mucosas del hospedador.

Consecuentemente, se estudió la capacidad de las levaduras cerveceras de asociarse con enteropatógenos. Al ensayar la co-agregación de microorganismos, se demostró una fuerte interacción de las levaduras con *E. coli* ATCC 25922, en particular de *S. cerevisiae* MBELGA62. Además, esta levadura demostró una competencia moderada en la co-agregación con *S. Enteritidis* CIDCA 101, mientras que *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6 interaccionan muy débilmente con *Salmonella*. En términos generales, las levaduras cerveceras co-agregaron con *E. coli* ATCC 25922 de forma eficiente; esta observación incluye a la condición de cultivo que emula la fermentación cervecera, lo que sugiere que las levaduras residuo de la producción de cerveza podrían actuar como agentes co-agregantes antimicrobianos que no se adhieren al epitelio intestinal.

Bajo esta hipótesis, se avanzó en el estudio de las propiedades antimicrobianas de las levaduras cerveceras; específicamente, se ensayó el efecto de la presencia de levaduras en la asociación e invasión de enteropatógenos a Caco-2/TC7. A partir de estos experimentos se verificó que la infectividad de *S. Enteritidis* CIDCA 101 no es afectada por las levaduras. Sin embargo, *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6 redujeron significativamente ($P < 0,05$) el daño celular inducido por *S. Enteritidis* CIDCA 101 sobre Caco-2/TC7, mientras que *S. cerevisiae* MBELGA62 lo hizo en células co-incubadas con *E. coli* EHEC 60169.

A partir de los resultados obtenidos durante esta caracterización es posible concluir que las levaduras cerveceras toleran las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos; producen sobrenadantes con efecto bacteriostático sobre bacterias patógenas; demuestran un efecto citoprotector frente a enteropatógenos sobre un modelo de epitelio intestinal, reduciendo los niveles de daño celular; y presentan propiedades adsorbentes, con capacidad de co-agregar con bacterias patógenas. Numerosos reportes proponen aplicaciones para levaduras capaces de actuar como agentes co-agregantes de bacterias y adsorbentes de toxinas. Comprobadas sus propiedades frente a enteropatógenos, se decidió abordar a continuación el estudio de las competencias antifúngicas y secuestrantes de toxinas de las levaduras cerveceras.

**Estudio del potencial de las levaduras cerveceras
como agentes biocontroladores de *Aspergillus* sp.
y secuestrantes de aflatoxina B₁**

Estudio del potencial de las levaduras cerveceras como agentes biocontroladores de *Aspergillus* sp. y secuestrantes de aflatoxina B₁

6.1 Introducción

La contaminación fúngica de alimentos y bebidas produce enormes pérdidas económicas a escala global. Particularmente, la contaminación por *A. parasiticus* y *A. flavus* afecta la producción de cereales y sus derivados, entre ellos, los alimentos balanceados para la producción agraria (Pitt y Hocking, 2009). Estas especies son las principales productoras del subtipo de micotoxina más tóxico, denominadas aflatoxinas, que se clasifican dentro del grupo 1 de compuestos carcinógenos humanos (IARC, 2002). Entre los 18 tipos de aflatoxinas conocidos, la más importante en términos de ubicuidad e impacto en la salud humana y animal es la aflatoxina B₁ (AFB₁) (Oliveira y col., 1997). Cuando AFB₁ es ingerida por animales domésticos a través de alimento contaminado, se acumula en el hígado con importantes efectos negativos sobre la salud animal y los parámetros productivos. Además, parte de la toxina sufre biotransformación hepática a epóxido o a su forma hidroxilada, la aflatoxina M₁ (AFM₁), que es excretada en los fluidos biológicos de animales intoxicados, pudiendo llegar al consumo humano, por ejemplo, a través de la leche vacuna (Murphy y col., 2006).

Las propiedades biocontroladoras y detoxificantes de levaduras frente a hongos filamentosos toxigénicos se encuentran ampliamente documentadas. Entre ellas, se han reportado la capacidad de inhibir la germinación y reducir el desarrollo fúngico y de regular negativamente la expresión, bio-degradar y capturar micotoxinas (Muccilli y Restuccia, 2015; Fernandes Oliveira y col., 2013; Moslehi-Jenabian y col., 2010). Estas interesantes propiedades de las levaduras permiten pensar en la posibilidad de emplear levaduras cerveceras como aditivo biocontrolador contra hongos filamentosos en alimento balanceado para pollos.

Durante el avance de la presente tesis pudieron aislarse, identificarse y seleccionarse en base a sus resistencia al tracto GI de pollos, las levaduras cerveceras *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* a partir del cual fueron aisladas, denominado M6. M6 es un lodo residuo de levaduras recuperado de la producción de una cerveza artesanal tipo ale y donado por un cervecero artesanal de la ciudad de La Plata, Buenos Aires, que se describió con detalle en la *sección 4.4.1*.

En el capítulo a continuación, se describen los resultados del estudio dirigido a caracterizar las levaduras aisladas del residuo cervecero respecto a sus propiedades antifúngicas y detoxificantes de AFB₁, con vistas a valorizar el residuo de la industria cervecera, compuesto por levaduras viables y su producto de fermentación, como

suplemento de alimento balanceado para pollos con capacidad antagonista contra *Aspergillus* sp. y decontaminante de aflatoxina.

6.2 Hipótesis

Las muestras cerveceras completas y sus levaduras aisladas podrían actuar como agentes biocontroladores de *Aspergillus* sp. toxigénico, a través de mecanismos de competencia por nutrientes y/o producción de metabolitos antagonistas.

Las muestras cerveceras completas y sus levaduras aisladas podrían actuar como agentes detoxificantes de micotoxinas, particularmente de aflatoxina B₁, a través de mecanismos de secuestro.

6.3 Objetivos específicos

- Caracterizar la capacidad de las levaduras cerveceras y de sus productos de fermentación de inhibir o reducir la germinación y crecimiento de *Aspergillus* sp. toxigénico.
- Estudiar el efecto citoprotector de las levaduras cerveceras sobre un modelo de hepatocitos humanos desafiado con AFB₁.
- Determinar la capacidad de las levaduras cerveceras de secuestrar AFB₁ *in vitro*. Analizar la relación entre la capacidad secuestrante y la composición de la pared celular de levaduras.

6.4 Resultados y discusión

6.4.1. Estudio de la reducción de la germinación de *Aspergillus* sp. por sobrenadantes libres de células (SLC) de cultivos de levaduras cerveceras

A. flavus CMUNLPI5 y *A. parasiticus* CMUNLP7, descritas previamente en la sección 3.2.2, son cepas productoras de AFB₁, toxina que se acumula en el hígado generando consecuencias para la salud, como aflatoxicosis, inmunosupresión y cáncer hepático (Kew, 2013; Pitt y Hocking, 2009). La inhibición de la germinación de especies toxigénicas, con la consecuente imposibilidad de producir AFB₁, es una de las estrategias empleadas en la prevención de los efectos deletéreos de la toxina, además de la consecuente preservación de los alimentos de la contaminación fúngica.

Contemplando estas estrategias, se inició la caracterización de las propiedades biocontroladoras de las levaduras cerveceras con el estudio del efecto de sus metabolitos sobre la germinación de *Aspergillus* sp., en ausencia total de levaduras

(SLC) y aproximando las condiciones experimentales al sistema de estudio, cual es el producto fermentado de la industria cervecera.

Es interesante recordar que, al terminar la fermentación cervecera, las levaduras son eliminadas por decantación y filtración, por lo que puede pensarse a la cerveza como el sobrenadante filtrado del proceso cervecero. En el contexto particular de esta tesis, se buscó conocer qué fracción del subproducto de la industria cervecera y en qué proporción debe adicionarse al alimento balanceado de pollos para lograr su preservación de hongos patógenos. El estudio de los sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de la fermentación de mosto cervecero con las levaduras seleccionadas en el laboratorio permite estudiar las propiedades antifúngicas de la fracción del subproducto cervecero correspondiente a la cerveza sobrenadante, sin levaduras. La capacidad de reducir la germinación fúngica de los SLC se presenta en la figura 1 como porcentaje de reducción respecto del control positivo.

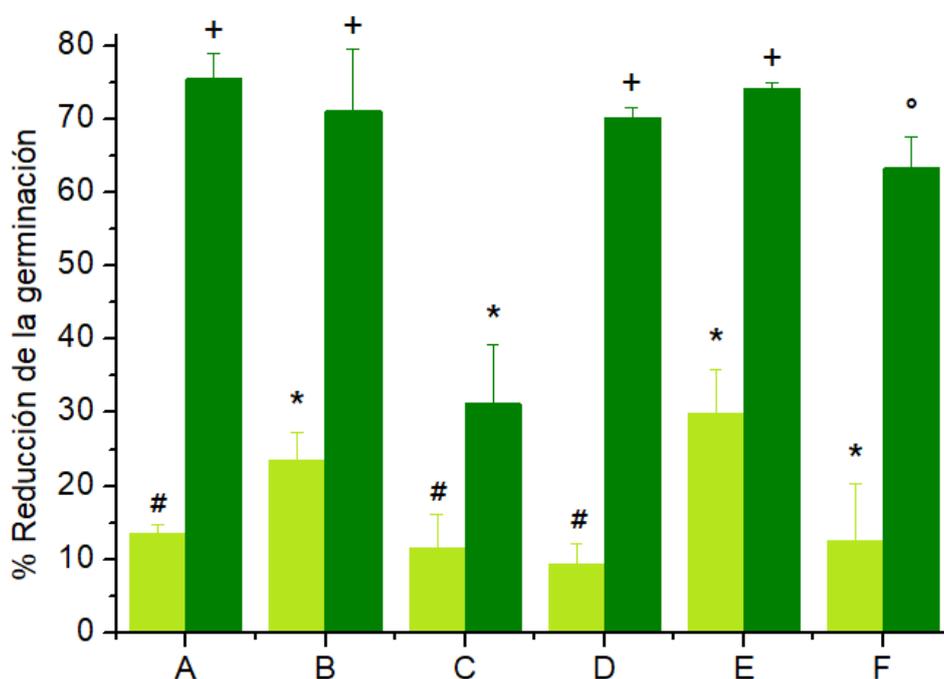


Fig. 1. Reducción de la germinación fúngica por sobrenadantes libres de células de cultivos de levaduras cerveceras. Los porcentajes de reducción de la germinación se calcularon de acuerdo a la ecuación 6, sección 3.22. Las barras representan el promedio \pm la desviación estándar de 4 fosas por tratamiento. Barras con el mismo símbolo (*,°,#,+), no presentan diferencias significativas entre sí ($P < 0,05$). **A:** *A. parasiticus* CMUNLP7/starter M6. **B:** *A. parasiticus* CMUNLP7/*S. cerevisiae* MBELGA62. **C:** *A. parasiticus* CMUNLP7/*P. kudriavzevii* MBELGA61. **D:** *A. flavus* CMUNLP15/starter M6. **E:** *A. flavus* CMUNLP15/*S. cerevisiae* MBELGA62. **F:** *A. flavus* CMUNLP15/*P. kudriavzevii* MBELGA61. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62. Barras ■: SLC obtenidos de micro-fermentaciones en mosto cervecero (condición c, sección 3.13). Barras ■: SLC obtenidos de cultivos en caldo YPD (condición a, sección 3.13).

Únicamente los SLC obtenidos a partir de micro-fermentaciones de mosto cervecero (condición c, sección 3.13) demostraron una reducción significativa de la germinación fúngica (Fig. 1). Esta condición de cultivo emula el proceso de producción de cerveza a escala laboratorio, lo que sugiere que los metabolitos solubles inhibidores/reductores del desarrollo fúngico estarían presentes en el producto de cervecería obtenido a partir de las levaduras cerveceras estudiadas, así como en el residuo húmedo de levaduras floculadas.

Los SLC obtenidos a partir de cultivos en caldo YPD (condición a, sección 3.13) no generan un efecto inhibitor sobre *Aspergillus* sp. en la mayoría de los tratamientos (Tabla 1, Fig. 1). Únicamente el SLC de *S. cerevisiae* MBELGA62 produjo una reducción significativa (> 20%) de la germinación de ambas especies *Aspergillus*, aunque en mucho menor grado que los SLC obtenidos a partir de micro-fermentaciones en mosto cervecero (Fig. 1). La tabla 1 sintetiza los datos graficados en figura 1, para mayor claridad del análisis.

Tabla 1. Reducción porcentual de la germinación de *Aspergillus* sp. por SLC de levaduras cerveceras

Tratamiento	% Reducción de la germinación	
	SLC caldo YPD	SLC micro-fermentación
<i>Ap</i> CMUNLP7/<i>starter</i> M6	13,54 ± 1,25 ^B	75,54 ± 3,41 ^{A*}
<i>Ap</i> CMUNLP7/<i>Pk</i> MBELGA61	11,55 ± 4,54 ^B	31,21 ± 8,00 ^{C*}
<i>Ap</i> CMUNLP7/<i>Sc</i> MBELGA62	23,56 ± 3,61 ^{A*}	71,18 ± 8,40 ^{A*}
<i>Af</i> CMUNLPI5/<i>starter</i> M6	9,29 ± 2,91 ^{BC}	70,29 ± 1,34 ^{AB*}
<i>Af</i> CMUNLPI5/<i>Pk</i> MBELGA61	12,52 ± 7,86 ^B	63,34 ± 4,17 ^{B*}
<i>Af</i> CMUNLPI5/<i>Sc</i> MBELGA62	29,80 ± 6,09 ^{A*}	74,13 ± 0,86 ^{AB*}

Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de la reducción porcentual de la germinación fúngica calculada respecto del control positivo de germinación correspondiente, como se indica en la ecuación 6, sección 3.22. *Indica diferencia significativa ($P < 0,05$) con el control positivo de germinación correspondiente. Letras superíndice diferentes indican diferencia significativa entre los porcentajes de reducción dentro de una columna ($P < 0,05$). *Ap* CMUNLP7: *A. parasiticus* CMUNLP7. *Af* CMUNLPI5: *A. flavus* CMUNLPI5. *Pk* MBELGA61: *P. kudriavzevii* MBELGA61. *Sc* MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. *Starter* M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Al realizar un análisis individual de las cepas, se verificó que *S. cerevisiae* MBELGA62 y el *starter* M6 produjeron los SLC con mayor efecto antifúngico, mientras que *P. kudriavzevii* MBELGA61 demostró un efecto reductor de la germinación significativamente menor frente a las cepas *Aspergillus* sp. (Tabla 1).

Los resultados sugieren que los SLC obtenidos por micro-fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae* MBELGA62 y el *starter* M6 contienen compuestos solubles con un efecto inhibitorio de la germinación de *Aspergillus* sp. significativamente mayor. Uno de esos compuestos es probablemente etanol, metabolito acumulado en mayor concentración en los SLC de micro-fermentación cervecera y producido eficientemente por la cepa *S. cerevisiae* MBELGA62 (sección 4.4.6, Tabla 8).

Estos resultados dan cuenta del potencial biocontrolador de los sobrenadantes de micro-fermentación de levaduras cerveceras para ser utilizados como aditivo en el alimento balanceado de animales.

6.4.2 Estudio de la reducción del crecimiento de *Aspergillus* sp. co-incubado en medio sólido con levaduras cerveceras

Continuando la caracterización de las levaduras cerveceras como agentes biocontroladores de *Aspergillus* sp., se estudió la capacidad de las levaduras cerveceras *P. kudriavzevii* MBELGA61, *S. cerevisiae* MBELGA62 y el *starter* M6, de reducir el crecimiento micelial de *Aspergillus* sp. toxigénico en co-cultivos en PDA. Este estudio evaluó el efecto conjunto de las levaduras cerveceras y de sus metabolitos solubles, es decir, se modelizan ambas fracciones del subproducto de la industria cervecera actuando simultáneamente sobre el crecimiento fúngico.

La metodología empleada, basada en un estudio publicado por Vero y col. (2013), se modificó con el objetivo de estudiar otros aspectos del antagonismo de las levaduras cerveceras contra *Aspergillus* sp. En principio, el esquema de siembra en placa de Petri de 90 mm se mantuvo (Fig. 2). A diferencia de Vero y col. (2013), quienes determinaron un parámetro de reducción del crecimiento micelial fúngico a un cierto tiempo, durante el presente trabajo se estudió la cinética de crecimiento fúngico (radio vs. tiempo) en presencia de las levaduras cerveceras. Las incubaciones continuaron hasta el momento en que el control positivo respectivo alcanzó el borde de la placa de Petri más alejado del punto de siembra (70 mm) (288 h). Las fotografías de la figura 2 ilustran el esquema de siembra y los resultados.

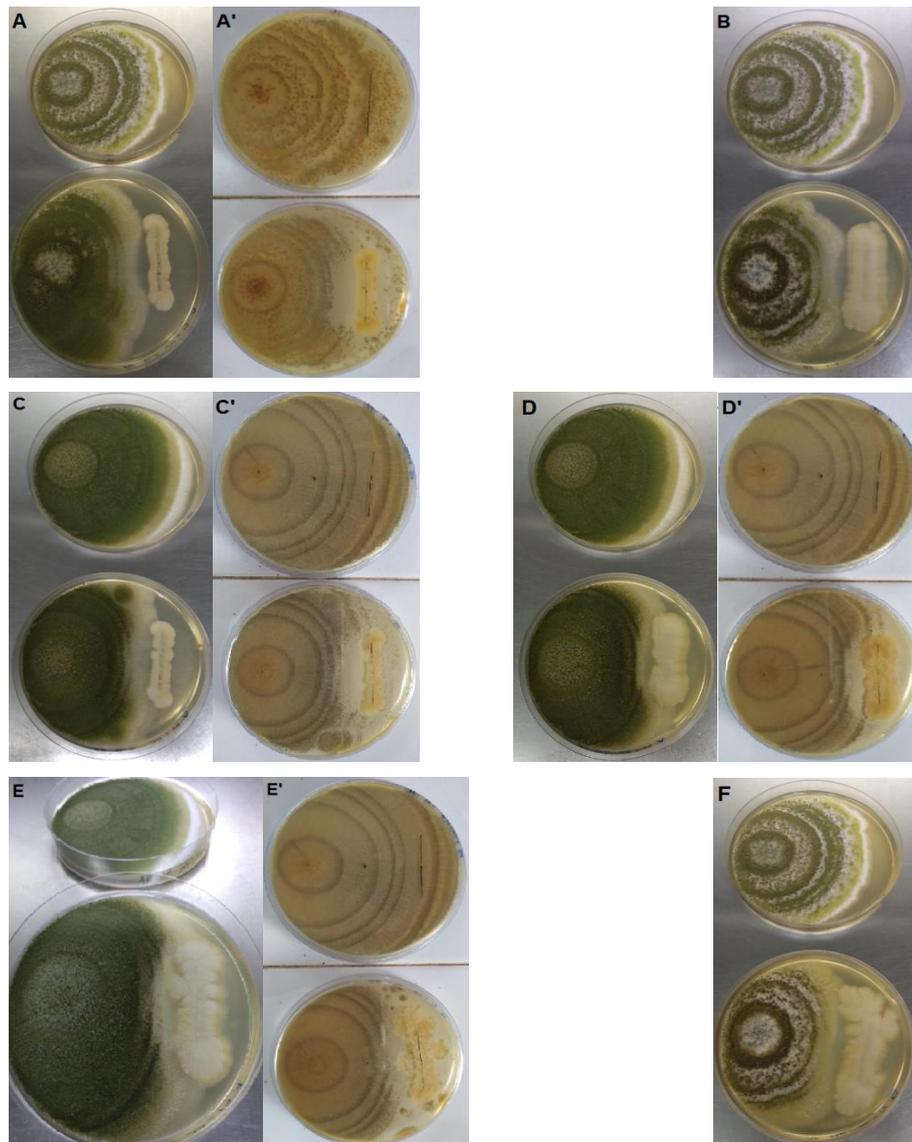


Fig. 2. Estudio de la reducción del crecimiento de *Aspergillus* sp. co-incubado con levaduras cerveceras en PDA. Las fotografías incluyen el tratamiento (en la foto inferior) y su respectivo control positivo (foto superior). Las fotografías del frente de placa (A, B, C, D, E y F) fueron tomadas a las 216 h de incubación. Las fotografías del reverso de placa (A', C', D' y E') se tomaron una vez finalizado el ensayo (288 h). **A, A':** *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. flavus* CMUNLP15. **B:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. flavus* CMUNLP15. **C, C':** *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. parasiticus* CMUNLP7. **D, D':** *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. parasiticus* CMUNLP7. **E, E':** *starter* M6 + *A. parasiticus* CMUNLP7. **F:** *starter* M6 + *A. flavus* CMUNLP15. El *starter* M6 es el lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Las modificaciones metodológicas llevadas a cabo permitieron la observación del comportamiento fúngico en contacto íntimo con la levadura, comprobándose que *Aspergillus* sp. desarrolló un micelio debilitado en las zonas cercanas a la estría de levadura, tal y como se observa en la figura 2 y con mayor detalle en la figura 3. A.

flavus CMUNLP15 fue incapaz de crecer sobre la estría de levaduras, aún a tiempos prolongados de incubación (Fig. 2A, 2B y 2F y Fig. 3 A-C). Esta especie fúngica no logró formar conidios (estructuras reproductivas) en la zona cercana a las levaduras (Fig. 2A, 2B y 2F) y desarrolló estructuras de resistencia al estrés denominadas esclerocios (Fig. 2A'). Por otro lado, *A. parasiticus* CMUNLP7 presentó un micelio debilitado en la zona cercana a la estría de levadura transcurridas 216 h de incubación (Fig. 2 C-E), que a tiempos más prolongados se mantuvo pero con crecimiento fúngico sobre la estría y formación de conidios (Fig. 3 D-F).

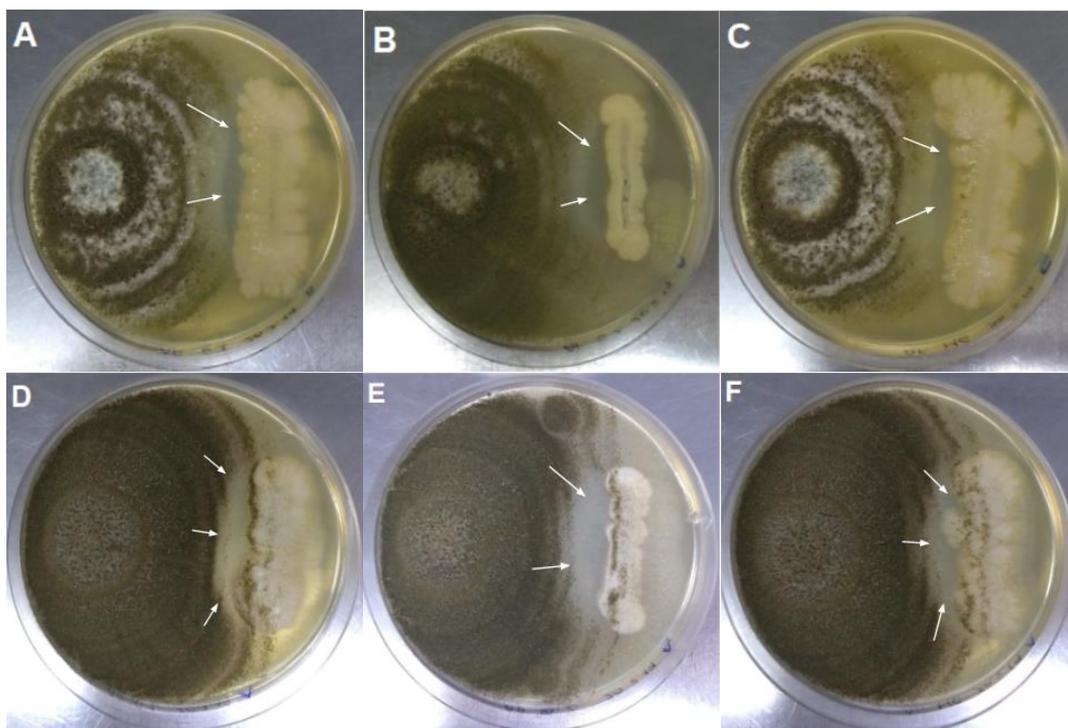


Fig. 3. Estudio de la reducción del crecimiento de *Aspergillus* sp. co-incubado con levaduras cerveceras en PDA. Las fotografías son primeros planos de los tratamientos y fueron tomadas tras 288 h de incubación. Se observa el detalle de la formación de micelio menos denso en la zona cercana a la levadura (flechas blancas). **A:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. flavus* CMUNLP15. **B:** *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. flavus* CMUNLP15. **C:** starter M6 + *A. flavus* CMUNLP15. **D:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. parasiticus* CMUNLP7. **E:** *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. parasiticus* CMUNLP7. **F:** starter M6 + *A. parasiticus* CMUNLP7. El starter M6 es el lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Principalmente, las modificaciones metodológicas aplicadas permitieron estudiar la cinética del crecimiento fúngico en presencia de las levaduras cerveceras y sus metabolitos solubles y determinar el efecto antagonista sobre la velocidad de crecimiento exponencial y la fase de latencia de *Aspergillus* sp. Las medidas de los radios fúngicos en el tiempo se sintetizan en la Tabla 2.

Tabla 2. Cinética de crecimiento de *Aspergillus* sp. en co-cultivo con levaduras cerveceras

Tratamiento/ Control	Radio micelial fúngico [cm]							
	48 h	96 h	120 h	144 h	192 h	216 h	264 h	288 h
Control Af	1,14 ± 0,08	2,70 ± 0,15	3,32 ± 0,14	3,74 ± 0,22	4,88 ± 0,33	5,37 ± 0,23	6,34 ± 0,20	6,58 ± 0,12
Af / Pk MBELGA61	1,12 ± 0,04 ^A	2,48 ± 0,07 ^A	2,98 ± 0,09 ^{A*}	3,29 ± 0,07 ^{A*}	3,80 ± 0,05 ^{AB*}	3,90 ± 0,01 ^{A*}	4,27 ± 0,28 ^{A*}	4,89 ± 0,24 ^{AB*}
Af / Sc MBELGA62	1,20 ± 0,04 ^A	2,63 ± 0,09 ^{AB}	3,02 ± 0,10 ^{A*}	3,32 ± 0,08 ^{AB*}	3,89 ± 0,35 ^{AB*}	4,22 ± 0,01 ^{A*}	4,23 ± 0,30 ^{A*}	4,27 ± 0,18 ^{A*}
Af / starter M6	1,25 ± 0,05 ^A	2,62 ± 0,03 ^{AB}	3,10 ± 0,05 ^{AB}	3,38 ± 0,13 ^{ABC*}	3,65 ± 0,15 ^{A*}	4,11 ± 0,06 ^{A*}	4,68 ± 0,09 ^{AB*}	5,48 ± 0,47 ^{B*}
Control Ap	1,33 ± 0,02	3,05 ± 0,05	3,82 ± 0,02*	4,19 ± 0,03	5,64 ± 0,06	6,32 ± 0,09	6,80 ± 0,07	6,80 ± 0,07
Ap / Pk MBELGA61	1,30 ± 0,04 ^A	2,94 ± 0,05 ^A	3,53 ± 0,05 ^{A*}	3,85 ± 0,04 ^{A*}	4,10 ± 0,15 ^{AB*}	5,11 ± 0,53 ^{B*}	5,56 ± 0,34 ^{AB*}	6,35 ± 0,19 ^A
Ap / Sc MBELGA62	1,28 ± 0,09 ^A	2,75 ± 0,10 ^{AB*}	3,30 ± 0,16 ^{AB*}	3,69 ± 0,20 ^{AB*}	4,34 ± 0,12 ^{A*}	4,36 ± 0,04 ^{A*}	5,94 ± 0,20 ^{BC}	6,31 ± 0,22 ^{AB}
Ap / starter M6	1,306 ± 0,005 ^A	2,89 ± 0,03 ^{AB}	3,50 ± 0,03 ^{A*}	3,66 ± 0,04 ^{AB*}	3,93 ± 0,06 ^{AB*}	4,22 ± 0,11 ^{A*}	6,24 ± 0,67 ^{BC}	6,41 ± 0,40 ^A

Los resultados se expresan como el promedio de los radios de crecimiento fúngico [cm] ± la desviación estándar de las medidas. Los ensayos se realizaron por triplicado en agar papa (Biokar, Francia) y las medidas se iniciaron a las 48 h. *Indica diferencia significativa con el control positivo de crecimiento fúngico correspondiente ($P < 0,05$). Letras superíndice distintas indican que existe diferencia significativa entre los radios de crecimiento de una misma especie *Aspergillus* sp. desafiada con diferentes levaduras a tiempos iguales ($P < 0,05$). Af: *A. flavus* CMUNLPI5. Ap: *A. parasiticus* CMUNLP7. Sc: *S. cerevisiae* MBELGA62. Pk: *P. kudriavzevii* MBELGA61. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

A partir de las 120 h de incubación, se detectó una reducción significativa del crecimiento de *A. flavus* CMUNLPI5 en presencia de las cepas *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61. Desde las 144 h de co-cultivo, la reducción del crecimiento de *A. flavus* se observó también en presencia del starter M6 (Tabla 2). Es notable que *A. flavus* co-incubado con *S. cerevisiae* MBELGA62 detuvo su crecimiento a las 216 h de cultivo, no detectándose aumento significativo del radio de colonia fúngica incluso 72 h después de dicha medida (288 h de incubación).

Al analizar de forma integral los datos de radios medidos y los registros fotográficos, pudo contrastarse la ausencia de crecimiento de *A. flavus* sobre la estría de la

levadura a tiempos prolongados de incubación con la reducción significativa de la tasa de crecimiento incluso transcurridas 288 h de co-cultivo (Tabla 2). Esta especie fúngica no logró formar conidios (estructuras reproductivas) en la zona cercana a las levaduras (Fig. 2A, 2B y 2F y Fig. 3A, 3B y 3C).

El crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 se limitó significativamente a las 120 h en todos los casos; incluso, se detectó reducción significativa a partir de las 96 h en presencia de *S. cerevisiae* MBELGA62 (Tabla 2). A tiempos prolongados de incubación (264 h), *A. parasiticus* CMUNLP7 incrementó su tasa de crecimiento y redujo la diferencia con el control (Tabla 2), logrando crecer y formar conidios sobre la estría de levadura a las 288 h (Fig. 3D, 3E y 3F).

Al comparar el efecto de las diferentes levaduras cerveceras sobre el crecimiento fúngico a un determinado tiempo de co-incubación, no se observaron diferencias significativas en el desarrollo de *A. flavus* CMUNLP15 en las primeras horas de ensayo. Sólo transcurridas 288 h pudo detectarse una mayor capacidad de inhibición de *S. cerevisiae* MBELGA62 sobre *A. flavus*, respecto del *starter* M6 (Tabla 2).

Para realizar este análisis sobre la cinética de *A. parasiticus* CMUNLP7, se restringieron los datos a aquellos tiempos de ensayo en los que se detectó diferencia significativa respecto del control positivo de crecimiento fúngico (hasta 216 h, Tabla 2). A las 216 h, la capacidad de reducir el desarrollo fúngico por *S. cerevisiae* MBELGA62 y el *starter* M6 fue similar y significativamente superior a la capacidad de *P. kudriavzevii* MBELGA61. En tiempos previos del ensayo no se detectaron diferencias significativas entre las levaduras.

Los resultados analizados globalmente no indican un efecto concreto de la asociación de las levaduras en el *starter* M6 respecto de las cepas cerveceras aisladas en su capacidad de inhibir a *Aspergillus* sp. y reflejan que las propiedades antagonistas de *S. cerevisiae* MBELGA62 contra *A. flavus* CMUNLP15 son significativamente más potentes ($P < 0,05$).

Ciertos autores (Armando y col., 2013) proponen que el principal mecanismo mediante el cual levaduras como *S. cerevisiae* antagonizan con hongos filamentosos es la competencia por los nutrientes. La rápida fermentación de azúcares simples en etanol, aún en condiciones aeróbicas y con un rendimiento energético inferior al que conseguiría por metabolismo respiratorio, es un mecanismo de competencia por los nutrientes bien estudiado en *S. cerevisiae*, conocido como efecto *Crabtree* (Dashko y col., 2014). Además, los compuestos solubles productos de este metabolismo antagonizan con microorganismos del nicho; el etanol, por su naturaleza tóxica, y el CO₂, por su capacidad de acidificar el medio al solubilizarse (White y Zainasheff, 2010). Ambos mecanismos, la competencia por nutrientes y la producción de

metabolitos antagonistas, podrían explicar la reducción del crecimiento de *Aspergillus* sp. en el desafío con *S. cerevisiae* MBELGA62.

P. kudriavzevii es una especie con alta velocidad de crecimiento que en condiciones de limitación de nitrógeno adopta un crecimiento invasivo, coincidente con un paradójico aumento en la producción de ésteres aromáticos a partir de aminoácidos (van Rijswijck y col., 2015). Dumlao y col. (2008) estudiaron el propósito biológico de dicha producción de ésteres, y encontraron evidencia de su rol como moléculas señalizadoras en la auto-inducción del crecimiento invasivo haploide (pseudohifal) de las levaduras. La limitación de aminoácidos induce la producción de ésteres por metilación del ácido 3-isopropilmalónico. Los autores observaron un cambio metabólico al crecimiento invasivo de levaduras haploides al agregar 3-isopropilmalato de metilo puro al medio de cultivo.

Durante los ensayos de esta tesis, tanto *P. kudriavzevii* MBELGA61 como el *starter* M6 demostraron crecimiento invasivo pseudohifal (Fig. 2B, 2D, 2E, 2F y Fig. 3A, 3C, 3D y 3F). Este comportamiento es parte de los mecanismos de antagonismo de la levadura contra *Aspergillus* sp., y podría ser indicio de la producción de compuestos volátiles inductores del cambio metabólico. En las fotografías de la figura 4 se registró con mayor detalle el crecimiento pseudohifal observado en estas levaduras.

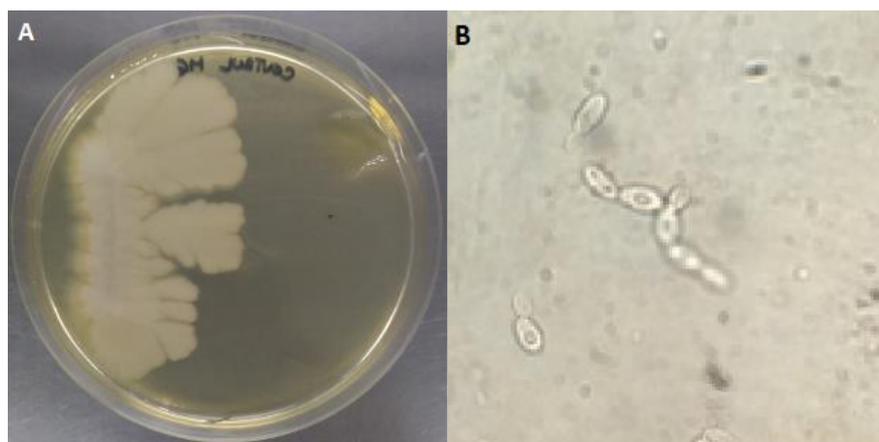


Fig 4. Crecimiento pseudohifal del *starter* M6 en placa de agar papa (Biokar, Francia) (A) y vista al microscopio óptico de la suspensión de una colonia de *P. kudriavzevii* MBELGA61 (B) (100x).

Se ha descrito que parámetros como la velocidad de crecimiento exponencial y la duración de la fase de latencia son buenos criterios para estudiar la capacidad de los hongos filamentosos de colonizar una superficie (León y col., 2012; Cavaglieri y col., 2004; Magan y Lacey, 1988). A partir de los registros de radios de crecimiento fúngico en el tiempo se graficaron las curvas de cada co-cultivo evaluado (Fig. 5A y 5B).

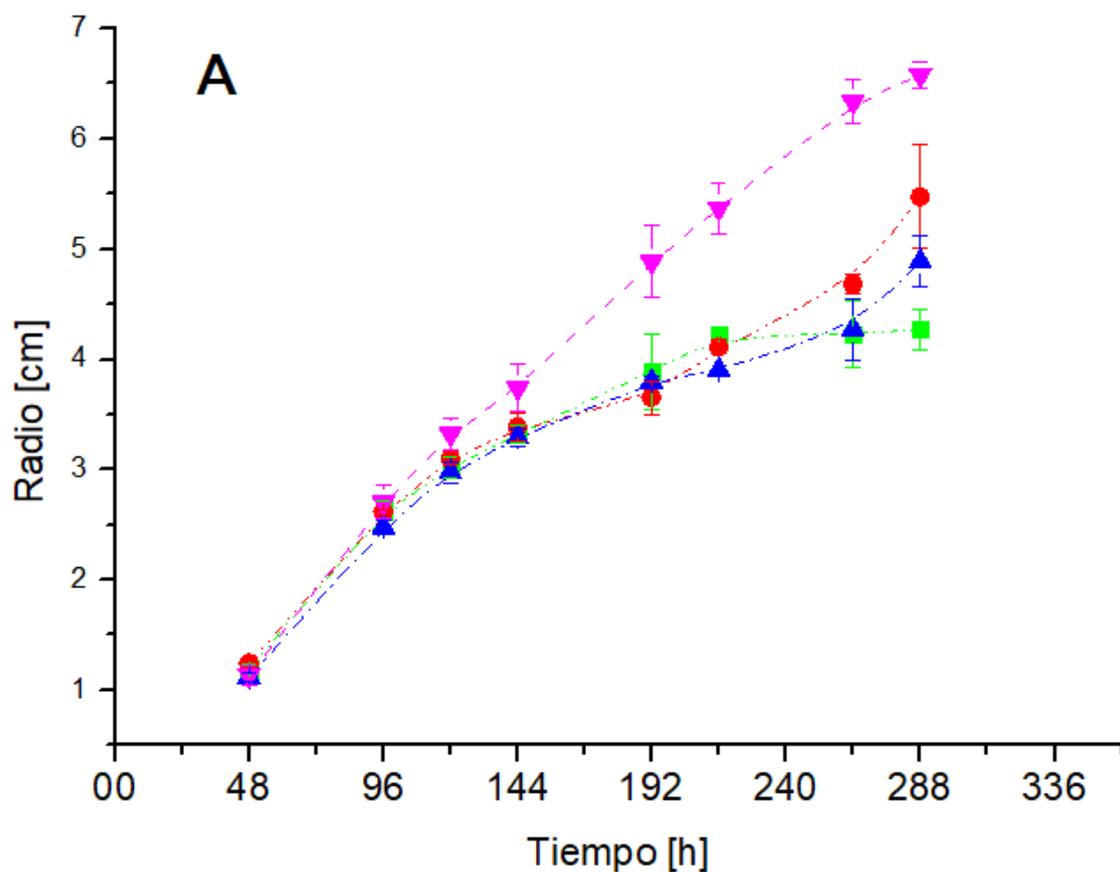


Fig. 5A. Curvas Radio micelial [cm] versus Tiempo [h] para cada uno de los tratamientos realizados sobre *A. flavus* CMUNLP15. Se grafica el promedio de los triplicados de cada tratamiento y del respectivo control positivo de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar de las medidas a cada tiempo. ■ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. flavus* CMUNLP15. ▲ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. flavus* CMUNLP15. ● Starter M6 + *A. flavus* CMUNLP15. ▼ Control positivo *A. flavus* CMUNLP15. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

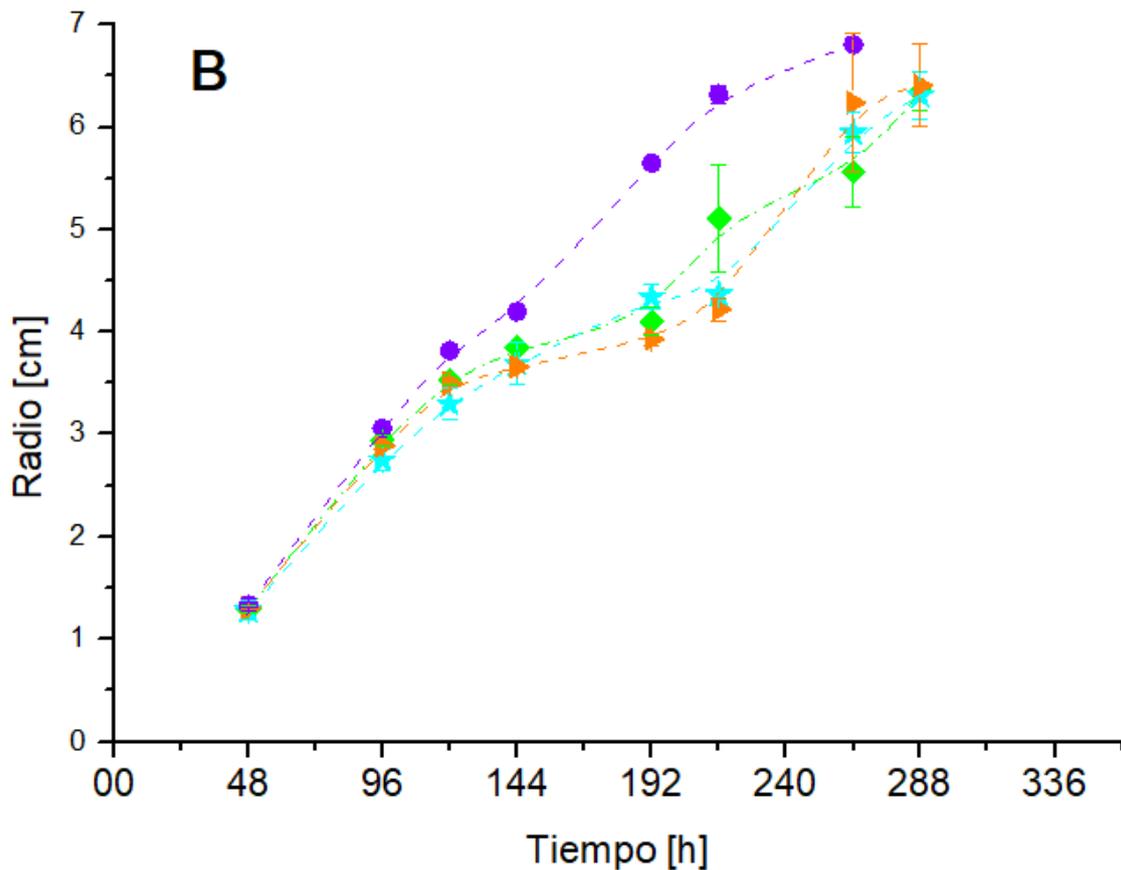


Fig. 5B. Curvas Radio micelial [cm] versus Tiempo [h] para cada uno de los tratamientos realizados sobre *A. parasiticus* CMUNLP7. Se grafica el promedio de los triplicados de cada tratamiento y el respectivo control positivo de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar de las medidas a cada tiempo. ★ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. parasiticus* CMUNLP7. ◆ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. parasiticus* CMUNLP7. ► Starter M6 + *A. parasiticus* CMUNLP7. ● Control positivo *A. parasiticus* CMUNLP7. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

A partir de las curvas de radio fúngico vs. tiempo se identificaron tres tramos lineales con pendientes diferentes; un tramo inicial de pendiente pronunciada, comprendido entre las 48 y las 96 h; un segundo tramo, durante el cual la pendiente de los tratamientos se redujo, comprendido entre las 96 h y un tiempo específico de cada tratamiento, que varió entre las 192 y las 216 h; y un tercer tramo donde la pendiente se hizo nula o se incrementó, según el tratamiento, comprendido entre el final del segundo tramo y las 288 h (Fig. 5A y 5B).

Estas diferencias de pendiente a lo largo de la co-incubación son el reflejo de distintos efectos de las levaduras cerveceras sobre la cinética de crecimiento fúngico. A continuación, se desarrolla un análisis de lo observado experimentalmente mediante el cálculo de las velocidades de crecimiento en cada etapa, tabuladas en las Tablas 3A, 3B y 3C. Las velocidades se calcularon como las pendientes de las regresiones

lineales para cada uno de los tramos identificados (Cavaglieri y col. 2004, Armando y col., 2013); los gráficos podrán apreciarse en las próximas páginas (Fig. 6A, 6B y 6C).

Primer tramo lineal de curva de crecimiento, entre las 48 y las 96 h

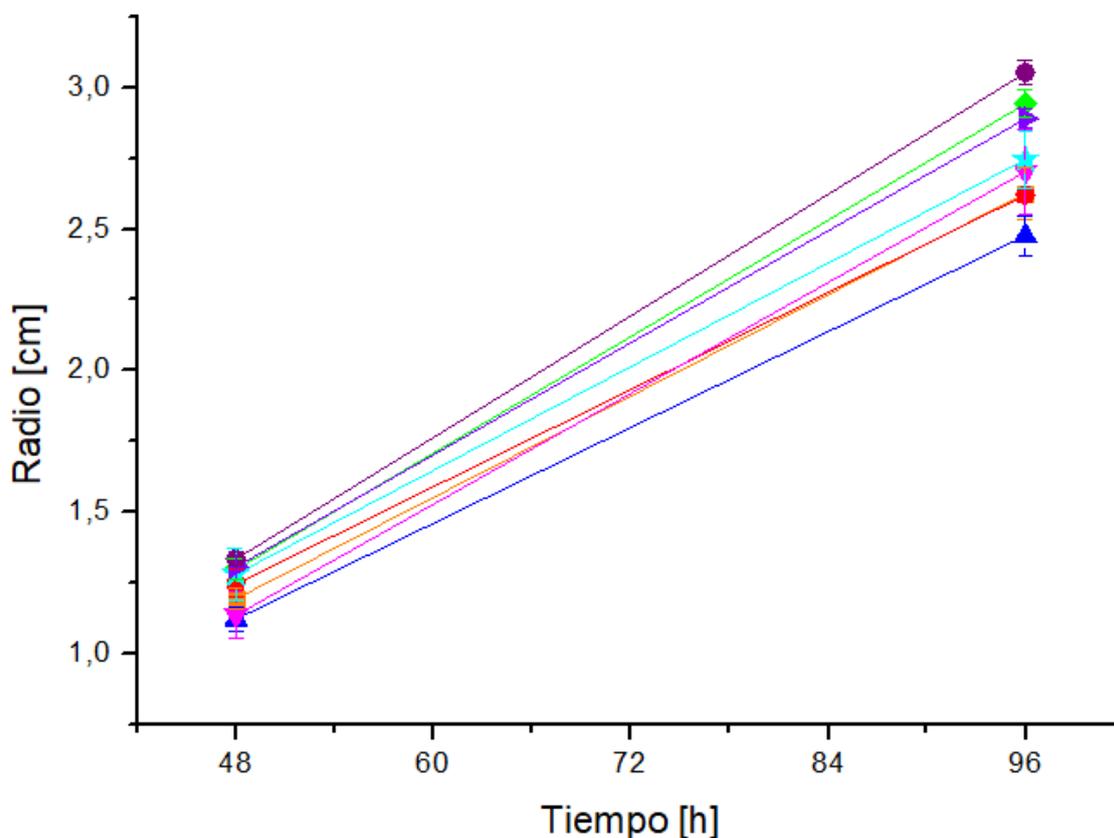


Fig. 6A. Regresión lineal calculada sobre los puntos de la curva Radio micelial [cm] versus Tiempo [h] (Fig. 5A y 5B) entre las 48 y las 96 h. Se grafica el promedio de los triplicados de cada tratamiento y los respectivos controles positivos de crecimiento fúngico. Las barras representan la desviación estándar de las medidas. ■ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. flavus* CMUNLPI5. ▲ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. flavus* CMUNLPI5. ★ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. parasiticus* CMUNLP7. ◆ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. parasiticus* CMUNLP7. ► Starter M6 + *A. parasiticus* CMUNLP7. ● Starter M6 + *A. flavus* CMUNLPI5. ▼ Control positivo *A. flavus* CMUNLPI5. ● Control positivo *A. parasiticus* CMUNLP7. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Los parámetros de crecimiento calculados a partir de las regresiones graficadas en la Fig. 6A se sintetizan en la Tabla 3A.

Tabla 3A. Parámetros de crecimiento de *Aspergillus* sp., primer tramo (48 a 96 h)

Tratamiento	Velocidad [cm/h] ^α	Tiempo de latencia [h] ^β
<i>Af</i> /Pk 61	0,0347 ± 0,0002 ^A	20,66 ± 0,50 ^A
<i>Af</i> /Sc 62	0,0357 ± 0,0002 ^{AB*}	19,61 ± 0,75 ^A
<i>Af</i> /starter M6	0,0362 ± 0,0003 ^{B*}	20,53 ± 0,13 ^A
Control <i>Af</i>	0,0341 ± 0,0011	19,77 ± 0,69
<i>Ap</i> /Pk 61	0,0406 ± 0,0006 ^{B*}	20,71 ± 0,59 ^{B*}
<i>Ap</i> /Sc 62	0,0380 ± 0,0006 ^A	20,20 ± 0,59 ^{AB}
<i>Ap</i> /starter M6	0,0400 ± 0,0002 ^{B*}	20,20 ± 0,12 ^{AB}
Control <i>Ap</i>	0,0387 ± 0,0003	19,23 ± 0,23

^αLas velocidades radiales de crecimiento fúngico se calcularon como la pendiente del tramo lineal de las curvas de crecimiento comprendido entre los tiempos 48 y 96 h (Armando y col., 2013). ^βLos tiempos de latencia se calcularon como la intersección del tramo lineal extrapolado con el eje X (Y=0) (Armando y col., 2013). Los resultados se informan como promedio de los triplicados de cada tratamiento ± la desviación estándar. *Indica diferencia significativa con el control positivo de crecimiento respectivo (P < 0,05). Letras superíndice diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos (P < 0,05). *Af*: *A. flavus* CMUNLP15. *Ap*: *A. parasiticus* CMUNLP7. *Sc*: *S. cerevisiae* MBELGA62. *Pk*: *P. kudriavzevii* MBELGA61. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Con este diseño experimental y esquema de siembra en la placa (Vero y col., 2013), únicamente *A. parasiticus* en co-cultivo con *P. kudriavzevii* MBELGA61 presentó una leve pero significativa prolongación de la fase de latencia fúngica (P < 0,05, Tabla 3A), mientras que en los restantes tratamientos no se detectaron diferencias. Adicionalmente, se registraron velocidades de crecimiento de los tratamientos levemente superiores a la velocidad de crecimiento del control. Posiblemente, la velocidad de crecimiento, consumo de nutrientes y producción de metabolitos solubles por las levaduras cerveceras no fue suficiente para limitar o retrasar el crecimiento del inóculo fúngico ubicado a 50 mm de distancia.

En etapas previas (sección 6.4.1), se estudió el efecto reductor de los metabolitos solubles producidos por las levaduras sobre la germinación de *Aspergillus* sp., donde los conidios estuvieron en contacto con dichos metabolitos desde el momento del inóculo. Sería interesante ensayar metodologías aplicadas a cultivos fúngicos en medio sólido en las cuáles los compuestos antagonistas se encontrasen en contacto con el hongo desde el momento de su inóculo. A través de técnicas que reúnen estas características, se ha demostrado el efecto de sobrenadantes de kefir y de ácidos orgánicos puros sobre la fase de latencia de *Aspergillus* sp. (Gamba y col. 2016b, León y col., 2012). Gamba y col. (2016b) estudiaron el efecto de sobrenadantes de kefir de leche con distinto pH sobre el crecimiento de una cepa *A. flavus*. Su diseño

experimental consistió en la inclusión de los sobrenadantes en el agar fundido, por lo que el agente antagonista se encontraba distribuido en toda la placa sobre la cual se sembró el hongo. Los autores determinaron un efecto antifúngico asociado a la prolongación de la fase de latencia del hongo, sin modificación significativa de la velocidad de crecimiento. En un trabajo previo, León y col. (2012) emplearon el mismo diseño experimental para determinar el efecto de adicionar distintas concentraciones de ácidos láctico y acético puros al agar. Los autores encontraron que el aumento de la concentración de ácidos no disociados guarda correlato con la reducción de la velocidad de crecimiento y la prolongación de la fase de latencia de cepas *A. flavus*, toxigénicas y no toxigénicas.

Estos reportes sustentan la hipótesis de que la distancia experimental entre el inóculo de *Aspergillus* sp. y el agente antagonista (la levadura cervecera y sus metabolitos solubles) pudo condicionar la observación de un efecto sobre la fase de latencia fúngica. Del mismo modo puede explicarse el escaso o nulo efecto sobre la velocidad de crecimiento de *Aspergillus* sp. en esta primera etapa (Tabla 3A).

Segundo tramo lineal de la curva de crecimiento, entre las 96 y las 192-216 h

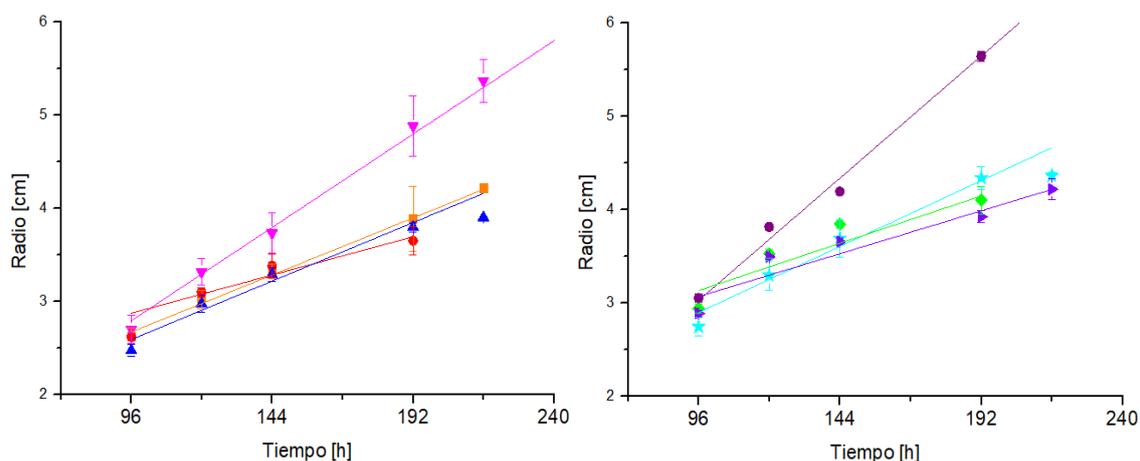


Fig. 6B. Regresión lineal calculada sobre los puntos de la curva Radio micelial [cm] versus Tiempo [h] (Fig. 5A y 5B) entre las 96 h y un tiempo específico de cada tratamiento. Se grafica el promedio de los triplicados de cada tratamiento y los respectivos controles positivos de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar de las medidas a cada tiempo. (5A): ■ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. flavus* CMUNLPI5 (96 a 216 h). ▲ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. flavus* CMUNLPI5 (96 a 216 h). (5B): ★ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. parasiticus* CMUNLP7 (96 a 216 h). ◆ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. parasiticus* CMUNLP7 (96 a 192 h). ► Starter M6 + *A. parasiticus* CMUNLP7 (96 a 216 h). ● Starter M6 + *A. flavus* CMUNLPI5 (96 a 192 h). ▼ Control positivo *A. flavus* CMUNLPI5. ● Control positivo *A. parasiticus* CMUNLP7. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Los parámetros de crecimiento calculados a partir de las regresiones graficadas en la figura 6B se sintetizan en la Tabla 3B.

Tabla 3B. Velocidades de crecimiento radial de micelio de *Aspergillus* sp., tramo 96 a 192-216 h

Tratamiento	Velocidad [cm/h] ^α	% Reducción de tasa crecimiento ^β	Relación velocidad primer tramo/ segundo tramo
Af/Pk 61	0,0146 ± 0,0007 ^{AB*}	57,2 ± 2,0	2,4
Af/Sc 62	0,0174 ± 0,0010 ^{B*}	49,0 ± 2,9	2,1
Af/starter M6	0,0133 ± 0,0018 ^{A*}	60,9 ± 5,4	2,7
Control Af	0,0341 ± 0,0011		
Ap/Pk 61	0,0175 ± 0,0008 ^{B*}	54,9 ± 2,4	2,3
Ap/Sc 62	0,0178 ± 0,0002 ^{B*}	54,1 ± 0,5	2,1
Ap/starter M6	0,0135 ± 0,0008 ^{A*}	63,8 ± 4,3	2,9
Control Ap	0,0387 ± 0,0003		

^αLas velocidades radiales de crecimiento fúngico se calcularon como la pendiente del tramo lineal de las curvas de crecimiento comprendido entre los tiempos 96 y 192-216 h (Armando y col., 2013). Los valores se calcularon como promedio de los triplicados de cada tratamiento. ± la desviación estándar. ^βEl porcentaje de reducción de la tasa de crecimiento se calculó respecto de la velocidad de crecimiento del respectivo control positivo. *Indica diferencia significativa con el control positivo de crecimiento correspondiente (P < 0,05). Letras superíndice diferentes indican diferencia significativa entre las velocidades radiales de los tratamientos (P < 0,05). Af: *A. flavus* CMUNLP15. Ap: *A. parasiticus* CMUNLP7. Sc: *S. cerevisiae* MBELGA62. Pk: *P. kudriavzevii* MBELGA61. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Si bien durante la etapa inicial de co-incubación (hasta las 96 h) no se observó efecto antagónico sobre el crecimiento fúngico, conforme el hongo creció y avanzó en dirección a la estría de levadura (> 96 h) su velocidad de crecimiento se redujo de forma significativa (P < 0,05, Tabla 3B), presumiblemente por la presencia de los metabolitos solubles secretados y un medio nutricionalmente agotado por las levaduras cerveceras.

De acuerdo a las velocidades radiales de crecimiento calculadas en el segundo tramo, todas las levaduras cerveceras tuvieron efecto reductor sobre *Aspergillus* sp. *A. flavus* CMUNLP15 redujo su velocidad de crecimiento radial en magnitud significativamente superior frente al starter M6 respecto de cuando se enfrentó a *S. cerevisiae* MBELGA62 (P < 0,05, Tabla 3B). *A. parasiticus* CMUNLP7 presentó una reducción de

la velocidad significativamente mayor cuando fue co-incubado con el *starter* M6 que cuando se lo hizo con *S. cerevisiae* MBELGA62 o *P. kudriavzevii* MBELGA61 ($P < 0,05$, Tabla 3B). De acuerdo a estos datos, el efecto del *starter* M6 sobre *Aspergillus* sp. durante esta etapa fue significativamente más potente que el efecto de las levaduras cerveceras aisladas.

Al comparar las velocidades del primer y segundo tramos lineales, se detectó una reducción de este parámetro de entre 2,1 y 2,9 veces (Tabla 3B). Esta reducción en la tasa de crecimiento fúngico observada cuando la distancia entre *Aspergillus* sp. y las levaduras disminuyó indica que, en las condiciones adecuadas, las levaduras cerveceras tienen potencial para ser incluidas como agentes biocontroladores en matrices alimentarias. Como conclusión parcial, el diseño de un alimento adicionado con levaduras cerveceras debería considerar la ubicuidad de las levaduras que garantice su cercanía con los hongos contaminantes.

Cabe destacar que si se hubiese limitado el período de incubación de acuerdo a los protocolos publicados (Vero y col., 2013) (menos de 96 h), estos experimentos hubiesen concluido en un efecto antagónico nulo de las levaduras sobre *Aspergillus* sp. La modificación metodológica aplicada permitió determinar una reducción significativa de la velocidad de crecimiento a partir de las 96 h (Tabla 3B, Fig. 6B).

Tercer tramo lineal de la curva de crecimiento, entre las 192-216 y las 288 h

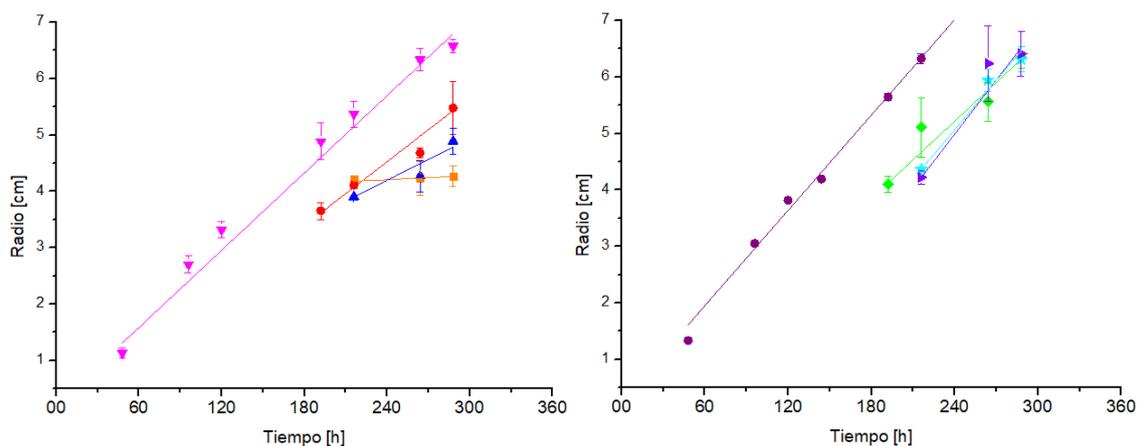


Fig. 6C. Regresión lineal calculada sobre los puntos de la curva Radio micelial [cm] versus Tiempo [h] (Fig. 5A y 5B) entre las 192-216 h y las 288 h. Se grafica el promedio de los triplicados de cada tratamiento. Las barras representan la desviación estándar de las medidas a cada tiempo (5A): ■ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. flavus* CMUNLPI5 (216 h a 288h). ▲ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. flavus* CMUNLPI5 (216 a 288 h). M6 + flavus y control flavus. (5B): ★ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. parasiticus* CMUNLP7 (216 a 288 h). ◆ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. parasiticus* CMUNLP7 (192 a 288 h). ► *Starter* M6 + *A. parasiticus* CMUNLP7 (216 a 288 h). ● *Starter* M6 + *A. flavus* CMUNLPI5 (192 a 288 h). ▼ Control positivo *A. flavus* CMUNLPI5. ● Control positivo *A. parasiticus* CMUNLP7. *Starter* M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Los parámetros de crecimiento calculados a partir de las regresiones graficadas en la figura 6C se sintetizan en la Tabla 3C.

Tabla 3C. Velocidades de crecimiento radial de *Aspergillus* sp., tercer tramo

Tratamiento	Velocidad [cm/h] ^α	% Reducción de tasa crecimiento ^β	Relación velocidad tercer tramo/ segundo tramo
<i>Af/Pk 61</i>	0,0079 ± 0,0030 ^{AB*}	76,9 ± 8,8	0,5
<i>Af/Sc 62</i>	0,0021 ± 0,0071 ^{A*}	93,8 ± 20,9	0,1
<i>Af/starter M6</i>	0,0156 ± 0,0030 ^{B*}	54,3 ± 8,9	1,2
Control <i>Af</i>	0,0341 ± 0,0011		
<i>Ap/Pk 61</i>	0,0155 ± 0,0034 ^{A*}	60,0 ± 8,7	0,9
<i>Ap/Sc 62</i>	0,0191 ± 0,0040 ^{A*}	50,9 ± 10,2	1,1
<i>Ap/starter M6</i>	0,0243 ± 0,0092 ^{A*}	37,2 ± 23,7	1,8
Control <i>Ap</i>	0,0387 ± 0,0003		

^αLas velocidades radiales de crecimiento fúngico se calcularon como la pendiente del tramo lineal de las curvas de crecimiento comprendido entre los tiempos 192-216 y 288 h (Armando y col., 2013). Los valores se calcularon como promedio de los triplicados de cada tratamiento. ± la desviación estándar. ^βEl porcentaje de reducción de la tasa de crecimiento se calculó respecto de la velocidad de crecimiento del respectivo control positivo. *Indica diferencia significativa con el control positivo de crecimiento correspondiente (P < 0,05). Letras superíndice diferentes indican diferencia significativa entre las velocidades radiales de los tratamientos (P < 0,05). *Af*: *A. flavus* CMUNLP15. *Ap*: *A. parasiticus* CMUNLP7. *Sc*: *S. cerevisiae* MBELGA62. *Pk*: *P. kudriavzevii* MBELGA61. *Starter M6*: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Durante el último tramo de co-incubación se observaron efectos diferentes de las levaduras cerveceras sobre *A. flavus* CMUNLP15 y *A. parasiticus* CMUNLP7 (Fig. 6C). *A. flavus* CMUNLP15 presentó reducción significativa del crecimiento (P < 0,05) frente a *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62. En el tratamiento con *S. cerevisiae* MBELGA62 se observó el amesetamiento de la curva (Fig. 5C), con una reducción de la velocidad de alrededor de un 90% (Tabla 3C), que puede interpretarse como inhibición del crecimiento.

Por el contrario, *A. parasiticus* CMUNLP7 no redujo su velocidad en este tramo frente a ninguna de las levaduras estudiadas (Tabla 3C). Al comparar las velocidades de los tramos tercero y segundo, se observa una recuperación de la tasa de crecimiento fúngico. Una posible interpretación se vincula al envejecimiento y muerte de las levaduras a tiempos prolongados de incubación. Esto tiene como consecuencias, por

un lado, la interrupción de la producción de metabolitos solubles antagonistas. Por otro, la citólisis de las levaduras, liberando su contenido celular nutritivo, que pudo ser aprovechado como sustrato de crecimiento por *A. parasiticus*.

Llamativamente, el *starter* M6, que fue el antagonista más efectivo durante el segundo tramo de incubación (Tabla 3B, Fig. 6B), durante el tercer tramo fue la única levadura superada por ambas especies fúngicas, logrando *Aspergillus* sp. recuperar la tasa de crecimiento (Tabla 3C).

Numerosos autores han reportado la capacidad de diversas especies de levaduras de actuar como agentes biocontroladores del crecimiento de hongos filamentosos y de la producción de micotoxinas. Bleve y col. (2006) reportaron el aislamiento de levaduras antagonistas a partir de la microbiota epifita de variedades de vid Negroamaro. Dos cepas *Issatchenkia orientalis* (ahora *P. kudriavzevii*), una *Metschnikowia pulcherrima*, una *Kluyveromyces thermotolerans*, una *Issatchenkia terricola* y una *Candida incommunis* fueron seleccionadas por presentar actividad *killer* contra *A. carbonarius* y *A. niger*, principales productores de OTA en uva, y capacidad de competir con estas especies por nutrientes. Las cepas *P. kudriavzevii* fueron las mejores antagonistas de la germinación fúngica en heridas realizadas en la piel de uvas frescas.

Más recientemente, Armando y col. (2013) reportaron el aislamiento de dos cepas *S. cerevisiae*, RC008 y RC016, capaces de capturar AFB₁ y de inhibir a *A. carbonarius* y *Fusarium graminearum*. Los investigadores comprobaron la capacidad de estas levaduras de reducir la producción de OTA, ZEA y deoxinivalenol (DON) por parte de los hongos patógenos y propusieron su implementación como aditivos biocontroladores en alimento balanceado para ganado.

Estos autores observaron que *F. graminearum* fue más sensible que la cepa *Aspergillus*. Al analizar sus datos de reducción de la velocidad de crecimiento de *A. carbonarius* en condiciones similares a las empleadas en nuestro laboratorio (agar papa-dextrosa, pH 5,6 ± 0,2, a_w 0,99, 30 °C, aireación normal), estos varían entre un 25% y un 80%, según la cepa *S. cerevisiae* estudiada. La fase de latencia fúngica en las mismas condiciones se prolongó entre un 30 y un 60% (Armando y col., 2013). Cuando las mismas cepas biocontroladoras *S. cerevisiae* fueron co-incubadas con una cepa *A. parasiticus* (Armando y col., 2012), sólo una de ellas fue capaz de reducir la velocidad de crecimiento en un 70%, mientras que la otra no mostró efecto alguno. Durante los mismos ensayos los autores comprobaron un aumento de los tiempos de latencia de 30 y 50%, según la cepa *S. cerevisiae* estudiada. Datos consistentes con estos resultados fueron obtenidos por investigadores de nuestro grupo. Gamba y col. (2016a) determinaron que las concentraciones de SLC de permeado de suero de lechería fermentado con kefir necesarias para inhibir la germinación de *F.*

graminearum fueron significativamente menores que las necesarias para inhibir a *A. parasiticus* (Gamba y col., 2015b, 2016a).

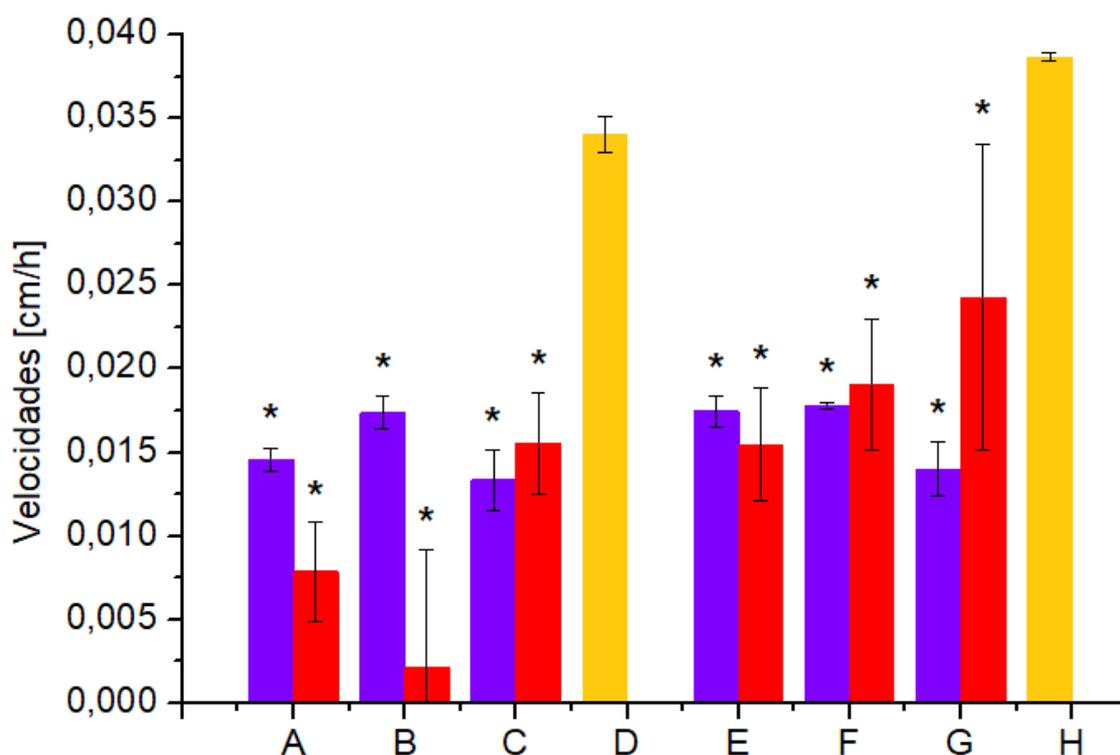


Fig 7. Velocidades radiales de crecimiento fúngico [cm/h] en presencia de levaduras cerveceras. Se representa el promedio del triplicado de cada tratamiento y de los controles positivos de crecimiento fúngico. Las barras de error representan la desviación estándar entre las réplicas. Los controles positivos de crecimiento se realizaron en PDA en ausencia de levaduras. *Indica diferencia significativa con el control respectivo. Barras ■: velocidades calculadas en el tramo de 96 a 192-216 h. Barras ■: velocidades calculadas en el tramo 192-216 a 288 h. Barras ■: velocidades de los controles positivos de crecimiento. **A:** *A. flavus* CMUNLPI5 y *P. kudriavzevii* MBELGA61. **B:** *A. flavus* CMUNLPI5 y *S. cerevisiae* MBELGA62. **C:** *A. flavus* CMUNLPI5 y *starter* M6. **D:** control positivo *A. flavus* CMUNLPI5. **E:** *A. parasiticus* CMUNLP7 y *P. kudriavzevii* MBELGA61. **F:** *A. parasiticus* CMUNLP7 y *S. cerevisiae* MBELGA62. **G:** *A. parasiticus* CMUNLP7 y *starter* M6. **H:** control positivo *A. parasiticus* CMUNLP7. *Starter* M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Durante el presente trabajo, las levaduras cerveceras seleccionadas lograron reducir las velocidades de crecimiento radial de *A. flavus* CMUNLPI5 entre un 49,0 y un 60,9% y las velocidades de *A. parasiticus* CMUNLP7 entre un 54,1 y un 63,8%, durante el período de incubación desde las 96 a las 216 h (Tabla 3B, Fig. 7, barras violetas). Posteriormente, *A. flavus* CMUNLPI5 fue inhibido por *S. cerevisiae* MBELGA62 y reducida su tasa de crecimiento por *P. kudriavzevii* MBELGA61 en un 60,0% respecto del control y por el *starter* M6 en un 37,2% (Tabla 3C, Fig. 7, barras rojas A y B). Estos resultados se presentan como promisorios para continuar el estudio de las propiedades antagónicas de las levaduras cerveceras sobre el desarrollo fúngico.

6.4.3. Estudio de la reducción del crecimiento de *Aspergillus* sp. por compuestos volátiles producidos por levaduras cerveceras

Una vez concluida la caracterización de las propiedades biocontroladoras de los metabolitos secretados por las levaduras cerveceras, se avanzó en el estudio de los metabolitos volátiles que producen y su efecto en la germinación de conidios y el crecimiento micelial de hongos filamentosos. La actividad antifúngica de compuestos volátiles (VOCs) producidos por levaduras se encuentra documentada (Muccilli y Restuccia, 2015); en el contexto de esta tesis, resulta de especial interés una publicación que caracteriza en profundidad de la actividad antagonista de los VOCs de una cepa *P. kudriavzevii* contra *A. flavus* toxigénico (Hua y col., 2014).

En ensayos descritos en la sección 3.24, se incubaron placas de agar papa (Biokar, Francia) sembradas con *Aspergillus* sp. en micro-atmósferas de VOCs producidos por las levaduras cerveceras y se midió el diámetro de la colonia fúngica en el tiempo. La figura 8 ilustra los experimentos y los resultados se sintetizan a continuación en la Tabla 4.

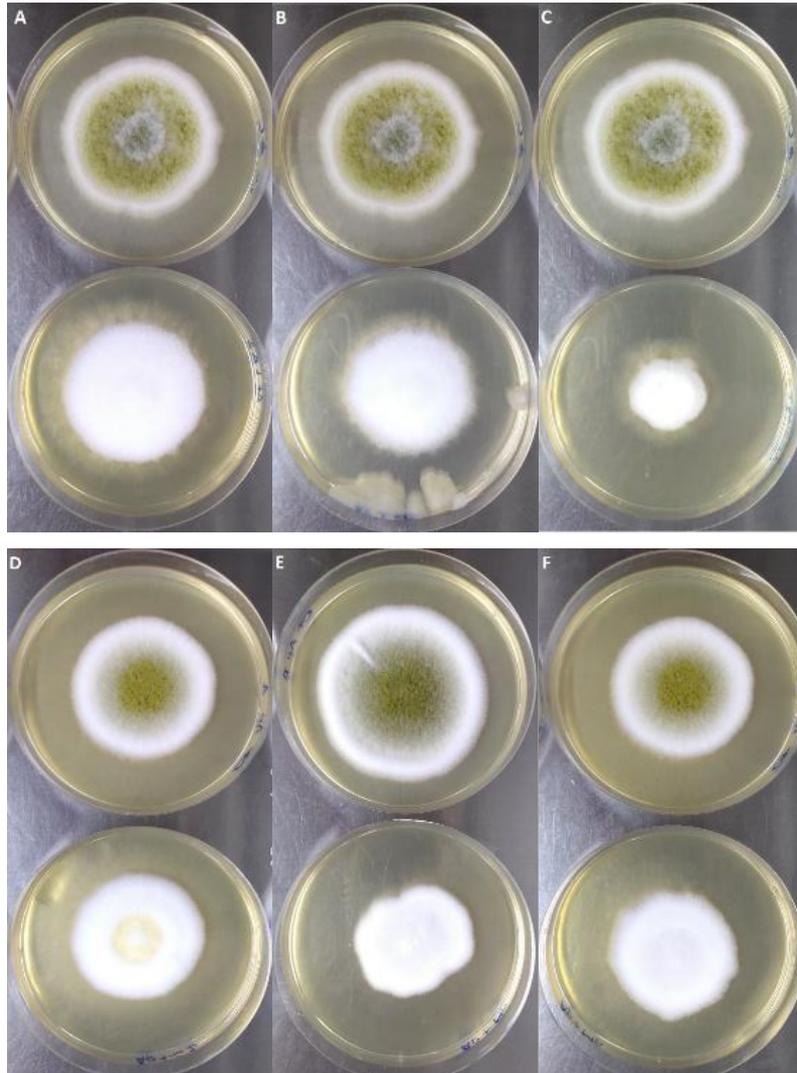


Fig. 8. Estudio de la reducción del crecimiento de *Aspergillus* sp. por compuestos volátiles producidos por levaduras cerveceras. Las fotografías fueron tomadas transcurridas 240 h de incubación, e incluyen tratamiento (placa inferior) y su respectivo control positivo (placa superior). **A:** *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. flavus* CMUNLP15. **B:** starter M6 + *A. flavus* CMUNLP15. **C:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. flavus* CMUNLP15. **D:** *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. parasiticus* CMUNLP7. **E:** starter M6 + *A. parasiticus* CMUNLP7. **F:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. parasiticus* CMUNLP7.

En las fotografías de la figura 8 se observa con claridad que *Aspergillus* sp. incubado en micro-atmósfera de volátiles de levaduras cerveceras desarrolla un micelio de menor diámetro que el control y no forma conidios. Similares observaciones pudieron realizarse cuando se co-incubó a *Aspergillus* sp. con las levaduras cerveceras (Fig. 1). Masih y Paul (2002) observaron fenómenos similares al co-incubar *B. cinerea* con la levadura antagonista *Pichia membranifaciens*. Los autores reportaron una pequeña zona de inhibición fúngica alrededor del inóculo de levadura en el agar y la ausencia

de conidios en la zona cercana al halo de inhibición. Además, cuando el micelio de *B. cinerea* se co-cultivó con *P. membranifaciens* en caldo papa-dextrosa, fue incapaz de germinar y producir las colonias grises típicas al ser inoculado posteriormente en PDA.

Tabla 4. Cinética de crecimiento de *Aspergillus* sp. en micro-atmósfera de compuestos volátiles de levaduras cerveceras

Tratamiento	Diámetro fúngico [cm]					
	24 h	48 h	72 h	120 h	168 h	240 h
Control Ap	0,96 ± 0,02	2,68 ± 0,03	4,10 ± 0,07	5,54 ± 0,31	7,22 ± 0,22	8,95 ± 0,04
Ap/Pk MBELGA61	n/d ^{*A}	0,44 ± 0,38 ^{*AB}	0,83 ± 0,22 ^{*A}	2,75 ± 0,27 ^{*BC}	3,93 ± 0,18 ^{*B}	5,12 ± 0,48 ^{*AB}
Ap/Sc MBELGA62	n/d ^{*A}	0,99 ± 0,11 ^{*AB}	1,82 ± 0,62 ^{*B}	2,75 ± 0,43 ^{*D}	4,52 ± 0,41 ^{*B}	6,22 ± 0,16 ^{*B}
Ap/starter M6	n/d ^{*A}	0,79 ± 0,11 ^{*AB}	1,16 ± 0,32 ^{*AB}	3,72 ± 0,33 ^{*BC}	3,72 ± 0,39 ^{*B}	5,81 ± 0,49 ^{*B}
Control Af	0,81 ± 0,11	2,35 ± 0,26	3,63 ± 0,29	5,49 ± 0,19	6,94 ± 0,17	8,92 ± 0,05
Af/Pk MBELGA61	n/d ^{*A}	0,26 ± 0,45 ^{*A}	0,44 ± 0,77 ^{*A}	1,48 ± 0,24 ^{*A}	2,33 ± 0,30 ^{*A}	4,27 ± 0,25 ^{*A}
Af/Sc MBELGA62	n/d ^{*A}	1,02 ± 0,07 ^{*B}	1,94 ± 0,11 ^{*B}	3,35 ± 0,19 ^{*CD}	4,2 ± 0,1 ^{*B}	5,55 ± 0,13 ^{*B}
Af/starter M6	n/d ^{*A}	0,27 ± 0,47 ^{*AB}	1,02 ± 0,33 ^{*AB}	2,27 ± 0,35 ^{*AB}	3,70 ± 0,92 ^{*B}	5,53 ± 0,53 ^{*B}

Los resultados se expresan como el promedio de los diámetros fúngicos [cm] ± la desviación estándar de triplicados de cada tratamiento. n/d = micelio fúngico no detectable. *Indica diferencia significativa con el control positivo de crecimiento fúngico correspondiente ($P < 0,05$). Letras superíndice distintas indican diferencia significativa entre los diámetros de colonia de una misma cepa *Aspergillus* sp. desafiada con distintas levaduras medidos a un determinado tiempo de incubación ($P < 0,05$). Af: *A. flavus* CMUNLPI5. Ap: *A. parasiticus* CMUNLP7. Sc: *S. cerevisiae* MBELGA62. Pk: *P. kudriavzevii* MBELGA61. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

De acuerdo a los resultados informados en la Tabla 4, el crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 y *A. flavus* CMUNLPI5 es inhibido desde etapas iniciales por compuestos volátiles producidos por las levaduras cerveceras.

La producción de compuestos volátiles en base al catabolismo de aminoácidos se inicia con su transaminación a alfa-cetoácidos, seguida de la decarboxilación para producir el correspondiente aldehído superior. Estos se reducen u oxidan alternativamente en alcoholes o ácidos superiores, a partir de los cuales se formarán

ésteres aromáticos. van Rijswijck y col. (2015) describieron una alta producción de ésteres aromáticos por el género *Pichia* cuando crece en condiciones de limitación de nitrógeno.

Se ha reportado que el compuesto aromático 2-feniletanol producido por *Pichia anomala* inhibe la germinación de esporas y la biosíntesis de AFB₁ de una cepa de *A. flavus* (Hua y col., 2014). Los autores determinaron que la exposición al 2-feniletanol redujo unas 10000 veces la expresión de genes involucrados en la síntesis de aflatoxina, como aflC (policétido sintasa), aflR (regulador positivo de la síntesis), aflS (potenciador de la transcripción), aflO (O-metiltransferasa B) y aflK (versicolorin B sintasa). Adicionalmente, el volátil alteró la expresión de algunos genes modificadores de cromatina, influenciando negativamente el crecimiento fúngico.

A partir de los ensayos realizados durante esta tesis, se comprobó la capacidad de las levaduras cerveceras de producir compuestos volátiles con efecto negativo sobre la germinación y crecimiento de *Aspergillus* sp. Pudo determinarse que transcurridas 24 h de incubación en micro-atmósfera de metabolitos volátiles de levaduras, *Aspergillus* sp. no fue capaz de desarrollar micelio detectable, produciéndose la inhibición total del crecimiento fúngico (Tabla 4). Esto se traduce en una prolongación significativa del tiempo de latencia en presencia de VOCs de levaduras cerveceras. Es notable el efecto de *P. kudriavzevii* MBELGA61 sobre este parámetro, que prolonga la fase de latencia de *Aspergillus* sp. más allá de las 48 h. El mismo comportamiento se observa en *A. flavus* incubado en micro-atmósfera de volátiles del *starter* M6 (Fig. 9A y 9B).

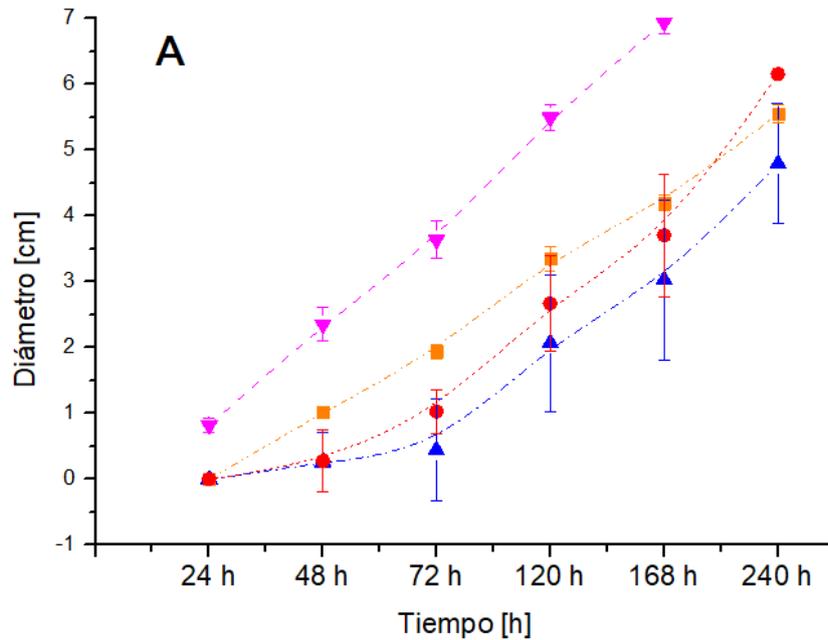


Fig. 9A. Curvas Diámetro [cm] versus Tiempo [h] para *A. flavus* CMUNLPI5 creciendo en presencia de compuestos volátiles de levaduras cerveceras. Se grafica el promedio de los triplicados de cada tratamiento y el respectivo control positivo de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar de las medidas a cada tiempo. ■ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. flavus* CMUNLPI5. ▲ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. flavus* CMUNLPI5. ● Starter M6 + *A. flavus* CMUNLPI5. ▼ Control positivo *A. flavus* CMUNLPI5. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

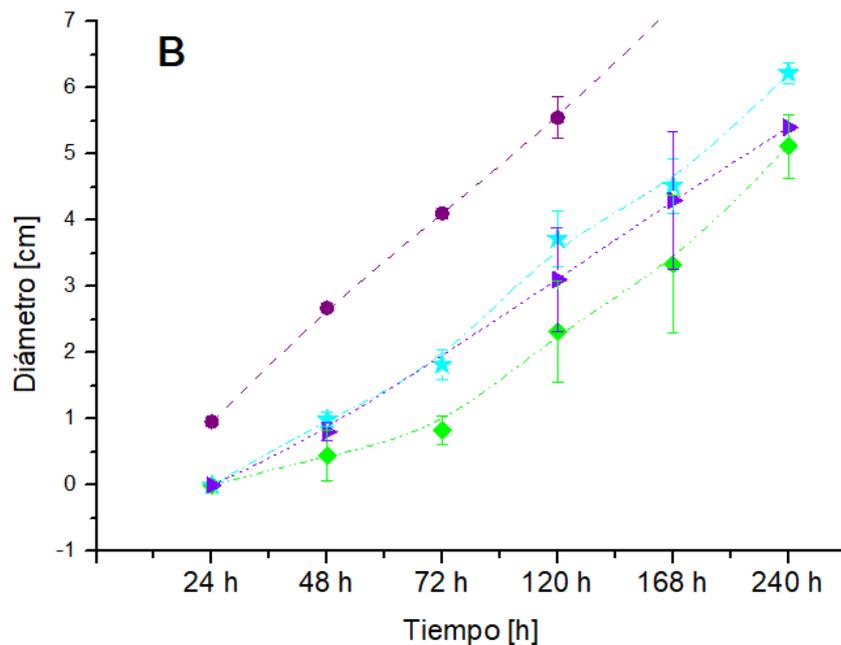


Fig. 9B. Curvas Diámetro [cm] versus Tiempo [h] para *A. parasiticus* CMUNLP7 creciendo en presencia de compuestos volátiles de levaduras cerveceras. Se grafica el promedio de los triplicados de cada tratamiento y el respectivo control positivo de crecimiento. Las barras representan la desviación estándar de las medidas a cada tiempo. ★ *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. parasiticus* CMUNLP7. ◆ *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. parasiticus* CMUNLP7. ► Starter M6 + *A. parasiticus* CMUNLP7. ● Control positivo *A. parasiticus* CMUNLP7. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Desde las 48 h de incubación y hasta finalizar el ensayo, el crecimiento de *Aspergillus* sp. en presencia de metabolitos volátiles de levaduras cerveceras se redujo significativamente respecto de los controles positivos de crecimiento (Tabla 4, Fig. 9).

A partir de las 72 h de incubación se observó diferencia significativa en el efecto inhibitorio desarrollado por las diferentes levaduras (Tabla 4). Tanto *A. parasiticus* CMUNLP7 como *A. flavus* CMUNLP15 presentaron una reducción del crecimiento significativamente mayor cuando el hongo se expuso a micro-atmósfera de volátiles de *P. kudriavzevii* MBELGA61 (Fig. 9).

Para profundizar la comprensión acerca del fenómeno observado, se calcularon los parámetros de crecimiento de *Aspergillus* sp. en presencia de VOCs de levaduras y se los contrastó con los parámetros de crecimiento fúngico en ausencia de volátiles. La velocidad de crecimiento diametral [cm/h] se calculó sobre la porción lineal de la curva de crecimiento (Fig. 9). Los parámetros calculados se sintetizan en la Tabla 5.

Tabla 5. Velocidad de crecimiento de *Aspergillus* sp. en micro-atmósfera de volátiles de levaduras cerveceras

Tratamiento	Velocidad [cm/h] ^α	% Reducción de velocidad ^β	Tiempo de latencia [h] ^δ
Control Ap	0,032 ± 0,001		8,7 ± 0,4
Ap / Pk MBELGA61	0,018 ± 0,005 ^{A*}	43,4 ± 16,0	53,2 ± 6,5 ^{BC*}
Ap / Sc MBELGA62	0,024 ± 0,002 ^A	24,3 ± 7,2	37,2 ± 1,4 ^{A*}
Ap / starter M6	0,020 ± 0,003 ^A	38,4 ± 7,8	41,3 ± 2,2 ^{AB*}
Control Af	0,0312 ± 0,0008		9,5 ± 1,5
Af / Pk MBELGA61	0,017 ± 0,006 ^{A*}	57,5 ± 5,7	72,0 ± 0,4 ^{D*}
Af / Sc MBELGA62	0,0217 ± 0,0006 ^{A*}	30,5 ± 2,1	32,8 ± 1,5 ^{A*}
Af / starter M6	0,021 ± 0,004 ^{A*}	41,3 ± 9,5	55,6 ± 8,4 ^{C*}

^αLas velocidades de crecimiento fúngico de los tratamientos se calcularon como la pendiente del tramo lineal de las curvas de crecimiento comprendido entre los tiempos 72 y 240 h (Armando y col., 2013). ^βEl porcentaje de reducción de la tasa de crecimiento se calculó respecto de la velocidad de crecimiento del respectivo control positivo. ^δLos tiempos de latencia se calcularon como la intersección del tramo lineal extrapolado con el eje X (Y=0) (Armando y col., 2013). Los resultados se informan como promedio de los triplicados de cada tratamiento ± la desviación estándar. *Indica diferencia significativa con el control positivo de crecimiento correspondiente (P < 0,05). Letras superíndice diferentes indican diferencia significativa entre los tratamientos (P < 0,05). Af: *A. flavus* CMUNLP15. Ap: *A. parasiticus* CMUNLP7. Sc: *S. cerevisiae* MBELGA62. Pk: *P. kudriavzevii* MBELGA61. Starter M6: Iodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Los resultados informados en la Tabla 5 muestran que la micro-atmósfera de volátiles de levaduras cerveceras redujo significativamente la velocidad de crecimiento de *A. flavus* ($P < 0,05$), con reducciones entre el 30,5 y el 57,5%. Únicamente *P. kudriavzevii* MBELGA61 logró reducir significativamente la velocidad de crecimiento de *A. parasiticus* CMUNLP7 en un 43,4%.

El mayor impacto de la micro-atmósfera de volátiles de levaduras cerveceras sobre el crecimiento de *Aspergillus* sp. se observó en la fase de latencia fúngica, que se prolongó significativamente ($P < 0,05$) en todos los tratamientos (Tabla 5).

Los valores de diámetros (Tabla 4) y velocidades de crecimiento fúngico (Tabla 5) registrados en presencia de compuestos volátiles del *starter* M6 no presentan diferencia significativa con los determinados en presencia de volátiles de las cepas cerveceras aisladas. Esto sugiere que no existe un efecto sinérgico de los metabolitos volátiles producidos por ambas cepas presentes en el *starter* M6. El resultado obtenido puede interpretarse como el efecto sobre el crecimiento fúngico generado por una micro-atmósfera que contiene presiones relativas de los volátiles producidos por cada levadura, inferiores a las presiones que cada volátil acumula cuando se estudia una levadura aislada. De acuerdo a esta hipótesis, la reducción del crecimiento fúngico depende de la naturaleza y concentración (presión parcial) de los metabolitos volátiles acumulados en la micro-atmósfera de cultivo del hongo (Fig. 10).

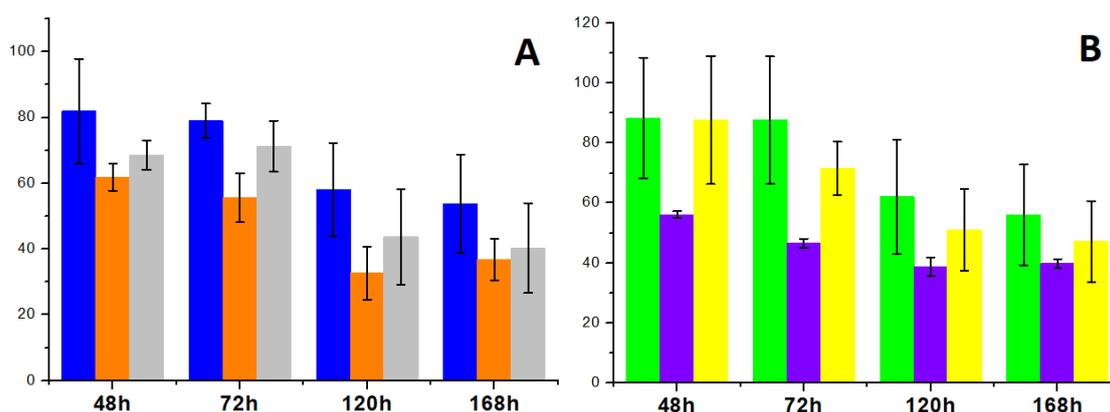


Fig. 10. Reducción porcentual del crecimiento fúngico en presencia de compuestos volátiles producidos por levaduras cerveceras. Las columnas representan el promedio y las barras de error la desviación estándar del triplicado de cada tratamiento. Los porcentajes fueron calculados respecto del control positivo de crecimiento promedio respectivo, de acuerdo a la ecuación 6, sección 3.22. **A.** Barras azules: *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. parasiticus*. Barras naranjas: *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. parasiticus*. Barras grises: *starter* M6 + *A. parasiticus*. **B.** Barras verdes: *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *A. flavus*. Barras violetas: *S. cerevisiae* MBELGA62 + *A. flavus*. Barras amarillas: *starter* M6 + *A. flavus*. *Starter* M6: Iodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

A partir de estos experimentos pudo comprobarse la producción de compuestos volátiles capaces de limitar el crecimiento de *Aspergillus* sp por parte de las levaduras cerveceras. Adicionalmente, no se observó producción de conidios luego de 240 h de incubación del hongo en micro-atmósfera de VOCs (Fig. 8, A-F). Esta observación podría tener impacto en el biocontrol de *Aspergillus* sp. en la matriz de alimentos adicionados con levaduras cerveceras, impidiendo o reduciendo la dispersión y reproducción fúngica a través de la liberación de conidios.

La efectividad de los VOCs de levaduras guarda relación con la presión parcial (concentración) que alcanzan estos compuestos en la atmósfera en contacto directo con el patógeno. Por lo tanto, el potencial de acción de los VOCs sobre el crecimiento fúngico tendrá correlato con el modo de almacenamiento del alimento adicionado con las levaduras, almacenamiento que debe permitir la acumulación de los volátiles y/o evitar su difusión en el ambiente. En este sentido, se ha demostrado la actividad antifúngica contra *Penicillium roqueforti* del acetato de etilo producido por *Pichia anomala* (ahora *W. anomalus*) en granos de trigo almacenados herméticamente (Druvefors y col., 2005).

Se observó también que diferentes especies de levaduras producen VOCs con distintos efectos sobre el crecimiento de *Aspergillus* sp., siendo los volátiles de *P. kudriavzevii* los que indujeron mayor prolongación de la fase de latencia (Tabla 5). Como perspectiva de estudio, resultaría muy interesante poder identificar qué compuestos volátiles producen *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62, y qué volátiles producen al coexistir en el *starter* M6.

6.4.4 Estudio del daño celular producido por AFB₁ en presencia/ausencia de las levaduras sobre la línea celular HepG2

La micotoxina AFB₁ produce daño en el organismo a través de su acumulación en hígado, donde es metabolizada por el sistema citocromo P450 en un derivado más carcinogénico aún, el AFB₁-8,9-epóxido (AFBO), u otros metabolitos menos mutagénicos, como AFM₁ (Murphy y col., 2006).

Debido al mecanismo de acción de AFB₁, que tiene al hígado como órgano blanco primario, la línea celular de hepatocarcinoma humano HepG2 se propone como un modelo adecuado para el estudio de su efecto citotóxico (Mc Kean y col., 2006). El grado de daño celular puede cuantificarse indirectamente a través de la actividad lactato deshidrogenasa (LDH), enzima intracelular que es liberada al sobrenadante de cultivo cuando la membrana celular sufre daño y permeabilización (Legrand y col., 1992). Investigadores de nuestro grupo reportaron una respuesta dosis-dependiente de la actividad LDH asociada al daño celular de HepG2 frente a diferentes

concentraciones de AFB₁ adicionada al sobrenadante de cultivo (Gamba y col., 2015b). Sus estudios de cuantificación de actividad MTT y LDH en sobrenadantes de cultivo celular comprobaron que las levaduras y bacterias ácido-lácticas del kefir son capaces de proteger a HepG2 del efecto tóxico de AFB₁ (Gamba y col., 2015b). Contemplando estos estudios, durante la presente tesis se decidió estudiar el efecto citotóxico de adicionar 500 ppb de AFB₁ (LC50 determinada previamente por el grupo) al sobrenadante de cultivo de HepG2, en presencia y ausencia de las levaduras cerveceras, para estudiar su potencial citoprotector frente a la aflatoxina. La actividad LDH cuantificada en los sobrenadantes de cultivo celular se grafica en la figura 11.

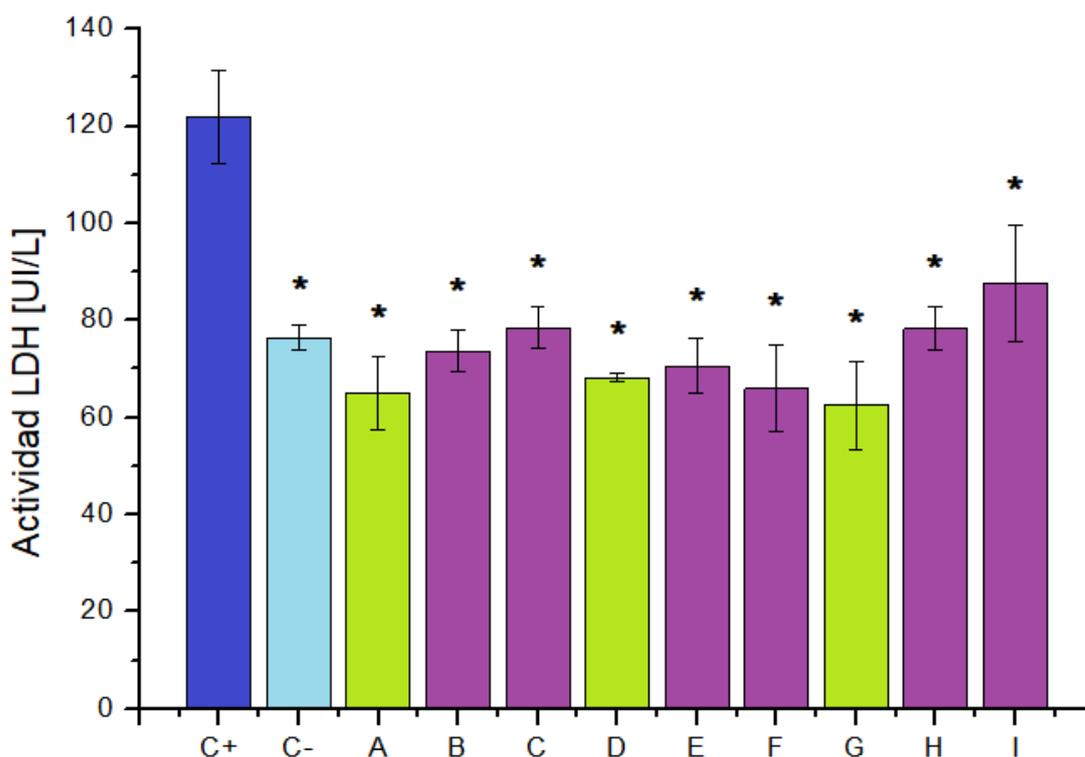


Fig. 11. Efecto citoprotector de levaduras cerveceras sobre células HepG2 expuestas a AFB₁ (500 ppb). La actividad LDH se determinó empleando el kit Wiener Lab® (Rosario, Argentina). Las barras grafican el promedio \pm la desviación estándar de tres experimentos en triplicado. *Indica diferencia significativa ($P < 0,05$) con la actividad LDH determinada en el control positivo y ausencia de diferencia significativa ($P < 0,05$) con la actividad LDH determinada en el control negativo. **C +** (control positivo): medio de cultivo celular DMEM con adición de 500 ppb de AFB₁. **C -** (control negativo): medio de cultivo celular DMEM sin AFB₁. **A:** starter M6 sin AFB₁. **B:** starter M6 de cultivo YPD (condición a, sección 3.13) + AFB₁ 500 ppb. **C:** starter M6 de cultivo en mosto (condición b, sección 3.13) + AFB₁ 500 ppb. **D:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 sin AFB₁. **E:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 de cultivo YPD (condición a, sección 3.13) + AFB₁ 500 ppb. **F:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 de cultivo en mosto (condición b, sección 3.13) + AFB₁ 500 ppb. **G:** *S. cerevisiae* MBELGA62 sin AFB₁. **H:** *S. cerevisiae* MBELGA62 de cultivo YPD (condición a, sección 3.13) + AFB₁ 500 ppb. **I:** *S. cerevisiae* MBELGA62 de cultivo en mosto (condición b, sección 3.13) + AFB₁ 500 ppb. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Se demostró que la presencia de levadura cervecera, independientemente de su especie o de las condiciones de cultivo a partir de las cuales fue obtenida, protege a las células del efecto citotóxico de AFB₁, recuperando la actividad LDH basal del control de células no expuestas a la toxina (Fig. 11).

Autores como Gonçalves y col. (2017), Campagnollo y col. (2015) y Bovo y col. (2015) reportan la efectividad de emplear levaduras cerveceras *S. cerevisiae* deshidratadas o productos basados en levaduras cerveceras para secuestrar AFB₁. Contemplando estos reportes, es posible conjeturar que el efecto citoprotector observado durante los estudios de esta tesis guarda correlación con una capacidad de las levaduras cerveceras de capturar AFB₁; una vez secuestrada la aflatoxina en la superficie de las levaduras, su interacción con los hepatocitos se ve impedida, con la consecuente reducción del daño celular ocasionado por la micotoxina.

Si bien es interesante profundizar en el estudio de los mecanismos de citoprotección de las levaduras cerveceras sobre HepG2 empleando levaduras inactivadas y extractos de pared celular, dada la aplicación que se pretende dar al residuo de lodo de levaduras cerveceras como aditivo de alimento para aves, resulta aún más significativo estudiar la capacidad de la levadura viable, tal y como se obtiene en la cervecería, de capturar aflatoxina. Es por ello que se postergó el estudio de los mecanismos de citoprotección de las levaduras cerveceras sobre HepG2 para avanzar con el estudio de la capacidad de la levadura viable de adsorber AFB₁ *in vitro*.

6.4.5 Estudio de la capacidad de secuestro in vitro de AFB₁ por levaduras cerveceras

Se ha reportado previamente la capacidad de las levaduras de secuestrar diversas micotoxinas, entre ellas la aflatoxina B₁ (AFB₁). Varios autores (Bueno y col., 2007; Yiannikouris y col., 2004b) describen el rol central de la pared celular de las levaduras en su capacidad secuestrante y detoxificante, mediante la adsorción de la toxina en la superficie de la levadura. Así, diferencias en la estructura de la pared celular guardan correlato con la capacidad secuestrante de las levaduras. Se estudió entonces la capacidad secuestrante de levaduras cerveceras obtenidas en condiciones de cultivo óptimas y en las condiciones de estrés propias de la fermentación cervecera. Los resultados se sintetizan en la Tabla 6.

Tabla 6. Secuestro *in vitro* de AFB₁ por levaduras cerveceras

Starter/ aislamiento	% AFB ₁ secuestrada ^u		
	Cultivos en YPD ^a	Cultivos en mosto ^b	Micro-fermentaciones ^c
<i>Pk</i> MBELGA61	14,7 ± 2,4 ^A	83,8 ± 0,0 ^B	79,2 ± 1,4 ^C
<i>Sc</i> MBELGA62	7,7 ± 0,9 ^A	83,8 ± 0,0 ^B	79,0 ± 0,0 ^C
Starter M6	7,8 ± 4,8 ^A	83,7 ± 0,1 ^B	79,1 ± 0,1 ^C

AFB₁ en los sobrenadantes de incubación se determinó empleando el kit ELISA (Veratox®, Neogen Corporation, USA). ^uLos resultados se expresan como el promedio del porcentaje de AFB₁ secuestrada por una suspensión de 10⁸ UFC/mL de levadura cervecera respecto de la cantidad de AFB₁ inicial (300 ppb) ± la desviación estándar de tres experimentos en duplicado. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa (P < 0,05) entre los diferentes cultivos de una misma levadura. ^aLevaduras obtenidas de cultivos en condiciones a, sección 3.13. ^bLevaduras obtenidas de cultivos en condiciones b, sección 3.13. ^cLevaduras obtenidas de cultivos en condiciones c, sección 3.13. *Pk*: *P. kudriavzevii* MBELGA61 *Sc*: *S. cerevisiae* MBELGA62. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

Las levaduras obtenidas a partir de cultivos en mosto cervecero (condiciones b y c, sección 3.13), cosechadas y resuspendidas a concentraciones de 10⁸ UFC/mL en solución de 300 ppb de AFB₁ en buffer fosfato fueron capaces de capturar entre 79,0 y 83,8% de la toxina presente inicialmente en el medio (Tabla 6). Sin embargo, suspensiones con la misma concentración de levaduras, cultivadas en caldo YPD (condición a, sección 3.13), capturaron porcentajes significativamente menores, entre 7,7 y 14,7% de AFB₁.

Jouany y col. (2005) afirman que las condiciones de cultivo, incluyendo pH, temperatura, tasa de oxigenación, naturaleza del medio y naturaleza y concentración de la fuente de carbono modulan fuertemente la cantidad y las propiedades estructurales de los D-glucanos, mananos y quitina de pared celular. Los resultados aquí presentados sugieren que el cultivo en un medio complejo y osmóticamente estresante como el mosto cervecero potencia la capacidad secuestrante de AFB₁ de las levaduras cerveceras. Esto resulta de mayor interés, ya que las levaduras obtenidas en condiciones que emulan en laboratorio la fermentación del mosto en la cervecería (Tabla 6, condición c) secuestran aflatoxina con gran eficiencia, removiendo de la suspensión entre el 79,0 y el 79,2% de AFB₁ original (300 ppb), lo que equivale a 0,00237 pg/UFC de AFB₁ capturada.

El contenido de aflatoxinas de muchos alimentos balanceados para pollos en Argentina supera el máximo permitido de 20 µg/kg (20 ppb) de alimento (Monge y col., 2013). Contemplando que la concentración de aflatoxinas reportada en alimento balanceado para pollos es 10 veces menor a la ensayada (300 ppb), es esperable que

los porcentajes de secuestro en el alimento serán aún mayores que los obtenidos en los experimentos presentados, lográndose una significativa disminución del contenido de aflatoxina en alimento y llevándolo a niveles seguros para el consumo animal.

Esto respalda la estrategia de utilizar el lodo de levaduras subproducto residual de la industria cervecera como potencial agente detoxificante de alimentos. Gonçalves y col. (2017), Campagnollo y col. (2015) y Bovo y col. (2015) estudiaron el empleo de *S. cerevisiae* cervecera o de los productos de su deshidratación o inactivación en la captura de AFB₁. Campagnollo y col. (2015) determinaron la capacidad del residuo de levaduras cerveceras (BFR, *beer fermentation residue*) obtenido de micro-cervecerías, secado y molido, de secuestrar ZEA en un 75,1%, OTA en un 59,4% y AFB₁ en un 48,1%, mientras que sólo un 11,6% de DON fue adsorbida.

Gonçalves y col. (2017) determinaron la habilidad de secuestrar AFB₁ por *S. cerevisiae* de cervecería activa, *S. cerevisiae* autolisada, pared celular extraída de *S. cerevisiae* y levaduras inactivadas. Los autores estudiaron las isotermas de adsorción de cada fuente de levaduras, y encontraron que la adsorción aumenta con la concentración de levaduras; se limita a altas concentraciones de la toxina, indicando la saturación de los sitios de unión a toxina de la pared celular; y que las levaduras cerveceras y el extracto de pared celular fueron los productos más efectivos en la captura de AFB₁. Las levaduras autolisadas e inactivadas presentaron una capacidad adsorptiva reducida y reversibilidad de la captura. Los investigadores afirman que la inactivación de las levaduras por secado y la lisis de la pared celular aparejan una reducción en el contenido de carbohidratos de pared y, en consecuencia, de los β -glucanos que capturan aflatoxina, lo que explica sus observaciones.

Estudios previos llevados adelante por Bovo y col., (2015) reportan resultados contradictorios a este respecto. Los autores analizaron la capacidad de capturar AFB₁ del BFR de *S. cerevisiae* obtenido por secado y molido; levaduras completas obtenidas de fermentación cervecera inactivadas; levaduras completas obtenidas de fermentación de caña de azúcar inactivadas; levaduras hidrolizadas; extracto de pared celular de levaduras; y levaduras activas comerciales. Sus resultados indican que la adsorción de aflatoxina varía entre los productos de levaduras (entre 45,5 y 69,4% a pH 3,0 y entre 24,0 y 63,8% a pH 6,0), y que los más eficientes en el secuestro fueron los productos que contienen levaduras hidrolizadas y extracto de pared celular. El BFR capturó entre 49,2 y 55,0% de la AFB₁.

Los resultados aquí presentados demuestran la capacidad del residuo de levadura cervecera viable de capturar AFB₁ sin necesidad de pre-tratamiento alguno, y en porcentajes significativamente mayores a los reportados en bibliografía.

6.4.6 Estudio de la composición de pared celular de levaduras cerveceras cultivadas en diferentes condiciones

La pared celular de *S. cerevisiae* está constituida por un 80-90% de polisacáridos. Su resistencia mecánica se atribuye a una capa interna de β -D-glucanos, organizados en una red altamente polimerizada de β -(1,3)-D-glucanos, con ramificaciones en unidades de β -(1,6)-D-glucanos. Esta capa interna está firmemente unida a la membrana plasmática por cadenas lineales de quitina, macromolécula con un rol significativo en la insolubilidad de toda la estructura. Tanto la quitina como los β -D-glucanos influyen en la plasticidad de la pared celular. La capa externa de la pared celular de levaduras está constituida por manoproteínas con un importante rol en el intercambio y transporte con el medio externo (Fernandes Oliveira y col., 2013).

Armando y col. (2012) estudiaron la adsorción de ZEA y OTA por células viables de *S. cerevisiae*, concluyendo que el diámetro celular y la profundidad de la pared celular correlacionan positivamente con la eficiencia de la captura de micotoxina. Es decir, la cantidad de pared celular es un factor determinante en la cantidad de micotoxina capturada. Gonçalves y col. (2017) estudiaron las isotermas de adsorción de *S. cerevisiae* obtenida a partir de diferentes fuentes, micro-cervecería y comerciales, y encontraron que la adsorción aumenta con la concentración de levaduras y se limita a altas concentraciones de la toxina, indicando la saturación de los sitios de unión a AFB₁ de la pared celular.

Toda la estructura de la pared celular es altamente dinámica y varía entre las cepas de levadura, las fases del ciclo celular y las condiciones del medio, tales como pH, temperatura, nivel de oxigenación, naturaleza del medio, concentración y naturaleza de la fuente de carbono. Las diferencias en la composición de la pared celular se relacionan directamente con su capacidad para adsorber micotoxinas (Jouany y col. 2005).

Diferentes componentes de la pared celular de levaduras se han vinculado a la capacidad de captura de micotoxinas. Ciertos estudios han demostrado que componentes de la pared celular de *S. cerevisiae* denominados oligomananos, luego de esterificarse, son capaces de adsorber más del 95% de AFB₁ (Devegowda y col., 1996). Otros, señalan a los β -D-glucanos como los principales responsables de la formación del complejo con la toxina, y que la organización reticular de β -(1,3)-D-glucanos y β -(1,6)-D-glucanos en la pared celular tienen un importante rol en la eficacia de la adsorción (Yiannikouris y col., 2006; Jouany y col., 2005). Además, Yiannikouris y col. (2004a) demostraron que fuerzas débiles de puente de Hidrógeno y van der Waals están involucradas en la interacción entre los β -D-glucanos y las micotoxinas. Estos autores concluyeron que la captura de ZEA depende del contenido

y configuración tridimensional de los β -D-glucanos en la pared celular de *S. cerevisiae*. Otras investigaciones atribuyen la adsorción de micotoxinas a glucomananos (Raju y col., 2002) y manano-oligosacáridos (Oguz y Parlat, 2005) de la pared celular.

Dado el significativo aumento de la capacidad secuestrante de AFB₁ por levaduras cultivadas en mosto cervecero en condiciones que emulan una fermentación industrial en relación a aquellas cultivadas en caldo YPD, se decidió estudiar la composición de la pared celular de los diferentes cultivos con el objetivo de encontrar una correlación entre la composición de la pared y la capacidad de captura de las levaduras. Se avanzó entonces en la determinación del contenido de manoproteínas y polisacáridos de pared celular de levaduras cerveceras cultivadas en diferentes condiciones (sección 3.27.1). Los resultados obtenidos de peso de glucosa, manosa y mananos de pared, calculados a partir de la curva estándar de manosa comercial y referidos al peso seco de levadura, se grafican en la figura 12.

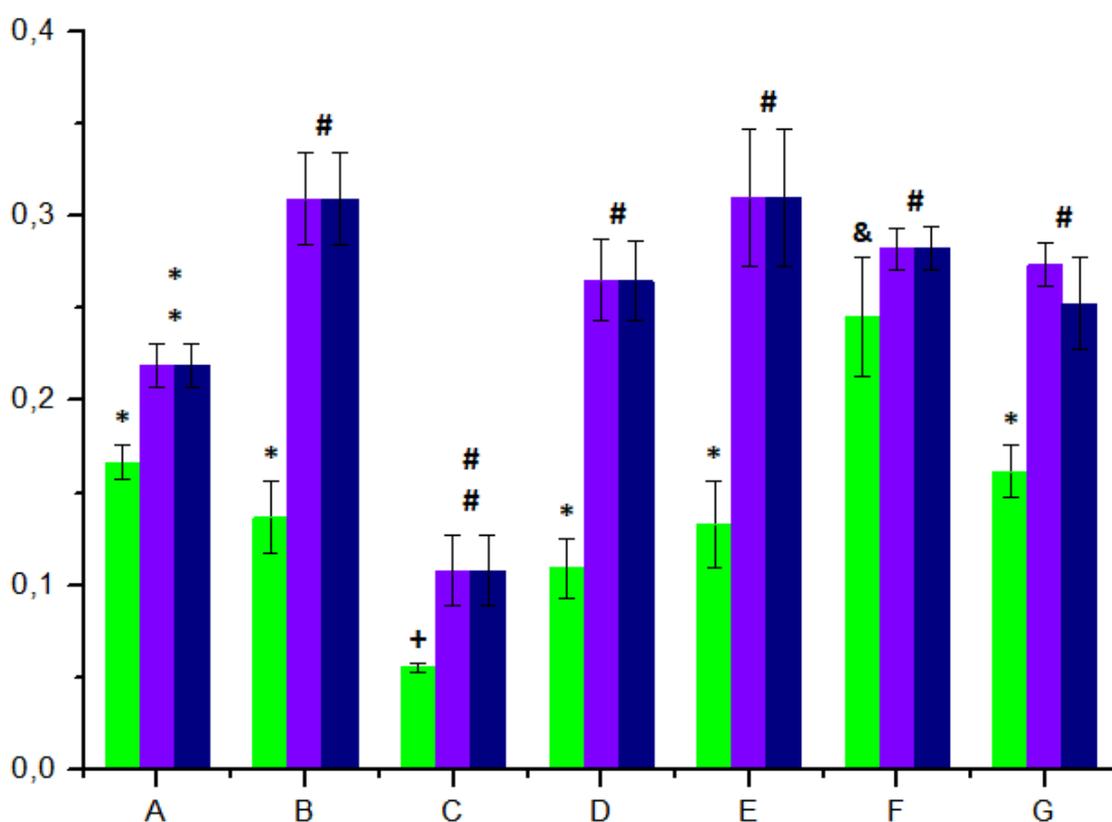


Fig. 12. Composición de pared celular de levaduras cerveceras. Los resultados fueron calculados a partir de la curva estándar de manosa y normalizados por el peso seco de levadura. Cada condición de cultivo se realizó por triplicado y cada muestra obtenida se analizó en HPLC por duplicado. Símbolos diferentes (*, #, &, +) indican diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0,05$). **A:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 en caldo YPD. **B:** *P. kudriavzevii* MBELGA61 en mosto cervecero de 17,0 °Bx, pH 4,5. **C:** starter M6 en caldo YPD. **D:** starter M6 en mosto cervecero de 17,0 °Bx, pH 4,5. **E:** *S. cerevisiae* MBELGA62 en caldo YPD. **F:** *S. cerevisiae* MBELGA62 en mosto cervecero de 17,0 °Bx, pH 4,5. **G:** *S. cerevisiae* MBELGA62 en mosto cervecero de 15,0 °Bx, pH 5,5. Starter M6: lodo de levaduras cerveceras a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62. Barras ■: mg de glucosa/ mg de peso seco. Barras ■: mg de manosa/ mg de peso seco. Barras ■: mg de mananos/ mg de peso seco.

Respecto a las unidades de glucosa liberadas durante la hidrólisis, no se encontraron diferencias significativas entre los cultivos en caldo YPD y las levaduras obtenidas como lodo cervecero en las micro-fermentaciones (mosto de 17,0 °Bx y pH 4,5) de *P. kudriavzevii* MBELGA61 (Fig. 12, series A y B, barras verdes). Sin embargo, sí se detectó un aumento significativo en el contenido de mananos de pared en cultivos obtenidos por micro-fermentación (Fig. 12, series A y B, barras violetas y azules).

Los resultados de *S. cerevisiae* MBELGA62 no mostraron diferencias significativas en el contenido de glucosa entre los cultivos en caldo YPD y los lodos obtenidos por fermentación de mosto de 15,0 °Bx y pH: 5,5 (Fig. 12, series E y G, barras verdes). Sin embargo, sí se detectó un aumento significativo de la glucosa liberada a partir de lodos obtenidos de fermentar mosto de 17,0 °Bx y pH: 4,5 (Fig. 12, series E y F, barras verdes), condiciones de mayor estrés para la levadura que pudieron inducir un cambio de composición en la pared celular. Respecto al contenido de mananos de pared, no se detectaron diferencias significativas entre los cultivos de *S. cerevisiae* MBELGA62 (Fig. 12, series E, F y G, barras violetas y barras azules).

Los cultivos del *starter* M6 (Fig. 12, series C y D) demostraron aumentos significativos en el contenido de glucosa y de mananos de pared celular al ser obtenidos a partir de micro-fermentaciones cerveceras ($P < 0,05$).

En el caso de *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6, los resultados permiten afirmar que la composición de mananos de pared es influida por las condiciones de cultivo. El peso de mananos de pared relativo al peso seco de levadura aumentó al realizar la micro-fermentación en mosto cervecero, condición de cultivo de mayor estrés para las levaduras (estrés osmótico, pH bajo, limitación de oxígeno).

Bueno y col. (2007) determinaron que la detoxificación de AFB₁ por *S. cerevisiae* es un proceso rápido que involucra la formación de un complejo reversible entre la toxina y la superficie de la levadura, sin modificación química de la toxina, y que requiere de la integridad estructural de la pared celular. Por otro lado, Joannis-Cassan y col. (2011) reportaron la dependencia de la adsorción con el tipo de micotoxina y el tipo de adsorbente ensayados (levaduras inactivadas, extracto de pared celular), pero señalan que no existe una correlación directa de la capacidad de captura con propiedades bioquímicas de la pared, como el contenido de mananos o glucanos. En la misma línea, Pereyra y col. (2013) determinaron que la captura de aflatoxinas y ZEA *in vitro* no guarda correlación con la composición de la pared.

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente tesis, la diferencia en el contenido de mananos de pared determinado podría correlacionarse con el aumento de la captura de AFB₁ de las levaduras obtenidas como lodos cerveceros, respecto de aquellas obtenidas de cultivos en caldo YPD. Sin embargo, este aumento en la captura

de AFB₁ se cuantificó también en lodos cerveceros de la cepa *S. cerevisiae* MBELGA62, la cual no presentó diferencia significativa en el contenido de mananos de pared entre las diferentes condiciones de cultivo.

Los resultados obtenidos no son concluyentes respecto del papel de la composición de la pared celular de levaduras cerveceras en la captura de micotoxina. Cabe destacar que el contenido de β -D-glucanos, señalados como los principales responsables de la adsorción por algunos autores (Yiannikouris y col., 2006; Jouany y col., 2005), no fueron cuantificados en este estudio. Posiblemente, el aumento significativo de la captura de AFB₁ por levaduras obtenidas como lodo de micro-fermentación cervecera guarde relación con el contenido de β -D-glucanos o bien con cambios en la estructura tridimensional de la pared celular y la disposición de los mananos de pared, cuya determinación requiere el empleo de técnicas diferentes a la aplicada.

6.5 Conclusiones

Contemplando los mecanismos conocidos mediante los cuales las levaduras antagonizan con hongos toxigénicos y contrarrestan los efectos negativos de sus micotoxinas sobre la salud animal y humana, durante este capítulo se abordó la caracterización de las levaduras cerveceras seleccionadas como agentes biocontroladores del desarrollo de *Aspergillus* sp. y secuestrantes de AFB₁.

Las levaduras cerveceras demostraron eficacia en la reducción del crecimiento de *Aspergillus* sp. en co-cultivos en agar papa, limitando las velocidades de crecimiento radial de *A. flavus* CMUNLPI5 entre un 16,2 y un 37,8% y las velocidades de *A. parasiticus* CMUNLP7 entre un 24 y un 42,5%, efecto que puede atribuirse a la producción de metabolitos antagónicos solubles y al consumo competitivo de nutrientes del medio por parte de las levaduras. Durante estos ensayos se observó un debilitamiento del micelio fúngico y la ausencia de conidios en el borde de colonia de *Aspergillus* sp. cercano al inóculo de levaduras.

Además, se verificó la presencia de metabolitos solubles reductores de la germinación fúngica en los sobrenadantes libres de células obtenidos de micro-fermentaciones de mosto cervecero. Este hallazgo sugiere que los metabolitos antagonistas contra *Aspergillus* sp. estarían presentes en la bebida producida con estas levaduras y en el residuo de levaduras obtenido de la industria cervecera.

Adicionalmente, se confirmó la producción de metabolitos volátiles por las levaduras cerveceras altamente efectivos en la inhibición del desarrollo de *Aspergillus* sp., especialmente la levadura *P. kudriavzevii* MBELGA61. Todas las levaduras prolongaron la fase de latencia fúngica más de un 100% y redujeron las velocidades exponenciales de crecimiento entre un 20 y un 44%. Nuevamente se observó la

incapacidad del hongo de producir conidios, sus estructuras reproductivas, en presencia de los metabolitos volátiles de las levaduras cerveceras.

Estos estudios permiten afirmar que las levaduras cerveceras obtenidas como subproducto residual de la fermentación son agentes biocontroladores de *Aspergillus* sp. efectivos, afectando sus parámetros de crecimiento y su capacidad de producir estructuras reproductivas. Estas observaciones sugieren el potencial de utilizar el residuo de levaduras cerveceras como agente biocontrolador adicionado al alimento balanceado para animales, lo que favorecería el retraso del desarrollo fúngico y una limitación en la producción y dispersión de esporas en el alimento.

Luego, se estudiaron las propiedades de las levaduras cerveceras como agentes citoprotectores y secuestrantes frente a AFB₁. Se comprobó el efecto citoprotector de las levaduras sobre la línea celular de hepatocitos humanos HepG2 en presencia de aflatoxina, quedando pendiente el estudio de los mecanismos de acción de las levaduras cerveceras que reducen los efectos citotóxicos de AFB₁. Vinculada a este efecto citoprotector, se demostró la capacidad de secuestro de aflatoxina de las levaduras, con gran efectividad cuando se obtienen a partir de micro-fermentaciones de mosto cervecero, con un 79,0 a 79,2% de la micotoxina inicial adsorbida por las levaduras. Los porcentajes obtenidos superan a los reportados por otros autores en *S. cerevisiae* cervecera (Gonçalves y col., 2017; Bovo y col., 2015; Campagnollo y col., 2015). Esta propiedad podría significar la protección de los pollos de cría alimentados con estas levaduras de los efectos del consumo de alimento contaminado con micotoxinas. En el capítulo previo se comprobó la baja eficiencia de las levaduras cerveceras para adherirse a la línea celular intestinal Caco-2/TC7 (sección 5.4.7). Dicho resultado, en perspectiva, reviste el mayor interés, puesto que la eliminación de la micotoxina del organismo del ave requiere un tránsito rápido de la levadura unida a AFB₁ por el tracto intestinal y su pronta excreción.

Estos resultados permiten postular al residuo de levaduras subproducto de la fermentación cervecera como un potencial agente biocontrolador de *Aspergillus* sp. y detoxificante para ser aplicado como suplemento de alimento para pollos.

De acuerdo a los estudios realizados, el residuo de levaduras cerveceras viables podría utilizarse en la formulación de alimento balanceado sin requerimiento de tratamientos previos de inactivación. Esto permitiría reducir los costos de producción del alimento adicionado, además de aprovechar las propiedades de las levaduras viables, sintetizadas por Pfliegler y col. (2015): su capacidad de fermentación; un menor impacto negativo en las propiedades organolépticas del producto adicionado, respecto del agregado de ciertos otros aditivos; el potencial efecto probiótico de su

consumo y su potencial para la biodegradación de toxinas, propiedad cuyo estudio no fue abordado durante la presente tesis.

**Aplicaciones de los estudios abordados durante esta tesis
en la elaboración cervecera y en la formulación
de un alimento balanceado para pollos
adicionado con residuo de levaduras**

Aplicaciones de los estudios abordados durante esta tesis en la elaboración cervecera y en la formulación de un alimento balanceado para pollos adicionado con residuo de levaduras

7.1 Introducción

Los estudios descritos en capítulos previos permitieron corroborar que las levaduras cerveceras seleccionadas y obtenidas como subproducto de la fermentación del mosto de cebada poseen capacidades antimicrobianas, antifúngicas, secuestrantes de micotoxinas y citoprotectoras. Estos resultados son coherentes con investigaciones previas realizadas sobre cepas de *Saccharomyces* sp. aisladas de alimentos y bebidas con potencial probiótico y biopreservante (Martins y col., 2005, 2007, 2011; Generoso y col., 2011; Kourelis y col., 2010; Pizzolitto y col., 2013), entre ellas, de cerveza (Campagnolo y col., 2015; Bovo y col., 2015). Durante este trabajo se comprobó que el residuo de levaduras viables tal y como se genera en la cervecería, sin pre-tratamientos de inactivación, exhibe las propiedades mencionadas. Esta observación es relevante en relación a los costos de producción del alimento suplementado con levaduras, que se verían incrementados en caso de requerirse tratamientos previos sobre el residuo. Además, la adición directa del residuo a la dieta balanceada permite aprovechar las propiedades probióticas de las levaduras.

El empleo de levaduras en la decontaminación de alimento para animales es una estrategia difundida, dada la comprobada disminución de la biodisponibilidad de aflatoxinas y la consecuente reducción de su adsorción a nivel intestinal en presencia de levaduras adicionadas (Śliżewska y Smulikowska, 2011). Se ha documentado la inocuidad del empleo de algunas cepas probióticas de la especie *S. cerevisiae* en alimentación animal y su habilidad de secuestrar AFB₁ cuando se las incluye en la dieta (Pizzolitto y col., 2013). Los extractos de pared celular de levaduras también son efectivos en la adsorción de aflatoxina y otras micotoxinas, como la zearalenona (Pereyra y col., 2013).

Existe una variedad de estudios *in vivo* que comprueban el efecto positivo de la inclusión de levaduras o de extracto de pared celular de levadura en la dieta de aves de cría (Magnoli y col., 2017; Shareef y Al-Dabbagh, 2009; Santin y col., 2001, 2003). Se ha reportado la factibilidad del reemplazo de antibióticos, empleados como promotores del crecimiento de aves, por levaduras y pared celular de levaduras sin detrimento de los parámetros productivos (Ghosh y col., 2012). Adicionalmente, se han estudiado los beneficios en la detoxificación de AFB₁ al suplementar la dieta con levaduras. Santin y col. (2003) comprobaron la reducción del efecto tóxico de las aflatoxinas en pollos de cría alimentados con dietas suplementadas con paredes

celulares de levaduras cerveceras (*S. cerevisiae* var. *Calsberg*, producto comercial Pronady500^(R)). Otros autores comprobaron que la adición de levaduras al alimento balanceado contaminado con aflatoxinas disminuyó los efectos negativos sobre la tasa de consumo del alimento, la ganancia de peso y la conversión alimenticia en codornices japonesas. Además, la adición de *S. cerevisiae* a alimento no contaminado mejoró significativamente todos los parámetros de crecimiento de codornices en alrededor de un 40% (Parlat y col., 2001). Más recientemente, Magnoli y col. (2017) demostraron que la adición de *P. kudriavzevii* al alimento balanceado de pollos mejora los parámetros productivos y genera efectos protectivos sobre dietas contaminadas con AFB₁.

Dado que la presente tesis se desarrolla en el marco de un proyecto de investigación y extensión que tuvo origen en la demanda de asesoría técnica y tecnológica de los cerveceros artesanales locales platenses, parte de los experimentos realizados fueron diseñados en respuesta a estas demandas. Particularmente, una inquietud planteada por los productores se vincula a la reproducibilidad de su proceso de elaboración y de la bebida lograda y al impacto que tiene la correcta manipulación de los *starters* de levaduras en su capacidad de repetir una receta cervecera. Por este motivo, se llevaron a cabo estudios de la composición del *starter* mixto M6 y de su producto de fermentación luego de varios subcultivos, con el objetivo de asesorar a los cerveceros artesanales en cuanto a la reproducibilidad de su cerveza, relacionada a la estabilidad del *starter*. Adicionalmente, la estabilidad de los *starters* cerveceros tiene impacto en la composición del residuo que se adicionará al alimento para pollos y, por lo tanto, influye en la reproducibilidad de la composición del alimento.

En el presente capítulo, se describen los resultados del estudio dirigido a valorizar el residuo de la industria cervecera, compuesto por levaduras viables y el sobrenadante de fermentación, como suplemento de alimento balanceado para pollos con capacidad antagonista contra *Aspergillus* sp. Inicialmente, se desarrollarán los resultados obtenidos a partir de ensayos que abordan aspectos de la elaboración de cerveza con el *starter* M6 y cuyas conclusiones aportan a la asesoría de productores locales en la manipulación de estas levaduras (parte A). A continuación, se describirán los resultados obtenidos del análisis bromatológico y microbiológico del alimento formulado por adición del residuo obtenido con las levaduras del *starter* M6 (parte B).

7.2 Hipótesis

La práctica de reutilización de las levaduras en la elaboración de cerveza artesanal podría modificar las poblaciones relativas de *starters* cerveceros mixtos.

Las características originales del proceso fermentativo cervecero y del producto de fermentación obtenido con un *starter* mixto modificado por reutilización podrían recuperarse mediante co-inóculo de las especies de levaduras presentes inicialmente en el *starter*.

El residuo de levaduras tal y como se obtiene de la elaboración cervecera podría ser empleado en la formulación de un alimento balanceado para producción avícola con capacidad de biocontrol sobre la microbiota natural del alimento y de secuestro de AFB₁.

7.3 Objetivos específicos

- Estudiar comparativamente diferentes diseños de co-fermentación con el *starter* mixto M6 y sus levaduras aisladas a fin de determinar cuál logra mayor reproducibilidad en la elaboración de cerveza y estabilidad en la composición del RLC que se adicionará al alimento para pollos.
- Determinar la capacidad del residuo de levaduras obtenido de capturar y retener AFB₁ en las condiciones del pasaje por el TGI de pollos simulado *in vitro*.
- Formular y caracterizar aspectos fisicoquímicos y microbiológicos de un alimento balanceado para pollos suplementado con el residuo de levaduras subproducto de la fermentación cervecera.
- Estudiar el efecto de la presencia de levaduras cerveceras sobre el desarrollo de la microbiota natural en el alimento formulado.

7.4 Resultados y discusión

Parte A. Fermentaciones alternativas con el *starter* M6 para la elaboración de cerveza

7.4.1 Optimización del diseño de fermentación para la obtención de cerveza y residuo de levaduras cerveceras (RLC)

Como se ha mencionado, la elección de la levadura que fermenta el mosto tiene un gran impacto en las cualidades sensoriales de la cerveza obtenida. Las especies no sacaromycéticas tienen el potencial de producir diversidad de sabores y aromas, pero generalmente presentan muy baja producción de etanol comparadas con *S. cerevisiae*. La estrategia más conveniente para su incorporación a la producción de cerveza es la co-inoculación simultánea o secuencial con *Saccharomyces* sp.

El *starter* M6 está constituido por más de una cepa, entre ellas *S. cerevisiae* MBELGA62 y la levadura no convencional *P. kudriavzevii* MBELGA61. *P. kudriavzevii*

MBELGA61 demostró no ser buena productora de etanol y CO₂, aunque se adaptó a las condiciones de fermentación del mosto cervecero y logró atenuarlo (sección 4.4.6). Esto sugiere el desarrollo de metabolismos alternativos al fermentativo, posiblemente vinculados a la producción de biomasa y de metabolitos solubles y volátiles. En correlato con esta hipótesis, se comprobó la producción de metabolitos volátiles con gran capacidad antifúngica por parte de esta levadura (sección 6.4.3).

S. cerevisiae MBELGA62 fermentó el mosto cervecero a velocidades que superaron las del control positivo Safbrew T-58 (Fermentis), con buena producción de etanol y 2,3-butanediol (sección 4.4.6), y comprobó ser capaz de metabolizar el azúcar complejo maltotriosa (sección 4.4.5), que *P. kudriavzevii* MBELGA61 no es capaz de asimilar. Comprobadas las capacidades tecnológicas de *S. cerevisiae* MBELGA62 en la producción de cerveza y las propiedades de *P. kudriavzevii* MBELGA61 en la producción de metabolitos volátiles con potencial de aportar al perfil sensorial de esta bebida, en esta etapa se propuso utilizar subcultivos del *starter* M6 para producir una cerveza atenuada.

Se llevó a cabo el monitoreo de una fermentación de mosto cervecero a escala laboratorio con subcultivos del *starter* M6 completo, que puede describirse como una co-fermentación simultánea de las levaduras que componen al *starter*. Las curvas de pérdida de peso y consumo de glucosa registradas se grafican en la figura 1, junto a las curvas que se obtuvieron previamente (sección 4.4.6) para los aislamientos *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61.

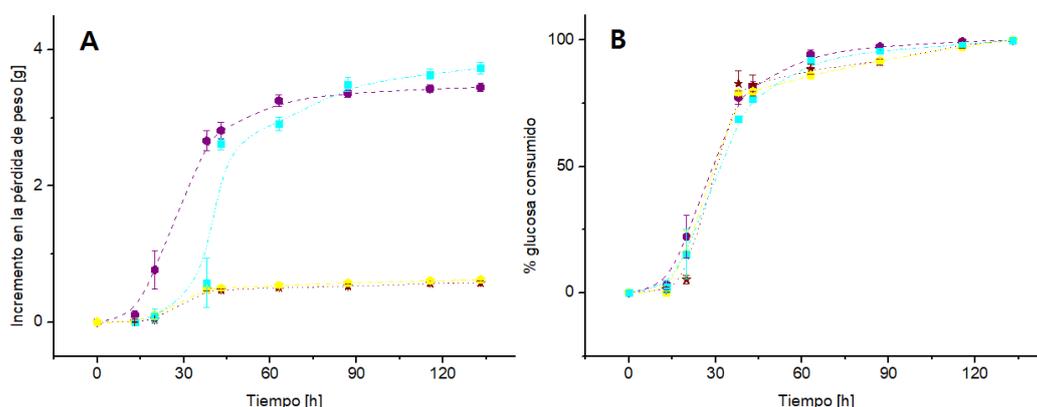


Fig. 1. Co-fermentaciones simultáneas. **A.** Curvas de incremento de peso perdido [g] en el tiempo [h]. **B.** Curvas ajustadas de porcentaje de glucosa consumida en el tiempo [h]. Se grafica el promedio del triplicado de cada tratamiento y las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas. Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. Como control positivo de fermentación se empleó el *starter* comercial Safbrew T-58 (Fermentis, Francia). ● *S. cerevisiae* MBELGA62. ★ *P. kudriavzevii* MBELGA61. ● *Starter* M6, a partir del cual se aislaron *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61. ■ Control positivo de fermentación.

Los ensayos evidenciaron un comportamiento fermentativo del subcultivo del *starter* M6 idéntico al comportamiento del aislamiento *P. kudriavzevii* MBELGA61 (Fig. 1). Este resultado puede interpretarse como producto de la variación de las poblaciones relativas de las levaduras del *starter* M6 a través de sucesivos repiques en el laboratorio. Posiblemente, el subcultivo del *starter* favoreció un rápido crecimiento de *P. kudriavzevii* MBELGA61 y un desbalance en la microbiota original. En estas condiciones, *S. cerevisiae* MBELGA62 y otras levaduras sacaromícéticas que pudieran formar parte del *starter* disminuyeron ostensiblemente. Como resultado, el *starter* M6 enriquecido en *P. kudriavzevii* MBELGA61 muestra una capacidad fermentativa disminuida respecto del *starter* original.

Adicionalmente, cuando se estudiaron las cinéticas de crecimiento de los aislamientos en mosto de cebada, *P. kudriavzevii* MBELGA61 mostró una fase de latencia nula y una cosecha máxima superior a la alcanzada por *S. cerevisiae* MBELGA62 ($P < 0,05$, Tabla 6F, sección 4.4.5). Es decir, si bien *P. kudriavzevii* MBELGA61 no fermenta el mosto de cebada, sí logra crecer en él desde el momento inmediato al inóculo. Esta ventaja frente a *S. cerevisiae* MBELGA62, sumada a los sucesivos subcultivos del *starter* M6 previos a la fermentación, podrían explicar el dominio del nicho por la levadura no sacaromícética.

Cuando se realizó el análisis HPLC del producto de fermentación del *starter* M6, se constató una composición muy diferente de aquél obtenido con la levadura sacaromícética *S. cerevisiae* MBELGA62 ($P < 0,05$). Los metabolitos cuantificados se sintetizan en la Tabla 1 y se grafican en la figura 2, junto a los metabolitos determinados en los productos fermentados por los aislamientos en etapas previas (sección 4.4.6), para facilitar la contrastación de resultados.

Tabla 1. Metabolitos solubles determinados en el producto de co-fermentación simultánea del *starter* M6 y en fermentaciones de sus levaduras aisladas

Cepa/ Starter	Glicerol [g/L]	2,3- butanediol [g/L]	Eritritol [g/L]	Etanol [% V/V]	Glucosa [g/L]	Fructosa [g/L]
Starter M6	0,77 ± 0,02 ^A	0,08 ± 0,01 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	1,19 ± 0,03 ^A	0,00 ± 0,62 ^A	0,00 ± 0,00 ^A
Sc MBELGA62	2,54 ± 0,02 ^B	0,3 ± 0,01 ^B	0,06 ± 0,00 ^B	6,48 ± 0,04 ^B	0,00 ± 0,71 ^A	0,00 ± 0,00 ^A
Pk MBELGA61	0,77 ± 0,02 ^A	0,1 ± 0,01 ^A	0,04 ± 0,00 ^A	1,19 ± 0,04 ^A	0,00 ± 0,66 ^A	0,00 ± 0,00 ^A

Micro fermentaciones realizadas a 20 °C en 70,0 mL de mosto elaborado en laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,2. Los resultados se expresan como el promedio de las medidas realizadas sobre tres fermentaciones por cada cepa ± la desviación estándar. Cada producto de fermentación se midió por duplicado en HPLC. Sc MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. Pk MBELGA61: *P. kudriavzevii* MBELGA61. Letras mayúsculas superíndice distintas indican diferencias significativas entre los valores de un metabolito determinados en diferentes productos fermentados ($P < 0,05$).

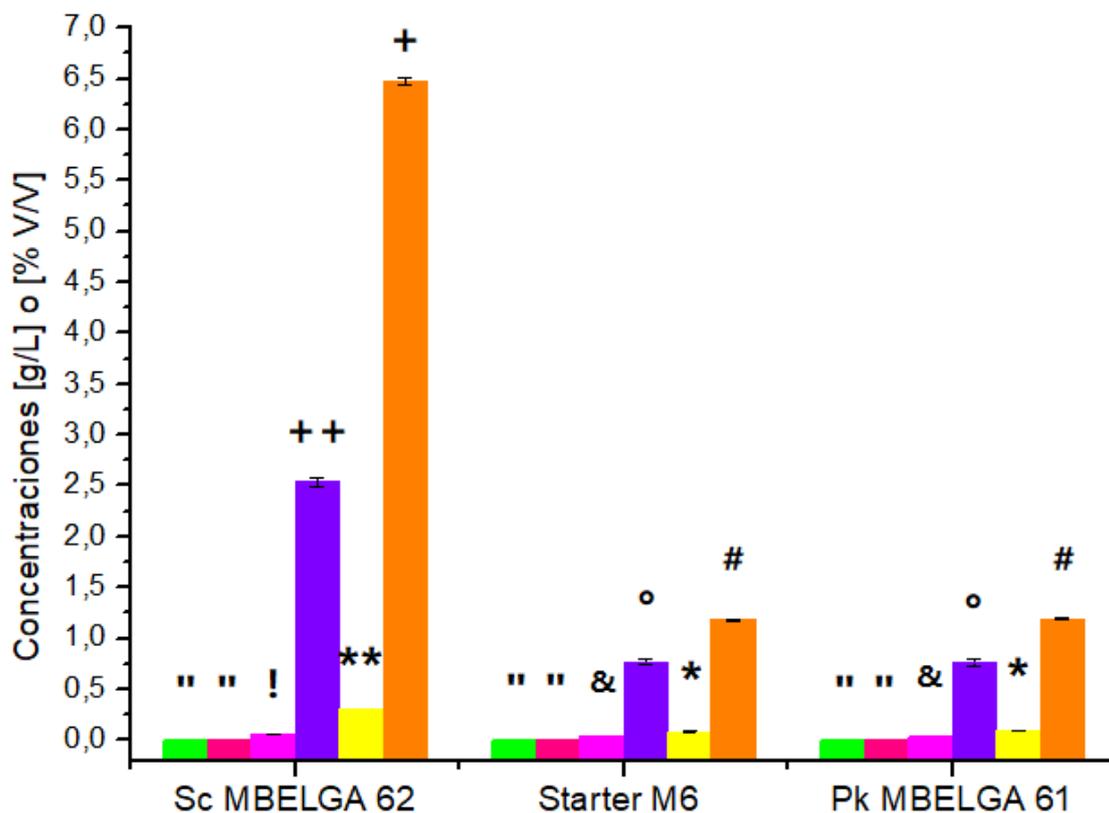


Fig. 2. Metabolitos solubles cuantificados en el producto de la fermentación del mosto cervecero con *starter* M6 y levaduras aisladas del starter. Se grafica el promedio del triplicado de cada tratamiento, y las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas. Símbolos iguales (*,+!,",#,&,"°) indican que no existe diferencia significativa entre los valores ($P < 0,05$). Sc MBELGA62: *S. cerevisiae* MBELGA62. Pk MBELGA61: *P. kudriavzevii* MBELGA61. *Starter* M6: *starter* cervecero a partir del cual se aislaron *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61. ■ Glucosa [g/L]. ■ Fructosa [g/L]. ■ Eritritol [g/L]. ■ Glicerol [g/L]. ■ 2,3-butanediol [g/L]. ■ Etanol [% V/V].

A partir del análisis HPLC se verificó el consumo total de la glucosa y la fructosa del mosto con muy baja producción de etanol por el *starter* M6 (Tabla 1, Fig. 2). Estos resultados dan cuenta de la similitud entre los productos de fermentación del *starter* M6 y de *P. kudriavzevii* MBELGA61 y de su diferencia significativa con el producto fermentado por *S. cerevisiae* MBELGA62 ($P < 0,05$, Fig. 2). Una observación de interés respecto de la aplicación que busca darse al residuo de fermentación es el bajo contenido de etanol detectado, respecto del esperado, que implica una actividad antimicrobiana disminuida del sobrenadante de fermentación del RLC.

En síntesis, los resultados de la co-fermentación simultánea de las cepas que constituyen al subcultivo del *starter* M6 no son satisfactorios respecto a la producción cervecera y son subóptimos en lo que respecta a la obtención de un lodo de levaduras multicepa antimicrobiano y antifúngico. Según Gibson y col. (2017), la co-inoculación

de levaduras no sacaromícéticas limitadas en su capacidad de fermentar el mosto asegura que dichas levaduras no dominarán el proceso de elaboración de cerveza. Sin embargo, mantener una comunidad compleja de levaduras podría ser un desafío para la industria cervecera, dadas ciertas prácticas instaladas de reutilización de las levaduras en sucesivos *batch* (Gibson y col., 2017). Esta apreciación se constató en nuestra experiencia.

Como alternativa, se procedió al diseño y evaluación de co-fermentaciones secuenciales, con inóculo inicial del *starter* M6 o de *P. kudriavzevii* MBELGA61 y una co-inoculación posterior con *S. cerevisiae* MBELGA62, al 1% del recuento alcanzado por la levadura iniciadora al momento de la siembra. La figura 3 muestra las curvas de pérdida de peso acumulado en el tiempo de las co-fermentaciones secuenciales en comparación con las curvas de las fermentaciones llevadas a cabo por el *starter* M6 o por *P. kudriavzevii* MBELGA61 sin co-inóculo posterior.

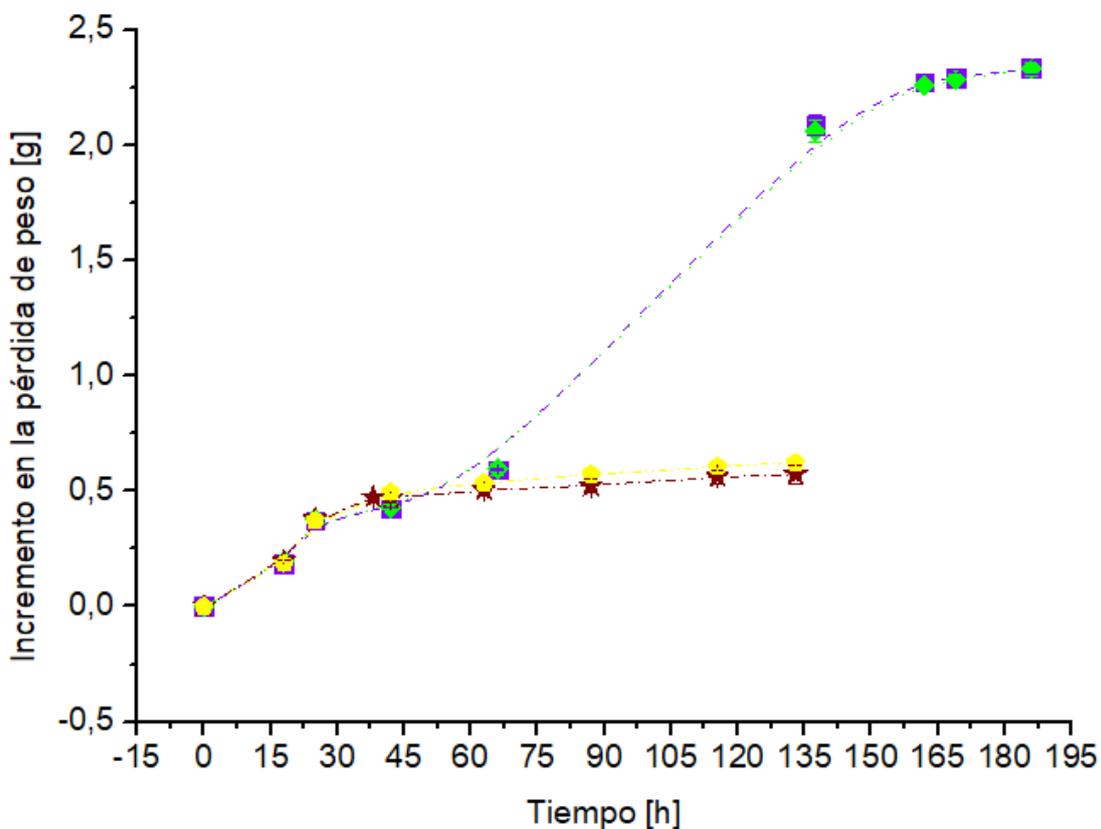


Fig. 3. Curvas de incremento de peso perdido [g] en el tiempo [h] durante co-fermentaciones secuenciales del mosto cervecero. La co-inoculación fue realizada transcurridas 66 h de incubación. Se grafica el promedio del triplicado de cada tratamiento y las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas. Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto cervecero formulado en el laboratorio de 17,0 °Bx y pH 4,5 ± 0,1 a 20 °C. ★ *P. kudriavzevii* MBELGA61. ● *Starter* M6, a partir del cual se aislaron *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61. ■ Co-fermentación *starter* M6 + *S. cerevisiae* MBELGA62. ◆ Co-fermentación *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *S. cerevisiae* MBELGA62.

Las curvas correspondientes a co-fermentaciones secuenciales muestran una inflexión a las 66 horas, momento en el que se realizó la co-inoculación con *S. cerevisiae* MBELGA62 al 1%, mientras que las fermentaciones llevadas a cabo por el *starter* M6 o por *P. kudriavzevii* MBELGA61 sin co-inóculo posterior, no exhiben modificación en el comportamiento de la curva (Fig. 3).

A partir de la co-inoculación de *S. cerevisiae* MBELGA62 se determinó un rápido incremento en la pérdida de peso, vinculada a la producción y liberación de CO₂ vía fermentación etanólica. La figura 4 ilustra los resultados del análisis HPLC de los productos de fermentación de las co-inoculaciones secuenciales en contraste con los metabolitos detectados en fermentaciones llevadas a cabo por *S. cerevisiae* MBELGA62 o el *starter* M6 (Tabla 1).

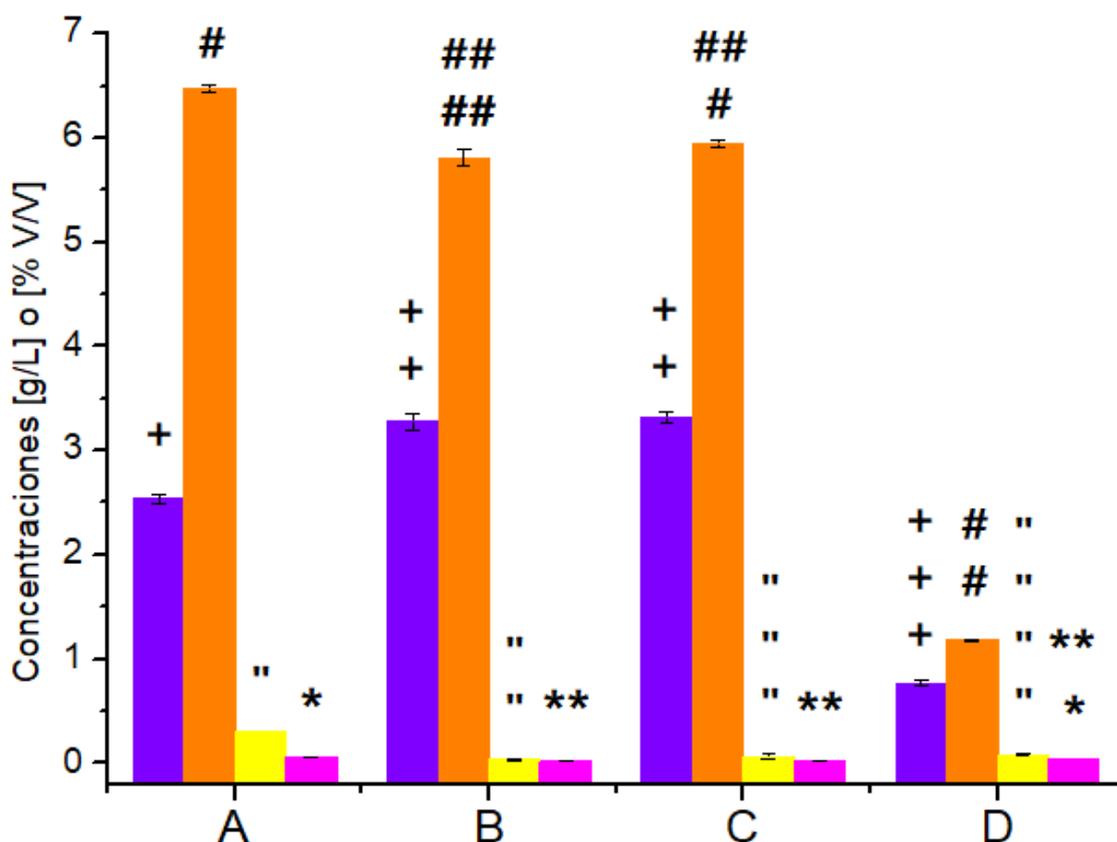


Fig. 4. Metabolitos solubles cuantificados en los productos de co-fermentaciones secuenciales del mosto cervecero. Se grafica el promedio del triplicado de cada tratamiento y las barras de error representan la desviación estándar de las réplicas. Símbolos iguales (*,+,",#) indican que no existe diferencia significativa entre los valores ($P < 0,05$). **A:** *S. cerevisiae* MBELGA62. **B:** co-fermentación *starter* M6 + *S. cerevisiae* MBELGA62. **C:** co-fermentación *P. kudriavzevii* MBELGA61 + *S. cerevisiae* MBELGA62. **D:** *starter* M6: *starter* cervecero a partir del cual se aislaron *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61. ■

Eritritol [g/L]. ■ Glicerol [g/L]. ■ 2,3-butanediol [g/L]. ■ Etanol [% V/V].

El análisis revela un contenido de etanol mucho más elevado en los productos de fermentación de las co-fermentaciones secuenciales respecto del producto obtenido con el *starter* M6, si bien presentan una reducción significativa respecto al contenido de etanol de fermentaciones realizadas con *S. cerevisiae* MBELGA62 como único inóculo ($P < 0,05$, Fig. 4).

Respecto al contenido de glicerol, la cantidad acumulada durante las co-fermentaciones secuenciales superan significativamente al contenido determinado en fermentaciones con *S. cerevisiae* MBELGA62 o el *starter* M6 ($P < 0,05$, Fig. 4). Este interesante resultado sugiere que la cerveza producida en co-fermentaciones secuenciales con estas levaduras podría destacar en propiedades sensoriales positivas asociadas al glicerol, como un mayor “cuerpo” o “redondez”, suavidad al paladar, sensación de plenitud en boca y mayor intensidad del sabor de la bebida (Zhao y col., 2015).

A partir de estos ensayos se concluye que es posible recuperar la capacidad de fermentación de un *starter* que se ha modificado en reutilizaciones sucesivas mediante co-inoculación de una levadura con comprobada competencia para fermentar y atenuar el mosto cervecero. Tal observación aporta conocimiento plausible de ser aplicado en la asesoría a cerveceros locales que deseen utilizar el *starter* M6 u otros *starters* con poblaciones mixtas en su producción. Por un lado, se les podrá asesorar en la selección de una cepa cervecera conveniente para restituir la capacidad fermentativa de su *starter*, además de suministrar tal cepa. Por el otro, los productores podrán renovar sus *starters* cuando lo consideren necesario; éstos se mantendrán criopreservados en el Banco de Levaduras Cerveceras de la FCE-UNLP, que actualmente está en construcción. Tanto el *starter* M6 original como sus aislamientos se encuentran criopreservados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ y estarán a disposición de los productores locales, junto a una variedad de levaduras conservadas de forma óptima.

Desde la perspectiva de la obtención de un RLC optimizado, las co-fermentaciones secuenciales produjeron lodos en los que conviven *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61 con un sobrenadante con elevadas concentraciones del metabolito antimicrobiano etanol. En etapas previas, ambas levaduras demostraron una elevada resistencia al TGI de pollos simulado *in vitro* de sus RLCs (sección 5.4.2). *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62 generaron metabolitos solubles y volátiles que reducen el crecimiento de *Aspergillus* sp. (sección 6.4.2 y 6.4.3) y ambos aislamientos, así como el *starter* M6 completo, demostraron gran eficiencia en el secuestro de AFB₁ (sección 6.4.5) y una elevada capacidad citoprotectora de la línea celular HepG2 desafiada con esta micotoxina (sección 6.4.4).

A partir de estos resultados, se definió la producción de un residuo de levaduras cerveceras con potencial biopreservante contra hongos y mitigante de los efectos de sus toxinas mediante co-fermentaciones secuenciales del *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62, para abordar los experimentos que se describen a continuación.

Parte B. Formulación de un alimento balanceado para pollos adicionado con RLC del *starter* M6

7.4.2 Estudio de la capacidad del RLC de secuestrar y retener AFB₁ a través del pasaje por el TGI de pollos simulado in vitro

Una vez estudiada la estabilidad de la composición del *starter* mixto M6 y las estrategias que contribuyen a estandarizar la cerveza producida y, consecuentemente, el RLC obtenido a partir de estas fermentaciones, se avanzó en la caracterización del residuo respecto a su comportamiento en las condiciones del TGI de pollos.

En etapas previas, se caracterizó la *performance* del subproducto de levaduras cervecera en el TGI de pollos, corroborando su capacidad de sobrevivir a las condiciones simuladas *in vitro* de pH, temperatura, presencia de bilis y enzimas y tiempos de permanencia en los compartimentos gástrico e intestinal (*secciones 5.4.1, 5.4.2, 5.4.3*). Posteriormente, se estableció su elevada eficiencia como agente secuestrante de AFB₁, capaz de capturar el 79,1% de la toxina presente en el medio (*sección 6.4.5*). En este punto, se presenta pertinente evaluar la capacidad del RLC producido por co-fermentación secuencial del *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62 de secuestrar AFB₁ y retenerla durante el pasaje por el TGI de pollos. Adicionalmente, se estudiaron las propiedades de los RLC obtenidos de fermentaciones llevadas a cabo con *S. cerevisiae* MBELGA62 o *P. kudriavzevii* MBELGA61.

Con este objetivo, se llevó a cabo el secuestro de AFB₁ como se describió previamente, se recuperó el *pellet* de levaduras unidas a aflatoxinas y se lo incubó en las condiciones gástrica e intestinal emuladas *in vitro* (*sección 3.30*). Posteriormente, se determinó la concentración de AFB₁ remanente en los sobrenadantes, producto de la desorción. Los resultados se sintetizan en la Tabla 2.

Tabla 2. Desorción de AFB₁ de la superficie de las levaduras cerveceras durante el pasaje GI simulado *in vitro*

RLC ^β	% Desorción de AFB ₁ ^α		
	Post pasaje gástrico	Post pasaje intestinal	Post pasaje gástrico + intestinal
<i>Pk</i> MBELGA61	12,9 ± 0,1 ^{a,A}	12,2 ± 0,3 ^{b,A}	25,1 ± 0,4 ^A
<i>Sc</i> MBELGA62	13,1 ± 0,1 ^{a,A}	12,8 ± 0,2 ^{a,B}	25,9 ± 0,3 ^B
<i>Starter</i> M6	12,1 ± 0,1 ^{a,B}	10,7 ± 0,1 ^{b,C}	22,8 ± 0,2 ^C

La AFB₁ liberada se determinó en los sobrenadantes de incubación empleando un kit ELISA (Veratox®, Neogen Corporation, USA). ^αEl porcentaje de AFB₁ de-adsorbida se calculó respecto de la concentración inicial de AFB₁ empleada en el ensayo de secuestro (300 ppb). Los resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de tres experimentos en duplicado. ^βLevaduras obtenidas como residuo de fermentación cervecera. Letras mayúsculas distintas indican diferencia significativa (P < 0,05) en la desorción entre las levaduras. Letras minúsculas distintas indican diferencia significativa (P < 0,05) en la desorción producida por las incubaciones aplicadas a una misma levadura. *Pk*: *P. kudriavzevii* MBELGA61. *Sc*: *S. cerevisiae* MBELGA62. *Starter* M6: *starter* a partir del cual se aislaron *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62.

P. kudriavzevii MBELGA61 y *S. cerevisiae* MBELGA62 perdieron un 25% de la micotoxina capturada previo al pasaje por el TGI simulado (Tabla 2), reteniendo un 54% de la AFB₁ inicialmente presente en la suspensión de desafío (300 ppb). En el caso del RLC de *starter* M6, el porcentaje de AFB₁ retenida fue de 56%, significativamente superior al obtenido con las levaduras aisladas (P < 0,05).

De acuerdo a Jespersen y col. (en Moslehi-Jenabian y col., 2010), el complejo *S. cerevisiae*/AFB₁ es estable durante el pasaje por un modelo *in vitro* del tracto gastrointestinal humano. Previamente, Shetty y col. (2007) demostraron que la adsorción de aflatoxina por *S. cerevisiae* es cepa-específica y se potencia luego del tratamiento térmico y ácido de las levaduras, logrando una captura de hasta el 78% de la aflatoxina total en suspensión post tratamiento. Es decir, el pasaje por condiciones similares a las del TGI humano potenciaría la capacidad de las cepas estudiadas por estos investigadores de capturar aflatoxina.

Los resultados obtenidos durante la presente tesis indican que existe desorción de la toxina en las condiciones simuladas del TGI de pollos. Cabe destacar que el TGI humano, modelo de estudio de Shetty y col. (2007), presenta diferencias sustanciales con el TGI de pollos, que funciona a mayor temperatura (41 °C), menor pH gástrico (pH 2,5) y tiempos totales de exposición más prolongados (8 h) que el modelo humano (37 °C; pH gástrico 3,0; 4 h totales, Minekus y col., 2014).

Sin embargo, los resultados aquí presentados indican que más del 50% de la micotoxina presente originalmente en un alimento contaminado sería capturado y retenido por el residuo de levaduras de la industria cervecera y excretado en las heces del pollo, impidiendo su absorción a nivel intestinal y previniendo su efecto nocivo sobre la salud animal.

7.4.3 Formulación de un alimento para pollos suplementado con RLC

La formulación de alimento suplementado requirió del estudio de una etapa inicial de obtención del RLC, seguida de su adición en una proporción que garantice un cierto recuento de levaduras viables por gramo de alimento. Adicionalmente, se investigó el aporte nutricional que significa la adición de levaduras cerveceras al alimento en relación a los requerimientos nutricionales de pollos de engorde.

El diseño de la co-fermentación secuencial para obtener el RLC (*sección 7.4.1*) tuvo en cuenta los resultados de caracterizaciones previas de las levaduras cerveceras aisladas y del *starter* M6. Se estima que una mayor concentración de etanol y una menor disponibilidad de azúcares residuales en el producto, atribuibles a las competencias fermentativas de *S. cerevisiae* MBELGA62, combinados con la acumulación de compuestos solubles y volátiles antagonistas contra *Aspergillus* sp., asociados especialmente al metabolismo de *P. kudriavzevii* MBELGA61, potenciarán el efecto biocontrolador en el alimento adicionado.

Es importante recordar que el RLC se agregó al alimento sin realizar pre-tratamientos de inactivación del efluente. Esta decisión estratégica favorece la valorización del residuo, pues no implica un costo adicional para el productor cervecero, y facilita su aplicación en alimentación animal a mayor escala. Además, posibilita mantener un recuento de levaduras viables y metabólicamente activas asociado a un potencial probiótico y biocontrolador del alimento producido en estas condiciones.

Se llevaron a cabo réplicas biológicas de co-fermentaciones secuenciales con el *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62, denominadas A y B, en diferentes frascos erlenmeyer conteniendo mosto de cebada rubia incubados en idénticas condiciones (*sección 3.29*). Una vez detenidas las fermentaciones, el RLC decantado al fondo de los frascos se cosechó, recuperando un residuo que incluyó la biomasa de levaduras y un sobrenadante de fermentación (cerveza inmadura).

Adicionalmente, se recuperaron los sobrenadantes de mosto fermentado, que fueron centrifugados y filtrados para obtener el mosto fermentado libre de células, con el que se elaboró un control de alimento para pollos adicionado con los metabolitos solubles producto de la fermentación pero sin levadura cervecera.

Respecto al contenido de levaduras óptimo para lograr un efecto antifúngico y secuestrante de micotoxinas, Pizzolitto y col. (2013) informaron la reducción de los efectos nocivos en la salud de pollos del consumo de dietas contaminadas con AFB₁ cuando se adiciona *S. cerevisiae* CECT 1891 liofilizada en concentraciones de 10¹⁰ células/kg.

De acuerdo a esta investigación, se realizaron los cálculos pertinentes para determinar una adición de RLC que aporte un recuento de levaduras viables de entre 10⁷ y 10⁸ por gramo de alimento (sección 3.31.2). Se produjeron entonces dos alimentos balanceados suplementados con las réplicas biológicas de RLC al 20% p/p, denominados tratamiento A y tratamiento B.

Por un lado, se adicionó el alimento para pollos bb PRENUT tal y como se adquirió, produciendo un total de 250 g del alimento NO ESTERILIZADO (NE) suplementado; 125 g se produjeron con la réplica biológica A de RLC y otros 125 g se produjeron con la réplica biológica B.

Además, se produjeron 100 g de alimento NE suplementado al 20% p/p con el sobrenadante de mosto fermentado filtrado (control con metabolitos solubles libre de células) y 100 g de alimento NE control adicionado con agua destilada estéril (control negativo).

Por otro lado, alimento para pollos bb PRENUT del mismo lote se esterilizó por autoclave previo a la adición del RLC. Se produjeron un total de 250 g de alimento ESTÉRIL (E) suplementado, 125 g de ellos producidos con la réplica biológica A de RLC y otros 125 g se produjeron con la réplica biológica B. Además, se produjeron 100 g de alimento E suplementado al 20% p/p con el sobrenadante de mosto fermentado filtrado (control con metabolitos solubles libre de células) y 100 g de alimento E control adicionado con agua destilada estéril (control negativo). En la Tabla 3 se sintetizan los alimentos formulados.

Tabla 3. Alimentos formulados a partir de alimento Prenut para pollo casero BB

Alimento para pollos BB Prenut^a	
Sin acondicionamiento previo, NO ESTERILIZADO (NE)	Autoclavado a 121 °C, 15 min, ESTERILIZADO (E)^b
<ul style="list-style-type: none"> ● Adicionado con RLC A, 125 g ● Adicionado con RLC B, 125 g ● Adicionado con mosto fermentado filtrado, 100 g ● Adicionado con agua destilada estéril, 100 g 	<ul style="list-style-type: none"> ● Adicionado con RLC A, 125 g ● Adicionado con RLC B, 125 g ● Adicionado con mosto fermentado filtrado, 100 g ● Adicionado con agua destilada estéril, 100 g

^aAlimento balanceado completo Prenut para pollo casero BB (PRENUT S.A., Argentina), certificado SENASA N° 03-347/A. ^bEl alimento se dispuso en bolsas de papel aptas para autoclave y se incluyeron tiras reactivas de autoclave para garantizar la eficiencia del proceso. El RLC con el cual se adicionaron los alimentos formulados se obtuvo como se describe en la *sección 3.29*. RLC: residuo de levaduras cerveceras. A y B se produjeron con RLCs producidos de forma independiente y se adicionaron al alimento Prenut BB. El alimento balanceado Prenut BB se esterilizó (o no) previamente a la adición de levaduras.

Una vez producidos los alimentos adicionados, se procedió a su análisis fisicoquímico y microbiológico y al estudio de sus propiedades biopreservantes antifúngicas contra la contaminación natural del alimento balanceado. Además, se estudió la sobrevivencia de las levaduras adicionadas en el alimento contaminado artificialmente con *Aspergillus* sp.

7.4.4 Caracterización fisicoquímica del alimento para pollos formulado por adición de RLC

El contenido en proteínas del alimento balanceado para pollos es un factor determinante en la producción, ya que la proteína en defecto disminuye los rendimientos en kg de carne producida, mientras que el exceso de proteína implica el catabolismo de los aminoácidos y su excreción como ácido úrico, con la consecuente pérdida económica (Gómez y col., 2011). Por un lado, las dietas de pollos de engorde deben ofrecer un nivel proteico que minimice el uso de aminoácidos como fuente de energía (Bertechini, 2012); por otro, se debe garantizar un nivel óptimo de aminoácidos totales y esenciales. Se ha reportado que reducir excesivamente los niveles de proteína, conlleva la disminución del tejido magro y aumenta la grasa abdominal de pollos, reduciendo la productividad (Torres-Novoa, 2017).

Algunos autores (Makinde y Egbekun, 2016; Mahmoud y col., 2017), observaron una mejor ganancia de peso, conversión alimenticia, digestibilidad de proteína bruta y

rendimiento de la canal utilizando un 22% de proteína bruta en la dieta. Guilcapi (2013) observó que, durante la etapa de crecimiento, una dieta con 20% de proteína bruta mejora la ganancia de peso y la conversión alimenticia, mientras que en la etapa de engorde, los parámetros se optimizan con un 18% de proteína bruta. El Manual Cobb para la cría de pollos de engorde sugiere un porcentaje de proteína bruta del 23% en la dieta.

De acuerdo a estos reportes, el contenido de proteína total de la dieta es un parámetro importante en avicultura. Asimismo, la cantidad de energía aportada por el alimento debe considerarse especialmente. Ambos fueron contemplados en la caracterización fisicoquímica del alimento producido, entre otros parámetros.

En la formulación, se empleó alimento balanceado completo Prenut para pollo casero BB (PRENUT S.A., Argentina), certificado SENASA N° 03-347/A. El fabricante informa un tenor mínimo de proteína bruta de 15 g cada 100 g de alimento y 2500 kcal/kg de energía metabolizable. Sería conveniente que la adición del RLC represente un aumento del contenido de proteína total, para aproximarse a los requerimientos de proteína de una dieta óptima (Makinde y Egbekun, 2016; Mahmoud y col., 2017; Guilcapi, 2013).

Los resultados de la caracterización fisicoquímica se detallan en la Tabla 4.

Tabla 4. Composición porcentual de los alimentos formulados

Determinación fisicoquímica	Alimento PRENUT BB no esterilizado		
	Adicionado con RLC ^a	Adicionado con sobrenadante fermentado libre de células ^b	Adicionado con agua destilada estéril ^c
Cenizas totales [g/100g]	7,09 ± 0,25 ^A	6,82 ± 0,66 ^A	7,34 ± 0,43 ^A
Humedad [g/100g]	25,54 ± 0,09 ^A	25,28 ± 0,38 ^A	23,13 ± 0,97 ^B
Energía bruta [Kcal/100 g]	308,86 ± 10,27 ^A	315,22 ± 21,32 ^A	324,58 ± 18,71 ^A
Carbohidratos [g/100g]	56,88 ± 2,05 ^A	59,01 ± 4,22 ^A	60,1 ± 3,28 ^A
Proteína total [g/100g]	6,72 ± 0,11 ^A	6,74 ± 0,32 ^A	6,83 ± 0,27 ^A
Grasas totales [g/100g]	2,52 ± 0,17 ^A	2,15 ± 0,19 ^A	2,6 ± 0,20 ^A

^aLos resultados se expresan como el promedio ± la desviación estándar de las réplicas biológicas A y B de alimento adicionado con RLC. Los alimentos producidos fueron adicionados al 20% p/p con réplicas biológicas de RLC producido en co-fermentaciones secuenciales con el *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62. ^bAlimento producido por adición al 20% p/p con mosto cervecero fermentado libre de células. ^cAlimento producido por adición de agua destilada estéril hasta a_w 0,95. Letras superíndice distintas indican diferencia significativa entre los tratamientos ($P < 0,05$) en el parámetro fisicoquímico analizado.

De acuerdo a los resultados obtenidos, no se detectaron diferencias significativas en el contenido de proteínas totales o en la energía bruta por adición del RLC al alimento balanceado para pollos ($P < 0,05$; Tabla 4). Tampoco se determinaron diferencias en otros aspectos fisicoquímicos estudiados.

Existen caracterizaciones fisicoquímicas previas realizadas sobre el residuo de levaduras cerveceras. Mathias y col. (2015) informaron un contenido de 52,7 g de proteína cada 100 g de RLC húmedo de *Saccharomyces* sp. Otros autores han reportado valores inferiores del contenido de proteína en el residuo de levaduras cerveceras sometido a procesos de secado. Pinto y col. (2013) determinaron un contenido de proteína que varía entre 35,2 y 47,2 % en biomasa de levadura cerveceras *Saccharomyces* sp. seca. Caballero-Cordoba y col. (1997) llegaron a resultados similares en determinaciones sobre levadura *Saccharomyces* sp. cerveceras. En estudios previos, Franco (1989) reportó que el polvo de levaduras cerveceras tiene una composición centesimal en proteínas de 46,1. Sin embargo, estos últimos estudios informan contenidos de proteína total en levadura seca, por lo que su comparación con el RLC, de elevado contenido de humedad, es difícil. Una correlación adecuada entre la proteína aportada por la levadura agregada y el contenido de proteína total del alimento balanceado se abordará en la siguiente sección de este capítulo, donde se detallan los resultados de la caracterización microbiológica del alimento adicionado.

Cabe destacar que a partir del análisis fisicoquímico realizado en el alimento balanceado sin adicionar, se registraron valores de proteína total muy por debajo de los 15,0 g cada 100 g de alimento informados por el fabricante (*sección 3.31.1*). A continuación, se transcriben los datos de composición centesimal del alimento completo para pollos caseros BB (PRENUT S. A., Argentina), lote certificado SENASA N° 03-347/A:

Tabla 5. Composición centesimal del alimento completo para pollos caseros BB PRENUT

Componente	g cada 100 g de alimento balanceado
Tenor mín. de proteína bruta	15,0
Tenor mín. de extracto etéreo	2,0
Tenor máx. de fibra cruda	7,0
Tenor máx. de minerales totales	10,0

Tenor máx. de humedad	13,0	
Tenor de calcio	Mín.:0,8	Máx.:1,2
Tenor de fósforo	Mín.:0,4	Máx.:0,6
Energía metabolizable	2500 kcal/kg	

Las grasas totales determinadas mediante el análisis fisicoquímico (2,6 g/100 g de alimento, Tabla 4) se aproximan a las informadas por el fabricante como tenor mínimo de extracto etéreo (Tabla 5), sin modificaciones significativas generadas por la adición del RLC (2,52 g/100 g de alimento adicionado, Tabla 4). El contenido mineral del alimento determinado como cenizas totales (7,34 g/100 g de alimento, Tabla 4), es significativamente inferior al tenor máximo de minerales totales informados por el fabricante (Tabla 5). La adición del RLC al alimento balanceado no produjo cambios significativos en este parámetro (7,09 g/100 g de alimento adicionado, Tabla 4).

7.4.5 Caracterización microbiológica del alimento para pollos formulado por adición de RLC.

Entre las experiencias publicadas de suplementación de la dieta de pollos con levaduras completas, la mayoría reporta la liofilización de las levaduras previo a su adición en formato polvo al alimento, en cantidades entre el 0,1 y el 2% p/p (Magnoli y col., 2017; Pereyra y col., 2013). Pizzolitto y col. (2013) adicionaron *S. cerevisiae* CECT 1891 liofilizada al alimento balanceado en concentraciones de 10^{10} células/kg (10^7 células/g), comprobando la reducción de los efectos nocivos del consumo de dietas contaminadas con AFB₁ en pollos. Shareef y Al-Dabbagh (2009) evaluaron el efecto de incorporar diferentes concentraciones de *S. cerevisiae* liofilizada al alimento de pollos, y verificaron que el agregado de 0,5% p/p equivale a una concentración de $3,44 \times 10^8$ UFC/g de alimento.

Para constatar que la adición de RLC húmedo al 20% p/p en alimento balanceado para pollos garantiza una cierta concentración de levaduras viables en la dieta, se llevó a cabo el recuento microbiológico del alimento formulado en agar YPD. Los resultados se sintetizan en la Tabla 6.

Tabla 6. Recuento de levaduras viables en alimento balanceado esterilizado y adicionado con RLC

Alimento tratamiento^a	Recuento [UFC/g]
Adicionado con RLC A	1,01 ± 0,16 x 10 ⁸
Adicionado con RLC B	7,36 ± 3,98 x 10 ⁷

^aLos alimentos producidos fueron adicionados al 20% p/p con réplicas biológicas de RLC producido en co-fermentaciones secuenciales con el *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62. Los resultados se informan como el promedio ± la desviación estándar de dos alícuotas de cada alimento.

Se verificó una concentración de levaduras viables de entre 10⁷ y 10⁸ UFC/g de alimento, lo cual, de acuerdo a la bibliografía consultada, es una cantidad adecuada para evaluar la eficiencia en la captura de AFB₁ del RLC en el alimento en futuras caracterizaciones. Adicionalmente, los estudios de sobrevida al TGI de pollos arrojaron recuentos similares de levaduras viables al finalizar las incubaciones en tales condiciones (*sección 5.4.2*). Si bien dichos ensayos se realizaron sobre suspensiones líquidas de levaduras, diferentes de la matriz de grano molido del alimento balanceado, los resultados de los recuentos dan indicios de que las levaduras presentes en el alimento adicionado llegarían viables y en concentraciones elevadas al intestino de los animales. Es necesario realizar estudios *in vivo* para confirmar esta hipótesis.

La figura 5 ilustra el proceso de recuento y evaluación microscópica del contenido de levaduras en el alimento balanceado. En las fotografías superiores se verifica la presencia de colonias correspondientes a levaduras sacaromicéticas y de colonias típicas de *Pichia* sp., atribuibles a la presencia de *S. cerevisiae* MBELGA62 y de *P. kudriavzevii* MBELGA61 en el alimento adicionado con RLC. En las fotografías inferiores se observan las morfologías celulares típicas de *Saccharomyces* sp. y *Pichia* sp. bajo microscopio óptico. A través del estudio microbiológico pudo verificarse la coexistencia de ambas levaduras en el alimento formulado por adición de RLC (Fig. 5).

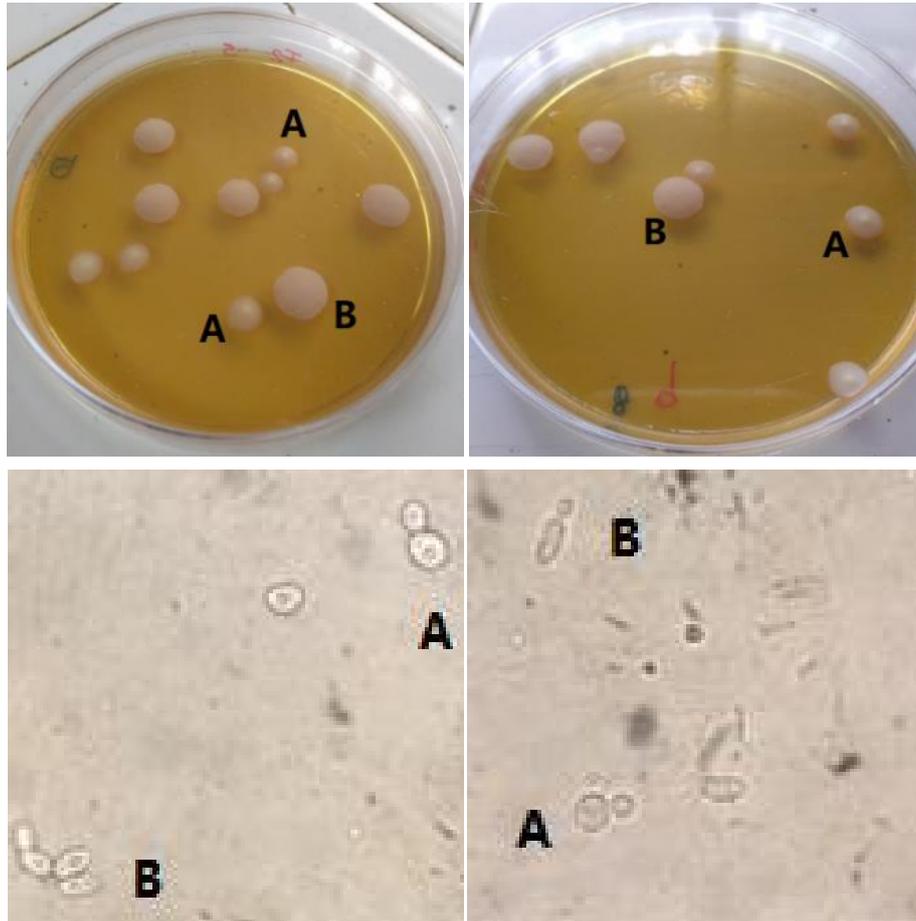


Fig. 5. Análisis microbiológico del alimento adicionado con RLC. Imagen superior: las fotografías ilustran el proceso de recuento por siembra en agar YPD de suspensiones del alimento en solución fisiológica estéril. Se distinguen colonias sacaromycéticas (A) y colonias típicas de *P. kudriavzevii* MBELGA61 (B). Imagen inferior: las ampliaciones de fotografías tomadas bajo microscopio óptico, muestran la presencia de levaduras en el sobrenadante de la suspensión del alimento en solución fisiológica.

El dato de recuento (Tabla 6) permite aproximar el contenido de proteína total aportado por las levaduras por gramo de alimento adicionado. Considerando que el peso de una célula de levadura es de $7,9 \pm 3,2 \times 10^{-11}$ g (Haddad y Lindegren, 1953) y que un gramo de alimento producido contiene aproximadamente 1×10^8 células de levadura, un sencillo cálculo permite estimar que el contenido de levadura por gramo de alimento es de $7,9 \times 10^{-3}$ g. Contemplando los datos reportados por Pinto y col. (2013), el contenido promedio de proteína de la levadura seca es de 41,2%, por lo que el alimento para pollos formulado contiene $3,3 \times 10^{-3}$ g de proteína de levadura/g. Esto implica la adición de aproximadamente 0,33 g de proteína asociada a levadura cada 100 g de alimento. Estos resultados explican por qué no se registró variación en el contenido de proteína total del alimento suplementado al compararlo con el alimento control sin agregado de RLC, y sugieren que el elevado contenido de líquido

sobrenadante del residuo diluyó el efecto esperado por la adición de levaduras. A partir de estos resultados, las futuras investigaciones de la aplicación de este alimento *in vivo* se concentrarán en los efectos probióticos y sobre la sanidad de los pollos.

A continuación, se estudió la sobrevivencia de las levaduras adicionadas al alimento balanceado contaminado artificialmente con una alta concentración de conidios fúngicos. Para ello, el alimento pre-esterilizado y adicionado con el RLC se secó hasta actividad acuosa de $0,95 \pm 0,1$ y se contaminó con esporas de *Aspergillus* sp., para luego someterse a incubación a 30 °C durante 10 días. A distintos tiempos se tomaron muestras para realizar el recuento de levaduras viables en agar YPD y los resultados se detallan en las tablas 7A y 7B.

Tabla 7A. Viabilidad de levaduras cerveceras en alimento para pollos contaminado con *A. parasiticus* CMUNLP7

Alimento tratamiento ^α	Recuentos en agar YPD [UFC/g alimento]		
	Día 1 ^β	Día 5	Día 10
Adicionado con RLC A	$2,7 \pm 0,4 \times 10^6$ ^A	$7,7 \pm 2,6 \times 10^7$ ^{AB}	$8,6 \pm 2,1 \times 10^7$ ^B
Adicionado con RLC B	$8,0 \pm 3,8 \times 10^6$ ^A	$7,1 \pm 0,5 \times 10^7$ ^B	$5,0 \pm 0,7 \times 10^7$ ^C

^αLos alimentos producidos fueron adicionados al 20% p/p con RLCs obtenidos como réplicas biológicas (A y B) en condiciones idénticas de fermentación. ^βRecuento determinado en el alimento post-secado en horno de convección hasta a_w de $0,95 \pm 0,1$. Los resultados se informan como el promedio \pm la desviación estándar de duplicados de cada tratamiento procesados a cada tiempo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los recuentos de un tratamiento evaluado a distintos tiempos de incubación.

Se evaluó la supervivencia de las levaduras adicionadas al alimento suplementado contaminado artificialmente con *A. parasiticus* CMUNLP7, detectando el aumento de un orden en su concentración luego de 5 días de incubación. Transcurridos 10 días de incubación, las levaduras mantuvieron el orden alcanzado al día 5; sólo se detectó una diferencia significativa en el coeficiente de recuento de la réplica B ($P < 0,05$, Tabla 7A). Estos resultados garantizan la presencia de una concentración de levaduras viables y metabólicamente activas adecuada en el alimento balanceado para pollos durante el período de incubación, aún en condiciones de almacenamiento que favorecen la contaminación y el desarrollo de *A. parasiticus*.

Tabla 7B. Viabilidad de levaduras cerveceras en alimento para pollos contaminado con *A. flavus* CMUNLPI5

Alimento tratamiento ^α	Recuentos en agar YPD [UFC/g alimento]		
	Día 1 ^β	Día 5	Día 10
Adicionado RLC A	2,25 ± 0,06 x 10 ⁸ A	4,07 ± 0,67 x 10 ⁸ A	2,59 ± 0,16 x 10 ⁸ A
Adicionado RLC B	4,61 ± 0,60 x 10 ⁸ A	3,51 ± 0,95 x 10 ⁸ AB	1,58 ± 0,89 x 10 ⁸ B

^αLos alimentos producidos fueron adicionados al 20% p/p con RLCs obtenidos como réplicas biológicas (A y B) en condiciones idénticas de fermentación. ^βRecuento determinado en el alimento post-secado en horno de convección hasta a_w de 0,95 ± 0,1. Los resultados se informan como el promedio ± la desviación estándar de duplicados de cada tratamiento procesados a cada tiempo. Letras mayúsculas diferentes indican diferencia significativa ($P < 0,05$) entre los recuentos de un tratamiento evaluado a distintos tiempos de incubación.

Las levaduras viables en el alimento balanceado suplementado y contaminado artificialmente con *A. flavus* CMUNLPI5 mantuvieron un orden de recuento de 10⁸ UFC/g durante los 10 días de incubación. En el caso de la réplica biológica B, se detectó una diferencia significativa entre los días 1 y 10 de incubación, registrada en el coeficiente de recuento ($P < 0,05$, Tabla 7B). Estos resultados garantizan la presencia de levaduras viables y metabólicamente activas durante el período de incubación y en condiciones de almacenamiento que favorecen la contaminación y crecimiento de *A. flavus*.

Los resultados del análisis microbiológico del alimento adicionado con RLC al 20% p/p demuestran que el alimento formulado contiene una concentración de levaduras viables adecuada de acuerdo a la bibliografía consultada, que entre las levaduras se encuentran tanto cepas sacaromycéticas como cepas de morfología coincidente con *Pichia* sp., y que las levaduras son tolerantes a la presencia de una alta carga fúngica en el alimento. Esta última característica sugiere un rol de las levaduras de competencia por el nicho altamente activo, que podrían limitar el crecimiento de *Aspergillus* sp. por limitación de nutrientes y producción de metabolitos antifúngicos. Para arribar a conclusiones respecto de las capacidades biocontroladoras del RLC en el alimento es necesario profundizar en el estudio del alimento formulado.

7.4.6 Estudio de la capacidad bio-preservante de las levaduras cerveceras en el alimento para pollos formulado por adición de RLC

A continuación, se abordó el estudio de las propiedades biocontroladoras aportadas por la adición del RLC al alimento balanceado para pollos no esterilizado (NE). El

efecto se determinó específicamente sobre la contaminación fúngica natural propia del alimento y proveniente del ambiente.

Cabe destacar que los alimentos balanceados en base a granos tienen actividades acuosas significativamente inferiores a las utilizadas en este ensayo, entre 0,65 y 0,72. Este grado de humedad de los alimentos balanceados impide el desarrollo de hongos en el alimento bien conservado; investigaciones previas de nuestro grupo determinaron que estos niveles de humedad impiden el desarrollo fúngico incluso en alimento contaminado artificialmente con 10^4 conidios cada 100 g (Gamba, 2015a). Sin embargo, los silos y criaderos en los cuales suele almacenarse tienen ventilación deficiente y permiten la humidificación del alimento, favoreciendo la proliferación de la contaminación fúngica natural.

Por lo expuesto, el alimento no esterilizado (NE) y adicionado con RLC fue incubado a temperatura ambiente (27 °C en promedio) en condiciones que garantizaron el mantenimiento de su $a_w \geq 0,95$. Esta actividad acuosa inducida en el alimento balanceado permite el desarrollo de la micobiota natural, que en condiciones de humedad inferiores se vería muy reducido, incluso inhibido, y guarda correlato con el grado de humedad que el alimento puede adquirir en condiciones de almacenamiento inadecuadas, frecuentes en silos.

La figura 6 ilustra el estado de los diferentes tratamientos luego de 5 y 11 días de incubación en condiciones de elevada humedad y temperatura.

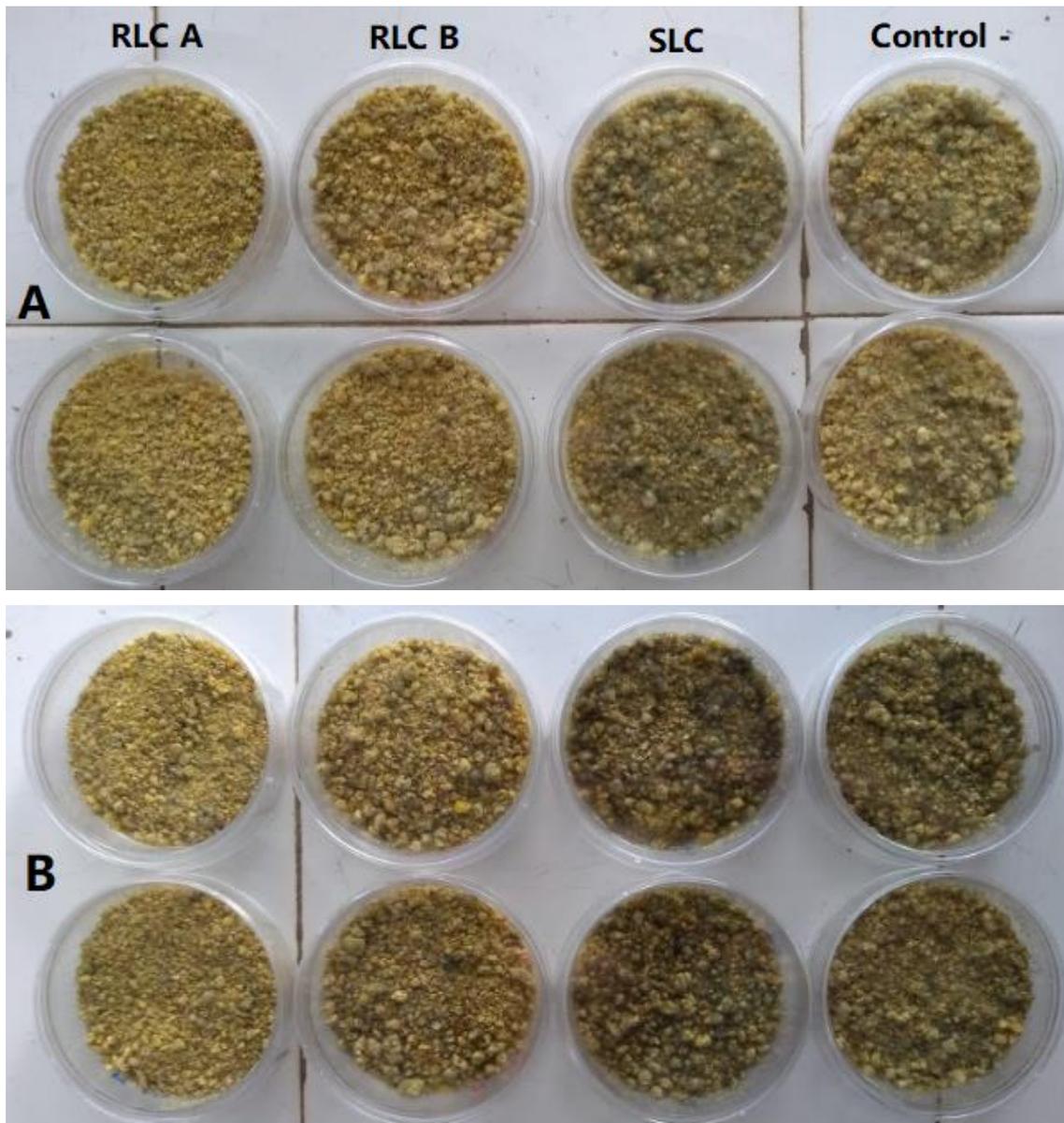


Fig. 6. Estudio de la vida útil del alimento adicionado con RLC. Fotografías del alimento para pollos NE formulado como se describe en la *sección 7.4.3*, Tabla 4. De izquierda a derecha se disponen: duplicados de alimento adicionado con RLC A; duplicados de alimento adicionado con RLC B; duplicados de alimento adicionado con metabolitos presentes en el mosto fermentado libre de células (SLC); duplicados de alimento adicionado con agua destilada estéril (control negativo). **A.** Día 5 de incubación. **B.** Día 11 de incubación.

Las fotografías confirman visualmente la reducción del crecimiento de la microbiota autóctona en el alimento para pollos adicionado con RLC y la ausencia de efecto biocontrolador en el alimento adicionado con mosto fermentado libre de células (SLC) (Fig. 6).

A distintos tiempos del ensayo se procesaron cajas para determinar el recuento de levaduras y el desarrollo visible de hongos filamentosos de cada tratamiento. Los resultados de este estudio se sintetizan en las tablas 8 y 9.

Tabla 8. Viabilidad de levaduras en alimento para pollos NE adicionado con RLC

Alimento tratamiento ^α	Recuentos en agar YGC [UFC/g alimento]		
	Día 1	Día 5	Día 11
Adicionado RLC A	2,38 ± 0,57 x 10 ⁸ A	7,69 ± 0,32 x 10 ⁸ B	6,41 ± 1,75 x 10 ⁸ B
Adicionado RLC B	1,11 ± 0,28 x 10 ⁸ A	5,47 ± 0,32 x 10 ⁸ B	5,02 ± 0,41 x 10 ⁸ B

^αLos alimentos producidos fueron adicionados al 20% p/p con RLC obtenidos como réplicas biológicas (A y B) en condiciones idénticas de fermentación. Los resultados se informan como el promedio ± la desviación estándar de duplicados de cada tratamiento procesados a cada tiempo. Letras superíndice distintas indican diferencia significativa (P < 0,05) entre muestras de un alimento tomadas a distintos tiempos.

Los recuentos en agar YPD dan cuenta de un aumento significativo de la cantidad de levaduras presentes en la matriz del alimento balanceado transcurridos 11 días de incubación en las condiciones descritas (P < 0,05, Tabla 8).

Adicionalmente, se realizaron recuentos en agar YPD del control de metabolitos solubles y el control negativo, a partir de los cuales se verificó la existencia de una microbiota de levaduras autóctonas del alimento balanceado significativamente menor en número (P < 0,05) que la levadura cervecera adicionada (resultados no mostrados). Además, se comprobó un aumento de la microbiota autóctona durante la incubación del control adicionado con mosto fermentado libre de células de levadura, lo que sugiere que el mosto filtrado tiene un potencial nutritivo para las levaduras autóctonas. A continuación, la Tabla 9 presenta los resultados de la determinación visual de presencia (+)/ausencia (-) de desarrollo fúngico en los alimentos llevados a a_w ≥ 0,95.

Tabla 9. Desarrollo visual de hongos filamentosos en alimento para pollos NE adicionado con RLC

Alimento tratamiento ^α	Día 1	Día 5	Día 11
Adicionado RLC A	-	-	+
Adicionado RLC B	-	-	+
Control metabolitos solubles^β	-	+	+
Control no adicionado^δ	-	+	+

^αLos alimentos fueron adicionados al 20% p/p con RLCs obtenidos como réplicas biológicas (A y B) en condiciones idénticas de fermentación. ^βAlimento producido por adición al 20% p/p con mosto cervecero fermentado libre de células. ^δAlimento producido por adición de agua destilada estéril hasta a_w 0,95. Se determinó desarrollo visible de micelio y/o compactación del alimento. (+): presencia de hongos filamentosos. (-): ausencia de hongos filamentosos.

Las siembras en agar DRBC (Diclorán Rosa de Bengala Cloranfenicol) se llevaron a cabo en los tratamientos que no presentaron desarrollo fúngico visible, para confirmar ausencia de hongos. Luego de 5 días de incubación a temperatura ambiente, los tratamientos adicionados con RLC no evidenciaron crecimiento de hongos filamentosos en el alimento ni en agar DRBC (< 10 colonias). Los controles negativo y adicionado con metabolitos solubles del mosto fermentado libre de levaduras presentaron un desarrollo micelial y de compactación incipiente. Luego de 11 días de incubación, todos los alimentos presentaron desarrollo fúngico detectable por visualización directa.

Sería interesante contrastar estos resultados con la cuantificación de hongos en el alimento llevada a cabo mediante un método de alta sensibilidad como PCR cuantitativa. A partir de lo determinado mediante análisis microbiológico clásico, puede afirmarse que la adición de RLC a alimento para pollos inhibe la germinación fúngica hasta 5 días de almacenamiento.

Los metabolitos solubles del mosto fermentado y filtrado no inhibieron el crecimiento fúngico (Tabla 9). Posiblemente, los metabolitos antimicrobianos presentes en el producto fermentado, como el etanol, sufrieron dilución a concentraciones subefectivas al ser adicionados al alimento para pollos. Estos datos indican que el RLC actúa como agente biocontrolador efectivo contra la microbiota autóctona del alimento, y que esta actividad biocontroladora se asocia, en estas condiciones, a la presencia de levaduras viables en el residuo cervecero.

Este tipo de experimentos se ha empleado en nuestro grupo de investigación en el estudio de otros productos fermentados, como el permeado de suero fermentado con gránulos de kefir de leche, una comunidad microbiana que incluye varios géneros de levaduras y bacterias ácido lácticas y ácido acéticas. Gamba y col. (2016b) reportaron que el alimento para pollos adicionado de este fermento incrementó significativamente el tiempo de desarrollo de *A. flavus*, *A. parasiticus* y *Penicillium sumatrense* inoculados artificialmente. En estudios anteriores, Gamba determinó que la adición de este producto fermentado al alimento para pollos en una concentración de 100% V/p redujo significativamente los recuentos de hongos filamentosos naturalmente presentes en el alimento luego de 30 días de incubación a 20 °C y a_w de 0,95 (Gamba, 2015a).

Otros autores han estudiado las propiedades de las levaduras como agentes de biocontrol fúngico. Armando y col. (2012) investigaron las propiedades antifúngicas de las cepas *S. cerevisiae* RC008, aislada de alimento para cerdos, y *S. cerevisiae* RC016, aislada de intestino de cerdo, contra *A. parasiticus* bajo diferentes condiciones ambientales evaluadas *in vitro*. Ambas levaduras demostraron mayor actividad antagonista a pH 4, con reducción en la producción de AFB₁. En estudios posteriores,

Armando y col. (2013) determinaron la actividad antagonista de estas cepas contra *A. carbonarius* y *F. graminearum* y su capacidad de reducir la producción de las micotoxinas OTA, ZEA y DON *in vitro*. Los autores postularon a estas levaduras con propiedades probióticas y biocontroladoras de hongos micotoxigénicos como candidatas a emplearse como aditivos de alimentos para producción animal, particularmente alimentos sometidos a largos períodos de almacenamiento.

Druverfors y col. (2002) comprobaron que *P. anomala* aislada de grano almacenado y capaz de inhibir a *P. roqueforti* en el laboratorio, logró inhibir el crecimiento del hongo en experimentos realizados sobre trigo recién cosechado y almacenado en silos de diferente permeabilidad al aire durante 14 meses. Al cabo del mismo tiempo, *P. roqueforti* llegó a recuentos de 10^5 UFC/g en silos sin tratamiento con *P. anomala*. En estudios previos, Petersson y col. (1999) obtuvieron resultados coherentes con los reportados por Druverfors y col. (2002) en trigo con alto contenido de humedad almacenado en silos durante 12 meses tratado con *P. anomala* e inoculado con *P. roqueforti*, que no creció en el período de estudio.

Tayel y col. (2013) estudiaron la cepa tipo *P. anomala* ATCC 34080, concluyendo que la levadura posee actividad lítica contra las hifas de *A. flavus*, que su inclusión en la dieta aumentó el contenido en proteína y que su consumo incrementó la ganancia de peso y disminuyó la mortalidad en ratones alimentados con dietas contaminadas con esporas de *A. flavus* aflatoxigénico.

Los estudios mencionados reportan las propiedades antifúngicas de cepas aisladas en el laboratorio. De acuerdo a la bibliografía consultada, este es el primer estudio realizado en un alimento balanceado para pollos suplementado con el subproducto de levaduras residuo de la fermentación cervecera con capacidad biocontroladora sobre la microbiota autóctona.

7.5 Conclusiones

- El RLC producido en co-fermentaciones secuenciales del *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62 contiene poblaciones apreciables de *P. kudriavzevii* MBELGA61 y de *S. cerevisiae* MBELGA62 y un contenido de etanol significativamente elevado respecto del RLC obtenido por fermentación con el *starter* M6. La co-inoculación con *S. cerevisiae* MBELGA62 logró recuperar la capacidad fermentativa del *starter* M6 sub-cultivado. El diseño de co-fermentación secuencial produjo una cerveza más atenuada con altas concentraciones de glicerol, metabolito de interés por sus propiedades sensoriales.

- El RLC producido retuvo más de un 50% de la aflatoxina originalmente presente en una suspensión de AFB₁ en PBS luego de simular *in vitro* su pasaje por el tracto gastrointestinal de pollos, lo que sugiere que un elevado porcentaje de la aflatoxina originalmente presente en el alimento balanceado sería retenido por las levaduras y excretado en las heces del pollo, disminuyendo sus efectos nocivos en la salud animal y los parámetros productivos.
- El alimento para pollos formulado por adición de un 20% p/p del RLC de co-fermentación del *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62, sin pre-tratamientos y tal y como se obtendría en la cervecería, no presentó diferencias significativas con el control respecto a su contenido proteico y aporte de energía bruta. El análisis microbiológico determinó recuentos de levaduras de entre 10⁷ y 10⁸ UFC/g de alimento, que garantiza una concentración de levadura viable efectiva en la captura de aflatoxina, de acuerdo a lo reportado en bibliografía, y explica el resultado de contenido de proteína.
- Las levaduras adicionadas sobrevivieron a una elevada contaminación por *Aspergillus* sp. en el alimento balanceado para pollos. Durante el estudio de vida útil del alimento suplementado con RLC, se comprobó la capacidad del residuo de inhibir la germinación de la contaminación fúngica natural hasta 5 días en incubaciones a temperatura ambiente y a_w de 0,95.

Conclusiones Generales

La cerveza es la bebida alcohólica más consumida a nivel mundial. En Argentina, su consumo se ha intensificado en las últimas décadas y diversificado en años recientes, de la mano del fenómeno de las cervecerías artesanales de pequeña y mediana escala, que se distribuyen a lo largo y ancho de nuestro país. Los cerveceros artesanales buscan mejorar su proceso de elaboración de forma permanente y ampliar la variedad de estilos de cerveza y de ingredientes incorporados a sus recetas.

Desde estas inquietudes, un grupo de productores locales platenses acudieron a la Universidad y a organismos de Ciencia y Técnica con demandas de tecnificación del proceso cervecero artesanal y propuestas para la producción conjunta de conocimiento aplicado. Nuestro grupo de investigación tomó el desafío de caracterizar *starters* cerveceros y levaduras aisladas respecto de sus propiedades tecnológicas y de estudiar la estabilidad de *starters* mixtos para asesorar a los productores artesanales en su manipulación. Entre los estudios realizados:

- Se aislaron e identificaron a nivel de cepa levaduras provenientes de la actividad cervecera, tanto de muestras provistas por productores artesanales locales como de muestras comerciales. Entre las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces*, se estudió la presencia de híbridos interespecíficos, como *S. pastorianus*, la levadura *lager*.
- Se estudiaron los parámetros de crecimiento de las cepas identificadas en medios de cultivo similares al mosto de cebada o que se formularon empleando como única fuente de carbono algún azúcar presente en el mosto cervecero.
- Se determinaron los parámetros fermentativos de las cepas en micro-fermentaciones de mosto de cebada a escala laboratorio, llevadas a cabo en agitación y a 20 °C, condiciones que simulan el proceso cervecero.
- Se estudió la capacidad de levaduras *S. cerevisiae* aisladas de kefir de agua de llevar a cabo la fermentación del mosto de cebada en las condiciones mencionadas, como estudio exploratorio de una fuente alternativa de potenciales nuevas cepas cerveceras.
- Se exploraron las condiciones de manipulación de un *starter* cervecero mixto durante la realización de fermentaciones de mosto de cebada.

A partir de los resultados obtenidos en esta etapa de tesis, se arribó a las siguientes conclusiones:

Las muestras cerveceras de *starters* comerciales y residuos de levaduras floculadas analizados están constituidos, en muchos casos, por más de una cepa de levadura. Estas cepas pudieron aislarse utilizando la técnica clásica de aislamiento de colonias gigantes envejecidas, que se fundamenta en la detección de diferencias macro-

morfológicas entre levaduras que se desarrollan en condiciones de abundancia de nutrientes y a tiempos prolongados. La técnica RFLP de ADN mitocondrial aplicada a los aislamientos permitió verificar la presencia de distintas cepas en una misma muestra, considerando como cepas diferentes a aquellos aislamientos cuyos perfiles de restricción del ADN mitocondrial presentaron bandas de tamaños distintos.

Adicionalmente, la técnica PCR-RFLP aplicada a determinados genes permitió la detección de híbridos *Saccharomyces* sp. inter-específicos, así como la detección de introgresiones interespecie. Pudo determinarse que la cepa SAFS235 es un híbrido *S. cerevisiae* x *S. eubayanus*, conocido como *S. pastorianus*, y se aisló como parte de una muestra que también incluye levaduras *S. cerevisiae* homocigotas. Además, se encontraron introgresiones del genoma de *S. paradoxus* en el genoma *S. cerevisiae* de las cepas LAGMV1, SAFABB3 y SAFS234, específicamente en el gen UBP7. Estos resultados corroboran nuevamente la co-existencia de levaduras cerveceras diferentes en *starters* comerciales y muestras artesanales.

Al avanzar en el estudio de los parámetros de crecimiento de las levaduras en diferentes medios, se observó que cepas aisladas a partir de una misma muestra presentaron diferencias en su capacidad de crecer en los diferentes sustratos. Asimismo, al estudiar su comportamiento en mosto de cebada, los parámetros de fermentación determinados y los metabolitos detectados mediante análisis HPLC de sus productos fermentados variaron entre las cepas. Estas observaciones son coherentes con la composición multi-cepa encontrada en las muestras cerveceras; posiblemente, el conjunto de las levaduras actúe como un consorcio, donde cada cepa aporta diferentes propiedades para lograr la bebida con las características deseadas: un determinado grado de atenuación; un cierto contenido de etanol y CO₂; un balance entre etanol y glicerol definido; la presencia de metabolitos de sabor y aroma que compongan un *bouquet* o perfil sensorial de estilo; la ausencia de compuestos *off-flavors*; una apariencia más o menos límpida; entre otras.

Un resultado interesante de esta etapa de caracterización tecnológica consistió en la observación de comportamientos fermentativos sustancialmente diferentes entre levaduras aisladas a partir de diferentes muestras que comparten un mismo perfil de restricción mitocondrial. A partir de estas observaciones, se postula que la identificación y diferenciación de cepas de levaduras utilizadas en cervecería debería considerar tanto criterios genéticos como criterios fenotípicos vinculados a su capacidad fermentativa y los aspectos sensoriales de sus productos de fermentación.

Entre las levaduras aisladas y estudiadas, *S. cerevisiae* SAFABB1, *S. cerevisiae* LAGMV2, *S. cerevisiae* SAFS231, *S. pastorianus* SAFS235, *S. cerevisiae* MBELGA62, *P. kudriavzevii* MBELGA61 y *M. guilliermondii* MUS122 se consideran cepas

interesantes, con ventajas para la producción cervecera vinculadas a su capacidad de fermentar el mosto y/o de producir sabores y aromas novedosos.

Adicionalmente y en respuesta a inquietudes traídas por los productores de cerveza locales, se estudió la estabilidad del *starter* mixto M6 a través de subcultivos y fermentaciones. Se encontró que la fermentación llevada a cabo por el *starter* tras varios subcultivos consecutivos no es adecuada para obtener cerveza, y que la co-inoculación secuencial con la levadura *S. cerevisiae* MBELGA62, aislada a partir de ese mismo *starter*, logró recuperar su capacidad fermentativa. El diseño de co-fermentación secuencial produjo una cerveza más atenuada, con altas concentraciones de glicerol, metabolito de interés por sus propiedades sensoriales. Estos resultados son valiosos en la asesoría dirigida a los cerveceros artesanales respecto de la correcta manipulación y reutilización de sus *starters*.

Frente a la demanda de los productores de nuevas cepas que aporten variedad a las levaduras comerciales disponibles, se abordó el aislamiento y caracterización de levaduras sacaromícéticas a partir de otros nichos fermentativos, como es el kefir de agua. Esta bebida artesanal, que contiene cantidades apreciables de etanol y CO₂, se produce fermentando soluciones azucaradas con gránulos de kefir de agua, que consisten en una comunidad de levaduras y bacterias ácido acéticas y ácido lácticas que conviven en una matriz de polisacárido producto de su metabolismo. Debido a que estos microorganismos viven en ambientes osmóticamente desafiantes, similares en este aspecto al mosto de cebada, y a que realizan fermentación alcohólica de azúcares simples, se exploró el potencial del kefir de agua como fuente de aislamiento de cepas de levaduras novedosas en la elaboración de cerveza.

Las levaduras sacaromícéticas aisladas de kefir de agua producido con gránulos de distintos orígenes se identificaron inicialmente como *S. cerevisiae*. Al realizar el análisis RFLP de su ADN mitocondrial, se encontró que todos los aislamientos de kefir de agua comparten un mismo perfil mitocondrial, que es además diferente de todos los perfiles determinados en levaduras cerveceras. Este resultado fue prometedor respecto a la posibilidad de encontrar una cepa novedosa; sin embargo, al estudiar sus propiedades fermentativas en mosto de cebada a escala de laboratorio, los parámetros determinados desalentaron la continuidad de esta línea de trabajo.

Hasta aquí, la síntesis de la etapa de estudio en relación a las propiedades tecnológicas de *starters* y levaduras para la elaboración de cerveza. La producción de esta bebida presenta otros desafíos, vinculados a la generación de residuos sólidos, como el bagazo de malta y las levaduras floculadas, que suponen un problema de descarte para los cerveceros artesanales, con los consecuentes efectos sobre el

ambiente. Los elevados costos del procesamiento de desechos de alta carga orgánica, necesario para su adecuado descarte, son inasequibles para productores cerveceros de pequeña y mediana escala.

Sin embargo, es posible reutilizar estos residuos sólidos, de importante valor nutritivo, como materia prima para la producción de alimento balanceado para animales. En torno a las soluciones requeridas por el sector de los cerveceros artesanales locales y con la experiencia de nuestro grupo de investigación en el estudio de microorganismos probióticos y antifúngicos y su aplicación en alimentación animal, la presente tesis abordó de forma amplia la caracterización del potencial de las levaduras cerveceras para ser empleadas como aditivo alimenticio en avicultura.

A partir de la bibliografía consultada, surgieron diferentes hipótesis acerca de la funcionalidad de las levaduras activas presentes en el residuo de cervecería. Por un lado, numerosos estudios dan cuenta de las propiedades y los mecanismos probióticos de *S. cerevisiae* var. *bouardii*, especialmente en el antagonismo de enteropatógenos como *E. coli* y *Salmonella*. Esta levadura guarda gran similitud taxonómica con *S. cerevisiae* cervecera, lo que sugiere que ciertas cepas empleadas en la elaboración de cerveza y que forman parte del residuo de fermentación podrían compartir aspectos probióticos con *S. bouardii*. Siguiendo esta hipótesis, la formulación de un alimento balanceado con adición de residuo de levaduras cerveceras podría redundar en propiedades probióticas antimicrobianas y tener efecto positivo en la sanidad de aves de cría. En este sentido, existen pocos estudios publicados que exploren el potencial del residuo de levaduras cerveceras floculadas como probiótico, en su mayoría referidos a la actividad ictícola y de producción de mariscos.

Por otro lado, se ha reportado la capacidad secuestrante de micotoxinas por parte de levaduras aisladas de diferentes nichos. La contaminación del alimento producido a base de cereal por hongos filamentosos es frecuente, y se ve favorecida en condiciones inadecuadas de almacenamiento del alimento balanceado, como la alta humedad e insuficiente ventilación, común en silos. Muchos de estos hongos son capaces de producir micotoxinas, metabolitos tóxicos, algunos de ellos termoestables, de alto impacto en la sanidad animal y en los parámetros zootécnicos. La contaminación fúngica, además de producir pérdidas económicas sustanciales para la actividad pecuaria, es riesgosa para la salud humana, ya que ciertas micotoxinas como la aflatoxina B₁, sufren biotransformación y sus metabolitos intermedios pueden acumularse en ciertos órganos del animal, llegando al consumo humano a través de la carne y la leche. Otra de las hipótesis de este trabajo sostuvo que las levaduras

viables que componen el residuo cervecero podrían actuar como agentes de biocontrol fúngico y secuestrantes de micotoxinas en el alimento balanceado.

Para abordar estos objetivos de estudio, durante esta etapa de la investigación se llevaron a cabo las siguientes actividades:

- Se determinó la capacidad de levaduras aisladas y de *starters* completos de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos emulado *in vitro*.
- Se determinó la capacidad de las levaduras de adherirse a un modelo de epitelio intestinal, estudio fundamental en la caracterización de un microorganismo con potencial probiótico.
- Se investigó la capacidad de las levaduras cerveceras de co-agregar con enteropatógenos de aves y agentes zoonóticos relevantes, como *E. coli* y *S. Enteritidis*. Se estudió, además, el efecto del co-cultivo de levaduras y bacterias sobre la adhesión, la invasividad y el daño celular producido por enteropatógenos en un modelo celular intestinal.
- Se estudiaron los aspectos antibacterianos y antifúngicos de los sobrenadantes libres de células de cultivos de las levaduras llevados a cabo en condiciones de fermentación cervecera, entre otras.
- Se estudió el efecto de la presencia de levaduras cerveceras y sus metabolitos sobre la germinación y crecimiento de *A. flavus* y *A. parasiticus* toxigénicos. Entre otros experimentos, se determinó el efecto de los metabolitos volátiles de las levaduras sobre el desarrollo fúngico, en ausencia de células.
- Se caracterizó a las levaduras cerveceras como agentes secuestrantes de aflatoxina B₁, en condiciones *in vitro*. Adicionalmente, se determinó su capacidad de mantener unida la micotoxina durante el pasaje por el tracto gastrointestinal de pollos simulado.

A continuación, se sintetizan las conclusiones logradas a partir de estos experimentos. Como condición primordial, un probiótico debe ser capaz de sobrevivir a las condiciones del tracto gastrointestinal del organismo hospedador para poder ejercer su efecto benéfico. Bajo esta premisa, se estudió la capacidad de las levaduras de tolerar las condiciones gastrointestinales de pollos y se comprobó que tanto *starters* completos como varias de las levaduras cerveceras aisladas son capaces de sobrevivir a las condiciones de pH, temperatura, presencia de bilis y enzimas digestivas del tracto gastrointestinal de pollos simuladas *in vitro*. Entre las cepas evaluadas, *P. kudriavzevii* MBELGA61 destacó por ser capaz de mantener su recuento

de viables luego de las incubaciones. Las cepas *S. cerevisiae* toleraron adecuadamente las condiciones evaluadas.

Con el objetivo de profundizar en la caracterización probiótica de *S. cerevisiae*, la levadura cervecera por excelencia, y de *P. kudriavzevii*, una levadura no convencional en la elaboración de cerveza que demostró los niveles de tolerancia al TGI de pollos más elevados, se seleccionaron las cepas *S. cerevisiae* MBELGA62 y *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6, a partir del cual fueron aisladas, para continuar su estudio. Los sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de micro-fermentaciones de mosto de cebada llevadas a cabo con las levaduras seleccionadas demostraron capacidad bacteriostática sobre los enteropatógenos y agentes zoonóticos *S. Enteritidis* CIDCA 101 y *E. coli* EHEC 60169. Debido a que estos SLC se obtuvieron en condiciones de cultivo que emulan el proceso cervecero, este resultado sugiere el potencial bacteriostático de una cerveza producida con las levaduras seleccionadas y del residuo de levaduras floculadas, que incluye el sobrenadante de fermentación.

A continuación, se abordó el estudio de las propiedades probióticas asociadas a la presencia de levaduras activas. Como etapa previa a los experimentos de adhesión sobre una línea celular de epitelio intestinal, se comprobó la capacidad de las levaduras seleccionadas de autoagregar, de forma eficiente *S. cerevisiae* MBELGA62 y de forma moderada *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6. Al estudiar la adhesión sobre células Caco-2/TC7, las levaduras demostraron una baja capacidad de adherirse a epitelio intestinal. Consultada bibliografía especializada en probióticos, varios autores reportan que la incapacidad de adherirse al intestino puede ser un rasgo funcional en microorganismos que establecen fuertes interacciones con enteropatógenos o que adsorben compuestos tóxicos en su superficie. En estos casos, el efecto probiótico radica en la eliminación del patógeno o la toxina mediante un transcurso veloz por el tracto intestinal, asociados al microorganismo benéfico y evitando su interacción con las mucosas del hospedador.

A la luz de estos resultados, se estudió la capacidad de las levaduras cerveceras de asociarse con enteropatógenos. Al ensayar la co-agregación de microorganismos, se demostró una fuerte interacción de las levaduras con *E. coli* ATCC 25922, en particular de *S. cerevisiae* MBELGA62, y moderada a débil con *Salmonella*. En términos generales, las levaduras cerveceras co-agregaron con *E. coli* ATCC 25922 de forma eficiente, incluidas aquellas que se obtuvieron a partir de micro-fermentaciones de mosto de cebada; esto sugiere que las levaduras residuo de la producción de cerveza podrían actuar como agentes co-agregantes de enteropatógenos de pollos, con potencial en la prevención de infecciones en granjas avícolas.

Bajo esta hipótesis, se avanzó en el estudio de las propiedades antimicrobianas de las levaduras cerveceras; específicamente, se determinó el efecto generado por la presencia de levaduras, sobre la asociación e invasión de enteropatógenos a células de la línea Caco-2/TC7. A partir de estos experimentos se verificó que la infectividad de *S. Enteritidis* CIDCA 101 no es afectada *in vitro* por las levaduras. Sin embargo, *P. kudriavzevii* MBELGA61 y el *starter* M6 redujeron significativamente ($P < 0,05$) el daño celular producido por *S. Enteritidis* CIDCA 101 sobre la línea celular, mientras que *S. cerevisiae* MBELGA62 lo hizo en células co-incubadas con *E. coli* EHEC 60169. Estos resultados introducen una perspectiva de estudio: el potencial efecto inmunomodulador de las levaduras cerveceras sobre células Caco-2/TC7, que debería abordarse a través de estudios de interacción enteropatógeno-hospedador a nivel inmunológico.

A partir de los resultados obtenidos durante esta etapa, es posible concluir que las levaduras cerveceras toleran las condiciones del tracto gastrointestinal de pollos; producen sobrenadantes con efecto bacteriostático sobre bacterias patógenas; demuestran un efecto citoprotector frente a enteropatógenos sobre un modelo de epitelio intestinal, reduciendo los niveles de daño celular; y presentan propiedades adsorbentes, con capacidad de co-agregar con bacterias patógenas *in vitro*. Numerosos reportes proponen aplicaciones para levaduras capaces de actuar como agentes co-agregantes de bacterias y adsorbentes de toxinas.

Comprobadas sus propiedades frente a enteropatógenos, se decidió continuar con el estudio de las competencias antifúngicas y secuestrantes de toxinas del *starter* M6 y sus aislamientos. Respecto a la capacidad de secuestro de micotoxinas ciertos autores, citados a lo largo de este trabajo, proponen la factibilidad de emplear el residuo de la industria cervecera en la reducción de la biodisponibilidad de micotoxinas en alimento para animales contaminado. Una investigación determinó *in vitro* que el residuo de la fermentación cervecera conteniendo *S. cerevisiae*, seco y molido, capturó entre el 75,1 y el 77,5% de ZEA, y entre el 40 y el 60% de AFB₁, OTA y DON presentes en suspensiones buffer. Otros investigadores utilizaron este mismo residuo seco y molido para realizar un estudio comparativo con otras fuentes de levaduras (levaduras intactas inactivas de la fermentación de caña de azúcar y de fermentación cervecera, células de levaduras hidrolizadas, extractos de pared celular de levaduras y levaduras activas), y concluyeron que aquellos productos que contienen levaduras hidrolizadas o extractos de pared de levaduras lograron los mejores porcentajes de captura de AFB₁. El porcentaje de captura de aflatoxina obtenido con el residuo cervecero fue de entre 49,2 y 55,0%, similar a aquellos obtenidos con levaduras inactivas intactas. Otros estudios afirman que la adsorción de aflatoxinas es más

eficiente cuando se emplean levaduras cerveceras completas o sus extractos de pared celular respecto de cuando se emplean levaduras autolizadas o inactivadas, las cuales presentaron reversibilidad frecuente de la adsorción.

Dentro de nuestro grupo de investigación, estudios previos exploraron las capacidades antifúngicas y secuestrantes de otros residuos, como el permeado de suero de quesería fermentado con gránulos de kefir de leche, una comunidad de microorganismos de comprobada capacidad probiótica que incluye levaduras. León (2013) encontró que los sobrenadantes libres de células de leche fermentada con gránulos de kefir poseen una acción antifúngica *in vitro* sobre *A. flavus*, vinculada a la concentración de ácidos orgánicos no disociados presentes en el fermento. También obtuvo resultados positivos al evaluar la capacidad de estos sobrenadantes de fermentación de prolongar la vida útil de un alimento a base de maíz típico de Colombia, la “arepa antioqueña”. León inició los estudios acerca de la capacidad antifúngica del permeado de suero fermentado con gránulos de kefir CIDCA AGK1 adicionado al alimento para pollos, y obtuvo resultados preliminares sobre la prolongación de la vida útil. Otro aspecto abordado por el grupo fue la capacidad secuestrante de micotoxinas de los microorganismos aislados del kefir. Estas investigaciones determinaron que la captura de aflatoxina B₁ aumenta con la concentración de microorganismos, varía con el tiempo de incubación, con respecto al tipo de microorganismo y de acuerdo al pH e hidrofobicidad. Gamba profundizó estos estudios durante su tesis doctoral (2015a), empleando cepas de *A. flavus* y *A. parasiticus* aflatoxigénicas y cepas de *Fusarium graminearum* productoras de ZEA, a fin de investigar los efectos de los sobrenadantes libres de células de leche vacuna y de permeado de suero fermentados con gránulos de kefir CIDCA AGK1 sobre el crecimiento fúngico y sobre su capacidad de producir micotoxinas. Su trabajo exploró la adición de permeado de suero fermentado con kefir completo al alimento para pollos contaminado artificialmente con conidios de *A. parasiticus*. Gamba determinó que la inhibición parcial del crecimiento fúngico o efecto fungistático promueve la producción de AFB₁ por parte de la cepa *A. parasiticus* CMUNLP7, y propuso la importancia de desarrollar sistemas de conservación que combinen diferentes barreras, entre ellas la aplicación del permeado de suero fermentado, para obtener el efecto fungicida requerido para la biopreservación.

La presente tesis abordó la caracterización funcional de otro desecho con potencial para ser utilizado en alimentación de aves, el efluente de levaduras floculadas de la industria cervecera, que incluye a la levadura activa y al sobrenadante de mosto fermentado, conteniendo etanol y otros metabolitos. Cabe destacar que estos estudios utilizaron el residuo de levaduras cerveceras viables tal y como se obtiene del

fermentador, sin tratamientos previos de inactivación, a fin de agregar valor a este desecho sin costo adicional para el pequeño productor cervecero. Además, se contempló que la suplementación con levadura fisiológicamente activa puede aportar a las propiedades probióticas del alimento.

Se comprobó que las levaduras cerveceras son eficaces en la reducción del crecimiento de *Aspergillus* sp. en co-cultivos en agar papa, limitando las velocidades de crecimiento radial de *A. flavus* CMUNLP15 entre un 16,2 y un 37,8% y las velocidades de *A. parasiticus* CMUNLP7 entre un 24 y un 42,5%, efecto que puede atribuirse a la competencia por nutrientes y a la producción de metabolitos antagónicos solubles por parte de las levaduras. Durante estos ensayos se observó la inhibición del avance del micelio fúngico y la ausencia de conidios en el perímetro de la colonia de *Aspergillus* sp. cercano al inóculo de levaduras.

Además, se verificó la presencia de metabolitos solubles reductores de la germinación fúngica en los sobrenadantes libres de células obtenidos a partir de micro-fermentaciones de mosto cervecero. Este resultado indica que los metabolitos antagonistas contra *Aspergillus* sp. estarían presentes en la bebida producida con estas levaduras y en el residuo de levaduras de la industria cervecera.

Adicionalmente, se confirmó que las levaduras cerveceras estudiadas durante esta tesis sintetizan metabolitos volátiles altamente antagonistas contra *Aspergillus* sp., especialmente la cepa *P. kudriavzevii* MBELGA61. Todas las levaduras prolongaron la fase de latencia fúngica más de un 100% y redujeron las velocidades de crecimiento de *Aspergillus* sp. entre un 20 y un 44%. Nuevamente, se observó la incapacidad del hongo de producir conidios, sus estructuras reproductivas, en presencia de los metabolitos volátiles de las levaduras.

Las levaduras cerveceras seleccionadas y obtenidas como subproducto residual de la fermentación son agentes biocontroladores de *Aspergillus* sp. efectivos, afectando sus parámetros de crecimiento y su capacidad de producir estructuras reproductivas. Estas observaciones sugieren el potencial de utilizar este efluente de la industria cervecera como agente biocontrolador adicionado al alimento balanceado para animales, lo que favorecería el retraso del desarrollo fúngico y una limitación en la producción y dispersión de esporas en el alimento, reduciendo la invasividad de hongos filamentosos.

Comprobada la baja adhesividad *in vitro* de las levaduras al epitelio intestinal, se avanzó en el estudio de sus propiedades como agentes secuestrantes de micotoxinas, específicamente aflatoxina B₁. Se observó un efecto citoprotector de las levaduras sobre la línea celular de hepatocitos humanos HepG2 en presencia de AFB₁. Vinculada a este efecto, se demostró su capacidad de secuestro de AFB₁, con un 79,0

a 79,2% de la micotoxina inicial adsorbida por las levaduras obtenidas a partir de micro-fermentaciones cerveceras. Los porcentajes obtenidos superan ampliamente lo reportado por otros autores; mientras que Campagnollo y col. (2015) informan una captura por RLC seco y molido de entre el 40 y el 60% de la AFB₁ presente en suspensiones buffer (el RLC húmedo utilizado en esta tesis secuestró entre 1,3 y 2,0 veces más), Bovo y col. (2015) obtuvieron con el mismo residuo seco y molido un porcentaje de secuestro de aflatoxina de entre 49,2 y 55,0%, (el RLC húmedo capturó alrededor de 1,4 a 1,6 veces más). Esta propiedad del RLC podría redundar en la protección de pollos de los efectos del consumo de micotoxinas a través de alimento contaminado. Como se mencionó previamente, la baja eficiencia de adhesión a la línea celular intestinal Caco-2/TC7 comprobada en las levaduras cerveceras reviste, en perspectiva, el mayor interés, puesto que sugiere que la micotoxina sería eliminada rápidamente del organismo del ave, gracias al tránsito fluido de la levadura unida a AFB₁ y su pronta excreción. Estos resultados postulan al residuo de las levaduras subproducto de la fermentación cervecera como aditivo para alimentación animal con potencial biocontrolador de *Aspergillus* sp. y detoxificante de AFB₁.

Dados los prometedores resultados de la caracterización funcional del *starter* M6 y sus levaduras aisladas, se avanzó en la formulación de un alimento para pollos formulado por adición del efluente de cervecería que contiene a estas levaduras y se inició el estudio de sus propiedades, realizando las siguientes actividades:

- Se formuló un alimento balanceado para aves por adición del residuo de levaduras cerveceras completo y se lo caracterizó respecto de su composición fisicoquímica y microbiológica.
- Se estudió la capacidad de biocontrol del residuo de levaduras cerveceras activas sobre la contaminación fúngica natural del alimento balanceado para aves en condiciones de elevada humedad y temperatura, que favorecen el desarrollo de hongos filamentosos.

Para formular el alimento, se seleccionó el RLC producido en co-fermentaciones secuenciales del *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62, puesto que contiene poblaciones apreciables de ambas levaduras estudiadas, *P. kudriavzevii* MBELGA61 y de *S. cerevisiae* MBELGA62, y un contenido de etanol significativamente elevado respecto del RLC obtenido por fermentación simple con el *starter* M6. Este RLC retuvo más de un 50% de la aflatoxina originalmente presente en una suspensión de AFB₁ luego de simular su pasaje por el tracto gastrointestinal de pollos, lo que sugiere que un elevado porcentaje de la aflatoxina originalmente presente en un alimento

balanceado contaminado sería retenido por las levaduras, disminuyendo su absorción a nivel intestinal con los consecuentes efectos nocivos en la salud animal.

El alimento para pollos formulado por adición de un 20% p/p del RLC obtenido por co-fermentación del *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62 presentó recuentos de levaduras de entre 10^7 y 10^8 UFC/g de alimento, que garantizan una concentración de levadura activa efectiva en la captura de aflatoxina, de acuerdo a lo reportado en bibliografía. Respecto a su composición fisicoquímica, el alimento suplementado con RLC no presentó diferencias significativas con el alimento control sin aditivos.

Las levaduras agregadas sobrevivieron al desafío de contaminación artificial con 10^4 conidios de *Aspergillus* sp. por gramo de alimento balanceado. Durante el estudio de vida útil del alimento suplementado con RLC, se comprobó la capacidad del residuo de inhibir la germinación de la contaminación fúngica natural hasta 5 días de incubación a temperaturas moderadas y actividad acuosa igual o superior a 0,95, condiciones que promueven el desarrollo de hongos y emulan a aquellas del alimento mal almacenado.

En síntesis, el residuo de levaduras activas obtenido a partir de la fermentación de mosto cervecero con el *starter* M6 y *S. cerevisiae* MBELGA62 demostró tener propiedades antimicrobianas, antifúngicas y secuestrantes de micotoxinas de interés para la producción avícola. La presente tesis, que consistió en una exploración amplia de las características de este residuo, suscitó nuevas preguntas y perspectivas que podrían ser origen de múltiples líneas de investigación, algunas de las cuales se detallarán a continuación.

Perspectivas:

En relación al desarrollo de conocimiento aplicable en cervecería:

Se propone profundizar en el estudio de las condiciones de conservación y manipulación más adecuadas de *starters* cerveceros mixtos para lograr reproducibilidad en la elaboración de cerveza, a fines de generar un cuerpo de conocimiento aplicado organizado en una guía práctica para el asesoramiento de productores artesanales.

Asimismo, es de interés estudiar la aplicabilidad de otras formas de conservación, como la liofilización y el secado, de acuerdo a su impacto en la viabilidad, el estado fisiológico y la estabilidad en las propiedades tecnológicas de las levaduras cerveceras.

Una línea de investigación promisorio respecto de las posibles aplicaciones de sus resultados consiste en el estudio de los perfiles de compuestos volátiles de productos fermentados obtenidos con *starters* mixtos y sus aislamientos. Por un lado, generaría

conocimiento útil para el diseño de *starters* novedosos a emplearse en la elaboración de cervezas de perfiles sensoriales innovadores. Por otro, la identificación de metabolitos volátiles con actividad antifúngica y antimicrobiana, conocida o potencial, podría aplicarse en el estudio de la revalorización del RLC como aditivo funcional en alimentación animal.

En relación al desarrollo de un alimento funcional para aves:

Se propone profundizar en la caracterización del alimento suplementado con RLC producido durante esta tesis respecto de sus propiedades secuestrantes de micotoxinas y de su capacidad de retenerlas durante el pasaje por el tracto gastrointestinal.

Vinculado al estudio de los metabolitos volátiles con actividad antagonista, resulta de interés llevar adelante la caracterización del efecto fungistático y fungicida del alimento adicionado con RLC conservado en condiciones que mantengan una micro-atmósfera concentrada en los compuestos volátiles producidos por levaduras cerveceras. Asimismo, estudiar la capacidad de hongos micotoxigénicos de producir toxinas en presencia de volátiles de levaduras.

De determinarse la aplicabilidad de procesos de secado o liofilizado al RLC, se propone caracterizar al producto resultante respecto de sus propiedades antimicrobianas, antifúngicas y secuestrantes de micotoxinas. Además, explorar la formulación de alimento balanceado adicionado con RLC seco o liofilizado en diferentes proporciones, analizar su composición fisicoquímica y microbiológica y estudiar los costos y beneficios de su producción en relación al alimento formulado durante esta tesis por adición del RLC tal y como se obtiene de la cervecería.

En una etapa más avanzada, es de interés para este grupo de investigación llevar adelante estudios *in vivo*, aplicando una dieta suplementada con el RLC y evaluando sus efectos en la morbi/mortalidad y en los parámetros zootécnicos de pollos, en contraste con una dieta control sin aditivos. El diseño experimental contemplaría la adición de RLC a la dieta en diferentes proporciones.

En el contexto de la extensión: los promisorios resultados de este trabajo se aplicarán en lo inmediato, dentro del marco del proyecto de extensión Huerta Urbana y Producción Aviar Familiar, de la Cátedra Libre en Salud y Derechos Humanos de la FCE, con la incorporación del residuo cervecero, generado por la actividad de los productores artesanales de la región, a la dieta de gallinas ponedoras de la Cooperativa Barrios Productores, Barrio Aeropuerto de La Plata.

Además, los estudios y aplicaciones de los resultados y perspectivas de esta tesis se profundizarán en el marco del proyecto PICT 2018-03702, "Aplicación de productos fermentados naturales en la producción aviar y de compostaje", diseñado y aprobado para su aplicación con cooperativas productoras de la región.



Referencias bibliográficas

- Ablin, A. (2012). El mercado de la cerveza. Área de Industria Agroalimentaria - Dirección de Promoción de la Calidad de Productos Agrícolas y Forestales - Subsecretaría de Agregado de Valor y Nuevas Tecnologías. Alimentos Argentinos – MinAgri.
http://www.alimentosargentinos.gob.ar/contenido/sectores/bebidas/Informes/Cerveza_02_2011_05May.pdf. Consultado en julio de 2020.
- Ahiwe, E. U., Abdallah, M. E., Chang'a, E. P., Al-Qahtani, M., Omede, A. A., Graham, H., Iji, P. A. (2019). Influence of autolyzed whole yeast and yeast components on broiler chickens challenged with *Salmonella* lipopolysaccharide. *Poultry Science*, 98, 7129–7138. <http://dx.doi.org/10.3382/ps/pez452>.
- Alonso, M. Z., Krüger, A., Sanz, M. E., Padola, N. L., Lucchesi, P. M. A. (2016). Serotypes, virulence profiles and stx subtypes of Shigatoxigenic *Escherichia coli* isolated from chicken derived products. *Revista Argentina de Microbiología*, 48(4), 325-328.
- Alonso-del-Real, J., Lairón-Peris, M., Barrio, E., Querol, A. (2017). Effect of temperature on the prevalence of *Saccharomyces non cerevisiae* species against a *S. cerevisiae* wine strain in wine fermentation: competition, physiological fitness and influence in final wine composition. *Frontiers in Microbiology*, 8:150. doi: 10.3389/fmicb.2017.00150
- Alsammar, H. & Delneri, D. (2020). Minireview. An update on the diversity, ecology and biogeography of the *Saccharomyces* genus. *FEMS Yeast Research*, 20. doi: 10.1093/femsyr/foaa013
- Aletekruse, S. F., Cohen, M. L., Swerdlow, D. L. (1997). Emerging foodborne diseases. *Emerging Infectious Diseases*, 3, 285-293.
- Alvarez, P., Malcorps, P., Almeida, A. S., Ferreira, A., Meyer, A. M., Dufour, J. P. (1994). Analysis of free fatty-acids, fusel alcohols, and esters in beer—an alternative to Cs2 extraction. *Journal of the American Society of Brewing Chemistry*, 52, 127–134.
- Aquilani, B., Laureti, T., Poponi, S., Secondi, L. (2015). Beer choice and consumption determinants when craft beers are tasted: An exploratory study of consumer preferences. *Food Quality and Preference*, 41, 214-224.
- Arabi, S. A. M. (2015). The effects of different protein and energy levels on broilers performance under hot climatic conditions. *International Journal of Innovative Agriculture & Biology Research*, 3(1), 19-28.
- Armando, M. R., Pizzolitto, R. P., Dogi, C. A., Cristofolini, A., et al. (2012). Adsorption of ochratoxin A and zearalenone by potential probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains and its relation with cell wall thickness. *Journal of Applied Microbiology*, 113, 256–264.
- Armando, M. R., Dogi, C. A., Poloni, V., Rosa, C. A. R., Dalcerro, A. M., Cavaglieri, L. R. (2013). *In vitro* study on the effect of *Saccharomyces cerevisiae* strains on growth and mycotoxin production by *Aspergillus carbonarius* and *Fusarium graminearum*. *International Journal of Food Microbiology*, 161, 182–188.
- Arroyo-López, F. N., Pérez-Través, L., Querol, A., y col. (2011). Exclusion of *Saccharomyces kudriavzevii* from a wine model system mediated by *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 28, 423–35.

- Awad, E. A., Zulkifli, I., Soleimani, A. F., Aljuobori, A. (2017). Effects of feeding male and female broiler chickens on low-protein diets fortified with different dietary glycine levels under the hot and humid tropical climate. *Italian Journal of Animal Science*, 16(3), 453-461.
- Bajaj, B. K., Raina, S., Singh, S. (2013). Killer toxin from a novel killer yeast *Pichia kudriavzevii* RY55 with idiosyncratic antibacterial activity. *Journal of Basic Microbiology*, 53, 645–656.
- Baker, E., Wang, B., Bellora, N., y col. (2015). The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. *Molecular Biology and Evolution*, 32, 2818–31.
- Barbosa, R., Almeida, P., Safar, S. V. y col. (2016). Evidence of natural hybridization in Brazilian wild lineages of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genome Biology and Evolution*, 8, 317–29.
- Baron, S. (1996). *Epidemiology-Medical Microbiology*. Galveston: University of Texas Medical Branch.
- Basso, R. F., Alcarde, A. R., Portugal, C. B. (2016). Review: Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute to innovative brewing fermentations? *Food Research International*, 86, 112–120.
- Belloch, C., Barrio, E., Uruburu, F., García, M. D., Querol, A. (1997). Characterisation of four species of the genus *Kluyveromyces* by mitochondrial DNA restriction analysis. *Systematic and Applied Microbiology*, 20, 397-408.
- Belloch, C., Barrio, E., García, M. D., Querol, A. (1998). Inter and intraespecific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. *Yeast*, 14, 1341-1354.
- Belloch, C., Orlic, S., Barrio, E. y col. (2008). Fermentative stress adaptation of hybrids within the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *International Journal of Food Microbiology*, 122, 188–95.
- Belloch, C., Pérez-Torrado, R., González, S. S., Pérez-Ortín, J. E., García-Martínez, J., Querol, A., Barrio, E. (2009) Chimeric genomes of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *Applied and Environmental Microbiology*, 75, 2534-2544.
- Bellon, J., Eglinton, J., Siebert, T., y col. (2011). Newly generated interspecific wine yeast hybrids introduce flavour and aroma diversity to wines. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 91, 603–12.
- Bellon, J., Schmid, F., Capone, D., y col. (2013). Introducing a new breed of wine yeast: interspecific hybridisation between a commercial *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast and *Saccharomyces mikatae*. *PLoS One*, 8, e62053.
- Bellon, J., Yang, F., Day, M., y col. (2015). Designing and creating *Saccharomyces* interspecific hybrids for improved, industry relevant, phenotypes. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 8597–609.
- Bennet J. & Klich, M. (2003). Mycotoxins. *Clinical Microbiology Reviews*, 16, 497-516.

- Berkhout, B., Bertling, L., Bleeker, Y., de Wit (EY), W., Kruis, G., Stokkel, R., Theuvs, R. (2014). The contribution made by beer to the European economy. Full Report December 2013. A report commissioned by The Brewers of Europe and conducted by Regioplan Policy Research and EY.
[http://www.ey.com/DLResults?Query=\[CountryCode\]=GL\[LanguageCode\]=en\[T_Industry\]=%28Industries/Consumer%20Products%29](http://www.ey.com/DLResults?Query=[CountryCode]=GL[LanguageCode]=en[T_Industry]=%28Industries/Consumer%20Products%29). Consultado en julio de 2020.
- Bertechini, A. G. (2012). Niveles de proteína y aminoácidos en avicultura. Universidade Federal de Lavras, MG/Brasil. Consultado en: http://amevea-ecuador.org/web_antigua/memorias2012/memorias/PROTEINA_AMINOACIDOS_EN_AVICULTURA_DR_BERTECHINI.pdf
- Bevan, E. A. & Somers, J. M. (1969). Somatic segregation of the killer (k) and neutral (n) cytoplasmic genetic determinants in yeast. *Genetic Research*, 14, 71–77.
- Binder, E., Tan, L., Chin, L., Handl, J., Richard, J. (2007). Worldwide occurrence of mycotoxins in commodities, feeds and feed ingredients. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 265-282.
- Bleve, G., Grieco, F., Cozzi, G., Logrieco, A., Visconti, A. (2006). Isolation of epiphytic yeasts with potential for biocontrol of *Aspergillus carbonarius* and *A. niger* on grape. *International Journal of Food Microbiology*, 108, 204–209.
- Bohórquez, A. V. D. (2014). Perspectiva de la producción avícola en Colombia. (Especialización en alta gerencia). Universidad Militar Nueva Granada. Bogotá, Colombia.
- Bokulich, N. A., Bamforth, C. W., Mills, D. A. (2012). Brewhouse-resident microbiota are responsible for multistage fermentation of American coolship ale. *PLoS ONE*, 7, e35507
- Bokulich, N. A. & Bamforth, C. W. (2013). The microbiology of malting and brewing. *Microbiology & Molecular Biology Review*, 77, 157-172.
- Boulton, C. (2017). Brewing Yeast Physiology. In N. A. Bokulich & C. W. Bamforth (Eds.), *Brewing Microbiology: Current Research, Omics and Microbial Ecology* (pp. 1-28). Norfolk, UK: Caister Academic Press.
- Bourdichon, F., Casaregola, S., Farrokh, C., y col. (2012). Food fermentations: microorganisms with technological beneficial use [published correction appears in *Int J Food Microbiology*, 2012, 1, 156(3), 301]. *International Journal of Food Microbiology*, 154(3), 87-97. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.12.030
- Bovo, F., Franco, L. T., Rosim, R. E., Barbalho, R., Fernandes Oliveira, C. A. (2015). *In vitro* ability of beer fermentation residue and yeast-based products to bind aflatoxin B₁. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(2), 577–581.
- Bradbury, J. E., Richards, K. D., Niederer, H. A. y col. (2006). A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 89, 27–37.
- Brake, J. (1991). Lack of effect of all live yeast culture on broiler, breeders and progeny performance. *Poultry Science*, 70, 1037-1039.

- Brewers-Association (2020). National beer sales and production data. The New Brewer. <https://www.brewersassociation.org/statistics-and-data/national-beer-stats/>. Consultado en julio de 2020.
- Briggs, D. E., Boulton, C. A., Brookes, P. A., Stevens, R. (2004). *Brewing Science and Practice*. Flórida: CRC Press LLC and Woodhead Publishing Limited. p. 863.
- Brown, D. W. (2011). The KP4 killer protein gene family. *Current Genetics*, 57, 51–62.
- Brumano, G. (2009). Níveis de lisina e de metionina + cistina e proteína bruta para melhor qualidade de ovo e de carcaça de aves e suínos. *Nutritime*, 6(3), 898-917.
- Bueno, D., Casale, C., Pizzolitto, R., Salvano, M., Oliver, G. (2007). Physical adsorption of aflatoxin B₁ by lactic acid bacteria and *Saccharomyces cerevisiae*: A theoretical model. *Journal of Food Protection*, 70, 2148–2154.
- Bueno, D. J., López, N. R., Rodríguez, F., Procura, F. (2016). Producción de pollos parrilleros en países sudamericanos y planes sanitarios nacionales para el control de *Salmonella* en dichos animales. *Revista agronómica del noroeste argentino*, 36 (2), 11-37. ISSN 0080-2069 2314-369X.
- Buts, J. P., Dekeyser, N., Stilmant, C., Delem, E., Smets, F., *et al.* (2006). *Saccharomyces boulardii* produces in rat small intestine a novel protein phosphatase that inhibits *Escherichia coli* endotoxin by dephosphorylation. *Pediatric Research*, 60, 24–29.
- Caballero-Cordoba, G. M., Pacheco, M. T. B., Sgarbieri, V. C. (1997). Composição química da biomassa de levedura integral (*Saccharomyces* sp.) e determinação do valor nutritivo da proteína em células íntegras ou rompidas mecanicamente. *Ciência e Tecnologia de Alimentos* (Campinas, Brasil), 17, 102–106.
- Campagnollo, F. B., Franco, L. T., Rottinghaus, G. E., Kobashigawa, E., Ledoux, D. R., Daković, A., *et al.* (2015). *In vitro* evaluation of the ability of beer fermentation residue containing *Saccharomyces cerevisiae* to bind mycotoxins. *Food Research International*, 77, 643–648.
- Cavaglieri, L. R., Passone, A., Etcheverry, M. (2004). Screening procedures for selecting rhizobacteria with biocontrol effects upon *Fusarium verticillioides* growth and fumonisin B₁ production. *Research in Microbiology*, 155, 747–754.
- Cegielska Radziejewska, R., Stuper, K., Szablewski, T. (2013). Microflora and mycotoxin contamination in poultry feed mixtures from western Poland. *Annals of Agriculture and Environmental Medicine*, 20, 30-35.
- Chai, S. J., White, P. L., Lathrop, S. L., Solghan, S. M., Medus, C., McGlinchey, B. M., Tobin-D'Angelo, M., Marcus, R., Mahon, B. E. (2012). *Salmonella enterica* serotype Enteritidis: Increasing incidence of domestically acquired infections. *Clinical Infectious Diseases*, 54 (suppl 5), S488– S497.
- Chang, Q., Wang, G., Regev-Yochay, M., Lipsitch, Hanage, W. P. (2014). Antibiotics in agriculture and the risk to human health: how worried should we be? *Evolutionary Applications*, 8, 240– 247.
- Chichester, D. & Tanner, F. (1972). Antimicrobial food additives. *CRC handbook of food additives*, 1, 115–184.

- Chu, F. S., Chang, C. C., Ashoor, S. H., Prentice, N. (1975). Stability of aflatoxin B₁ and ochratoxin A in brewing. *Applied Microbiology*, 29(3), 313-316.
- Ciani, M. & Comitini, F. (2010). Non-*Saccharomyces* wine yeasts have a promising role in biotechnological approaches to winemaking. *Annals of Microbiology*, 61, 25-32.
- Ciani, M., Comitini, F., Mannazzu, I., Domizio, P. (2010). Controlled mixed culture fermentation: a new perspective on the use of non-*Saccharomyces* yeasts in winemaking. *FEMS Yeast Research*, 10, 123-133.
- Ciegler, A. Burmaister, H. Vesonder, R. Hesseltine, C. (1981). Mycotoxins: occurrence in the environment. En: Shank R. (Ed). *Mycotoxins and N-Nitro Compounds: Environmental Risks*. CRC Press, Boca Raton, FL, 1-50.
- CLAVES, información competitiva (2019). Informe del mercado argentino de cervezas. <https://www.claves.com.ar/sector/20-cerveza>. Consultado en julio de 2020.
- Comitini, F., Mannazzu, I., Ciani, M. (2009). *Tetrapisispora phaffii* killer toxin is a highly specific β -glucanase that disrupts the integrity of the yeast cell wall. *Microbial Cell Factories*, 8, 1–11.
- Czerucka, D., Roux, I., Rampal, P. (1994). *Saccharomyces boulardii* inhibits secretagogue-mediated adenosine 3',5'-cyclic monophosphate induction in intestinal cells. *Gastroenterology*, 106, 65–72.
- Czerucka, D. & Rampal, P. (2002). Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens. *Microbes Infection*, 4, 733–739.
- Czerucka, D., Piche, T., Rampal, P. (2007). Review article: yeast as probiotics-*Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 26, 767–778.
- Dalcero, A., Magnoli, C., Luna, M., Ancasi, G., Reynoso, M., Chiacchiera, S., Miazzo, R., Palacio, G. (1998). Mycoflora and naturally occurring mycotoxins in poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 141, 37-43.
- Dalmasso, G., Cottrez, F., Imbert, V., Lagadec, P., Peyron, J. F., Rampal, P., Czerucka, D., Groux, H. (2006). *Saccharomyces boulardii* inhibits inflammatory bowel disease by trapping T cells in mesenteric lymph nodes. *Gastroenterology*, 131, 1812 – 1825.
- Damerow, G. (2012). The chicken encyclopedia: an illustrated reference storey. North Adams, Mass, USA.
- Dashko, S., Zhou, N., Compagno, C., Piskur, J. (2014). Minireview: Why, when, and how did yeast evolve alcoholic fermentation? *FEMS Yeast Research*, 14, 826–832.
- Day, E. J. (1997). Effect of yeast culture on tibia bone in three-week old broiler chicks fed graded level of inorganic phosphorus. *Res. Bull. Mississippi State University Stark Villains*.
- de Oliveira Dias, M. & Falconi, D. (2018). The evolution of craft beer industry in Brazil. *Journal of Economics and Business*, 1(4), 618-626. DOI: 10.31014/aior.1992.01.04.55

- Dehghani, T. N. & Jahanian, R. (2016). Effect of supplemental organic acids on performance, carcass characteristics, and serum biochemical metabolites in broilers fed diets containing different crude protein levels. *Animal Feed Science and Technology*, 211, 109-116.
- Dekoninck, T., Verbelen, P. J., Delvaux, F., Van Mulders, S. E., Delvaux, F. (2012). The importance of wort composition for yeast metabolism during accelerated brewery fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemistry*, 70, 195–204.
- Del Re, B., Sgorbati, B., Miglioli, M., Palenzona, D. (2000). Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters of Applied Microbiology*, 31, 438–442.
- Devegowda, G., Aravind, B. I. R., Morton, M. G. (1996). *Saccharomyces cerevisiae* and mannanoligosaccharides to counteract aflatoxicoses in broilers. *Proceedings of the Australian Poultry Science Symposium*, 103-106.
- Di Costanzo, A. & Murphy, M. (2012). Strategies for feeding mycotoxin and mold contaminated grains to cattle. [http://www.extension.umn.edu/agriculture/beef/components/docs/strategies for feeding mycotoxin and mold contaminated grain.pdf](http://www.extension.umn.edu/agriculture/beef/components/docs/strategies_for_feeding_mycotoxin_and_mold_contaminated_grain.pdf). Consultado en julio de 2020.
- Di Maro, E., Ercolini, D., Coppola, S. (2007). Yeast dynamics during spontaneous wine fermentation of the Catalanesca grape. *International Journal of Food Microbiology*, 117(2), 201–210.
- Diosma, G. (2010). Estudio y selección de levaduras con propiedades probióticas. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.
- Diosma, G., Romanin, D. E., Rey-Burusco, M. F., Londero, A., Garrote, G. L. (2013). Yeasts from kefir grains: Isolation, identification, and probiotic characterization. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1419-9>.
- Dragone, G., Silva, D. P., de Almeida e Silva, J. B. (2004). Factors influencing ethanol production rates at high-gravity brewing. *Lebensmittel-Wissenschaft und -Technologie*, 37, 797–802.
- Druvefors, U. Å., Jonsson, N., Boysen, M. E., Schnürer, J. (2002). Efficacy of the biocontrol yeast *Pichia anomala* during long-term storage of moist feed grain under different oxygen and carbon dioxide regimens. *FEMS Yeast Research*, 2, 389-394.
- Druvefors, U. Å., Passoth, V., Schnürer, J. (2005). Nutrient effects on biocontrol of *Penicillium roqueforti* by *Pichia anomala* J121 during airtight storage of wheat. *Applied and Environmental Microbiology*, 71, 1865–1869.
- Dubey, R.C., Maheshwari, D.K., Saravanamurthu, R. (2010). Industrial exploitation of microorganisms. *International Publishing House, Pvt. Ltd.*, New Delhi.
- Dumlao, D. S., Hertz, N., Clarke, S. (2008). Secreted 3-isopropylmalate methyl ester signals invasive growth during amino acid starvation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemistry*, 47, 12.
- Dunn, B. & Sherlock, G. (2008). Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Research*, 18, 1610–23.

Edwards-Ingram, L. C., Gent, M. E., Hoyle, D. C., Hayes, A., Stateva, L. I., Oliver, S. G. (2004). Comparative genomic hybridization provides new insights into the molecular taxonomy of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Genome Research*, 14, 1043-1051.

Edwards-Ingram, L., Gitsham, P., Burton, N., Warhurst, G., Clarke, I., Hoyle, D., Oliver, S. G., Stateva, L. (2007). Genotypic and physiological characterization of *Saccharomyces boulardii*, the probiotic strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(8), 2458–2467.

Engberg, R. M., Hedemann, M. S., Leser, T. D., Jensen, B. B. (2000). Effect of zinc bacitracin and salinomycin on intestinal microflora and performance of broilers. *Poultry Science*, 79, 1311–1319.

Erdman, J. W. (1989). Phytic acid interactions with divalent cations in foods and in gastrointestinal tract. In F. R. Dintzis and J. A. Laszlo (ed.). *Mineral absorption in monogastric gastrointestinal tract*. Plenum Press, New York. NY. p. 161-170.

Escuela de Organización Industrial de Sevilla. (2008). Contaminación de las aguas. Vertidos de la elaboración y envasado de cervezas. Máster Profesional en Ingeniería y Gestión Medio Ambiental. p. 6.

Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 49, 329-337.

Esteve-Zarzoso, B., Peris-Torán, M. J., García-Maiquez, E., Uruburu, F., Querol, A. (2001). Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(5), 2056–2061.

Ewing, W. N. & Cole, D. J. A. (1994). *The living gut: an introduction to microorganisms in nutrition*. Context graphics, Dungannon, UK.

Fakruddin, M., Hossain, M. N., Ahmed, M. M. (2017). Antimicrobial and antioxidant activities of *Saccharomyces cerevisiae* IFST062013, a potential probiotic. *BMC Complementary and Alternative Medicine*, 17, 64.

Fernandes Oliveira, C. A., Bovo, F., Corassin, C. H., Vincenzi Jager, A., Ravindranadha Reddy, K. (2013). Recent trends in microbiological decontamination of aflatoxins in foodstuffs. *Intech Open*. <https://doi.org/10.5772/51120>.

Fernández-Espinar, M. T., Barrio, E., Querol, A. (2003). Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast*, 20, 1213-1226.

Ferreira, I. M. P. L. V. O., Pinho, O., Vieira, E., Taveira, J. G. (2010). Review: Brewer's *Saccharomyces* yeast biomass: Characteristics and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 21, 77–84.

Fillaudeau, L., Blanpain-Avet, P., Daufin, G. (2006). Water, wastewater and waste management in brewing industries. *Journal of Cleaner Production*, 14, 463-471.

Fiorda, F. A., de Melo Pereira, G. V., Thomaz-Soccol, V., Rakshit, S. K., Pagnoncelli, M. G. B., Vandenbergh, L. P. de S., Soccol, C. R. (2017). Microbiological,

biochemical, and functional aspects of sugary kefir fermentation - A review. *Food Microbiology*, 66, 86–95.

Fiori, S., Urgeghe, P. P., Hammami, W., Razzu, S., Jaoua, S., Migheli, Q. (2014). Biocontrol activity of four non- and lowfermenting yeast strains against *Aspergillus carbonarius* and their ability to remove ochratoxin A from grape juice. *International Journal of Food Microbiology*, 189, 45–50.

Fix, G. J. & Fix, L. A. (1997). An analysis of brewing techniques. Boulder, Colo.: *Brewers Publications*, 57-65.

Foligné, B., Dewulf, J., Vandekerckove, P., Pignède, G., Pot, B. (2010). Probiotic yeasts: Anti-inflammatory potential of various non-pathogenic strains in experimental colitis in mice. *World Journal of Gastroenterology*, 16(17), 2134-2145.

Folster, J. P., Pecic, G., Singh, A., Duval, B., Rickert, R., Ayers, S., Abbott, J., McGlinchey, B., Bauer-Turpin, J., Haro, J., Hise, K., Zhao, S., Fedorka-Cray, P. J., Whichard, J., McDermott, P. F. (2012). Characterization of extended-spectrum cephalosporin-resistant *Salmonella enterica* serovar Heidelberg isolated from food animals, retail meat, and humans in the United States 2009. *Foodborne Pathogens and Disease*, 9, 638– 645.

Food and Agriculture Organization/World Health Organization Working Group. (2002).

França, R. C., Conceição, F. R., Mendonça, M., Haubert, L., Sabadin, G., *et al.* (2015). *Pichia pastoris* X-33 has probiotic properties with remarkable antibacterial activity against *Salmonella* Typhimurium. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 7953–7961.

Franco, G. (1989). Tabela de composição química dos alimentos, 8th ed. *Atheneu Editora*, Rio de Janeiro. pp. 92, 135, 164, 196, 197.

Fredlund, E., Blank, L. M., Schnürer, J., Sauer, U., Passoth, V. (2004). Oxygen- and glucose-dependent regulation of central carbon metabolism in *Pichia anomala*. *Applied and Environmental Microbiology*, 70, 5905–5591.

Gallone, B., Steensels, J., Prah, T., *y col.* (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, 166, 1397–410.

Gamba, R. R. (2015a). Estudio del potencial del kefir como agente antifúngico. Tesis doctoral. Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

Gamba, R. R., Colo, C. N., Correa, M., Astoreca, A., Alconada, T., De Antoni, G., *et al.* (2015b). Antifungal activity against *Aspergillus parasiticus* of supernatants from whey permeates fermented with kefir grains. *Advances in Microbiology*, 5, 479–492.

Gamba, R. R., De Antoni, G., León Peláez, A. (2016a). Whey permeate fermented with kefir grains shows antifungal effect against *Fusarium graminearum*. *Journal of Dairy Research*, 83, 249–255. doi:10.1017/S0022029916000121

Gamba, R. R., Caro, C. A., Martínez, O. L., Moretti, A. F., Giannuzzi, L., *et al.* (2016b). Antifungal effect of kefir fermented milk and shelf life improvement of corn arepas. *International Journal of Food Microbiology*, 235, 85-92.

- Gamba, R. R., Yamamoto, S., Sasaki, T., Michihata, T., Mahmoud, A-H., Koyanagi, T., Enomoto, T. (2019). Microbiological and functional characterization of kefir grown in different sugar solutions. *Food Science and Technology Research*, 25 (2), 303-312. doi: 10.3136/fstr.25.303
- Garda, J., Macedo, R. M., Faria, R., Bernd, L., Dors, G. C., Badiale-Furlong, E. (2005). Alcoholic fermentation effects on malt spiked with trichothecenes. *Food Control*, 16, 423-428.
- Garrido, C., Hernández, A., Pacin. (2012). Mycotoxins occurrence in Argentina's maize (*Zea mays L.*), from 1999 to 2010. *Food Control*, 25, 660-665.
- Gedek, B. R. (1999). Adherence of *Escherichia coli* serogroup O157 and the *Salmonella* Typhimurium mutant DT 104 to the surface of *Saccharomyces boulardii*. *Mycoses*, 42, 261–264.
- Generoso, S. V., Viana, M. L., Santos, R. G., Arantes, R. M. E., Martins, F. S., Nicoli, J. R., Machado, J. A. N., Correia, M. I. T. D., Cardoso, V. N. (2011). Protection against increased intestinal permeability and bacterial translocation induced by intestinal obstruction in mice treated with viable and heat-killed *Saccharomyces boulardii*. *European Journal of Nutrition*, 50, 1436-6215.
- Gerez, C., Torres, M., Font de Valdez, G., Rollán, G. (2013). Control of spoilage fungi by lactic acid bacteria. *Biological Control*, 64, 231-237.
- Gheorghe, A., Dragotoiu, D., Ciurescu, G., Lefter N., Habeanu, M. (2013). Effects of dietary protein level on protein deposition in Broilers: 2. Body composition, plasma metabolic profile and litter composition. *Bulletin UASVM Animal Science and Biotechnologies*, 70(2), 274-283.
- Ghosh, T. K., Haldar, S., Bedford, M. R., Muthusami, N., Samanta, I. (2012). Assessment of yeast cell wall as replacements for antibiotic growth promoters in broiler diets: effects on performance, intestinal histo-morphology and humoral immune responses. *Journal of Animal Physiology and Animal Nutrition*, 96, 275–284.
- Gibson, B., Storgards, E., Krogerus, K., y col. (2013). Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast*, 30, 255–66.
- Gibson, B., Geertman, J-M. A., Hittinger, C. T., Krogerus, K., Libkind, D., Louis, E. J., Magalhaes, F., Sampaio, J. P. (2017). Minireview. New yeasts—new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Research*, 17. doi: 10.1093/femsyr/fox038
- Gil-Rodríguez, A. M., Carrascosa, A. V., Requena, T. (2015). Yeasts in foods and beverages: *in vitro* characterisation of probiotic traits. *LWT - Food Science and Technology*, 64(2), 1156-1162.
- Gillespie, J. & Flanders, F. (2009). Modern livestock and poultry production cengage. Learning, Ontario, Canada, 8th Edition.
- Gitoe, A., Janmohammadi, H., Taghizadeh, A., Rafat, S. A. (2015). Effects of a multi-enzyme on performance and carcass characteristics of broiler chickens fed corn-soybean meal basal diets with different metabolizable energy levels. *Journal of Applied Animal Research*, 43(3), 295-302.

- Glade, M. J. & Biesik, L. M. (1986). Enhanced nitrogen retention in yearling horses supplemented with yeast culture. *Journal of Animal Science*, 62, 16-35.
- Glade, M. J. & Sist, M. O. (1988). Dietary yeast culture supplementation enhances urea recycling in equine large intestine. *Nutrition reports international (USA)*, 37, 11- 17.
- Golubev, W. I. (2006). Antagonistic interactions among yeasts. In *Biodiversity and Ecophysiology of Yeasts*, 197–219. Rosa, C. A., Peter, G. (Eds.). Springer-Verlag: Berlin, Germany.
- Gómez, R. S., López, C. C., Cortés, C. A., Ávila, G. E. (2011). Evaluación de tres programas de alimentación para pollos de engorda con base en dietas sorgo-soya con distintos porcentajes de proteína. *Veterinaria México*, 42(4), 299-309.
- Gómez-Corona, C., Escalona-Buendía, H. B., García, M., Chollet, S., Valentin, D. (2016). Craft vs. industrial: Habits, attitudes and motivations towards beer consumption in Mexico. *Appetite*, 96(1), 358-367.
- Gonçalves, P., Valerio, E., Correia, C. y col. (2001). Evidence for divergent evolution of growth temperature preference in sympatric *Saccharomyces* species. *PLoS One*, 6, e20739.
- Gonçalves, M., Pontes, A., Almeida, P. y col. (2016). Distinct domestication trajectories in top-fermenting beer yeasts and wine yeasts. *Current Biology*, 26, 2750–61
- Gonçalves, B. L., Rosim, R. E., Fernandes de Oliveira, C. A., Corassin, C. H. (2017). The *in vitro* ability of different *Saccharomyces cerevisiae* - based products to bind aflatoxin B₁. *Food Control*, 47, 298–300.
- González, S. S., Barrio, E., Gafner, J. y col. (2006). Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 6, 1221–34.
- González, S. S., Gallo, L., Climent, M. A. y col. (2007). Enological characterization of natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii*. *International Journal of Food Microbiology*, 116, 11–18
- González, S. S., Barrio, E., Querol, A. (2008). Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2314–20
- González Pereyra, M. L., Dogi, C., Torres Lisa, A., Wittouck, P., *et al.* (2014). Genotoxicity and cytotoxicity evaluation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* RCRC016: a 60-day subchronic oral toxicity study in rats. *Journal of Applied Microbiology*, 117, 824–833.
- Greco, M., Franchi, M., Rico, S., Pardo, A., Pose, G. (2014). Mycotoxigenic fungi in poultry feed for food producing animals. *Science World Journal*, Article ID968215. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/96821>
- Guilcapi, P. R. S. (2013). Utilización de aminoácidos sintéticos con reducción de proteína bruta en la alimentación de pollos parrilleros. Escuela Superior Politécnica de Chimborazo. Tesis de Grado. Riobamba, Ecuador.

- Guillamón, J. M., Barrio, E., Huerta, T., Querol, A. (1994). Rapid characterization of four species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex according to mitochondrial DNA patterns. *International Journal of Systematic Bacteriology*, 44, 708-714.
- Gulitz, A., Stadie, J., Wenning, M., Ehrmann, M. A., Vogel, R. F. (2011). The microbial diversity of water kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 151, 284–288.
- Gut, A. M., Vasiljevic, T., Yeager, T., Donkor, O. N. (2018). *Salmonella* infection – prevention and treatment by antibiotics and probiotic yeasts: a review. *Microbiology*, 164, 1327–1344. DOI 10.1099/mic.0.000709.
- Gutierrez-Ruiz, M. C., Quiroz, S., Souza, B., Bucio, L., Hernandez, E., Olivares, I. P., et al. (1999). Cytokines, growth factors, and oxidative stress in HepG2 cells treated with ethanol, acetaldehyde and LPS. *Toxicology*, 134, 197–207.
- Haddad, S. A & Lindegren, C C. (1953). A method for determining the weight of an individual yeast cell. *Applied and Environmental Microbiology*, 1(3), 153-156.
- Hebly, M., Brickwedde, A., Bolat, I. y col. (2015). *S. cerevisiae* x *S. eubayanus* interspecific hybrid, the best of both worlds and beyond. *FEMS Yeast Research*, 15, 1–14.
- Hellborg, L. & Piskur, J. (2009). Yeast diversity in the brewing industry. In V. R. Preedy (Ed.), *Beer in health and disease prevention* (pp. 1068-1073). New York: Elsevier.
- Hernández-Fillor, R. E., Báez-Arias, M., Alfonso-Zamora, P., Espinosa-Castaño, I. (2017). Susceptibilidad antimicrobiana y formación de biopelícula en aislados de *Escherichia coli* procedentes de gallinas ponedoras. *Revista de Salud Animal*, 39(3). <http://scielo.sld.cu/pdf/rsa/v39n3/rsa05317.pdf>.
- Hiralal, L., Olaniran, A. O., Pillay, B. (2013). Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 117, 57–64.
- Hirayama, S., Furukawa, S., Ogihara, H., Morinaga, Y. (2012). Yeast mannan structure necessary for co-aggregation with *Lactobacillus plantarum* ML11-11. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 419 (4), 652-655.
- Holt, S., Mukherjee, V., Lievens, B., Verstrepen, K. J., Thevelein, J. M. (2018). Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiology*, 72: 55-66. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2017.11.008>
- Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., y col. (1982). Hopped wort and beer. In: Hough, J. S., Briggs, D. E., Stevens, R., Young, T. W. (Eds). *Malting and Brewing Science*, vol. 2. London: Chapman and Hall.
- Hua, S. S. T., Beck, J. J., Sarreal, S. B. L., Gee, W. (2014). The major volatile compound 2-phenylethanol from the biocontrol yeast, *Pichia anomala*, inhibits growth and expression of aflatoxin biosynthetic genes of *Aspergillus flavus*. *Mycotoxin Research*, 30, 71–78.
- Huige, N. J. (2006). Brewery by-products and effluents. In F. G. Priest, & G. G. Stewart (Eds.), *Handbook of brewing* (pp. 656-713). Boca Raton: CRC Press.

Hussein, S. H. & Brassel, J. M. (2001). Toxicity, metabolism and impact of mycotoxins on humans and animals. *Toxicology*, 167, 101–134.

IARC, International Agency for Research on Cancer- World Health Organization. (2002). IARC Monograph on the Evaluation of Carcinogenic Risk to Humans., 82, 171.

ILSI Argentina. (2006). Maíz y Nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal, Vol. 2 http://www.ilsa.org.ar/biblioteca/Maiz_y_Nutricion.pdf, p. 7-8.

INDEC, Instituto Nacional de Estadística y Censos de la República Argentina. (2009). Consultado en <http://www.indec.mecon.ar>

Infocampo (2019). Radiografía de la cerveza en Argentina: una agroindustria federal y en constante innovación. <https://www.infocampo.com.ar/radiografia-de-la-cerveza-en-argentina-una-agroindustria-federal-y-en-constante-innovacion/> Consultado en julio de 2020.

İzgü, F. & Altınbay, D. (2004). Isolation and characterization of the K5- type yeast killer protein and its homology with an exo- β -1,3- glucanase. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 68, 685–693.

Joannis-Cassan, C., Tozlovanu, M., Hadjeba-Medjdoub, K., Ballet, N., Pfohl-Leszkowicz, A. (2011). Binding of zearalenone, aflatoxin B1, and ochratoxin A by yeast-based products: a method for quantification of adsorption performance. *Journal of Food Protection*, 74, 1175–1185.

Jolly, N. P., Varela, C., Pretorius, I. S. (2014). Not your ordinary yeast: non-*Saccharomyces* yeasts in wine production uncovered. *FEMS Yeast Research*, 14, 215-237.

Jouany, J. P., Yiannikouris, A., Bertin, G. (2005). The chemical bonds between mycotoxins and cell wall components of *Saccharomyces cerevisiae* have been identified. *Archiva Zootechnica*, 8-26.

Kell, J. (2016). What you didn't know about the boom in craft beer. Consultado en julio de 2020 en <http://fortune.com/2016/03/22/craft-beer-sales-rise-2015/>

Kew, M. (2013). Aflatoxins as a cause of hepatocellular carcinoma. *Journal of Gastrointestinal and Liver Diseases*, 22, 305–310.

Kimura, A. C., Reddy, V., Marcus, R., Cieslak, P. R., Mohle-Boetani, J. C., Kassenborg, H. D., Segler, S. D., Hardnett, F. P., Barrett, T., Swerdlow, D. L. (2004). Chicken consumption is a newly identified risk factor for sporadic *Salmonella enterica* serotype Enteritidis infections in the United States: A case-control study in FoodNet sites. *Clinical Infectious Diseases*, 38, S244–S252.

Kiros, T. G. , Gaydos, T., Corley, J., Raspoet, R., Berghaus, R., Hofacre, C. (2019). Effect of *Saccharomyces cerevisiae* yeast products in reducing direct colonization and horizontal transmission of *Salmonella* Heidelberg in broilers. *Journal of Applied Poultry Research*, 28, 23–30. <http://dx.doi.org/10.3382/japr/pfy012>.

Klassen, R. & Meinhardt, F. (2002). Linear plasmids pWR1A and pWR1B of the yeast *Wingea robertsiae* are associated with a killer phenotype. *Plasmid*, 48, 142–148.

- Klassen, R. & Meinhardt, F. (2005). Induction of DNA damage and apoptosis in *Saccharomyces cerevisiae* by a yeast killer toxin. *Cell Microbiology*, 7, 393–401.
- Klassen, R., Paluszynski, J. P., Wemhoff, S., Pfeiffer, A., Fricke, J., Meinhardt, F. (2008). The primary target of the killer toxin from *Pichia acaciae* is tRNA. *Molecular Microbiology*, 69, 681–697.
- Korabecna, M. (2007). The variability in the fungal ribosomal DNA (ITS1, ITS2, and 5.8 S rRNA gene): its biological meaning and application in medical mycology. A. Méndez-Vilas (Ed.). *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, 783-787.
- Kos, B., Suskovic, J., Vukovic, S., Simpraga, M., Frece, J., Matosic, S. (2003). Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. *Journal of Applied Microbiology*, 94, 981–987.
- Kourelis, A., Kotzamanidis, C., Litopoulou-Tzanetaki, E., Papaconstantinou, J., Tzanetakis, N., Yiangou, M. (2010). Immunostimulatory activity of potential probiotic yeast strains in the dorsal air pouch system and the gut mucosa. *Journal of Applied Microbiology*, 109, 260–271.
- Kozakiewicz, Z. (1989). *Aspergillus* species on stored products. *CAB International Mycological Institute*, Kew, Surrey.
- Krogerus, K., Magalhaes, F., Vidgren, V., y col. (2015). New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *Journal of Industrial Biotechnology and Microbiology*, 42, 769–78.
- Krogerus, K., Magalhães, F., Vidgren, V., Gibson, B. (2017). Minireview: Novel brewing yeast hybrids: creation and application. *Applied Microbiology & Biotechnology*, 101, 65–78. DOI 10.1007/s00253-016-8007-5
- Kulakovskaya, T. V., Shashkov, A. S., Kulakovskaya, E. V., Golubev, W. I. (2004). Characterization of an antifungal glycolipid secreted by the yeast *Sympodiomyopsis paphiopedili*. *FEMS Yeast Research*, 5, 247–252.
- Kumara, H. M. C. S., De Cort, S., Verachtert, H. (1993). Localization and characterization of α -glucosidase activity in *Brettanomyces lambicus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 2352–58.
- Kumura, H., Tanoue, Y., Tsukahara, M., Tanaka, T., Shimazaki, K. (2004). Screening of dairy yeast strains for probiotic applications. *Journal of Dairy Science*, 87, 4050–4056.
- Kurtzman, C. P. & Robnett C. J. (1997). Identification of clinically important ascomycetous yeasts based on nucleotide divergence in the 5' end of the large-subunit (26S) ribosomal DNA gene. *Journal of Clinical Microbiology*, 35:1216-1223.
- Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (1998). Identification and phylogeny of ascomycetous yeasts from analysis of nuclear large subunit (26S) ribosomal DNA partial sequences. *Antonie van Leeuwenhoek*, 73, 331–371.
- Kurtzman, C. P. & Fell, J. W. (1998). *The Yeasts - A taxonomic study*. 4th Ed. Amsterdam: Elsevier Science & Technology.

- Kurtzman, C. P. & Robnett, C. J. (2003). Phylogenetic relationships among yeasts of the 'Saccharomyces complex' determined from multigene sequence analyses. *FEMS Yeast Research*, 3, 417–32.
- Kurtzman, C. P. & Piskur, J. (2006). Taxonomy and phylogenetic diversity among the yeasts. Sunnerhagen, P. & Piskur, J. Eds. *Comparative Genomics: Using Fungi as Models*. Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg. Springer. p. 29–46.
- Lairón-Peris, M., Pérez-Través, L., Muñoz-Calvo, S., Guillamón, J. M., Heras, J. M., Barrio, E., Querol, A. (2020). Differential contribution of the parental genomes to a *S. cerevisiae* × *S. uvarum* hybrid, inferred by phenomic, genomic, and transcriptomic analyses, at different industrial stress conditions. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00129>
- Lara-Flores, M., Olvera-Novoa, M. A., Guzmán-Méndez, B. E., López-Madrid, W. (2002). Use of the bacteria *Streptococcus faecium* and *Lactobacillus acidophilus*, and the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as growth promoters in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*). *Aquaculture*, 216, 193-201.
- Lee, S. Y., Knudsen, F. B., Poyton, R. O. (1985). Differentiation of brewery yeast strains by restriction endonuclease analysis of their mitochondrial DNA. *Journal of the Institute of Brewing*, 9, 169-173.
- Legrand, C., Bour, J. M., Jacob, C., Capiamont, J., Martial, A., Marc, A., et al. (1992). Lactate dehydrogenase (LDH) activity of the cultured eukaryotic cells as marker of the number of dead cells in the medium [corrected]. *Journal of Biotechnology*, 25(3), 231–243 Erratum in *Journal of Biotechnology* (1993), 31(2), 234.
- León, A., Serna, C., Quintero, E., Gamba, R., De Antoni, G., Giannuzzi, L. (2012). Inhibitory activity of lactic and acetic acid on *Aspergillus flavus* growth for food preservation. *Food control*, 24 (1–2), 177-183.
- Libkind, D., Hittinger, C., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P., Sampaio, J. (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. 14539-44. 10.1073/pnas.1105430108.
- Line, J. E., Bailey, J. S., Cox, N. A., Stern, N. J. (1997). Yeast treatment to reduce *Salmonella* and *Campylobacter* populations associated with broiler chickens subjected to transport stress. *Poultry Science*, 76, 1227–1231.
- Lodder, J. L. (1970). *The Yeast, A Taxonomic Study*. North-Holland: Amsterdam. Elsevier.
- Londero, A., Iraporda, C., Garrote, G. L., Abraham, A. G. (2015). Cheese whey fermented with kefir microorganisms: Antagonism against *Salmonella* and immunomodulatory capacity. *International Journal of Dairy Technology*, 68, 118–126.
- Lopandic, K., Gangl, H., Wallner, E. y col. (2007). Genetically different wine yeasts isolated from Austrian vine-growing regions influence wine aroma differently and contain putative hybrids between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii*. *FEMS Yeast Research*, 7, 953–65.
- Lopes, C. A., Lavalle, T. L., Querol, A., Caballero, A. C. (2006). Combined use of killer biotype and mtDNA-RFLP patterns in a Patagonian wine *Saccharomyces cerevisiae*

diversity study. *Antonie van Leeuwenhoek*, 89, 147–156. DOI 10.1007/s10482-005-9017-y

López, A. C., Minnaard, J., Pérez, P. F., Alippi, A. M. (2013). *In vitro* interaction between *Bacillus megaterium* strains and Caco-2 cells. *International Microbiology*, 16, 27-33.

López, V., Querol, A., Ramon, D., Fernández-Espinar, M. T. (2001). A simplified procedure to analyse mitochondrial DNA from industrial yeasts. *International Journal of Food Microbiology*, 68, 75–81.

López-Malo, M., Querol, A., Guillamon, J. (2013). Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. *PLoS One*, 8, e60135.

Machado, M. D., Santos, M. S. F., Gouveia, C., Soares, H. M. V. M., Soares, E. V. (2008). Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: the flocculation as a separation process. *Bioresource Technology*, 99, 2107-2115.

Machado, M. D., Janssens, S., Soares, H. M., Soares, E. V. (2009). Removal of heavy metals using a brewer's yeast strain of *Saccharomyces cerevisiae*: advantages of using dead biomass. *Journal of Applied Microbiology*, 106, 1792-1804.

Magan, N. & Lacey, J. (1988). Ecological determinants of mould growth in stored grain. *International Journal of Food Microbiology*, 7, 245–256.

Magnoli, C., Dalcero, A., Chiacchiera, S., Miazzo, R., Saenz, M. (1998). Enumeration and identification of *Aspergillus* group and *Penicillium* species in poultry feeds from Argentina. *Mycopathologia*, 142, 27-32.

Magnoli, C., Saenz, M., Chiacchiera, S., Dalcero, A. (1999). Natural occurrence of *Fusarium* species and fumonisin production by toxigenic strains isolated from poultry feeds in Argentina. *Mycopathologia*, 145, 35-41.

Magnoli, C., Chiacchiera, S., Miazzo, R., Palacio, G., Angeletti, A., Hallak, C., Dalcero, A. (2002). The mycoflora and toxicity of feedstuffs from a production plant in Córdoba, Argentina. *Mycotoxin Research*, 18, 7-22.

Magnoli, A. P., Rodriguez, M. C., González Pereyra, M. L., Poloni, V. L., Peralta, M. F., Nilson, A. J., Miazzo, R. D., Bagnis, G., Chiacchiera, S. M., Cavaglieri, L. R. (2017). Use of yeast (*Pichia kudriavzevii*) as a novel feed additive to ameliorate the effects of aflatoxin B₁ on broiler chicken performance. *Mycotoxin Research*, DOI 10.1007/s12550-017-0285-y

Mahmoud, K., Obeidat, B., Al-Sadi, M., Hatahet, S. (2017). Effect of *Bacillus subtilis* supplementation and dietary crude protein level on growth performance and intestinal morphological changes of meat type chicken. *Livestock Science*, 195, 99-104.

Makinde, O. A. & Egbekun, C. P. (2016). Determination of optimum dietary energy and protein levels for confined early-stage Fulani Ecotype chickens. *Livestock Research for Rural Development*, 28(9), 164.

Marsh, A. J., O'Sullivan, O., Hill, C., Ross, R. P., Cotter, P. D. (2013). Sequence based analysis of the microbial composition of water kefir from multiple sources. *FEMS Microbiology Letters*, 348, 79-85. <http://dx.doi.org/10.1111/1574-6968.12248>.

Martin, S. A., Nisbet, B. J., Dean, R. G. (1989). Influence of a commercial yeast supplement on the *in vitro* ruminal fermentation. *Nutrition reports international (USA)*, 40, 395- 403.

Martins, F. S., Nardi, R. M., Arantes, R. M., Rosa, C. A., Neves, M. J., Nicoli, J. R. (2005). Screening of yeasts as probiotic based on capacities to colonize the gastrointestinal tract and to protect against enteropathogen challenge in mice. *Journal of General and Applied Microbiology*, 51(2), 83-92.

Martins, F., Rodrigues, A., Tiago, F., Penna, F., Rosa, C., Arantes, R., Nardi, R., Neves, M., Nicoli, J. J. (2007). *Saccharomyces cerevisiae* strain 905 reduces the translocation of *Salmonella enterica* serotype Typhimurium and stimulates the immune system in gnotobiotic and conventional mice. *Medical Microbiology*, 56(3), 352-359.

Martins, F. S., Dalmaso, G., Arantes, R. M., Doye, A., Lemichez, E., *et al.* (2010). Interaction of *Saccharomyces boulardii* with *Salmonella enterica* serovar Typhimurium protects mice and modifies T84 cell response to the infection. *PLoS One*, 5, e8925.

Martins, F. S., Elian, S. D. A., Vieira, A. T., Tiago, F. C .P., Martins, A. K .S., Silva, F. C .P., Souza, E. L. S., Sousa, L. P., Araújo, H. R. C., Pimenta, P. F., Bonjardim, C. A., Arantes, R. M. E., Teixeira, M. M., Nicoli, J. R. (2011). Oral treatment with *Saccharomyces cerevisiae* strain UFMG 905 modulates immune responses and interferes with signal pathways involved in the activation of inflammation in a murine model of typhoid fever. *International Journal of Medical Microbiology*, 301(4), 359-364.

Martorell, P., Barata, A., Malfeito-Ferreira, M., Fernandez-Espinar, M. T., Loureiro, V., Querol, A. (2006). Molecular typing of the yeast species *Dekkera bruxellensis* and *Pichia guilliermondii* recovered from wine related sources. *International Journal of Food Microbiology*, 106, 79 – 84.

Masih, E. I. & Paul. B. (2002). Secretion of 1,3-glucanases by the yeast *Pichia membranifaciens* and its possible role in the biocontrol of *Botrytis cinerea* causing grey mold disease of the grapevine. *Current Microbiology*, 44, 391–395.

Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C. y col. (1998). New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 3887–92.

Mathias, T. R. D. S., Marinho Fontes Alexandre, V., Christe Cammarota, M., Moretzsohn de Mello, P. P., Camporese Sérvulo, E. F. (2015). Characterization and determination of brewer's solid wastes composition. *Journal of the Institute of Brewing and Distilling*, 121, 400–404. DOI 10.1002/jib.229

Mathur, S. & Singh, R. (2006). Antibiotic resistance in food lactic acid bacteria - A review. *International Journal of Food Microbiology*, 105, 281-95. 10.1016/j.ijfoodmicro.2005.03.008.

McDonnell, G. & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 12, 147–179.

- McKean, C., Tang, L., Tang, M., Billam, M., Wang, Z., Theodorakis, C., Kendall, R., Wang, J. (2006). Comparative acute and combinative toxicity of aflatoxin B and Fumonisin B₁ in animals and human cells. *Food and Chemical Toxicology*, 44, 868-876.
- Meilgaard, M. C. (1975). Flavour chemistry of beer. Part II: flavor and threshold of 239 aroma volatiles. MBAA. *Technical Quarterly*, 12, 151–168.
- Meilgaard, M. C. (1982). Prediction of flavor differences between beers from their chemical composition. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 30, 1009–17.
- Menezes, A. G. T., Melo, D. d. S., Ramos, C. L., Moreira, S. I., Alves, E., Schwan, R. F. (2020). Yeasts isolated from brazilian fermented foods in the protection against infection by pathogenic food bacteria. *Microbial Pathogenesis*, 140, 103969. ISSN 0882-4010.
- Mertens, S., Steensels, J., Saels, V. y col. (2015). A large set of newly created interspecific yeast hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Applied and Environmental Microbiology*, 81, 8202–14.
- Minekus, M., Alminger, M., Alvito, P., Ballance, S., Bohn, T., Bourlieu, C., *et al.* (2014). A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food - an international consensus. *Food & Function*, 5, 1113–1124.
- Miranda, D. J. A., Vieira, S. L., Favero, A., Angel, C. R., Stefanello, C., Nogueira, E. T. (2015). Performance and meat production of broiler chickens fed diets formulated at different crude protein levels supplemented or not with L-valine and L-isoleucine. *Animal Feed Science and Technology*, 206, 39-47.
- Mo, E. K., Lee, J. H., Xu, B. J., Sung, C. K. (2004). Identification of yeasts from Korean faeces and prerequisite characterisation for preparation of probiotics. *Food Science and Biotechnology*, 13, 63–70.
- Monge, M., Magnoli, C., Chiacchiera, S. (2012). Survey of *Aspergillus* and *Fusarium* species and their mycotoxins in raw materials and poultry feeds from Cordoba, Argentina. *Mycotoxin Research*, 28, 111-122.
- Monge, M. P., Dalcero, A. M., Magnoli, C. E., Chiacchiera, S. M. (2013). Natural co-occurrence of fungi and mycotoxins in poultry feeds from Entre Ríos, Argentina. *Food Additives & Contaminants: Part B: Surveillance*, 6, 168– 174.
- Morales, L. & Dujon, B. (2012). Evolutionary role of interspecies hybridization and genetic exchanges in yeasts. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76, 721–39.
- Moslehi-Jenabian, S., Lindegaard Pedersen, L., Jespersen, L. (2010). Review: Beneficial effects of probiotic and foodborne yeasts on human health. *Nutrients*, 2, 449–473.
- Muccilli, S. & Restuccia, C. (2015). Review: Bioprotective Role of Yeasts. *Microorganisms*, 3(4), 588-611. doi:10.3390/microorganisms3040588.
- Muccilli, S., Wemhoff, S., Restuccia, C., Meinhardt, F. (2013). Exoglucanase-encoding genes from three *Wickerhamomyces anomalus* killer strains isolated from olive brine. *Yeast*, 30, 33–43.

Murphy, P. A., Hendrich, S., Landgren, C., Bryant, C. M. (2006). Food mycotoxins: an update. *Journal of Food Science*, 71(5), 51-65.

Mussatto, S. I. (2009). Biotechnological potential of brewing industry by-products. *Biotechnology for agro-industrial residues utilisation*. Netherlands: Springer. pp. 313-326.

Naseeb, S., James, S. A., Alsammar, H. y col. (2017). *Saccharomyces jurei* sp. nov., isolation and genetic identification of a novel yeast species from *Quercus robur*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 67, 2046–52.

Naumov, G. I., James, S. A., Naumova, E. S. y col. (2000). Three new species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex: *Saccharomyces cariocanus*, *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces mikatae*. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 50 Pt 5, 1931–42.

Nayar, S., Hegde, S., Rao, P. S., Sudha, P. (1998). Live organisms as feed in aquaculture. *Infofish International*, 4, 36-39.

Nguyen, H-V., Lepingle, A., Gaillardin. (2000). Molecular typing demonstrate homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *S. uvarum* and *S. cerevisiae*, including the *S. bayanus* type strain CBS 380. *Systematics and Applied Microbiology*, 23, 71–85.

Ochigava, I., Collier, P. J., Walker, G. M., Hakenbeck, R. (2011). *Williopsis saturnus* yeast killer toxin does not kill *Streptococcus pneumoniae*. *Antonie van Leeuwenhoek*, 99, 559–566.

O'Donnell, K. (1993). *Fusarium* and its near relatives. In: Reynolds, D. R. & Taylor, J. W. (Eds). *The Fungal Holomorph: Mitotic, Meiotic and Pleomorphic Speciation in Fungal Systematics* (pp. 225–233). CAB International, Wallingford, UK.

Oguz, H. & Kutoglu, V. (2000). Effect of clinoptilolite on fattening performance of broiler chickens during experimental aflatoxicosis. *British Poultry Science*, 41, 512-517.

Oguz, H. & Parlat, S. (2005). Effects of dietary mannanoligosaccharide on performance of Japanese quail affected by aflatoxicosis. *South African Journal of Animal Science*, 34, 144–148.

Oliveira, C. A. F. & Germano, P. M. L. (1997). Aflatoxinas: conceitos sobre mecanismos de toxicidade e seu envolvimento na etiologia do câncer hepático celular. *Revista de Saúde Pública*, 31(4), 417-424.

Oliveira, P. W., Oliveira, M. R. F., Donzele, L. J., Albino, T. L. F., Martins, S. M., Assis, A. P. (2011). Redução do nível de proteína bruta em rações para frangos de corte em ambiente de termoneutralidade. *Revista Brasileira de Zootecnia*, 40(8), 1725-1731.

Onifade, A. A. & Babatune, G. M. (1996). Supplemental value of dried yeast in a high fiber diet for broiler chicks. *Animal Feed Science & Technology*, 62, 91-96.

Orberá Ratón, T. (2004). Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Micología*, 21, 15-19.

- Origone, A. C., González, M., Rodríguez, M. E., Querol, A., Lopes, C. A. (2020). Inheritance of winemaking stress factors tolerance in *Saccharomyces uvarum*/*S. eubayanus* × *S. cerevisiae* artificial hybrids. *International Journal of Food Microbiology*, 320, <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2019.108500>
- Ortuño, J., Cuesta, A., Rodríguez, A., Esteban, M. A., Meseguer, J. (2002). Oral administration of yeast, *Saccharomyces cerevisiae*, enhances the cellular innate immune response of gilthead seabream (*Sparus aurata* L.). *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 85, 41-50.
- Ou, C. C., Chiu, Y. H., Lin, S. L., Chang, Y. J., Huang, H. Y., Lin, M. Y. (2012). Hepatoprotective effect of lactic acid bacteria in the attenuation of oxidative stress from tert-butyl hydroperoxide. *Journal of Food and Drug Analysis*, 20, 101–110.
- Pagan, J. D. (1990). Effect of yeast culture supplementation on nutrient digestibility in mature horses. *Journal of Animal Science*, 68, 1.
- Palma, M. L., Zamith-Miranda, D., Martins, F. S. et al. (2015). Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* strains as biotherapeutic tools: is there room for improvement? *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99, 6563–6570.
- Pandey, P. K. & Soupir, M. L. (2011). *Escherichia coli* inactivation kinetics in anaerobic digestion of dairy manure under moderate, mesophilic and thermophilic temperatures. *AMB Express*, 1, 18.
- Paradis, M. A., McMillan, E., Bagg, R., Vessie, G., Zocche, A., Thompson, M. (2016). Efficacy of avilamycin for the prevention of necrotic enteritis caused by a pathogenic strain of *Clostridium perfringens* in broiler chickens. *Avian Pathology*, 45, 365-369.
- Parlat, S. S., Özcan, M., Oguz, M. (2001). Biological suppression of aflatoxicosis in Japanese quail (*Coturnix coturnix japonica*) by dietary addition of yeast (*Saccharomyces cerevisiae*). *Research in Veterinary Science*, 7, 207.
- Pascari, X., Ramos, A. J., Marín, S., Sanchís, V. (2018). Mycotoxins and beer. Impact of beer production process on mycotoxin contamination. A review. *Food Research International*, 103, 121–129.
- Peng, X., Sun, J., Iserentant, D., Michiels, C., Verachtert, H. (2001). Flocculation and co flocculation of bacteria by yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55, 777–781. DOI 10.1007/s002530000564.
- Perello, M. M. G. (2009). Detección y caracterización de aislados de *Escherichia coli* de origen clínico y fecal en gallinas ponedoras. Tesis Doctoral. Universidad Complutense de Madrid, España. p. 184.
- Pereyra, C. M., Cavaglieri, L. R., Chiacchiera, S. M., Dalcero, A. (2013). The corn influence on the adsorption levels of aflatoxin B₁ and zearalenone by yeast cell wall. *Journal of Applied Microbiology*, 114, 655–662.
- Perez, P. F., Minnaard, Y., Disalvo, E. A., De Antoni, G. L. (1998). Surface properties of Bifidobacterial strains of human origin. *Applied and Environmental Microbiology*, 64, 21–26.
- Pérez-Sotelo, L. S., Talavera-Rojas, M., Monroy-Salazar, H. G., Lagunas-Bernabé, S., Cuarón-Ibargüengoytia, J. A., Jimenez, R. M., Vázquez-Chagoyán, J. C. (2005). *In*

vitro evaluation of the binding capacity of *Saccharomyces cerevisiae* Sc47 to adhere to the wall of *Salmonella* spp. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 47(3-4), 70-5.

Pérez-Torrado, R., Barrio, E., Querol, A. (2017). Alternative yeasts for wine-making: *Saccharomyces non-cerevisiae* and its hybrids. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, DOI:10.1080/10408398.2017.1285751.

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, 102-111.

Pérez-Través, L., Lopes, C. A., Barrio, E., Querol, A. (2014a). On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: hybridization and potential hybrid speciation. Public Library of Science, *Plos One*, 9, 4, 1-14.

Pérez-Través, L., Lopes, C. A., Barrio, E., Querol, A. (2014b). Stabilization process in *Saccharomyces* intra and interspecific hybrids in fermentative conditions. *International Microbiology*, Open Access, 17, 213-224. doi:10.2436/20.1501.01.224

Peris, D., Belloch, C., Lopandic, K. y col. (2012). The molecular characterization of new types of *Saccharomyces cerevisiae* x *S. kudriavzevii* hybrid yeasts unveils a high genetic diversity. *Yeast*, 29, 81–91.

Peris, D., Moriarty, R. V., Alexander, W. G. y col. (2017). Hybridization and adaptive evolution of diverse *Saccharomyces* species for cellulosic biofuel production. *Biotechnology Biofuels*, 10, 78.

Peris, D., Pérez-Torrado, R., Hittinger, C. T. y col. (2018). On the origins and industrial applications of *Saccharomyces cerevisiae* x *Saccharomyces kudriavzevii* hybrids. *Yeast*, 35, 51–69.

Peter, J., De Chiara, M., Friedrich, A., *et al.* (2018). Genome evolution across 1011 *Saccharomyces cerevisiae* isolates. *Nature*, 556, 339–344. <https://doi.org/10.1038/s41586-018-0030-5>.

Péteri, Z., Teren, J., Vagvolgyi, C., Varga, J. (2007). Ochratoxin degradation and adsorption caused by astaxanthin-producing yeasts. *Food Microbiology*, 24, 205-210.

Petersson, S., Jonsson, N., Schnürer, J. (1999). *Pichia anomala* as a biocontrol agent during storage of high-moisture feed grain under airtight conditions. *Postharvest Biology and Technology*, 15(2), 175-184. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(98\)00081-7](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(98)00081-7)

Petersson, S., Hansen, M. W., Axberg, K., Hult, K., Schnürer, J. (1998). Ochratoxin A accumulation in cultures of *Penicillium verrucosum* with the antagonistic yeast *Pichia anomala* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Mycology Research*, 102, 1003–1008.

Petruzzi, L., Rosaria Corbo, M., Sinigaglia, M., Bevilacqua, A. (2016). Brewer's yeast in controlled and uncontrolled fermentations, with a focus on novel, nonconventional, and superior strains. *Food Reviews International*, 32, 341–363.

Pfliegler, W. P., Pusztahelyi, T., Pócsi, I. (2015). Review Mycotoxins – prevention and decontamination by yeasts. *Journal of Basic Microbiology*, 54, 1–14. DOI 10.1002/jobm.201400833.

- Pinto, L. C., Lopes, M. V., Carvalho-Filho, C. D., Alves, L. V. A., Benevides, C. M. J. (2013). Determinação do valor nutritivo de derivados de levedura de cervejaria (*Saccharomyces* spp.). *Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais*, 15, 7–17.
- Pires, E., Teixeira, J., Brányik, T., Vicente, A. (2014). 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*, 98(5), 1937–1949.
- Pitt, J., & Hocking, A. (2009). Fungi and food spoilage. London: Blackie Academic and Professional. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-92207-2>.
- Pizzolitto, R. P., Armando, M. R., Combina, M., Cavaglieri, L. R., Dalcerro, A. M., Salvano, M. A. (2012). Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* strains as probiotic agent with aflatoxin B₁ adsorption ability for use in poultry feedstuffs. *Journal of Environmental Science and Health. Part B: Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes*, 47 (10), 933-941. DOI: 10.1080/03601234.2012.706558.
- Pizzolitto, R. P., Armando, M. R., Salvano, M. A., Dalcerro, A. M., Rosa, C. A. (2013). Evaluation of *Saccharomyces cerevisiae* as an anti aflatoxigenic agent in broiler feedstuffs. *Poultry Science*, 92, 1655–1663. <http://dx.doi.org/10.3382/ps.2012-02846>.
- Platania, C., Restuccia, C., Muccilli, S., Cirvilleri, G. (2012). Efficacy of killer yeasts in the biological control of *Penicillium digitatum* on Tarocco orange fruits (*Citrus sinensis*). *Food Microbiology*, 30, 219–225.
- Plato Logic Limited (2019). World Beer Report 2019 edition. The Ultimate Guide to the World Beer Market. <https://www.yumda.com/en/news/1163885/beverage-trends-beer.html>. Consultado en julio de 2020.
- Plaza-Diaz, J., Gomez-Llorente, C., Fontana, L., Gil, A. (2014). Modulation of immunity and inflammatory gene expression in the gut, in inflammatory diseases of the gut and in the liver by probiotics. *World Journal of Gastroenterology*, 20(42), 15632-15649.
- Pontier-Bres, R., Munro, P., Boyer, L., Anty, R., Imbert, V., *et al.* (2014). *Saccharomyces boulardii* modifies *Salmonella* Typhimurium traffic and host immune responses along the intestinal tract. *PLoS One*, 9, e103069.
- Posadas, G. A., Broadway, P. R., Thornton, J. A., Carroll, J. A., Lawrence, A., *et al.* (2017). Yeast pro-and paraprobiotics have the capability to bind pathogenic bacteria associated with animal disease. *Translational Animal Science*, 1, 60–68.
- Pote, D. H., Way, T. R., Kleinman, P. J., Moore, P. A., Meisinger, J. J., Sistani, K. R., Saporito, L. S., Allen, A. L., Feyereisen, G. W. (2011). Subsurface application of poultry litter in pasture and no-till soils. *Journal of Environmental Quality*, 40, 402-411.
- Pothoulakis C. (2009). Review article: anti-inflammatory mechanisms of action of *Saccharomyces boulardii*. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 30, 826–833.
- Pretscher, J., Fischkal, T., Branscheidt, S., Jäger, L., Kahl, S., Schlander, M., Thines, E., Claus, H. (2018). Yeasts from different habitats and their potential as biocontrol agents. *Fermentation*, 4, 31. doi:10.3390/fermentation4020031
- Psomas, E. L., Fletouris, D. J., Litopoulou-Tzanetaki, E., Tzanetakis, N. (2003). Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant faeces and feta cheese. *Journal of Dairy Science*, 86, 3416–3422.

- Pulvirenti, A., Nguyen, H., Caggia, C. y col. (2000). *Saccharomyces uvarum*, a proper species within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters*, 192, 191–6.
- Querol, A., Barrio, E., Ramon, D. (1992a). A comparative study of different methods of yeast-strain characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, 15, 439–446.
- Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., Ramón, D. (1992b). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2948-2953.
- Querol, A. & Bond, U. (2009). The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiology Letters*, 293, 1-10.
- Quirós, M., Morales, P., Pérez-Través, L., Barcenilla, J. M., Gonzalez, R. (2011). A new methodology to determine cell wall mannoprotein content and release in wine yeasts. *Food chemistry*, 125(2), 760-766.
- Rainieri, S., Zambonelli, C., Hallsworth, J. E. y col. (1999). *Saccharomyces uvarum*, a distinct group within *Saccharomyces sensu stricto*. *FEMS Microbiology Letters*, 177, 177–85.
- Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y. y col. (2006). Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Applied and Environmental Microbiology*, 72, 3968–74.
- Raju, M. V. L. N. & Devegowda, G. (2002). Esterified-glucomannan in broiler chicken diets-contaminated with aflatoxin, ochratoxin and T-2 toxin: evaluation of its binding ability (*in vitro*) and efficacy as immunomodulator. *Asian-Australian Journal of Animal Science*, 15, 1051–1056.
- Revolledo, L., Ferreira, C. S., Ferreira, A. J. (2009). Prevention of *Salmonella* Typhimurium colonization and organ invasion by combination treatment in broiler chicks. *Poultry Science*, 88, 734–743.
- Rodríguez, M. E., Pérez-Través, L., Sangorrín, M. P., Barrio, E., Querol, A., Lopes, C. A. (2017). *Saccharomyces uvarum* is responsible for the traditional fermentation of apple chicha in Patagonia. *FEMS Yeast Research*, 17(1), fow109, <https://doi.org/10.1093/femsyr/fow109>
- Romanin, D., Serradell, M., González Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G. L., Rumbo, M. (2014). Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *International Journal of Food Microbiology*, 140(2–3), 102-10833.
- Romi, W., Keisam, S., Ahmed, G., Jeyaram, K. (2014). Reliable differentiation of *Meyerozyma guilliermondii* from *Meyerozyma caribbica* by internal transcribed spacer restriction fingerprinting. *BMC Microbiology*, 14, 52.
- Rossouw, D., Naes, T., Bauer, F. F. (2008). Linking gene regulation and the exo-metabolome: a comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics*, 9, 530.
- Rostagno, H. S., Albino, L. F. T., Donzele, J. L., Gomes, P. C., Oliveira, R. F., Lopes, D. C., Ferreira, A. S., Barreto, S. L., Euclides, R. F. (2011). Tabelas brasileiras para aves e suínos, Composição de alimentos e exigências nutricionais. 3a Ed. Universidade Federal de Viçosa, Brasil.

- Ruiz, B. (2016). Repuntan pollo y huevo en la avicultura latinoamericana. *Industria Avícola*, 63, 10-38.
- SAGPyA, Secretaría de Agricultura, Ganadería y Pesca. (2005). Consultado en http://www.minagri.gob.ar/SAGPyA/agricultura/analisis_economico/03Exportaciones/index.php
- Saif, Y. M., Barnes, H. J., Glisson, J. R., Fadly, A. M., Mc Dougald, L. R., Swayne, D. E. (2003). *Salmonella* infections. In *Diseases of Poultry*, 11th Edn.; Iowa States Press: Ames, Iowa, U.S.
- Saison, D., De Schutter, D. P., Uyttendhove, B., Delvaux, F., Delvaux, F. R. (2009). Contribution of staling compounds to the aged flavour of lager beer by studying their flavour thresholds. *Food Chemistry*, 114, 1206–1215.
- Salguero Cruz, S. C., Ramalho de Lima, M., Vieira Gonclaves Vieira, D. (2017). Requerimientos nutricionales de las aves. Capítulo en *Tablas Brasileñas para Aves y Cerdos*. 4ta Ed. [Rostagno H. S.]. 271-377. ISBN: 978-85-8179-122-7.
- Sampaio, J. P. & Goncalves, P. (2008). Natural populations of *Saccharomyces kudriavzevii* in Portugal are associated with oak bark and are sympatric with *S. cerevisiae* and *S. paradoxus*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74, 2144–52.
- Santin, E., Maiorka, A., Macari, M., Grecco, M., Sanchez, J. C., Okada, T. M., Myasaka, A. M. (2001). Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diets containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Applied Poultry Research*, 10, 236–244.
- Santin, E., Paulilo, A. C., Maiorka, A., Nakaghi, L. S. O., Macan, M., de Silva, A. V. F., et al. (2003). Evaluation of the efficiency of *Saccharomyces cerevisiae* cell wall to ameliorate the toxic effects of aflatoxin in broilers. *International Journal of Poultry Science*, 2, 241–344.
- Santos, A., Mauro, M. S., Abrusci, C., Marquina, D. (2007). Cwp2p, the plasma membrane receptor for *Pichia membranifaciens* killer toxin. *Molecular Microbiology*, 64, 831–843.
- Santos, M. S. V., Vieira, S. S., Tavares, F. B., Andrade, P., Manno, M. C., Costa, H. S., Moreira, A. (2012). Desempenho, carcaça e cortes de frangos caipira francês barre (Gris Barre Cou Plume). *Archivos de Zootecnia*, 61(234), 287-295.
- Scallan, E., Hoekstra, R. M., Angulo, F. J., Tauxe, R. V., Widdowson, M. A., Roy, S. L., Jones, J. L., Griffin, P. M. (2011). Foodborne illness acquired in the United States—Major pathogens. *Emerging Infectious Diseases*, 17, 7–15.
- Scott, P. M., Kanhere, S. R., Lawrence, G. A., Daley, E. F., Farber, J. M. (1995). Fermentation of wort containing added ochratoxin A and fumonisins B₁ and B₂. *Food Additives & Contaminants*, 12, 31-40.
- Servicio de Sanidad Animal y Calidad Agroalimentaria. (2016). Establecimientos con Avicultura por Tipo de Producción - Marzo 2016. En: http://www.senasa.gov.ar/sites/default/files/ARBOL_SENASA/INFORMACION/INFORMES%20Y%20ESTADISTICAS/Informes%20y%20estadisticas%20Animal/AVES/INDICADORES%20GANADEROS/distribucion_de_granjas_avicolas_por_provincia.xls

- Shankar, P. A., Premavalli, K., Omprakash, A.V., Kirubakaran, J. J., Hudson, G.H. (2017). Effect of dietary yeast supplementation on the production performance of broilers. *International Journal of Advanced Biological Research*, 7 (2), 222-228.
- Shareef, A. M. & Al-Dabbagh, A. S. A. (2009). Effect of probiotic (*Saccharomyces cerevisiae*) on performance of broiler chicks. *Iraqi Journal of Veterinary Sciences*, 23 (1), 23-29.
- Shareef, A. (2010). Molds and mycotoxins in poultry feeds from farms of potential mycotoxicosis. *Iraqi Journal of Veterinary Science*, 24, 17-25.
- Sharp, D. C., Steensels, J., Shellhammer, T. H. (2017). The effect of hopping regime, cultivar and β -glucosidase activity on monoterpene alcohol concentrations in wort and beer. *Journal of the Institute of Brewing*, DOI: 10.1002/jib.418
- Shetty, P. H. & Jespersen, L. (2006). *Saccharomyces cerevisiae* and lactic acid bacteria as potential mycotoxin decontaminating agents. *Trends in Food Science and Technology*, 17(2), 48–55.
- Shetty, P. H., Hald, B., Jespersen, L. (2007). Surface binding of aflatoxin B1 by *Saccharomyces cerevisiae* strains with potential decontaminating abilities in indigenous fermented foods. *International Journal of Food Microbiology*, 113, 41-46.
- Shurson, G. C. (2018). Review Article. Yeast and yeast derivatives in feed additives and ingredients: Sources, characteristics, animal responses, and quantification methods. *Animal Feed Science and Technology*, 235, 60–76.
- Spiczki, M. (2008) Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Research*, 8, 996-1007.
- Sivignon, A., de Vallée, A., Barnich, N., Denizot, J., Darcha, C., Pignède, G., Vandekerckove, P., Darfeuille-Michaud, A. (2015). *Saccharomyces cerevisiae* CNCM I-3856 prevents colitis induced by AIEC bacteria in the transgenic mouse model mimicking Crohn's Disease. *Inflammatory Bowel Disease*, 2, 276-286.
- Siwicki, A. K., Anderson, D. P., Rumsey, G. L. (1994). Dietary intake of immunostimulants by rainbow trout affects non-specific immunity and protection against furunculosis. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 41, 125-139.
- Śliżewska, K. & Smulikowska, S. (2011). Detoxification of aflatoxin B₁ and change in microflora pattern by probiotic *in vitro* fermentation of broiler feed. *Journal of Animal Feed Science*, 20, 300–309.
- Spitaels, F., Wieme, A. D., Janssens, M., Aerts, M., Daniel, H. -M., Van Landschoot, A., Vandamme, P. (2014). The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS ONE*, 9(4), 1–13.
- Stanley, V. G., Ojo, R., Woldesenbet, S., Hutchinson, D. H., Kubena, L. F. (1993). The use of *Saccharomyces cerevisiae* to suppress the effects of aflatoxicosis in broiler chicks. *Poultry Science*, 72(10), 1867-1872.
- Statista. (2018). Beer production worldwide from 1998 to 2016 (in billion hectoliters). <https://www.statista.com/statistics/270275/worldwide-beer-production/>. Consultado en julio de 2020.

- Steensels, J. & Verstrepen, K.J. (2014). Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annual Review of Microbiology*, 68, 61-80.
- Steensels, J., Daenen, L., Malcorps, P., Derdelinckx, G., Verachtert, H., Verstrepen, K.J. (2015). *Brettanomyces* yeasts - From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *International Journal of Food Microbiology*, 206, 24-38.
- Strosnider, H., Azziz-Baumgartner, E., Banziger, M. (2006). Work group report: Public health strategies for reducing aflatoxin exposure in developing countries. *Environmental Health Perspectives*, 114, 1898-1903.
- Sun, Z., Wang, T., Demelash, N., Zheng, S., Zhao, W., Chen, X., Zhen, Y., Qin, G. (2020). Effect of yeast culture (*Saccharomyces cerevisiae*) on broilers: a preliminary study on the effective components of yeast culture. *MDPI Animals*, 10, 68. doi:10.3390/ani10010068
- Suzuki, C., Ando, Y., Machida, S. (2001). Interaction of SMKT, a killer toxin produced by *Pichia farinosa*, with the yeast cell membranes. *Yeast*, 18, 1471–1478.
- Tayel, A. A., El-Tras, W. F., Moussa, S. H., El-Agamy, M. A. (2013). Antifungal action of *Pichia anomala* against aflatoxigenic *Aspergillus flavus* and its application as a feed supplement. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, DOI 10.1002/jsfa.6169.
- Tiago, F. C. P., Martins, F. S., Souza, E. L. S., Pimenta, P. F. P., Araujo, H. R. C., Castro, I. M., Brandao, R. L., Nicoli, J. R. (2012). Adhesion to the yeast cell surface as a mechanism for trapping pathogenic bacteria by *Saccharomyces* probiotics. *Journal of Medical Microbiology*, 61, 1194–1207. DOI 10.1099/jmm.0.042283-0.
- Torres-Novoa, D. M. (2018). Exigencias nutricionales de proteína bruta y energía metabolizable para pollos de engorde. *Revista de Investigación Agraria y Ambiental*, 9(1), 105-113. DOI: <https://doi.org/10.22490/21456453.2052>.
- Ullivarri, M. F., Mendoza, L. M., Raya, R. R. (2014). Killer activity of *Saccharomyces cerevisiae* strains: Partial characterization and strategies to improve the biocontrol efficacy in winemaking. *Antonie van Leeuwen*, 106, 865–878.
- van der Aa Kühle, A., Skovgaard, K., Jespersen, L. (2005). *In vitro* screening of probiotic properties of *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* and food-borne *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of Food Microbiology*, 101, 29–39.
- Vanderhaegen, B., Neven, H., Coghe, S., Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Verachtert, H. (2003). Bioflavoring and beer refermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 62(2–3), 140–150.
- van Oevelen, D. (1979). Microbiology and biochemistry of the natural wort fermentation in the production of lambic and gueuze. PhD Thesis, Kathol. University of Leuven, Belgium.
- van Rijswijck, I. M. H., Dijksterhuis, J., Wolkers-Rooijackers, J. C. M., Abee, T., Smid, E. J. (2015). Nutrient limitation leads to penetrative growth into agar and affects aroma formation in *Pichia fabianii*, *P. kudriavzevii* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 31, 89–101. DOI: 10.1002/yea.3050.

- Varela, C. (2016). Minireview: The impact of non-*Saccharomyces* yeasts in the production of alcoholic beverages. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(23), 9861–9874. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7941-6>
- Varela, C. & Borneman, A. R. (2017). Yeasts found in vineyards and wineries. *Yeast*, 34, 111–28.
- Vasconcellos, C. F., Fontes, D. O., Lara, L. C., Silva, M. A., Vidal, T. B., Fernandes, I. S., Rocha, J. S. R. (2015). Evaluation of glycine plus serine levels in low crude protein diets for broiler chickens. *Arquivo Brasileiro De Medicina Veterinária e Zootecnia*, 67(2), 499-505.
- Venancio, A. & Paterson, R. (2007). The challenge of mycotoxins. In A. McElhatton, A. & Marshall, R. (Eds.). *Food Safety. A Practical and Case Study Approach*. Springer, Berlin, Germany, 24-47.
- Verachtert, H. (1992). Lambic and gueuze brewing: mixed cultures in action. Presented at COMETT Course Microb. Contam., Helsinki.
- Vero, S., Garmendia, G., González, M. B., Bentancur, O., Wisniewski, M. (2013). Evaluation of yeasts obtained from Antarctic soil samples as biocontrol agents for the management of postharvest diseases of apple (*Malus × domestica*). *FEMS Yeast Research*, 13(2), 189–199. <https://doi.org/10.1111/1567-1364.12021>
- Waema, S., Maneesri, J., Masniyom, P. (2009). Isolation and identification of killer yeast from fermented vegetables. *Asian Journal of Food AgroIndustry*, 2, 126–134.
- Wang, S. A. & Bai, F. Y. (2008). *Saccharomyces arboricolus* sp. nov., a yeast species from tree bark. *International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology*, 58, 510–4.
- Watts, D. B., Way, T. R., Torbert, H. A. (2011). Subsurface application of poultry litter and its influence on nutrient losses in runoff water from permanent pastures. *Journal of Environmental Quality*, 40, 421-430.
- Wedral, D., Shewfelt, R., Frank, J. (2010). The challenge of *Brettanomyces* in wine. *Food Science and Technology*, 43, 1474-1479. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2010.06.010>
- White, T. J., Bruns, T., Lee, S. Taylor, S. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In M. A. Innins, D. H. Gelfand, J. J. Sninsky, & T. J. White (Eds.). *PCR protocols. A guide to methods and applications* (pp. 315–322). San Diego, United States of America: Academic Press, Inc.
- White, L. A., Newman, M. C., Cromwell, G. L., Lindemann, M. D. (2002). Brewers dried yeast as a source of mannan oligosaccharides for weanling pigs. *Journal of Animal Science*, 80, 2619-2628.
- White, C. & Zainasheff, J. (2010). In W. L. Pengelly (Ed.). *Yeast, the practical guide to beer fermentation*. United States of America: Brewers Publications.
- Wilcox, R. A. (1988). Spoiled feedstuffs—Harmless or dangerous? Kemin Research. Cooperative Extension Service Kansas State University, Manhattan, Kansas, USA.

- Wilson, B. A., Salyers, A. A., Whitt, D. D., Winkler, M. E. (1994). Bacterial pathogenesis. A molecular approach. 3rd Ed, *ASM Press*, Washington, EE.UU. p. 542.
- Winterhalter, P. & Skouroumounis, G. K. (1997). Glycoconjugated aroma compounds: occurrence, role and biotechnological transformation. *Advances in Biochemical Engineering / Biotechnology*, 55, 74–99.
- Yang, L-B., Zhan, X-B., Zheng, Z-Y., Wu, J-R., Gao, M-J., Lin, C-C. (2014). A novel osmotic pressure control fed-batch fermentation strategy for improvement of erythritol production by *Yarrowia lipolytica* from glycerol. *Bioresource Technology*, 151, 120–127.
- Yasar, S. & Yegen, M. K. (2017). Yeast fermented additive enhances broiler growth. *Brazilian Journal of Animal Science*, 46(10), 814-820.
- Yiannikouris, A., Francois, J., Poughon, L., Dussap, C. G., Jeminet, G., Bertin, G., *et al.* (2004a). Influence of pH on complexing of model b-D-glucans with zearalenone. *Journal of Food Protection*, 67, 2741–2746.
- Yiannikouris, A., François, J., Poughon, L., Dussap, C. G., *et al.* (2004b). Adsorption of zearalenone by beta-D-glucans in the *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Journal of Food Protection*, 67, 1195–1200.
- Yiannikouris, A., André, G., Poughon, L., François, J., *et al.* (2006). Chemical and conformational study of the interactions involved in mycotoxin complexation with beta-D-glucans. *Biomacromolecules*, 7, 1147–1155.
- Xu, H., Jeong, H. S., Lee, H. Y., Ahn, J. (2009). Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. *Letters of Applied Microbiology*, 49, 434–442.
- Zamberi, N. R., Abu, N., Mohamed, N. E., Nordin, N., Keong, Y. S., Beh, B. K., Zakaria, Z. A. B., Nik Abdul Rahman, N. M. A., Alitheen, N. B. (2016). The antimetastatic and antiangiogenesis effects of kefir water on murine breast cancer cells. *Integrative Cancer Therapies*, 15, 1–14.
- Zanello, G., Berri, M., Dupont, J., Sizaret, P.-Y., D’Inca, R., Salmon, H., Meurens, F. (2011). *Saccharomyces cerevisiae* modulates immune gene expressions and inhibits ETEC-mediated ERK1/2 and p38 signaling pathways in intestinal epithelial cells. *PLoS ONE*, 6(4), e18573.
- Zavala, L., Golowczyc, M. A., van Hoorde, K., Medrano, M., Huys, G., Vandamme, P., Abraham, A. G. (2016). Selected *Lactobacillus* strains isolated from sugary and milk kefir reduce *Salmonella* infection of epithelial cells *in vitro*. *Beneficial Microbes*, 7(4), 585-595.
- Zhao, X., Procopio, S., Becker, T. (2015). Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. *Journal of Food and Science Technology*, 52(12), 7588–7598. DOI 10.1007/s13197-015-1977-y
- Zwietering, M. H., Jongenburger, I., Rombouts, F. M., van 't Riet, K. (1990). Modeling of the bacterial growth curve. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 1875–1881.

ANEXO I. Medios de cultivo y soluciones

La composición de los medios de cultivo microbiológico y de las soluciones utilizadas durante esta tesis fue descrita en el capítulo de Materiales y Métodos, así como los procedimientos para formular y esterilizar cada uno de ellos. A continuación, en las Tablas 1 y 2 se detalla nuevamente la composición para facilitar su consulta.

Tabla 1. Composición de los medios de cultivo y soluciones acuosas empleados*

Caldo YPD		
Extracto de levadura	10,0 g/L	pH 6,5 ± 0,2
Peptona	20,0 g/L	
Dextrosa	20,0 g/L	
Caldo GPY		
Extracto de levadura	5,0 g/L	pH 3,8 ± 0,2
Peptona de carne	5,0 g/L	
Glucosa	40,0 g/L	
Caldo extracto de malta		
Extracto de malta	30,0 g/L	pH 5,4 ± 0,1
Peptona de carne	3,0 g/L	
Caldo Nutritivo (Laboratorios Britania, CABA, Argentina)**		
Pluripeptona	5 g/L	pH 7,0 ± 0,2
Extracto de carne	3 g/L	
Mosto de cebada rubia molida		
Extracto de malta cervecera rubia en polvo	180,0 g/L	pH 4,5 ± 0,1
ZnSO ₄	0,25 g/L	
Extracto de lúpulo isomerizado estéril	417 µL/L	

Caldo YNB (BD Difco™) suplementado con glucosa 0,5% p/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Glucosa	5,0 g/L	
Caldo YNB (BD Difco™) suplementado con maltosa 0,5% p/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Maltosa	5,0 g/L	
Caldo YNB (BD Difco™) suplementado con extracto de malta 0,5% p/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Extracto de malta de calidad microbiológica	5,0 g/L	
Caldo YNB (BD Difco™) suplementado con maltosa 0,1% p/V y maltotriosa 0,5% p/V***		
Yeast Nitrogen Base (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Maltosa	1,0 g/L	
Maltotriosa	5,0 g/L	
Agar YNB (BD Difco™ Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) suplementado con glucosa 2,0% p/V		
Agar YNB without Amino Acids (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Glucosa	20 g/L	
Agar agar	15 g/L	
Agar YNB (BD Difco™ Yeast Nitrogen Base without Amino Acids) suplementado con glicerol 3,0% V/V		
Agar YNB without Amino Acids (BD Difco™)	6,70 g/L	-
Glicerol	30 mL/L	
Agar agar	15 g/L	

Agar YGC (Biokar Diagnostics, Beauvais, Francia)**		
Extracto de levadura	5 g/L	pH 6,5 ± 0,2
Glucosa	20 g/L	
Cloranfenicol	0,1 g/L	
Agar agar	15 g/L	
Agar papa (PDA, Biokar Diagnostics, Francia)**		
Extracto de papa	4 g/L	pH 5,5 ± 0,2
Glucosa	20 g/L	
Agar agar	15 g/L	
Solución de esporas		
Lauril Sulfato de Sodio (Merck, Darmstadt, Alemania)	0,1 g/L	-
Glucosa	10,0 g/L	
Solución reguladora fosfato salino (PBS)		
NaCl	8,0 g/L	pH 7,5 ± 0,2
KCl	0,2 g/L	
Na ₂ HPO ₄	1,44 g/L	
KH ₂ PO ₄	0,24 g/L	
Solución fisiológica (SF)		
NaCl	9,0 g/L	pH 7,0 ± 0,2
Solución de azúcar de mascabo		
Azúcar de mascabo	50,0 g/L	-
Solución de azul de metileno		
Colorante azul de metileno	1,0 g/L	-

Solución de cristal violeta		
Colorante violeta de genciana	20 g/L	-
Oxalato de amonio	8,0 g/L	
Etanol	20% V/V	

*Los medios de cultivo y soluciones se prepararon por disolución de sus componentes en agua destilada y se esterizaron en autoclave a 121 °C durante 15 minutos, a excepción de la solución de azúcar de mascabo y de los colorantes azul de metileno y cristal violeta. **Los medios microbiológicos indicados se prepararon por disolución del formulado y se esterizaron de acuerdo a las indicaciones del proveedor; en la tabla se indica la composición del medio comercial. ***El caldo YNB y las soluciones de azúcares se prepararon como soluciones concentradas, 10X y 5X, respectivamente, en agua destilada y se esterizaron por filtración por poro de 0,22 µm; el agar agar se preparó como una solución 2X en agua destilada y se esterizó por autoclave a 121 °C durante 15 min.

Tabla 2. Medios utilizados en el cultivo celular (Gamba, 2015)

Ingrediente	DMEM Completo A	DMEM Completo B	DMEM Adhesión C
DMEM ^a	1 sobre	1 sobre	1 sobre
Penicilina/estreptomicina (1000 m,1000 µg/mL) ^b	13 mL	13 mL	-
Aminoácidos no esenciales ^c	13 mL	13 mL	-
Gentamicina (50 mg/mL)	10 mL	10 mL	-
NaHCO ₃	2,0 g	2,0 g	2,0 g
L-glutamina	0,3 mg	0,3 mg	-
Suero fetal bovino inactivado ^d	120 mL	180 mL	-
Agua miliQ	1000 mL	1000 mL	1000 mL
pH	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1	7,5 ± 0,1

^aDulbecco Modified Eagle's Medium, GIBCO (Grand Island N.Y., Estados Unidos); ^bGIBCO (Grand Island N.Y., Estados Unidos); ^cMEM Non-essential amino acids solution (100X), GIBCO, (Grand Island N.Y., Estados Unidos); ^dBIOSER (Argentina). El suero fue inactivado térmicamente, incubando 30 minutos a 60 °C. El DMEM A se utilizó para las células HepG2 y el DMEM B se utilizó

para las células Caco-2/TC7. El DMEM C se adhesión se empleó en los ensayos de adhesión de microorganismos a la línea Caco-2/TC7.