

**Molecular, Fermentative and Sensorial Characterization of Ecuadorian
Strains of *Saccharomyces Cerevisiae* for the Industrial Production of
Beverages.**

¹ J. Simbaña, ² J. Carvajal.

¹ CNIB, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador

² CNIB, Pontificia Universidad Católica del Ecuador, Quito, Ecuador

jenn170996@gmail.com

Key words: wild yeast, fermented beverages, organoleptic profiles, fermentation.

ABSTRACT:

Background: The fermented beverages industry its nowadays the oldest and most predominant biotechnology in the world, this has increase the need of searching for new and innovative approaches involving the protagonist of this fermentative processes: *S. cerevisae*. Ecuador is a country with a variety of habitats that shape the genetic diversity of *S. cerevisae* and along with it, its metabolic diversity, from which various biotechnological applications could be found. **Results:** Six different strains were identified among the 92 isolates. There was a significant difference between the isolates in terms of their fermentation traits and the sensorial quality that they give to the beverages. Various isolates (CLQCA 05-006, CLQCA 09-001, CLQCA 09-004, CLQCA 09-012, CLQCA 09-019, CLQCA 10-003, CLQCA 10-083, CLQCA 10-098, CLQCA 19-001, CLQCA 20-060, CLQCA 20-083.) were found to be appropriate for the production of wheat beer, the isolate (CLQCA- 10-098) is suitable for the production of low alcohol flavorful beers. The isolates (CLQCA 09-004 and CLQCA 10-003.) could be useful for the production of Indian Pale Ale (IPA) beers and finally the isolates (CLQCA 09-001, CLQCA 09-140, CLQCA 09-012, CLQCA 09-019, CLQCA 10-083, CLQCA 10-098 CLQCA 11-027, CLQCA 20-083) are appropriate for the production of lambic beers. **Conclusion:** The isolates used in the study showed great potential for the use in the industry, product of the genotypical and phenotypical diversity of wild yeasts.

INTRODUCCIÓN

Las bebidas fermentadas se han producido alrededor del mundo por miles de años y las características únicas que las diferencian están determinadas por los productos de fermentación generados por la diversidad de microorganismos presentes en estas, los principales: las levaduras ¹.

Las levaduras están presentes en la naturaleza en una gran variedad de sustratos y se han adaptado a nuevos a lo largo del tiempo ², por lo que desde hace mucho tiempo han estado asociadas a los seres humanos ³.

La domesticación de las levaduras es considerada uno de los eventos clave en la historia humana ⁴.

La producción de comida y bebidas gracias a este microorganismo fue uno de los factores que impulsó el cambio de la vida nómada al sedentarismo y con este el desarrollo de la agricultura ².

El uso de las levaduras por los humanos se ha reportado tan temprano como en el Neolítico en China, Irán y Egipto en donde ya se producían bebidas fermentadas ⁵.

En el Ecuador las bebidas fermentadas como la chicha también son evidencia de una domesticación temprana de microorganismos, esta bebida data de los 200 A. C, incluso antes del establecimiento de los Incas en la región ⁶. La producción de bebidas fermentadas es considerada la biotecnología más antigua y predominante en el mundo, lo que la ha convertido también en la más importante económicamente ⁷, produciendo aproximadamente \$245 billones anualmente⁸.

Durante las últimas décadas se ha llevado a cabo una gran cantidad de estudios para determinar la diversidad genética de las levaduras, los cuales han empleado diferentes técnicas moleculares: Fragmentos de restricción de longitud polimórfica (RFLP), reacción en cadena de la polimerasa con cebador arbitrario (AP-PCR), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD) y

secuenciamiento ⁹. A través de estos estudios se confirma la vasta variabilidad genética de las levaduras a nivel intra e interespecífico¹⁰.

La levadura más empleada en procesos fermentativos es *Saccharomyces cerevisiae*, las diferentes cepas de esta especie influyen en el sabor y aroma de las bebidas ⁷. En la industria de bebidas fermentadas, las características organolépticas dadas por las levaduras, son criterios importantes al seleccionar las levaduras con potencial uso.

Durante la fermentación las levaduras producen alrededor de 300 compuestos secundarios volátiles y no volátiles, los cuales varían según la cepa ¹¹, la combinación de esos 300 o más distintos compuestos, potencia sabores, aromas y produce identidad única a cada producto.

Es por esto que la caracterización molecular, fermentativa y sensorial de aislados de *Saccharomyces cerevisiae*, provenientes de distintos sustratos, permiten encontrar una o más levaduras que posean potenciales usos en la industria de bebidas fermentadas. En esta forma se proporciona aplicaciones a la diversidad microbiológica del Ecuador.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislados de levaduras: Los 96 aislados que se utilizaron pertenecen a la Colección de Levaduras Quito-Católica (CLQCA) y fueron colectadas en varios sustratos y provincias del Ecuador (Tabla 1). Estos 96 aislados fueron previamente identificados como *Saccharomyces cerevisiae* mediante secuenciamiento del dominio D1/D2 del gen 26S rRNA.

Extracción de ADN: Se extrajo el ADN de las levaduras, según lo descrito por Amber., *et al*¹². Se obtuvo una azada de los cultivos de las levaduras y se resuspendió en tubos con 500 ul de buffer de lisis (1 M Tris pH 8.0, 5 M NaCl, 50mM EDTA, 0.01 M SDS) y 0.4 g de microesferas de vidrio, posteriormente se agitaron en un molino Retsch (modelo MM 400) durante 3 minutos. A continuación, fueron incubados a 65°C por una hora, luego de la incubación los tubos fueron nuevamente agitados durante 3 minutos y centrifugados en una centrifuga Sigma (modelo 1-15 K) por 15 minutos a 1500 rpm. El sobrenadante fue transferido a nuevos tubos y almacenado a -20°C.

PCR con el microsatélite M13: La caracterización molecular (PCR fingerprinting) se llevó a cabo utilizando el cebador M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3')¹³. El proceso de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), fue efectuado en un termociclador Techne (modelo TC-412). Cada reacción tuvo lugar en un volumen de 20 ul que contenía 5 ul del templado de ADN (5ng/ul), 8.1 ul de H₂O, 5 ul de Buffer Gotaq (5x), 2,5 ul de dNTPs (10 mM), 4 ul del cebador M13 (5 Um) y 1 U Gotaq Pol (Promega). Los parámetros de los ciclos fueron: pre-desnaturalización del ADN a 93°C por 3 minutos, seguido por 45 ciclos de desnaturalización a 93°C por 1 minuto, templado a 55°C por 1 minuto, extensión a 72°C por un minuto y la extensión final a 72°C por 10 minutos¹⁴.

Electroforesis: Los productos de la PCR fueron separados por electroforesis en un gel al 1% de agarosa con 12.5 ul de bromuro de etidio en 0.5x TBE (40 mM Tris, 1 mM EDTA, 0.5 mM ácido bórico, pH 8.0) por tres horas a 90 V.

Preparación del mosto: El mosto se preparó con 1.5 kg de extracto de malta (MalBräu 75% solidos p/v), los cuales fueron diluidos en 20 litros de agua destilada; se sometió la mezcla al calor hasta llegar a ebullición y se agregó 20 g de lúpulo. Se hirvió el mosto durante 15 minutos y se dejó enfriar, el mosto fue almacenado en alícuotas de 1 litro a -20 °C. El mosto fue de 8 grados

Brix, los cuales fueron determinados en unrefractómetro ABBE (Optic ivymen system, modelo: WYA-S).

Ensayos de fermentación: Las fermentaciones se realizaron en volúmenes de 330ml de mosto con 15ml de levadura (1 a $2 \cdot 10^8$ células/ml) durante 7 días a temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C}$).

Las levaduras para estos ensayos fueron seleccionadas tomando en cuenta dos variables las cepas y sustratos de las que provienen, en total se seleccionaron 15 aislados. Los sustratos fueron clasificados en: bebidas tradicionales, sustratos naturales, piezas arqueológicas y toneles de fermentación, esto con el fin de probar la influencia que tiene el sustrato de origen en las características fermentativas y organolépticas de la levadura.

Análisis por HPLC: Al finalizar la fermentación, se tomó una alícuota de 1 ml del mosto fermentado para el análisis por HPLC en el cual se determinó las concentraciones de maltodextrina, maltotriosa, maltosa, dextrosa, glicerol y etanol producidas por cada cepa.

Embotellado: La cerveza fue envasada en botellas de 330 ml y se realizó carbonatación natural para lo cual se colocó 2g de azúcar previamente en las botellas La cerveza envasada se colocó en un lugar oscuro a temperatura ambiente ($\sim 22^\circ\text{C}$) por una semana, luego fueron trasladadas a la refrigeradora (3°C), hasta la evaluación sensorial.

Evaluación sensorial: La evaluación sensorial de las bebidas fue llevada a cabo por un panel de cuatro jueces, de los cuales dos están certificados por el programa BJCP (Beer Judge Certification Program). Los parámetros de la evaluación se enfocaron en las características de aroma y sabor dadas por los compuestos secundarios liberados por las levaduras: de aroma: floral, frutal, ácidos

grasos, sulfuroso, cuero, granos y de sabor: frutal, floral, especiado, alcohol, dulce, salado, miel y ácido, según lo descrito por Meodoro et al (2016) ¹¹.

Análisis estadístico: Se realizó un ANOVA para determinar diferencias significativas en los productos de fermentación y los puntajes de la evaluación sensorial de las cepas y entre aislados pertenecientes a la misma cepa y que provienen de distintos sustratos. Un análisis de componentes principales se aplicó a los promedios de los resultados del análisis por HPLC.

RESULTADOS

Caracterización molecular (PCR fingerprinting): Se identificaron 6 perfiles diferentes (Figura 1) entre los 96 aislados (Figura 3). La mayoría de los aislados pertenecen al perfil IV, que representa el 33% del total de los aislados, el perfil VI representa el 27% de los aislados, el perfil I representa al 17% y los perfiles II, III y IV representan el 7%, 8% y 9% respectivamente.

Todos los perfiles encontrados estuvieron presentes en sustratos diferentes y en provincias distintas (Figura 2), a excepción del perfil I Y II que se encontraron exclusivamente en bebidas tradicionales del Ecuador (Anexo A).

Análisis del mosto fermentado por HPLC: Las concentraciones de azúcares, glicerol y etanol obtenidas en las fermentaciones del mosto (Tabla 3) variaron significativamente entre cepas ($p = 2.2 \times 10^{-16}$) y entre los aislados de la misma cepa ($p = 7.4 \times 10^{-5}$). Según el Análisis de Componentes Principales, se identificaron cinco grupos (Figura 4).

La composición inicial del mosto fue: maltodextrina (0.186 g/l), maltotriosa (0.08 g/l), maltosa (0.281 g/l), glucosa (0.04 g/l). La glucosa fue el azúcar que las levaduras metabolizaron en mayor cantidad, reduciéndola en un 100%, seguido por la maltosa que se redujo en un 90 % y la maltodextrina en un 37%.

Determinados aislados mostraron metabolizar significativamente (0.00025) más azúcares que otros y producir significativamente más etanol y glicerol (Tabla 2).

Análisis organoléptico: Los puntajes obtenidos en la evaluación sensorial de las bebidas (Fig. 4) fueron significativamente diferentes tanto entre cepas ($p=0.00039$, como entre aislados pertenecientes a la misma cepa ($p=0.00023$).

La característica predominante en la evaluación sensorial fue la presencia de los aromas frutal y floral, presentes en nueve de las quince bebidas producidas. Los aromas sulfurosos y a granos también fueron los más perceptibles en los aislados: CLQCA 20-221 y CLQCA 09-008 respectivamente.

Con respecto al perfil de sabor, la característica más notable y común fue la presencia de un sabor frutal y junto con esta, los sabores ácidos y agrios.

DISCUSIÓN

Estudios recientes han establecido a *S. cerevisiae* como una levadura nómada debido a que esta carece de un nicho específico¹⁵, esto se debe a su metabolismo¹⁶, el cual le permite ser una generalista que puede sobrevivir en una variedad de ambientes y bajo distintas condiciones^{17,18}.

Este carácter generalista se evidencia en los aislados utilizados en este estudio, los cuales se encontraron en una diversidad de sustratos, desde aquellos relacionados a actividades humanas, hasta sustratos naturales en ambientes parcialmente o no disturbados por los humanos¹⁹.

A pesar de ser generalista y nómada, algunos genotipos de *S. cerevisiae* han demostrado tener adaptaciones a nichos específicos, resultado de la interrupción del flujo génico por barreras geográficas²⁰. Sin embargo, estas restricciones geográficas se han reducido debido a las migraciones humanas²⁰.

Un ejemplo de la reducción de estas restricciones fue registrado por Wang et al (2012)¹⁹, quien encontró que las poblaciones de cepas que se encontraban en bosques primarios migraban a ambientes habitados por los seres humanos. En este estudio, de la misma forma, se encontró que aquellos perfiles que se encuentran en sustratos naturales también estaban presentes en sustratos relacionados con actividades humanas, además los mismos perfiles se encuentran en provincias diferentes.

Este patrón se da debido a la capacidad de dispersión de las levaduras y a procesos de extinción en nichos intermedios, causada por eventos relacionados a actividades humanas y a eventos naturales²¹.

La dispersión de *S. cerevisiae* puede darse pasivamente, mediante corrientes de agua y viento²², y activamente por medio de vectores: *Drosophila*, avispas y abejas, los cuales atrae por medio de la

liberación de compuestos volátiles²². Cuando se encuentra en sustratos con poca cantidad de nutrientes produce esporas resistentes que pueden sobrevivir durante varios años y por largas distancias ²², estos factores permiten que las levaduras puedan colonizar una variedad de hábitats.

Con respecto a las características de fermentación de los aislados estudiados, los resultados del Análisis de Componentes Principales mostraron que el sustrato de origen es un factor importante en la determinación de las características fermentativas de las levaduras.

Estas diferencias se deben a que las levaduras que se encuentran en sustratos naturales generalmente presentan tasas de consumo de azúcar más bajas que aquellas relacionadas a actividades humanas, las cuales han sido seleccionadas bajo condiciones de alta disponibilidad de azúcar ²², esto también fue demostrado por Nidelet et al (2016) ²³, quien mostró un modelo que probaba que los flujos metabólicos eran diferentes entre cepas de *S. cerevisiae* de distinto sustrato de origen.

La evaluación de los productos de la fermentación de aislados silvestres de *S. cerevisiae* contribuye a la búsqueda de sus aplicaciones en la industria, por ejemplo, la producción de concentraciones altas de glicerol es una característica de interés en la industria cervecera, debido a que este compuesto contribuye al cuerpo de la bebida y a su vez juega un rol importante en la intensidad del sabor ²⁴.

La variación en las concentraciones de glicerol producidas por las levaduras es causada por el carácter de algunas levaduras, que durante la fermentación pueden alterar el balance de NADH/NAD⁺, con esto redireccionan el flujo de carbono hacia el glicerol en lugar de al etanol ²⁵, reduciendo las concentraciones de este, de esta manera producen bebidas con bajo contenido alcohólico y sabores agradables ²⁶.

La producción de este tipo de bebidas de bajo contenido alcohólico, que involucren levaduras que produzcan altas concentraciones de glicerol y por tanto bajas concentraciones de etanol, serían una buena alternativa para generar bebidas con una mejor calidad sensorial.

En la industria, las bebidas con bajo contenido alcohólico se producen mediante la remoción física del alcohol o por fermentaciones interrumpidas, ambas involucran la evaporación de los compuestos secundarios generados por la levadura, resultando en la reducción de los sabores y aromas de las bebidas ²⁶.

El aislado CLQCA- 10-098 produjo la mayor concentración de glicerol y a su vez, mostró un limitado consumo de azúcar (tabla 4), lo cual lo hace adecuado para la producción de bebidas con bajo contenido alcohólico y con sabores intensos.

En el campo de la biotecnología de bebidas una de las características claves al seleccionar las levaduras es el “fenotipo organoléptico”, el cual es producido por la combinación de los compuestos secundarios liberados por la levadura durante la fermentación ²⁷.

Estos compuestos han evolucionado en las levaduras debido a procesos fisiológicos favorables para la célula y también en respuesta a factores ambientales en procesos ecológicos con otras especies ³¹, es por esto que el sustrato de origen es un factor importante que influye sobre el fenotipo organoléptico. Este estudio mostro una gran variedad de fenotipos entre las levaduras estudiadas, ya que hubo diferencias significativas entre los puntajes obtenidos en la evaluación organoléptica.

Lo compuestos que constituyen el fenotipo organoléptico son los ésteres, alcoholes superiores, compuestos sulfurosos, ácidos orgánicos y ácidos grasos ²⁸. Los aromas y sabores frutales son señal

de la presencia de ésteres, los cuales en concentraciones balanceadas son deseables en la producción de ciertos tipos de cerveza como en algunas cervezas de trigo ²⁹.

Esta característica es de hecho la más común entre los aislados empleado en el estudio y se encontró tanto en el aroma como en el sabor de los aislados: CLQCA 05-006, CLQCA 09-001, CLQCA 09-004, CLQCA 09-012, CLQCA 09-019, CLQCA 10-003, CLQCA 10-083, CLQCA 10-098, CLQCA 19-001, CLQCA 20-060, CLQCA 20-083.

Por su parte los alcoholes superiores son compuestos que proveen tanto sabores como aromas frutales y alcohólicos, estos compuestos también son deseables en la producción de bebidas fermentadas y pueden ser útiles en ciertos estilos de cerveza como las India Pale Ale (IPA) ³⁰. Los aislados con este potencial son CLQCA 09-004 y CLQCA 10-003.

Uno de las características organolépticas más comunes entre las levaduras del estudio (CLQCA 09-001, CLQCA 09-140, CLQCA 09-012, CLQCA 09-019, CLQCA 10-083, CLQCA 10-098 CLQCA 11-027, CLQCA 20-083) fue la presencia de un sabor ácido. En la industria esta característica es deseable en la producción de cervezas lámbicas ²⁹. Las levaduras proveen estos sabores por la síntesis de ácidos orgánicos, mediante distintas rutas metabólicas ³¹.

Los principales ácidos que *Saccharomyces cerevisiae* produce y que contribuyen a la característica ácida de las bebidas son: ácido málico (50 – 70 mg/l), ácido succínico (36-166 mg/litro), ácido fumárico (40-60 mg/litro), ácido cítrico (120- 160/ mg/litro), ácido tartárico (100- 520 mg/litro), ácido fórmico (1 mg/litro) y ácido acético (10- 20 mg/litro) ³².

En cuanto a las características no deseables, el aislado CLQCA 20-221, fue el único que produjo aromas y sabores sulfurosos fuertes, lo cual lo hace descartable para un potencial uso en la industria.

Esta característica se produce mediante el anabolismo o catabolismo de los aminoácidos metionina y cisteína. Las concentraciones bajas de nitrógeno en el medio incrementan la necesidad de las levaduras por asimilar azufre, esto conlleva al aumento de la producción de H₂S, este proceso está influenciado por la cepa de levadura ²⁹.

A pesar de la existencia de esta característica no deseable en la industria de bebidas fermentadas, la mayor parte de los aislados del estudio mostraron potencial fermentativo y organoléptico para ser empleadas en la industria con varios fines.

CONCLUSIÓN

Los perfiles encontrados mostraron ser ubicuos, presentes en varias provincias y en distintos sustratos, debido a la capacidad de dispersión y al carácter generalista de *S. cerevisae*.

Los productos de fermentación generados y las características organolépticas fueron significativamente diferentes entre los perfiles determinados.

Los aislados mostraron tener aplicaciones en la industria de bebidas fermentadas en la producción de bebidas con bajo contenido alcohólico, cervezas de trigo, cervezas Indian Pale Ale (IPA) y cervezas lámbicas.

REFERENCIAS

1. Querol, A., & Fleet, G. H. (Eds.). (2006). *Yeasts in food and beverages*. Berlin: Springer.
2. Money, N. P. (2018). *The Rise of Yeast: How the Sugar Fungus Shaped Civilization*. New York: Oxford University Press
3. Gallone, B., Steensels, J., Prahl, T., Soriaga, L., Saels, V., Herrera-Malaver, B., ... & Teiling, C. (2016). Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts. *Cell*, *166*(6), 1397-1410.
4. Duan, S. F., Han, P. J., Wang, Q. M., Liu, W. Q., Shi, J. Y., Li, K., ... & Bai, F. Y. (2018). The origin and adaptive evolution of domesticated populations of yeast from Far East Asia. *Nature communications*, *9*(1), 2690.
5. Kurtzman, C., Fell, J. W., & Boekhout, T. (Eds.). (2011). *The yeasts: a taxonomic study*. Elsevier.
6. Piló, F. B., Carvajal-Barriga, E. J., Guamán-Burneo, M. C., Portero-Barahona, P., Dias, A. M. M., Freitas, L. F. D. D., ... & Rosa, C. A. (2018). *Saccharomyces cerevisiae* populations and other yeasts associated with indigenous beers (chicha) of Ecuador. *brazilian journal of microbiology*, *49*(4), 808-815.
7. Walker, G. M., & Stewart, G. G. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*, *2*(4), 30.
8. Jernigan, D. H. (2009). The global alcohol industry: an overview. *Addiction*, *104*, 6-12.

9. Možina, S. S., & Raspor, P. (1997). Molecular techniques for yeast identification in food processing. *Food technol. biotechnology*, 35, 55-61.
10. Capece, A., Granchi, L., Guerrini, S., Mangani, S., Romaniello, R., Vincenzini, M., & Romano, P. (2016). Diversity of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from two Italian wine-producing regions. *Frontiers in microbiology*, 7, 1018.
11. Medoro, C., Cianciabella, M., Camilli, F., Magli, M., Gatti, E., & Predieri, S. (2016). Sensory profile of Italian craft beers, beer taster expert versus sensory methods: a comparative study. *Food and Nutrition Sciences*, 7(06), 454. G.(Eds.) *Changing Diversity in Changing Environments*, 55-86.
12. Amberg, D. C., Burke, D. J., & Strathern, J. N. (2006). Preparation of genomic DNA from yeast using glass beads. *Cold Spring Harbor Protocols*, 2006(1).
13. Kuhls, K., Lieckfeldt, E., & Börner, T. (1995). PCR-fingerprinting used for comparison of ex type strains of *Trichoderma* species deposited in different culture collections. *Microbiological research*, 150(4), 363-371.
14. Abd-Elsalam, K. A., Almohimeed, I., Moslem, M. A., & Bahkali, A. H. (2010). M13-microsatellite PCR and rDNA sequence markers for identification of *Trichoderma* (Hypocreaceae) species in Saudi Arabian soil. *Genetics and Molecular Research*, 9(4), 2016-2024.
15. Lodolo, E. J., Kock, J. L., Axcell, B. C., & Brooks, M. (2008). The yeast *Saccharomyces cerevisiae*—the main character in beer brewing. *FEMS yeast research*, 8(7), 1018-1036.
16. Meier-Dörnberg, T., Hutzler, M., Michel, M., Methner, F. J., & Jacob, F. (2017). The importance of a comparative characterization of *Saccharomyces Cerevisiae* and *Saccharomyces Pastorianus* strains for brewing. *Fermentation*, 3(3), 41.

17. Cubillos, F. A., Gibson, B., Grijalva-Vallejos, N., Krogerus, K., & Nikulin, J. (2019). Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast*.
18. Goddard, M. R., & Greig, D. (2015). *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche? *FEMS yeast research*, *15*(3), fov009
19. Wang, Q. M., Liu, W. Q., Liti, G., Wang, S. A., & Bai, F. Y. (2012). Surprisingly diverged populations of *Saccharomyces cerevisiae* in natural environments remote from human activity. *Molecular ecology*, *21*(22), 5404-5417.
20. Carvajal, J. B., Libkind, D., Briones, A. I., Iranzo, J. U., Portero, P., Roberts, I., ... & Rosa, C. A. (2011). Yeasts biodiversity and its significance: case studies in natural and human-related environments, ex situ preservation, applications and challenges. *Changing Diversity in Changing Environment*, 55-86. William T. Starmer, Marc-André Lachance, in *The Yeasts* (Fifth Edition), 2011
21. Jouhten, P., Ponomarova, O., Gonzalez, R., & Patil, K. R. (2016). *Saccharomyces cerevisiae* metabolism in ecological context. *FEMS yeast research*, *16*(7).
22. Nidelet, T., Brial, P., Camarasa, C., & Dequin, S. (2016). Diversity of flux distribution in central carbon metabolism of *S. cerevisiae* strains from diverse environments. *Microbial cell factories*, *15*(1), 58.
23. Zhao, X., Procopio, S., & Becker, T. (2015). Flavor impacts of glycerol in the processing of yeast fermented beverages: a review. *Journal of food science and technology*, *52*(12), 7588-7598.
24. Goold, H. D., Kroukamp, H., Williams, T. C., Paulsen, I. T., Varela, C., & Pretorius, I. S. (2017). Yeast's balancing act between ethanol and glycerol production in low-alcohol wines. *Microbial biotechnology*, *10*(2), 264-278.

25. Capece, A., Romaniello, R., Siesto, G., & Romano, P. (2018). Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*, 4(2), 38.
26. Carrau, F., Boido, E., & Dellacassa, E. (2016). Yeast diversity and flavor compounds. *Fungal Metabolites*, 1-29.
27. Pires, E. J., Teixeira, J. A., Brányik, T., & Vicente, A. 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.
28. Dzialo, M. C., Park, R., Steensels, J., Lievens, B., & Verstrepen, K. J. (2017). Physiology, ecology and industrial applications of aroma formation in yeast. *FEMS microbiology reviews*, 41(Supp_1), S95-S128.
29. Crauwels, S., Steensels, J., Aerts, G., Willems, K. A., Verstrepen, K. J., & Lievens, B. (2015). *Brettanomyces bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. *BrewingScience*, 68(9-10), 110-121.
30. 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.
31. Whiting, G. C. (1976). Organic acid metabolism of yeasts during fermentation of alcoholic beverages—A review. *Journal of the Institute of Brewing*, 82(2), 84-92.
32. Chidi, B. S., Bauer, F. F., & Rossouw, D. (2018). Organic Acid Metabolism and the Impact of Fermentation Practices on Wine Acidity: A Review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 39(2), 1-15.

FIGURAS

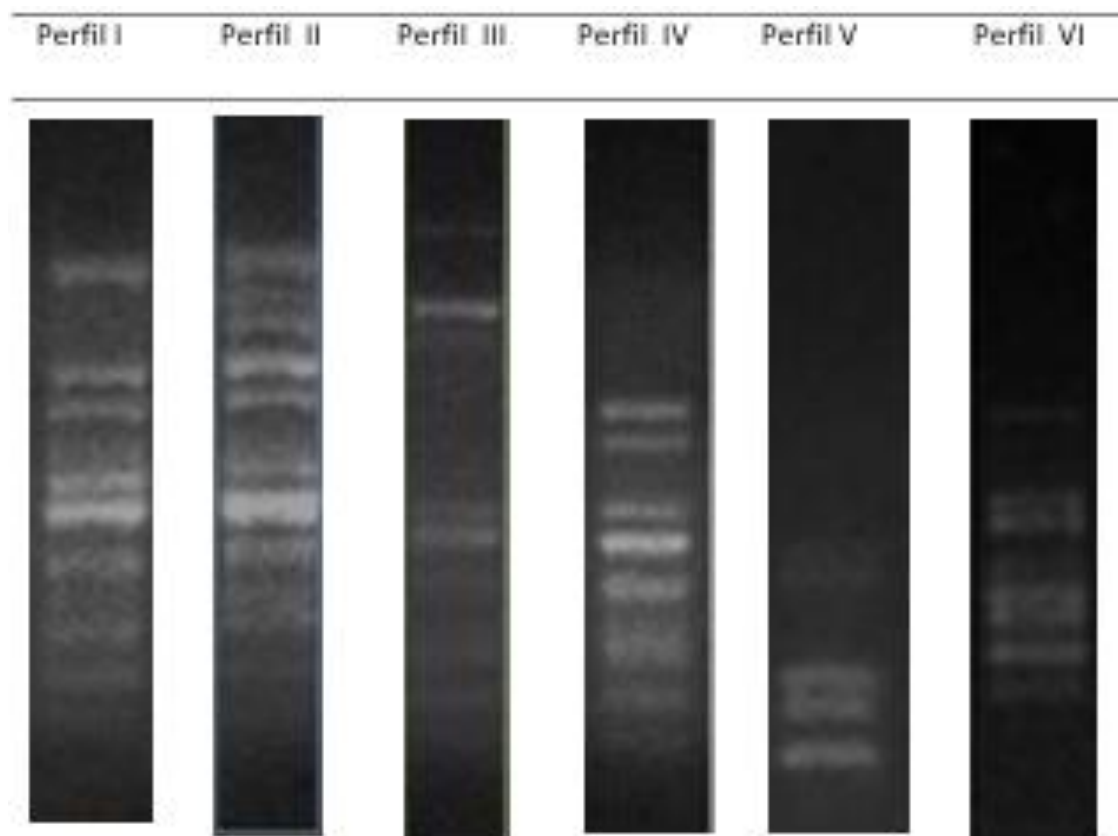


Figura 1: Seis distintos perfiles determinados en la caracterización molecular, mediante la PCR con el primer M13 (5'-GAGGGTGGCGGTTCT-3').

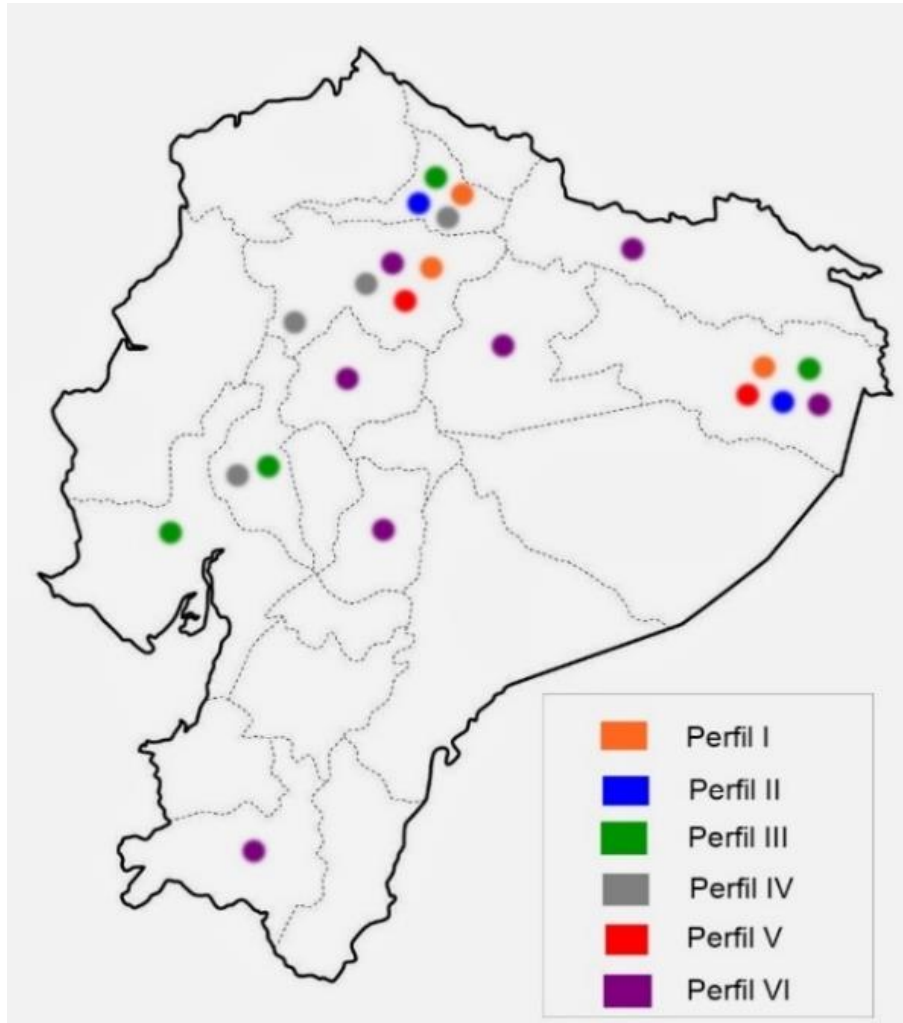


Figura 2: Mapa de la distribución de los seis perfiles determinados en la caracterización molecular.

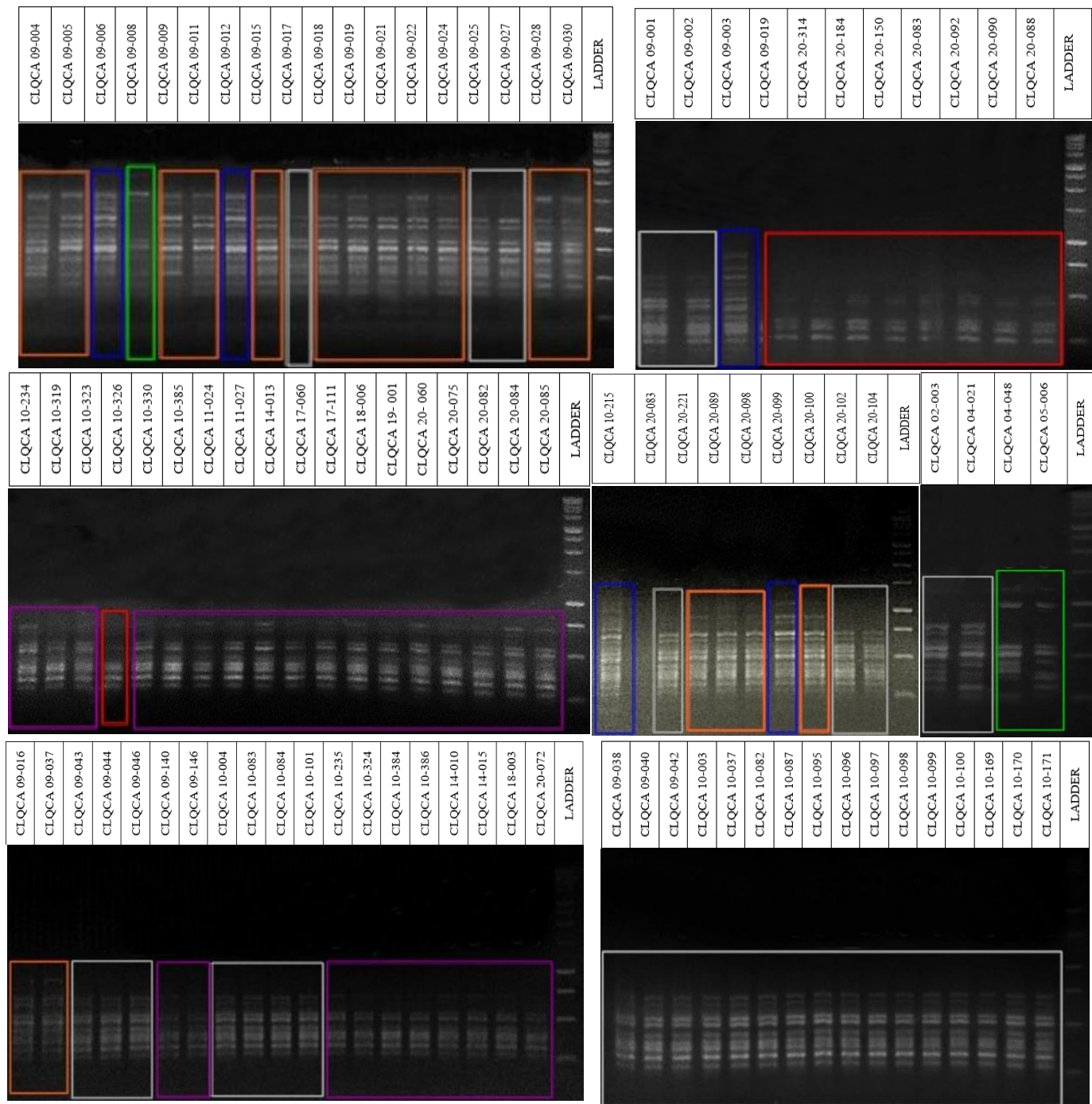


Figura 3: Caracterización molecular realizada con el primer M13 para los 96 aislados de *Saccharomyces cerevisiae*, cada color representa un perfil diferente.

Azul: perfil 1; tomate: perfil 2, verde: perfil 3, blanco: perfil 4, morado: perfil 5, rojo: perfil 6.

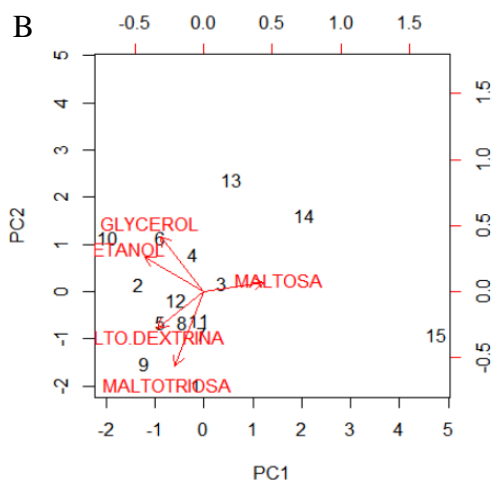
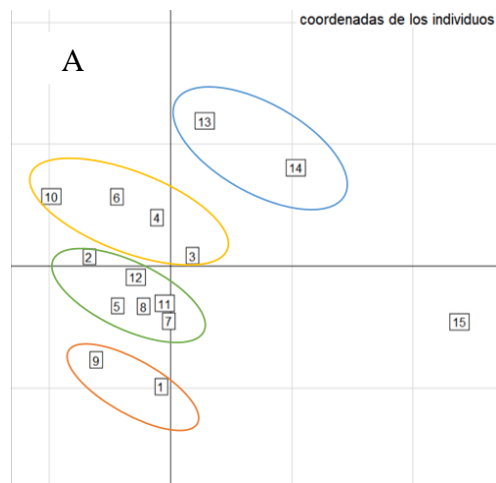


Figura 4: Análisis de Componentes Principales de los resultados obtenidos en el análisis por HPLC de las fermentaciones.

A: En el gráfico de coordenadas se encuentran los cinco grupos obtenidos, cada uno delimitado por un color diferente.

B: Los individuos más cercanos a las flechas de los compuestos son aquellos de los cuales mayores concentraciones se encontraron en el análisis de HPLC.

1. CLQCA 05-006, 2. CLQCA 09-001, 3. CLQCA 09-004, 4. CLQCA 09-140, 5. CLQCA 09-012, 6. CLQCA 09-019, 7. CLQCA 10-003, 8. CLQCA 10-083, 9. CLQCA 10-096, 10. CLQCA 10-098, 11. CLQCA 11-027, 12. CLQCA 19-001, 13. CLQCA 20-060, 14. CLQCA 20-083, 15. CLQCA 20-221.

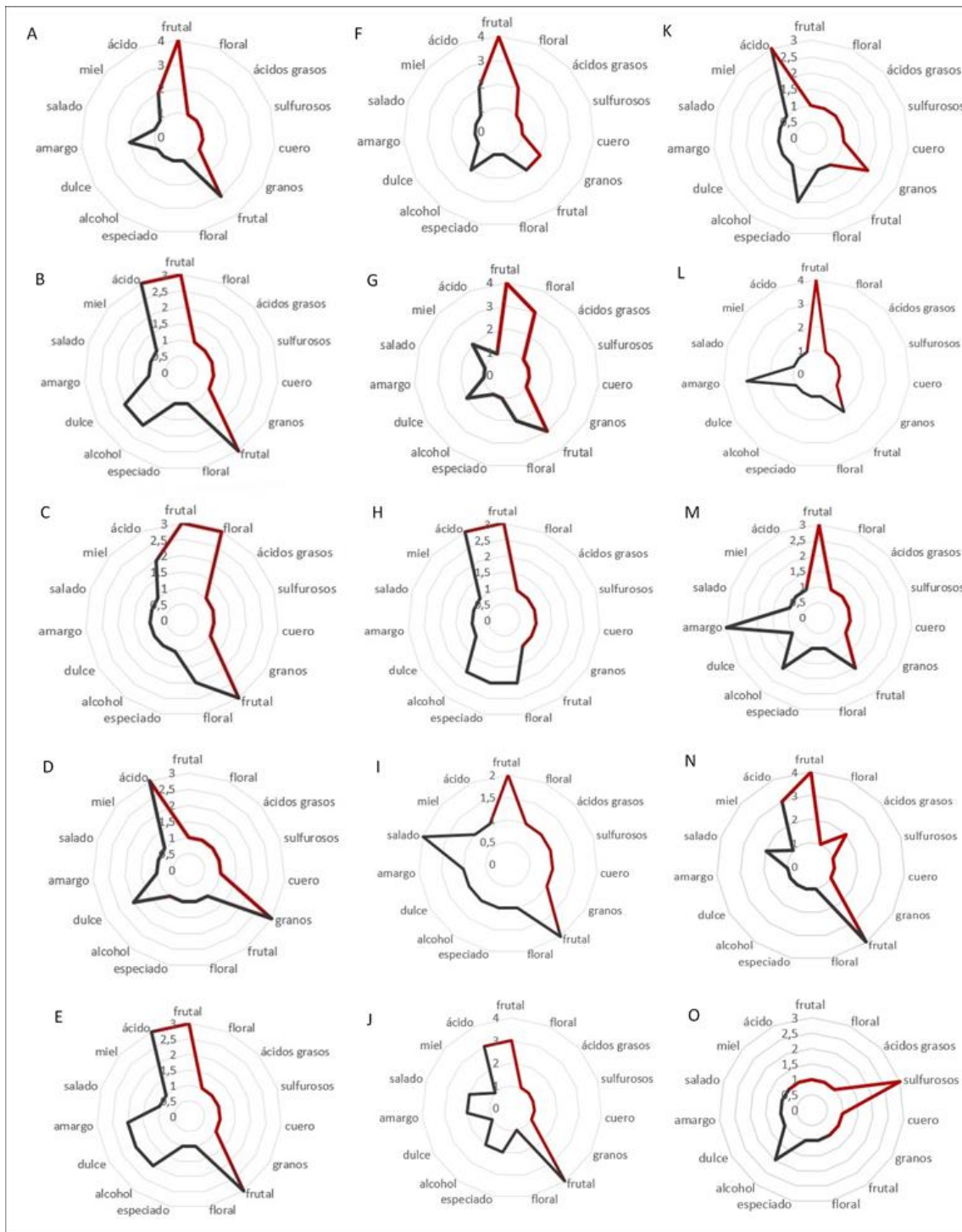


Figura 5: Perfiles organolépticos producidos por los 15 aislados seleccionados, el color rojo representa la evaluación de aroma y el negro la evaluación de sabores.

A: CLQCA 05-006, B: CLQCA 09-001, C: CLQCA 09-004, D: CLQCA 09-140, E: CLQCA 09-012, F: CLQCA 09-019, G: CLQCA 10-003, H: CLQCA 10-083, I: CLQCA10-096, J: CLQCA10-098, K: CLQCA 11-027, L: CLQCA 19-001, M: CLQCA 20-060, N: CLQCA 20-083, O: CLQCA 20-221.

TABLAS

Tabla 1: Perfiles identificados y sustratos de los cuales provienen.

Perfil	Sustrato	Código
Perfil I	Chicha de jora (bebida tradicional)	CLQCA 09-004
	<i>Heliconia</i> sp.	CLQCA 20-221
Perfil II	Chicha de jora	CLQCA 09-012
Perfil III	Chicha de jora (bebida tradicional)	CLQCA 09-008
	Fruto indeterminado en descomposición	CLQCA 05-006
Perfil IV	Tonel de fermentación	CLQCA 10-083
	Meliponino	CLQCA 10-003
	Termitero	CLQCA 10-098
	Vasija (pieza arqueológica)	CLQCA 10-096
Perfil V	Chicha de yuca (bebida tradicional)	CLQCA 09-019
	Yuca fermentada	CLQCA 20-083
Perfil VI	Chicha de jora (bebida tradicional)	CLQCA 09-140
	Planta acuática	CLQCA 11-027
	Agua en hoja con materia orgánica	CLQCA 20-060
	<i>Musa textilis</i> (jugo fermentado)	CLQCA 19-001

Tabla 2: Aislados de cuyas fermentaciones se obtuvieron las mayores y menores concentraciones de los compuestos analizados por HPLC

Compuesto	Mayor		Menor	
	Aislado	Concentración (g/l)	Aislado	Concentración (g/l)
Maltotriosa	CLQCA 10-096	0,200 ± 0,3	CLQCA 20-060	0,113 ± 0,3
Maltodextrina	CLQCA 10-098	0,044 ± 0,3	CLQCA 20-060	0,012 ± 0,3
Maltosa	CLQCA 20-221	0,146 ± 0,2	CLQCA 11-027	0,0077 ± 0,4
Glicerol	CLQCA 10-098	0,016 ± 0,2	CLQCA 20-221	0,0076 ± 0,3
Etanol	CLQCA 09-019	0,258 ± 0,4	CLQCA 20-221	0,126 ± 0,4

Tabla 3: Promedios de los resultados del análisis por HPLC y sus desviaciones estándar.

Aislado	Malto triosa (g/l)	Malto-dextrina (g/l)	Maltosa (g/l)	Glicerol (g/l)	Etanol (g/l)
CLQCA 05-006	0,185 ± 0,3	0,081 ± 0,3	0,0075 ± 0,2	0,0084± 0,3	0,212 ± 0,3
CLQCA 09-001	0,175 ± 0,4	0,070 ± 0,3	0,0093 ± 0,4	0,015 ± 0,4	0,232 ± 0,3
CLQCA 09-004	0,186 ± 0,3	0,035 ± 0,5	0,061,8 ± 0,4	0,010 ± 0,3	0,225 ± 0,3
CLQCA 09-140	0,160 ± 1,1	0,040 ± 0,3	0,022 ± 0,4	0,013 ± 0,4	0,225 ± 0,3
CLQCA 09-012	0,182 ± 0,2	0,077 ± 0,4	0,018 ± 0,2	0,013 ± 0,4	0,222 ± 0,4
CLQCA 09-019	0,169 ± 0,3	0,028 ± 0,2	0,0091 ± 0,4	0,012 ± 0,2	0,258 ± 0,4
CLQCA 10-003	0,155 ± 0,3	0,076 ± 0,2	0,0078 ± 0,3	0,010 ± 0,3	0,211 ± 0,5
CLQCA 10-083	0,157 ± 0,3	0,077 ± 0,3	0,0074 ± 0,3	0,011 ± 0,6	0,227 ± 0,3
CLQCA 10-096	0,200 ± 0,3	0,088 ± 0,5	0,0089 ± 0,3	0,011 ± 0,4	0,228 ± 0,4
CLQCA 10-098	0,205 ± 0,3	0,044 ± 0,3	0,029 ± 0,8	0,016 ± 0,2	0,254 ± 0,3
CLQCA 11-027	0,154 ± 0,3	0,073 ± 0,3	0,0077 ± 0,4	0,011 ± 0,4	0,209 ± 0,5
CLQCA 19-001	0,161 ± 0,6	0,071 ± 0,4	0,0081 ± 0,3	0,013 ± 0,3	0,213 ± 0,3
CLQCA 20-060	0,113 ± 0,3	0,012 ± 0,3	0,026 ± 0,4	0,013 ± 0,2	0,244 ± 0,6
CLQCA 20-083	0,124 ± 0,7	0,014 ± 0,4	0,0781 ± 0,2	0,012 ± 0,2	0,197 ± 0,4
CLQCA 20-221	0,132 ± 0,5	0,041 ± 1,1	0,146 ± 0,2	0,0076± 0,3	0,126 ± 0,4

ANEXOS

Anexo A: Aislados pertenecientes a los seis perfiles identificados y los sustratos y provincias de los cuales fueron aislados.

Perfil	Aislado	Sustrato	Provincia	
I	09-004	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-005	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-007	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-009	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-011	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-015	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-016	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-018	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-019	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-021	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-022	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-024	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-028	Chicha de siete granos	Imbabura	
	09-030	Chicha de siete granos	Imbabura	
	10-215	Morocho	Pichincha	
	20-099	Yuca fermentada	Orellana	
	II	09-003	Chicha de siete granos	Imbabura
		09-006	Chicha de siete granos	Imbabura
		09-012	Chicha de siete granos	Imbabura
20-083		Chicha de yuca	Orellana	
20-102		Yuca fermentada	Orellana	
20-104		Yuca fermentada	Orellana	

III	04-048	Malvaceae (flor rosada)	Los rios
	05-006	Fruto indeterminado (descomposición)	Guayas
	09-008	Chicha de siete granos	Imbabura
	20-089	Yuca fermentada	Orellana
	20-098	Yuca fermentada	Orellana
	20-100	Yuca fermentada	Orellana
	20-221	Heliconia sp flor	Orellana
IV	02-003	Banda palmito	Santo domingo
	04-021	Coleóptero	Los Rios
	09-001	Opuntia sp. (flor)	Imbabura
	09-002	Chicha de siete granos	Imbabura
	09-017	Chicha de siete granos	Imbabura
	09-025	Chicha de siete granos	Imbabura
	09-027	Chicha de siete granos	Imbabura
	09-038	Chicha de siete granos	Imbabura
	09-040	Chicha de siete granos	Imbabura
	09-042	Chicha de siete granos	Imbabura
	09-043	Chicha de siete granos	Imbabura
	09-044	Chicha de siete granos	Imbabura
	09-046	Chicha de siete granos	Imbabura
	10-003	Meliponino	Pichincha
	10-004	Abeja	Pichincha
	10-027	Hierba	Pichincha
	10-082	Tonel madera de fermentación	Pichincha
	10-083	Tonel madera de fermentación	Pichincha
	10-084	Vasija	Pichincha
	10-087	Vasija	Pichincha
10-095	Vasija	Pichincha	
10-096	Vasija	Pichincha	

	10-097	Tonel madera de fermentación	Pichincha	
	10-098	Tonel madera de fermentación	Pichincha	
	10-099	Tonel madera de fermentación	Pichincha	
	10-100	Tonel madera de fermentación	Pichincha	
	10-101	Tonel madera de fermentación	Pichincha	
	10-169	Chicha de jora	Pichincha	
	10-170	Chicha de jora	Pichincha	
	10-171	Chicha de jora	Pichincha	
V	10-326	Chicha de jora	Pichincha	
	20-088	Yuca fermentada	Orellana	
	20-090	Yuca fermentada	Orellana	
	20-092	Yuca fermentada	Orellana	
	20-093	Yuca fermentada	Orellana	
	20-150	Gesneriace	Orellana	
	20-184	Heliconia sp flor	Orellana	
	20-314	Termitero	Orellana	
	VI	09-140	Champús	Pichincha
		09-146	Champús	Pichincha
10-234		Champús	Pichincha	
10-235		Champús	Pichincha	
10-236		Champús	Pichincha	
10-319		Macerado de intestino rana	Pichincha	
10-323		Champús	Pichincha	
10-324		Chicha de jora	Pichincha	
10-330		Chicha de jora	Pichincha	
10-384		Tonel de fermentación	Pichincha	
10-385		Tonel de fermentación	Pichincha	
10-386		Tonel de fermentación	Pichincha	
11-024		Planta acuática	Cotopaxi	
11-027		Planta acuática	Cotopaxi	
14-010		Chicha de jora	Chimborazo	
14-013		Chicha de jora	Chimborazo	
14-015		Tonel de fermentación	Chimborazo	
17-060		Tonel de fermentación	Loja	

17-111	Tonel de fermentación	Loja
18-003	Planta acuática	Sucumbíos
18-006	Planta acuática	Sucumbíos
19-001	Chicha de jora	Napo
20-060	Chicha de jora	Orellana
20-072	Chicha de jora	Orellana
20-075	Hemiptera	Orellana