

Nutrientes para levaduras cerveceras: La clave del éxito

Texto traducido del artículo *Feeding Yeast for Brewing Success*, de *Lallemand Brewing 2021* por *Joan Montasell, MSc, Dipl.Brew, Technical Sales Manager – Spain & Portugal*.

Las levaduras son microorganismos vivos y, como todo organismo, su esperanza de vida se verá muy condicionada por la nutrición y el manejo. Una atención especial a la levadura, concretamente a sus necesidades nutricionales, puede resultar en fermentaciones más consistentes con sabores y aromas más complejos e interesantes.

Introducción

La levadura es un ingrediente fundamental para el proceso de elaboración de cerveza. Concretamente es la responsable de la fermentación alcohólica, en la que se produce alcohol, dióxido de carbono (CO₂) y multitud de compuestos aromáticos, entre otros. Se cree que hay alrededor de 950 compuestos que componen el perfil organoléptico de la cerveza, y 400 de ellos son producidos por levadura.

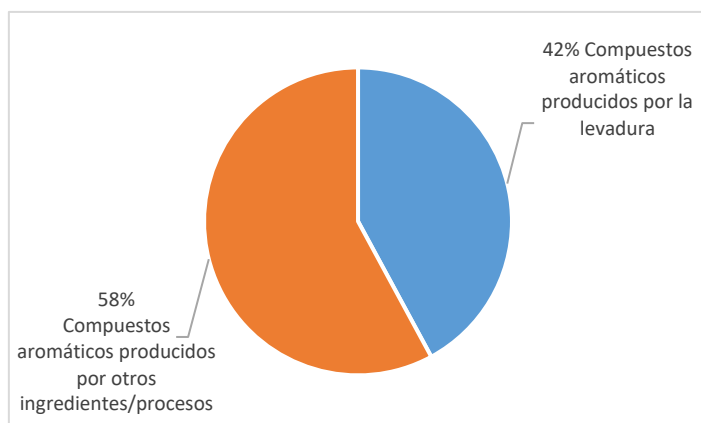


Figura 1. *World Brewing Academy Lecture: Yeast Nutrition-Walker, Dr. Graeme. (2018). Siebel Institute of Technology. [1]*

El aroma es solo un ejemplo de la complejidad y los matices que aporta la levadura. Sin embargo, la fermentación alcohólica en sí no es un ambiente ideal para su crecimiento y desarrollo, sino más bien un ambiente hostil. La presencia de los compuestos producidos por la misma levadura, tales como el alcohol y dióxido de carbono, pueden crear unas condiciones estresantes.

Cuando la levadura se encuentra en condiciones estresantes, su rendimiento puede disminuir propiciando la producción de aromas y sabores desagradables o incluso dar lugar a fermentaciones lentas o paradas. No obstante, la adición de nutrientes permite conseguir unas condiciones ideales en las que se da una mejora del crecimiento de las células, resultando en fermentaciones más consistentes y fiables.

Consecuencias de un mosto deficiente en nutrientes

Idealmente, un mosto obtenido a partir de malta de cebada puede proporcionar los componentes necesarios para una buena fermentación. Sin embargo, es bastante común tener ciertas deficiencias.

Los mostos de alta densidad, o con alto porcentaje de adjuntos, pueden dar lugar a una carencia de nutrientes esenciales, los cuales permiten a la levadura realizar su trabajo de un modo correcto. Por ejemplo, una mayor producción de alcohol se consigue a partir

de mostos concentrados o bien añadiendo azúcares al medio. En estas condiciones, el equilibrio entre carbohidratos y nitrógeno queda alterado, resultando en la presencia de posibles problemas durante la fermentación [2].

Los métodos de elaboración detallados a continuación pueden reducir aún más la capacidad del mosto para proporcionar los nutrientes considerados indispensables:

- Producción de mostos de alta densidad (*high-gravity worts*)
- Uso de porcentajes elevados de cereales sin maltear en la producción de mosto.
- Aumento del recuento de células durante la propagación
- Reducción de los tiempos de proceso durante la fermentación [3]

Oxígeno: un nutriente clave para la levadura

El oxígeno no se considera un nutriente para los humanos, pero sí lo es para la levadura. Este microorganismo, necesita oxígeno inmediatamente después de ser inoculada. Normalmente, no se requiere inyectar oxígeno o aire para las fermentaciones estándar que utilizan levadura seca activa en el primer paso, ya que contienen suficientes reservas de ergosteroles y ácidos grasos, necesarios para la multiplicación celular.

Los métodos de elaboración afectan la calidad de la levadura

La elaboración de mostos de alta densidad requiere de una mayor concentración de azúcar en comparación con los métodos tradicionales, provocando un estrés adicional sobre la levadura durante la fermentación. Se ha demostrado que dicha práctica resulta en:

- Disminución de las tasas de crecimiento
- Fases de latencia más largas
- Utilización incompleta del azúcar
- Mayor producción ésteres, tales como el acetato de etilo y acetato de isoamilo en la cerveza final [4]

Factores que propician un mosto con deficiencias

Las deficiencias en un mosto variarán según la receta, la levadura y el resultado deseado. En general, el mosto puede carecer de nitrógeno, zinc, ácido pantoténico (vitamina B5)

y biotina (vitamina B7), o tener un desequilibrio de los minerales magnesio y calcio. Esto puede resultar en un crecimiento de levadura menos robusto y una menor producción de enzimas.

La suplementación de nutrientes es una práctica común que puede ayudar a abordar las deficiencias de un mosto. No todos los suplementos son igual de biodisponibles para la levadura, y algunas formulaciones pueden ser contraproducentes.

Los 5 nutrientes a tener en cuenta

En este artículo, analizaremos los cinco nutrientes esenciales los cuales todo cervecero debería considerar para mejorar sus fermentaciones, dando lugar a una mejora también en el sabor y aroma del producto final, entre otras características.

1. Nitrógeno
2. Biotina (vitamina B7)
3. Ácido pantoténico (vitamina B5)
4. Magnesio
5. Zinc

Nitrógeno: el nutriente más importante

Sin una cantidad suficiente de nitrógeno, la levadura no podrá crecer ni fermentar, ya que se trata de un nutriente esencial necesario. Aproximadamente el 10% del peso seco de la levadura está compuesto de nitrógeno [5]. Las fuentes de nitrógeno del mosto son principalmente aminoácidos, iones de amonio y dipéptidos y tripéptidos [6].

La disponibilidad de nitrógeno impacta de un modo muy directo sobre el sabor de la cerveza resultante.

Escenarios donde se requiere una suplementación de nitrógeno

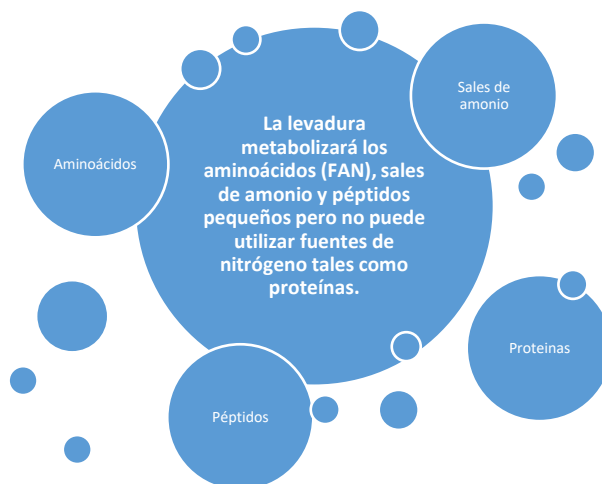
A menudo, los mostos obtenidos a partir de adjuntos y/o azúcares añadidos causará una dilución del nitrógeno disponible, entre otros nutrientes, haciendo necesaria una suplementación en los mismos [1].

Concentraciones ideales

El amino nitrógeno libre (FAN) se refiere al nitrógeno orgánico disponible en el mosto. FAN es considerado el indicador de referencia para predecir el crecimiento saludable de la levadura, la viabilidad, la vitalidad, la eficiencia de la fermentación y la calidad y estabilidad de la cerveza [8]. Por lo general, el nivel de FAN en el mosto debe ser de alrededor de mínimo 150 mg/L, pero puede oscilar entre 100 y 300 mg/L.

¿Qué es el FAN?

El amino nitrógeno libre (FAN) es la suma de los aminoácidos individuales y péptidos pequeños (dipéptidos y tripéptidos). La mayor parte de FAN es producida por enzimas proteolíticas de la malta durante el proceso de malteado y macerado. Existe una actividad proteolítica muy limitada de la levadura. Además, una concentración minoritaria de péptidos pequeños se produce por la acción hidrolítica de las proteinasas procedentes de la levadura extracelulares [8].



Opciones de suplementación de nitrógeno

- Amonio

El amonio es una fuente inorgánica de nitrógeno. La suplementación de amonio más habitual es mediante las mezclas complejas de nutrientes a base sales de amonio, como el fosfato de diamonio (DAP), además de vitaminas y sales minerales.

Las necesidades de nitrógeno por parte de la levadura dependen de la cepa. Algunas levaduras necesitan hasta cuatro veces más nitrógeno que otras para fermentar a la misma velocidad un mosto deficiente en nitrógeno [9]. Suplementar los mostos deficientes en nitrógeno mediante las sales de amonio puede presentar algunos

inconvenientes. La levadura tiende a metabolizar el amonio muy rápidamente, lo que propiciará un crecimiento rápido. No obstante, dicho crecimiento acelerado causa una rápida disminución del nitrógeno disponible dando lugar de nuevo a un medio deficiente. Al carecer de otros nutrientes esenciales, la levadura consumirá sus propios aminoácidos, resultando en la producción de compuestos azufrados y varios sabores desagradables.

- Urea

La urea proporciona una fuente de nitrógeno fácilmente disponible para la levadura. Sin embargo, en presencia de calor puede crear una reacción química para formar carbamato de etilo o uretano cuando se combina con alcohol. Se ha demostrado que estos compuestos son carcinogénicos [10] [11].

- Autolisados de levadura

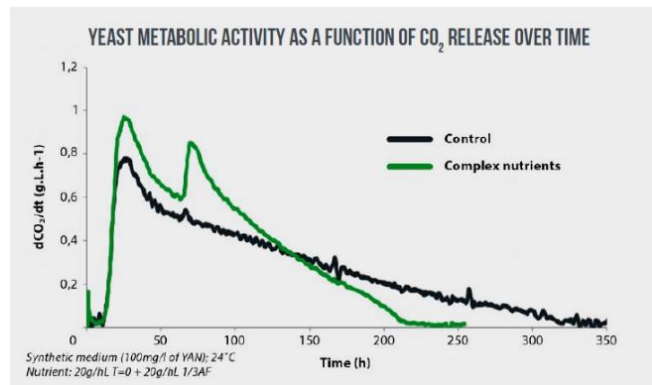
Los autolisados de levadura son nutrientes orgánicos procedentes de la autólisis parcial de las células de levadura. Los autolisados se producen de manera similar a los extractos de levadura, pero las paredes celulares no se eliminan en el proceso. Esto los hace parcialmente solubles en agua. Los autolisados contienen una fuente de aminoácidos, vitaminas, minerales y otros micronutrientes. En comparación con las sales minerales, los autolisados de levadura son de origen natural por lo que ofrecen una mayor biodisponibilidad del nitrógeno, el cual será absorbido más lentamente por parte de la levadura durante la fermentación. Este proceso más lento, ayuda a evitar condiciones estresantes para la levadura.

Orgánico vs inorgánico

Los términos "inorgánico" y "orgánico" suelen asociarse en dietética, aunque en el contexto de la fermentación se refieren más bien a la composición química.

Orgánico = Compuesto derivado de materia viva, que contiene carbono.

Inorgánico = Un compuesto químico que carece de enlaces carbono-hidrógeno, como metales y minerales.



Biotina (Vitamina B7): El suplemento necesario en la elaboración de cerveza

La biotina es parte de la familia de las vitaminas del grupo B. Es un catalizador de múltiples reacciones importantes, tales como el metabolismo de los aminoácidos, la biosíntesis de los ácidos grasos y el metabolismo para la obtención de energía. La biotina también es un cofactor enzimático importante para las enzimas responsables de catalizar las transferencias de dióxido de carbono [12].

- Cuando y como añadir biotina

El mosto cervecero debería ser un medio suficiente en la mayoría de las vitaminas, excepto en la biotina. Por este motivo, un suplemento para la mayoría de las fermentaciones debe ser considerado en la fabricación de cerveza. Las fermentaciones con azúcar añadido siempre requieran de vitaminas suplementarias, incluida la biotina.

- Concentraciones ideales

Los requisitos de biotina dependerán de la fuente de nutrientes, el método de elaboración y el resultado deseado. Los requisitos nutricionales son diferentes para cada aplicación, ya sean fermentaciones de mostos de densidad normal, alta y muy alta. La biodisponibilidad de la biotina y las interacciones de los nutrientes individuales también pueden ejercer una influencia.

- Opciones de suplementación con biotina

A) Extractos de levadura

Los extractos de levadura pueden representar un desafío para los técnicos cerveceros debido a la composición física fluctuante de los extractos de levadura y sus efectos en los procesos de fermentación, que pueden ser difíciles de calcular [3]. Es importante seleccionar un extracto de levadura que proceda de un proveedor de confianza que pueda garantizar la consistencia y la calidad.

Información destacada de nuestro I+D:

Los mostos de alta densidad que se han suplementado con extracto de levadura al 0,8% dieron como resultado **un 14% alc. vol. a 14 ° C en solo 5 días**. Contrariamente, los mostos sin dicha suplementación requirieron **hasta 2 semanas para terminar la fermentación**. El aporte de los nutrientes necesarios resultó en un aumento significativo en la producción de biomasa, además de disminuir los tiempos de fermentación y aumentar la concentración de alcohol [13].

B) Autolisados de levadura

Los autolisados de levadura (descritos anteriormente) también son una fuente de vitaminas, incluida la biotina, minerales y otros micronutrientes. La pared celular contiene manoproteínas, las cuales ofrecen una mayor sensación en boca en el producto acabado. Estos compuestos no solo se limitan a bebidas fermentadas especiales, como el *Hard Seltzer*, sino que se pueden utilizar también en la elaboración de cerveza, sidra e hidromieles. No obstante, la combinación de nutrientes proporcionados por los autolisados de levadura es ideal para fermentaciones con alto contenido de azúcar, y bajo contenido de nutrientes, como las bebidas tipo *Hard Seltzer*.

Ácido pantoténico (Vitamina B5): Esencial para evitar sabores desagradables y fermentaciones paradas

Los estudios realizados en el sector vinícola muestran que los desequilibrios entre los niveles de ácido pantoténico y nitrógeno pueden derivar en una mortalidad mayor al 90% de la población de levadura en el inicio de la fermentación, lo que conlleva a una fermentación completamente parada. Los investigadores concluyeron que la muerte de las células de levadura fue provocada por la carencia de un conjunto de micronutrientes, donde se incluye el ácido pantoténico [7] [14].

Por lo que respecta a la elaboración de la cerveza, las deficiencias de pantotenato pueden resultar en un desequilibrio en la biosíntesis de aminoácidos, propiciando una absorción excesiva de iones sulfato y a la consiguiente excreción de sulfuro de hidrógeno (H₂S) [15].

Escenarios de suplementación con ácido pantoténico

- Cepa de levadura

Algunas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* son altamente dependientes del ácido pantoténico, por lo que producirán H₂S en un medio deficiente en este compuesto. La producción de sulfuro de hidrógeno es suprimida por la presencia de L-metionina, pero también es estimulada por otros aminoácidos, aunque estos no tengan ningún efecto sobre el crecimiento [16].

- Sabores extraños en la elaboración de la cerveza

Un mosto deficiente en ácido pantoténico resultará en la presencia de compuestos sulfurados. Varios estudios han demostrado que la suplementación de mosto con 0.01ppm de ácido pantoténico evita la formación de ácido sulfhídrico. La suplementación con esta vitamina también disminuye las concentraciones de dióxido de azufre (SO₂) y acetaldehído, ambos producidos durante la fermentación. En algunas combinaciones específicas de levadura y mosto, hay una deficiencia de pantotenato, conduciendo a una escasez de la Coenzima A (CoA) y resultando en una elevada producción de acetaldehído [17].

- Niveles ideales

El nivel adecuado de pantotenato para un mosto (100% malta) es de 0,45-0,65 mg/L [18].

- Opciones de suplementación con ácido pantoténico: Autolisados de levadura

Los autolisados de levadura pueden proporcionar micronutrientes, incluido el ácido pantoténico, en el proceso de elaboración de la cerveza.

Zinc: El micronutriente imprescindible para obtener fermentaciones óptimas

El zinc es un oligoelemento esencial necesario para la levadura, y que permite obtener una fermentación óptima. Este mineral, es un cofactor enzimático y participa en muchas reacciones enzimáticas, aunque su papel más importante es catalizar la enzima alcohol-deshidrogenasa (ADH), la cual es la responsable en la producción de etanol [19].

Durante la producción de mosto, aproximadamente el 95% del zinc procedente de la malta se pierde con el bagazo. Las deficiencias en zinc pueden provocar fermentaciones paradas y problemas en la floculación de la levadura. La suplementación con niveles adecuados de zinc influirá positivamente en el metabolismo y el rendimiento de la levadura durante la fermentación, dando lugar a [20]:

- Fermentaciones más rápidas
- Mejor floculación de la levadura
- Estimulación de la absorción de maltosa y maltotriosa
- Estimulación de la síntesis de proteínas y el crecimiento de las levaduras.
- Acción protectora sobre varias enzimas
- Mayor estabilidad en la membrana celular

ADVERTENCIA:

¡Un mosto a base de azúcar añadido carece de todos los nutrientes!

Un mosto procedente de 100% malta suele contener suficientes nutrientes para una buena fermentación. No obstante, en un mosto a base de azúcar, típicos del hidromiel o *Hard Seltzer*, habrá una ausencia significativa de los nutrientes esenciales, siendo muy importante y necesario añadir una correcta suplementación para obtener una fermentación óptima.

Escenarios donde se requiere una suplementación adecuada

- El riesgo de encontrar concentraciones bajas de zinc en el mosto (100% malta) es muy alto debido al enlace químico entre el zinc y las proteínas que coagularán durante la ebullición del mosto y el consiguiente reposo en el *whirlpool* [19].
- Las fermentaciones de mostos con azúcar añadido también requerirán de zinc suplementario.
- Durante la cosecha y reaprovechamiento de la levadura, son muy comunes las deficiencias de dicho mineral.

Niveles ideales

Los requerimientos de zinc por parte de la levadura pueden depender de cada cepa, aunque el rango mínimo es de entre 0,15 y 0,30 mg/L. Niveles inferiores a 0,1 ppm pueden provocar fermentaciones paradas y afectar negativamente a la calidad de la cerveza.

Opciones de suplementación

- Sulfato de zinc

El sulfato de zinc ($ZnSO_4$) es una forma común de complementar este mineral. Sin embargo, esta forma es menos biodisponible en comparación con otras y puede terminar desechada junto con la torta (*hot trub*).

- Levadura enriquecida con zinc (ej: *Servomyces*)

El uso de levadura enriquecida con una alta concentración de zinc puede proporcionar dicho mineral de un modo más eficiente en comparación con el uso de sales inorgánicas, debido a su mayor biodisponibilidad. Esta opción, también puede permitir fermentaciones a temperaturas más bajas para obtener un sabor "más limpio".

Magnesio y Calcio: equilibrio para una elaboración óptima

El metabolismo de los azúcares del mosto está muy influenciado por la concentración de ciertos minerales, principalmente el magnesio y el calcio [21].

Las levaduras tienen unos requerimientos muy importantes de magnesio, siendo dicho metal un cofactor enzimático esencial para la función de más de 300 enzimas. El magnesio tiene su rol en [21]:

- División y crecimiento de las células de levadura
- Estructura y función mitocondrial
- Metabolismo respiro-fermentativo
- Respuestas al estrés ambiental, tales como la temperatura y la presión osmótica [21] [22].

El calcio y el magnesio actúan de forma antagónica. Una gran cantidad de calcio en el medio puede suprimir las enzimas que dependen del magnesio [23] [24]. El calcio actúa principalmente de manera extracelular y es esencial para la actividad de la enzima α -amilasa y la precipitación de los iones fosfato, lo que da al calcio un papel importante en el control del pH [22] [25].

Tabla 1. Influencia de la variabilidad del magnesio y el calcio en el rendimiento de la fermentación [24].

Cepa de levadura	Medio	Magnesio (mg/L)	Calcio (mg/L)	Ratio Mg:Ca	Alcohol obtenido (% v/v)	Diferencia
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> DBV 2168	Mosto de vino blanco	67	136	0.5	7.1	0 (control)
		1,217	114	10.7	8.7	+1.6
		47	768	0.06	4.8	-2.3
<i>S. cerevisiae</i> DCLM	Melaza	100	450	0.22	5.6	0 (control)
		190	450	0.42	6.8	+1.2
<i>S. cerevisiae</i> NCYC 1109	Mosto a base de malta (15,5°P / 1062)	225	140	1.6	6.0	0 (control)
		257	710	0.36	5.8	-0.2
		265	1,675	0.16	5.7	-0.3
		280	2,100	0.13	4.8	-1.2
<i>S. cerevisiae</i> DCLM		1,500	10,000	0.15	5.7	0 (control)
		1,500	1,000	1.5	7.7	+2.0

En la tabla 1 se muestran los resultados de las fermentaciones utilizando distintas cepas de levadura y diferentes medios complejos. Aunque *a priori* parece que las diferencias provienen principalmente de la cepa de levadura utilizada y los respectivos medios, en realidad se observa una estimulación de la actividad fermentativa en función de los ratios favorables de Mg:Ca. Se sabe que altos niveles de calcio reducen la absorción celular del magnesio y el bombeo de protones de la membrana célula (actividad ATPasa), la cual es esencial para la translocación de nutrientes y el crecimiento celular. El incremento de la concentración de calcio también puede tener un impacto sobre la floculación prematura de la levadura y en la reducción del pH de los medios, retardando así el crecimiento de la levadura y la fermentación [24].

Escenarios donde se requiere una suplementación adecuada

Una cosecha de cebada de mala calidad puede resultar en mostos deficientes en manganeso, magnesio y calcio. La obtención del mosto a partir de maltas de mala calidad también causa grandes diferencias en el contenido de metales. Esto también puede provocar fermentaciones lentas y una calidad de la levadura deficiente [22].

Algunos medios, tales como el mosto de vino y la melaza, contienen proporciones de magnesio/calcio (Mg:Ca) en las que se favorece enormemente la presencia de calcio, dando lugar a condiciones perjudiciales para el crecimiento de la levadura.

Niveles ideales

El equilibrio ideal depende de la cepa de levadura, el medio y las concentraciones de metales, por lo que es difícil determinar el nivel ideal para todas las condiciones de elaboración. Hay evidencias de que no solo son importantes las cantidades absolutas de calcio y magnesio, sino también la proporción de magnesio/calcio. Hay estudios que han sugerido una proporción óptima sería una relación superior a dos entre dichos compuestos [22].

Dependiendo de la cepa, las células de levadura absorben activamente el magnesio con un requerimiento mínimo de 42,5 ppm (1,7 mM), y niveles por encima de los 25.000 ppm (1 M) se produce la inhibición sobre el crecimiento de la levadura [25].

Se ha demostrado también que la suplementación con 500 ppm de magnesio sobre mostos distintos, uno estándar (12° P) y el otro de alta densidad, dan como resultado [23]:

- Mayor tasa de fermentación
- Mayor absorción de maltosa y maltotriosa
- Mayor producción de etanol, con hasta 5 mL/L extra de etanol, en la fermentación de un mosto de alta densidad cuando se ha añadido magnesio como suplemento

Las células de levadura requieren una concentración mínima de 10-20 ppm de calcio (0,25-0,5 mM), niveles por encima de los 1000 ppm producen la inhibición del crecimiento [25].

Opciones de suplementos de calcio y magnesio

Tanto el agua del grifo como el de manantial pueden contener minerales. Siempre es recomendable analizar el agua antes de elaborar cerveza, para poder crear un perfil que se pueda ajustar a la receta o estilo deseado. Muchos cerveceros eligen usar agua osmotizada para un mejor control sobre el perfil iónico del agua, mediante el uso de sales minerales.

- Pre-acondicionamiento de las células de levadura con mosto rico en magnesio
Una alternativa a la suplementación con mosto es el pre-acondicionamiento de las células de levadura mediante la propagación en un mosto rico en magnesio. Las células ricas en magnesio tienen una mayor productividad de etanol en las fermentaciones posteriores en comparación con los cultivos no acondicionados [23].
- Suplementación con calcio
Cualquier efecto positivo de la suplementación con calcio sobre el crecimiento de la levadura puede verse comprometido por su efecto antagonista sobre la absorción y función de magnesio. La suplementación del mosto con calcio solo puede ser beneficiosa en determinadas circunstancias [23]

CONCLUSIÓN

Una dieta equilibrada y saludable ofrece los mismos beneficios para todos los organismos vivos, incluida la levadura. Con la correcta suplementación, los cerveceros pueden obtener fermentaciones mejoradas, mayor cantidad de levadura producida, aumento de la floculación y, en definitiva, características mejoradas. Por estos mismos motivos, es muy importante proveer a la levadura con una nutrición adecuada para crecer y realizar su función correctamente, por lo que comprender las necesidades de la levadura es un paso muy importante hacia la obtención de productos de alta calidad.

REFERENCIAS

1. World Brewing Academy Lecture: Yeast Nutrition- Walker, Dr. Graeme. (2018). Siebel Institute of Technology.
2. Jacob FF, Michel M, Zarnkow M, Hutzler M & Methner F-J. (March/April 2019) The complexity of yeast extracts and its consequences on the utility in brewing: A review. *BrewingScience*, 72, pp. 50-62.
3. Jacob F, Hutzler M, Michel M & Methner F. (2019) Boosting yeast propagation via yeast extract supplementation. *BrewingScience*. 72. 157-167.
4. Pidocke M, Kreis S, Heldt-Hansen H, Nielsen K & Olsson L. (2009) Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentation with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Applied microbiology and biotechnology*. 84. 453-64.
5. Ferreira IM, Guido LF. (2018) Impact of Wort Amino Acids on Beer Flavour: A Review. *Fermentation*, 4(2):23.
6. O'Connor-Cox ES & Ingledew WM. (1989) Wort Nitrogenous Sources—Their Use by Brewing Yeasts: A Review, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 47:4, 102-108.
7. Ortiz-Julien A & Walker G. Deep Dive into Yeast Nutrition. Lallemand Brewing Presentation. Jan. 28, 2021. Available at: www.youtube.com/watch?v=V3NfZeR05Wc&feature=youtu.be. Accessed Feb. 2, 2021.
8. Stewart GG, Hill A & Lekkas C. (2013) Wort FAN – Its Characteristics and Importance during Fermentation, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 71:4, 179-185.
9. Julien A, Roustan J, Dulau L & Sablayrolles J. (2000). Comparison of nitrogen and oxygen demands of enological yeasts : Technological consequences. *American Journal of Enology and Viticulture*, 51, 215-222.
10. Ingledew WM, Sosulski FW & Magnus CA. (1986) An Assessment of Yeast Foods and Their Utility in Brewing and Enology, *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 44:4, 166-170.
11. Zimmerli B & Schlatter J. (1991) Ethyl carbamate: analytical methodology, occurrence, formation, biological activity and risk assessment. *Mutation research*, 259(3-4), 325–350.
12. Wronska AK, et al. (2020) Exploiting the Diversity of Saccharomycotina Yeasts To Engineer Biotin-Independent Growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*. 86 (12) e00270-20.
13. Casey GP, Magnus CA & Ingledew WM. (1983) High gravity brewing: Nutrient enhanced production of high concentrations of ethanol by brewing yeast. *Biotechnol Lett*, 5, 429–434.

14. Ortiz-Julien A & Raynal C. Custom nutrition for specific wine yeasts in Sauvignon blanc. Lallemand Oenology, Blagnac, France.
15. Walker GM. Yeast physiology and biotechnology. (1998) West Sussex, England. John Wiley & Sons Ltd.
16. Jordan B & Slaughter JC. (1986) Sulphate availability and cysteine desulphydration activity as influences on production of hydrogen sulphide by *Saccharomyces cerevisiae* during growth in a defined glucose-salts medium. Transactions of the British Mycological Society, (87);4:525-531.
17. Boulton C & Quain D. (2006) The Biochemistry of Fermentation. In Brewing Yeast and Fermentation (eds C. Boulton and D. Quain).
18. Annemüller G, Manger HJ & Lietz P. (2014) Die Hefe in der Brauerei: Grundlagen – Technologie – Anlagentechnik (3rd Edition).
19. De Nicola R & Walker GM. (2011) Zinc Interactions with Brewing Yeast: Impact on Fermentation Performance, Journal of the American Society of Brewing Chemists, 69:4, 214-219.
20. Fischborn T. et al. (2004) Servomyces: A biological nutrient. MBAA TQ. 41,366-379.
21. Birch RM, Ciani M & Walker GM. (2003) Magnesium, Calcium and Fermentative Metabolism in Wine Yeasts, Journal of Wine Research, 14:1, 3-15.
22. Bromberg SK, Bower PA, Duncombe GR, et al. (1997) Requirements for zinc, manganese, calcium, and magnesium in wort. Journal of the American Society of Brewing Chemists, 55(3):123-128.
23. Gibson BR. (2011). 125th Anniversary Review: Improvement of Higher Gravity Brewery Fermentation via Wort Enrichment and Supplementation. Journal of the Institute of Brewing, 117: 268-284.
24. Walker GM, Birch RM, Chandrasena G & Maynard AI. (1996) Magnesium, Calcium, and Fermentative Metabolism in Industrial Yeasts, Journal of the American Society of Brewing Chemists, 54:1, 13-18.
25. Rees EMR & Stewart GG. (1997) The Effects Of Increased Magnesium And Calcium Concentrations On Yeast Fermentation Performance In High Gravity Worts. Journal of the Institute of Brewing, 103: 287-291.