

Levaduras y biotransformación:

Utilización de una levadura híbrida natural para liberar el potencial de las interacciones entre el lúpulo y la levadura

por LALLEMAND BREWING

Las levaduras cerveceras son centrales metabólicas que se han adaptado para producir una amplia gama de metabolitos a partir de una gran variedad de sustratos. Muchos de estos metabolitos contribuyen al perfil sensorial característico de los estilos de cerveza históricos y modernos, en particular las IPA y otros estilos con altos índices de lupulado.

Estamos especialmente interesados en la capacidad de diferentes cepas de levadura para liberar compuestos sensorialmente activos a partir de precursores sensorialmente inactivos presentes en el mosto, en concreto terpenos y tioles polifuncionales, que pueden aportar aromas y sabores florales, afrutados y tropicales a la cerveza terminada. Estos atributos sensoriales son clave en el perfil de muchos estilos modernos de IPA.

¿Qué son los terpenos?

Los terpenos son hidrocarburos de cadena insaturada de longitud variable que suelen introducirse en el flujo de mosto o cerveza a través del lúpulo. Éstos también pueden sufrir modificaciones para incorporar distintos grupos funcionales. Comúnmente encontrados en la fracción de aceite esencial de las flores (contenido en el lúpulo en las glándulas de lupulina, ver Figura 1), los más agradables de estos compuestos pueden tener perfiles sensoriales descritos como florales, cítricos y dulces (por ejemplo, geraniol, linalool, beta-citronelol, limoneno). También hay terpenos que tienen características más polarizadas, como "leñoso", pino y resinoso (por ejemplo, cariofileno, pineno y mirceno).

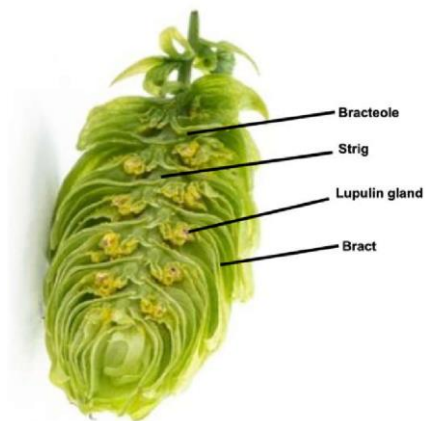


Figura 1. Sección transversal de un lúpulo.

Estos terpenos pueden estar presentes en forma "libre" o "ligada", esta última glicosilada (unida a una molécula de azúcar). Algunas cepas de levadura de cerveza pueden producir la enzima beta-glucosidasa, que puede romper el enlace terpeno-azúcar, liberando una molécula de azúcar para que la consuma la levadura, así como una molécula de terpeno de gran actividad sensorial (ver Figura 2 i Figura 3).

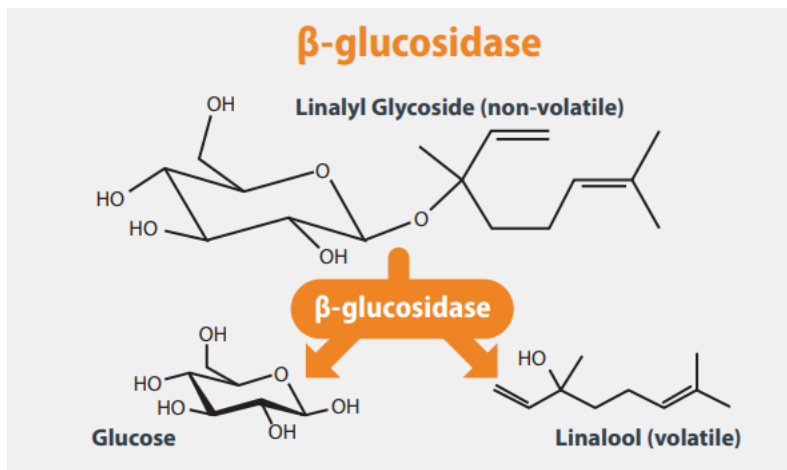


Figura 2. Mecanismo enzimático de la beta-glucosidasa.

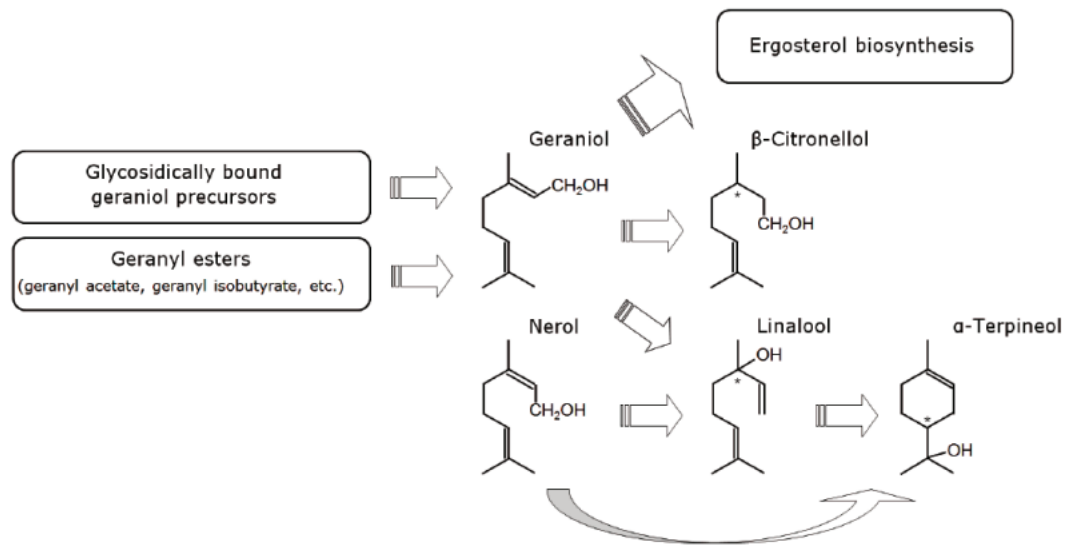


Figura 3. Representación de las múltiples reacciones de biotransformación (Takoi, 2017)

Las levaduras varían en la cantidad de enzima beta-glucosidasa que pueden crear y, por tanto, en el potencial liberador de terpenos. Nos interesan estos compuestos debido a su baja concentración necesaria para la actividad sensorial. Por ejemplo, el umbral sensorial para el geraniol es de 100-200 $\mu\text{g/L}$ (Instituto Siebel) y se ha informado que es tan bajo como 6 $\mu\text{g/L}$ ¹; en comparación, el acetaldehído es de 10 000-20 000 $\mu\text{g/L}$. Es importante destacar que los terpenos también contribuyen a la intensidad general del lúpulo y a la capacidad de potenciar la percepción de otros atributos sensoriales positivos, como el "tropical" de los tioles².

¿Qué son los tioles?

En términos químicos, un tiol polifuncional (o simplemente tiol) es una molécula que contiene un grupo -SH terminal. Lo más probable es que los cerveceros ya estén familiarizados con al menos un tiol, el 3-metil-2-buten-1-tiol (3MBT), que es el responsable del sabor desagradable de las cervezas ligeras.

Muchos tioles tienen olores extraordinariamente fuertes que van desde el ajo, el sudor y la cebolla hasta las frutas tropicales, el vino y los cítricos. Debido a sus impactantes aromas, a menudo se utilizan como odorantes; por ejemplo, el olor del gas natural se añade en forma del tiol etanotiol. Los tioles tienen un umbral sensorial increíblemente bajo, en la región de los nanogramos por litro. La razón por la que se añade etanotiol al gas es que podemos olerlo a niveles cien millones de veces inferiores a los del etanol. No es de extrañar, pues, que si se crean

demasiados tioles libres se puedan obtener algunas características más indeseables, como frutas vegetales, sudorosas, gomosas y demasiado maduras en la cerveza.

Al igual que los terpenos, los tioles pueden estar presentes en dos formas: libres (aromáticos) o moléculas precursoras unidas (inodoras). Para los cerveceros, el reto fundamental es liberar el tiol ligado a su forma libre. En la *S. cerevisiae* no modificada genéticamente, se cree que la enzima β -liasa producida por el gen IRC7 puede escindir un pequeño porcentaje de los tioles unidos a la cisteína, liberándolos potencialmente para su liberación en la cerveza (ver Figura 4). Los tioles ligados al glutatión también pueden liberarse, pero normalmente con menor eficacia que los aductos de Cys³. Sin embargo, dado que los tioles unidos al glutatión suelen constituir una reserva inicial mayor en la malta y el lúpulo, siguen siendo de gran interés.

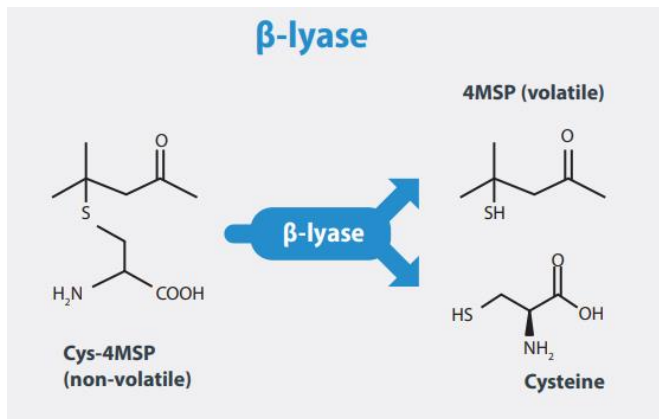


Figura 4. Mecanismo enzimático de la β -liasa.

Optimización de los compuestos responsables de los aromas de la cerveza

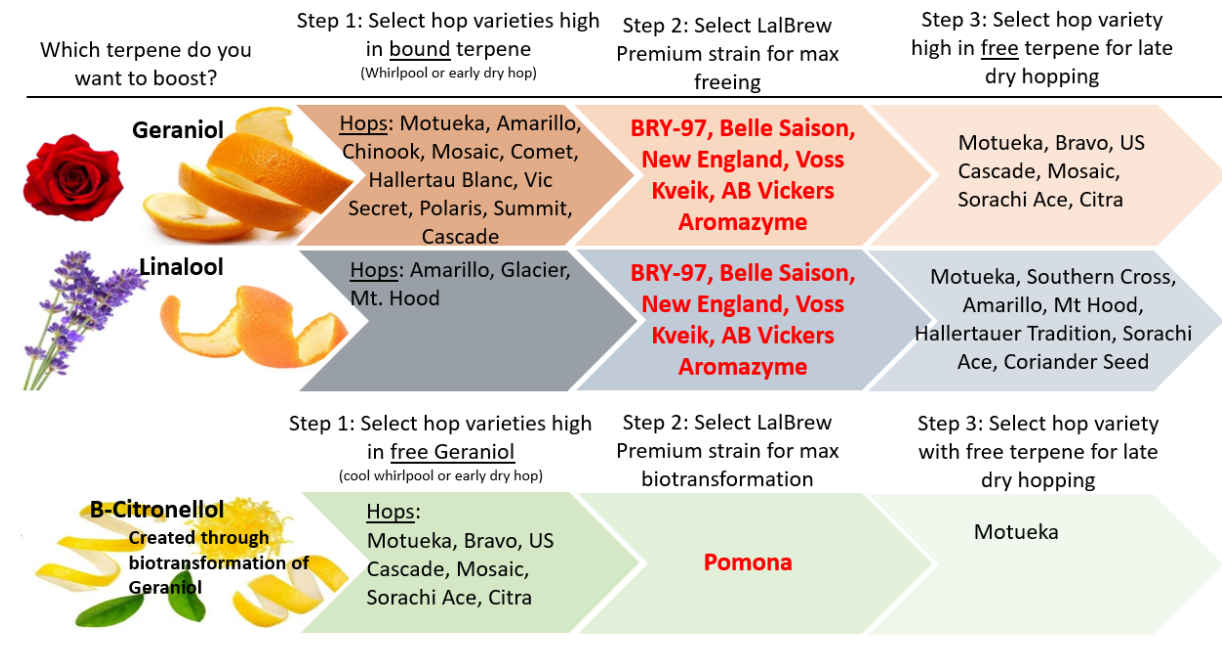
En su forma más simple, los cerveceros deberían seleccionar una cepa de levadura con un buen potencial para liberar terpenos o tioles ligados y cargar el mosto con sus formas ligadas derivadas del lúpulo.

El lúpulo puede introducirse mediante un uso intensivo en la producción de mosto o mediante lupulización en seco temprana. El objetivo es que estos precursores estén disponibles para la levadura en el momento o justo después del pico de recuento celular para la máxima liberación posible. La complicación es que los terpenos y tioles liberados son volátiles, por lo que cuanto antes se creen, mayor será el potencial de depuración por fermentación activa. Tenga en cuenta también que la beta-glucosidasa como enzima es reprimida por el azúcar simple (glucosa) en el mosto, por lo que un mosto con mayores cantidades de azúcar simple puede ser menos eficaz en la liberación potencial de terpenos.

El siguiente diagrama de flujo ofrece una guía práctica para maximizar la liberación de terpenos y la expresión final en su cerveza. Además de la liberación de terpenos ligados, también existen

pruebas de la creación de novo de terpenos en las fermentaciones, y de la conversión de geraniol/linalool en beta-citronellol, que se percibe como un agradable cítrico^{4,5}.

How to boost terpenes in your beer flowchart – ingredient selection



La selección de la levadura desempeña un papel clave en la liberación de tioles, y algunos estudios científicos recientes demuestran que la liberación de tioles ligados por las cepas de levadura es compleja y no se conoce del todo bien. Se descubrió que, en un mosto de 12°P elaborado con malta Pilsner al 100 % y lupulizado en tetera con una cantidad moderada de Cascade (origen EUA), diferentes levaduras liberaban diferentes cantidades y tipos de tioles ligados⁶.

Este estudio incluyó muchas cepas de levadura LalBrew Premium, y esta información se ha incorporado al diagrama de flujo de selección de ingredientes que figura a continuación. Este diagrama puede utilizarse como herramienta para adaptar la selección de levadura y lúpulo con el fin de lograr un perfil de tioles y unos resultados sensoriales específicos en la cerveza terminada:

How to boost thiols in your beer flowchart – ingredient selection



Ahora que ya sabemos qué son los terpenos y los tioles, ¿qué combinaciones de lúpulo y levadura debería utilizar un cervecero en una cerveza? La tabla 1 resume algunos de los compuestos de interés, en qué variedades de lúpulo pueden encontrarse en altas concentraciones y qué levadura puede utilizarse para liberar su potencial. Junto con los diagramas de flujo anteriores, puede utilizarse como herramienta para adaptar las recetas en función de su potencial de biotransformación.

Tabla 1

	High Free	High Bound	LalBrew Premium strains with potential for max freeing	Hop Reference
Thiols				
3SH	Apollo, Galaxy, Simcoe, Citra, Mosaic,	<u>Hops</u> : Motueka, Polaris, Amarillo, Saaz, Citra, Hallertau Blanc, Barbe Rouge, Cascade <u>Malt</u> : Pilsner/lightly kilned base malt	Diamond, Nottingham, Farmhouse	6, 7, 8
3SHA (yeast-esterified 3SH)	None	None	Farmhouse, Nottingham	9
4MSP	Nelson Sauvín, Apollo, Citra, Galaxy, Mosaic, Simcoe	Nelson Sauvín, Aramis, Strisselspalt, Mandarina Bavaria, Simcoe	Voss, Nottingham, Diamond	10, 11
3S4MP	Nelson Sauvín, Apollo, Ekuanot, Hallertau Blanc, Mosaic	Hallertau Blanc	Voss, Nottingham, Verdant	12
Terpenes				
Geraniol	Motueka, Bravo, US Cascade, Mosaic, Sorachi Ace, Citra	Motueka, Amarillo, Chinook, Mosaic, Comet, Hallertau Blanc, Vic Secret, Polaris, Summit	BRY-97, Belle Saison, New England, Voss Kveik, AB Vickers Aromazyme	13
Linalool	Motueka, Southern Cross, Amarillo, Mt Hood, Hallertauer Tradition, Sorachi Ace	Amarillo, Glacier, Mt. Hood	BRY-97, Belle Saison, New England, Voss Kveik, AB Vickers Aromazyme	13

Una Nueva Levadura Híbrida IPA - LalBrew® Pomona™

Con el objetivo de producir una levadura comercial única en forma seca activa con mayores capacidades de biotransformación, Lallemand se ha asociado con Escarpment Labs para lanzar LalBrew® Pomona. Esta cepa de levadura híbrida ha sido creada mediante una combinación de técnicas de cría y evolución adaptativa de laboratorio para poseer un alto potencial de

biotransformación, resaltando las notas de fruta de hueso y cítricos del lúpulo. Algunas de las principales características de esta levadura, a continuación:

- Levadura para estilos tipo IPA muy versátil con notas de melocotón, cítricos y frutas tropicales
- Alto potencial de biotransformación resalta las notas de fruta de hueso y cítricos del lúpulo
- Haze-positivo para la formación de una turbidez estable
- Excelente eficacia en la fermentación y tolerancia al alcohol

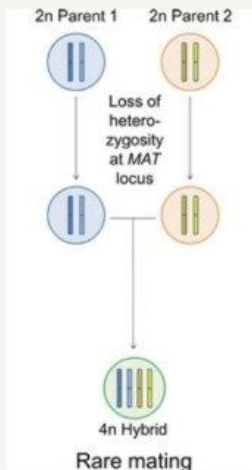
El equipo de microbiólogos de Escarpment Lab utilizó técnicas avanzadas de obtención de levaduras para cruzar una cepa muy aromática con otra robusta y fiable.

A continuación, utilizaron un proceso denominado Evolución Adaptativa en Laboratorio para desarrollar una cepa que utilizara las condiciones de fermentación únicas de las IPA, mejorando especialmente la biotransformación, la turbidez y la tolerancia al alcohol. En el diagrama 1, a continuación, se presenta un resumen de este proceso:

Diagrama 1

Strain Design Step 1 - Parental Hybrid

- Developed using rare mating technique of yeast breeding
- Sterling x Cerberus hybrid
- Sterling sporulated first to make 2n spore clone
- Resulting hybrid is tetraploid



Parent 1: Sterling

- Scottish/British genetic background
- Tetraploid
- Very efficient fermentation, low aroma formation

Parent 2: Cerberus

- “Beer 2” genetic background
- STA1 positive (diastatic), POF-
- Diploid
- Excellent aroma formation

Consideraciones sobre el proceso de fermentación

El proceso de fermentación es otro aspecto clave que los cerveceros deben tener en cuenta. El ajuste del proceso implica considerar qué forma de tiores añade cada lúpulo y en qué punto del proceso se utilizan mejor para su retención y máximo impacto en la cerveza final. Véase la tabla 2 como referencia.

	High Free	High Bound	LalBrew Premium strains with potential for max freeing	Hop Reference
Thiols				
3SH	Apollo, Galaxy, Simcoe, Citra, Mosaic,	<u>Hops</u> : Motueka, Polaris, Amarillo, Saaz, Citra, Hallertau Blanc, Barbe Rouge, Cascade <u>Malt</u> : Pilsner/lightly kilned base malt	Diamond, Nottingham, Farmhouse	6, 7, 8
3SHA (yeast-esterified 3SH)	None	None	Farmhouse, Nottingham	9
4MSP	Nelson Sauvín, Apollo, Citra, Galaxy, Mosaic, Simcoe	Nelson Sauvín, Aramis, Strisselspalt, Mandarinina Bavaria, Simcoe	Voss, Nottingham, Diamond	10, 11
3S4MP	Nelson Sauvín, Apollo, Ekuanot, Hallertau Blanc, Mosaic	Hallertau Blanc	Voss, Nottingham, Verdant	12
Terpenes				
Geraniol	Motueka, Bravo, US Cascade, Mosaic, Sorachi Ace, Citra	Motueka, Amarillo, Chinook, Mosaic, Comet, Hallertau Blanc, Vic Secret, Polaris, Summit	BRY-97, Belle Saison, New England, Voss Kveik, AB Vickers Aromazyme	13
Linalool	Motueka, Southern Cross, Amarillo, Mt Hood, Hallertauer Tradition, Sorachi Ace	Amarillo, Glacier, Mt. Hood	BRY-97, Belle Saison, New England, Voss Kveik, AB Vickers Aromazyme	13

Por último, dado que los compuestos tiólicos se liberan intracelularmente, se recomienda un periodo de maduración post-fermentativa con la levadura aún en contacto con la cerveza para

liberar los tioles libres de nuevo en la cerveza terminada (de 3 a 5 días post-fermentación a >4° C parece ser lo óptimo^{3,7}). Los efectos de enmascaramiento de las cepas que producen carácter fenólico (POF+) y la adsorción de aceites de lúpulo en las células de levadura y su posterior eliminación de la cerveza pueden causar cierta confusión. La parte fundamental de los tioles está unida al glutatión y no a la cisteína⁸. La dificultad para los cerveceros es que, aunque teóricamente existe una reserva abundante de tioles, como ya se ha mencionado, es difícil acceder a ellos o "liberarlos" debido a los pasos enzimáticos adicionales necesarios en la conversión del conjugado glutatión-tiol en tioles libres.

Principales conclusiones:

1. Para maximizar la biotransformación, considera un enfoque holístico:
 - a. La selección del lúpulo y la levadura, así como el momento, serán factores clave.
2. Los terpenos libres ofrecen una fuerte columna vertebral aromática para potenciar el aroma general.
3. Los tioles son difíciles de liberar y cuantificar en la cerveza.
 - a. Gran parte de la investigación en tioles procede del vino, la investigación en cerveza/matriz del mosto cervecero está en curso.
 - b. Muchos lúpulos contienen tanto la forma libre como la forma ligada de los tioles
 - i. La levadura, la selección del lúpulo y las consideraciones relativas al proceso ayudarán a liberar los tioles ligados para obtener resultados sensoriales.
4. La sensorialidad de los compuestos del lúpulo es muy compleja y se hace más interesante por la interacción entre terpenos, tioles, lactonas, ésteres y otros compuestos de la cerveza.

Referencias

- 1 Takoi, K., Itoga, Y., Koie, K., Kosugi, T., Shimase, M., Katayama, Y., ... & Watari, J. (2010). The contribution of geraniol metabolism to the citrus flavour of beer: synergy of geraniol and β -citronellol under coexistence with excess linalool. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(3), 251-260.
- 2 Takoi, K., Itoga, Y., Takayanagi, J., Matsumoto, I., & Nakayama, Y. (2016). Control of hop aroma impression of beer with blend-hopping using geraniol-rich hop and new hypothesis of synergy among hop-derived flavour compounds. *Brew. Sci*, 69, 85-93.
- 3 Chenot, C., Thibault de Chanvalon, E., Janssens, P., & Collin, S. (2021). Modulation of the sulfanylalkyl acetate/alcohol ratio and free thiol release from cysteinylated and/or glutathionylated sulfanylalkyl alcohols in beer under different fermentation conditions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 69(21), 6005-6012.
- 4 Haslbeck, K., Bub, S., von Kamp, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., & Coelhan, M. (2018). La influencia de las cepas de levadura cervecera en los alcoholes monoterpénicos y ésteres que contribuyen al sabor cítrico de la cerveza. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 403-415.

5 Roberts, R., Khomenko, I., Eyres, G. T., Bremer, P., Silcock, P., Betta, E., & Biasioli, F. (2023). Investigation of Geraniol Biotransformation by Commercial *Saccharomyces* Yeast Strains by Two Headspace Techniques: Solid-Phase Microextraction Gas Chromatography/Mass Spectrometry (SPME-GC/MS) and Proton Transfer Reaction-Time of Flight-Mass Spectrometry (PTR-ToF-MS). *Fermentation*, 9(3), 294.

6 Molitor, R. W., Fischborn, T., Dagan, L., & Shellhammer, T. H. (2023). Examining How the Fermentation Medium Influences Thiol Expression and Its Perceived Aroma in Commercial Brewing Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(5), 2493-2502.

7 Holt, S., Miks, M. H., de Carvalho, B. T., Foulquie-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). La biología molecular de los aromas afrutados y florales en la cerveza y otras bebidas alcohólicas. *FEMS Microbiology Reviews*, 43(3), 193-222.

8 Silva Guimarães Ferreira, Carlos Antonio; Collin, Sonia. *Free and bound polyfunctional thiols and terpenols in dual-purpose hop varieties. First evidence of glutathione S-conjugates*. In: Thomas H. Shellhammer, Scott R. Lafontaine, Daniel C. Sharp, and Peter H. Wolfe, *Hop Flavor and Aroma - Proceedings of the 2nd International Brewers Symposium, ASBC 2020*, p. 83-92

Referencias del lúpulo

1 Bonnaffoux, H., Roland, A., Schneider, R., & Cavelier, F. (2021). Spotlight on release mechanisms of volatile thiols in beverages. *Food Chemistry*, 339, 127628.

2 Holt, S., Miks, M. H., de Carvalho, B. T., Foulquié-Moreno, M. R., & Thevelein, J. M. (2019). La biología molecular de los aromas afrutados y florales en la cerveza y otras bebidas alcohólicas. *FEMS microbiology reviews*, 43(3), 193-222.

3 Fischer, A., Grab, W., & Schieberle, P. (2008). Characterisation of the most odour-active compounds in a peel oil extract from Pontianak oranges (*Citrus nobilis* var. *Lour. microcarpa* Hassk.). *European Food Research and Technology*, 227, 735-744.

4 Takoi, K., Itoga, Y., Koie, K., Kosugi, T., Shimase, M., Katayama, Y., ... & Watari, J. (2010). The contribution of geraniol metabolism to the citrus flavour of beer: synergy of geraniol and β -citronellol under coexistence with excess linalool. *Journal of the Institute of Brewing*, 116(3), 251-260.

5 Haslbeck, K., Bub, S., von Kamp, K., Michel, M., Zarnkow, M., Hutzler, M., & Coelhan, M. (2018). La influencia de las cepas de levadura cervecera en los alcoholes monoterpénicos y ésteres que contribuyen al sabor cítrico de la cerveza. *Journal of the Institute of Brewing*, 124(4), 403-415.

6 Chenot, C., Collin, S., Suc, L., & Roland, A. (2024). Unusual Profile of Thiol Precursors in Special Malts: First Evidence of Chemical Glutathione- γ GluCys-and CysGly-/Cys-Conversions. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 82(1), 15-22.

7 Chenot, C., Robiette, R., & Collin, S. (2019). Primera evidencia de los conjugados de cisteína y glutatión del 3-sulfanilpentan-1-ol en lúpulo (*Humulus lupulus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 67(14), 4002-4010.

8 Takoi, K. (2019). Variedades de "lúpulo de sabor" y diversos compuestos de sabor que contribuyen a sus "aromas varietales": Una revisión. *Tech. Quart. Master Brew. Assoc. Am*, 56, 113-123.

9 Molitor, R. W., Fischborn, T., Dagan, L., & Shellhammer, T. H. (2023). Examining How the Fermentation Medium Influences Thiol Expression and Its Perceived Aroma in Commercial Brewing Yeast Strains. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 71(5), 2493-2502.

10 Kankolongo Cibaka, M. L., Gros, J., Nizet, S., & Collin, S. (2015). Quantitation of selected terpenoids and mercaptans in the dual-purpose hop varieties Amarillo, Citra, Hallertau Blanc, Mosaic, and Sorachi Ace. *Journal of agricultural and food chemistry*, 63(11), 3022-3030.

11 Roland, A., Viel, C., Reillon, F., Delpech, S., Boivin, P., Schneider, R., & Dagan, L. (2016). Primera identificación y cuantificación de precursores glutatiónilados y cisteinilados de 3-mercaptohexan-1-ol y 4-metil-4-mercaptopentan-2-ona en lúpulo (*Humulus lupulus*). *Flavour and Fragrance Journal*, 31(6), 455-463.

12 Kankolongo Cibaka, M. L., Decourrière, L., Lorenzo-Alonso, C. J., Bodart, E., Robiette, R., & Collin, S. (2016). 3-Sulfanyl-4-methylpentan-1-ol in dry-hopped beers: first evidence of glutathione s-conjugates in hop (*Humulus lupulus* L.). *Journal of agricultural and food chemistry*, 64(45), 8572-8582.

13 Takoi, K., Itoga, Y., Koie, K., Takayanagi, J., Kaneko, T., Watanabe, T., ... & Nomura, M. (2017). Análisis sistemático del comportamiento de los alcoholes monoterpénicos derivados del lúpulo durante la fermentación y nueva clasificación del lúpulo aromatizante rico en geraniol. *BrewingScience*, 70, 177-186.

Diagramas 1, 2

Fuente: Escarpment Labs, utilizado con su permiso