



UNIVERSIDAD PERUANA  
**CAYETANO HEREDIA**  
FACULTAD DE CIENCIAS E INGENIERÍA

**OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN LA INDUSTRIA  
CERVECERA MEDIANTE EL SECUENCIAMIENTO COMPLETO DEL  
GENOMA DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE***

**Trabajo de Suficiencia Profesional para optar el Título Profesional de  
Licenciado en Biología**

**Autor:**

Sebastian Luca Morales-Bermudez Espinel

**Asesor:**

Prof. Lidio Edgar Neyra Valdez

Lima – Perú

2024

# OPTIMIZACIÓN DE LA PRODUCCIÓN DE ETANOL EN LA INDUSTRIA CERVECERA MEDIANTE EL SECUENCIAMIENTO COMPLETO DEL GENOMA DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE

## ORIGINALITY REPORT

12%

SIMILARITY INDEX

11%

INTERNET SOURCES

5%

PUBLICATIONS

4%

STUDENT PAPERS

## PRIMARY SOURCES

1

[pubmed.ncbi.nlm.nih.gov](http://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov)

Internet Source

3%

2

[www.micetcraft.com](http://www.micetcraft.com)

Internet Source

2%

3

[issuu.com](http://issuu.com)

Internet Source

1%

4

Submitted to Universidad del Valle de Guatemala

Student Paper

<1%

5

[www.researchgate.net](http://www.researchgate.net)

Internet Source

<1%

6

[www.semanticscholar.org](http://www.semanticscholar.org)

Internet Source

<1%

7

[es.unionpedia.org](http://es.unionpedia.org)

Internet Source

<1%

8

[onomazein.lettras.uc.cl](http://onomazein.lettras.uc.cl)

Internet Source

<1%

## ÍNDICE

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	3
2. METODOLOGÍA.....	11
3. RESULTADOS.....	13
4. DISCUSIÓN.....	22
5. CONCLUSIONES.....	24
6. RECOMENDACIONES.....	25
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	26

## RESUMEN

El estudio se enfoca en la implementación del secuenciamiento completo del genoma de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en las industrias cerveceras con el objetivo de optimizar la producción de etanol. A través de una exhaustiva revisión bibliográfica, se identificaron genes clave asociados con la producción de etanol, como ADH1, ADH2, PDC1 y HXT1, así como tecnologías como CRISPR-Cas9 y "Genome Shuffling" para modificar e identificar estos genes. Se destacó la importancia de realizar estudios adicionales para validar las variaciones genéticas identificadas y comprender su impacto real en la producción de etanol. Se resalta la necesidad de considerar factores externos que influyen en la fermentación alcohólica, como la composición del sustrato y la presencia de contaminantes microbianos. En conclusión, el secuenciamiento completo del genoma se presenta como una técnica prometedora para desarrollar cepas mejoradas de levadura y optimizar la producción de etanol en la industria cervecera. A través de la recopilación de datos de 11 estudios relevantes de diversas ubicaciones geográficas, se proporciona una visión global del estado actual de la investigación en este campo. Se resalta la necesidad de ampliar los estudios para garantizar la validez y aplicabilidad de los resultados, así como la importancia de abordar una gama más amplia de variables en la optimización de la producción de etanol.

Palabras clave: *Saccharomyces cerevisiae*, Secuenciamiento Genoma completo, Fermentación y Producción de etanol.

## ABSTRACT

The study focuses on the implementation of whole-genome sequencing of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* in the brewing industries with the aim of optimizing ethanol production. Through an exhaustive literature review, key genes associated with ethanol production, such as ADH1, ADH2, PDC1, and HXT1, were identified, along with technologies like CRISPR-Cas9 and genome shuffling for modifying and identifying these genes. The importance of conducting additional studies to validate the identified genetic variations and understand their real impact on ethanol production was highlighted. The need to consider external factors influencing alcoholic fermentation, such as substrate composition and the presence of microbial contaminants, was emphasized. In conclusion, whole-genome sequencing is presented as a promising technique for developing improved yeast strains and optimizing ethanol production in the brewing industry. By compiling data from 11 relevant studies from various geographic locations, a global view of the current state of research in this field is provided. The need to expand studies to ensure the validity and applicability of the results, as well as the importance of addressing a broader range of variables in optimizing ethanol production, is highlighted.

Keywords: *Saccharomyces cerevisiae*, Whole-genome sequencing, Fermentation, Ethanol production.

## 1. INTRODUCCIÓN

La fermentación es considerada la biotecnología más antigua y económica descubierta por la humanidad, la cual cuenta con rastros que se remontan a la prehistoria y ha evolucionado a lo largo de los siglos (1). En la actualidad, con la adquisición de nuevas herramientas tecnológicas y conocimientos, hemos logrado revisitar nuestra historia y revitalizar el interés por las biotecnologías ancestrales. Esto posibilita dotar a la fermentación, una de las biotecnologías más antiguas, con nuevas características y mejoras

Un campo destacado de la aplicación de la fermentación es la elaboración de bebidas alcohólicas mediante la acción de levaduras, especialmente *Saccharomyces cerevisiae*, sobre los azúcares presentes en diferentes materias primas como cereales, plantas ricas en sacarosa o frutas.

Esta interacción entre levaduras y azúcares ha sido el núcleo de la industria de las bebidas alcohólicas, que ha reinventado la levadura a su conveniencia para obtener productos únicos y deseados. *Saccharomyces cerevisiae* se destaca como una de las levaduras más predominantes en esta industria (1). En presencia de azúcares y otros nutrientes esenciales, como aminoácidos, minerales y vitaminas, esta levadura realiza el metabolismo fermentativo para producir etanol y dióxido de carbono, que son los metabolitos principales de la fermentación (1). Este proceso tiene lugar mientras las células de levadura luchan por obtener energía y regenerar el coenzima NAD<sup>+</sup> en condiciones anaeróbicas. Además de estos metabolitos primarios, en la fermentación se generan diversos metabolitos secundarios, como alcoholes superiores, ésteres y compuestos de azufre, que desempeñan un papel crucial en la formación del sabor y aroma característicos de las bebidas.

La importancia de las levaduras, especialmente de *S. cerevisiae*, radica en su papel vital

al proporcionar el contenido de alcohol y los perfiles sensoriales que caracterizan a las bebidas como cerveza, vino, whisky, ron y brandy. Para comprender a fondo los mecanismos genéticos y metabólicos que rigen la fermentación en estas levaduras, se ha llevado a cabo una serie de investigaciones significativas, entre las que se destacan los trabajos de Reiter T et al (2), Davydenko S et al (3), Deed RC et al (4) y Varela C et al (5).

Reiter T et al (2) se centraron en el estudio de los patrones de expresión génica de *S. cerevisiae* durante la fermentación del vino Pinot Noir a una escala industrialmente relevante, utilizando avanzadas técnicas como la secuenciación de ARN (RNA-seq) y el análisis bioinformático. Por otro lado, Davydenko S et al (3) emplearon un enfoque diferente, realizando un análisis proteómico para identificar genes específicos relacionados con la panificación, la elaboración de cervezas y la producción de etanol entre las cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Reiter T et al (2) identificaron genes clave involucrados en la glicólisis y la fermentación, como HXT3, PFK1, PFK2 y ADH1-5, revelando los mecanismos moleculares que regulan estos procesos. En el caso de Davydenko S et al (3), encontraron varios genes de alcohol deshidrogenasa (ADH1, ADH3, ADH4, ADH5 y SFA1) que desempeñan un papel crucial en la conversión de acetaldehído a etanol durante la fermentación de glucosa. Este enfoque subraya la importancia de comprender la base genética de las cepas de levadura utilizadas en diversas industrias para mejorar su rendimiento y eficiencia. Ambas investigaciones convergieron en la importancia de los genes de alcohol deshidrogenasa (ADH1-5) durante el proceso de fermentación.

La investigación liderada por Deed RC et al (4) exploró la relación entre la temperatura de fermentación y los genes que afectan la cinética de fermentación. Estudiaron 121

descendientes F1 obtenidos de un cruce entre cepas haploides, identificando un locus de rasgo cuantitativo genéticamente vinculado a la tasa de fermentación. En este locus, encontraron genes como FLO1 y SWH1 vinculados a la mejora de la producción de etanol en condiciones industriales, incluida la resistencia mejorada a factores como el etanol y el ácido acético.

Varela C et al (5) se enfocaron en estrategias de modificación génica para crear levaduras de vino con bajo contenido de alcohol, centrándose en la cepa *Saccharomyces cerevisiae* AWRI1631. A través de la manipulación de la expresión génica y la regulación a la baja de genes vinculados a la producción de etanol, identificaron genes como MDH2 y FRD1 cuya expresión mejorada afectó la formación de ácidos orgánicos y redujo marginalmente la producción de etanol.

En la actualidad, uno de los métodos más empleados para obtener levaduras con características deseadas es el genome shuffling. Este enfoque comprende tanto la reproducción sexual como asexual de la levadura, evitando la fusión de protoplastos mediada por glicol de polietileno (9).

Tanto la investigación de Hou L (9), como la de Tao X et al (10) utilizaron este método en condiciones de fermentación de alta gravedad (VHG). Hou L (9) aplicó este enfoque con el propósito de mejorar la producción de etanol en cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae*, cuyas propiedades de fermentación resultan difíciles de alterar con métodos tradicionales debido a la influencia de múltiples genes. Tras llevar a cabo tres rondas de "genome shuffling", se obtuvo la cepa de mejor rendimiento, S3-10, la cual demostró una mejora significativa en la tolerancia al estrés de etanol, glucosa y calor. El ciclo de fermentación de S3-10 se acortó, y el rendimiento de etanol aumentó hasta un 10.96% en comparación con el control en fermentaciones de alta gravedad (VHG).

En el estudio de Tao X et al (10), el objetivo fue utilizar métodos de combinación de

ingeniería metabólica y recombinación genética para crear cepas de levadura destinadas a la fermentación de alta gravedad (VHG). En la cepa parental Z5, eliminaron mediante ingeniería genética el gen GPD2, que codifica glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, con el fin de obtener una cepa con menor rendimiento de glicerol y menor productividad de etanol. Como resultado, obtuvieron la cepa SZ3-1, la cual produjo menos glicerol y aumentó el rendimiento de etanol hasta un 8% en comparación con la cepa parental Z5. Sin embargo, tanto en el caso de Hou L, como en el estudio de Tao X et al, se identificó una brecha en la investigación: ninguna evaluó las variaciones genéticas que pudieron haber ocurrido en las cepas S3-10 o SZ3-1 con respecto a la cepa control/parental. Estas limitaciones forman la base de la problemática que abordaremos en este trabajo.

El problema central que motiva este trabajo de investigación radica en las limitaciones observadas en estudios previos, especialmente en la falta de evidencia que demuestre las variaciones genéticas entre cepas mejoradas y sus cepas parentales. Esta ausencia de información genética dificulta la comprensión de la relación entre material genético y mecanismos como la producción de etanol y resistencia a factores de estrés

La importancia de abordar este problema recae en la necesidad de la industria de bebidas alcohólicas como la cervecera, que busca constantemente la optimización de procesos y el aumento de eficiencia en su producción. La elaboración de alta gravedad se propone como un método para lograr estos objetivos. Esta técnica, que se originó en la década de 1960 en Estados Unidos, se ha introducido progresivamente en cervecerías de todo el mundo durante los últimos 40 años (11). Consiste en utilizar mosto (cerveza no fermentada) a concentraciones más altas de lo normal, lo que implica una dilución posterior con agua tratada, generalmente desoxigenada, hasta obtener la gravedad o la fuerza alcohólica deseada.

El término "High Gravity Brewing" se refiere al proceso de preparar un tipo de mosto

fuerte con una alta gravedad original (OG) con la intención de producir una cerveza de alto contenido de alcohol. Generalmente, se considera cerveza de alta gravedad aquella con una OG superior a 1.075. La OG es una medida de sustancias fermentables y no fermentables en el mosto antes de la fermentación, que se mide después de la ebullición inicial y antes de agregar la levadura. Posteriormente, se utiliza junto con la lectura de la gravedad final para calcular el contenido de alcohol. Una OG más alta significa que hay mucha "comida" en el mosto para que la levadura se alimente, produciendo distintos tipos de alcoholes. Bajo condiciones ambientales y de cuidado adecuadas, ciertas cepas de levadura en mosto de alta gravedad específica pueden producir una gran cantidad de alcohol, de ahí que "alta gravedad específica" y "alto contenido de alcohol" sean sinónimos (12).

Una ventaja de esta técnica es su capacidad para satisfacer una alta demanda de producción cuando la capacidad de elaboración disponible es limitada, sin necesidad de ampliar las instalaciones existentes de elaboración, fermentación y almacenamiento. En este sentido, un cervecero puede elaborar un mosto de alta gravedad que se convertirá en una cerveza base de alto contenido alcohólico para utilizarse como un concentrado. En los últimos pasos de acabado, el cervecero agrega agua de elaboración desoxigenada para diluir la cerveza de alto contenido alcohólico a una fuerza normal. Procesar un volumen menor de mosto y cerveza, manteniendo al mismo tiempo una producción líquida constante, también resulta en ganancias de eficiencia en el uso de energía, mano de obra, limpieza y costos de efluentes (13).

La elaboración de cerveza de alta gravedad se realiza para producir estilos de cerveza con alto contenido alcohólico, como las "Barley" y "Doppelbocks", una bock alemana, una tripel belga o una barley wine británica, que dependen de toda la gravedad obtenida

del mosto. Estos tipos de cervezas son estilos especializados y generalmente no se producen en grandes cantidades. Algunos estilos comunes de cerveza de alta gravedad incluyen “Barley Wine”, “Imperial Porter” / “Imperial Stout”, “Scotch Ale” / “Wee Heavy”, “Imperial IPA”, “Wheat Wine Ale”, Cerveza envejecida en barriles y “Belgian-Style Golden Strong Ale” (14).

Aunque algunas fuentes indican que la elaboración de alta gravedad también ofrece flexibilidad en el tipo de cerveza que se puede ofrecer para la venta, permitiendo la producción de varios productos diferentes con extractos originales y niveles de alcohol diversos a partir de un solo "stock" de cerveza de alta gravedad, sin la necesidad de mantener un inventario separado para cada tipo de cerveza. Además, con la aparición de extractos de lúpulo, extractos de malta, jarabes y colorantes naturales producidos con dióxido de carbono y etanol como solventes, la gama potencial de tipos de productos comercializables se expande aún más (11).

Lamentablemente, el éxito de esta técnica está estrictamente ligada a la disponibilidad de cepas de levadura capaces de producir altas cantidades de etanol de forma eficiente y a su tolerancia al alcohol.

Desde un punto de vista práctico, la obtención de levaduras con características mejoradas, como la eficiencia en la producción de etanol, es esencial para maximizar los beneficios de la técnica de alta gravedad. Aunque el entrecruzamiento se presenta como una opción, abordar la problemática desde una perspectiva genética puede proporcionar resultados más directos al identificar el genotipo necesario para la característica deseada.

Una de las soluciones para resolver esta problemática es el uso del secuenciamiento completo del genoma (SCG). La Secuenciación Completa del Genoma (SCG) es una técnica de biología molecular utilizada para determinar la secuencia completa de ADN

del genoma de un organismo (15). Esto incluye todos los genes del organismo, así como las regiones no codificantes del ADN que pueden desempeñar un papel en la regulación génica y otros procesos celulares (17). La SCG ofrece una perspectiva completa de la composición genética de un organismo, facilitando un análisis detallado y la comparación de las variaciones genéticas. Esta técnica implica varios pasos clave; en primer lugar, se extrae ADN de alta calidad del organismo de interés, como un cultivo bacteriano o una muestra clínica. Luego, se procesa el ADN extraído para crear una biblioteca, esto implica fragmentar el ADN, los cuales después son secuenciados utilizando tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Finalmente, los datos de secuencia generados se analizan utilizando herramientas de bioinformática para ensamblar la secuencia completa del genoma, identificar variaciones genéticas e interpretar la información genómica (16). Se aplican acciones de control de calidad durante todo el proceso con el fin de asegurar la obtención de resultados precisos y confiables (15).

Las investigaciones de Baert L et al (15), Kwong JC et al (16) y Otero JM et al (17), nos han proporcionado un profundo entendimiento de las múltiples aplicaciones de la Secuenciación Completa del Genoma (SCG). Esta tecnología no solo se limita a campos como la medicina, la agricultura, la ciencia ambiental y la biología evolutiva, sino que también ha encontrado un lugar crucial en una diversidad de sectores (17). Investigadores, agencias de salud pública y empresas privadas, incluyendo laboratorios clínicos y la industria alimentaria, se benefician ampliamente de la versatilidad de la SCG (16).

Entre los profesionales y organizaciones que hacen uso de esta técnica, se destacan los microbiólogos clínicos, quienes emplean la SCG en la identificación de patógenos, el estudio de la resistencia antimicrobiana y la investigación de brotes de enfermedades.

Los laboratorios de salud pública la utilizan para la vigilancia, estudios epidemiológicos y monitoreo de la propagación de enfermedades infecciosas. En instituciones de investigación, la SCG es una herramienta esencial para estudiar la evolución microbiana, factores de virulencia y diversidad genética. Además, las empresas farmacéuticas la emplean en el desarrollo de medicamentos, desde la identificación de posibles objetivos farmacológicos hasta la comprensión de mecanismos de resistencia

(16). En la industria alimentaria, la SCG se revela como una herramienta valiosa para el rastreo de origen, investigaciones de brotes y el control de calidad, proporcionando información crucial sobre la relación genética de los aislados microbianos, facilitando la identificación de fuentes de contaminación y permitiendo la implementación de medidas de control específicas (15).

En este contexto, la investigación se presenta como una oportunidad para cerrar la brecha de conocimiento y tiene como objetivo sustentar bibliográficamente que el secuenciamiento completo del genoma nos ayudará a identificar cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* con mejor producción de etanol. Para lograr esto, se plantean los siguientes objetivos específicos: primero, identificar investigaciones donde se use secuenciamiento genético en levaduras con el fin de optimizar su producción de etanol; y segundo, sintetizar los datos recopilados de estas investigaciones, incluyendo métodos, resultados obtenidos y limitaciones encontradas.

## 2. METODOLOGÍA

En el presente estudio, se lleva a cabo una revisión bibliográfica metódica y estructurada sobre la implementación del secuenciamiento completo del genoma de las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* en las industrias cerveceras. La identificación de palabras clave, tales como "*Saccharomyces cerevisiae*", "Whole Genome Sequencing" y "Ethanol", resultó esencial gracias a la formulación precisa de la pregunta de investigación. Estos términos fueron seleccionados metódicamente con el objetivo de abordar tanto los aspectos genéticos como funcionales de las levaduras en el contexto de la producción cervecera.

Un componente crítico de nuestra metodología ha sido la adaptación de los algoritmos de búsqueda a lo largo del proceso investigativo. Inicialmente, se empleó el algoritmo ("*Saccharomyces cerevisiae*" [Mesh]) AND ("Whole Genome Sequencing" [Mesh]) AND ("Ethanol" [Mesh]) para explorar bases de datos. A medida que la investigación progresó, se incorporaron términos adicionales a la búsqueda para ampliar el rango de información. El algoritmo resultante incluyó ("*Saccharomyces cerevisiae*" [Mesh] OR "Yeast strains" [Mesh]) AND ("Whole Genome Sequencing" [Mesh] OR "Genome Sequencing" [Mesh]) AND ("Fermentation" [Mesh] or "Ethanol" [Mesh]). Finalmente, se implementó un algoritmo más completo: ("*Saccharomyces cerevisiae*" [Mesh] OR "Brewer's yeast" [Mesh] OR "*Saccharomyces cerevisiae* Strains" [Mesh] OR "Yeast strains" [Mesh]) AND ("Whole Genome Sequencing" [Mesh] OR "Genome Sequencing" [Mesh] OR "DNA Sequence" [Mesh] OR "Genetic Mapping" [Mesh]) AND ("Fermentation" [Mesh] or "Ethanol" [Mesh] OR "Bioalcohol Production" [Mesh]).

Durante el proceso de búsqueda, se accedió a diversas plataformas y páginas web, entre

ellas ProQuest, PubMed, SciELO y Google Scholar, con el objetivo de recopilar información relevante. Estas plataformas proporcionan acceso a una amplia variedad de revistas científicas, libros y documentos académicos que abordan la aplicación de la técnica de secuenciamiento completo del genoma en levaduras de la especie *Saccharomyces cerevisiae* durante el proceso de fermentación en la producción de cerveza y bebidas espirituosas

Para refinar la búsqueda y garantizar la inclusión de estudios pertinentes, se aplicaron filtros específicos. Inicialmente, se aplicó un filtro para incluir sólo estudios completos y gratuitos. Posteriormente, se procedió a excluir determinados tipos de publicaciones como resúmenes de conferencias o cartas editoriales, priorizando investigaciones con diseños más sólidos. Se establecieron criterios temporales, limitando la búsqueda a publicaciones de los últimos diez años para asegurar la inclusión de investigaciones recientes y relevantes. Además, se aplicaron filtros de idioma, priorizando la inclusión de estudios en inglés y español para garantizar la accesibilidad y comprensión del contenido. Para evitar la redundancia de datos, se procedió a descartar duplicados durante el proceso de selección. Se aplicaron filtros adicionales para incluir únicamente investigaciones centradas en levaduras *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en la industria cervecera o afines, descartando así estudios no relacionados con el ámbito de interés.

### 3. RESULTADOS

La investigación se enfocó en la propuesta del secuenciamiento completo del genoma como un método prometedor para identificar cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* con una capacidad mejorada de producción de etanol. Se realizó un análisis de 11 estudios obtenidos de diversas plataformas como ProQuest, PubMed, SciELO y Google Scholar, con una exclusión mínima de artículos debido a la limitada disponibilidad de información relevante. Estos estudios abarcaron un período desde 2009 hasta 2024 y provinieron de una variedad de ubicaciones geográficas, incluyendo países como Estados Unidos, Australia, China y Grecia, entre otros. El objetivo de la revisión bibliográfica fue proporcionar una visión general del corpus de literatura, centrándose en los genes asociados con la producción de etanol, los métodos utilizados para su identificación y modificación. Además, se revisaron diversos métodos y tecnologías para mejorar la producción de etanol en levaduras. Asimismo, se exploró en detalle el proceso del secuenciamiento completo del genoma, su aplicación y los sectores que lo utilizaban. Este enfoque se orientó específicamente hacia la industria cervecera y sectores afines, como el vino, bioetanol, aguardiente y cachaza, debido a la falta de información disponible.

Fig 1: Flujograma de la revisión bibliográfica

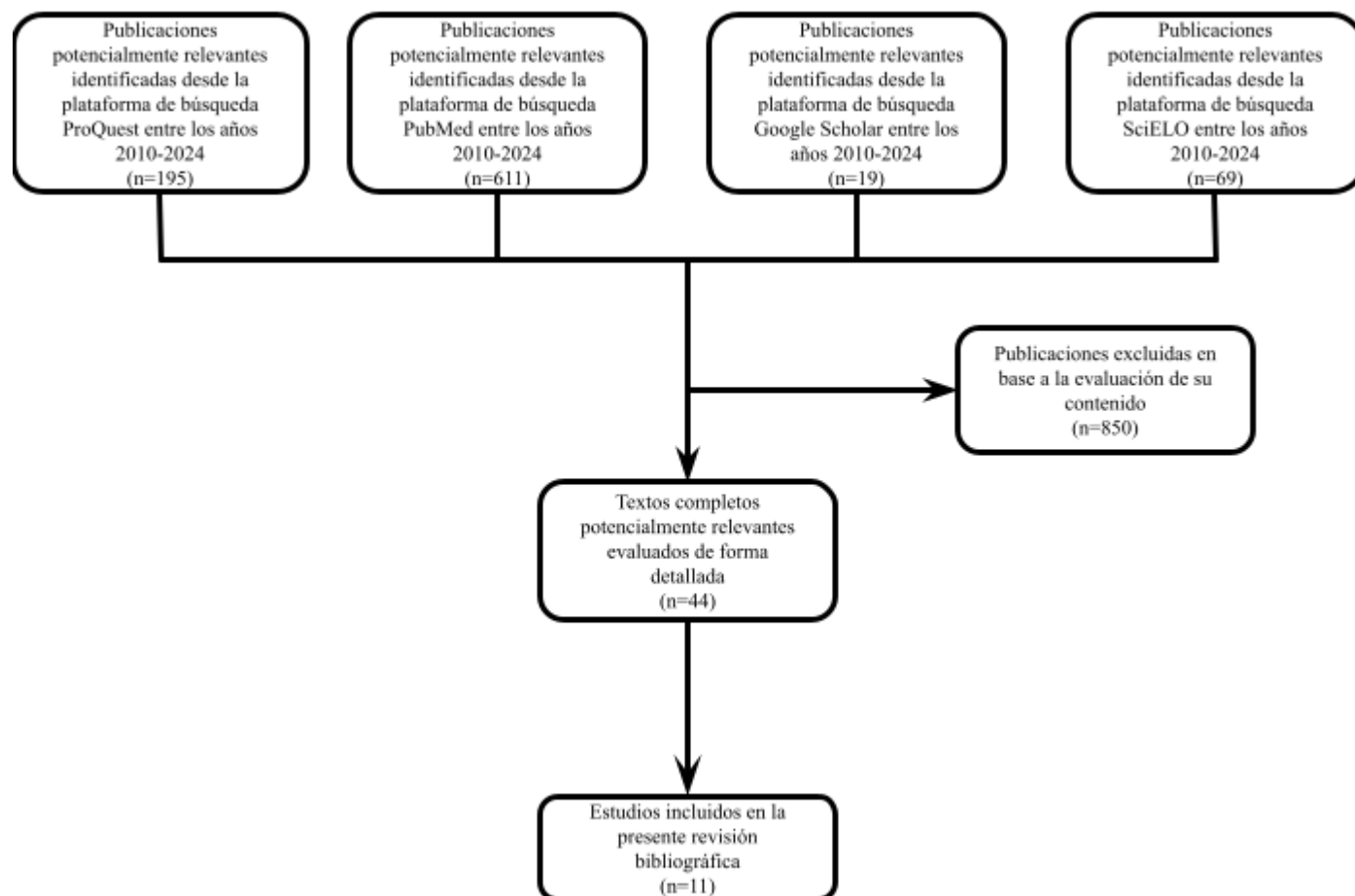


Tabla 1: Cuadro de síntesis de los estudios relevantes a la investigación

Título	Autor	Método	Resultados	Limitaciones
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> Gene Expression during Fermentation of Pinot Noir Wines at an Industrially Relevant Scale	Reiter T, Montpetit R, Byer S, Frias I, Leon E, Viano R, et al.	RNA-seq de series temporales, análisis de expresión diferencial, muestreo y análisis de datos bioinformáticos, para estudiar la expresión génica durante la fermentación del vino Pinot Noir a escala industrial.	Se identificó un programa central de expresión génica por <i>S. cerevisiae</i> en fermentaciones de vinos Pinot Noir a escala industrial, independientemente de la cosecha. Genes destacados en la fermentación de vino: ADH1 para la conversión de acetaldehído a etanol y HXT1/HXT4 para el transporte de glucosa.	El estudio puede tener limitaciones relacionadas con el número y diversidad de fermentaciones, un tamaño de muestra más grande y diverso podría ofrecer una comprensión más completa de la expresión génica de <i>S. cerevisiae</i> . Los hallazgos pueden ser específicos de las condiciones y variedades de uva estudiadas. Se reconoce la presencia de microorganismos no <i>Saccharomyces</i> metabólicamente activos

<p>Evaluation of Gene Modification Strategies for the Development of Low-Alcohol-Wine Yeasts</p>	<p>Varela C, Kutyna DR, Solomon MR, Black CA, Borneman A, Henschke PA, et al.</p>	<p>Ensayo de placas para el tamizaje de colonias con actividad de glucosa oxidasa. Transformaciones de levaduras mediante el método de acetato de litio-polietilenglicol. PCR del gen GOX y clonación en el plásmido pCV1-FBA1pMF<math>\alpha</math>. SPME (microextracción en fase sólida). Cromatografía de gases para la cuantificación de etanol y glicerol.</p>	<p>Identificaron genes clave para reducir la producción de etanol en levaduras de vino. La sobreexpresión de los genes GPD1 y GPD2 (producción de glicerol) mostró ser prometedor para reducir la producción de etanol. La sobreexpresión de genes de la rama reductiva del ciclo del ácido tricarboxílico (PYC1, FUM1, MDH2 y FRD1) y la delección de PDC5 (producción de etanol), HXK2 y MIG1 (represión de glucosa) disminuyó la producción y concentración de etanol.</p>	<p>Solo 15 de las 41 cepas mutantes construidas mostraron una producción significativamente menor de etanol, lo que indica que la efectividad de las modificaciones genéticas puede ser limitada. No se estudió las interacciones entre diferentes modificaciones genéticas o sus efectos combinados. Hallazgos limitados al fondo de levadura de vino AWRI1631. No se aplicó secuenciamiento genómico a las cepas con menor producción de etanol.</p>
<p>Complete genome sequence and analysis of a <i>Saccharomyces cerevisiae</i> strain used for sugarcane spirit production</p>	<p>Costa ACT, Hornick J, Antunes TFS, Santos AMC, Fernandes AAR, Broach JR, et al.</p>	<p>Se determinó la secuencia completa del genoma de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> utilizando las plataformas Illumina HiSeq y PacBio RS II, con ensamblaje mediante SPAdes. La anotación del genoma se realizó con AUGUSTUS. Se comparó genómicamente con S288c y otras cepas de caña. El análisis incluyó enriquecimiento GO, evaluación de completitud por BUSCO y análisis estadístico en R.</p>	<p>Este estudio secuenció y analizó el genoma de una cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para la producción de aguardiente de caña. Se identificaron características únicas, como alteraciones en genes de metabolismo y alta capacidad de fermentación. Los genes clave en el metabolismo de carbohidratos incluyen ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7, PDC1, PDC5, PDC6 y PDC7, implicados en la conversión de azúcares a etanol durante la fermentación, proporcionando recursos genéticos valiosos para la mejora de la producción.</p>	<p>Falta de validación funcional de las variaciones genéticas y su impacto en la producción de alcohol, limitando la comprensión de la cepa. El enfoque en una sola cepa de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> usada en aguardiente puede no ser generalizable. La falta de detalles sobre condiciones específicas de fermentación y la falta de abordaje de factores epigenéticos impactan la interpretación genómica.</p>
<p>Improved Production of Ethanol by Novel Genome Shuffling in <i>Saccharomyces cerevisiae</i></p>	<p>Hou L.</p>	<p>El estudio utilizó la reorganización genómica para aumentar la producción de etanol y mejorar la resistencia al estrés</p>	<p>El uso de la reorganización genómica mejora rápidamente la resistencia al estrés y la fermentación en cepas de levadura industrial. La cepa S3-10 destaca por su mejora en la</p>	<p>El estudio no demostró las diferencias genéticas entre la nueva cepa S3-10 y la control, que causaron el aumento en factores de estrés y producción de etanol. Se enfocó solo en mejorar la</p>

		<p>en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. Se aplicó cromatografía líquida de alta resolución (HPLC) para medir glucosa, glicerol y etanol, mientras que la mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS) indujo variación genética. Se empleó citometría de flujo para medir el contenido de ADN nuclear en levaduras.</p>	<p>tolerancia al estrés y un 10.96% más de rendimiento de etanol que el control, atribuido a su fase de crecimiento exponencial prolongada y mayor actividad metabólica.</p>	<p>producción y resistencia al estrés en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, sin explorar otras características relevantes para la producción de bioetanol.</p>
<p>Proteomics Answers Which Yeast Genes Are Specific for Baking, Brewing, and Ethanol Production</p>	<p>Davydenko S, Meledina T, Mittenberg A, Shabelnikov S, Vonsky M, Morozov A.</p>	<p>Se utilizaron métodos como electroforesis bidimensional y espectrometría de masas para separar e identificar proteínas con expresión alterada. Se aplicó el índice emPAI para clarificar el contenido relativo de proteínas, y se fraccionaron péptidos mediante cromatografía líquida. La tinción con azul brillante Coomassie G-250 permitió visualizar las proteínas.</p>	<p>Los autores encontraron que la expresión de los genes glicoxalasa, HEM2 y GDB1 aumentó en cepas de levadura productoras de etanol en comparación con cepas de levadura cervecera. También identificaron varios genes de alcohol deshidrogenasa (ADH1, ADH3, ADH4, ADH5 y SFA1) que participan en la conversión de acetaldehído a etanol durante la fermentación de glucosa.</p>	<p>El estudio tiene limitaciones al centrarse en solo tres cepas de levadura, posiblemente no representativas de todas las utilizadas en procesos industriales. Además, solo identificó proteínas con cambios de expresión sin explorar los mecanismos genéticos subyacentes, efectos ambientales, modificaciones genéticas o interacciones proteína-proteína en los niveles de expresión de proteínas.</p>
<p>A Novel Strategy to Construct Yeast <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Strains for Very High Gravity Fermentation</p>	<p>Tao X, Zheng D, Liu T, Wang P, Zhao W, Zhu M, et al.</p>	<p>Se emplearon diversos métodos y tecnologías, incluyendo el análisis de viabilidad celular, evaluación de la integridad de la membrana durante la fermentación de etanol, determinación de la estabilidad</p>	<p>Se crearon cepas de levadura innovadoras con mejor rendimiento y tolerancia al estrés (SZ3-1) mediante reorganización genómica y modificación génica. Estas cepas demostraron un rendimiento mejorado en fermentación de alta gravedad, con mayor producción de etanol y</p>	<p>La falta de secuenciación genómica en la cepa SZ3-1 limita la identificación de las variaciones genéticas responsables de las mejoras. La aplicabilidad de la estrategia a diferentes condiciones o microorganismos no está demostrada. No se abordan explícitamente aspectos económicos y</p>

		fermentativa, medición de metabolitos, y análisis del rendimiento y supervivencia celular durante la fermentación.	menos subproductos no deseados, así como mayor tolerancia al estrés y mayor integridad de la membrana celular durante la fermentación de etanol. La estabilidad fermentativa de los híbridos seleccionados se evidenció en su rendimiento constante y cariotipos consistentes tras múltiples subcultivos. La estrategia desarrollada tiene potencial para la cría industrial de cepas y aplicaciones en otros microorganismos y mejoras de características.	ambientales de la estrategia.
Guidance document on the use of whole genome sequencing (WGS) for source tracking from a food industry perspective	Baert L, McClure P, Winkler A, Karn J, Bouwknecht M, Klijn A.	El estudio destaca métodos y tecnologías para la secuenciación genómica completa (WGS) en microbiología alimentaria. Incluye el aislamiento y cultivo de microorganismos en la fabricación de alimentos o productos terminados, extracción de ADN, plataformas de secuenciación como Illumina y Ion Torrent, análisis bioinformático (verificación de calidad, SNP y MLST) y la interpretación de resultados, subrayando la importancia de la validación del flujo de trabajo y controles de calidad.	El artículo destaca que la secuenciación genómica completa (WGS) es eficaz para identificar relaciones genéticas en aislamientos microbianos, facilitando la detección de contaminación y la implementación de medidas de control. El uso de WGS en la industria alimentaria requiere recursos y una infraestructura dedicada. La selección de proveedores de servicios de secuenciación para WGS implica consideraciones técnicas como tecnologías de secuenciación y herramientas/plataformas bioinformáticas. La interpretación interna de resultados de WGS por la empresa, basada en conocimiento operativo y metadatos, es crucial para decisiones prácticas.	La secuenciación genómica completa (WGS) puede resultar costosa y no es la opción ideal cuando se buscan resultados rápidos. Se necesita experiencia tanto en operaciones de laboratorio como en análisis bioinformático para interpretar los resultados de WGS y traducirlos en decisiones prácticas. Además, compartir datos de WGS presenta limitaciones debido a preocupaciones sobre privacidad y derechos de propiedad intelectual. La validación del flujo de trabajo es esencial para asegurar la precisión y confiabilidad de los resultados, contribuyendo a la estandarización.
Whole genome sequencing of	Otero JM, Vongsangnak	Se aplicaron diversos métodos y	Los resultados incluyen la obtención de las secuencias	Las limitaciones del estudio incluyen la cobertura del

<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i>: from genotype to phenotype for improved metabolic engineering applications</p>	<p>W, Asadollahi MA, Olivares-Hernandes R, Maury J, Farinelli L, et al.</p>	<p>tecnologías, incluyendo el aislamiento de ADN con cultivos de <i>S. cerevisiae</i>, secuenciación del genoma mediante Illumina/Solexa, fermentaciones y caracterización fisiológica, análisis del transcriptoma con microarrays Affymetrix, y evaluación de la integridad del ARN utilizando el Bioanalizador Agilent 2100 y kit RNA 6000 Nano LabChip. Se empleó el kit FastRNA Pro RED para la extracción total de ARN.</p>	<p>genómicas de cepas de <i>S. cerevisiae</i> mediante Illumina/Solexa. La caracterización fisiológica reveló correlaciones entre la fisiología y SNPs no sinónimos, indicando utilidad para la ingeniería metabólica. El análisis del transcriptoma mostró diferencias significativas en la expresión génica, especialmente en genes relacionados con el metabolismo del carbono. El estudio sienta las bases para análisis comparativos de ingeniería metabólica SNP, contribuyendo al diseño de fábricas celulares mejoradas.</p>	<p>genoma, ya que los modelos metabólicos de <i>S. cerevisiae</i> abarcan sólo el 13-14% del genoma, limitando la comprensión integral de relaciones genotipo-fenotipo. Aunque se realiza análisis del transcriptoma, este solo puede ofrecer una visión parcial de los mecanismos regulatorios complejos. La identificación de SNPs, aunque detallada, no aborda explícitamente las limitaciones de los métodos. Además, los hallazgos son específicos de ciertas cepas, limitando su generalización a otras levaduras u organismos.</p>
<p>Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid</p>	<p>Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, et al.</p>	<p>Se emplearon varios métodos, como la secuenciación de genoma completo y bibliotecas cosmidicas, para analizar el genoma de la levadura de elaboración lager. Las secuencias se ensamblaron con Phred y PCAP, y se realizaron análisis filogenéticos, identificación de rearrreglos cromosómicos y mapeo óptico. El proyecto completo se depositó en DDBJ/EMBL/GenBank bajo el número de acceso ABPO00000000.</p>	<p>El genoma de la levadura de elaboración lager se ensambló en 3184 contigs y 796 supercontigs con Phred y PCAP, revelando una secuencia consensuada preliminar de 23.4 Mb. Se identificó como un híbrido de <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. bayanus</i>, con estructuras cromosómicas y regiones subteloméricas distintas. Se confirmaron rearranglos cromosómicos y translocaciones mediante PCR y mapeo óptico con XhoI, proporcionando información detallada sobre su genoma.</p>	<p>El ensamblaje del genoma de la levadura de elaboración lager podría contener brechas y errores, afectando la precisión del análisis. La identificación de rearrreglos cromosómicos se basó en PCR y secuenciación, con limitaciones para detectar variaciones complejas. El estudio se enfocó en aspectos genéticos y cromosómicos, sin explorar completamente la conexión directa entre los hallazgos genómicos y las características específicas de elaboración de la levadura, sugiriendo la necesidad de investigaciones adicionales para comprender mejor las implicaciones funcionales.</p>
<p>Ethanol yield improvement in</p>	<p>Yang P, Jiang S, Lu S, Jiang</p>	<p>Se utilizaron diversas técnicas,</p>	<p>La eliminación de los genes GPD2, FPS1, ADH2 y</p>	<p>El estudio se enfocó en eliminar cuatro genes en <i>S.</i></p>

<p><i>Saccharomyces cerevisiae</i> GPD2 Delta FPS1 Delta ADH2 Delta DLD3 Delta mutant and molecular mechanism exploration based on the metabolic flux and transcriptomics approaches</p>	<p>S, Jiang S, Deng Y, et al.</p>	<p>como la edición genética CRISPR-Cas9 en <i>S. cerevisiae</i>, HPLC y GC-MS para medir la producción de etanol, modelado de flujo metabólico, y análisis de transcriptoma mediante secuenciación Illumina Hiseq. Se emplearon herramientas como CASAVA, Trimmoatic, HISAT2, RSeQC, DEGseq, GO y KEGG para analizar datos y funciones génicas, y se usó Matlab para cálculos y análisis de datos.</p>	<p>DLD3 en <i>S. cerevisiae</i> mediante CRISPR-Cas9 generó la cepa modificada SCGFAD, con un aumento del 18.58% en contenido de etanol y reducción de subproductos. El análisis metabólico y transcriptómico reveló un aumento en el flujo de carbono hacia el etanol y la identificación de 472 genes diferencialmente expresados, sugiriendo que esta cepa podría mejorar la producción de etanol y la viabilidad económica en la industria del bioetanol.</p>	<p><i>cerevisiae</i>, sin explorar otras modificaciones genéticas que podrían mejorar aún más el rendimiento del etanol. Realizado en laboratorio, no se sabe cómo la cepa modificada se desempeñaría a nivel industrial. No evaluó el impacto en parámetros como pH, temperatura o disponibilidad de oxígeno. No incluyó un análisis económico detallado ni investigó el impacto en el sabor del etanol producido.</p>
<p>Omics Sequencing of <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Strain with Improved Capacity for Ethanol Production</p>	<p>Lu Z, Guo L, Chen X, Lu Q, Wu Y, Chen D, et al.</p>	<p>Utilizaron diversas técnicas, como conteo automático de células, cromatografía de gases y RNA-Seq, para analizar la fermentación en <i>S. cerevisiae</i>. También realizaron extracción de ADN completo, con secuenciación Illumina NovaSeq 6000, y emplearon herramientas como Burrows-Wheeler Aligner y GATK Unified Genotyper para análisis de datos genómicos. La precisión de RNA-Seq fue confirmada mediante qRT-PCR.</p>	<p>La cepa mutante (MT) de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> mostró ventajas significativas en crecimiento y fermentación de etanol (16.13% v/v) en comparación con la cepa salvaje (WT, 13.72% v/v) en medio con 30% de sacarosa. El análisis genómico y de expresión reveló cambios en vías metabólicas clave, identificando genes cruciales para la adaptabilidad metabólica en la cepa MT durante la fermentación. Los datos de WGS y RNA-Seq están disponibles en el NCBI SRA bajo PRJNA885247.</p>	<p>El estudio se enfoca en la caracterización genética y metabólica de la cepa mejorada de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> para producción de etanol, sin abordar ampliamente la escalabilidad industrial. Carece de análisis económico detallado y no discute desafíos a largo plazo y consideraciones regulatorias en la aplicación industrial de la cepa modificada.</p>

El análisis detallado de los estudios reveló una variedad de genes relacionados con la producción de etanol en cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*. Entre los hallazgos más destacados se encuentran genes como ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, ADH6, ADH7, HXT1, HXT4, PDC1, PDC5, PDC6 y PDC7 (2, 3, 5, 6, 7), que están implicados en la conversión de azúcares a etanol durante la fermentación. Estos genes fueron identificados en varios estudios, como: "Evaluation of Gene Modification Strategies for the Development of Low-Alcohol-Wine Yeasts" y "Genome Sequencing and Comparative Analysis of *Saccharomyces cerevisiae* Strains of the Peterhof Genetic Collection". La sobreexpresión de genes como GPD1 y GPD2, que participan en la síntesis de glicerol, ha demostrado ser una estrategia prometedora para disminuir la producción de etanol (5); sin embargo, utilizada de manera inversa, puede aumentar la producción de este último.

En cuanto a los métodos y tecnologías utilizados para identificar y/o alterar genes, se encontraron diversos enfoques, como el uso de técnicas de mutagénesis dirigida mediante PCR o EMS (8, 9), edición genética mediante CRISPR-Cas9 (7), y análisis de expresión génica mediante RNA-seq (2, 19). A pesar de algunas variaciones en los enfoques utilizados, se observó un acuerdo general en la eficacia de estos métodos para mejorar la producción de etanol en cepas de *Saccharomyces cerevisiae*.

Finalmente, se destaca un conjunto de estudios que han identificado y desarrollado cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con una notable mejora en la producción de etanol. Entre estos estudios resaltan los trabajos de Hou L (9), donde se empleó la reorganización genómica para mejorar la producción de etanol y la resistencia al estrés en las cepas de levadura industrial, lo cual resultó en la creación de la cepa S3-10. Otro estudio relevante fue llevado a cabo por Tao X et al (10), quienes también usaron la técnica de reorganización genómica y la modificación genética, culminando en la

creación de la cepa SZ3-1. Ambas cepas exhibieron mejoras significativas en la producción de etanol y tolerancia al estrés. Además, las investigaciones de Nakao Y et al (18) y Lu Z et al (19) resaltan la relevancia del secuenciamiento completo del genoma como la técnica más eficaz para identificar y desarrollar estas cepas mejoradas. Nakao Y et al (18) exploraron el genoma de cepas de levadura de elaboración lager, mientras que Lu Z et al (19) analizaron cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con una mayor capacidad de producción de etanol. En conjunto, estas investigaciones resaltan la importancia de esta técnica avanzada en el desarrollo de cepas mejoradas de levadura para aplicaciones industriales.

#### 4. DISCUSIÓN

La revisión bibliográfica destaca varias limitaciones que podrían dificultar la aplicación práctica del secuenciamiento completo del genoma para optimizar la producción de etanol en la industria cervecera. Una de estas limitaciones se relaciona con la escalabilidad de las estrategias propuestas, ya que la mayoría de los estudios se basan en condiciones de laboratorio o a pequeña escala, lo que podría no reflejar adecuadamente las condiciones reales de producción industrial (19). Esta falta de escalabilidad plantea dudas sobre la efectividad de las cepas de levaduras modificadas genéticamente en entornos industriales. Además, se observa una falta de especificidad en los hallazgos para las condiciones experimentales utilizadas y una escasa generalización a otras cepas de levaduras, lo que subraya la necesidad de una mayor diversidad de estudios que abordan una gama más amplia de condiciones y cepas de levaduras para garantizar la validez y aplicabilidad de los resultados (2, 17). Otro aspecto crítico es la falta de validación funcional de las variaciones genéticas identificadas y su impacto en la producción de etanol. Aunque el secuenciamiento completo del genoma puede proporcionar información detallada sobre las características genéticas de las cepas de levaduras, es esencial realizar estudios adicionales para comprender cómo estas variaciones afectan realmente la producción de etanol (5, 6). También, la revisión bibliográfica resalta la importancia de considerar otros factores externos que pueden influir en la producción de etanol, como la composición del sustrato utilizado para la fermentación y la presencia de contaminantes microbianos. Estos factores pueden tener un impacto significativo en la eficiencia y la velocidad de la fermentación alcohólica, lo que destaca la necesidad de abordar una gama más amplia de variables en los estudios de optimización de la producción de etanol.

En cuanto a la implementación del secuenciamiento completo del genoma, se señala que

una de las limitaciones radica en la necesidad de todo el material genético, ya que los genes relevantes para la fermentación están dispersos en diversas regiones genéticas y cromosómicas (4). Sin embargo, se han llevado a cabo investigaciones para identificar regiones genéticas o genes específicos relacionados con la producción de etanol o fermentación, lo que demuestra que esta técnica puede ser útil tanto para evaluar características a nivel del material genético completo como en regiones específicas en cada cepa de levadura.

Por último, en relación con la técnica de secuenciación completa, los estudios destacan su importancia en industrias similares, como la de alimentos, aunque también señalan la necesidad de personal capacitado para interpretar y traducir los resultados en acciones prácticas, así como la importancia de la capacitación continua del personal involucrado (15). Respecto a los costos, una mayor investigación ayudo a refutar las preocupaciones iniciales, ya que el costo de tercerizar las muestras para su secuenciación oscila alrededor de 90 a 120 dólares por muestra (20).

## 5. CONCLUSIONES

Basándonos en los objetivos establecidos y los resultados obtenidos, podemos concluir lo siguiente:

En primer lugar, hemos logrado identificar un limitado número de investigaciones que emplean el secuenciamiento genético en cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae* con el fin de identificar cepas con mejor producción de etanol. A través de una exhaustiva búsqueda en diversas plataformas académicas, hemos recopilado datos de 11 estudios relevantes que abarcan un período de tiempo significativo y provienen de distintas ubicaciones geográficas, lo que ha proporcionado una visión global del estado actual de la investigación en este campo.

En segundo lugar, el análisis detallado de estos estudios reveló una serie de genes asociados con la producción de etanol en cepas de levaduras *Saccharomyces cerevisiae*, como como ADH1, ADH2, PDC1, y HXT1. Además, se destacaron los métodos CRISPR-Cas9 y “Genome Shuffling” como tecnologías efectivas para modificar e identificar estos genes, así como el desarrollo de cepas mejoradas con una notable mejora en la producción de etanol y tolerancia al estrés como las cepas S3-10, SZ3-1, ABPO00000000 y PRJNA885247 .

Finalmente, los resultados resaltan la importancia del secuenciamiento completo del genoma como una técnica prometedora y eficaz para identificar y, a futuro, desarrollar cepas mejoradas de levadura para aplicaciones industriales en la producción de etanol. Esta técnica avanzada permite una comprensión más profunda de los genes y procesos involucrados en la fermentación, lo que facilita la ingeniería genética dirigida a optimizar la producción de etanol para la industria cervecera.

## 6. RECOMENDACIONES

En lo que respecta a las recomendaciones para mejorar este estudio, se sugiere iniciar con la adquisición de las levaduras necesarias. Esto puede lograrse a través de la colaboración con empresas de la industria cervecera, la compra independiente o la recolección de cepas autóctonas del Perú.

Posteriormente, se recomienda tercerizar el proceso de secuenciamiento. Esta medida evitará la necesidad de adquirir equipos, materiales o personal capacitado para realizar el secuenciamiento y, con la información resultante, será posible identificar las secuencias genéticas relevantes para la producción de etanol. De forma paralela, se recomienda verificar la producción de etanol en cada cepa secuenciada.

A partir de este punto, será esencial contar con la infraestructura adecuada de un laboratorio. Esto se debe a que gracias a la información obtenida en los pasos anteriores, se podrá proceder a la creación de nuevas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* con mejoras en su capacidad de producción de etanol, utilizando diversas técnicas disponibles.

Estas acciones combinadas servirán para optimizar el estudio y fomentar avances significativos en la producción de etanol, contribuyendo así al desarrollo y la eficiencia del proceso fermentativo en la industria cervecera.

## 7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Walker GM, Stewart GG. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages*. 2016;2(4):1–12.
2. Reiter T, Montpetit R, Byer S, Frias I, Leon E, Viano R, et al. *Saccharomyces Cerevisiae* Gene Expression During Fermentation of Pinot Noir Wines at an Industrially Relevant Scale. *Appl Environ Microbiol*. 2021;87(11):1–21.
3. Davydenko S, Meledina T, Mittenberg A, Shabelnikov S, Vonsky M, Morozov A. Proteomics answers which yeast genes are specific for baking, brewing, and ethanol production. *Bioengineering*. 2020;7(4):1–15.
4. Deed RC, Fedrizzi B, Gardner RC. *Saccharomyces Cerevisiae* FLO1 gene demonstrates genetic linkage to increased fermentation rate at low temperatures. *G3 Genes, Genomes, Genet*. 2017;7(3):1039–48.
5. Varela C, Kutyna DR, Solomon MR, Black CA, Borneman A, Henschke PA, et al. Evaluation of gene modification strategies for the development of low-alcohol-wine Yeasts. *Appl Environ Microbiol*. 2012;78(17):6068–77.
6. Costa ACT, Hornick J, Antunes TFS, Santos AMC, Fernandes AAR, Broach JR, et al. Complete genome sequence and analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* strain used for sugarcane spirit production. *Brazilian J Microbiol*. 2021;52(3):1087–95.
7. Yang P, Jiang S, Lu S, Jiang S, Jiang S, Deng Y, et al. Ethanol yield improvement in *Saccharomyces cerevisiae* GPD2 Delta FPS1 Delta

- ADH2 Delta DLD3 Delta mutant and molecular mechanism exploration based on the metabolic flux and transcriptomics approaches. *Microb Cell Fact* [Internet]. 2022;21(1):1–14. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12934-022-01885-3>
8. Papadimitriou K, Kapolos J, Koliadima A. Fermentation Efficiency of Genetically Modified Yeasts in Grapes Must. 2022; 11, 413. <https://doi.org/10.3390/foods11030413>
  9. Hou L. Improved production of ethanol by novel genome shuffling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010;160(4):1084–93.
  10. Tao X, Zheng D, Liu T, Wang P, Zhao W, Zhu M, et al. A novel strategy to construct yeast *Saccharomyces cerevisiae* strains for very high gravity fermentation. *PLoS One*. 2012;7(2).
  11. Barth R. High gravity brewing – the pros and cons - New Food Magazine [Internet]. [cited 2024 Feb 29]. Available from: <https://www.newfoodmagazine.com/article/1550/high-gravity-brewing-the-pros-and-cons/>
  12. What is high-gravity brewing? - Micet Craft [Internet]. [cited 2024 Feb 29]. Available from: <https://www.micetcraft.com/high-gravity-brewing/>
  13. Villa K. high gravity brewing | Craft Beer & Brewing [Internet]. [cited 2024 Feb 29]. Available from: <https://beerandbrewing.com/dictionary/4xtnZ4PwZ3/>

14. Wolfe A. High Gravity Beer: Big Risk, Bigger Reward - CraftBeer.com [Internet]. [cited 2024 Feb 29]. Available from: <https://www.craftbeer.com/craft-beer-muses/high-gravity-beer-big-risk-bigger-reward>
15. Baert L, McClure P, Winkler A, Karn J, Bouwknecht M, Klijn A. Guidance document on the use of whole genome sequencing (WGS) for source tracking from a food industry perspective. Food Control [Internet]. 2021;130:108148. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108148>
16. Kwong JC, McCallum N, Sintchenko V, Howden BP. Whole genome sequencing in clinical and public health microbiology. Pathology. 2015;47(3):199–210.
17. Otero JM, Vongsangnak W, Asadollahi MA, Olivares-Hernandes R, Maury J, Farinelli L, et al. Whole genome sequencing of *Saccharomyces cerevisiae*: From genotype to phenotype for improved metabolic engineering applications. BMC Genomics [Internet]. 2010;11(1):723. Available from: <http://www.biomedcentral.com/1471-2164/11/723>
18. Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, et al. Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. DNA Res. 2009;16(2):115–29.
19. Lu Z, Guo L, Chen X, Lu Q, Wu Y, Chen D, et al. Omics Sequencing of *Saccharomyces cerevisiae* Strain with Improved Capacity for Ethanol Production. Fermentation. 2023;9(5).

20. Whole Genome Sequencing - Novogene [Internet]. [cited 2024 Feb 29].

Available from:

<https://www.novogene.com/us-en/services/research-services/genome-sequencing/whole-genome-sequencing/>