Título: Levaduras no convencionales como herramientas de innovación y diferenciación en la producción de cerveza

Title: Non-conventional yeasts as tools for innovation and differentiation in brewing

Julieta Amalia Burini^a; Juan Ignacio Eizaguirre^b; Claudia Loviso^c y Diego Libkind^{a,*}

^aCentro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC), Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), CONICET - Universidad Nacional del Comahue, Quintral 1250, (CP8400), San Carlos de Bariloche, Argentina. juliburini@gmail.com.

^bLaboratorio de Biología Celular de Membranas (LBCM), Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET), FCEN-UBA, Pabellón IFIByNE, Ciudad Universitaria, (CP1428), Buenos Aires, Argentina. juani.eizaguirre@gmail.com.

^cCentro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR), CONICET, Bv. Almirante Brown 2915, (CP9120), Puerto Madryn, Argentina. claudia.loviso@gmail.com.

*Autor para correspondencia: libkindfd@comahue-conicet.gob.ar. Quintral 1250 (CP8400), San Carlos de Bariloche, Argentina.

Resumen

En la elaboración de cerveza las levaduras cumplen un rol fundamental. Además de ser las responsables de llevar a cabo la fermentación, generando principalmente etanol y dióxido de carbono, también son capaces de metabolizar y producir numerosos compuestos orgánicos que tienen un impacto determinante en el aroma y sabor final de la cerveza. Las especies *Saccharomyces cerevisiae* y *Saccharomyces pastorianus* son utilizadas tradicionalmente para la producción de cervezas Ale y Lager, respectivamente. No obstante, el continuo crecimiento en el mercado de la cerveza artesanal y el aumento del interés y exigencias de los consumidores han orientado los esfuerzos hacia la producción de cervezas diferenciales e innovadoras. En este punto, las levaduras no convencionales han cobrado gran protagonismo como herramienta para el desarrollo de nuevos productos. En el presente trabajo se describe y desarrolla la potencial aplicación en el sector cervecero de diferentes especies de levaduras no convencionales pertenecientes a los géneros *Brettanomyces*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Mrakia*, entre otras; así como también levaduras del género *Saccharomyces* distintas a las levaduras cerveceras tradicionales. Se detallan las condiciones de fermentación de este tipo de levaduras, su capacidad de asimilar y metabolizar diferentes componentes del mosto y de aportar características particulares al producto final. Conocer el estado del arte sobre levaduras no convencionales es de gran relevancia para evaluar su aplicación en la producción de cervezas artesanales con características sensoriales diferenciales, cervezas bajas en calorías, cervezas sin alcohol y cervezas funcionales.

Palabras clave: Levaduras no convencionales; *Brettanomyces*; *Torulaspora*; *Lachancea*; *Saccharomyces eubayanus*; Cervezas especiales; *Bioflavoring*; Cerveza artesanal

Abstract

Yeasts play a very important role in brewing. In addition to being responsible for carrying out fermentation, generating mainly ethanol and carbon dioxide, they are also able to metabolize and produce a large number of organic compounds that have a decisive impact on the final flavor of beer. *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* species are traditionally used in the

production of ale and lager beers, respectively. However, the continuous growth of the craft beer market and the increasing interest and demands of consumers have oriented efforts towards the production of differential and innovative beers. In this point, non-conventional yeasts have acquired a relevant role as a tool for the development of new products. In the present work, we describe the potential application in the brewing sector of different non-conventional yeast species belonging to the genus *Brettanomyces*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Pichia* y *Mrakia*, among others; as well as yeasts of the genus *Saccharomyces*, but different from traditional brewing yeasts. The fermentation conditions of these non-conventional yeast are reviewed, along with their abilities to assimilate and metabolize various components of the wort and to provide differential characteristics to the final product. Knowing the state of the art of non-conventional yeasts is essential to evaluate its application in the production of novel craft beers with different characteristics, such as flavored beers, non-alcoholic beers, low-calorie beers and functional beers.

Key words: Non-conventional yeast; *Brettanomyces*; *Torulaspora*; *Lachancea*; *Saccharomyces eubayanus*; Specialty beers; Bioflavoring; Craft beer

1. Introducción

La cerveza es la bebida alcohólica de mayor consumo a nivel mundial y su elaboración comprende la fermentación, mediada por levaduras, de un mosto obtenido a partir de granos malteados (generalmente cebada) y al que se le incorpora lúpulo^{2,80}. Uno de los principales criterios de clasificación de los cientos de estilos diferentes de cerveza existentes se basa en el tipo de fermentación y, por lo tanto, en el tipo de levadura involucrada. Las levaduras cerveceras se clasifican principalmente en aquellas de fermentación alta (Ale o *top fermenting yeasts*) y baja (Lager o *bottom fermenting yeasts*)⁶. Las primeras se emplean para fabricar cervezas Ale, que son producidas con cepas domesticadas de la especie *Saccharomyces cerevisiae* en un proceso que ocurre generalmente entre los 18 y 24 °C, y se suelen caracterizar por una mayor complejidad de aromas y sabores (*flavor*) frutales, florales y/o especiados. Por su parte las cervezas de fermentación baja (cervezas Lager) se producen utilizando la especie híbrida *Saccharomyces pastorianus* (*S. cerevisiae* x *S. eubayanus*) a temperaturas bajas entre 5 y 15 °C y resultan sensorialmente más neutras; *S. pastorianus* además exhibe alta resistencia a diversos factores de estrés, lo que la hace muy útil para la producción de cerveza a nivel industrial^{42,93,99}. La cerveza Lager representa hoy más del 90% de la producción mundial de cerveza, aunque el rápido crecimiento de la producción a escala artesanal, en donde se utilizan en mayor proporción levaduras Ale, puede modificar sensiblemente estos valores en el futuro cercano. Existen actualmente otros estilos de cervezas particulares y de menor incidencia, como las cervezas Lámbicas de origen belga, que mantienen sistemas fermentativos más antiguos y son una muestra actual de cómo se hacía cerveza históricamente en lo que refiere a la fermentación. Las mismas resultan de un proceso de fermentación espontánea y menos controlada llevado a cabo por microorganismos residentes en las propias cervecerías, que se incorporan al exponer el mosto en tanques abiertos al enfriarse durante la noche, antes de ser transferido a barricas de madera para su posterior fermentación y maduración^{20,97}. Múltiples y diversas especies de levaduras y bacterias se desarrollan durante este proceso de fermentación espontánea, que consta de tres fases: una fase inicial donde predominan las enterobacterias y algunas levaduras no sacaromícéticas (como *Kluyveromyces*, *Rhodotorula* y *Pichia* spp.), una fase de fermentación alcohólica principal liderada por levaduras del género *Saccharomyces* coexistiendo con bacterias ácido lácticas (BAL) y, en menor medida, bacterias ácido acéticas (BAA) y, finalmente el

nicho es ocupado por levaduras del género *Brettanomyces*, que predominarán en la maduración durante meses o años y aportan a la complejidad de aromas y sabores de estos estilos de cerveza⁹⁷.

Desde la segunda mitad del Siglo XIX, esta forma antigua de fermentación espontánea comenzó a restringirse al establecerse el concepto de fermentaciones controladas, llevadas adelante mediante la inoculación del mosto con cultivos iniciadores de levaduras específicas⁹³. Estas levaduras cerveceras fueron evolucionado a través de procesos de selección natural y artificial, llevando a la generación de cepas altamente especializadas y adaptadas (proceso de domesticación)²⁶. Los desarrollos microbiológicos que tuvieron lugar en esa época, en particular el uso de cultivos de levadura pura iniciados por Christian Hansen en la década de 1880, mejoraron en gran medida la consistencia y calidad de la cerveza, pero limitaron el número de cepas aplicadas a la producción de la misma⁹⁷. Las levaduras cerveceras por excelencia pertenecen al género *Saccharomyces* y esto se debe básicamente a aspectos clave como: producción eficiente de etanol, ausencia de producción de toxinas (inocuidad), alta tolerancia al etanol y capacidad de llevar a cabo la fermentación alcohólica incluso en presencia de oxígeno. Como característica complementaria se destaca la capacidad de producir compuestos de *flavor* que aportan perfiles organolépticos deseables a la cerveza^{93,97}.

Aunque el etanol, el dióxido de carbono y el glicerol son los principales compuestos producidos por las levaduras cerveceras durante la fermentación del mosto, en general tienen un impacto mínimo en el aroma y sabor; es la concentración de los diversos productos metabólicos secundarios lo que determina principalmente el balance de *flavor* de la cerveza^{26,82,98}. El metabolismo de las levaduras da lugar a aproximadamente el 80% de todos los compuestos aromáticos activos en la cerveza, ya que por sí solas son capaces de producir alrededor de 500 metabolitos de aroma y sabor diferentes que varían en su concentración entre cepas¹⁰⁷. Los mismos son intermediarios en vías metabólicas que van desde el catabolismo de los componentes del mosto (azúcares, compuestos nitrogenados y compuestos de azufre) hasta la síntesis de los componentes necesarios para el crecimiento de la levadura (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos): carbonilos (aldehídos y cetonas), alcoholes superiores (*fusel*), ésteres, VDK (diacetilo y pentanodiona), ácidos grasos, ácidos orgánicos, compuestos de azufre y compuestos fenólicos (conocidos como POF, *phenolic off flavors*)^{82,100}. En trabajos de revisión previos se ha profundizado en los factores que regulan la síntesis de ésteres⁶⁷ y alcoholes superiores⁶⁸ en las

151 levaduras cerveceras. Sin duda, los compuestos de *flavor* deben mantenerse dentro de ciertos límites o
152 pueden predominar y perjudicar el balance de sabor y aroma de la cerveza¹⁰⁰. Además de la amplia
153 gama de productos metabólicos que producen las levaduras, estas también tienen un rol activo en
154 procesos de biotransformación, siendo capaces de convertir precursores no volátiles e inodoros (en
155 particular del lúpulo) en compuestos de *flavor*, aumentando así el potencial organoléptico del mosto^{6,97}.
156 Las cepas de levadura son tan diversas como los aromas y sabores resultantes y, por lo tanto, la elección
157 de la misma está directamente relacionada con las características organolépticas deseadas en los estilos
158 de cerveza producidos¹⁰⁷.

159 A pesar del uso generalizado de las levaduras cerveceras tradicionales, las levaduras no
160 convencionales han comenzado a ganarse un lugar en las cervecerías. El crecimiento del segmento de
161 cerveza artesanal y el creciente número de consumidores especializados ha impulsado la búsqueda de
162 estrategias para la diferenciación productiva, y el papel de las diferentes levaduras como protagonistas
163 en la generación de productos innovadores y con características distintivas ha recibido especial
164 atención³¹. Generalmente, las levaduras no convencionales presentan bajos rendimientos de
165 fermentación y son más sensibles al estrés por etanol, pero abren un abanico de posibilidades al
166 proporcionar aromas y sabores distintivos, nuevos enfoques y características que impactan en el perfil
167 organoléptico de la cerveza^{6,74}. En el sector de alimentos y bebidas, la producción o el aumento de
168 compuestos de *flavor* a través de sistemas biológicos se conoce como *bioflavoring*¹⁰³; en este contexto,
169 diversas especies de levaduras no convencionales han sido indicadas como agentes factibles para
170 acentuar, mejorar y diversificar las características sensoriales de la cerveza⁶. Además del *bioflavoring*
171 se han destacado otras aplicaciones a partir de levaduras no convencionales, como la producción de
172 cervezas bajas en calorías, cervezas sin alcohol o bajas en alcohol (NABLAB, por sus siglas en inglés),
173 y cervezas funcionales^{20,31}.

174 Para atender estas innovaciones se han estado estudiando y/o utilizando levaduras que
175 pertenecen al mismo género que las levaduras cerveceras (*Saccharomyces*), así como también levaduras
176 pertenecientes a grupos taxonómicos distintos de *Saccharomyces*. Las primeras involucran levaduras
177 industriales de *S. cerevisiae* pero domesticadas para otros procesos fermentativos (como cachaça, sake,
178 etc), o levaduras no domesticadas de otras especies provenientes de ambientes naturales, consideradas

salvajes, como por ejemplo *S. eubayanus*. Las segundas comprenden un amplio grupo de especies con capacidad fermentativa que pertenecen en su mayoría al filo ascomicota (géneros como *Brettanomyces*, *Torulaspora*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Saccharomyces*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, entre otros) y, en pocos casos, al filo basidiomicota (ej. *Mrakia*)^{30,46}.

Dado que actualmente el desarrollo de inóculos comerciales basados en este tipo de levaduras no convencionales se encuentra en fuerte crecimiento, así como su aplicación en cervecerías en busca de productos innovadores, en este trabajo se presenta el estado actual del conocimiento sobre estas levaduras. En la Figura 1 se esquematiza la filogenia o relación de parentesco entre las distintas especies de levaduras descritas junto con sus principales características y potenciales aplicaciones en el sector cervecero.

2. Levaduras no convencionales en la industria cervecera

Actualmente, existen más de 1500 especies conocidas de levaduras repartidas en los filos ascomicota y basidiomicota, de las cuales sólo el 30% (la mayoría ascomicotas), tiene la capacidad de fermentar azúcares simples⁶⁰. Estudios de más de 100 especies diferentes evaluando el rendimiento de fermentación y el potencial de producción de compuestos aromáticos (tales como alcoholes superiores, ésteres de acetato y ésteres de etilo), revelaron que muchas especies de levaduras no convencionales poseen una elevada capacidad para producir diferentes compuestos de *flavor*, con un buen potencial de aplicación para la producción de cervezas diferenciales^{39,73}. Los estudios orientados a la selección y aplicación de levaduras no convencionales en la producción de cerveza generalmente estudian características como: utilización de maltosa (principal azúcar del mosto), desempeño fermentativo, tolerancia al etanol y a bajas temperaturas, tolerancia a los compuestos que provienen del lúpulo, utilización de aminoácidos, formación de POF, detección de compuestos de sabor y aroma, y síntesis de enzimas que interactúan con el lúpulo (como las β -glicosidasas)^{26,73,101,105}. En pocos años, las levaduras no convencionales cambiaron su papel de microorganismos potencialmente indeseables asociados al deterioro de los alimentos (incluida la cerveza), a poseer un rol principal en el desarrollo de productos innovadores para ganar una posición de mercado en el segmento cervecero⁹³. A continuación se describen los ejemplos más destacados de levaduras no convencionales en investigación

o aplicación en la industria cervecera, divididas en levaduras sacaromicéticas alternativas y levaduras no sacaromicéticas.

2.1. *Saccharomyces* alternativas

Dentro de las levaduras sacaromicéticas no convencionales se distinguen aquellas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, pero que son distintas de las levaduras cerveceras Ale. Puede tratarse de *S. cerevisiae* provenientes de cervezas con características muy particulares o de regiones geográficas determinadas (por lo que han atravesado trayectorias de domesticación diferentes -ej. levaduras *farmhouse*-), *S. cerevisiae* aisladas de ambientes naturales (salvajes o silvestres) o aisladas de otras bebidas tradicionales (ej. cachaça, chicha, sake)²⁶; asimismo, pueden encontrarse dentro de esta especie variedades con características muy distintas (ej. *S. cerevisiae* var. *diastaticus*). Por su parte, las levaduras sacaromicéticas no convencionales pueden incluir también a especies distintas a *S. cerevisiae*, como lo es la especie *S. eubayanus*.

2.1.1. Levaduras *farmhouse* noruegas

Las levaduras *farmhouse* son aquellas que se han utilizado en la elaboración tradicional de cerveza en granjas de Europa durante un período de tiempo considerable, siendo un ejemplo de levaduras sacaromicéticas no convencionales que sufrieron un proceso de domesticación diferente al de las variedades cerveceras tradicionales⁴⁰. El caso más novedoso son las denominadas levaduras *kveik* de origen noruego, que fueron puestas en escena recientemente por Lars Marius Garshol, un ingeniero de software que pasó cinco años investigando diversos aspectos de la elaboración de cerveza en granjas remotas de Noruega⁴⁰. Hasta hace poco los cultivos de levadura conocidos como *kveik* (un término para “levadura” en el dialecto de la región oeste y sur de Noruega), estaban aislados geográficamente y mantenidos sólo localmente por los cerveceros tradicionales. Ellos mantienen y reutilizan las *kveik* haciendo uso de los famosos “*yeast logs*” o “*yeast rings*” (elementos de madera agujereada) que, entre producción y producción, se deshidratan al sol^{88,104}. Gracias a los recientes avances en la tecnología de secuenciación genómica, estudios científicos permitieron hipotetizar que el proceso de domesticación de las levaduras cerveceras tradicionales se aceleró en el período de industrialización, en el caso de las *kveik* se sabe que fueron reutilizadas localmente en Noruega desde el Siglo XVI atravesando un proceso de domesticación diferente^{88,104}. Esto explica el porqué, en un estudio reciente que exploró diez cepas

distintas, las *kveik* han sido reconocidas como un grupo genético y fenotípicamente distinto de levaduras cerveceras tradicionales, con propiedades relevantes para la elaboración de la cerveza^{26,57,88}. Los cultivos de *kveik* son cultivos mixtos que consisten principalmente en múltiples cepas diferentes de *S. cerevisiae*⁴⁰.

En general, estas levaduras son muy floculantes, altamente tolerantes al etanol, no producen fenoles (POF⁻), atenúan el mosto dentro del rango esperado para cepas cerveceras domesticadas y exhiben una alta tasa de fermentación (posiblemente debido a que los cerveceros noruegos prefieren un corto tiempo de fermentación, a menudo de sólo 1-2 días, antes de transferir al barril)^{40,88}. Además, las *kveik* son tolerantes a altas temperaturas probablemente como resultado de la práctica tradicional de inocular la levadura en el mosto caliente (28 - 40 °C). Así, una característica diferencial es que estas levaduras pueden entonces ser utilizadas en fermentaciones a altas temperaturas sin la producción de *off flavors* (en particular de alcoholes superiores)^{40,88}. Los cerveceros noruegos tradicionales usan una tasa de inoculación mucho más baja que la típica para la producción de cerveza (aproximadamente el 10% de la tasa de inoculación habitual), incluso en mostos de alta densidad, sin producción de *off flavors* o cambios sensoriales evidentes⁸⁹. Inocular a una tasa estándar (0,75 - 1,5 cel/ml) puede reducir el aroma, pero puede mejorar el tiempo de fermentación; es recomendable la experimentación en fábrica para determinar qué tasa de inoculación es la óptima para cada producto⁴⁰. Organolépticamente, las *kveik* son capaces de producir ésteres en concentraciones por encima del umbral de percepción, que contribuyen al *flavor* frutado asociado con estas levaduras: caproato de etilo (ananá, tropical), octanoato de etilo (ananá, tropical, manzana, coñac) y decanoato de etilo (manzana), así como acetato de fenetilo (miel, floral); aportando complejidad aromática a las cervezas⁴⁰. Asimismo, se ha encontrado que las *kveik* disminuyen el pH del mosto en comparación con levaduras tradicionales. Esto tiene implicancias organolépticas a tener en cuenta en la producción, ya que el pH bajo de la cerveza puede ser asociado con una percepción de cuerpo más ligero y un carácter de lúpulo más áspero y astringente³⁶. Aún no hay información publicada sobre la capacidad de biotransformación de componentes del mosto por parte de estas levaduras, pero su estudio es inminente; actualmente se están llevando a cabo ensayos sobre su potencial de transformación de terpenos del lúpulo (Preiss R, comunicación personal). La

introducción de las *kveik* en las cervecerías se está convirtiendo en una práctica popular en América pudiéndose actualmente acceder a distintas cepas de estas levaduras en formato comercial (Tabla 1).

2.1.2. Otras *Saccharomyces cerevisiae*

Muchas otras bebidas fermentadas tradicionales (como la cachaça, chicha, tequila, mezcal y sake) pueden contener una mezcla de levaduras nativas, incluidas *S. cerevisiae* salvajes o domesticadas para esa bebida específica. Entre dichas cepas aisladas de diversos sustratos, puede haber una diversidad fenotípica considerable causada por fluctuaciones en los niveles de expresión de genes y la selección debida al estrés ambiental^{26,46}. Araújo y col. (2018) encontraron dos cepas aisladas de cachaça con capacidad de fermentar la maltosa y maltotriosa del mosto cervecero, de crecer a temperaturas bajas, con elevada producción de ésteres de acetato, baja producción de sulfuros y floculación alta, resultando posible la producción de cervezas Ale y Lager de calidad aceptable². Montandon y col. (2016) estudiaron *S. cerevisiae* salvajes aisladas de ambientes naturales y bebidas fermentadas tradicionales de Brasil en función de los aspectos fisiológicos, la capacidad fermentativa y la producción de compuestos deseables, pudiendo seleccionar levaduras con gran potencial cervecero. Una cepa fue posteriormente probada a escala semi-piloto en las instalaciones de una micro-cervecería (Grimor Brewery, Brasil), logrando desarrollar la primera cerveza con un levadura aislada en Brasil, que fue lanzada al mercado bajo el nombre de Grimor 18. Además de los resultados con alta reproducibilidad en cuanto a los parámetros de fermentación y compuestos aromáticos producidos, la cerveza también tuvo aprobación por los consumidores brasileños⁷⁷.

2.1.3. Variantes de *S. cerevisiae*

Existen cepas de *S. cerevisiae* con características particulares que por mucho tiempo se las ha considerado variedades dentro de la especie, y que tienen cierta relevancia en la producción de bebidas fermentadas o como complemento dietario, tales es el caso de *S. cerevisiae* variedad *diastaticus* y *S. cerevisiae* var *boulardii*.

A diferencia de la mayoría de las *S. cerevisiae* domesticadas para cerveza, *S. cerevisiae* var. *diastaticus* tiene la capacidad de hidrolizar las dextrinas del mosto en azúcares fermentables, causando un alto grado de atenuación (> 90%, cuando para levaduras cerveceras lo normal es entre 65 y 85%¹⁰⁶),

debido a que poseen genes *STA* que permiten que la levadura produzca y secrete la enzima glucoamilasa con la capacidad hidrolítica mencionada⁷⁰. Además, su capacidad super-atenuante puede generar una fermentación secundaria con formación excesiva de dióxido de carbono en botellas, latas o barriles, así como cambios en el sabor, la sedimentación y aumento de la turbidez⁷⁰. Por su parte, esta enzima ha tomado mayor importancia para el sector cervecero debido a su uso en la producción del nuevo estilo Brut IPA, así como para la producción de cervezas bajas en carbohidratos. *S. cerevisiae* var. *diastaticus* es además tolerante a la temperatura y al alcohol, por lo que puede considerarse robusta y capaz de sobrevivir en entornos desfavorables, como el de la cerveza⁷⁰. La capacidad de producir fenoles (fenotipo POF⁺) que ocurre como resultado de la descarboxilación del ácido ferúlico y cumárico del mosto, es otra característica que puede considerarse para identificar a esta variedad de levadura. Las levaduras salvajes, suelen tener funcionales sus genes *PAD1* y *FDC1*, relacionados con la producción de fenoles volátiles, mientras que las levaduras cerveceras domesticadas tienen mutaciones sin sentido o de cambio de marco en estos genes, haciéndolos no funcionales (POF⁻)⁵⁶. La mayoría de las cepas estudiadas de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* son productoras de POF impartiendo *flavors* dominantes especiados y a clavo de olor en la cerveza. Debido a todas las características descriptas, *S. cerevisiae* var. *diastaticus* es considerada uno de los más peligrosos agentes de contaminación en cervecerías. Sin embargo, Meier-Dörnberg y col. (2018) estudiaron el potencial de aplicación de estas levaduras en la producción de cerveza y encontraron que, además de fermentar dextrinas y producir fenoles, las 6 cepas evaluadas presentaban perfiles de sabor y aroma interesantes y diferenciales. La impresión de *flavor* principal de las cervezas producidas con *S. cerevisiae* var. *diastaticus* fue la de una cerveza similar al vino, de cuerpo seco, con notables sabores fenólicos (similares a clavo de olor) y un sutil *flavor* frutado; ninguno de los panelistas pudo detectar ningún aroma o sabor desagradable. Los autores concluyen que la especie *S. cerevisiae* var. *diastaticus* es adecuada para producir cervezas con buenas características de *flavor* en condiciones clásicas de fermentación, y que también podrían aplicarse en fermentaciones secundarias o mixtas para producir cervezas con sabores especiales y/o con bajo contenido de carbohidratos⁷⁰.

Otra variedad dentro de la especie *S. cerevisiae* cuyo potencial en la industria cervecera ha sido estudiado (y que se desarrollará en la sección 3.4) es *S. cerevisiae* var. *boulardii*, levadura conocida y

estudiada por su capacidad probiótica que, suministrada en cantidades adecuadas promueve beneficios en la salud del consumidor^{21,32,79}.

2.1.4. *Saccharomyces eubayanus*

Si bien se reconoció por algún tiempo que la levadura involucrada en la elaboración de cerveza Lager era un híbrido entre dos especies de levaduras sacaromicéticas diferentes (híbrido interespecífico), la identidad de los parentales era objeto de debate. El problema se resolvió en 2011 con el descubrimiento de la nueva especie *Saccharomyces eubayanus*, que posee una coincidencia genética del 99.6% con la parte parental no-*S. cerevisiae* del híbrido Lager⁶⁴. Esta especie, en su estado original o puro, se encuentra exclusivamente en los ambientes naturales (silvestre o salvaje) en particular asociada a árboles, como los del género *Nothofagus* (muestras de corteza, hojas, suelo y del hongo endémico *Cyttaria* spp.) típicos de los bosques de la Patagonia Argentina^{64,90}. Posteriormente, unos pocos aislamientos fueron obtenidos de bosques en el este de Asia¹², América del Norte⁸⁵ y Nueva Zelanda⁴¹ pero, sorprendentemente, no en Europa (posible sitio original del evento de hibridización que dió lugar a la levadura Lager). El descubrimiento de la madre de las levaduras Lager ha despertado interés en el sector científico-tecnológico para el estudio de su potencial aplicación en la industria cervecera.

La criotolerancia es una característica promisorio en levaduras cerveceras para la producción de cervezas Lager ya que la baja temperatura es el factor principal que determina las propiedades sensoriales de las mismas; y *S. eubayanus* es una de las especies con mayor tolerancia al frío dentro del género *Saccharomyces*, pudiendo crecer rápida y eficientemente a 10 °C^{42,53,71}. Respecto a sus capacidades fermentativas, *S. eubayanus* fermenta la glucosa y maltosa del mosto cervecero, con valores de atenuación promedio de 65 %^{34,54,69}. Se ha propuesto que la baja atenuación observada para esta especie en comparación con las levaduras cerveceras Lager (aproximadamente de 85 %) es el resultado de la incapacidad de *S. eubayanus* para fermentar maltotriosa^{34,42,54,56,69}. Se realizaron ensayos del consumo con maltotriosa marcada ([14C]- maltotriosa) que demostraron que *S. eubayanus* es incapaz de ingresar este azúcar, y por lo tanto de fermentarlo^{34,42,48,69}. En las levaduras Lager (y algunas Ale), la asimilación de maltotriosa ocurre debido a la presencia de genes que codifican para permeasas,

como *MTT1* y *AGT1*, que se pensaba inicialmente que venían del genoma del parental *S. eubayanus*²⁴. Sin embargo, ninguno de los genomas disponibles de *S. eubayanus* contiene el gen *MTT1*, aunque se han observado algunos fragmentos de ADN de alguna manera semejantes al *AGT1*^{4,69,86}. Hasta el momento no se ha logrado que cepas salvajes de *S. eubayanus* asimilen la maltotriosa, sino sólo a través de estrategias de modificación genética^{5,14}. Por su parte, esta especie presenta baja floculación evidenciada por la biomasa en suspensión^{53,54}. En cuanto a la producción de *flavor*, *S. eubayanus* se caracteriza por una producción moderada de ésteres de acetato y de etilo, como el acetato de isoamilo, que aporta aroma a banana y pera, considerados deseables en diversos estilos de cerveza^{53,71}. Produce además concentraciones moderadas a altas de alcoholes superiores relacionados con la síntesis de aminoácidos de cadena ramificada (isobutanol, alcohol isoamílico y 2-metilbutanol), que le pueden dar a la cerveza aromas alcohólicos y similares a solventes, generalmente considerados desagradables cuando están en altas concentraciones^{53,71}. Se observó también la producción de aromas sulfurosos (etanotiol y tioacetato de etilo) durante la fermentación del mosto, al igual que en levaduras Lager y algunas Ale, pero que normalmente se reducen con la maduración (*lagering*)^{55,71}. Tal vez el aroma y sabor más característico asociado a las cervezas de *S. eubayanus* es el *flavor* a clavo de olor y/o ahumado derivado principalmente del 4-vinilguaicol (4-VG)^{53,71} y del 4-vinilfenol (4-VF)³⁵. A pesar de su desempeño fermentativo disminuido, *S. eubayanus* posee muchos atributos ventajosos para la elaboración de cerveza, como el crecimiento celular a baja temperatura (hasta 4 °C), el uso de maltosa y la producción de compuestos aromáticos deseables para algunos estilos de cerveza, por lo que puede ser explotada como herramienta para la diversificación productiva y el agregado de valor⁴³. El primer producto comercial elaborado exclusivamente con una cepa de *S. eubayanus* aislada de la Patagonia fue lanzado por Heineken® en 2016 bajo la denominación de Wild Lager H41. En 2018, se firmaron las licencias de comercialización de cervezas realizadas con *S. eubayanus* por parte de la ACAB (Asociación de Cerveceros Artesanales de Bariloche y la Comarca Andina) bajo el nombre de Proyecto Patagonia Salvaje, dónde se realizó la transferencia de la levadura EUBY® (Tabla 1) a 11 cervecerías de Bariloche y el Bolsón, que lanzaron al mercado sus productos comerciales. La posibilidad de emplear una levadura nativa para la fabricación de cerveza abre las puertas para elaborar cervezas con todos los insumos de origen nacional, dado que las levaduras empleadas en la industria son extranjeras. Cabe

aclarar que el hecho de aislar una levadura en territorio de un país, no implica necesariamente que dicha levadura es autóctona o nativa de ese ambiente o región, dado que los microorganismos tienen una alta capacidad de dispersión y colonización de sustratos nuevos. Distinto es el caso de la levadura *S. eubayanus* en la Patagonia argentina y chilena, donde estudios científicos han demostrado que dicha especie es autóctona de los bosques andino-patagónicos^{34,61,81}. Más recientemente, y gracias al extenso cultivo de lúpulo y al éxito del cultivo experimental de cebada cervecera llevado adelante por el INTA Bariloche en la zona de El Bolsón (Rio Negro, Argentina) y su posterior malteado local, fue posible elaborar la primera cerveza 100% patagónica.

2.2. Levaduras no-sacaromicéticas

2.2.1. *Brettanomyces*

Podría decirse que las levaduras no convencionales por excelencia son aquellas pertenecientes al género *Brettanomyces* (antiguamente denominadas *Dekkera*), siendo *B. bruxellensis* y *B. anomalus* (también conocida como *B. claussenii*) las especies comúnmente relacionadas con la industria cervecera^{6,43,93}. Su rol ambiguo en la industria de las fermentaciones es muy conocido. En las cervecerías y, especialmente en las bodegas de vino, *Brettanomyces* es un reconocido microorganismo contaminante, siendo la causa de grandes pérdidas económicas. Su presencia puede cambiar por completo las propiedades organolépticas del producto debido a la producción de diversos metabolitos secundarios (principalmente fenoles) producidos durante la fermentación alcohólica²³. Sin embargo, distintas propiedades potenciales como su alta producción y tolerancia al etanol, la tolerancia a la presión osmótica, al pH bajo y a bajas concentraciones de oxígeno, la absorción de nitrato y la producción de otros aromas característicos que aumentan la complejidad del *flavor* de las bebidas fermentadas, han puesto a esta especie en el centro de atención²³. Históricamente, *Brettanomyces* ha resultado esencial para la producción de determinados estilos de cerveza (Lámbicas, *Gueuze*, otras *Belgian sours*). Actualmente, las propiedades aromáticas únicas de esta levadura y sus oportunidades para la elaboración de cerveza están siendo reconocidas, y cada vez más cerveceros las agregan deliberadamente a sus fermentaciones, ya sea como cultivo puro o en combinación con cepas cerveceras tradicionales^{23,25,98}. Quizás la diferencia de *flavor* más destacado de las cepas de levadura *Brettanomyces*

es la producción de fenoles volátiles. Se trata de una conversión de dos pasos donde el ácido ferúlico y p-cumarico presentes en el mosto son descarboxilados a 4-vinilguaiacol (4-VG) y 4-vinilfenol (4-VP), y luego reducidos a 4-etilguaiacol (4-EG) y 4-etilfenol (4-EP). La descarboxilación está mediada por una descarboxilasa de ácido fenilacrílico (*PADI*), mientras que una vinilfenol reductasa (*VPR*) es responsable de la etapa de reducción^{44,47}. Este último paso de reducción es representativo de *Brettanomyces*, por lo que se detectan altas concentraciones de 4-EG y 4-EP en fermentaciones que contienen estas levaduras, pero sólo pequeñas cantidades de 4-VG y 4-VP^{49,98}. El umbral de detección para estos compuestos es muy bajo, con diversos descriptores de *flavor* asociados a sudor de caballo, cuero, especiado, medicinal y ahumado, entre otros²³.

Dentro de los compuestos volátiles producidos por *Brettanomyces*, los ésteres son los más deseados ya que contribuyen con un agradable *flavor* frutado a la cerveza. Por lo general, en comparación con la levadura cervecera Ale, los ésteres de acetato (como el acetato de isoamilo -banana- y el acetato de fenetilo -miel, floral-) no se producen e incluso son degradados por las esterasas presentes en *Brettanomyces*. Sin embargo, los ésteres de etilo (como el acetato, lactato, hexanoato, decanoato y octanoato de etilo) están presentes en altas concentraciones, lo que contribuye a los sabores exóticos frutales y tropicales (ananá, mango, pera, uva)^{25,74}. Además, estas levaduras son capaces de esterificar ácidos grasos de cadena media y larga (comúnmente descriptos como sabores rancios y a “queso”), a sus ésteres particulares y, en consecuencia, cambiar el perfil de *flavor* de la cerveza a sabores dulces a uva, manzana, vino²³. Muchos términos diferentes, incluyendo clavo, picante, corral, ahumado, plástico, fenólico, medicinal, “*band-aid*®”, metálico, cuero húmedo, biscuit, sudor, cabra, manzana, floral, fruta tropical, cítricos y / o especiado, se utilizan para describir el perfil de aroma de las cervezas producidas con *Brettanomyces*, pero suelen resumirse más convenientemente como “*Brett flavor*”⁹⁸.

Por otro lado, estas levaduras producen distintas enzimas glicosidasas que tienen impacto en las características sensoriales de las cervezas producidas. Las dextrinas, como la maltotetraosa y la maltopentaosa, están presentes como azúcares residuales después de la fermentación principal de la cerveza. Al igual que *S. cerevisiae* var *diastaticus*, *Brettanomyces* produce glucoamilasas, enzima que le permite hidrolizar estos azúcares complejos en unidades de glucosa, produciendo cervezas “super-atenuadas” con niveles de etanol ligeramente más altos y concentraciones más bajas de azúcares

residuales (y, por lo tanto, contenidos calóricos más bajos)⁹⁸. Otra enzima de relevancia producida por *Brettanomyces* es la β -glucosidasa. La función principal de esta enzima es la hidrólisis de la celobiosa (azúcar presente en la madera) para su posterior uso como fuente de carbono, una característica que puede explicar la capacidad de estas levaduras para sobrevivir durante períodos prolongados en las barricas de madera utilizadas para la fermentación de la cerveza Lámbica. Estas enzimas también tienen el efecto de liberar compuestos aromáticos (agliconas) que están unidos glicosídicamente, lo que agrega complejidad al perfil de *flavor* de los vinos y cervezas⁴³. En la cerveza, estos glucósidos (compuestos inodoros y no volátiles mientras están unidos a una molécula de azúcar) derivan principalmente del lúpulo, y su hidrólisis puede dar lugar a un aumento significativo de compuestos volátiles en la cerveza, incluidos terpenos como el linalol (cítrico, floral y anisado) y salicilato de metilo (menta y especiado)^{23,43}. Las agliconas también pueden originarse a partir de frutas y flores, como en el caso de la cerveza de cereza tradicional *Kriek*, donde *Brettanomyces* mejora la producción de compuestos aromáticos como benzaldehído, linalol o eugenol^{27,105}. Un estudio de β -glucosidasas en 400 cepas de levaduras reveló una fuerte actividad enzimática en las cepas de *Brettanomyces*, que presentaron valores excepcionalmente altos de esa enzima durante el *screening*; la enzima β -glucosidasa de *B. anomalus* fue aislada y caracterizada para su potencial uso como agente natural de *bioflavoring*¹⁰⁵. La actividad de las β -glucosidasas, puede verse inhibida por altas concentraciones de alcohol, y su rango de pH óptimo es 5-6¹⁰⁷.

La mayoría de los estudios realizados con *B. bruxellensis* y *B. anomalus* sugieren el potencial uso de estas levaduras como cultivo puro^{39,62,108}. Sin embargo, el tiempo de fermentación resulta muy largo en comparación con las fermentaciones realizadas con levaduras Ale; por lo que el uso alternativo de cultivos iniciadores de levaduras cerveceras y de *Brettanomyces* en inoculaciones secuenciales resulta en una buena opción para el desarrollo de nuevas variedades de cerveza^{49,62,74}.

Sólo se necesitan unas pocas células de *Brettanomyces* para que su carácter aparezca, y una cantidad excesiva puede resultar sensorialmente perjudicial para cervezas realizadas con estas levaduras. Una tasa de inoculación de 2×10^5 cel/ml resulta efectiva (mucho más baja que la utilizada para Ale o Lager, $0.75 - 1.5 \times 10^6$ cel/ml)¹⁰⁷. Al realizar cervezas en barrica de madera nuevas, la recomendación es inocular el doble de esa tasa, de modo que la levadura pueda establecerse¹⁰⁷. Lo único

que impide que muchos cerveceros experimenten con *Brettanomyces* es la preocupación por la contaminación cruzada. Si no se procede cuidadosamente, en poco tiempo puede encontrarse “*Brett flavor*” en todas las cervezas de la fábrica. *Brettanomyces* se dispersa fácilmente y puede formar *biofilms*⁵¹. Sin embargo, procedimientos adecuados de limpieza y sanitización minimizan estos riesgos¹⁰⁷.

2.2.2. *Lachancea*

El género *Lachancea*, al igual que *Saccharomyces*, pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*⁵⁹. Las especies de dicho género han sido aisladas de una amplia variedad de ambientes naturales como muestras de árboles, suelo, fuentes de agua e insectos, así como de ambientes antrópicos como alimentos y bebidas fermentadas⁸⁷. Algunas de ellas eran conocidas antiguamente con el género *Kluveromyces*⁵⁹. Las especies *L. thermotolerans* y *L. fermentati* son las que se han aislado con mayor frecuencia y las que poseen la más amplia diversidad de nichos ecológicos, encontrándose principalmente asociadas a mosto de uva y ambientes de bodega⁸⁷. Si bien las características de *flavor* y la producción de ácido láctico en *L. thermotolerans* han sido bien estudiadas en vino⁷⁸ (principalmente en co-inoculaciones con *S. cerevisiae*¹¹), el estudio de la aplicación de levaduras de este género en la industria cervecera es escaso y reciente^{9,18,33,84}. En un estudio en que se evaluaron las características fermentativas de 3 cepas de *L. thermotolerans* en mosto cervecero, se demostró su capacidad de consumo de maltosa (similar al control Ale) aunque en tiempos largos de fermentación (2-3 semanas); ninguna fue capaz de consumir la maltotriosa presente en el mosto. En particular, destacó la elevada producción de ácido láctico (2-6 veces mayor que la cepa Ale), así como una producción de glicerol un 40% mayor (compuesto que aporta a la sensación de cuerpo)³³; Zdaniewicz y col. (2020) también encontraron una elevada producción de glicerol para *L. thermotolerans*¹¹⁰. Se demostró además una tasa de inoculación óptima de 2×10^6 cel/ml/°P, tolerancia a los iso-alfa-ácidos provenientes del lúpulo, un fenotipo no floculante y una actividad β -glucosidasa mayor que la levadura Ale³³. Sensorialmente *L. thermotolerans* produce cervezas con altos contenidos de acetato y butirato de etilo (floral, miel, dulce) comparado con *S. cerevisiae*¹⁸. Por su parte, *L. fermentati* (KBI 12.1) también posee capacidad de fermentar maltosa (aunque 20% menos que la cepa Ale), no asimila la maltotriosa, es tolerante a los iso-alfa-ácidos, es POF⁻ y posee una floculación moderada⁹. Con esta cepa fueron producidas cervezas

de baja graduación alcohólica (2.2% v/v etanol) y un pH final de 3.6 (debido a la producción de ácido láctico). El contenido de alcoholes superiores resultó menor que para la levadura Ale y la producción de ésteres 3 veces mayor. Las cervezas obtenidas fueron descriptas sensorialmente como frutadas, con carácter vinoso, cítrico y ácidas⁹. *L. thermotolerans* y *L. fermentati* son levaduras heterofermentativas que, como se describe, pueden producir etanol y ácido láctico como sub-productos de la fermentación⁸⁴, siendo este último compuesto un actor principal en la producción de estilos de cerveza *sour*. Esto sitúa a las especies de *Lachancea* en la mira para el desarrollo de cervezas diferenciales. Las cervezas *sour* son producidas generalmente haciendo uso de bacterias lácticas a partir de dos metodologías para lograr la acidificación del mosto. Una es inoculando los microorganismos previo a la fermentación (con técnicas como *sour mash* o *kettle sour*) y la otra es durante o post-fermentación utilizando cultivos mixtos, o bien inoculaciones secuenciales¹⁰². A partir del estudio y potencial aplicación de *Lachancea* sp. surge una nueva propuesta, el *primary souring*⁸⁴, consistente en la producción de cervezas inoculadas únicamente con levaduras heterofermentativas, como es el caso de *L. thermotolerans* y *L. fermentati*. Por su parte, se encontró una cepa (MN477031) de *L. thermotolerans* que se destacó de muchas otras debido a la baja producción de ácido láctico y a su influencia marginal en la disminución del pH en comparación con *Saccharomyces cerevisiae*; presentando un elevado potencial para la producción de diferentes tipos de cerveza sin limitarse sólo a *sours*¹¹⁰.

A nivel comercial, es posible adquirir cepas de *L. thermotolerans*, siendo más limitado el mercado para cepas de *L. fermentati* (Tabla 1). Sin embargo, es probable que el constante crecimiento del sector y el auge de cervezas *sour* resulte en que en los próximos años haya una mayor disponibilidad de diferentes especies y cepas del género *Lachancea*. En Argentina, en los últimos años se han aislado cepas de *Lachancea* de diversos sustratos^{34,72} (incluyendo otras especies nuevas), cuyo potencial en la producción de cervezas está comenzando a ser estudiado en nuestro laboratorio.

2.2.3. *Torulaspora delbrueckii*

El género *Torulaspora* también pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*⁵⁹ y, a pesar de que por décadas fue considerada un contaminante común en cervezas, la especie *Torulaspora delbrueckii* ha sido foco de atención por su capacidad de impartir características interesantes a las bebidas fermentadas. Esta levadura se encuentra presente en diversos ambientes (frutas, malta y suelos)⁶⁰ y ha

510 sido domesticada por el ser humano desde hace ya 4000 años¹. *T. delbrueckii* fue la primer levadura no
511 sacaromícetica en ser comercializada para la producción de vinos (2003), siendo conocida en la
512 industria vitivinícola por incrementar el *flavor* frutado^{1,3}. King y Dickinson (2000) fueron los primeros
513 en observar el potencial de esta especie en la producción de cerveza al detectar su capacidad para
514 modificar el aroma del producto final a partir de la biotransformación de monoterpenos del lúpulo
515 (generando mayores cantidades de linalool)⁵². Posteriormente, se encontró que cervezas fermentadas
516 con esta especie (pura y en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae*) presentaron una mejora en sus
517 características aromáticas respecto de cervezas control Ale, debido a la presencia de altos niveles de
518 ésteres como hexanoato de etilo, α -terpineol y feniletanol (aroma frutal, rosas, chicle y banana);
519 resultados que fueron confirmados por paneles de cata^{19,75}. Asimismo, *T. delbrueckii* ha mostrado un
520 impacto positivo a nivel sensorial en cuanto a la baja producción de compuestos indeseables como ácido
521 acético y acetaldehído^{16,101}. Se ha observado además una baja producción de fenoles volátiles por parte
522 de esta especie⁷⁵, el 4-VG puede ser detectado en cervezas fermentadas con determinadas cepas,
523 aportando interesantes notas a madera¹⁰¹. A nivel fermentativo, las temperaturas varían entre los 20 y
524 28°C y, debido a que algunas cepas no fermentan maltosa ni maltotriosa, los niveles de alcohol son
525 bajos variando de 0,8 a 4% v/v⁷⁵; por lo que ciertas cepas resultarían promisorias para la elaboración de
526 cervezas con bajo contenido de alcohol¹⁶. Una ventaja adicional de *T. delbrueckii* es su capacidad de
527 resistir diversas condiciones de estrés, como altas concentraciones de alcohol (9-11% v/v) y alto
528 contenido de iso-alfa-ácidos del lúpulo (antimicrobiano)⁷⁵, siendo capaces de fermentar mostos
529 altamente lupulados y alcohólicos, como es el caso de cervezas Indian Pale Ale (IPA). Por otro lado,
530 esta levadura posee alta tolerancia osmótica, por lo que puede fermentar mostos de densidad media y
531 alta con alta producción de ésteres y alcoholes superiores²⁰. Si bien el uso *T. delbrueckii* en cultivos
532 puros y mixtos aporta un *flavor* aromático muy agradable y particular, los resultados fermentativos y
533 organolépticos asociados a esta especie dependen principalmente de la cepa utilizada^{17,75}. Prelude®
534 (Chr.-Hansen, Copenhagen, Dinamarca) y Biodivia® (Lallemand Inc., Brooklyn Park, Australia) son
535 dos ejemplos de diferentes cepas de *T. delbrueckii* que se comercializan actualmente. La cepa Biodivia®
536 es capaz de generar menor porcentaje de etanol y niveles inferiores de ésteres y alcoholes superiores
537 (excepto alcohol isoamílico) respecto de la cepa Prelude®¹⁰¹. Sin embargo, en cervezas fermentadas con

Biodivia® se notaron niveles de butanoato de etilo (frutado, frutilla) significativamente mayores a los generados por la cepa Prelude®, por lo que posee un gran potencial para incrementar el *flavor* de cervezas bajas en contenido alcohólico. Por otro lado, con la cepa Prelude® es posible obtener cervezas con niveles de decanoato de etilo (floral, ananá) y dodecanoato de etilo (Floral, coñac) notablemente más altos (15 y 50 veces mayor, respectivamente)¹⁰¹. En cuanto a la producción de terpenos, se han observado mayores concentraciones de β -cariofileno, α -farnesceno y cadaleno en cervezas elaboradas con Prelude®, demostrando mayor capacidad por parte de esta cepa para biotransformar terpenos a través de la actividad β -glucosidasa¹⁰¹.

Al igual que para el género *Lachancea*, existen aislamientos naturales de *T. delbrueckii* de la Patagonia Argentina³⁴ que se suman a la larga lista de cepas para estudiar como potenciales herramientas de diversificación productiva en la industria de la cerveza.

3. Innovación productiva y tecnológica “no convencional”

En respuesta al aumento de la demanda de los consumidores, la industria cervecera ha dedicado muchos esfuerzos de investigación al desarrollo de nuevas tecnologías e innovaciones para la expansión de variedades de cervezas especiales. Los tipos de cervezas especiales donde el uso de levaduras no convencionales es de particular interés son las cervezas con *flavors* novedosos, cervezas bajas en calorías, cervezas sin alcohol o bajas en alcohol y cervezas funcionales^{20,93}.

3.1. Bioflavoring con levaduras no-convencionales

Diversas técnicas son aplicadas para ajustar los aromas y sabores de alimentos y bebidas a las nuevas demandas del mercado. Aunque los productos químicos sintéticos aún se utilizan ampliamente, los *flavors* obtenidos a través de métodos biológicos (*bioflavors*) son cada vez más solicitados por los consumidores, preocupados por los problemas ambientales y de salud causados por los químicos sintéticos y aditivos. Los *bioflavors* pueden extraerse de plantas o ser producidos haciendo uso de cultivos de células vegetales, microorganismos o enzimas aisladas. El *bioflavoring* microbiológico, con especial énfasis en el uso de levaduras no convencionales, es el foco para el desarrollo de cervezas innovadoras. Este enfoque se puede lograr (a) inoculando una sola especie de levadura como cultivo puro, (b) usando diferentes microorganismos en fermentaciones secuenciales o co-inoculadas, (c)

565 haciendo uso de organismos genéticamente modificados (OGM) y (d) por adición de enzimas secretadas
566 por otros microorganismos^{6,20,103}.

567 Distintas especies en cultivo puro a menudo producen altas concentraciones de compuestos de
568 *flavor* particulares, lo que les permite aportar aromas y sabores específicos al producto. *Kluyveromyces*
569 *marxianus*, por ejemplo, produce niveles relativamente altos de compuestos con aroma a rosas como
570 feniletanol y acetato de fenetilo⁴³ y, las ya discutidas especies de *Brettanomyces*, *Lachancea* y *S.*
571 *eubayanus* producen altas concentraciones de compuestos de *bioflavoring* distintivos como fenoles y
572 ésteres frutales. Además de *Lachancea*, especies de levaduras como *Schizosaccharomyces japonicus*,
573 *Wickerhamomyces anomalus*, *Hanseniaspora vineae* y *Hanseniaspora uvarum*, han sido utilizadas
574 como inóculo puro para la producción de cervezas *sour*^{31,84}. *Hanseniaspora uvarum* se encuentra
575 asociada a la fase inicial de las fermentaciones espontáneas de cervezas Lámbicas⁹⁶, aporta *flavors*
576 frutales y es productora de la enzima β -glucosidasa⁶, siendo posible acceder a cultivos comerciales de
577 esta especie (Tabla 1).

578 Muchas levaduras no convencionales no pueden utilizar todos los azúcares fermentables del
579 mosto, por lo que diversos estudios han sugerido el uso de estas levaduras como agentes de *bioflavoring*
580 en fermentaciones co-inoculadas con cepas de levaduras cerveceras. Aquí, la capacidad fermentativa
581 de las levaduras salvajes resulta secundaria, y el enfoque se basa más bien en una mayor producción de
582 compuestos aromáticos deseables y a menudo únicos, donde la producción de alcohol se logra con, por
583 ejemplo, cepas Ale o Lager^{26,43}. Como se vio antes, *T. delbrueckii* y especies de *Brettanomyces* se han
584 propuesto como agentes de *bioflavoring* cuando las levaduras están involucradas en la co-fermentación
585 con cepas cerveceras. *Pichia kluyveri* es capaz de fermentar sólo la glucosa del mosto con una baja
586 producción de etanol, por lo que resulta un candidato interesante para la fermentación secuencial en
587 busca de una mejora de los sabores frutados en la cerveza. Esta levadura genera una alta cantidad de
588 acetato de isoamilo (80 mg/L después de 2 días de fermentación) y también produce otros compuestos
589 frutales como propionato y butirato de etilo (ananá), valerato de etilo (manzana), decanoato de etilo
590 (frutado, manzana) y octanoato de etilo (ananá, tropical, manzana, coñac)^{49,74,91}. Además, se ha
591 reportado la capacidad de esta especie de convertir precursores presentes en las uvas en tioles
592 polifuncionales, que proporcionan aroma a frutas tropicales al vino. Estos precursores están también

presentes en el lúpulo, por lo que *P. kluyveri* podría incrementar el *flavor* de la cerveza mediante esta transformación⁴⁹. Por su parte, diversos autores han aplicado *W. anomalus* con éxito en co-cultivos con levaduras cerveceras para mejorar el perfil de aroma de la cerveza. Se demostró que estas levaduras son buenas productoras de ésteres, principalmente acetato de etilo, y otros como el acetato de isoamilo y el butirato de etilo, contribuyendo a mejorar la complejidad aromática del mosto fermentado con notas frutales como manzana, pera y durazno^{6,18,37,84}.

Otro aspecto interesante relacionado con el *bioflavoring* tiene que ver con la biotransformación de compuestos presentes en el mosto por acción de las levaduras. Las levaduras no sólo son responsables de la producción directa de compuestos aromáticos, sino que también pueden mediar la bioconversión de precursores de *flavor* covalentemente unidos, no volátiles e inodoros en compuestos de *flavor* activos. De esta manera, la elección de una cepa adecuada puede liberar esta fracción potencial de *flavor*. Diversos compuestos *flavor* activos, como los alcoholes monoterpenos, los norisoprenoides y los alcoholes alifáticos, pueden unirse covalentemente a un azúcar (en general β -D-glucosa), para formar glucósidos no volátiles e inodoros. Estos glucósidos están presentes en ingredientes importantes de los medios de fermentación, como el lúpulo en la cerveza⁹⁷. Como fue discutido (Sección 2.2.1), cuando estos compuestos son separados del residuo de azúcar, pueden afectar positivamente el aroma de la cerveza y algunas levaduras, como *Brettanomyces*, pueden producir las enzimas β -glucosidasas que catalizan esta reacción de liberación. Muchas otras especies son conocidas por secretar estas enzimas, incluidas algunas levaduras sacaromycéticas y diversas no sacaromycéticas como *Debaryomyces* spp., *Hanseniaspora* spp., *Scheffersomyces shehatae* y *Pichia terricola*^{43,74}. Todas las cepas mencionadas resultan en candidatos interesantes para ser usados en fermentaciones mixtas para bebidas donde se desea realzar o diversificar el *flavor*. Existen registros de levaduras de los 3 géneros mencionados obtenidas de ambientes naturales de la Patagonia Argentina^{15,34} (y datos no publicados).

3.2. Cervezas bajas en calorías (*light*)

Debido a las campañas de *marketing* dirigidas al cuidado del peso y a minimizar los riesgos que conlleva la obesidad, el interés sin precedentes en las calorías y las dietas ha estimulado a la industria cervecera a desarrollar cervezas bajas en calorías para atender a este creciente segmento de consumidores¹⁰⁹. Las cervezas bajas en calorías se pueden elaborar abordando algunos métodos de

producción alternativos, particularmente buscando reducir la concentración de carbohidratos en el producto final. Un método factible es la "dilución" de carbohidratos de mosto, que desafortunadamente conduce a cervezas poco expresivas y poco estructuradas, a menudo calificadas como acuosas, siendo menos preferidas por los consumidores^{6,109}. Son más aceptados entonces métodos alternativos: las cervezas *light* se pueden producir mediante una maceración especial que da lugar a grandes cantidades de azúcares fermentables, o mediante el proceso fermentativo de un mosto regular en condiciones específicas, como la inoculación de microorganismos que pueden hidrolizar los azúcares más complejos para reducir las concentraciones de azúcares residuales en el producto final. Este es el caso de *Brettanomyces* y *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, que producen enzimas glucoamilasas y glucosidasas que permiten la hidrólisis de carbohidratos no fermentables para formar azúcares simples, estos son posteriormente fermentados durante la etapa de fermentación primaria conduciendo a cervezas más bajas en calorías^{6,20,109}. En este aspecto, dado que el etanol tiene un mayor valor energético en comparación con los carbohidratos, la producción de cervezas bajas en calorías implica que parte del alcohol sea posteriormente eliminado¹⁰⁹. A partir de un estudio de la incidencia de levaduras contaminantes en múltiples cervezas embotelladas y de muestras de proceso de elaboración de cerveza en fábricas de la Patagonia Argentina, fue posible aislar más de 20 levaduras de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* (Latorre y col., enviado para su publicación) que resultan interesantes para la producción de cervezas bajas en calorías.

3.3. Cervezas sin alcohol o bajas en alcohol

Por su parte, la creciente preocupación de los consumidores por la salud y el abuso del alcohol han motivado a la industria cervecera a producir cervezas sin alcohol y con bajo contenido de alcohol^{13,109}. La terminología de la cerveza "sin alcohol" y "baja en alcohol", y las reglamentaciones legales correspondientes relativas a los límites de alcohol muestran muchas diferencias en cada país. En Argentina, la cerveza sin alcohol es aquella cuyo contenido alcohólico es inferior o igual a 0,5% v/v²²; para cervezas bajas en alcohol no existe una regulación vigente pero suelen entenderse como las cervezas con un contenido de etanol entre 0.6–3.5% v/v⁸. Las estrategias para producir NABLAB se pueden dividir en procesos físicos y biológicos. Los métodos físicos (evaporación, filtración por

membrana) se basan en la eliminación del alcohol de la cerveza terminada y requieren inversiones considerables de equipamiento especial. Los enfoques biológicos más utilizados se basan en la formación limitada de etanol durante la fermentación de la cerveza, donde las levaduras se inactivan o eliminan antes de que comiencen a producir etanol en grandes cantidades. Por lo general, se realiza enfriando rápidamente la cerveza en fermentación a 0 °C, por pasteurización o centrifugación; y suelen utilizarse los equipos de cervecería tradicionales, por lo que no requieren inversiones adicionales, pero el producto suele caracterizarse por presentar *off flavors*. En ambos casos la cerveza pierde cuerpo y frescura y, lo más importante, los compuestos de *flavor* disminuyen o se eliminan debido a su evaporación con el alcohol en el primer caso, o la ausencia de su formación en el último^{13,76}. El uso de levaduras no convencionales con capacidades limitadas para utilizar los azúcares del mosto (maltosa y/o maltotriosa en particular) resulta en una alternativa útil para producir cervezas sin alcohol y con bajo contenido de alcohol que aún conservan, o en algunos casos mejoran, parte de la complejidad aromática. Dichas levaduras son capaces de producir altas cantidades de ésteres que enmascaran los sabores indeseables, algunas incluso reducen los aldehídos del mosto eliminando así el sabor a "mosto" que a menudo se encuentra en las cervezas bajas en alcohol producidas por el método de fermentación detenida²⁰. Diferentes especies no convencionales tienen estas características y están siendo evaluadas y utilizadas para la producción de NABLAB. Un buen ejemplo de esto es el uso de *Saccharomyces ludwigii*^{29,50,65}. Las cervezas producidas con esta levadura tienen una concentración muy baja de alcohol (<0.1% v/v) debido a su incapacidad de fermentar maltosa y maltotriosa, y muestran buenos perfiles de *flavor* debido a su producción de ésteres y alcoholes superiores^{29,50,65}. Sin embargo, la producción de ésteres y el contenido de etanol de la cerveza final depende de la cepa²⁹; pudiendo encontrarse disponible comercialmente la cepa WSL-17 (*S. ludwigii*, Hefebank Weihenstephan; Tabla 1) con aplicación en la industria cervecera⁶⁵. Por su parte, se demostró que cultivos puros de cepas de *T. delbrueckii* son capaces de fermentar cervezas con un contenido de etanol que varía de 0.9 a 2.6% v/v caracterizadas por interesantes sabores frutales^{16,74,75}. Asimismo, Bellut y col. (2018) aislaron de kombucha cepas de *T. delbrueckii*, junto con cepas de *Hanseniaspora valbyensis*, *Hanseniaspora vineae*, *Zygosaccharomyces bailii* y *Zygosaccharomyces kombuchaensis*, con potencial para la

producción de cervezas sin alcohol que se comportaron fermentativa y sensorialmente de manera similar que la cepa Ale comercial⁷. Se ha encontrado también que se puede producir una bebida baja en alcohol o sin alcohol, con un perfil de *flavor* muy cercano a una cerveza estándar (al menos 4% v/v de alcohol) usando cepas de *P. kluyveri*. Como se vio, esta levadura sólo usa la glucosa del mosto y tiene la capacidad de convertir este sustrato en una alta concentración de compuestos de *flavor* específicos; siendo los principales acetato de isoamilo, alcohol isoamílico, butirato de etilo, hexanoato de etilo y octanoato de etilo^{91,92}. Por otro lado, en un estudio dirigido a la detección de levaduras basidiomicetes de *Mrakia* spp. para la producción de cervezas bajas en alcohol, se descubrió que una cepa psicrófila de *M. gelida* produjo una cerveza más aromática (con descriptores de damasco, uva y lichi) en comparación con la producida por un cultivo comercial de *S. ludwigii*³⁰. Una cepa de *Cyberlindnera mrakii* demostró tener aplicación en la fermentación de cervezas bajas en alcohol extra-frutales, debido a la capacidad de aumentar los niveles de ésteres de acetato y retener los terpenos y terpenoides del mosto lupulado⁶⁶. *Scheffersomyces shehatae*⁶³, *Zygosaccharomyces rouxii*⁹⁵ y *Cyberlindnera subsufficiens*¹⁰ son otras especies consideradas para el desarrollo de cervezas NABLAB.

3.4. Cervezas funcionales

Las cervezas funcionales se obtienen mediante el enriquecimiento con sustancias promotoras de la salud, considerándose cervezas que brindan beneficios para la salud si se consumen en cantidades moderadas. Estas cervezas especiales se producen mediante el uso de levaduras no convencionales, capaces de producir o transformar algunos compuestos beneficiosos, como la melatonina, una hormona capaz de regular el sueño en los mamíferos y que posee propiedades antioxidantes; algunas levaduras pueden producir esta sustancia durante la fermentación⁶. Entre las cervezas funcionales, una novedad está dada por las cervezas probióticas, obtenidas mediante la incorporación de agentes probióticos²¹. Estos son microorganismos utilizados como suplementos alimenticios que, en una dosis correcta, son potencialmente beneficiosos para la salud humana, especialmente para el equilibrio microbiano intestinal⁷⁹. La cerveza artesanal sin filtrar y sin pasteurizar puede ser considerada como una nueva herramienta para aportar efectos benéficos debido a que las levaduras permanecen viables en la bebida, lo que es crucial para la eficacia de los probióticos²¹. La mayoría de los microorganismos probióticos

son bacterias, *S. cerevisiae* var. *boulardii* es la única levadura utilizada ampliamente como probiótico y, a menudo comercializada como suplemento dietético. Posee propiedades que la convierten en un agente probiótico potencial, como la supervivencia a temperatura corporal (37 °C), la resistencia a los ácidos estomacales y biliares, y la supervivencia al ambiente competitivo del tracto intestinal²¹. Se demostró que esta levadura es capaz de fermentar los azúcares presentes en mosto cervecero a temperaturas de hasta 2 °C, y crecer en presencia de iso-alfa-ácidos (hasta 60 mg/L) y etanol (hasta 16% v/v)^{32,94} haciendo posible su aplicación en la producción cervecera. En estudios utilizando *S. cerevisiae* var. *boulardii* como único cultivo iniciador, así como en co-cultivos, fueron obtenidas cervezas con mayor actividad antioxidante, menor contenido de alcohol (NABLAB) y características sensoriales similares a las obtenidas con levaduras cerveceras, resultando en una herramienta muy prometedora para aumentar la calidad saludable del producto^{21,79,93,94}. Por otro lado, se demostró que una cepa de *B. bruxellensis* que expresa una alta actividad de β -glucosidasa es capaz de producir resveratrol, una molécula con acciones antioxidantes y anti-envejecimiento. Investigaciones futuras podrían considerar tal capacidad para la producción de cervezas funcionales^{23,31,58}.

4. Conclusiones y perspectivas

Las levaduras no convencionales poseen un considerable potencial para su explotación en la industria cervecera, representando una forma natural de introducir diversidad al producto. Muchas especies de levaduras están emergiendo como candidatos para la producción de cervezas especiales y diferenciales. La innovación no sólo se basa en la obtención de productos con una mayor complejidad de aromas y sabores, sino además en enfocar en nuevos nichos comerciales que demandan cervezas distintas en un mercado en crecimiento (ej. cervezas NABLAB, bajas en calorías, funcionales).

Los cerveceros se encuentran actualmente reinterpretando el rol de las levaduras en general (subestimadas en cuanto a su capacidad de influir en el *flavor* de las cervezas), y de las no convencionales en particular (estigmatizadas históricamente como contaminantes en la industria de las bebidas), por lo que existe un retraso en aprovechar la elevada funcionalidad que ofrecen las mismas.

Las cervecerías modernas mantienen altos niveles de sanitización y control, por lo que son

comprensiblemente reacias a introducir levaduras nuevas que, además, tienen el potencial de causar contaminación. El manejo en fábrica de estas levaduras alternativas es asimismo diferente en cuanto a cuestiones técnicas como tasa de inoculación, temperaturas de fermentación, estrategias de re-utilización, oxigenación y nutrición en general, por lo que requiere de un aprendizaje y pruebas previas a fin de lograr las características deseadas en el producto. Es por ello que todos los estudios tendientes a una mejor comprensión del desempeño fermentativo y organoléptico, así como la propagación y estabilidad de los inóculos, resultan de gran importancia para que gradualmente los productores implementen este tipo de levaduras en sus fábricas.

Si bien muchas de las levaduras discutidas en este trabajo han sufrido algún tipo de proceso de domesticación, está claro que aquellas que no han estado nunca en contacto con la industria de las fermentaciones pueden ser bioinsumos útiles para producción de cervezas diferenciales, y en particular con identidad regional. La mayoría de las especies y géneros aquí mencionados como de interés cervecero, cuenta con versiones salvajes o silvestres que pueden encontrarse en los ambientes naturales. La región andina de la Patagonia Argentina se ha demostrado como un reservorio muy interesante de levaduras de alto valor científico-tecnológico al contar con levaduras sacaromicéticas (*S. eubayanus* y *S. uvarum*) y no sacaromicéticas de géneros como *Lachancea*, *Hanseniospora*, *Torulaspora*, *Cyberlindera*, *Mrakia*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, entre otras. Por otro lado, estudios recientes permitieron obtener numerosos aislamientos de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* sumamente interesantes a partir de cervezas contaminadas también de la Patagonia Argentina. Estas levaduras en su totalidad son atractivos muy importantes como potenciales herramientas de innovación productiva, y su estudio y adecuada conservación son fundamentales a fin de poder transferir bioinsumos útiles para el agregado de valor y diferenciación productiva a un sector económico pujante y de fuerte impacto regional. A su vez, el potencial de estas levaduras alternativas excede al mundo cervecero, siendo de importancia para otro tipo de bebidas y alimentos como el vino⁸³, la sidra³⁸, el whisky y los panificados, entre otros (Álvarez L & Libkind L, enviado para su publicación).

Otro enfoque que se está implementando, y que involucra a algunas de estas levaduras no convencionales, es el de aplicar estrategias de mejora de levaduras no domesticadas ya sea por una acelerada adaptación al mosto cervecero a través del método de evolución experimental dirigida (EED),

o a través de la hibridación selectiva entre cepas o especies con características deseables complementarias. Estas son técnicas no generadoras de Organismos Genéticamente Modificados (OGM), que pueden emplearse para mejorar las características de estas levaduras no convencionales y/o simplificar su uso industrial. El caso más destacado sin dudas es el de la generación de nuevas variantes de levaduras Lager a través de la hibridización de cepas salvajes de *S. eubayanus* y levaduras domesticadas de *S. cerevisiae*^{35,45,48,53,54,56,71}. Hasta el momento no están disponibles comercialmente levaduras desarrolladas por estos métodos. Existen otros métodos de mejora que implican la manipulación genética, como ser ingeniería genética y biología sintética, que están siendo empleados o investigados pero que involucran la generación de OGM, los cuales tanto la industria como los consumidores aún no aceptan. Revisiones de los distintos tipos de abordajes de mejoramiento genético ya han sido publicados^{43,106} y están en vías de publicación (Eizaguirre y col., en preparación).

Queda en evidencia que en el sector cervecero tanto industrial como artesanal ha comenzado una nueva etapa en donde las levaduras van a tener un mayor protagonismo como consecuencia de los cambios en las demandas del mercado, de recientes descubrimientos científicos y de la búsqueda de levaduras distintas de las tradicionales Ale y Lager. Si bien ya existen levaduras no convencionales, con distinta posibilidad de acceso para los productores cerveceros, es de esperar que gradualmente la diversidad y accesibilidad de estas cepas vaya en aumento.

Agradecimientos

Nuestro agradecimiento a los apasionados productores de cerveza artesanal de la Argentina, en particular de la Patagonia, quienes inspiraron esta serie de artículos de revisión. A Martín Moliné por su ayuda en el armado y diseño de la figura.

Financiación

Este trabajo fue financiado por el proyecto PICT 3677 del FONCyT, el proyecto PIP424 del CONICET y la Universidad Nacional del Comahue (Proyecto B199) otorgados a DL. JB es beneficiaria de una beca CONICET.

782 **Conflicto de intereses**

783 Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

784

785

Referencias bibliográficas

1. Albertin W, Chasseriaud L, Comte G, Panfili A, Delcamp A, Salin F, Marullo P, Bely M. Winemaking and bioprocesses strongly shaped the genetic diversity of the ubiquitous yeast *Torulaspora delbrueckii*. PLoS One. 2014;9(4):e94246. doi:10.1371/journal.pone.0094246.
2. Araújo TM, Souza MT, Diniz RHS, Yamakawa CK, Soares LB, Lenczak JL, Olivera JVC, Goldman GH, Barbosa EA, Campos ACS, Castro IM, Brandao RL. Cachaça yeast strains: alternative starters to produce beer and bioethanol. Antonie van Leeuwenhoek. 2018;111(10):1749-1766.
3. Azzolini M, Fedrizzi B, Tosi E, Finato F, Vagnoli P, Scrinzi C, Zapparoli G. Effects of *Torulaspora delbrueckii* and *Saccharomyces cerevisiae* mixed cultures on fermentation and aroma of Amarone wine. Eur. Food Res. Technol. 2012;235:303–313.
4. Baker E, Wang B, Bellora N, Peris D, Hulfachor AB, Koshalek JA, Adams M, Libkind D, Hittinger CT. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. Molecular biology and evolution. 2015;32(11):2818-2831.
5. Baker EP, Hittinger CT. Evolution of a novel chimeric maltotriose transporter in *Saccharomyces eubayanus* from parent proteins unable to perform this function. PLoS genetics. 2019;15(4).
6. Basso RF, Alcarde AR, Portugal CB. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations?. Food Res. Int. 2016;86:112–120.
7. Bellut K, Michel M, Zarnkow M, Hutzler M, Jacob F, De Schutter DP, Daenen L, Lynch KM, Zannini E, Arendt EK. Application of non-*Saccharomyces* yeasts isolated from Kombucha in the production of alcohol-free beer. Fermentation. 2018;4(3):66.
8. Bellut K, Arendt EK. Chance and challenge: non-*Saccharomyces* yeasts in non alcoholic and low alcohol beer brewing—A review. J. Am. Soc. Brew. Chem. 2019;77:77–91.

- 809 9. Bellut K, Michel M, Hutzler M, Zarnkow M, Jacob F, De Schutter DP, Daenen L, Lynch KM,
810 Zannini E, Arendt EK. Investigation into the potential of *Lachancea fermentati* strain KBI 12.1 for low
811 alcohol beer brewing. J. Am. Soc. Brew. Chem. 2019;77:157–169.
- 812 10. Bellut K, Michel M, Zarnkow M, Hutzler M, Jacob F, Atzler JJ, Hoehnel A, Lynch KM, Arendt
813 EK. Screening and Application of *Cyberlindnera* Yeasts to Produce a Fruity, Non-Alcoholic Beer.
814 Fermentation. 2019;5(4):103.
- 815 11. Benito Á, Calderón F, Benito S. Combined use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in
816 winemaking. Beneficial effects determined through the study of wines' analytical characteristics.
817 Molecules. 2016;21(12):1744.
- 818 12. Bing J, Han PJ, Liu WQ, Wang QM, Bai FY. Evidence for a far east asian origin of lager beer
819 yeast. Curr. Biol. 2014; 24(10):R380–R381.
- 820 13. Brányik T, Silva DP, Baszczyński M, Lehnert R, Almeida e Silva JB. A review of methods of
821 low alcohol and alcohol-free beer production. J. Food Eng. 2012;108:493–506.
- 822 14. Brouwers N, de Vries Gorter AR, Weening SM, Elink TS, Kuijpers NGA, Pronk JT, Daran JG.
823 *In vivo* recombination of *Saccharomyces eubayanus* maltose-transporter genes yields a chimeric
824 transporter that enables maltotriose fermentation. PLoS genetics. 2019;15(4):e1007853-e1007853.
- 825 15. Čadez N, Bellora N, Ulloa R, Hittinger CT, Libkind D. Genomic content of a novel yeast
826 species *Hanseniaspora gamundiae* sp. nov. from fungal stromata (*Cyttaria*) associated with a unique
827 fermented beverage in Andean Patagonia, Argentina. PloS one. 2019;14(1):e0210792.
- 828 16. Canonico L, Agarbati A, Comitini F, Ciani M. *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process:
829 A new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. Food Microbiol. 2016;56:45–51.
- 830 17. Canonico L, Comitini F, Ciani M. *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing
831 fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. Int. J. Food Microbiol. 2017;259:7–13.

- 832 18. Canonico L, Galli E, Ciani E, Comitini F, Ciani M. Exploitation of three non-conventional
833 yeast species in the brewing process. *Microorganisms*. 2019;7(1):11.
- 834 19. Canonico L, Ciani E, Galli E, Comitini F, Ciani M. Evolution of Aromatic Profile of
835 *Torulaspora delbrueckii* Mixed Fermentation at Microbrewery Plant. *Fermentation*. 2020; 6(1):7.
- 836 20. Capece A, Romaniello R, Siesto G, Romano P. Conventional and non-conventional yeasts in
837 beer production. *Fermentation*. 2018;4(2):38.
- 838 21. Capece A, Romaniello R, Pietrafesa A, Siesto G, Pietrafesa R, Zambuto M, Romano P. Use of
839 *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of
840 craft beers with potential healthy value-added. *Int. J. Food Microbiol*. 2018;284:22–30.
- 841 22. Código Alimentario Argentino. Bebidas Hídricas, Agua y Agua Gasificadas. 2002;XII:982-
842 1079.
- 843 23. Colomer MS, Funch B, Forster J. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production.
844 *Curr. Opin. Biotechnol*. 2019;56:30–35.
- 845 24. Cousseau FEM, Alves Jr SL, Trichez D, Stambuk BU. Characterization of maltotriose
846 transporters from the *Saccharomyces eubayanus* subgenome of the hybrid *Saccharomyces pastorianus*
847 lager brewing yeast strain Weihenstephan 34/70. *Letters in applied microbiology*. 2013;56(1):21-29.
- 848 25. Crauwels S, Steensels J, Aerts G, Willems K, Verstrepen K, Lievens B. *Brettanomyces*
849 *bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for
850 the brewing industry. *Brewing Science*. 2015;68:110–121.
- 851 26. Cubillos FA, Gibson B, Grijalva-Vallejos N, Krogerus K, Nikulin J. Bioprospecting for
852 brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast*. 2019;1–16.

- 853 27. Daenen L, Sterckx F, Delvaux FR, Verachtert H, Derdelinckx G. Evaluation of the glycoside
854 hydrolase activity of a *Brettanomyces* strain on glycosides from sour cherry (*Prunus cerasus* L.) used
855 in the production of special fruit beers. FEMS yeast research. 2008;8(7):1103-1114.
- 856 28. Daniel HM, Lachance MA, Kurtzman CP. On the reclassification of species assigned to
857 *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription.
858 Antonie van Leeuwenhoek. 2014;106(1):67-84.
- 859 29. De Francesco G, Turchetti B, Sileoni V, Marconi O, Perretti G. Screening of new strains of
860 *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. J. Inst. Brew.
861 2015;121:113–121.
- 862 30. De Francesco G, Sannino C, Sileoni V, Marconi O, Filippucci S, Tasselli G, Turchetti B.
863 *Mrakia gelida* in brewing process : An innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic
864 yeast strain. J. Food Microbiol. 2018;76:354–362.
- 865 31. de Souza Varize C, Christofoleti-Furlan RM, Muynarsk,EDSM, de Melo Pereira GV, Lopes
866 LD, Basso LC. *Biotechnological Applications of Nonconventional Yeasts*. En: Basso TP, editor. Yeasts
867 in Biotechnology. 2019;1-26. doi:10.5772/intechopen.83035.
- 868 32. Dias Graça AI. Use of *Saccharomyces boulardii* in alcohol-free beer production. Master Thesis
869 of Science Degree in Biological Engineering 2016. Técnico Lisboa.
- 870 33. Domizio P, House JF, Joseph CML, Bisson LF, Bamforth CW. *Lachancea thermotolerans* as
871 an alternative yeast for the production of beer. J. Inst. Brew. 2016;122:599–604.
- 872 34. Eizaguirre JI, Peris D, Rodríguez ME, Lopes CA, De Los Ríos P, Hittinger CT, Libkind D.
873 Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia.
874 Environ. Microbiol. 2018;20(10):3732-3743.

- 875 35. Eizaguirre JI. Caracterización y domesticación de cepas naturales de *Saccharomyces*
876 *eubayanus* para su aplicación en la industria cervecera. Tesis de Doctorado en Biología 2019.
877 Universidad Nacional del Comahue.
- 878 36. Escarpmentlabs.com [internet]. Crispy brewing with kveik: mind the pH gap. Ontario, 2019
879 [citado 04 Feb 2020]. Available from: [https://www.escarpmentlabs.com/single-](https://www.escarpmentlabs.com/single-post/2019/10/20/Crispy-brewing-with-kveik)
880 [post/2019/10/20/Crispy-brewing-with-kveik](https://www.escarpmentlabs.com/single-post/2019/10/20/Crispy-brewing-with-kveik).
- 881 37. Fan G, Teng C, Xu D, Fu Z, Minhazul KA, Wu Q, Liu P, Yang R, Li X. Enhanced production
882 of ethyl acetate using co-culture of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae*. J.
883 Biosci. Bioeng. 2019;128(5):564-570.
- 884 38. Flores MG, Rodríguez ME, Oteiza JM, Barbagelata RJ, Lopes CA. Physiological
885 characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their
886 potential for cidermaking. International journal of food microbiology. 2017;249:9-17.
- 887 39. Gamero A, Quintilla R, Groenewald M, Alkema W, Boekhout T, Hazelwood L. High-
888 throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma
889 formation in food fermentation. Food Microbiol. 2016;60:147–159.
- 890 40. Garshol LM, Preiss R. How to Brew with Kveik. MBAA TQ. 2018;55(4):76-83.
- 891 41. Gayevskiy V, Goddard MR. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside
892 in North Island native New Zealand forests. Environ. Microbiol. 2016;18:1137–1147.
- 893 42. Gibson BR, Storgårds E, Krogerus K, Vidgren V. Comparative physiology and fermentation
894 performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces*
895 *eubayanus*. Yeast. 2013;30(7):255–266.
- 896 43. Gibson B, Geertman J, Hittinger CT, Krogerus K., Libkind D, Louis EJ, Magalhães F, Sampaio
897 JP. New yeasts - new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. FEMS
898 Yeast Res. 2017;17(4):2–6.

899 44. Godoy L, García V, Peña R, Martínez C, Ganga MA. Identification of the *Dekkera bruxellensis*
900 phenolic acid decarboxylase (PAD) gene responsible for wine spoilage. Food Control. 2014;45:81–86.

901 45. Gorter de Vries AR, Voskamp MA, van Aalst AC, Kristensen LH, Jansen L, Van den Broek
902 M, Salazar AN, Brouwers N, Abeel T, Pronk JT, Daran, JMG. Laboratory evolution of a *Saccharomyces*
903 *cerevisiae*×*S. eubayanus* hybrid under simulated lager-brewing conditions. Frontiers in genetics.
904 2019;10:242.

905 46. Gschaedler A. Contribution of non-conventional yeasts in alcoholic beverages. Curr. Opin.
906 Food Sci. 2017;13:73–77.

907 47. Harris V, Ford CM, Jiranek V, Grbin PR. Survey of enzyme activity responsible for phenolic
908 off-flavour production by *Dekkera* and *Brettanomyces* yeast. Appl. Microbiol. Biotechnol.
909 2009;81:1117–1127.

910 48. Hebly M, Brickwedde A, Bolat I, Driessen MR, de Hulster EA, van den Broek M, Pronk JT,
911 Geertman JM, Daran JM, Daran-Lapujade P. *S. cerevisiae*×*S. eubayanus* interspecific hybrid, the best
912 of both worlds and beyond. FEMS Yeast Research. 2015;15(3).

913 49. Holt S, Mukherjee V, Lievens B, Verstrepen KJ, Thevelein JM. Bioflavoring by non-
914 conventional yeasts in sequential beer fermentations. Food Microbiol. 2018;72:55–66.

915 50. Jiang Z, Yang B, Liu X, Zhang S, Shan J, Liu J, Wang X. A novel approach for the production
916 of a non-alcohol beer ($\leq 0.5\%$ abv) by a combination of limited fermentation and vacuum distillation. J.
917 Inst. Brew. 2017;123:533–536.

918 51. Joseph CM, Kumar G, Su E, Bisson LF. Adhesion and biofilm production by wine isolates of
919 *Brettanomyces bruxellensis*. Am. J. Enol. Vitic. 2007;58:373–378.

920 52. King A, Dickinson JR. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces*
921 *cerevisiae*, *Torulaspora delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. Yeast. 2000;16:499–506.

922 53. Krogerus K, Magalhães F, Vidgren V, Gibson B. New lager yeast strains generated by
923 interspecific hybridization. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 2015;42:769–778.

924 54. Krogerus K, Arvas M, De Chiara M, Magalhães F, Mattinen L, Oja M, Vidgren V, Yue J, Liti
925 G, Gibson B. Ploidy influences the functional attributes of de novo lager yeast hybrids. *Appl. Microbiol.*
926 *Biotechnol.* 2016;100:7203–7222.

927 55. Krogerus K, Magalhães F, Vidgren V, Gibson B. Novel brewing yeast hybrids: creation and
928 application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2017;101:65–78.

929 56. Krogerus K, Seppänen-Laakso T, Castillo S, Gibson B. Inheritance of brewing-relevant
930 phenotypes in constructed *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. *Microb.*
931 *Cell Fact.* 2017;16:1–22.

932 57. Krogerus K, Preiss R, Gibson B. A unique *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces uvarum*
933 hybrid isolated from norwegian farmhouse beer: Characterization and reconstruction. *Front. Microbiol.*
934 2018;9:1–15.

935 58. Kuo HP, Wang R, Huang CY, Lai JT, Lo YC, Huang ST. Characterization of an extracellular
936 β-glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production. *J. Food Drug Anal.* 2018;26:163–
937 171.

938 59. Kurtzman CP. Phylogenetic circumscription of *Saccharomyces*, *Kluyveromyces* and other
939 members of the *Saccharomycetaceae*, and the proposal of the new genera *Lachancea*, *Nakaseomyces*,
940 *Naumovia*, *Vanderwaltozyma* and *Zygorhizula*. *FEMS yeast research.* 2003;4(3):233-245.

941 60. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T, editors. The yeasts: a taxonomic study, 5th edition. Elsevier,
942 2011.

943 61. Langdon QK, Peris D, Eizaguirre JI, Opulente DA, Buh KV, Sylvester K, Jarzyna M, Rodríguez
944 ME, Lopes CA, Libkind D, Hittinger CT. Genomic diversity and global distribution of *Saccharomyces*
945 *eubayanus*, the wild ancestor of hybrid lager-brewing yeasts. *bioRxiv.* 2019;709535.

946 62. Lentz M, Putzke T, Hessler R, Luman E. Genetic and physiological characterization of yeast
947 isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential. *J. Inst. Brew.* 2014;120:559–
948 564.

949 63. Li H, Liu Y, Zhang W. Method for preparing non-alcoholic beer by *Candida shehatae*
950 (*Scheffersomyces shehatae*). 2011;Pat. CN102220198 B.

951 64. Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, Gonçalves P, Sampaio
952 JP. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc.*
953 *Natl. Acad. Sci.* 2011;108:14539–14544.

954 65. Lissner L. Non-alcoholic beer with maltose negative yeast strain *Saccharomyces ludwigii*.
955 Master Thesis at Department of Food Technology 2018. Lunds Universitet.

956 66. Liu S, Ying A, Quek H. Evaluation of Beer Fermentation with a Novel Yeast *Williopsis*
957 *saturnus*. *Food Technol. Biotechnol.* 2016;54:403–412.

958 67. Loviso CL, Libkind D. Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing
959 yeast: Esters. *Rev. Argent. Microbiol.* 2018;50:436–446.

960 68. Loviso CL, Libkind D. Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing
961 yeast: fusel alcohols. *Rev. Argent. Microbiol.* 2019;51:386-397.

962 69. Magalhães F, Vidgren V, Ruohonen L, Gibson B. Maltose and maltotriose utilisation by group
963 I strains of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *FEMS Yeast Res.* 2016;16, 1–11.

964 70. Meier-Dörnberg T, Kory OI, Jacob F, Michel M, Hutzler M. *Saccharomyces cerevisiae* variety
965 *diastaticus* friend or foe?. *FEMS Yeast Res.* 2018;18(4), foy023.

966 71. Mertens S, Steensels J, Saels V, De Rouck G, Aerts G, Verstrepen KJ. A large set of newly
967 created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Appl. Environ.*
968 *Microbiol.* 2015;81:8202–8214.

- 969 72. Mestre MC, Ulloa JR, Rosa CA, Lachance MA, Fontenla S. *Lachancea nothofagi* sp. nov., a
970 yeast associated with *Nothofagus* species in Patagonia, Argentina. Int. J. Syst. Evol. Microbiol.
971 2010;60:2247–2250.
- 972 73. Methner Y, Hutzler M, Matoulková D, Jacob F, Michel M. Screening for the Brewing Ability
973 of Different Non-Saccharomyces Yeasts. Fermentation. 2019;5(4):101.
- 974 74. Michel M, Meier-Dörnberg T, Jacob F, Methner FJ, Wagner RS, Hutzler M. Review: Pure non-
975 *Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and
976 practical applications. Journal of the Institute of Brewing. 2016;122(4):569-587.
- 977 75. Michel M, Kopecká J, Meier-Dörnberg T, Zarnkow M, Jacob F, Hutzler M. Screening for new
978 brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspora delbrueckii* as model. Yeast.
979 2016;33(4):129–144.
- 980 76. Montanari L, Marconi O, Mayer H, Fantozzi P. *Production of Alcohol-Free Beer*. In: [Preedy](#)
981 VR, editor. Beer in health and disease prevention, 1st edition. London, Academic Press. 2009, p. 61-
982 75.
- 983 77. Montandon G, Borelli B, De Causmaecker B, Praet T, Jaskula-Goiris B, Rosa A, Aerts G.
984 Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for top fermentation beer production. 12th
985 International Trends in Brewing Symposium, 2016, Abstract, Ghent, Bélgica.
- 986 78. Morata A, Loira I, Tesfaye W, Bañuelos MA, González C, Suárez Lepe JA. *Lachancea*
987 *thermotolerans* applications in wine technology. Fermentation. 2018; 4(3):53.
- 988 79. Mulero-Cerezo J, Briz-Redón Á, Serrano-Aroca Á. *Saccharomyces Cerevisiae* Var. *Boulardii*:
989 Valuable Probiotic Starter for Craft Beer Production. Applied Sciences. 2019;9(16):3250.
- 990 80. Nelson, Max. The barbarian's beverage: a history of beer in ancient Europe. Routledge, 2005.

991 81. Nespolo RF, Villarroel CA, Oporto CI, Tapia SM, Vega F, Urbina K, De Chiara M,
 992 Mozzachiodi S, Mikhalev E, Thompson D, Saenz-Agudelo P, Litti G, Cubillos FA. An Out-of-
 993 Patagonia dispersal explains most of the worldwide genetic distribution in *Saccharomyces eubayanus*.
 994 bioRxiv. 2019;709253.

995 82. Olaniran AO, Hiralal L, Mokoena MP, Pillay B. Flavour-active volatile compounds in beer:
 996 production, regulation and control. J. Inst. Brew. 2017;123:13–23.

997 83. Origone AC, del Monaco SM, Ávila JR, González Flores M, Rodríguez ME, Lopes CA.
 998 Tolerance to winemaking stress conditions of Patagonian strains of *Saccharomyces eubayanus* and
 999 *Saccharomyces uvarum*. Journal of applied microbiology. 2017;123(2) 450-463.

1000 84. Osburn K, Amaral J, Metcalf SR, Nickens DM, Rogers CM., Sausen C, Caputo R, Miller J, Li
 1001 H, Tennessen JM, Bochman ML. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer
 1002 production. Food Microbiol. 2018;70:76–84.

1003 85. Peris D, Sylvester K, Libkind D, Gonçalves P, Sampaio JP, Alexander WG, Hittinger CT.
 1004 Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing
 1005 hybrids. Mol. Ecol. 2014;23:2031–2045.

1006 86. Peris D, Langdon QK, Moriarty RV, Sylvester K, Bontrager M, Charron G, Leducq JB, Landry
 1007 CR, Libkind D, Hittinger CT. Complex ancestries of lager-brewing hybrids were shaped by standing
 1008 variation in the wild yeast *Saccharomyces eubayanus*. PLoS genetics. 2016;12(7).

1009 87. Porter TJ, Divol B, Setati ME. *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics
 1010 and oenological significance. Food research international. 2019.

1011 88. Preiss R, Tyrawa C, Krogerus K, Garshol LM, Van Der Merwe G. Traditional Norwegian
 1012 Kveik are a genetically distinct group of domesticated *Saccharomyces cerevisiae* brewing yeasts. Front.
 1013 Microbiol. 2018;9:2137.

- 1014 89. Preiss R, Netto I. How low can you go: Impact of inoculation rate on Norwegian kveik yeast
1015 fermentation. Master Brewers Conference, 2019, MBAA, Abstract 76, Calgary Alberta.
- 1016 90. Rodríguez ME, Pérez-Través L, Sangorrín MP, Barrio E, Lopes CA. *Saccharomyces eubayanus*
1017 and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in
1018 Patagonia. FEMS Yeast Res. 2014;14:948–965.
- 1019 91. Saerens S, Swiegers H. Enhancement of beer flavor by a combination of *Pichia* yeast and
1020 different hop varieties. 2014;1:Pat. US20140234480 A1.
- 1021 92. Saerens S, Swiegers J. Production of low-alcohol or alcohol-free beer with *Pichia kluyveri* yeast
1022 strains. 2017;Pat. 20170226451A1.
- 1023 93. Sannino C, Mezzasoma A, Buzzini P, Turchetti B. *Non-conventional Yeasts for Producing*
1024 *Alternative Beers*. In: Sibirny A, editor. Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application.
1025 Switzerland AG, Springer Nature, 2019, p. 361–88.
- 1026 94. Senkarcinova B, Alexandra I, Dias G, Nespor J, Branyik T. Probiotic alcohol-free beer made
1027 with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. LWT-Food Sci. Technol. 2018;100:362-367.
- 1028 95. Sohrabvandi S, Razavi SH, Mousavi SM, Rezaei K, Mortazavian A. Application of
1029 *Saccharomyces rouxii* for the production of on-alcoholic beer. Food Sci. Biotechnol. 2009;18:1132–
1030 1137.
- 1031 96. Spitaels F, Wieme AD, Janssens M, Aerts M, Daniel HM, Van Landschoot A, De Vuyst L,
1032 Vandamme, P. (2014). The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. PloS
1033 one. 2014;9(4): e95384.
- 1034 97. Steensels J, Verstrepen KJ. Taming Wild Yeast: Potential of Conventional and
1035 Nonconventional Yeasts in Industrial Fermentations. Annu. Rev. Microbiol. 2014;68:61–80.

- 1036 98. Steensels J, Daenen L, Malcorps P, Derdelinckx G, Verachtert H, Verstrepen KJ.
1037 *Brettanomyces* yeasts—From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations.
1038 International journal of food microbiology. 2015;206:24-38.
- 1039 99. Stewart GG, Hill AE, Russell I. 125th Anniversary Review: Developments in brewing and
1040 distilling yeast strains. J. Inst. Brew. 2013;119:202–220.
- 1041 100. Stewart GG. *Flavour Production by Yeast*. In: Stewart GG, editor. Brewing and Distilling
1042 Yeasts. Switzerland AG, Springer International Publishing, 2017, p. 325–57.
- 1043 101. Toh DWK, Chua JY, Lu Y, Liu SQ. Evaluation of the potential of commercial non-
1044 *Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspora delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer
1045 fermentation. Int. J. Food Sci. Technol. 2019;0–3.
- 1046 102. Tonsmeire, M. American Sour Beer: Innovative Techniques for Mixed Fermentations. Brewers
1047 Publications. 2014.
- 1048 103. Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H.
1049 Bioflavoring and beer refermentation. Applied Microbiology and Biotechnology. 2003;62(2-3):140-
1050 150.
- 1051 104. Verberg S. Brewery Scandinavian Yeast Rings : The curious case of the Twisted Torus. Brew.
1052 Hist. J. 2019;178:49-61.
- 1053 105. Vervoort Y, Herrera-Malaver B, Mertens S, Guadalupe Medina V, Duitama J, Michiels L,
1054 Derdelinckx G, Voordeckers K, Verstrepen KJ. Characterization of the recombinant *Brettanomyces*
1055 *anomalus* β -glucosidase and its potential for bioflavouring. Journal of applied microbiology.
1056 2016;121(3):721-733.
- 1057 106. Walker GM, Walker RS. *Enhancing yeast alcoholic fermentations*. In: Gadd G, Sariaslani S,
1058 editors. Advances in applied microbiology, Volume 105, 1st edition. Academic Press, 2018, pp. 87-
1059 129.

- 1060 107. White C, Zainasheff J. Yeast: the practical guide to beer fermentation. Brewers Publications.
1061 2010.
- 1062 108. Yakobson C. Pure culture fermentation characteristics of *Brettanomyces* yeast species and their
1063 use in the brewing industry. Brettanomycesproject.com [internet]. School of life sciences, Heriot-Watt
1064 University, Edinburgh; 2010 [citado 03 Feb 2020]. Available from:
1065 <http://brettanomycesproject.com/dissertation/>.
- 1066 109. Yeo HQ, Liu SQ. An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and
1067 prospects. Int. J. Food Sci. Technol. 2014;49:1607–1618.
- 1068 110. Zdaniewicz M, Satora P, Pater A, Bogacz S. Low Lactic Acid-Producing Strain of *Lachancea*
1069 *thermotolerans* as a New Starter for Beer Production. Biomolecules. 2020;10(2):256.

1070

1071

1072

1073

Tabla 1. Levaduras no convencionales más relevantes para la producción de cervezas diferenciales e innovadoras.

Especie	Fuente de aislamiento	Aplicaciones	Características	Cepas comerciales	Referencias
<i>Brettanomyces</i> spp.	Fermentaciones espontáneas Contaminante de bebidas alcohólicas	Fermentación primaria y co- inoculación Maduración Añejamiento <i>Bioflavoring</i> Cervezas bajas en calorías	Atenuación: > 90% <i>Flavor</i> : especiado, tropical, pera, uva, <i>Brett flavor</i> POF: positiva (VPR) Tolerancia a estrés: etanol; acidez; oxidativo; osmótico Otras: glucoamilasa +; β -glucosidasa +	[ECY04; ECY35; ECY36; ECY37; ECY38; ECY39] ^{ECY} [MYLBB1; MYBB2; MYBB3; MYBB4; MYBrett86; MYBrett87; MYOrval] ^{MY} [OYL-201; OYL-202; OYL-203; OYL-216] ^{OY} [WY5112; WY5151(PC); WY5526] ^{WY} [WLP640; WLP645; WLP648; WLP650; WLP653] ^{WLP} [MIP-701; MIP-702; MIP-703; MIP-710; MIP-714; MIP-720; MIP-750; MIP-760] ^{PL} [<i>Brettanomyces bruxelensis</i> ; <i>Brettanomyces clausenii</i> ; <i>Brettanomyces lambicus</i>] ^{LT} [W05; W10; W12; W13; W15; W16] ^{IV} [Brett B; Brett D; Brett Q; Brett L; Brett M; Brussels Brett; Berliner Brett I; Berliner Brett II] ^{EL} [TYB184; TYB207; TYB261; TYB307; TYB415] ^{YB}	6,23,25,43, 44,47,49,62 74,98,105

				[BB0022; BB0034A; BB0035C] ^{BB}	
<i>Hanseniaspora uvarum</i>	Ambientes naturales Alimentos y bebidas fermentadas	Cervezas <i>sour</i> <i>Bioflavoring</i>	Atenuación: nr <i>Flavor</i> : banana, solvente POF: nr Tolerancia a estrés: etanol Otras: producción de ácido láctico; β-glucosidasa+	[YH2] ^{WP}	6,31,73,84,96
<i>Lachancea fermentati</i>	Ambientes naturales Alimentos y bebidas fermentadas	Fermentación primaria y co-inoculación Cervezas <i>sour</i> NABLAB	Atenuación: <45% <i>Flavor</i> : cítrico, vinoso POF: negativa Tolerancia a estrés: iso-alfa ácidos Otras: producción de ácido láctico; floculación media	[MYLAY4] ^{MY}	9,84,87
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Ambientes naturales Alimentos y bebidas fermentadas	Fermentación primaria y co-inoculación <i>Bioflavoring</i> Cervezas <i>sour</i>	Atenuación: <65% <i>Flavor</i> : floral, miel POF: nr Tolerancia a estrés: iso-alfa ácidos	[YH39] ^{WP} [MYLAY5; MYLAY8] ^{MY} [CONCERTO TM] ^{CH} [LACHANCEA] ^{LLC}	18,33,84,87,110

			Otras: producción de ácido láctico y glicerol; β -glucosidasa +; floculación negativa; fermentación lenta	[LEVULIA [®] Alcomeno] ^{AEB}	
<i>Pichia kluyveri</i>	Ambientes naturales Alimentos fermentados	Co-inoculación <i>Bioflavoring</i> NABLAB	Atenuación: nr <i>Flavor</i> : banana, manzana POF: nr Tolerancia a estrés: osmótico; acidez Otras: biotransformación de tioles	[FROOTZEN [®]] ^{CH} [MIP-001] ^{PL}	6,49,73,74, 91,92
<i>Saccharomyces cerevisiae</i> (<i>Kveik</i>)	Granjas (<i>farmhouse</i>) de Noruega	Fermentación primaria <i>Bioflavoring</i>	Atenuación: 65 – 85% <i>Flavor</i> : tropical, cítrico, floral, miel POF: negativa Tolerancia a estrés: temperatura; secado; iso-alfa ácidos Otras: temperatura fermentación alta: > 28 °C; tasa de inóculo baja: 10 % de recomendada	[ECY43] ^{ECY} [Raftevold gård*; Framgarden*; Simonaitis*; Granvin*; Voss*; Midtbust*; Lærdal*; Wollsæter*] ^{MY} [OYL-057; OYL-061; OYL-091] ^{OY} [WLP518] ^{WLP} [MIP-340; MIP-342; MIP-343; MIP-350; MIP-352] ^{PL} [Seljeset] ^{LT} [A43; A44*; A46] ^{IY} [Hornindal*; Voss; Årset*; Ebbegarden*] ^{EL}	40,88,89

				[WLP4045] ^{YB} [Voss] ^L [Aurora; Oslo] ^{BB}	
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>boulardii</i>	Frutas tropicales (Lichi)	Fermentación primaria Cervezas funcionales NABLAB	Atenuación: < 65% <i>Flavor</i> : Frutal POF: nr Tolerancia a estrés: temperatura; acidez; etanol Otras: capacidad probiótica	[ECY03B] ^{ECY} [Chardonnay] ^{BB}	21,32,79,94
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i>	Contaminante de cervecerías	Fermentación primaria Maduración Añejamiento Cervezas bajas en calorías	Atenuación: > 90% <i>Flavor</i> : especiado, frutado POF: positiva Tolerancia a estrés: temperatura; etanol; iso-alfa ácidos Otras: glucoamilasa +	[Infectious Behavior] ^{MY} [OYL-019; OYL-025; OYL-026; OYL-027; OYL-039; OYL-042; OYL-056; OYL-200] ^{OY} [WY1388; WY3711; WY3724; WY3725-PC; WY3726; WY3739-PC; WY3822-PC; WY3864-PC] ^{WY} [WLP026; WLP038; WLP045; WLP073; WLP099; WLP351; WLP545; WLP565; WLP566; WLP570; WLP590; WLP644; WLP885] ^{WLP} [MIP-300; MIP-302; MIP-303; MIP-304; MIP-524] ^{PL}	70

				[A20; A24; B56; B64] ^{IY} [Spooky Saison; Wild Thing; Dry Belgian; St. Lucifer Belgian] ^{EL} [BE-134; WB-06] ^F [Belle Saison] ^L [M29] ^{MJ} [WLP4020; WLP4025] ^{YB}	
<i>S. eubayanus</i>	Ambientes naturales	Fermentación primaria y co-inoculación <i>Bioflavoring</i>	Atenuación: < 65% <i>Flavor</i> : especiado, ahumado POF: positiva Tolerancia a estrés: osmótico; etanol; iso-alfa ácidos Otras: floculación negativa; baja temperatura de fermentación; psicrófila	EUBY® [Bajo Licencia CONICET - UNComahue desde el IPATEC]	34,42,53,54, 56,64,69,71, 90
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Ambientes naturales Alimentos y bebidas fermentadas	Fermentación primaria y co-inoculación <i>Bioflavoring</i> NABLAB	Atenuación: < 65% <i>Flavor</i> : banana, ananá, floral, especiado leve (cepa dependiente) POF: positiva (cepa dependiente)	[YH52] ^{WP} [MYTD1; Earth Bender] ^{MY} [WLP603] ^{WLP} [PRELUDE TM] ^{CH} [BIODIVA TM] ^L	1,3,6,16,17, 19,20,52,75, 101

			Tolerancia a estrés: iso-alfa ácidos; etanol; osmótico; baja temperatura Otras: β-glucosidasa +		
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Ambientes naturales (roble) Alimentos y bebidas fermentadas	Co- inóculación <i>Bioflavoring</i> Cervezas <i>sour</i>	Atenuación: nr <i>Flavor</i> : pera, manzana, durazno POF: positiva Tolerancia a estrés: temperatura; acidez Otras: producción de ácido láctico; sensible a etanol	[MYLAY2] ^{MY}	6,18,26,31, 37,73;84

Flavor: sabor y aroma; POF: fenoles no deseados (*phenolic off flavors*); VPR: vinilfenol reductasa; nr: no reportado.

Empresas comerciales de levaduras no convencionales: ECY: East Coast Yeast (<http://www.eastcoastyeast.com/>); MY: Mainiacal Yeast (<https://www.mainiacalyeast.com/>); OY: Omega Yeast (<https://www.omegayeast.com/>); WY: Wyeast Laboratories (<https://wyeastlab.com/>); WLP: White Labs (<https://www.whitelabs.com/>); PL: Propagate Lab (<https://www.propagatelab.com/>); LT: Lev Teck (<https://www.levteck.com.br/>); IY: Imperial Yeast (<https://www.imperialyeast.com/>); EL: Escarpments Labs (<https://www.escarpmentlabs.com/>); YB: The Yeast Bay (<https://www.theyeastbay.com/>); BB: Bootleg Biology (<https://bootlegbiology.com/>); WP: Wild Yeast Pitch (<http://wildpitchyeast.com/>); CH: Chr-hansen (<https://www.chr-hansen.com/>); LLC: Lachancea LLC (<https://lachancea.squarespace.com/>); AEB: AEB (<https://aebusa.myshopify.com/>); L: Lallemmand (<https://www.lallemmandbrewing.com/>); F: Fermentis (<https://fermentis.com/>); MJ: Mangrove Jacks (<https://mangrovejacks.com>)

Figura 1. Cladograma de las especies de levaduras no convencionales de interés para el sector cervecero.

Las relaciones de parentesco entre las especies está basado en la publicación de Daniel y col. (2014)²⁸ y datos propios. Se detallan las familias en las que se agrupan las distintas especies de levaduras, junto con las características y aplicaciones más relevantes para su aplicación en la producción de cerveza. *Especies con formato comercial disponible. POF: fenoles no deseados, por sus siglas en inglés. *Bioflavoring*: producción de cervezas con características de aroma y sabor diferenciales. NABLAB: cervezas sin alcohol o bajas en alcohol (según sus siglas en inglés). Bajas calorías: cervezas con bajo contenido de carbohidratos. *Sour*: Cervezas ácidas.

- Presentan las características/aplicaciones detalladas ○ No presentan las características/aplicaciones detalladas
- Las características/aplicaciones detalladas son cepa dependiente. La especie *Saccharomyces pastorianus* no se encuentra representada debido a que no es una especie biológicamente reconocida por tratarse de un híbrido.