



## ARTÍCULO ESPECIAL

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



Julieta Amalia Burini<sup>a</sup>, Juan Ignacio Eizaguirre<sup>b</sup>, Claudia Loviso<sup>c</sup> y Diego Libkind<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Centro de Referencia en Levaduras y Tecnología Cervecera (CRELTEC), Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), CONICET - Universidad Nacional del Comahue, San Carlos de Bariloche, Argentina

<sup>b</sup> Laboratorio de Biología Celular de Membranas (LBCM), Instituto de Fisiología, Biología Molecular y Neurociencias (IFIByNE-CONICET), FCEN-UBA, Pabellón IFIByNE, Buenos Aires, Argentina

<sup>c</sup> Centro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR), CONICET, Puerto Madryn, Argentina

Recibido el 10 de marzo de 2020; aceptado el 4 de enero de 2021

Disponible en Internet el 3 de marzo de 2021

## PALABRAS CLAVE

Levaduras no convencionales;  
*Brettanomyces*;  
*Torulaspota*;  
*Lachancea*;  
*Saccharomyces eubayanus*;  
Cervezas alternativas;  
*Bioflavoring*;  
Cerveza artesanal

**Resumen** En la elaboración de cerveza las levaduras cumplen un rol fundamental. Además de ser 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 el 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 las 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 herramientas 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*, *Torulaspota*, *Lachancea*, *Wickerhamomyces*, *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 y su capacidad de asimilar y metabolizar diferentes componentes del mosto y de aportar características particulares al producto final. Este trabajo provee el estado del arte sobre levaduras no convencionales, lo que resulta 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.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Este es un artículo Open Access bajo la licencia CC BY-NC-ND (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

\* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: [libkindfd@comahue-conicet.gob.ar](mailto:libkindfd@comahue-conicet.gob.ar) (D. Libkind).

**KEYWORDS**

Non-conventional yeast;  
*Brettanomyces*;  
*Torulaspota*;  
*Lachancea*;  
*Saccharomyces eubayanus*;  
 Alternative beers;  
 Bioflavoring;  
 Craft beer

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

**Abstract** Yeasts play a crucial role in brewing. During fermentation, besides ethanol and carbon dioxide, yeasts produce a considerable number of organic compounds, which are essential for beer flavor. In particular, *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces pastorianus* are traditionally used in the production of ale and lager beers, respectively. Nowadays, the continuous growth of the craft beer market motivates the production of differential and innovative beers; leading specialists and brewers focus on non-conventional yeasts as tools for new product development. In this work, we describe the potential application of non-conventional yeast species such as those of the genera *Brettanomyces*, *Torulaspota*, *Lachancea*, *Wickerhamomyces*, *Pichia* and *Mrakia* in the craft brewing industry, as well as non-traditional brewing yeasts of the *Saccharomyces* genus. Furthermore, the fermentation conditions of these non-conventional yeasts are discussed, along with their abilities to assimilate and metabolize diverse wort components providing differential characteristics to the final product. In summary, we present a comprehensive review of the state-of-the-art of non-conventional yeasts, which is highly relevant for their application in the production of novel craft beers including flavored beers, non-alcoholic beers, low-calorie beers and functional beers.

© 2021 Asociación Argentina de Microbiología. Published by Elsevier España, S.L.U. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

**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 (generalmente, de cebada) malteados, al que se le incorpora lúpulo<sup>73</sup>. 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*). 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 complejidad de aromas y sabores frutales, florales o especiados. Por su parte, las cervezas de fermentación baja (cervezas lager) se producen utilizando la especie híbrida *Saccharomyces pastorianus* (*S. cerevisiae* x *Saccharomyces 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<sup>40,85</sup>.

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 la que se utilizan en mayor proporción levaduras ale, puede modificar sensiblemente estos valores en el futuro cercano. Existen en la actualidad 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. Estas cervezas surgen de un proceso de fermentación espontánea 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<sup>20,88,89</sup>. Múltiples especies de levaduras y bacterias se desarrollan durante este proceso de fermentación espontánea, que consta de distintas fases: una fase inicial, donde predominan las enterobacterias y algunas levaduras no sacaromícéticas (como *Hanseniaspora*, *Naumovia*, *Kluyveromyces*, *Rhodotorula* y *Pichia* spp.), una fase de fermentación alcohólica principal, liderada por levaduras del género *Saccharomyces*, seguida de una fase ácida llevada a cabo por bacterias ácido lácticas (BAL), y, en menor medida, bacterias ácido acéticas (BAA); finalmente, el nicho es ocupado por levaduras del género *Brettanomyces*, que predominarán en la maduración durante meses o años aportando a la complejidad de aromas y sabores de estos estilos de cerveza<sup>88,89</sup>.

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 específicas<sup>85</sup>. Estas levaduras cerveceras fueron evolucionado a través de procesos de selección natural y artificial, y llevaron a la generación de cepas altamente especializadas y adaptadas (proceso de domesticación)<sup>26</sup>. 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 su producción<sup>89</sup>. Las levaduras cerveceras por excelencia pertenecen al género *Saccharomyces* y esto se debe, básicamente, a aspectos claves como la producción eficiente de etanol, la ausencia de producción de toxinas (inocuidad), la alta tolerancia al etanol y la 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<sup>85,89</sup>. En este trabajo se utilizará la palabra *flavor* para designar la combinación de aromas, sabores y sensaciones percibidos en la boca.

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, dichos compuestos tienen un impacto mínimo en el aroma y sabor; en cambio, es la concentración de los diversos productos metabólicos secundarios lo que determina, principalmente, el balance de *flavor* de la cerveza<sup>26,75</sup>. Estos productos secundarios son intermediarios en vías metabólicas que van desde el catabolismo de los componentes del mosto (azúcares, compuestos nitrogenados y compuestos azufrados) hasta la síntesis de los componentes necesarios para el crecimiento de la levadura (aminoácidos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos), y corresponden a carbonilos (aldehídos y cetonas), alcoholes superiores (*fusel*), ésteres, dicetonas vecinales (diacetilo y pentanodiona), ácidos grasos, ácidos orgánicos, compuestos azufrados y compuestos fenólicos (conocidos como POF, *phenolic off flavors*, fenoles no deseados)<sup>75,91</sup>. En trabajos de revisión previos se ha profundizado en los factores que regulan la síntesis de ésteres<sup>60</sup> y alcoholes superiores<sup>61</sup> en las levaduras cerveceras. Sin duda, los compuestos de sabor y aroma deben mantenerse dentro de ciertos límites o pueden predominar y perjudicar el balance organoléptico de la cerveza<sup>75,91</sup>. Además de la amplia gama de productos metabólicos generados por las levaduras, éstas también tienen un rol activo en procesos de biotransformación, ya que son capaces de convertir precursores no volátiles e inodoros (en particular, del lúpulo) en compuestos de *flavor*, aumentando así el potencial organoléptico del mosto<sup>6,89</sup>. Las cepas de levaduras son tan diversas como los aromas y sabores resultantes; por lo tanto, la elección de aquella deberá apuntar a las características organolépticas deseadas en los estilos de cerveza producidos<sup>98</sup>.

A pesar del uso generalizado de las levaduras cerveceras tradicionales, las levaduras no convencionales han comenzado a ganarse un lugar en las cervecerías. El crecimiento del segmento de cerveza artesanal y el creciente número de consumidores especializados han impulsado la búsqueda de estrategias para la diferenciación productiva, y el papel de las diferentes levaduras como protagonistas en la generación de productos innovadores y con características distintivas ha recibido especial atención<sup>30</sup>. Generalmente, las levaduras no convencionales presentan bajos rendimientos de fermentación y son más sensibles al estrés por etanol, pero abren un abanico de posibilidades al proporcionar aromas y sabores distintivos, así como nuevos enfoques y características que impactan en el perfil organoléptico de la cerveza<sup>6,68</sup>. En el sector de alimentos y bebidas, la producción o el aumento de compuestos de *flavor* a través de sistemas biológicos se conoce como *bioflavoring*<sup>94</sup>; en este contexto, diversas especies de levaduras no convencionales han sido indicadas como agentes factibles para acentuar, mejorar y diversificar las características sensoriales de la cerveza<sup>6</sup>. El término *bioflavoring* será utilizado a lo largo de este trabajo de revisión basado en esta capacidad de mejorar,

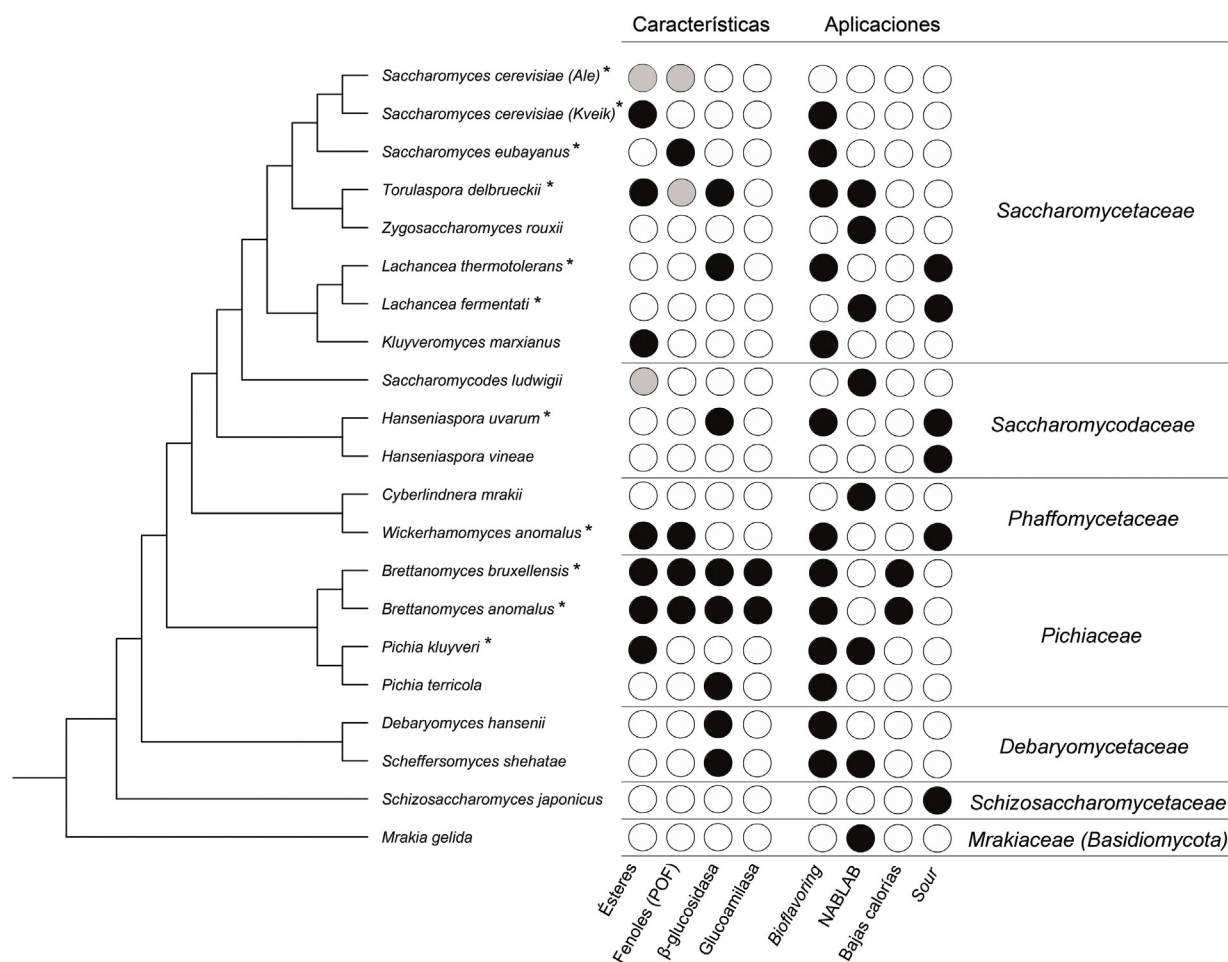
o aumentar o diversificar las propiedades organolépticas de *flavor* (aroma, sabor y sensación en boca). Además del *bioflavoring*, se han destacado otras aplicaciones a partir de levaduras no convencionales, como la producción de cervezas bajas en calorías, cervezas sin alcohol o bajas en alcohol (*non-alcoholic beer and low-alcohol beer sector, NABLAB*) y cervezas funcionales<sup>20,30</sup>.

Para atender a estas innovaciones de la demanda, se han estudiado e incluso utilizado levaduras que pertenecen al mismo género que las levaduras cerveceras (*Saccharomyces*), así como también levaduras pertenecientes a grupos taxonómicos distintos de *Saccharomyces*. Las primeras involucran levaduras industriales de *S. cerevisiae*, pero domesticadas para otros procesos fermentativos (como *cachaça*, sake, 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 filum Ascomycota (de los géneros *Brettanomyces*, *Torulaspota*, *Lachancea*, *Hanseniaspora*, *Saccharomycodes*, *Zygosaccharomyces*, *Pichia*, entre otros) y, en pocos casos, al filum Basidiomycota (por ej. *Mrakia*)<sup>29</sup>.

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<sup>27</sup> entre las distintas especies de levaduras descritas, junto con sus principales características y potenciales aplicaciones en el sector cervecero.

## Levaduras no convencionales en la industria cervecera

Actualmente, existen más de 1.500 especies conocidas de levaduras repartidas en los filum Ascomycota y Basidiomycota, de las cuales solo el 30% (la mayoría, Ascomycota) tiene la capacidad de fermentar azúcares simples<sup>52</sup>. Estudios de más de 100 especies diferentes en los que se evaluó el rendimiento de fermentación y el potencial de producción de compuestos aromáticos (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<sup>36,67</sup>. Los estudios orientados a la selección y la aplicación de levaduras no convencionales en la producción de cerveza, generalmente, estudian características como la utilización de maltosa (principal azúcar del mosto), el desempeño fermentativo, la tolerancia al etanol y a bajas temperaturas, la tolerancia a los compuestos que provienen del lúpulo, la utilización de aminoácidos, la formación de POF y de compuestos de sabor y aroma, y también la síntesis de enzimas que interactúan con el lúpulo (como las  $\beta$ -glucosidasas)<sup>26,67,92,96</sup>. En pocos años, las levaduras no convencionales cambiaron su papel de microorganismos potencialmente indeseables asociados al deterioro de los alimentos (incluida la cerveza) a agentes claves en el



**Figura 1** Cladograma de las especies de levaduras no convencionales de interés para el sector cervecero. Las relaciones de parentesco entre las especies están basadas en la publicación de Daniel et al. (2014)<sup>27</sup> 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 uso en la producción de cerveza.

POF: fenoles no deseados; *bioflavoring*: producción de cervezas con características de aroma y sabor diferenciales; NABLAB: cervezas sin alcohol o bajas en alcohol; bajas calorías: cervezas con bajo contenido de hidratos de carbono; *sour*: cervezas ácidas.

\* Especies con formato comercial disponible.

● 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.

desarrollo de productos innovadores para ganar una posición de mercado en el segmento cervecero<sup>85</sup>. A continuación, se mencionan los ejemplos más destacados de levaduras no convencionales en investigación o con aplicación en la industria cervecera, agrupándolas como levaduras sacaromícéticas «alternativas» o bien levaduras no sacaromícéticas.

### Saccharomyces alternativas

Dentro de las levaduras sacaromícéticas no convencionales se distinguen aquellas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, pero que son distintas de las levaduras cerveceras ale. Puede tratarse de cepas de *S. cerevisiae* provenientes de cervezas con características muy particulares o de regiones geográficas determinadas (por lo que han atravesado

trayectorias de domesticación diferentes, por ejemplo, las levaduras *farmhouse*), o bien de cepas aisladas de ambientes naturales (salvajes) o de otras bebidas tradicionales (por ej. *cachaça*, *chicha*, *sake*)<sup>26</sup>; asimismo, pueden encontrarse dentro de esta especie variedades con características muy distintas (como *S. cerevisiae* var. *diastaticus*). Por su parte, las levaduras sacaromícéticas no convencionales pueden incluir también a especies distintas a *S. cerevisiae*, como lo es la especie *S. eubayanus*.

### 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, y

son un ejemplo de levaduras sacaromycéticas no convencionales que sufrieron un proceso de domesticación diferente al de las variedades cerveceras tradicionales<sup>37</sup>. 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 Noruega<sup>37</sup>. 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 solo 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<sup>80,95</sup>. 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 y han atravesado un proceso de domesticación diferente<sup>80,95</sup>. Esto explica por qué, en un estudio reciente que exploró diez cepas distintas, las *kveik* fueron reconocidas como un grupo genético y fenotípicamente distinto de levaduras cerveceras tradicionales, con propiedades relevantes para la elaboración de la cerveza<sup>26,80</sup>. Los cultivos de *kveik* son cultivos mixtos que consisten, principalmente, en múltiples cepas diferentes de *S. cerevisiae*<sup>37</sup>.

En general, estas levaduras son muy floculantes, con gran tolerancia al etanol, no producen fenoles (POF<sup>-</sup>), atenúan el mosto dentro del rango esperado para cepas cerveceras domesticadas (65-85% de atenuación<sup>97</sup>) y exhiben una alta velocidad de fermentación (posiblemente, debido a que los cerveceros noruegos prefieren un corto tiempo de fermentación, a menudo de solo uno o dos días, antes de transferir al barril)<sup>37,80</sup>. Las *kveik* presentan, además, tolerancia a altas temperaturas, característica que se mantuvo en estas levaduras debido a la práctica tradicional de inocular y fermentar mostos a temperaturas altas en relación con los estándares modernos (entre 35 y 40 °C), posiblemente dada por la incapacidad de enfriar el mosto de manera rápida y eficiente<sup>38</sup>. Así, una característica diferencial es que estas levaduras pueden ser utilizadas en fermentaciones a altas temperaturas sin la producción de *off flavors* (en particular, de alcoholes superiores)<sup>37,80</sup>. Los cerveceros noruegos tradicionales usan una tasa de inoculación mucho más baja que la típica para la producción de cerveza (aproximadamente, del 10% de la tasa de inoculación habitual), incluso en mostos de alta densidad, sin producción de *off flavors* o cambios sensoriales evidentes<sup>81</sup>. Inocular a una tasa estándar (0,75-1,5 × 10<sup>6</sup> cél./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 producto<sup>37</sup>. 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; entre ellos cabe mencionar el caproato de etilo (ananá, tropical), el octanoato de etilo (ananá, tropical, manzana, coñac) y el decanoato de etilo (manzana), así como el acetato de fenetilo (miel, floral), e incluso,

un sabor intrigante (aún no completamente caracterizado) a hongos<sup>37</sup>. 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 cervecías se está convirtiendo en una práctica popular en América y ya es posible acceder a distintas cepas de estas levaduras en formato comercial (tabla 1).

### Otras *Saccharomyces cerevisiae*

Muchas otras bebidas fermentadas tradicionales (como *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<sup>26</sup>. Araújo et al. 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, con baja producción de sulfuros y floculación alta, lo que posibilitaría la producción de cervezas ale y lager de calidad aceptable<sup>2</sup>. Montandon et al. 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, y pudieron seleccionar levaduras con gran potencial cervecero<sup>70</sup>. Una cepa fue posteriormente probada a escala semipiloto en las instalaciones de una microcervecía (Grimor Brewery®, Brasil), con lo que se logró desarrollar la primera cerveza con una levadura aislada en Brasil; esta cerveza fue lanzada al mercado bajo el nombre de Grimor 18. Además de conseguirse resultados de elevada reproducibilidad en cuanto a los parámetros de fermentación y compuestos aromáticos producidos, la cerveza también tuvo aprobación por los consumidores<sup>70</sup>.

### 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, tal es el caso de *S. cerevisiae* variedad *diastaticus* y *S. cerevisiae* var. *boulardii*.

A diferencia de la mayoría de las *S. cerevisiae* cerveceras (ale), *S. cerevisiae* var. *diastaticus* tiene la capacidad de hidrolizar las dextrinas del mosto en azúcares fermentables, lo que causa un alto grado de atenuación (> 90%, cuando para levaduras cerveceras lo normal es entre 65 y 85%<sup>97</sup>). Esto se debe a que poseen genes *STA*, los que permiten que la levadura produzca y secrete la enzima glucoamilasa, responsable de la capacidad hidrolítica mencionada (fenotipo STA<sup>+</sup>)<sup>50,64</sup>; esto constituye una ventaja competitiva respecto de las levaduras cerveceras, ya que les permite seguir desarrollándose en la cerveza terminada (ambiente rico en dextrinas)<sup>49,64</sup>. Además, su capacidad súper atenuante

**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 coinoculación 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 +; $\beta$ -glucosidasa +	[ECY04; ECY35; ECY36; ECY37; ECY38; ECY39] <sup>ECY</sup> [MYLBB1; MYBB2; MYBB3; MYBB4; MYBrett86; MYBrett87; MYOrval] <sup>MY</sup> [OYL-201; OYL-202; OYL-203; OYL-216] <sup>OY</sup> [WY5112; WY5151(PC); WY5526] <sup>WY</sup> [WLP640; WLP645; WLP648; WLP650; WLP653] <sup>WLP</sup> [MIP-701; MIP-702; MIP-703; MIP-710; MIP-714; MIP-720; MIP-750; MIP-760] <sup>PL</sup> [ <i>Brettanomyces bruxelensis</i> ; <i>Brettanomyces clausenii</i> ; <i>Brettanomyces lambicus</i> ] <sup>LT</sup> [W05; W10; W12; W13; W15; W16] <sup>IY</sup> [Brett B; Brett D; Brett Q; Brett L; Brett M; Brussels Brett; Berliner Brett I; Berliner Brett II] <sup>EL</sup> [TYB184; TYB207; TYB261; TYB307; TYB415] <sup>YB</sup> [BB0022; BB0034A; BB0035C] <sup>BB</sup> [YH2] <sup>WP</sup>	6,22-25,41-43,55,68,90,96
<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; $\beta$ -glucosidasa +	[MYLAY4] <sup>MY</sup>	6,30,67,77,88
<i>Lachancea fermentati</i>	Ambientes naturales Alimentos y bebidas fermentadas	Fermentación primaria y coinoculación 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] <sup>MY</sup>	9,11,77,79
<i>Lachancea thermotolerans</i>	Ambientes naturales Alimentos y bebidas fermentadas	Fermentación primaria y coinoculación <i>Bioflavoring</i> Cervezas <i>sour</i>	Atenuación: < 65% <i>Flavor</i> : floral, miel POF: nr Tolerancia a estrés: iso-alfa ácidos Otras: producción de ácido láctico y glicerol; $\beta$ -glucosidasa positiva; floculación negativa; fermentación lenta	[YH39] <sup>WP</sup> [MYLAY5; MYLAY8] <sup>MY</sup> [CONCERTO <sup>TM</sup> ] <sup>CH</sup> [LACHANCEA] <sup>LLC</sup> [LEVULIA <sup>?</sup> Alcomeno] <sup>AEB</sup> [WildBrew <sup>TM</sup> Philly Sour] <sup>L</sup> ( <sup>€</sup> )	18,31,77,79,100

**Tabla 1** (continuación)

Especie	Fuente de aislamiento	Aplicaciones	Características	Cepas comerciales	Referencias
<i>Pichia kluyveri</i>	Ambientes naturales Alimentos fermentados	Coinoculación <i>Bioflavoring</i> NABLAB	Atenuación: nr <i>Flavor</i> : banana, manzana POF: nr Tolerancia a estrés: osmótico; acidez Otras: biotransformación de tioles	[FROOTZEN <sup>?</sup> ]CH [MIP-001]PL	6,43,67,68,83,84
<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 la recomendada	[ECY43]ECY [Raftenvold gård*; Framgarden*; Simonaitis*; Granvin*; Voss*; Midtbust*; Lærdal*; Wollsæter*]MY [OYL-057; OYL-061; OYL-091]OY [WLP518;WLP520]WLP [MIP-340; MIP-342; MIP-343; MIP-350; MIP-352]PL [Seljeset]LT [A43; A44*; A46]IY [Hornindal*; Voss; Årset*; Ebbegarden*]EL [WLP4045]YB [Voss]L [Aurora; Oslo]BB	37,38,80,81
<i>S. cerevisiae</i> var. <i>bouardii</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	21,72,86
<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 [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	49,50,54,64

Tabla 1 (continuación)

Especie	Fuente de aislamiento	Aplicaciones	Características	Cepas comerciales	Referencias
<i>S. eubayanus</i>	Ambientes naturales	Fermentación primaria y coinoculación <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]	32,40,46-48,57,62,63,65,74,82,93
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	Ambientes naturales Alimentos y bebidas fermentadas	Fermentación primaria y coinoculación <i>Bioflavoring</i> NABLAB	Atenuación: < 65% <i>Flavor</i> : banana, ananá, floral, especiado leve (dependiente de la cepa) POF: positiva (dependiente de la cepa) Tolerancia a estrés: iso-alfa ácidos; etanol; osmótico; baja temperatura Otras: β-glucosidasa +	[YH52] <sup>WP</sup> [MYTD1; Earth Bender] <sup>MY</sup> [WLP603] <sup>WLP</sup> [PRELUDE <sup>TM</sup> ] <sup>CH</sup> [BIODIVA <sup>TM</sup> ] <sup>L</sup>	1,3,6,16,17,19,20,45,69,92
<i>Wickerhamomyces anomalus</i>	Ambientes naturales (roble) Alimentos y bebidas fermentadas	Coinoculación <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] <sup>MY</sup>	6,18,26,30,34,67

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

(€) Figura como *Lachancea* spp.

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: Lallemand (<https://www.lallemandbrewing.com/>); F: Fermentis (<https://fermentis.com/>); MJ: Mangrove Jacks (<https://mangrovejacks.com/>).



nuante puede generar una fermentación secundaria, con formación excesiva de dióxido de carbono en botellas, latas o barriles, así como cambios en el sabor, sedimentación y aumento de la turbidez<sup>64</sup>; en casos extremos, incluso puede producirse la explosión de envases, lo que pone en peligro al consumidor<sup>50</sup>. Por otra parte, la enzima glucoamilasa ha tomado importancia para el sector cervecero debido a su aplicación en la producción del nuevo estilo Brut IPA, así como para la producción de cervezas bajas en hidratos de carbono. *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 cerveza<sup>64</sup>. La capacidad de producir fenoles (fenotipo POF<sup>+</sup>), que ocurre como resultado de la descarboxilación del ácido ferúlico y ácido 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 de lectura en estos genes, que los vuelven no funcionales (POF<sup>-</sup>)<sup>48</sup>. La mayoría de las cepas estudiadas de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* son productoras de POF, por lo que imparten *flavors* dominantes especiados y a clavo de olor en la cerveza. Debido a todas las características descriptas, *S. cerevisiae* var. *diastaticus* es considerado uno de los microorganismos contaminantes más peligrosos en cervecerías. Sin embargo, es parte de un grupo de levaduras domesticadas muy especializadas que pertenecen a un importante linaje de levaduras cerveceras<sup>49</sup>. De hecho, son utilizadas en la producción de estilos tradicionales (como *Saison*, que actualmente está creciendo en popularidad) y muestran potencial para la creación de nuevos productos con características distintivas<sup>50</sup>. En este contexto, Meier-Dörnberg et al. estudiaron el potencial de aplicación de estas levaduras en la producción de cerveza y encontraron que, además de fermentar dextrinas y producir fenoles, las seis cepas evaluadas presentaban perfiles de sabor y aroma interesantes y diferenciales<sup>64</sup>. 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 citados autores concluyen que la especie *S. cerevisiae* var. *diastaticus* es adecuada para producir cervezas con buenas características organolépticas en condiciones clásicas de fermentación, y que también podrían aplicarse en fermentaciones secundarias o mixtas para producir cervezas con sabores especiales o con bajo contenido de hidratos de carbono<sup>64</sup>.

Otra variedad dentro de la especie *S. cerevisiae* cuyo potencial en la industria cervecera ha sido estudiado (y que se desarrollará en una sección posterior) 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<sup>21,72</sup>.

### *Saccharomyces eubayanus*

Si bien era sabido que la levadura involucrada en la elaboración de cerveza lager era un híbrido entre dos especies de levaduras sacaromycéticas 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 *S. eubayanus*, que posee una coincidencia genética del 99,6% con la parte parental no-*S. cerevisiae* del híbrido lager<sup>57</sup>. Esta especie, en su estado original o puro, se encuentra exclusivamente en los ambientes naturales, en particular, asociada a árboles como los del género *Nothofagus* (típicos de los bosques de la Patagonia argentina); su presencia fue demostrada en muestras de corteza, hojas, suelo y del hongo endémico *Cyttaria* spp.<sup>57,82</sup>. Unos pocos aislamientos fueron obtenidos de bosques en el este de Asia<sup>13</sup>, América del Norte<sup>78</sup> y Nueva Zelanda<sup>39</sup>, pero sorprendentemente no en Europa (posible sitio original del evento de hibridización que dio 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 promisoría en levaduras cerveceras para la producción de cervezas lager, ya que la baja temperatura es el factor principal que determina sus propiedades sensoriales, y *S. eubayanus* es una de las especies con mayor tolerancia al frío dentro del género *Saccharomyces*, ya que puede crecer rápida y eficientemente a 10 °C<sup>40,46,65</sup>. Respecto de sus capacidades fermentativas, *S. eubayanus* fermenta la glucosa y maltosa del mosto cervecero, y es capaz de llegar a valores de atenuación promedio del 65%<sup>32,47,62</sup>. Se ha propuesto que la baja atenuación observada para esta especie en comparación con las levaduras cerveceras lager (aproximadamente del 85%) es el resultado de la incapacidad de *S. eubayanus* para fermentar maltotriosa<sup>32,40,47,48,62,63,74</sup>. Se realizaron ensayos del consumo con maltotriosa marcada ([<sup>14</sup>C]-maltotriosa), que demostraron que *S. eubayanus* es incapaz de transportar este azúcar, y, por lo tanto, de fermentarlo<sup>40,62</sup>. En las levaduras lager (y algunas ale), la asimilación de maltotriosa ocurre debido a la presencia de genes que codifican permeasas, como *MTT1* y *AGT1*. Inicialmente se consideró que éstas venían del genoma del parental *S. eubayanus*. Sin embargo, ninguno de los genomas disponibles de *S. eubayanus* contiene el gen *MTT1*, aunque se han observado algunos fragmentos de ADN semejantes al *AGT1*<sup>4,62</sup>. Hasta el momento, no se ha logrado que cepas salvajes de *S. eubayanus* asimilaran la maltotriosa, sino solo a través de estrategias de modificación genética<sup>5,14</sup>. Por su parte, esta especie presenta baja floculación, evidenciada por la biomasa en suspensión<sup>46,47</sup>. En cuanto a la producción de compuestos de aroma y sabor, *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<sup>46,63,65,93</sup>. Produce, además, concentraciones moderadas a altas de alcoholes superiores, como el alcohol fenilico (aroma a rosas)<sup>93</sup> y otros 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<sup>46,65</sup>. Se observó, también, la producción de aromas sulfurados (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*)<sup>65</sup>. Tal vez el aroma y sabor más carac-

terístico asociado a las cervezas de *S. eubayanus* es el *flavor* a clavo de olor y/o ahumado, derivado principalmente del 4-vinilguaiacol (4-VG)<sup>46,65,93</sup> y del 4-vinilfenol (4-VF)<sup>33</sup>. 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 valor<sup>41</sup>.

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, donde se realizó la transferencia de la levadura EUBY® (tabla 1) a 11 cervecerías de Bariloche y El Bolsón (Río Negro, Argentina), 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<sup>32,53,74</sup>. 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 y su posterior malteado local, fue posible elaborar la primera cerveza 100% patagónica.

## Levaduras no sacaromícéticas

### *Brettanomyces*

Podría decirse que las levaduras no convencionales por excelencia son aquellas pertenecientes al género *Brettanomyces* (antiguamente denominadas *Dekkera*), y que son las especies *B. bruxellensis* y *B. anomalus* (esta última, también conocida como *B. claussenii*) las comúnmente relacionadas con la industria cervecera<sup>6,41,85</sup>. 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 y una 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 alcohólica<sup>22</sup>. 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 asimilación de nitrato y la producción de otros aromas característicos que

umentan la complejidad del *flavor* de las bebidas fermentadas, han puesto a esta especie en el centro de atención<sup>22</sup>.

Históricamente, *Brettanomyces* ha resultado esencial para la producción de determinados estilos de cerveza (*lámbicas*, *gueuze*, otras *belgian sours*). En la actualidad, 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<sup>22,25,90</sup>. Quizás la diferencia de un *flavor* más destacado con las cepas de levadura *Brettanomyces* obedece a la producción de fenoles volátiles. Se trata de una conversión en dos pasos donde los ácidos ferúlico y p-cumárico 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 fenilacético (*PAD1*), mientras que una vinilfenol reductasa (*VPR*) es responsable de la etapa de reducción<sup>42</sup>. 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 solo pequeñas cantidades de 4-VG y 4-VP<sup>43,90</sup>. El umbral de percepción para estos compuestos es muy bajo, con diversos descriptores de *flavor* asociados a sudor de caballo, cuero, especiado, medicinal y ahumado, entre otros<sup>22</sup>. Colomer et al. identificaron por primera vez una cepa de *B. anomalus* POF<sup>-23</sup>. Esta cepa (CRL-90) ha perdido el gen *PAD1*, lo que la convierte en un buen candidato para la obtención de cervezas con las características distintivas de *Brettanomyces*, pero sin la fuerte impronta dada por los compuestos fenólicos<sup>23</sup>. 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 isoamilol -banana- y el acetato de fenilol -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)<sup>25,68</sup>. 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, vino<sup>22</sup>. Muchos términos diferentes, como clavo, picante, corral, ahumado, plástico, fenólico, medicinal, *band-aid*®, metálico, cuero húmedo, *biscuit*, sudor, cabra, manzana, floral, fruta tropical, cítrico o especiado, se utilizan para describir el perfil de aroma de las cervezas producidas con *Brettanomyces*, pero suelen resumirse más convenientemente como *Brett flavor*<sup>90</sup>.

Por otro lado, estas levaduras producen distintas enzimas glucosidasas 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, enzimas que le permiten hidrolizar estos azúcares complejos en unidades de glucosa y

producir cervezas «súper atenuadas», con niveles de etanol ligeramente más altos y concentraciones más bajas de azúcares residuales (y, por lo tanto, contenidos calóricos más bajos)<sup>90</sup>.

Otra enzima de relevancia producida por *Brettanomyces* es la  $\beta$ -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 por enlaces glucosídicos, lo que agrega complejidad al perfil de *flavor* de los vinos y cervezas<sup>41</sup>. 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 el salicilato de metilo (menta y especiado)<sup>22,41</sup>.

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<sup>96</sup>. Un estudio de  $\beta$ -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  $\beta$ -glucosidasa de *B. anomalus* fue aislada y caracterizada para su potencial uso como agente natural de *bioflavoring*<sup>96</sup>. La actividad de las  $\beta$ -glucosidasas puede verse inhibida por altas concentraciones de alcohol, y su rango de pH óptimo es 5-6<sup>98</sup>. Por su parte, Colomer et al. observaron la transformación de linalol y geraniol a  $\alpha$ -terpineol y  $\beta$ -citronelol, independientemente de la actividad  $\beta$ -glucosidasa de las cepas estudiadas, y relacionaron esta actividad a una contribución directa de proteínas oxidoreductasas<sup>24</sup>.

La mayoría de los estudios realizados con *B. bruxellensis* y *B. anomalus* sugieren el potencial uso de estas levaduras como cultivo puro<sup>36,55</sup>. 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 una buena opción para el desarrollo de nuevas variedades de cerveza<sup>43,55,68</sup>.

Solo 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  $2 \times 10^5$  cél./mL resulta efectiva (mucho más baja que la utilizada para ale o lager, que es  $0,75-1,5 \times 10^6$  cél./mL)<sup>98</sup>. Al realizar cervezas en barrica de madera nuevas, la recomendación es inocular el doble de esa tasa, de modo que la levadura pueda establecerse<sup>98</sup>. 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. Sin

embargo, procedimientos adecuados de limpieza y sanitización minimizan estos riesgos<sup>98</sup>.

## Lachancea

El género *Lachancea*, al igual que *Saccharomyces*, pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*<sup>52</sup> (fig. 1). 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 fermentadas<sup>79</sup>. Algunas de ellas eran conocidas antiguamente con el género *Klyuveromyces*<sup>52</sup>. Las especies *Lachancea thermotolerans* y *Lachancea fermentati* son las que se han aislado con mayor frecuencia y las que poseen la más amplia diversidad de nichos ecológicos; se las ha encontrado principalmente asociadas a mosto de uva y ambientes de bodega<sup>79</sup>. Si bien las características de *flavor* y la producción de ácido láctico en *L. thermotolerans* han sido bien estudiadas en vino<sup>71</sup> (principalmente en coinoculaciones con *S. cerevisiae*<sup>12</sup>), el estudio de la aplicación de levaduras de este género en la industria cervecera es escaso y reciente<sup>9,18,31,77</sup>. En un estudio en el que se evaluaron las características fermentativas de tres cepas de *L. thermotolerans* en mosto cervecero, se demostró su capacidad de consumo de maltosa (similar al control *S. cerevisiae* anchor ale), aunque en tiempos largos de fermentación (2-3 semanas); asimismo, ninguna fue capaz de consumir la maltotriosa presente en el mosto. En particular, se 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)<sup>31</sup>; Zdaniewicz et al. también encontraron una elevada producción de glicerol por *L. thermotolerans*<sup>100</sup>. Se demostró, además, una tasa de inoculación óptima de  $2 \times 10^6$  cél./mL/°P, tolerancia a los iso-alfa-ácidos provenientes del lúpulo, un fenotipo no floculante y una actividad  $\beta$ -glucosidasa mayor que la levadura ale<sup>31</sup>.

Sensorialmente, *L. thermotolerans* produce cervezas con mayores contenidos de acetato y butirato de etilo (floral, miel, dulce) comparado con *S. cerevisiae* (cepa comercial US-05)<sup>18</sup>. Por su parte, *L. fermentati* (KBI 12.1) también posee capacidad de fermentar maltosa (aunque un 20% menor que la cepa ale), no asimila la maltotriosa, es tolerante a los iso-alfa-ácidos, es POF<sup>-</sup> y posee una floculación moderada<sup>9</sup>. 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 con la levadura ale (cepa comercial WLP001), y la producción de ésteres, tres veces mayor. Las cervezas obtenidas fueron descritas sensorialmente como frutadas, con carácter vinoso, cítrico y ácidas<sup>9</sup>.

*L. thermotolerans* y *L. fermentati* son levaduras heterofermentativas que, como se describe, pueden producir etanol y ácido láctico como subproductos de la fermentación<sup>77</sup>; este último compuesto es 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 antes de la fermentación (con técnicas como *sour mash* o *kettle sour*); la otra es inoculando durante la fermentación o después de esta utilizando cultivos mixtos, o bien inoculaciones secuenciales<sup>77</sup>. A partir del estudio y la potencial aplicación de *Lachancea* sp. surge una nueva propuesta, el *primary souring*<sup>77</sup>, 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 entre muchas otras debido a la baja producción de ácido láctico y a su influencia marginal en la disminución del pH en comparación con *S. cerevisiae* (cepa comercial T-58); esta cepa presenta un elevado potencial para la producción de diferentes tipos de cerveza, sin limitarse solo a *sours*<sup>100</sup>.

Es posible adquirir cepas comerciales de *L. thermotolerans*, en tanto que el mercado para cepas de *L. fermentati* es más limitado (tabla 1). Sin embargo, es probable que el constante crecimiento del sector y el auge de cervezas *sour* hagan que exista una mayor disponibilidad de diferentes especies y cepas del género *Lachancea* en los próximos años. En Argentina, se han aislado en los últimos años cepas de *Lachancea* de diversos sustratos<sup>32,33,66</sup> (incluso otras especies nuevas), cuyo potencial en la producción de cervezas está comenzando a ser estudiado en nuestro laboratorio.

### *Torulaspota delbrueckii*

El género *Torulaspota* también pertenece a la familia *Saccharomycetaceae*<sup>52</sup> (fig. 1) y, a pesar de que por décadas fue considerada un contaminante común en cervezas, la especie *Torulaspota 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)<sup>52</sup> y ha sido domesticada por el ser humano a lo largo de 4.000 años<sup>1</sup>. *T. delbrueckii* fue la primera levadura no sacaromícetica en ser comercializada para la producción de vinos (en 2003), ésta es conocida en la industria vitivinícola por incrementar el *flavor* frutado<sup>1,3</sup>. King y Dickinson fueron los primeros en observar el potencial de esta especie en la producción de cerveza, al detectar su capacidad para modificar el aroma del producto final a partir de la biotransformación de monoterpenos del lúpulo (lo que genera mayores cantidades de linalol)<sup>45</sup>. Posteriormente, se encontró que cervezas fermentadas con esta especie (pura y en fermentaciones mixtas con *S. cerevisiae*) presentaron una mejora en sus características aromáticas respecto de cervezas control ale (cepa comercial US-05) debido a la presencia de altos niveles de compuestos aromáticos, como hexanoato de etilo,  $\alpha$ -terpineol y feniletanol (aroma frutal, rosas, chicle y banana), resultados que fueron confirmados por páneces de cata<sup>19,69</sup>. Asimismo, *T. delbrueckii* ha mostrado un impacto sensorial positivo vinculado a una baja producción de compuestos indeseables como ácido acético y acetaldehído<sup>16,92</sup>, junto con una baja producción de fenoles volátiles<sup>69</sup>.

Las temperaturas para la fermentación varían entre los 20 y 28 °C y, debido a que algunas cepas no fermentan maltosa y maltotriosa, los niveles de alcohol resultan bajos, en el orden del 0,8 a 4% v/v<sup>69</sup>; por lo que estas cepas resultarían

promisorias para la elaboración de cervezas con bajo contenido de alcohol<sup>16</sup>. Una ventaja adicional de *T. delbrueckii* es su capacidad de resistir diversas condiciones de estrés, como altas concentraciones de alcohol (9-11% v/v) y alto contenido de iso-alfa-ácidos del lúpulo (antimicrobiano)<sup>69</sup>, lo que le permite fermentar mostos intensamente lupulados y alcohólicos, como es el caso de cervezas India Pale Ale (IPA). Por otro lado, esta levadura posee alta tolerancia osmótica, por lo que puede fermentar mostos de densidad media y alta, con elevada producción de ésteres y alcoholes superiores<sup>20</sup>. Si bien el uso de *T. delbrueckii* en cultivos puros y mixtos aporta un *flavor* aromático muy agradable y particular, los resultados fermentativos y organolépticos asociados a esta especie dependen, principalmente, de la cepa utilizada<sup>17,69</sup>.

Prelude® (Chr. Hansen®, Copenhagen, Dinamarca) y Biodivia® (Lallemand Inc.®, Brooklyn Park, Australia) son dos ejemplos de diferentes cepas de *T. delbrueckii* que se comercializan actualmente. La cepa Biodivia® es capaz de generar menor porcentaje de etanol y niveles inferiores de ésteres y alcoholes superiores (excepto alcohol isoamílico) respecto de la cepa Prelude®<sup>92</sup>. Sin embargo, en cervezas fermentadas con Biodivia® se notaron niveles de butanoato de etilo (frutado, frutilla) significativamente mayores que los generados por la cepa Prelude®, por lo que posee un gran potencial para incrementar el *flavor* de cervezas con bajo 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 mayores, respectivamente)<sup>92</sup>. En cuanto a la producción de terpenos, se han observado mayores concentraciones de  $\beta$ -cariofileno,  $\alpha$ -farnesceno y cadaleno en cervezas elaboradas con Prelude®, lo que demuestra la mayor capacidad por parte de esta cepa para biotransformar terpenos a través de la actividad  $\beta$ -glucosidasa<sup>92</sup>.

Al igual que en el caso del género *Lachancea*, existen aislamientos naturales de *Torulaspota* de la Patagonia argentina<sup>32,33</sup>, que se suman a la larga lista de cepas para estudiar como potenciales herramientas de diversificación productiva en la industria cervecera.

### 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 alternativas. El uso de levaduras no convencionales es de particular interés para producir cervezas alternativas con *flavors* novedosos, cervezas bajas en calorías, cervezas sin alcohol o bajas en alcohol y cervezas funcionales<sup>20,85</sup>.

### 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 objetivo se puede lograr de diversos modos: (a) inoculando una sola especie de levadura como cultivo puro, b) usando diferentes microorganismos en fermentaciones secuenciales o coinoculadas, c) haciendo uso de organismos genéticamente modificados (OGM) y d) por adición de enzimas secretadas por microorganismos<sup>6,20,94</sup>.

Distintas especies en cultivo puro a menudo producen altas concentraciones de compuestos que les permiten aportar aromas y sabores específicos al producto. *Kluyveromyces marxianus*, por ejemplo, produce niveles relativamente altos de compuestos con aroma a rosas, como feniletanol y acetato de fenetilo<sup>41</sup>, y las ya discutidas especies de *Brettanomyces*, *Lachancea* y *S. eubayanus* producen altas concentraciones de compuestos de *bioflavoring* distintivos, como fenoles y ésteres frutales. Además de *Lachancea*, especies de levaduras como *Schizosaccharomyces japonicus*, *Wickerhamomyces anomalus*, *Hanseniaspora vineae* y *Hanseniaspora uvarum* han sido utilizadas como inóculo puro para la producción de cervezas *sour*<sup>30,77</sup>. *Hanseniaspora uvarum* se encuentra asociada a la fase inicial de las fermentaciones espontáneas de cervezas lámbicas<sup>88</sup>, aporta *flavors* frutales y es productora de la enzima  $\beta$ -glucosidasa<sup>6</sup>; se puede acceder a cultivos comerciales de esta especie (tabla 1).

Muchas levaduras no convencionales no pueden utilizar todos los azúcares fermentables del mosto, por lo que diversos estudios han sugerido el uso de estas levaduras como agentes de *bioflavoring* en fermentaciones coinoculadas con cepas de levaduras cerveceras. Aquí, la capacidad fermentativa de las levaduras salvajes resulta secundaria y el enfoque se basa más bien en una mayor producción de compuestos aromáticos deseables y, a menudo únicos, donde la producción de alcohol se logra, por ejemplo, con cepas ale o lager<sup>26,41</sup>. Como se vio antes, *T. delbrueckii* y especies de *Brettanomyces* se han propuesto como agentes de *bioflavoring* cuando las levaduras están involucradas en la cofermentación con cepas cerveceras.

*Pichia kluyveri* es capaz de fermentar solo la glucosa del mosto, con una baja producción de etanol, por lo que resulta un candidato interesante para la fermentación secuencial en busca de una mejora de los sabores frutados en la cerveza. Esta levadura genera una elevada cantidad de acetato de isoamilo (80 mg/l después de dos días de fermentación) y también produce otros compuestos frutales, como propionato y butirato de etilo (ananá), valerato de etilo (manzana), decanoato de etilo (frutado, manzana) y octanoato de etilo (ananá, tropical, manzana, coñac)<sup>43,68,83</sup>. Además, se ha reportado la capacidad de esta especie de convertir precursores presentes en las uvas en tioles 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 transformación<sup>43</sup>. 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 de acetato de etilo y otros, como acetato de isoamilo y butirato de etilo, por lo contribuyen a mejorar la complejidad aromática del mosto fermentado con notas frutales, como manzana, pera y durazno<sup>6,18,34</sup>.

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 solo 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 aroma y sabor. Diversos compuestos *flavor* activos, como los alcoholes monoterpénicos, los norisoprenoides y los alcoholes alifáticos, pueden unirse covalentemente a un azúcar (en general,  $\beta$ -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 cerveza<sup>89</sup>. Como ya fue discutido previamente, la separación de estos compuestos del residuo de azúcar puede afectar positivamente el aroma de la cerveza y, algunas levaduras, como *Brettanomyces*, pueden producir las enzimas  $\beta$ -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*<sup>41,68</sup>. Todas las cepas mencionadas son candidatos interesantes para ser usados en fermentaciones mixtas de bebidas cuyo *flavor* se desea realzar o diversificar. Existen registros de levaduras de los tres géneros mencionados obtenidas de ambientes naturales de la Patagonia argentina<sup>15,32</sup>.

### 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 han estimulado a la industria cervecera a desarrollar cervezas bajas en calorías<sup>99</sup>. Las cervezas bajas en calorías se pueden elaborar abordando algunos métodos de producción alternativos, particularmente, buscando reducir la concentración de hidratos de carbono en el producto final. Un método factible es la «dilución» de hidratos de carbono del mosto, que desafortunadamente conduce a cervezas poco expresivas y poco estructuradas, a menudo calificadas como acuosas y menos preferidas por los consumidores<sup>6,99</sup>. Son más aceptados, entonces, los 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. Éste es el caso de *Brettanomyces* y *S. cerevisiae* var. *diastaticus*, que producen glucoamilasas y glucosidasas. Estas enzimas permiten la hidrólisis de

hidratos de carbono no fermentables para formar azúcares simples, estos son posteriormente fermentados durante la etapa de fermentación primaria, conduciendo a cervezas más bajas en calorías<sup>6,20,99</sup>. En este aspecto, dado que el etanol tiene un mayor valor energético en comparación con los hidratos de carbono, la producción de cervezas bajas en calorías implica que parte del alcohol sea posteriormente eliminado<sup>99</sup>. 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*<sup>54</sup> que resultarían interesantes para la producción de cervezas bajas en calorías.

### 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<sup>8,99</sup>. La terminología de cerveza «sin alcohol» y «baja en alcohol», así como las reglamentaciones legales 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/v; 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/v<sup>8</sup>. Las estrategias para producir cervezas sin alcohol o bajas en alcohol (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 por pasteurización, por centrifugación o enfriando rápidamente la cerveza en fermentación a 0°C, 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<sup>8,99</sup>. El uso de levaduras no convencionales con capacidades limitadas para utilizar los azúcares del mosto (maltosa y maltotriosa, en particular) constituye una alternativa útil para producir cervezas sin alcohol y con bajo contenido de alcohol, pero que aún conservan, o, en algunos casos mejoran, parte de la complejidad aromática. Dichas levaduras son capaces de producir elevadas cantidades de ésteres que enmascaran los sabores indeseables, e incluso, algunas 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 detenida<sup>20</sup>.

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*<sup>28,44,58</sup>. 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<sup>28,44,58</sup>. Sin embargo, la producción de ésteres y el contenido de etanol de la cerveza final depende de la cepa<sup>28</sup>; están disponibles comercialmente las cepas WSL-17 (Hefebank Weihenstephan®) y WLP618 (White Labs®), con aplicación en la industria cervecera. Por otra parte, se demostró que cultivos puros de cepas de *T. delbrueckii* son capaces de producir cervezas con un contenido de etanol que varía del 0,9 a 2,6% v/v, caracterizadas por interesantes sabores frutales<sup>16,68,69</sup>. Asimismo, Bellut et al. 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 comercial (WLP001)<sup>7</sup>. Cepas de *L. fermentati* aisladas también de kombucha fueron evaluadas para establecer su potencial de producción de cervezas bajas en alcohol. Pudo obtenerse por el método de fermentación detenida una cerveza con contenido de alcohol menor del 1,3% v/v y una proporción equilibrada entre el dulzor de azúcares residuales y la acidez láctica producida. Sin embargo, se detectaron niveles altos de diacetilo (debido a la fermentación detenida), de modo que se debe mejorar el proceso para reducir su concentración a niveles aceptables<sup>11</sup>. 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, usando cepas de *P. kluyveri*. Como se vio, esta levadura solo usa la glucosa del mosto y tiene la capacidad de convertir este sustrato en una alta concentración de compuestos de *flavor* específicos, los principales son el acetato de isoamilo, el alcohol isoamílico, el butirato de etilo, el hexanoato de etilo y el octanoato de etilo<sup>83,84</sup>. 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*<sup>29</sup>. Una cepa de *Cyberlindnera mrakii* demostró tener aplicación en la fermentación de cervezas bajas en alcohol extrafrutales, debido a la capacidad de aumentar los niveles de ésteres de acetato y retener los terpenos y terpenoides del mosto lupulado<sup>59</sup>. *Scheffersomyces shehatae*<sup>56</sup>, *Zygosaccharomyces rouxii*<sup>87</sup> y *Cyberlindnera subsufficiens*<sup>10</sup> son otras especies consideradas para el desarrollo de cervezas NABLAB.

### Cervezas funcionales

Las cervezas funcionales se obtienen mediante el enriquecimiento con sustancias promotoras de la salud y se considera que estas cervezas brindan beneficios para la salud si se consumen en cantidades moderadas. Estas cervezas alternativas se producen mediante el uso de levaduras no convencionales, capaces de producir o transformar algunos compuestos beneficiosos, como la melatonina, una hormona implicada

en la regulación del sueño en los mamíferos y que posee propiedades antioxidantes. Algunas levaduras pueden producir esta sustancia durante la fermentación<sup>6</sup>. Entre las cervezas funcionales, una novedad está dada por las cervezas probióticas, obtenidas mediante la incorporación de agentes probióticos<sup>21</sup>. Estos son microorganismos utilizados como suplementos alimenticios que, en una dosis correcta, son potencialmente beneficiosos para la salud humana, sobre todo, para el equilibrio microbiano intestinal<sup>72</sup>. La cerveza artesanal sin filtrar y sin pasteurizar puede ser considerada como una nueva herramienta para aportar efectos beneficiosos debido a que las levaduras permanecen viables en la bebida, lo que es crucial para la eficacia de los probióticos<sup>21</sup>. La mayoría de los microorganismos probióticos son bacterias; *S. cerevisiae* var. *bouardii* 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 intestinal<sup>21</sup>. Se demostró que esta levadura es capaz de fermentar los azúcares presentes en el mosto cervecero a temperaturas de hasta 2°C, y de crecer en presencia de iso-alfa-ácidos (hasta 60 mg/l) y etanol (hasta 16% v/v)<sup>86</sup>, lo que hace posible su aplicación en la producción de cerveza. Se ha evaluado *S. cerevisiae* var. *bouardii* como único cultivo iniciador, así como en co-cultivos, y se obtuvieron cervezas con mayor actividad antioxidante, menor contenido de alcohol (NABLAB) y características sensoriales similares a las obtenidas con levaduras cerveceras, por lo que dicha levadura resulta ser una herramienta muy prometedora para aumentar la calidad saludable del producto<sup>21,72,85,86</sup>. 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 antienviejimiento. Investigaciones futuras podrían considerar tal capacidad para la producción de cervezas funcionales<sup>22,30,51</sup>.

## Conclusiones y perspectivas

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

Actualmente, los cerveceros se encuentran 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 éstas ofrecen. Las cervecerías modernas mantienen altos niveles de sanitización y control, por lo que resulta comprensible que sean reacias a

introducir levaduras nuevas, potencialmente contaminantes. 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 reutilización, oxigenación y nutrición en general, por lo que requiere de un aprendizaje y de pruebas previas, a fin de lograr las características deseadas en el producto. Es por ello que todos los estudios tendientes a lograr una mejor comprensión del desempeño fermentativo y organoléptico de estas levaduras, así como de la propagación y la estabilidad de los inóculos, resultan de gran importancia para que gradualmente los productores puedan introducir las 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 la 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, que pueden encontrarse en los ambientes naturales. La región andina de la Patagonia argentina se ha revelado como un reservorio muy interesante de levaduras de alto valor científico-tecnológico, al contar con levaduras sacaromícéticas (*S. eubayanus* y *S. uvarum*) y no sacaromícéticas de géneros como *Lachancea*, *Hanseniospora*, *Torulasporea*, *Cyberlindera*, *Mrakia*, *Zygosaccharomyces* o *Pichia*, entre otras. Por otro lado, se han obtenido recientemente numerosos aislamientos de *S. cerevisiae* var. *diastaticus* sumamente interesantes a partir de cervezas contaminadas, también de la Patagonia argentina. Todas estas levaduras son 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 y son de importancia para la producción de otros tipos de bebida y de alimentos, como el vino<sup>76</sup>, la sidra<sup>35</sup>, el whisky y los panificados, entre otros (Álvarez y Libkind, 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 por 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 o simplificar su uso industrial. El caso más destacado, sin duda, es el de la generación de nuevas variantes de levaduras lager a través de la hibridación de cepas salvajes de *S. eubayanus* y levaduras domesticadas de *S. cerevisiae*<sup>33,46-48,65</sup>. Hasta el momento, no se dispone comercialmente de levaduras desarrolladas por estos métodos. Existen otros métodos de mejora que implican la manipulación genética, como serían la 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 publicadas<sup>41,97</sup> o están en vías de publicación (Eizaguirre et al., en preparación). Queda en evidencia que en el sector cervecero, tanto industrial como artesanal, ha comenzado una nueva etapa en la que 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.

## 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.

## Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

## 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.

## Bibliografía

- 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:e94246.
- 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;111:1749–66.
- 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;235:303–13.
- Baker E, Wang B, Bellora N, Peris D, Hulfacher AB, Koshalek JA, Adams M, Libkind D, Hittinger CT. The genome sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the domestication of lager-brewing yeasts. *Mol Biol Evol*. 2015;32:2818–31.
- Baker EP, Hittinger CT. Evolution of a novel chimeric maltotriose transporter in *Saccharomyces eubayanus* from parent proteins unable to perform this function. *PLoS Genet*. 2019;15:e1007786.
- Basso RF, Alcarde AR, Portugal CB. Could non-*Saccharomyces* yeasts contribute on innovative brewing fermentations? *Food Res Int*. 2016;86:112–20.
- 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;4:66.
- 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;77:1–15.
- Bellut K, Michel M, Hutzler M, Zarnkow M, Jacob F, De Schutter DP, Daenen L, Lynch KM, Zannini E, Arendt EK. Investigation into the potential of *Lachancea fermentati* strain KBI 12.1 for low alcohol beer brewing. *J Am Soc Brew Chem*. 2019;77:157–69.
- Bellut K, Michel M, Zarnkow M, Hutzler M, Jacob F, Atzler JJ, Hoehnel A, Lynch KM, Arendt EK. Screening and application of *Cyberlindnera* yeasts to produce a fruity non-alcoholic beer. *Fermentation*. 2019;5:103.
- Bellut K, Krogerus K, Arendt EK. *Lachancea fermentati* strains isolated from kombucha: fundamental insights, and practical application in low alcohol beer brewing. *Front Microbiol*. 2020;11:764.
- Benito Á, Calderón F, Benito S. Combined use of *S. pombe* and *L. thermotolerans* in winemaking. Beneficial effects determined through the study of wines analytical characteristics. *Molecules*. 2016;21:1744.
- Bing J, Han PJ, Liu WQ, Wang QM, Bai FY. Evidence for a Far East Asian origin of lager beer yeast. *Curr Biol*. 2014;24:R380–1.
- Brouwers N, Gorter de Vries AR, van den Broeck M, Weening SM, Elink Schuurman TD, Kuijpers NGA, Pronk JT, Daran JG. In vivo recombination of *Saccharomyces eubayanus* maltose-transporter genes yields a chimeric transporter that enables maltotriose fermentation. *PLoS Genet*. 2019;15:e1007853.
- Čadež N, Bellora N, Ulloa R, Hittinger CT, Libkind D. Genomic content of a novel yeast species *Hanseniaspora gamundiae* sp. nov. from fungal stromata (*Cyttaria*) associated with a unique fermented beverage in Andean Patagonia, Argentina. *PLoS One*. 2019;14:e0210792.
- Canonico L, Agarbati A, Comitini F, Ciani M. *Torulaspora delbrueckii* in the brewing process: a new approach to enhance bioflavour and to reduce ethanol content. *Food Microbiol*. 2016;56:45–51.
- Canonico L, Comitini F, Ciani M. *Torulaspora delbrueckii* contribution in mixed brewing fermentations with different *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol*. 2017;259:7–13.
- Canonico L, Galli E, Ciani E, Comitini F, Ciani M. Exploitation of three non-conventional yeast species in the brewing process. *Microorganisms*. 2019;7:11.
- Canonico L, Ciani E, Galli E, Comitini F, Ciani M. Evolution of aromatic profile of *Torulaspora delbrueckii* mixed fermentation at microbrewery plant. *Fermentation*. 2020;6:7.
- Capece A, Romaniello R, Siesto G, Romano P. Conventional and non-conventional yeasts in beer production. *Fermentation*. 2018;4:38.
- Capece A, Romaniello R, Pietrafesa A, Siesto G, Pietrafesa R, Zambuto M, Romano P. Use of *Saccharomyces cerevisiae* var. bouldarii in co-fermentations with *S. cerevisiae* for the production of craft beers with potential healthy value-added. *Int J Food Microbiol*. 2018;284:22–30.
- Colomer MS, Funch B, Forster J. The raise of *Brettanomyces* yeast species for beer production. *Curr Opin Biotechnol*. 2019;56:30–5.
- Colomer MS, Chailyan A, Fennessy RT, Olsson KF, Johnsen L, Solodovnikova N, Forster J. Assessing population diversity of *Brettanomyces* yeast species and identification of strains for brewing applications. *Front Microbiol*. 2020;11:637.



24. Colomer MS, Funch B, Solodovnikova N, Hobbey TJ, Förster J. Biotransformation of hop derived compounds by *Brettanomyces* yeast strains. *J Inst Brew.* 2020;126.
25. Crauwels S, Steensels J, Aerts G, Willems K, Verstrepen K, Lievens B. *Brettanomyces bruxellensis*, essential contributor in spontaneous beer fermentations providing novel opportunities for the brewing industry. *Brew Sci.* 2015;68:110–21.
26. Cubillos FA, Gibson B, Grijalva-Vallejos N, Krogerus K, Nikulin J. Bioprospecting for brewers: exploiting natural diversity for naturally diverse beers. *Yeast.* 2019;36:383–98.
27. Daniel HM, Lachance MA, Kurtzman CP. On the reclassification of species assigned to *Candida* and other anamorphic ascomycetous yeast genera based on phylogenetic circumscription. *Antonie Van Leeuwenhoek.* 2014;106:67–84.
28. De Francesco G, Turchetti B, Sileoni V, Marconi O, Perretti G. Screening of new strains of *Saccharomyces ludwigii* and *Zygosaccharomyces rouxii* to produce low-alcohol beer. *J Inst Brew.* 2015;121:113–21.
29. De Francesco G, Sannino C, Sileoni V, Marconi O, Filippucci S, Tasselli G, Turchetti B. *Mrakia gelida* in brewing process: an innovative production of low alcohol beer using a psychrophilic yeast strain. *Food Microbiol.* 2018;76:354–62.
30. de Souza Varize C, Christofoleti-Furlan RM, Muynarsk EDSM, de Melo Pereira GV, Lopes LD, Basso LC. Biotechnological applications of nonconventional yeasts. En: Peixoto Basso T, editor. *Yeasts in biotechnology.* London: IntechOpen; 2019. p. 713.
31. Domizio P, House JF, Joseph CML, Bisson LF, Bamforth CW. *Lachancea thermotolerans* as an alternative yeast for the production of beer. *J Inst Brew.* 2016;122:599–604.
32. Eizaguirre JI, Peris D, Rodríguez ME, Lopes CA, De los Ríos P, Todd Hittinger C, Libkind D. Phylogeography of the wild Lager-brewing ancestor (*Saccharomyces eubayanus*) in Patagonia. *Environ Microbiol.* 2018;20:3732–43.
33. Eizaguirre JI. Caracterización y domesticación de cepas naturales de *Saccharomyces eubayanus* para su aplicación en la industria cervecera. Tesis de Doctorado en Biología. 2019. Universidad Nacional del Comahue.
34. Fan G, Teng C, Xu D, Fu Z, Minhazul KA, Wu Q, Liu P, Yang R, Li X. Enhanced production of ethyl acetate using co-culture of *Wickerhamomyces anomalus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng.* 2019;128:564–70.
35. Flores MG, Rodríguez ME, Oteiza JM, Barbagelata RJ, Lopes CA. Physiological characterization of *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces eubayanus* from Patagonia and their potential for cidermaking. *Int J Food Microbiol.* 2017;249:9–17.
36. Gamero A, Quintilla R, Groenewald M, Alkema W, Boekhout T, Hazelwood L. High-throughput screening of a large collection of non-conventional yeasts reveals their potential for aroma formation in food fermentation. *Food Microbiol.* 2016;60:147–59.
37. Garshol LM, Preiss R. How to brew with Kveik. *MBAA TQ.* 2018;55:76–83.
38. Garshol LM. Pitch temperatures in traditional farmhouse brewing. *J Inst Brew.* 2020, <http://dx.doi.org/10.31235/osf.io/wmyfe>.
39. Gayevskiy V, Goddard MR. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces arboricola* reside in North Island native New Zealand forests. *Environ Microbiol.* 2016;18:1137–47.
40. Gibson BR, Storgårds E, Krogerus K, Vidgren V. Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*. *Yeast.* 2013;30:255–66.
41. Gibson B, Geertman J, Hittinger CT, Krogerus K, Libkind D, Louis EJ, Magalhães F, Sampaio JP. New yeasts - new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Res.* 2017;17:2–6.
42. Godoy L, García V, Peña R, Martínez C, Ganga MA. Identification of the *Dekkera bruxellensis* phenolic acid decarboxylase (PAD) gene responsible for wine spoilage. *Food Control.* 2014;45:81–6.
43. Holt S, Mukherjee V, Lievens B, Verstrepen KJ, Thevelein JM. Bioflavoring by non-conventional yeasts in sequential beer fermentations. *Food Microbiol.* 2018;72:55–66.
44. Jiang Z, Yang B, Liu X, Zhang S, Shan J, Liu J, Wang X. A novel approach for the production of a non-alcohol beer ( $\leq 0.5\%$  abv) by a combination of limited fermentation and vacuum distillation. *J Inst Brew.* 2017;123:533–6.
45. King A, Dickinson JR. Biotransformation of monoterpene alcohols by *Saccharomyces cerevisiae*, *Torulopsis delbrueckii* and *Kluyveromyces lactis*. *Yeast.* 2000;16:499–506.
46. Krogerus K, Magalhães F, Vidgren V, Gibson B. New lager yeast strains generated by interspecific hybridization. *J Ind Microbiol Biotechnol.* 2015;42:769–78.
47. Krogerus K, Arvas M, De Chiara M, Magalhães F, Mattinen L, Oja M, Vidgren V, Yue J, Liti G, Gibson B. Ploidy influences the functional attributes of de novo lager yeast hybrids. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;100:7203–22.
48. Krogerus K, Seppänen-Laakso T, Castillo S, Gibson B. Inheritance of brewing-relevant phenotypes in constructed *Saccharomyces cerevisiae* × *Saccharomyces eubayanus* hybrids. *Microb Cell Fact.* 2017;16:66.
49. Krogerus K, Magalhães F, Kuivanen J, Gibson B. A deletion in the STA1 promoter determines maltotriose and starch utilization in STA1 + *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2019;103:7597–615.
50. Krogerus K, Gibson B. A re-evaluation of diastatic *Saccharomyces cerevisiae* strains and their role in brewing. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2020;104:3745–56.
51. Kuo H-P, Wang R, Huang C-Y, Lai J-T, Lo Y-C, Huang S-T. Characterization of an extracellular  $\beta$ -glucosidase from *Dekkera bruxellensis* for resveratrol production. *J Food Drug Anal.* 2018;26:163–71.
52. Kurtzman C, Fell JW, Boekhout T. The yeasts: a taxonomic study. 5th edition. Elsevier Science; 2011.
53. Langdon QK, Peris D, Eizaguirre JI, Oplente DA, Buh KV, Sylvester K, Jarzyna M, Rodríguez ME, Lopes CA, Libkind D, Hittinger CT. Postglacial migration shaped the genomic diversity and global distribution of the wild ancestor of lager-brewing hybrids. *PLoS Genet.* 2020;16:e1008680.
54. Latorre M, Hutzler M, Michel M, Zarnkow M, Jacob F, Libkind D. Genotypic diversity of *Saccharomyces cerevisiae* spoilers in a community of craft microbreweries. *Brew Sci.* 2020;73:52–7.
55. Lentz M, Putzke T, Hessler R, Luman E. Genetic and physiological characterization of yeast isolated from ripe fruit and analysis of fermentation and brewing potential. *J Inst Brew.* 2014;120:559–64.
56. Li H, Liu Y, Zhang W. Method for preparing non-alcoholic beer by *Candida shehatae* (*Scheffersomyces shehatae*); Patent CN 102220198B, China. 2011.
57. Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, Gonçalves P, Sampaio JP. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108:14539–44.
58. Lissner L. Non-alcoholic beer with maltose negative yeast strain *Saccharomyces ludwigii*. Master Thesis at Department of Food Technology. 2018. Lunds Universitet.
59. Liu S-Q, Quek AY. Evaluation of Beer Fermentation with a Novel Yeast *Williopsis saturnus*. *Food Technol Biotechnol.* 2016;54:403–12.
60. Loviso CL, Libkind D. Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: Esters. *Rev Argent Microbiol.* 2018;50:436–46.

61. Loviso CL, Libkind D. Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: fusel alcohols. *Rev Argent Microbiol.* 2019;51:386–97.
62. Magalhães F, Vidgren V, Ruohonen L, Gibson B. Maltose and maltotriose utilisation by group I strains of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *FEMS Yeast Res.* 2016;16:1–11.
63. Mardones W, Villarreal CA, Krogerus K, Tapia SM, Urbina K, Oporto CI, O'Donnell S, Minebois M, Nespola R, Fischer G, Querol A, Gibson B, Cubillos FA. Molecular profiling of beer wort fermentation diversity across natural *Saccharomyces eubayanus* isolates. *Microbial Biotechnol.* 2020;13:1012–25.
64. Meier-Dörnberg T, Kory OI, Jacob F, Michel M, Hutzler M. *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus friend or foe?-spoilage potential and brewing ability of different *Saccharomyces cerevisiae* variety diastaticus yeast isolates by genetic, phenotypic and physiological characterization. *FEMS Yeast Res.* 2018;18:1–327.
65. Mertens S, Steensels J, Saels V, De Rouck G, Aerts G, Verstrepen KJ. A large set of newly created interspecific *Saccharomyces* hybrids increases aromatic diversity in lager beers. *Appl Environ Microbiol.* 2015;81:8202–14.
66. Mestre MC, Ulloa JR, Rosa CA, Lachance MA, Fontenla S. *Lachancea nothofagi* sp. nov., a yeast associated with *Nothofagus* species in Patagonia, Argentina. *Int J Syst Evol Microbiol.* 2010;60:2247–50.
67. Methner Y, Hutzler M, Matoulková D, Jacob F, Michel M. Screening for the brewing ability of different non-*Saccharomyces* yeasts. *Fermentation.* 2019;5:101.
68. Michel M, Meier-Dörnberg T, Jacob F, Methner F-J, Wagner RS, Hutzler M. Review: Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for beer fermentation with a focus on secondary metabolites and practical applications. *J Inst Brew.* 2016;122:569–87.
69. Michel M, Kopecká J, Meier-Dörnberg T, Zarnkow M, Jacob F, Hutzler M. Screening for new brewing yeasts in the non-*Saccharomyces* sector with *Torulaspota delbrueckii* as model. *Yeast.* 2016;33:129–44.
70. Montandon G, Borelli B, De Causmaecker B, Praet T, Jaskula-Goiris B, Rosa A, Aerts G. Selection of indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains for top fermentation beer production. 12th International Trends in Brewing Symposium. 2016. Ghent, Bélgica.
71. Morata A, Loira I, Tesfaye W, Bañuelos MA, González C, Suárez Lepe JA. *Lachancea thermotolerans* applications in wine technology. *Fermentation.* 2018;4:53.
72. Mulero-Cerezo J, Briz-Redón Á, Serrano-Aroca Á. *Saccharomyces Cerevisiae* Var *Boulardii*: Valuable Probiotic Starter for Craft Beer Production. *Applied Sciences.* 2019;9:3250.
73. Nelson M. The barbarian's beverage: a history of beer in ancient Europe. London, UK: Routledge; 2005.
74. Nespola RF, Villarreal CA, Oporto CI, Tapia SM, Vega-Macaya F, Urbina K, De Chiara M, Mozzachiodi S, Mikhalev E, Thompson D, Larrondo LF, Saenz-Agudelo P, Litti G, Cubillos FA. An Out-of-Patagonia migration explains the worldwide diversity and distribution of *Saccharomyces eubayanus* lineages. *PLoS Genet.* 2020;16:e1008777.
75. Olaniran AO, Hiralal L, Mokoena MP, Pillay B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *J Inst Brew.* 2017;123:13–23.
76. Origone AC, del Mónaco SM, Ávila JR, González Flores M, Rodríguez ME, Lopes CA. Tolerance to winemaking stress conditions of Patagonian strains of *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum*. *J Appl Microbiol.* 2017;123:450–63.
77. Osburn K, Amaral J, Metcalf SR, Nickens DM, Rogers CM, Sausen C, Caputo R, Miller J, Li H, Tennessen JM, Bochman ML. Primary souring: A novel bacteria-free method for sour beer production. *Food Microbiol.* 2018;70:76–84.
78. Peris D, Sylvester K, Libkind D, Gonçalves P, Sampaio JP, Alexander WG, Hittinger CT. Population structure and reticulate evolution of *Saccharomyces eubayanus* and its lager-brewing hybrids. *Mol Ecol.* 2014;23:2031–45.
79. Porter TJ, Divol B, Setati ME. *Lachancea* yeast species: Origin, biochemical characteristics and oenological significance. *Food Res Int.* 2019;119:378–89.
80. Preiss R, Tyrawa C, Krogerus K, Garshol LM, Van Der Merwe G. Traditional Norwegian Kveik are a genetically distinct group of domesticated *Saccharomyces cerevisiae* brewing yeasts. *Front Microbiol.* 2018;9:2137.
81. Preiss R, Netto I. How low can you go: Impact of inoculation rate on Norwegian kveik yeast fermentation. Master Brewers Conference, Abstract 76, Calgary Alberta Canada. 2019.
82. Rodríguez ME, Pérez-Través L, Sangorrín MP, Barrio E, Lopes CA. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with the fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS Yeast Res.* 2014;14:948–65.
83. Saerens S, Swiegers H. Enhancement of beer flavor by a combination of *Pichia* yeast and different hop varieties; United States Patent US 2017/0183612A1, Hoersholm, DK. 2017.
84. Saerens S, Swiegers J. Production of low-alcohol or alcohol-free beer with *Pichia kluyveri* yeast strains; United States Patent 9580675B2, Hoersholm, DK. 2017.
85. Sannino C, Mezzasoma A, Buzzini P, Turchetti B. *Non-conventional Yeasts for Producing Alternative Beers*. En: Sibirny A, editor. *Non-conventional Yeasts: from Basic Research to Application*. Switzerland AG: Springer Nature; 2019. p. 361–88.
86. Senkarcinova B, Graça Dias AI, Nespola J, Brányik T. Probiotic alcohol-free beer made with *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*. *LWT Food Sci Technol.* 2019;100:362–7.
87. Sohrabvandi S, Razavi SH, Mousavi SM, Mortazavian A, Rezaei K. Application of *Saccharomyces rouxii* for the production of on-alcoholic beer. *Food Sci Biotechnol.* 2009;18:1132–7.
88. Spitaels F, Wieme AD, Janssens M, Aerts M, Daniel H-M, Van Landschoot A, De Vuyst L, Vandamme P. The microbial diversity of traditional spontaneously fermented lambic beer. *PLoS One.* 2014;9:e95384.
89. Steensels J, Verstrepen KJ. Taming wild yeast: potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:61–80.
90. Steensels J, Daenen L, Malcorps P, Derdelinckx G, Verachtert H, Verstrepen KJ. *Brettanomyces* yeasts-From spoilage organisms to valuable contributors to industrial fermentations. *Int J Food Microbiol.* 2015;206:24–38.
91. Stewart GG. *Flavour Production by Yeast*. En: Stewart GG, editor. *Brewing and Distilling Yeasts*. Switzerland AG: Springer International Publishing; 2017. p. 325–57.
92. Toh DWK, Chua JY, Lu Y, Liu SQ. Evaluation of the potential of commercial non-*Saccharomyces* yeast strains of *Torulaspota delbrueckii* and *Lachancea thermotolerans* in beer fermentation. *Int J Food Sci Technol.* 2019;55:2049–59.
93. Urbina K, Villarreal P, Nespola RF, Salazar R, Santander R, Cubillos FA. Volatile compound screening using HS-SPME-GC/MS on *Saccharomyces eubayanus* strains under low-temperature Pilsner wort fermentation. *Microorganisms.* 2020;8:755.
94. Vanderhaegen B, Neven H, Coghe S, Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Verachtert H. Bioflavoring and beer refermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2003;62:140–50.
95. Verberg S. Brewery Scandinavian Yeast Rings: The curious case of the Twisted Torus. *Brew Hist.* 2019;178:49–61.
96. Vervoort Y, Herrera-Malaver B, Mertens S, Guadalupe Medina V, Duitama J, Michiels L, Derdelinckx G, Voordeckers K, Verstre-

- pen KJ. Characterization of the recombinant *Brettanomyces anomalus*  $\beta$ -glucosidase and its potential for bioflavouring. *J Appl Microbiol.* 2016;121:721–33.
97. Walker GM, Walker RSM. Enhancing yeast alcoholic fermentations. *Adv App Microbiol.* 2018;105:87–129.
98. White C, Zainasheff J. *Yeast: the practical guide to beer fermentation.* Colorado, USA: Brewers Publications; 2010.
99. Yeo HQ, Liu S-Q. An overview of selected specialty beers: Developments, challenges and prospects. *Int J Food Sci Technol.* 2014;49:1607–18.
100. Zdaniewicz M, Satora P, Pater A, Bogacz S. Low Lactic Acid-producing strain of *Lachancea thermotolerans* as a new starter for beer production. *Biomolecules.* 2020;10:256.