

IDENTIFICACIÓN MORFOLÓGICA, FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE LEVADURAS DEL GÉNERO SACCHAROMYCES PARA LA ELABORACIÓN DE CERVEZA.

Arias Ochoa Andrés, Barrios Rodríguez Alexis, Simonsen Cavanzo Emilio,
Tejeda Santamaría Sebastián.¹

Resumen

Se busco reconocer pautas clave al momento de identificar morfológica, fisiológica y molecularmente levaduras del género *Saccharomyces* para la elaboración de cerveza mediante la búsqueda bibliográfica en bases de datos (FEMS: Yeast research, PMC-NCBI y Google académico). La cerveza es una bebida alcohólica no destilada, espumosa, resultante de un proceso de fermentación usando levaduras. Las levaduras como organismos microscópicos unicelulares son pertenecientes al dominio *Eukarya* y están clasificadas dentro del reino Fungi. El conocimiento de las levaduras es importante en la industria de los alimentos por la capacidad que poseen de convertir carbohidratos en etanol y CO₂ mediante el proceso de fermentación alcohólica. Las levaduras pueden identificarse de forma morfológica, fisiológica y molecular por medio de técnicas de PCR, ARN de bajo peso molecular (LMW-RNA), análisis de microsatélites, Polimorfismo de longitud en los fragmentos de restricción del ADNr/ARNr(RFLP).

Palabras Clave

Saccharomyces, Fermentación alcohólica, Cerveza Ale, Cerveza Lager.

Abstract

We sought to recognize key patterns to identifying morphologically, physiologically and molecularly yeasts of the genus *Saccharomyces* through bibliographic search in databases (FEMS: Yeast research, PMC-NCBI and Google academic). Beer is a non-distilled, frothy alcoholic beverage resulting from a fermentation process using yeasts. Yeasts are unicellular microscopic organisms belong to the *Eukarya* domain and there are classified within the Fungi kingdom. The knowledge of yeasts is important in the food industry because of the ability to convert carbohydrates into ethanol and CO₂ through the process of alcoholic fermentation. Yeasts can be morphologically, physiologically and molecularly identified by PCR techniques, low molecular weight RNA (LMW-RNA), microsatellite analysis, Length polymorphism in the restriction fragments of rDNA / rRNA (RFLP).

Key Words

Saccharomyces, Alcoholic Fermentation, Ale Beer, Lager Beer.

¹ *Estudiantes programa de Microbiología. Universidad Libre Barranquilla.*
andresf0512@hotmail.com,
albarcok11@hotmail.com,
eesimonsen@hotmail.com,
sebastiantejeda95@gmail.com

Introducción

La cerveza es una bebida alcohólica no destilada, espumosa, resultante de un proceso de fermentación usando levaduras. Se obtiene a partir de mostos de malta de cebada, la cual puede estar acompañada de otros cereales amiláceos y cuyo aroma se obtiene de las flores de lúpulo(1,2). Entre las bebidas más antiguas del mundo encontramos la cerveza. Su historia se remonta entre 5.000 a 8.000 años atrás, pero no se sabe con seguridad quienes fueron los pioneros en producirla. Sin embargo, existen registros que muestran que los sumerios, procedentes de Sudan, del área de Mesopotamia, elaboraban una bebida alcohólica llamada Sikariu, esta era elaborada a partir de pan y agua.

Hace 4.000 años atrás en China se produjo una cerveza llamada Kiu, hecha a base de mijo, arroz, trigo y cebada, indicando así que las civilizaciones mesopotámicas no fueron las únicas en descubrir la “fórmula” de la cerveza. El Duque Guillermo IV de Baviera decretó en el año 1516 una ley en la cual se definieron los ingredientes de la cerveza: malta de cebada, agua y lúpulo, de aquí en adelante los últimos detalles definitivos fueron dados por el mercantilismo, la revolución industrial, el capitalismo y la globalización. Desde la primera vez que se hizo cerveza se han desarrollado múltiples estilos determinados por su sabor y por las características propias del país de donde fueron elaboradas (1,3,4).

De acuerdo con la forma cómo se comporta la levadura en la fermentación, la cerveza puede ser clasificada en dos tipos: Ale y Lager. Las cervezas de tipo Ale (fermentación alta) tienen la característica de fermentar a temperaturas cercanas a los 20°C, y forman una densa capa de levaduras en la superficie del fermentador. En las cervezas tipo Lager (fermentación baja)

las levaduras se encuentran en el fondo del fermentador, y se caracterizan por realizar este proceso a temperaturas bajas (5, 6).

Se define a las levaduras como organismos microscópicos unicelulares pertenecientes al dominio *Eukarya* y están clasificadas dentro del reino Fungi. Su reproducción puede presentarse sexual (por esporas) y asexual (gemación). Son muy conocidas por su gran capacidad de convertir carbohidratos en etanol y CO₂ mediante el proceso de fermentación alcohólica el cual es un proceso de mucha importancia en la industria de los alimentos (7).

La fermentación alcohólica para la elaboración de cerveza se presenta mediante el uso de levaduras del género *Saccharomyces* (29). El género *Saccharomyces* se encuentra clasificado en el *phylum Ascomycota*, clase *Hemiascomycetes*, orden *Saccharomycetales* y la familia *Saccharomycetaceae*, dividida en 12 clados(8,9). Hasta entonces se han descrito 10 especies dentro del género *Saccharomyces*: *S. cerevisiae*, *S. eubayanus*, *S. arboricolus*, *S. cariocanus*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae*, *S. paradoxus*, *S. pastorianus*, *S. bayanus* y *S. uvarum* (38). Otros autores denominan a *S. uvarum* como *S. bayanus* variedad *uvarum* y a *S. bayanus* como *S. bayanus* variedad *bayanus* ya que estas son variaciones de un mismo taxón (35,36, 37, 39).

Goddard Matthew, Greig Duncan(45) mencionan a *S. cerevisiae* como una levadura nómada que tiene la capacidad de poder vivir y crecer en una gran variedad de ambientes y condiciones. Se ha demostrado las variaciones que existe entre las cepas salvajes de *S. cerevisiae* y su distribución alrededor del mundo (46,47,48,49). Entre las características importantes podemos encontrar la tolerancia al etanol, creci-

miento a pH bajo, producción de enzimas, etc.(29, 51) y las características organolépticas como el sabor y el aroma(50) se pueden obtener de cepas salvajes de *S. cerevisiae* (49, 52).

Identificación Morfológica

La identificación morfológica de las levaduras del género *Saccharomyces* es realizada por medio de la observación macroscópica y microscópica de estos microorganismos. Estas características pueden cambiar de acuerdo con el medio en el que haya crecido el microorganismo.

La textura y elevación de las colonias son las principales características en las que se basa la identificación macroscópica, en la cual que se pueden observar colonias planas, lisas, cremosas o húmedas(10). En el caso de *S. cerevisiae* el color varía dependiendo del medio de cultivo en el que se encuentre la levadura, pudiéndose encontrar colonias de color blanco, crema, verde pálido o azul verdosas, con forma plana y textura húmeda o cremosa (tabla 1)(11).

TABLA 1. Características morfológicas del género *Saccharomyces*

Medio de cultivo	Características microscópicas	Características macroscópicas
Agar malta 5%	Globosas, ovoidales o se alargan	Colonias color crema, lisas, generalmente planas, algunas veces levantada
Agar dextrosa	Blastoconidias alargadas, globosas o elipsoidales con gemación multilateral	Colonias color blanco, planas, húmedas o cremosas
WL	Elipsoidales o alargadas	Colonias de color blanco, lisas y cremosas

Fuente: Tabla adaptada de varias refe-

rencias (14, 15, 16)

Microscópicamente *Saccharomyces* se observa en racimos laxos formados por levaduras grandes, con forma ovalada y cuando son cultivados en agar harina de maíz pueden presentar brotes (12). Generalmente podemos observar a *S. cerevisiae* de forma ovalada, cilíndrica o elíptica. Su tamaño se encuentra entre 2-7 micras de largo dependiendo la edad de la célula, estando aislada o en colonias (15). La presencia de estructuras de reproducción sexual como ascosporas en medios de cultivos que contengan acetato de potasio, extracto de levadura, glucosa y agua, confirman la identificación microscópica de levaduras de género *Saccharomyces* (12).

La levadura *Saccharomyces uvarum* microscópicamente produce un pseudomicelio. Según Giusiano, un pseudomicelio se define como el alargamiento de la célula con puntos de constricción entre las mismas y producción secuencial de gemaciones manteniéndose unidas sin separarse(16). *S. bayanus* se puede apreciar microscópicamente de forma globosa, ovoidal o elipsoide y/o alargada, no produce pseudohifas, presentando una longitud de (2,2-6,0) x (3,5-10,5) micras y macroscópicamente forma colonias lisas (13,14).

Identificación Fisiológica

Las levaduras del género *Saccharomyces* están caracterizadas por su crecimiento en ambientes con anaerobiosis, presentando un crecimiento lento, la fuente de energía más utilizada son los azúcares, principalmente la glucosa, fructosa, sacarosa, manosa(18) y también tienen la capacidad de fermentar biopolímeros como la celulosa(17).

TABLA 2. Fermentación y crecimiento de dos especies del género *Saccharomyces*

Especie	Fermentación							Crecimiento					
	Glucosa	Galactosa	Sacarosa	Maltosa	Lactosa	Rafinosa	Trehalosa	D-Glucitol	Cytx 10000	30°C	37°C	Vit-Libre	Frc
<i>S. cerevisiae</i>	+	Variable	+	Variable	-	+	-	-	-	+	Variable	-	-
<i>S. pastorianus</i>	+	Variable	Variable	+	-	+	-	-	-	+	-	-	+

Fuente: Tabla adaptada de varias referencias(14,19)

S. carlsbergensis se caracteriza por crecer óptimamente entre los 25-30°C y puede crecer a una temperatura máxima de 35-47°C con un pH de 4 a 4,519. La temperatura óptima de crecimiento de *S. cerevisiae* está en un rango de 22-30°C pero no tiene la capacidad de soportar temperaturas de más de 53°C. El pH para una actividad fermentativa está entre 4,5 y 6 y si la fermentación es directa el pH es de 5,2 a 5,7(20).

S. diastaticus se desarrolla a una temperatura óptima de 25-30°C, se puede almacenar a una temperatura de -80°C y liofilizar a 2-8°C (42,43). *S. pastorianus* crece óptimamente entre 25-30°C (44). Para la identificación se realizan una serie de pruebas con distintas fuentes de carbono

para observar fermentación, crecimiento y asimilación (tabla 2 y 3).

Identificación Molecular

El uso del género *Saccharomyces* ha sido de mucha importancia en la industria de las bebidas alcohólicas como la cerveza, vinos y destilados. Esto ha conducido al estudio de las características genéticas y los perfiles específicos de expresión, y así, poder entender de una mejor manera el proceso biológico de la fermentación a nivel molecular y la expresión de genes relacionados a los cambios en las características físicas y químicas del medio de cultivo (40,41).

TABLA 3. Reacciones de asimilación de dos especies del género *Saccharomyces*

Molécula / Especie	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pastorianus</i>
Glucosa	+	+
Galactosa	Variable	+
L-Sorbosa	-	-
Sacarosa	+	+
Maltosa	+	+
Celobiosa	-	-
Trehalosa	+	+
Lactosa	-	-
Melibiosa	Variable	-
Rafinosa	+	+
Melesitosa	Variable	Variable
Inulina	-	-
Almidón	-	-
D-Xylosa	-	-
L-Rabinosa	-	-
D-Rabinosa	-	-
D-Ribosa	-	-
Ramnosa	-	-
D-Samina	-	-
N-acetil D-glucosamina	-	-
Metanol	-	-
Etanol	+	+
Glicerol	-	Variable
Eritritol	-	-
Ribitol	-	-
Galactitol	-	-
D-manitol	-	-

Fuente: Tabla adaptada de varias referencias (14, 19)

PCR: Es una reacción enzimática *in vitro* en la cual se obtienen millones de copias de una secuencia de ADN durante un número de ciclos establecidos. Para obtener nuevo material genético a partir de una secuencia inicial este proceso utiliza la enzima ADN polimerasa (21, 22, 23).

Capello M.S, *et al.* (24) tomaron genes mitocondriales de la subunidad pequeña del ADNr, citocromo oxidasa II, en un estudio de caracterización de cepas de *S. cerevisiae* que fueron aisladas a partir de uvas, con los cebadores d1: 5'-CAA AAT TCA CCT ATA TTC TCA-3' y d2: 5'-GTG GAT TTT TAT TCC A ACA-3', para determinar la autenticidad de las levaduras.

Damas L. y Pereyra B.(25) describen unos genes que codifican para unas proteínas conocidas como zimolectinas llamados *flo*, estos genes pueden encontrarse de manera dominante como FLO1 (FLO4), FLO2, FLO5, FLO8, FLO9, FLO10, FLO11 y Lg-FLO1; y recesivos o semidominantes como *flo3*, *flo6*, *flo7*, *fsu1*, *fsu2* y *fsu3*.

ARN de bajo peso molecular (LMW-RNA): Es un método de identificación molecular basado en los patrones de electroforesis de ARN de bajo peso molecular como los genes ARNr 5S, ARNr 5,8S, ARNt clase 1 y ARNt clase 2. Por medio de los patrones LMW-rRNA se ha dado la posibilidad de llegar hasta la diferenciación de género, mientras que por los patrones de LMW-tRNA ha sido posible diferenciar hasta el nivel de especie en levaduras de interés industrial (26).

Análisis de microsatélites: Los microsatélites o “secuencias simples repetidas” (SSRs) son secuencias de ADN conformadas por repeticiones de nucleótidos de 1 a 6 pares de bases. Esta técnica basada en PCR consiste en la amplificación de SSRs presentes en el DNA26. Estas pueden presentarse por varias repeticiones de un solo nucleótido (AAAAAA = A6) se les denomina como puros o perfectos. También se presentan de dos o más nucleótidos diferentes los cuales son considerados como compuestos (AAAATTTT= A4 T4) (27). Esta técnica se ha usado en la identificación de especies del género *Zygosaccharomyces* (26, 28).

Polimorfismo del DNA mitocondrial (mtDNA): Esta técnica se fundamenta en las diferencias que pueden encontrarse en el contenido de G+C entre el ADN nuclear (nDNA) y el ADN mitocondrial (mtDNA) (26). Cuando se hace un aislamiento de DNA total, se usan enzimas de restricción específicas que tengan la capacidad de

poder reconocer regiones ricas en G+C, el nDNA sufre una digestión lo que permite generar muchos fragmentos de tamaño muy pequeño. Estos fragmentos no pueden ser detectados en el gel de agarosa por lo cual solo se logran apreciar los fragmentos que corresponden al mtDNA (26, 30). También se usan métodos basados en el uso del genoma ribosomal.

Polimorfismo de Longitud en los Fragmentos de Restricción del NA/ARNr (RFLP): El polimorfismo es determinado por la diferencia entre los organismos dado el análisis de los patrones de ruptura que se producen en un lugar específico del genoma en el momento que es cortado por enzimas de restricción. En un gel de electroforesis se puede observar un patrón de bandas polimórficas que corresponden a los fragmentos de diferentes tamaños, que se originaron con el corte de cada endonucleasa. La similitud de los patrones que fueron generados da la capacidad de determinar correlaciones entre especies y cepas, junto a la presencia de patrones únicos que permiten dicha identificación (31).

La técnica de RFLP ha sido ampliamente utilizada en estudios de identificación y filogenia de levaduras de interés industrial, en la cual se tomaron las regiones del ADNr 5,8S y los Espaciadores Transcritos Internos (*Internal Transcribed Spacers*) conocidos por sus siglas en inglés ITS 1 e ITS 2 (5,8S – ITS)(32,33). La región 5,8S es codificadora, conservada y muestra una baja variabilidad intraespecífica haciendo que la delimitación entre las cepas de una misma especie no sea permitida. Aun así, la zona de los ITS, que es una región no codificadora e hipervariable, a nivel interespecífico, permite el reconocimiento de la región. Este método se ha utilizado en la identificación de especies del género *Kluyveromyces* (34).

Conclusiones y Recomendaciones

Los medios de cultivo para el aislamiento de levaduras tipo *Saccharomyces* deben contener glucosa, maltosa o sacarosa como fuente de carbono y extracto de levadura, también es posible agregar antibióticos para evitar el crecimiento de bacterias. Algunos de los agares más utilizados son el papa dextrosa (PDA), Sabouraud dextrosa o agar dextrosa, Sabouraud maltosa o agar malta, WL.

Para identificar a las levaduras aisladas se deberá empezar por la observación de las características macroscópicas y/o microscópicas seguidas de la confirmación por pruebas fisiológicas o técnicas moleculares. Los métodos moleculares por su alta especificidad, sensibilidad y rapidez son recomendables. *S. cerevisiae* tiene la gran ventaja de ser un organismo modelo completamente secuenciado y por lo tanto es más sencillo encontrar material de referencia. A nivel molecular la utilización de sondas y primers basados en secuencias de los genes de floculación *flo1* y *flo11*, los cuales codifican para la producción de las proteínas llamadas zimolectinas, constituyen los más frecuentes marcadores para la identificación.

Entre las principales características fisiológicas de las levaduras del género *Saccharomyces* utilizadas en la elaboración de cerveza se encuentran la tolerancia al etanol, crecimiento a pH bajo, producción de enzimas, el sabor y el aroma. Morfológicamente las características macroscópicas son el color, la textura y elevación de las colonias. Microscópicamente las levaduras del género *Saccharomyces* pueden observarse como racimos laxos de levaduras grandes, ovales y la identificación es confirmada por la estructura de reproducción sexual como ascosporas.

Referencias Bibliográficas

1. Chamorro, David. Elaboración de un plan de negocios para la producción de cerveza artesanal [Tesis]. Universidad Austral de Chile (2012). Puerto Montt, Chile
2. Carretero, Francisco. Innovación tecnológica en la industria de bebidas [Tesis]. Escola Universita D'enginyeria técnica industrial de Barcelona (2006). Barcelona, España
3. De la Bandera, Mauro. Introducción de cerveza tipo artesanal en el mercado de la ciudad de Ambato [Tesis]. Pontificia universidad católica del Ecuador (2012). Ambato, Ecuador
4. Jaramillo, Xavier., Salazar, Patricio. Evaluación del uso entre banano verde o banano maduro (Cavendish) como adjunto en el desarrollo de una cerveza artesanal. Escuela superior politécnica del litoral (2014). Guayaquil, Ecuador
5. Zambrano, Juan., Borbor, Kleber. Utilización de una nueva cepa de levadura en el proceso de fermentación en una industria cervecera en la ciudad de Guayaquil [Tesis]. Escuela superior politécnica del litoral (2014). Guayaquil, Ecuador
6. Hernandez, Fremio. Efecto de la temperatura y el tiempo de maceración en la elaboración de un prototipo de cerveza tipo Bock (2009). Zamorano, Honduras
7. Tacury L. Evaluación del potencial hidrolítico y fermentativo de levaduras antárticas. Escuela superior politécnica del litoral (2015). Guayaquil, Ecuador
8. Miranda D. Selección de levaduras enológicas del género *Saccharomyces* nativas de viñedos establecidos en Querétaro. Universidad autónoma de Querétaro (2013). Querétaro, México

9. Pérez. Obtención, estabilización y selección de levaduras híbridas de *Saccharomyces* de interés enológico. Universitat de Valencia (2015). Valencia, España
10. Torija J. Ecología de levaduras: selección y adaptación a fermentaciones vínicas [Tesis]. Universitat Rovira I Virgili (2002). Tarragona, España
11. Universidad Autónoma Metropolitana. Microbiología del vino [Internet]; Disponible en: http://sgpwe.izt.uam.mx/files/users/uami/jrvc/enologia/clase_7microbiologia_del_viino_2011-O.pdf [Consultado en 19 Sep 2017]
12. Tangarife V. *Saccharomyces spp* [Internet]; Disponible en: <http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true> HYPERLINK «<http://aprendeonline.udea.edu.co/lms/moodle/mod/resource/view.php?inpopup=true&>»&id=100776 [Consultado en 8 Mar 2016]
13. Viticulture & Enology. *Saccharomyces bayanus* [Internet]; Disponible en: http://wineserver.ucdavis.edu/industry/enology/winemicro/wineyeast/saccharomyces_bayanus.html [Consultado en 21 Abril 2016]
14. Cletus P. Kurtzman, Jack W. Fell. The Yeasts, A Taxonomic Study Fourth edition [Libro] Página 362 [Consultado en 31 Mar 2016]
15. Washington C. Winn, Stephen D. Allen, William M. Janda, Elmer W. Koneman, Gary W. Procop, Paul C. Schereckenberger y Gail L. Woods. Koneman Diagnóstico microbiológico [Libro] Página 1208 [Consultado en 14 Mar 2016]
16. Giusiano G. Micología General [Internet]; Disponible en: <http://ecaths1.s3.amazonaws.com/catmicromed/APUNTE%20Micologia%20general.pdf> [Consultado en 17 Mar 2016]
17. Buitrago, Tenjo D. Obtención de un sustrato fermentable de origen vegetal y su evaluación con células libres de *Saccharomyces cerevisiae* [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana (2007). Bogotá D.C, Colombia
18. Fajardo E, Sarmiento S. Evaluación de melaza de caña como sustrato para la producción de *Saccharomyces cerevisiae* [Tesis]. Pontificia Universidad Javeriana (2007). Bogotá D.C, Colombia
19. Fernández L. Determinación del tiempo de crecimiento exponencial de la levadura *Saccharomyces carlsbergensis*, en tanques verticales cilindro cónicos, en la fase de fermentación del proceso de elaboración de cerveza pilsener, cervecería nacional s. a. planta quito [Tesis]. Universidad tecnológica equinoccial (2013). Quito, Ecuador
20. Ferré & Consulting USA. La Levadura (*Saccharomyces cerevisiae*) [Internet]; Disponible en: <http://www.artesblancas.com/la-levadura-saccharomyces-cerevisiae/> [Consultado en 27 Mar 2016]
21. Tamay de Dios L, Ibarra C, Velasquillo C. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. Investigación en discapacidad (2013); 2(2): 70-78
22. Bolívar AM, Rojas A, García-Lugo P. PCR y PCR-Múltiple: parámetros críticos y protocolo de estandarización. Avan Biomed (2014); 3: 25-33
23. Rodríguez I, Barrera H. La reacción en cadena de la polimerasa a dos décadas de su invención. Ciencia UANL (2004); 7(3): 323-335
24. Capello, M.S, Bleve G, Grieco F, Dellaglio F, Zacheo G. Characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains isolated from must of grape grown in experimental vineyard. Journal of applied microbiology(2004);97(6):

- 1274-1280
25. Damas L, Pereyra B. Control genético de la floculación de *Saccharomyces cerevisiae* en el proceso de fermentación industrial. *Ciencia UANL* (2009); 12(4):417-429
 26. Oberá T. Métodos moleculares de identificación de levaduras de interés biotecnológico. *Revista Iberoamericana de Microbiología* (2004); 21: 15-19
 27. Lobo A, Morales A. Microsatélites [Internet]; Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/710/microsatelites.pdf> [Consultado 16/05/2016]
 28. Loureiro V, Querol A. The prevalence and control of spoilage yeasts in foods and beverages. *Trends Food Sci Technol* (1999); 10: 1-10
 29. Bokulich N, Bamforth C. The microbiology of malting and brewing. *Microbiology and molecular biology reviews* (2013); 77(2): 157-172
 30. Alcoba J, Arévalo M, Pérez E, Laich F, Rívero B. Yeast molecular identification and typing. *Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology* (2007): 535-546.
 31. Henrick-Kling CMT. Identification of *Brettanomyces/Dekkera* species based on polymorphisms in the rRNA internal transcribed spacer region. *Food Technol Biotechnol* 2000; 38: 69-75
 32. Esteve-Zarzoso B, Belloch C, Uruburu F, Querol A. Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8 rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *Intern Jour Syst Bacteriol* 1999; 49: 329-337.
 33. Kurtzman CP. Molecular taxonomy of the yeasts. *Yeast* 1994; 10: 1727-1740.
 34. Belloch C, Barrio E., García MD, Querol A. Inter and intra-specific chromosome pattern variation in the yeast genus *Kluyveromyces*. *Yeast* 1998; 14: 1341-1354.
 35. Pérez-Través L, Lopes C, Querol A, Barrio E. On the complexity of the *Saccharomyces bayanus* taxon: Hybridization and potential hybrid speciation. *PLOS ONE* (2014); 9(4): 1-14.
 36. Nguyen Huu-Vang, Legras Jean-Luc, Neuvéglise Cécile, Gaillardin Claude. Deciphering the hybridisation history leading to the lager lineage based on the mosaic genomes of *Saccharomyces bayanus* strains NBRC1948 and CBS380. *PLOS ONE* (2011); 6(10): 1-19.
 37. Rainieri S, Kodama Y, Kaneko Y, Mikata K, Nakao Y, Ashikari T. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Applied and environmental microbiology* (2006); 72(6): 3968-3974.
 38. Rodríguez M, Pérez-Través L, Sangorrín M, Barrio E, Lopes C. *Saccharomyces eubayanus* and *Saccharomyces uvarum* associated with fermentation of *Araucaria araucana* seeds in Patagonia. *FEMS Yeast research* (2014); 14: 948-965.
 39. López-Malo M, Querol A, Guillamon J. Metabolomic comparison of *Saccharomyces cerevisiae* and the cryotolerant species *S. bayanus* var. *uvarum* and *S. kudriavzevii* during wine fermentation at low temperature. *PLOS ONE* (2013); 8(3): 1-14.
 40. Arias J. Diversidad genética en las especies del complejo *Saccharomyces sensu stricto* de fermentaciones tradicionales [Tesis]. *Universitat de Valencia* (2008). Valencia, España.
 41. Verdugo A. Dinámica de levaduras mediante técnicas microbiológicas y moleculares. *Lacandonia* (2007); 1(1): 29-35.
 42. ATCC. *Saccharomyces diastaticus*

- (ATCC® 13007™) [Internet]; Disponible en: <https://www.atcc.org/~/ps/13007.ashx> [Consultado en 28 Septiembre 2017].
43. ATCC. *Saccharomyces diastaticus* (ATCC® 62988™) [Internet]; Disponible en: www.atcc.org/products/all/62988.aspx [Consultado en 28 Septiembre 2017].
 44. ATCC. *Saccharomyces pastorianus* (ATCC® 42367™) [Internet]; Disponible en: www.atcc.org/products/all/42367.aspx [Consultado en 28 Septiembre 2017].
 45. Goddard M, Greig D. *Saccharomyces cerevisiae*: a nomadic yeast with no niche?. *FEMS Yeast research* (2015); 15(3): 1-6.
 46. Steensels J, Snoek T, Meersman E, Nicolino M, Voordeckers, Verstrepen. Improving industrial yeast strains: exploiting natural and artificial diversity. *FEMS Microbiol rev* (2014); 38: 947-955.
 47. Tofalo R, Perpetuini G, Schirone M, Fasoli G, Aguzzi I, Corsetti A. Biogeographical characterization of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast by molecular methods. *Frontiers in microbiology* (2013); 4: 1-13.
 48. Sweeney J, Kuehne H, Sniegowski P. Sympatric natural *Saccharomyces cerevisiae* and *S. paradoxus* populations have different thermal growth profiles. *FEMS Yeast research* (2004); 4: 521-525.
 49. Barbosa C, Lage P, Vilela A, Mendes-Faia A, Mendes-Ferreira A. Phenotypic and metabolic traits of commercial *Saccharomyces cerevisiae* yeasts. *AMB Express* (2014); 4(39): 1-14.
 50. Parker N, James S, Dicks J, Bond C, Nueno-palop C, White C, Roberts I. Investigating flavour characteristics of british ale yeasts: techniques, resources and opportunities for innovation. *Yeast* (2015); 32: 281-287.
 51. Suranská H, Vránová D, Omelková J. Isolation, identification and characterization of regional indigenous *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Brazilian journal of microbiology* (2016); 47: 181-190.
 52. Walker M, Nguyen T, Liccioli T, Schmid F, Kalatzis N, Sundstrom J, et al. Genome-wide identification of the fermentome; genes required for successful and timely completion of wine-like fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Genomics* (2014); 15(552): 1-17