



ARTÍCULO ESPECIAL

Síntesis y regulación de los compuestos del aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: alcoholes superiores



Claudia L. Loviso^a y Diego Libkind^{b,*}

^a Centro para el Estudio de Sistemas Marinos (CESIMAR), CONICET, Puerto Madryn, Argentina

^b Laboratorio de Microbiología Aplicada, Biotecnología y Bioinformática de levaduras, Instituto Andino Patagónico de Tecnologías Biológicas y Geoambientales (IPATEC), CONICET - Universidad Nacional del Comahue, Bariloche, Argentina

Recibido el 27 de abril de 2018; aceptado el 14 de agosto de 2018

Disponible en Internet el 1 de febrero de 2019

PALABRAS CLAVE

Flavor;
Alcoholes superiores;
Levaduras cerveceras

KEYWORDS

Flavor;
Fusel alcohols;
Brewing yeast

Resumen Entre los principales componentes de la cerveza, los alcoholes superiores son de importancia por su influencia en el sabor y el aroma del producto final, y por ende, en su calidad. Durante el proceso de producción de cerveza, estos compuestos se generan por las levaduras a partir del metabolismo de aminoácidos. Tanto las levaduras como las condiciones de fermentación y la composición del mosto afectan el perfil de alcoholes superiores y sus concentraciones. En la presente revisión se reúne información detallada sobre las enzimas que participan en la formación de alcoholes superiores y su regulación. Además, se describe cómo el tipo de levadura utilizada, la temperatura de fermentación, la composición de hidratos de carbono y la fuente de nitrógeno presente en el mosto, entre otros parámetros de fermentación, afectan la biosíntesis de estos alcoholes. El análisis de los factores que afectan los niveles de alcoholes superiores durante la elaboración de la cerveza brinda a los productores cerveceros una herramienta de relevancia para lograr las características deseadas en el producto final, y al mismo tiempo, pone en evidencia aspectos aún desconocidos para la ciencia.

© 2018 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/>).

Synthesis and regulation of flavor compounds derived from brewing yeast: fusel alcohols

Abstract Among the main beer components, fusel alcohols are important because of their influence on the flavor of the final product, and therefore on its quality. During the production process, these compounds are generated by yeasts through the metabolism of amino acids. The

* Autor para correspondencia.

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

yeasts, fermentation conditions and wort composition affect fusel alcohols profiles and their concentrations. In this review, we provide detailed information about the enzymes involved in fusel alcohols formation and their regulation. Moreover, we describe how the type of yeast used, the fermentation temperature and the composition of carbohydrates and nitrogen source in wort, among other fermentation parameters, affect the biosynthesis of these alcohols. Knowing how fusel alcohol levels vary during beer production provides a relevant tool for brewers to achieve the desired characteristics in the final product and at the same time highlights the aspects still unknown to science.

© 2018 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 una mezcla compleja, no solo por los compuestos que aportan las materias primas utilizadas para su elaboración (agua, malta, lúpulo y levadura), sino porque durante las diferentes etapas del proceso se producen entre ellos numerosas reacciones e interacciones que definen las características organolépticas (o el «*flavor*») de la cerveza³⁸.

Las levaduras son el ingrediente más activo en términos generales respecto de su influencia en el *flavor*, ya que pueden producir numerosos compuestos que inciden tanto de manera positiva como negativa en la calidad de la cerveza. Entre ellos se destacan los ésteres, los alcoholes superiores, los fenoles, los compuestos sulfurados, los aldehídos, las cetonas y los ácidos orgánicos, entre otros. En una publicación anterior se abordó el tema de la síntesis y la regulación de los ésteres por parte de las levaduras cerviceras⁵⁶; en el presente trabajo nos enfocamos, particularmente, en los alcoholes superiores.

Los alcoholes superiores son el producto del metabolismo secundario de las levaduras, se generan en altas concentraciones respecto de otros compuestos volátiles y son de gran interés por su impacto en el aroma y el sabor de las cervezas⁶⁸. Este tipo de alcoholes poseen más de dos carbonos y su peso molecular y punto de ebullición son mayores que los del etanol. En cerveza se pueden encontrar aproximadamente 40 alcoholes superiores diferentes⁵⁸; los que más influyen en el *flavor* de las cervezas son el propanol, el isobutanol, el feniletanol, el alcohol amílico y el alcohol isoamílico (tabla 1). Este último es el que se encuentra en mayor proporción y el que más afecta la tomabilidad de la cerveza, dado que a concentraciones elevadas genera un intenso *flavor* a solvente⁶³.

Al igual que la mayoría de los compuestos del *flavor*, los alcoholes superiores pueden tener un efecto positivo o negativo según su concentración. Sin embargo, en este caso es más probable que su aporte sea negativo, por lo que la comprensión de los factores que afectan su síntesis es muy importante. Altas concentraciones de alcoholes superiores (>300 mg/l) en cerveza generan un *flavor* fuerte (a solvente) y pungente, lo que crea una sensación de calentamiento en boca, mientras que niveles adecuados pueden incrementar, en ciertos estilos, la complejidad de bebidas

Tabla 1 Alcoholes superiores más relevantes en el *flavor* de la cerveza

	Valores umbrales ^a (mg/l)	Descripción aromática
Propanol	700	Solvente, dulce, alcohol
Isobutanol	200	Solvente, alcohol
Alcohol isoamílico	50-65	Frutado, banana, alcohol
Alcohol amílico	50-70	Alcohólico, solvente
Feniletanol	40	Floral, rosas

^a Detectados por el humano.
Tomado de Pires et al.⁶⁵.

fermentadas intensificando la percepción alcohólica^{38,63}. Asimismo, la relación entre la cantidad de alcoholes superiores y otros compuestos volátiles es de gran importancia^{65,71}. En cervezas Lager, es deseable una relación 4:1 o 3:1 de alcoholes vs. ésteres. Un aumento en esta relación, provocada por un incremento de alcoholes superiores, da como resultado cervezas más secas y con aromas de menos carácter².

Los alcoholes superiores son generados por las levaduras durante la fase lag (o de aclimatación) de la fermentación, a partir de la síntesis o la degradación de aminoácidos⁹⁸ (utilizando piruvato y acetil-CoA en el primer caso o después de la asimilación de la fuente de nitrógeno en el segundo). Es decir que la acumulación de alcoholes superiores en la cerveza es el resultado de la reproducción activa de la levadura, que demanda de aminoácidos para fabricar proteínas. El catabolismo de aminoácidos, después de que estos ingresan a las células de levadura, puede llevarse a cabo a través de la vía de Ehrlich. Esta vía incluye reacciones de transaminación, descarboxilación y reducción para dar lugar a los alcoholes correspondientes, los cuales posteriormente son excretados al medio³⁴.

La producción de alcoholes superiores varía con las cepas de levadura utilizada²⁰. No obstante, otros parámetros fermentativos como la temperatura de fermentación, la aireación y el contenido de nitrógeno en el mosto también influyen en los niveles producidos de estos

compuestos^{45,47,48}. En el presente trabajo se describe el modo en que las levaduras sintetizan alcoholes superiores, así como también las enzimas involucradas en este proceso y su regulación. Además, se analiza cómo diferentes factores relevantes para producción de cerveza afectan las concentraciones de este tipo de compuestos del *flavor*.

Es innegable el crecimiento del segmento de cervezas artesanales: se anticipa un incremento anual a nivel mundial del 9,3% en el período 2015-2020⁷. Para lograr un producto de calidad y acorde con la demanda de los consumidores, los productores de este tipo de cervezas —a menudo insertos en mercados incipientes, aunque promisorios, como es el caso de la Argentina— demandan cada vez más asesoramiento acerca del proceso de producción en general y sobre el manejo de levaduras y el control del *flavor* generado en la cerveza, en particular. Se pretende que esta revisión, junto con la anterior de la misma serie⁵⁶, no solo ayuden a dar cuenta de lo que se conoce hasta el día de hoy respecto de cómo se generan los compuestos del *flavor*, sino que también se constituyan en una herramienta útil para los productores de cerveza artesanal en su camino por obtener los aromas y sabores deseados en sus productos.

¿Cómo se generan los alcoholes superiores en la cerveza?

Los alcoholes superiores son formados por las levaduras, a partir de la incorporación y el metabolismo de los aminoácidos presentes en el mosto (fig. 1). El ingreso de los aminoácidos en las células de levaduras es llevado a cabo por proteínas transportadoras ubicadas en la membrana plasmática, las cuales poseen propiedades diferentes en cuanto a su especificidad, afinidad por sustratos, capacidad y regulación^{5,39}. Los aminoácidos ramificados como la valina, la leucina y la isoleucina, requeridos para la síntesis de isobutanol, alcohol isoamílico y alcohol amílico, respectivamente, pueden ingresar a la célula por medio de una permeasa general (GAP), de las permeasas BAP2 y BAP3, con alta afinidad por estos aminoácidos, y de otras permeasas menos específicas, como TAT1, AGP2 y AGP3^{31,77}.

Grauslund et al.³¹ detectaron por primera vez el gen *BAP2* en 1995. En ese mismo trabajo se indica que la delección del gen *BAP2* en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* cuyo alelo *GAP1* también se encuentra delecionado ($\Delta gap1$) reduce en un 45%, aproximadamente, la absorción de valina y leucina, y en cerca de un 25% la absorción de isoleucina, respecto de una cepa control que contiene delecciones en el gen *GAP1* únicamente. La incorporación de otros aminoácidos hidrofóbicos no se vio afectada por la delección de *BAP2*³¹. La transcripción de este gen depende de la fuente de nitrógeno presente en el medio y responde de manera opuesta a la transcripción del gen *GAP1*. Este último gen se encuentra sujeto a la represión por fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables, como amonio, asparagina o glutamina^{21,78}. *BAP2* puede expresarse en un medio mínimo que contiene amonio como única fuente de nitrógeno, pero los niveles de transcripto aumentan con el agregado de cantidades micromolares de leucina. Esta inducción se ve acompañada no solo de la incorporación de leucina en la célula, sino también de isoleucina y valina²¹.

En condiciones típicas de producción industrial de cerveza, la formación de isobutanol, alcohol isoamílico y alcohol amílico se encontró asociada a la absorción de aminoácidos ramificados, particularmente al emplear la levadura Lager S23 durante la fermentación. Asimismo, diferencias en la transcripción de permeasas presentes en S23 y S81 (levaduras Lager y Ale, respectivamente) sugieren que estas enzimas podrían afectar la incorporación de aminoácidos y, por lo tanto, las concentraciones de alcoholes superiores logradas por estas cepas⁶⁶. Esta hipótesis, sin embargo, aún debe ser testeada a fin de confirmar que existe una relación entre los niveles de estos transcriptos y la producción de metabolitos involucrados en la formación del *flavor*. La concentración de alcoholes superiores depende también de la expresión y actividad de las enzimas involucradas en su síntesis.

Una vez dentro de la célula, los aminoácidos como isoleucina, leucina, la valina, tirosina, el triptofano, metionina y la fenilalanina pueden ser catabolizados mediante la vía de Ehrlich para dar lugar a la formación de alcoholes superiores, y para que esto ocurra deben actuar enzimas transaminasas, descarboxilasas y alcohol deshidrogenasas²⁶. Estos compuestos también se producen durante la biosíntesis de dichos aminoácidos³², ya que los esqueletos carbonados generados durante este proceso son capaces de entrar en la vía de Ehrlich como oxoácidos. La combinación precisa de enzimas activas en un determinado momento depende del aminoácido presente en el medio, del suplemento de oxoácidos y del estado de crecimiento del cultivo^{20,76}. Asimismo, de acuerdo con las necesidades celulares, las vías catabólicas y biosintéticas pueden relacionarse. Por ejemplo, el aminoácido valina es capaz de generar tanto isobutanol como alcohol isoamílico, dado que el catabolismo de este aminoácido y la síntesis de leucina comparten un *pool* común de alfa-cetoisovalerato¹⁸.

Vía de Ehrlich

Aminotransferasas

En la levadura *S. cerevisiae*, la última reacción en la biosíntesis de aminoácidos y la primera involucrada en su catabolismo se debe a la acción aminotransferasas. Estas enzimas catalizan la transferencia de grupos amino entre aminoácidos y sus correspondientes alfa-cetoácidos, precursores de los alcoholes superiores. Cuatro aminotransferasas se encuentran implicadas en la primera reacción de la vía de Ehrlich. Estas son codificadas por los genes *BAT1* (*Twt1* o *Eca39*), *BAT2* (*Twt2* o *Eca40*), *ARO8* y *ARO9*³⁴. Las enzimas *BAT1* y *BAT2* participan de la transaminación de aminoácidos ramificados y sus funciones se ven reflejadas en su localización celular y sus patrones de expresión. *BAT1* se encuentra ubicada en la mitocondria, mientras que su isoenzima *BAT2* se localiza en el citosol²⁵. Asimismo, la isoenzima mitocondrial presenta una alta expresión durante el crecimiento exponencial en cultivos batch y un carácter predominantemente biosintético, aunque también posee un rol catabólico, evidenciado cuando el gen *BAT2* es disfuncional¹⁵. Su contraparte citosólica, en cambio, se expresa preferentemente durante la fase estacionaria

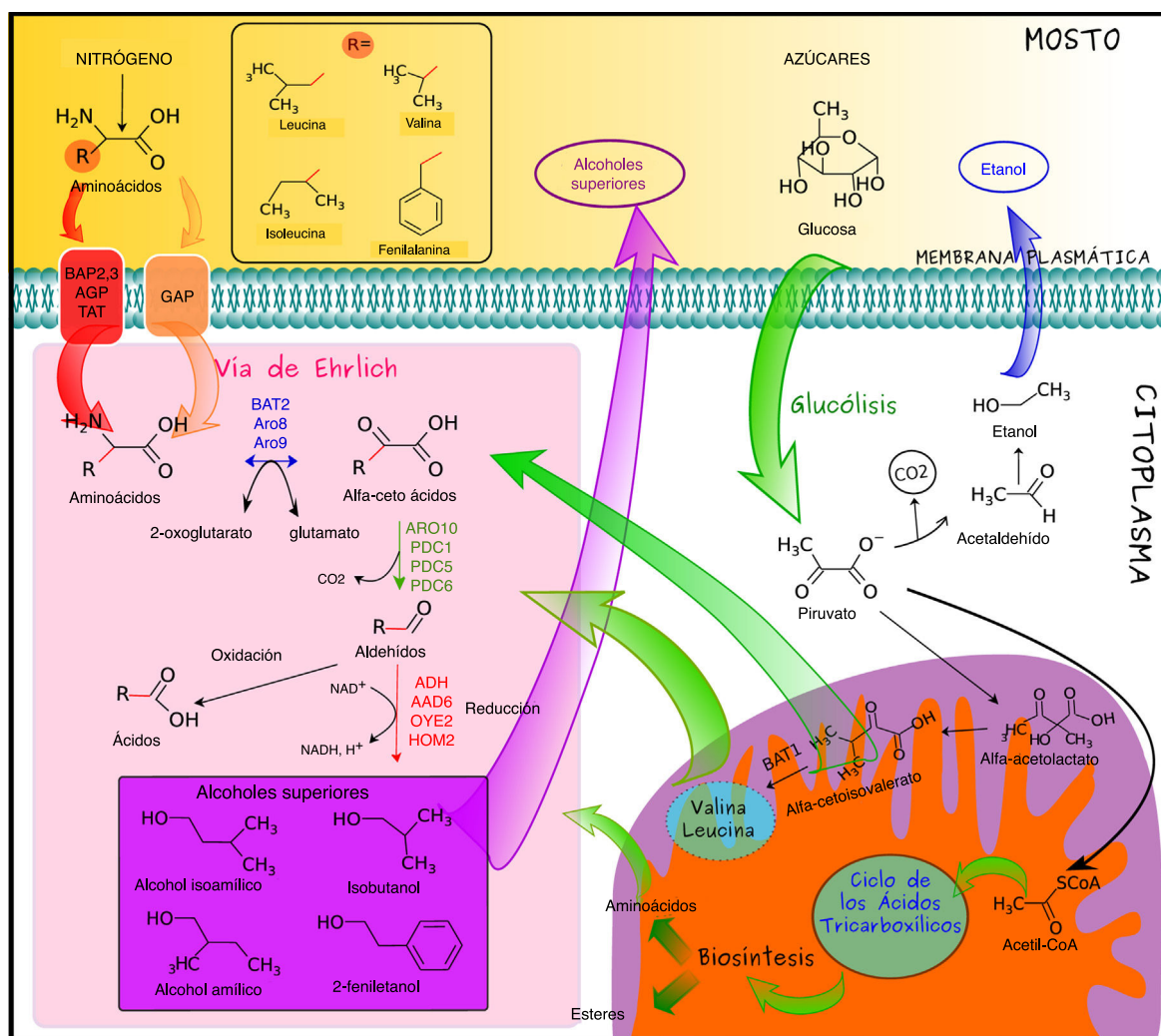


Figura 1 Esquema de las principales rutas metabólicas que contribuyen a la síntesis de alcoholes superiores en levaduras inoculadas en mosto cervicero. En la membrana plasmática, BAP2,3, AGP, TAT y GAP representan proteínas transportadoras de aminoácidos. Dentro de la vía de Ehrlich (citoplasma), las flechas en azul, verde y rojo indican la acción de enzimas aminotransferasas, descarboxilasas y deshidrogenasas, respectivamente. El color de esta figura solo puede apreciarse en la versión electrónica del artículo.

y se encuentra involucrada casi exclusivamente en el catabolismo de la valina, la isoleucina y la leucina^{15,34}.

Algunos trabajos en los que se estudió el efecto de la delección de estos genes mostraron que la ausencia de ambos conduce a un retardo en el crecimiento y una menor producción de alcoholes superiores^{15,76}. Asimismo, y a pesar de que la mutación simple del gen *BAT1* no disminuye de manera significativa la producción de alcoholes superiores, se observaron efectos drásticos en la producción de isobutanol, alcohol amílico e alcohol isoamílico tras la delección del gen *BAT2*^{24,76,99}. Más aún, la sobreexpresión de este gen puede aumentar hasta dos veces la producción de isobutanol¹⁴. Estos resultados indican que la expresión de *BAT2* sería esencial para la formación de estos compuestos, principalmente durante el crecimiento de las levaduras en etanol⁷⁶. No obstante, otras transaminasas podrían estar involucradas en la formación de estos alcoholes^{24,99}.

ARO8 y *ARO9* son dos aminotransferasas que poseen una amplia especificidad de sustrato y, en la vía de Ehrlich,

catalizan la transaminación de aminoácidos aromáticos⁸⁹. Ambas enzimas difieren en su perfil de expresión. Al igual que *BAT1*, *ARO8* presenta una mayor expresión al inicio de la fermentación respecto de *ARO9*⁶⁶. *ARO8* también se expresa constitutivamente bajo el control de la síntesis de aminoácidos, mientras que la expresión de *ARO9* es inducida en presencia de aminoácidos aromáticos⁴⁰. Boer et al.⁸ arribaron a una conclusión similar al observar una regulación positiva en la transcripción de *ARO9* y *BAT2* cuando a cultivos de *S. cerevisiae* se agregó fenilalanina, metionina y leucina como únicas fuentes de nitrógeno.

Recientemente, a partir del perfil global de transcripción en levaduras Ale y Lager, se analizó la relación entre la expresión de genes asociados a la formación del *flavor* y los niveles de compuestos volátiles⁶⁶. La transcripción de los genes *BAT1* y *ARO8* fue menor en la levadura de tipo Lager, lo cual podría explicar los menores niveles generados de isobutanol, alcohol amílico e alcohol isoamílico en comparación con la levadura de tipo Ale⁶⁶. No se han encontrado estudios

en los que la sobreexpresión de *ARO8* y *ARO9* se vincule con aumentos de los niveles de feniletanol.

Descarboxilasas

La descarboxilación de los alfa-cetoácidos derivados de la transaminación de los aminoácidos representa la única reacción irreversible en la vía de Ehrlich. Esta etapa es catalizada por descarboxilasas dependientes de tiamina pirofosfato. *S. cerevisiae* posee cinco descarboxilasas de este tipo, PDC1, PDC5, PDC6, ARO10 y THI3, las cuales conforman una familia de proteínas estrechamente relacionadas²⁰. Los primeros estudios acerca de estas enzimas mostraron que en la descarboxilación de cada oxoácido proveniente del catabolismo de la valina, la leucina y la isoleucina participaba una descarboxilasa diferente, o un grupo determinado de ellas, lo que indica una alta especificidad en esta etapa de la vía de Ehrlich^{18,19}. No obstante, en ese entonces se desconocía la descarboxilasa codificada por el gen *ARO10* y, hasta el momento, no hay pruebas de que el gen *THI3* realmente codifique una descarboxilasa con actividad catalítica^{19,72,93}.

Una caracterización más profunda de estas enzimas utilizando una combinación de estrategias fisiológicas, genéticas y bioquímicas demostró luego que las tres isoenzimas PDC pueden descarboxilar sustratos aromáticos como el fenilpiruvato y los 2-oxoácidos derivados de aminoácidos ramificados y azufrados, sin diferir de manera significativa en su especificidad, a excepción de PDC5, que posee mayor actividad frente a fenilpiruvato y una K_m más alta para el piruvato^{72,93}. De las cinco descarboxilasas, PDC1, PDC5 y PDC6 son las únicas capaces de catalizar la descarboxilación de 2-oxoácidos lineales como el 2-cetobutanoato y el 2-cetopentanoato, precursores de n-propanol y n-butanol, respectivamente⁷².

Las isoenzimas PDC, por otra parte, se expresan de manera diferencial. La enzima PDC1 es capaz de expresarse en casi cualquier condición, mientras que la PDC5 presenta una mayor transcripción en ausencia del gen *PDC1*^{76,79}, bajo limitación de nitrógeno^{8,87} y en cultivos limitados en tiamina⁶¹. Los niveles de expresión de PDC6 son mayores en cultivos limitados en azufre⁸⁷.

La ARO10 es una descarboxilasa con amplia especificidad de sustrato, cuya actividad depende de la fuente de nitrógeno utilizada durante el crecimiento de las levaduras. Extractos celulares de una cepa de *S. cerevisiae* carente de los genes *PDC1*, *PDC5*, *PDC6*, *THI3* y *ARO10*, a la que se incorporó un vector con el gen *ARO10* bajo el control de un promotor constitutivo, mostraron actividad descarboxilasa sobre 2-oxoácidos derivados de la transaminación de la valina, la isoleucina, la leucina, la metionina y la fenilalanina^{72,92}.

En comparación con las tres enzimas PDC, ARO10 presentó mayor afinidad por estos sustratos, de modo que esta podría ser la principal descarboxilasa responsable de la formación de alcoholes superiores relevantes en el *flavor* de cervezas^{72,91}. La transcripción de *ARO10* es inducida por leucina, metionina, triptófano y fenilalanina, aunque es mayor en cultivos que contienen aminoácidos aromáticos como única fuente de nitrógeno^{8,72,92,93}. La regulación transcripcional de *ARO10* es mediada por el regulador positivo

ARO80, cuya síntesis se encuentra sometida a la represión por catabolitos nitrogenados (NCR). Este regulador se une constitutivamente a promotores de *ARO9* y *ARO10* favoreciendo así la expresión de estos genes en cultivos carentes de fuentes de nitrógeno fácilmente asimilables. Además, los aminoácidos aromáticos activan el regulador ARO80 e incrementan aún más la transcripción de *ARO9* y *ARO10*, ejerciendo así un efecto aditivo en la regulación de ambos genes⁴⁶. Por otro lado, Vuralhan et al.^{92,93} observaron que los niveles de transcripto no se correlacionan con la actividad descarboxilasa, lo cual sugiere que la regulación de la expresión de *ARO10* podría ocurrir en la etapa postranscripcional.

Diferentes alelos *ARO10* pertenecientes a distintas levaduras también pueden codificar enzimas ARO10 con una amplia especificidad de sustrato, aunque difieren en su regulación y actividad^{9,83}. En la levadura cervecera *Saccharomyces pastorianus* CBS1483 (híbrido de *S. cerevisiae* x *Saccharomyces eubayanus*), si bien la expresión de los alelos *ARO10* correspondientes a cada subgenoma (*LgSeubARO10* y *LgScARO10*) se induce en presencia de fenilalanina, dicha inducción es mayor en el alelo *LgScARO10*. Más aún, los niveles de transcripto de *LgSeubARO10* se ven incrementados en presencia de fuentes de nitrógeno como amonio y leucina, no así su contraparte derivada del subgenoma de *S. cerevisiae* (*LgScARO10*)⁹. Ante estos resultados, Bolat et al.⁹ sugirieron que *LgSeubARO10* y *LgScARO10* cumplirían diferentes roles. Por su expresión constitutiva en ausencia de aminoácidos extracelulares, *LgSeubARO10* estaría involucrada en la producción de alcoholes superiores a partir de la síntesis de aminoácidos, mientras que *LgScARO10* contribuiría a su formación mediante la vía de Ehrlich. Además, a pesar de que ambos alelos mostraron una actividad similar frente a la mayoría de los sustratos evaluados, con preferencia por el fenilpiruvato, la actividad de la descarboxilasa codificada por *LgSeubARO10* frente a cetio-isovalerato (compuesto que forma parte de la síntesis de la leucina y del catabolismo de la valina) fue dos veces mayor. En contraposición con las descarboxilasas anteriores, Strybny et al.⁸³ observaron que la enzima SkARO10 de *Saccharomyces kudriavzevii* (especie capaz de hibridar con *S. cerevisiae* para dar lugar a levaduras utilizadas en la producción de cervezas belgas) posee una actividad similar con cada sustrato evaluado (derivados de valina, leucina, isoleucina, fenilalanina y metionina), sin preferencias por ninguno en particular. No obstante, fermentaciones en mosto sintético realizadas con una cepa de *S. cerevisiae* a la que se le cambió el gen *ScARO10* por *SkARO10* dieron lugar a mayores concentraciones de alcohol isoamílico e isobutanol respecto de la cepa que contenía *ScARO10*. Estas diferencias podrían deberse a la complejidad del medio y al impacto de otros compuestos en la formación de alcoholes superiores⁸³.

A partir de la selección a gran escala de genes de *S. cerevisiae* cuya delección afecta la producción de compuestos aromáticos, se identificaron genes codificantes de otras dos descarboxilasas (PAD1 y SPE1) que podrían ser de importancia en la vía de Ehrlich^{84,85}. Ambas enzimas tendrían la capacidad de actuar de manera promiscua y, por lo tanto, aceptar varios compuestos como sustratos, como por ejemplo, los ácidos p-cumárico y ferúlico. Ambos ácidos son precursores para la formación de fenoles, compuestos

que también influyen en el *flavor* de las cervezas¹¹. Sin embargo, se necesitan más estudios bioquímicos para confirmar las propiedades de estas enzimas y su rol directo en el catabolismo de aminoácidos⁸⁴.

Deshidrogenasas

La última etapa de la vía de Ehrlich consiste en la reducción del aldehído formado durante la descarboxilación, reacción catalizada por enzimas alcohol deshidrogenasas. El genoma de *S. cerevisiae* contiene genes codificantes de 16 alcohol deshidrogenasas, 6 aldehído deshidrogenasas y al menos dos reductasas de amplio espectro dependientes de nucleótidos pirimidínicos³⁴. Cualquiera de las enzimas etanol deshidrogenasas ADH1, ADH2, ADH3, ADH4 y ADH5, junto con la formaldehído deshidrogenasa SFA1, pueden tener un papel significativo en la formación de alcoholes superiores a través de la vía de Ehrlich²⁰, aunque Styger et al.⁸⁴ observaron que en medio complejo solo la delección del gen *ADH3* afecta la producción de estos compuestos. ADH3 es responsable de la reducción de acetaldehído dentro de la mitocondria, lo que mantiene el balance redox durante el crecimiento de las levaduras en anaerobiosis⁴. Los aldehídos involucrados en esta etapa de la vía pueden dar lugar tanto a alcoholes superiores como a ácidos; que predomine una u otra reacción depende del estado redox de las células^{84,93}.

Otras deshidrogenasas podrían estar directamente implicadas en la vía de Ehrlich. Entre ellas se encuentran OYE2, AAD6 y HOM2. OYE2 es capaz de oxidar tanto NADPH como NADH, y de reducir diferentes sustratos^{10,88}. La delección del gen codificante de esta enzima provoca una notable disminución en los niveles de isobutanol e alcohol isoamílico⁸⁴. En *S. cerevisiae*, el gen *AAD6* se transcribe mayormente al inicio de la fermentación y su delección también lleva a menores concentraciones de estos compuestos^{66,84}. Dickinson et al.²⁰ no observaron tales efectos cuando se deleccionaron los 7 genes *AAD* presentes en *S. cerevisiae*, lo cual podría deberse a diferencias en el medio de cultivo utilizado⁸⁴. HOM2 es una semialdehído deshidrogenasa que cataliza el segundo paso de la biosíntesis de la metionina y la treonina³. En comparación con los genes *AAD6* y *OYE2*, *HOM* produce una mayor reducción en la concentración de alcoholes superiores cuando es eliminado⁸⁴. Durante el transcurso de la fermentación, la transcripción de *HOM2* es regulada positivamente⁶⁶.

La vía de Ehrlich permite explicar solo la formación de alcoholes como isobutanol, alcohol isoamílico, alcohol amílico y feniletanol, no así la producción de otros alcoholes superiores, dado que no todos se corresponden con los aminoácidos conocidos²⁰. Se cree que una de las razones por las cuales se forman los alcoholes superiores es para mantener la relación NADH/NAD^+ y, por lo tanto, el balance redox dentro de la célula²². Sin embargo, hay quienes sostienen que compuestos como el etanol, el glicerol, el acetato, el acetaldehído y el succinato también cumplen este rol. Otra posibilidad es que los alcoholes superiores se generen para remover aldehídos tóxicos para las células, o como fuente alternativa para obtener nitrógeno^{84,93}.

El mecanismo por el cual se liberan estos compuestos al mosto aún se desconoce. Hasta el momento no se han detectado transportadores de membrana que intervengan

en la excreción de alcoholes superiores, por lo que es posible que este proceso ocurra simplemente por difusión pasiva a través de la membrana celular de las levaduras⁵².

Factores que afectan la formación de alcoholes superiores

Composición del mosto

El material de partida para la elaboración de cerveza, es decir, la composición del mosto, juega un papel importante en el perfil de *flavor* del producto final. En general, para la producción de cerveza se utilizan granos de cebada maltada, pero también se pueden incluir otros cereales como trigo, avena, sorgo y centeno^{38,57}. Dependiendo del tipo de grano utilizado, el mosto generado puede tener una composición de azúcares y nitrógeno diferente, lo cual afecta de manera significativa los niveles de alcoholes superiores generados por las levaduras¹⁷.

Efecto de la composición de hidratos de carbono

En la composición de un mosto estándar hay aproximadamente un 90% de hidratos de carbono, que incluyen azúcares como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa y dextrinas. El perfil de azúcares y su concentración tiene una influencia directa en la eficiencia de fermentación y en el metabolismo de la levadura. Al incrementarse los niveles de sacarosa en el mosto se eleva la producción de alcoholes superiores³⁶, mientras que el metabolismo de la maltosa disminuye la concentración de estos compuestos en comparación con fuentes de carbono más fácilmente asimilables, como glucosa y fructosa⁴⁸. Es por esto que cuando se agregan adjuntos a fin de aumentar la densidad inicial del mosto, se debe tener en consideración el tipo de azúcar agregado. En un trabajo reciente donde se utilizó *S. pastorianus*, se observó que el suplemento de glucosa en mostos con densidades de 18 y 24°P incrementó entre un 17% y un 90% las concentraciones de isobutanol y feniletanol respecto de mostos de la misma densidad a los que se agregó sacarosa y maltosa⁴⁸. En cambio, el agregado de maltosa solo aumentó los niveles de alcohol isoamílico en los mostos analizados⁴⁸. La adición de este azúcar podría dar origen a un perfil de *flavor* más favorable en el producto final, dado que a su vez disminuye la formación de ésteres de acetato^{56,64}, lo cual facilitaría el diseño de mostos de alta densidad.

En mostos con 18°P de densidad inicial fermentados con levaduras de tipo Ale se ha observado un incremento en los niveles de alcoholes superiores respecto de mostos de densidad inicial menor⁷³. Que estos compuestos aumenten con la densidad del mosto se correlaciona con el hecho de que altas concentraciones de hidratos de carbono afectan de manera positiva la actividad de enzimas aminotransferasas^{24,70}. No obstante, en levaduras Lager, la producción de estos compuestos puede no verse afectada o disminuir en mostos más concentrados^{48,49,100}. El genoma de levaduras Lager presenta un alto grado de plasticidad: es capaz de experimentar cambios genéticos en respuesta a condiciones de estrés tales como mostos de alta densidad y altas temperaturas⁴¹. Por otro lado, en mostos con

elevada relación azúcares/nitrógeno, la actividad fisiológica normal de las levaduras se ve modificada, lo cual genera desbalances en la producción de compuestos del *flavor*^{36,81}. En este caso, la fuente de nitrógeno se convierte en el factor limitante en el metabolismo de las levaduras. De hecho, dado que la producción de alcoholes superiores se encuentra directamente ligada al metabolismo de los aminoácidos, la fuente de nitrógeno presente en el mosto es el principal sustrato que influye en su biosíntesis.

Efecto de la fuente de nitrógeno

En general, un aumento en la concentración de nitrógeno asimilable permite incrementar la producción de compuestos del *flavor*, como alcoholes superiores y ésteres^{33,50}.

La transcripción de genes asociados a la síntesis de estos compuestos puede verse afectada al aumentar los niveles de la fuente de nitrógeno en el mosto^{49,73,99}. El tipo de aminoácidos que forman parte del nitrógeno asimilable genera diferentes respuestas en las levaduras y también influye en la formación de alcoholes superiores. En medio sintético, el aminoácido leucina en cantidades micromolares actúa como el principal regulador de señal para la incorporación de aminoácidos ramificados en *S. cerevisiae*^{21,97}. Como se mencionó anteriormente, la incorporación de leucina, isoleucina o valina y su asimilación a través de la vía de Ehrlich provocan un aumento en la cantidad de alcohol isoamílico, alcohol amílico, isobutanol, respectivamente, y sus correspondientes ésteres de acetato^{34,69,82}. Además, el análisis de los perfiles de expresión de *S. cerevisiae* durante la formación de compuestos del *flavor* cuando es cultivada en L-leucina y amonio reveló una regulación positiva o negativa en 117 genes, entre los cuales se incluyeron genes codificantes de enzimas involucradas en diferentes rutas del metabolismo de aminoácidos⁷⁵.

La prolina y la histidina son otros aminoácidos de relevancia para el *flavor* de las cervezas^{50,67}. Fermentaciones realizadas en medio sintético con adición de prolina utilizando levaduras de tipo Ale y Lager permiten llegar a mayores concentraciones de alcoholes superiores. Este aminoácido no puede ser transformado en un alcohol superior a través de la vía de Ehrlich, por lo que su incidencia en el *flavor* podría explicarse por la síntesis de glutamato a partir de dicho aminoácido⁶⁷. La adición de histidina incrementa de manera significativa la producción de alcoholes superiores como isobutanol, alcohol isoamílico y feniletanol⁵⁰. Lei et al.⁵⁰, observaron que en levaduras Lager en fase exponencial se activan genes codificantes para permeasas específicas del transporte de aminoácidos (BAP2, LYP1, HIP1, y AGP1) cuando se utilizan mostos de alta densidad suplementados con histidina. A su vez, durante la fermentación en estas mismas condiciones, se reprimen genes involucrados en el mecanismo de represión del catabolismo del nitrógeno^{6,50}.

La temperatura de fermentación

La concentración final de alcoholes superiores en cervezas se ve incrementada al utilizar mayores temperaturas de fermentación^{37,45,74}. El aumento en el crecimiento y el metabolismo de las levaduras al aumentar la temperatura de fermentación favorece la absorción y asimilación

de aminoácidos del mosto, por lo que se estima cierta correlación entre la expresión de los genes involucrados en este proceso, la temperatura y los niveles de alcoholes superiores en cerveza⁴⁵. De hecho, Kodama et al.⁴², al elevar la temperatura de fermentación, lograron la expresión constitutiva del gen codificante de la permeasa BAP2 presente en la levadura cervecera BH-225, y ello dio lugar a una mayor asimilación de valina, leucina e isoleucina. Aunque en ese estudio se detectó un aumento en la producción de alcohol isoamílico, se sugirió que durante la formación de otros alcoholes podrían utilizarse mecanismos diferentes pero relacionados⁴². Abe et al.¹ también confirmaron la dependencia de la temperatura por parte del gen BAP2, al detectar una disminución en los niveles de expresión de dicho gen a bajas temperaturas de fermentación. En relación con los genes codificantes de las aminotransferasas de la vía de Ehrlich, temperaturas más altas incrementan los niveles de expresión del gen *BAT1*, lo que da lugar a una mayor producción de alcoholes superiores⁷³.

Otros factores que afectan la producción de alcoholes superiores

La formación de alcoholes superiores se ve afectada positivamente en presencia de oxígeno y ácidos grasos insaturados. En mostos con suficiente cantidad de nutrientes, ambos factores (al igual que la temperatura) estimulan el crecimiento de las levaduras y, por ende, el metabolismo de aminoácidos⁵⁴. En respuesta a la presencia de oxígeno varios genes se expresan diferencialmente, entre los cuales se encuentra el gen codificante de la permeasa BAP2. Al aumentar la concentración de oxígeno, los niveles de transcripción de este gen pueden incrementarse en una hora, y favorecer así la incorporación de aminoácidos en las levaduras y la formación de alcoholes superiores⁹⁰. Sin embargo, y a pesar de que una mayor oxigenación del mosto puede provocar un aumento en la concentración de estos compuestos, este incremento no es tan significativo como lo es el de la expresión de BAP2⁹⁰. Probablemente el oxígeno regule de manera diferente otros genes que pueden también estar involucrados, directa o indirectamente, en la síntesis de estos compuestos.

A diferencia de lo que sucede con el oxígeno, los niveles de alcoholes superiores prácticamente no se ven afectados por el incremento de CO₂ durante las primeras etapas de fermentación²³. Hacia el final de la fermentación, el aumento en la presión de CO₂ puede causar una disminución en la formación de alcoholes superiores, aunque en menor medida respecto de cómo afecta en la síntesis de ésteres⁵⁶. Esta disminución en la concentración de compuestos del *flavor* es parcialmente causada por la inhibición del crecimiento de la biomasa metabólicamente activa⁷¹.

Las levaduras requieren iones y vitaminas para su eficiente proliferación y fermentación. Estos componentes del mosto permiten que las enzimas y coenzimas de las levaduras funcionen de manera correcta, por lo que una deficiencia de iones o vitaminas puede dar lugar a alteraciones en el metabolismo y afectar el *flavor* del producto final⁹⁴. En general, el mosto contiene suficiente cantidad de iones inorgánicos, aunque ocasionalmente podría ser necesario un suplemento adicional (como en el caso del cinc)⁹⁵. El

cinc es de gran importancia en la producción de alcoholes superiores. Cumple funciones catalíticas, estimula la ruptura de alfa-cetoácidos, con lo cual la producción de estos compuestos se ve favorecida²³. No obstante, solo concentraciones elevadas de Zn (10 ppm) en el mosto se asocian con diferencias significativas en los niveles de alcoholes superiores⁶².

La tasa de inóculo también puede afectar la producción de alcoholes superiores. Generalmente, el incremento en la concentración de levaduras inoculadas favorece la formación de algunos alcoholes superiores, aunque diferentes autores han aportado resultados contradictorios al respecto. A escala industrial, Kucharczyk et al.⁴⁴ no observaron un efecto significativo en la cantidad total de alcoholes al modificar la concentración de inóculo inicial de 5×10^6 a 9×10^6 células/ml de mosto. Por otro lado, tasas de inoculación demasiado altas pueden disminuir la concentración de alcoholes superiores¹⁵, probablemente por una reducción en el crecimiento celular y, por lo tanto, en el metabolismo de los aminoácidos. Al parecer, el impacto de la concentración de inóculo en el *flavor* depende, además, de la cepa de levadura, su estado fisiológico y las condiciones de propagación^{23,44,90}.

La levadura: factor determinante en el perfil aromático de las cervezas

Tal como sucede con la producción de ésteres, la cepa de levadura utilizada en la producción de cerveza juega un papel preponderante en la formación de alcoholes superiores^{56,80}.

En general, levaduras de tipo Lager proveen aromas y sabores más limpios, asociados a una producción de bajos niveles de alcoholes superiores y ésteres comparados con levaduras de tipo Ale⁹⁶. Dentro de las levaduras Lager, a su vez pueden distinguirse dos grupos de levaduras con características bien diferenciadas: grupo I o Saaz y grupo II o Froberg⁸⁰. Respecto de la producción de alcoholes superiores, fermentaciones realizadas a temperaturas entre 10 y 14 °C con levaduras Lager correspondientes al grupo II son capaces de producir entre 1 y 14 mg/l más de isobutanol, alcohol isoamílico y alcohol amílico respecto de aquellas pertenecientes al grupo I^{28,96}. Distintos niveles en la producción de alcoholes superiores entre cepas podrían deberse a diferencias genéticas (por ejemplo, mutaciones puntuales, rearrreglos genómicos, deleciones o aneuploidías), regulatorias y de expresión de los genes correspondientes, así como también a diferencias en la especificidad de sustrato de las enzimas codificadas por dichos genes^{35,43,56}.

Particularmente, que las levaduras Lager (*S. pastorianus*) sean híbridos aneuploides en los que una parte de su genoma proviene de *S. cerevisiae* y la otra de *S. eubayanus* (esta última especie, adaptada al frío)⁵¹ ha generado interrogantes sobre la transcripción y regulación de los genes involucrados en la producción del *flavor* en cada subgenoma y su contribución.

Algunos resultados del análisis de la transcripción de los genes *BAP2* y *BAT2* durante la producción de cerveza con una cepa Lager sugieren una dominancia fenotípica del subgenoma de *S. eubayanus* respecto de la parte de *S. cerevisiae*³⁵. En esos trabajos, y en concordancia con lo

observado por Kodama et al.⁴², surgieron indicios de que los genes ortólogos *BAP2* difieren en su patrón de expresión en distintas etapas de la fermentación, lo cual indica que en levaduras Lager ambos genes son regulados de manera diferencial y que podrían cumplir diferentes funciones. Esto podría explicar, en parte, la diferencia en el perfil de alcoholes superiores generados por levaduras Lager en comparación con sus parentales. Por otro lado, en la levadura de tipo Lager *S. pastorianus* CBS1483, Bolat et al.⁹ describieron roles diferentes para dos isoenzimas descarboxilasas que participan en la síntesis de alcoholes superiores. La especificidad de sustrato de la descarboxilasa codificada por el alelo proveniente de *S. cerevisiae* fue similar a la observada en una cepa de *S. cerevisiae*. La misma enzima codificada por el alelo de *S. eubayanus*, además, presentó mayor preferencia por el compuesto cetoisovalerato, precursor para la síntesis de isobutanol, lo cual podría afectar el balance del *flavor* respecto de cervezas producidas con cepas de *S. cerevisiae*⁹.

Diversos artículos han demostrado el potencial de levaduras no convencionales como herramientas de innovación en la producción de cerveza^{12,28,60}. *Brettanomyces bruxellensis*, *Torulaspora delbruekii*, *Pichia kluyveri*, *Naumovia dairenensis* y *S. eubayanus* son algunos ejemplos de estas levaduras, las cuales difieren en su capacidad fermentativa y en la producción de compuestos del *flavor*, entre otras características^{27,29}. En relación con la producción de alcoholes superiores, levaduras salvajes como *S. eubayanus* y otras levaduras sacaromycéticas no comerciales tienden a producir altos niveles de estos compuestos^{29,59}. *T. delbruekii*, en cambio, puede generar menos alcoholes superiores que *S. cerevisiae*, pero ser apta para la producción de estilos de cerveza como American Amber Ale, Weiss, Stout y Dunkel, dado que brinda niveles agradables de alcohol amílico y aporta complejidad al producto final, lo que da lugar a cervezas de aromas y sabores agradables^{12,27,60}. Por otro lado, el cocultivo de las levaduras salvajes *Kazachstanian servazzi* o *N. dairenensis* con *S. cerevisiae* durante la producción de cerveza permitió generar mayores niveles de alcohol isoamílico, feniletanol, feniletil acetato, etil octanoato y etil decanoato, con lo que se obtuvo un *flavor* más frutado respecto del control³⁰.

Si bien este tipo de levaduras son promisorias a la hora de generar productos novedosos, poco se conoce sobre los genes involucrados en la formación del *flavor* y su regulación en estas levaduras²⁹. Esto constituye una limitación al momento de ser aplicadas en el sector cervecero, ya que es necesario que el productor sepa cómo controlarlas para poder generar las características deseadas en la cerveza.

Consideraciones finales

Dada la gran variedad de compuestos responsables del aroma y sabor en la cerveza, y de los diferentes parámetros que afectan su formación, la mayor parte de la base genética involucrada en la producción de compuestos del *flavor* y en su variación natural permanece sin conocerse en su totalidad. En el caso de los alcoholes superiores, aún se desconocen enzimas que podrían estar involucradas en la vía de Ehrlich. Una de las dificultades en determinar las enzimas específicas para la producción de alcoholes superiores es el amplio grado de redundancia de los genes correspondientes

Tabla 2 Impacto de algunos parámetros fermentativos sobre la producción de alcoholes superiores y la transcripción de genes involucrados en su síntesis

	Concentración de alcoholes superiores	Transcripción de genes
↑ Fuente de nitrógeno	↑	↑ o ↓ Permeasas (<i>GAP1</i> , <i>BAP2</i>) ^a ↑ Aminotransferasa <i>ARO9</i> ^b ↑ Descarboxilasa <i>ARO10</i> ^b ↑ Aminotransferasas ^d
↑ Fuente de carbono	↑ ^c	↑ Aminotransferasas ^d
↑ Oxígeno	↑	↑ Permeasa <i>BAP2</i>
↑ Temperatura	↑	↑ Permeasa <i>BAP2</i> ↑ Aminotransferasa <i>BAT1</i>
Levadura de tipo Ale (vs. Lager)	↑	↑ Aminotransferasas (<i>BAT1</i> y <i>ARO08</i>)

^a Aumenta o disminuye, dependiendo de la fuente de nitrógeno y la permeasa.

^b Aumenta con aminoácidos aromáticos.

^c Depende de la composición del mosto.

^d En cepas Ale.

en el genoma de la levadura³⁸, por lo que la presencia de múltiples genes codificantes de aminotransferasas, descarboxilasas y alcohol deshidrogenasas genera grandes desafíos al momento de estudiar la producción de alcoholes superiores. Por otro lado, el desarrollo de nuevas herramientas para el análisis poligénico ha permitido detectar genes nunca antes asociados a la producción de compuestos del *flavor*⁸⁶. A partir del análisis del polimorfismo de nucleótido simple (SNP) en locus de caracteres cuantitativos (QTL) de cepas *S. cerevisiae* se ha logrado relacionar los genes *TOR1* y *FAS2* a la producción de fenil etilacetato y alcoholes superiores, como feniletanol, alcohol isoamílico e isobutanol¹³. El gen *TOR1* se encuentra involucrado en la regulación de múltiples procesos celulares, entre los que se encuentran la represión por catabolismo del nitrógeno y la transcripción de aminoácido permeasas^{16,55}. El gen *FAS2*, en cambio, estaría principalmente ligado al metabolismo del fenil etilacetato y de otros ésteres, dado que codifica la subunidad alfa de la enzima ácido-graso sintasa¹³.

La concentración de sustratos para las levaduras y la composición del mosto también son de gran importancia en la regulación de los niveles de alcoholes superiores en la cerveza (tabla 2). Si bien en los últimos años se ha avanzado en el conocimiento del impacto de la fuente de carbono y nitrógeno en la regulación de genes de levadura involucrados en la producción de estos compuestos, es necesario realizar más investigaciones al respecto. La asimilación de prolina y su papel en la formación de compuestos aromáticos no se conoce por completo⁶⁷. Asimismo, dado que la maltosa es el azúcar principal del mosto, sería de gran utilidad conocer qué proporción de diferentes azúcares regula positivamente la expresión de genes responsables de perfiles aromáticos específicos.

Existen diferentes opciones para el control de la síntesis de alcoholes superiores durante la fermentación (tabla 2). Junto con la combinación adecuada de factores, tales como la temperatura de fermentación y la composición de sustratos, la cepa de levadura es fundamental en la formación de compuestos del *flavor*. La síntesis de alcoholes superiores puede estar muy bien balanceada si se elige la cepa adecuada^{53,68}.

Financiación

Los autores son miembros del CONICET y este trabajo fue financiado por el proyecto PICT 3677 del FONCYT, el proyecto PIP424 del CONICET y la Universidad Nacional del Comahue.

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 y en particular de la Patagonia quienes inspiraron esta serie de artículos de revisión.

Bibliografía

1. Abe F, Minegishi H. Global screening of genes essential for growth in high-pressure and cold environments: searching for basic adaptive strategies using a yeast deletion library. *Genetics*. 2008;178:851–72.
2. Annemüller G. Gärung und reifung des bieres: Grundlagen-Technologie-Anlagentechnik. Berlin: VLB, 2009.
3. Arevalo-Rodríguez M, Pan X, Boeke J, Heitman J. FKBP12 controls aspartate pathway flux in *Saccharomyces cerevisiae* to prevent toxic intermediate accumulation. *Eukaryot Cell*. 2004;3:1287–96.
4. Bakker B, Overkamp K, van Maris A, Kotter P, Luttik M, van Dijken J, Pronk JT. Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*. 2001;25:15–37.
5. Barnett JA. A history of research on yeasts 13 Active transport and the uptake of various metabolites 1. *Yeast*. 2008;25:689–731.
6. Beltran G, Novo M, Roz N, Mas A. Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Res*. 2004;4:625–32.
7. Bisht P. Beer Industry Analysis & Global Beer Market Report [internet]. U.K.: Allied Market Research; 2015. [consultado 15 Ene 2018]. Disponible en: <https://www.alliedmarketresearch.com/beer-market>.

8. Boer VM, Tai SL, Vuralhan Z, Arifin Y, Walsh MC, Piper MDW, Winde JH, de Pronk JT, Daran J. Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and non preferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS*. 2007;7:604–20.
9. Bolat I, Romagnoli G, Zhu F, Pronk JT, Daran J. Functional analysis and transcriptional regulation of two orthologs of ARO10, encoding broad-substrate-specificity 2-oxo-acid decarboxylases, in the brewing yeast *Saccharomyces pastorianus* CBS1483. *FEMS*. 2013;13:505–17.
10. Brown B, Hyun J, Duvvuri S, Karplus P, Massey V. The role of glutamine 114 in old yellow enzyme. *J Biol Chem*. 2002;277:2138–45.
11. Callemien D, Collin S. Structure, organoleptic properties quantification methods, and stability of phenolic compounds in beer—A review. *Food Rev Int*. 2009;26:1–84.
12. Canonico L, Agarabati 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.
13. Carvalho B, Holt S, Souffriau B, Lopes Brandao R, Foulquié-Moreno M, Thevelein JM. Identification of novel alleles conferring superior production of rose flavor phenylethyl acetate using polygenic analysis in yeast. *Am Soc Microbiol*. 2017;8:1–21.
14. Chen X, Nielsen K, Borodina I, Kielland-Brandt M, Karhumaa K. Increased isobutanol production in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of genes in valine metabolism. *Biotechnol Biofuels*. 2011;4:1–12.
15. Colon M, Hernandez F, Lopez K, Quezada H, Gonzalez J. *Saccharomyces cerevisiae* Bat1 and Bat2 aminotransferases have functionally diverged from the ancestral-like *Kluyveromyces lactis* orthologous enzyme. *PLoS One*. 2011;6:1–13.
16. Conrad M, Schothorst J, Kankipati HN, Zeebroeck G, van Rubio-texeira M, Thevelein JM. Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS*. 2014;38:254–99.
17. Dack RE, Black GW, Koutsidis G, Usher SJ. The effect of Maillard reaction products and yeast strain on the synthesis of key higher alcohols and esters in beer fermentations. *Food Chem*. 2017;232:595–601.
18. Dickinson J, Harrison S, Hewlins M. An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 1998;273:6–25751.
19. Dickinson J, Harrison S, Hewlins M. An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*. 2000;275:10937–42.
20. Dickinson JR. The formation of higher alcohols. En: Smart KA. *Brewing yeast fermentation performance*. Oxford: UK, Blackwell Science, 2003, p. 196–205.
21. Didion T, Grauslund M, Kielland-brandt MC, Andersen HA. Amino acids induce expression of BAP2, a branched-chain amino acid permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*. 1996;178:2025–9.
22. Van Dijken J, Scheffers W. Redox balances in the metabolism of sugars by yeasts. *FEMS Microbiol Rev*. 1986;32:199–224.
23. Dufour J, Malcorps P, Silcock P. Control of ester synthesis during brewery fermentation. En: Smart K. *Brewing yeast fermentation performance*. Oxford, UK: Blackwell Publishing, 2003, p. 213–33.
24. Eden A, van Nederveelde L, Drukker M, Benvenisty N. Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl Microbiol Biotechnol*. 2001;55:296–300.
25. Eden A, Simchen G, Benvenisty N. Two yeast homologs of ECA39, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. *J Biol Chem*. 1996;271:20242–5.
26. Ehrlich F. Über die bedingungen der fuselolbildung und über ihren zusammenhang mit dem eiweissaufbau der hefe. *Eur J Inorg Chem*. 1907;40:1027–47.
27. Esteves Garcia M. *Produção de cerveja: Utilização de estirpes nãoconvencionais em co-fermentação com Saccharomyces para potenciação do perfil sensorial de diversos tipos de cerveja*. Mestre em Engenharia Alimentar – Processamento de Alimentos, 2017. Universidad de Lisboa.
28. 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.
29. Gibson B, Geertman J, Hittinger C, Krogerus K, Libkind D, Louis E, Magalhães F, Sampaio J. New yeasts - new brews: modern approaches to brewing yeast design and development. *FEMS Yeast Res*. 2017;17:1–35.
30. Gibson B, Krogerus K, Ekberg J, Mikkelsen A, Pentikäinen S, Wilpola A, Vidgren V. 2013. Non-Conventional Yeast as a New Tool for Beer Flavour Modification. VTT Technical Research Centre of Finland [internet; consultado 16 Nov 2017]. Disponible en: <http://beer.suregork.com/wpcontent/uploads/2015/06/Poster-89.pdf>.
31. Grauslund M, Didion T, Kielland-brandt MC, Andersen HA. BAP2, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1995;1269:275–80.
32. Hammond J. *Fusel alcohols*. The yeast. London: Academic Press, 1993, p. 34–6.
33. Hashimoto T, Maruhashi T, Yamaguchi Y, Hida Y, Oka K. The effect on fermentation by-products of the amino acids in wort. *Proceedings of the World Brewing Congress*, Portland, OR. 2012.
34. Hazelwood LA, Daran J, Pronk JT, Dickinson JR. The ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol*. 2008;74:2259–66.
35. He Y, Dong J, Yin H, Chen P, Lin H, Chen L. Monitoring of the production of flavour compounds by analysis of the gene transcription involved in higher alcohol and ester formation by the brewer's yeast *Saccharomyces pastorianus* using a multiplex RT-qPCR assay. *Inst Brew Distill*. 2014;120:119–26.
36. He Y, Dong J, Yin H, Zhao Y, Chen R, Wan X, Chen P, Hou X, Liu J, Chen L. Wort composition and its impact on the flavour-active higher alcohol and ester formation of beer – a review. *Inst Brew Distill*. 2014;120:157–63.
37. Hiralal L, Olaniran AO, Pillay B. Aroma-active ester profile of ale beer produced under different fermentation and nutritional conditions. *J Biosci Bioeng*. 2014;117:57–64.
38. Hirst MB, Richter CL. Review of aroma formation through metabolic pathways of *Saccharomyces cerevisiae* in beverage fermentations. *Am J Enol Vitic*. 2016;4:361–70.
39. Horak J. Yeast nutrient transporters. *Biochim Biophys Acta*. 1997;1331:41–79.
40. Iraqi I, Vissers S, Cartiaux M, Urrestarazu A. Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol Gen Genet*. 1998;257:238–48.
41. James T, Usher J, Campbell S, Bond U. Lager yeasts possess dynamic genomes that undergo rearrangements and gene amplification in response to stress. *Curr Genet*. 2008;53:139–52.
42. Kodama Y, Omura F, Miyajima K, Ashikari T. Control of higher alcohol production by manipulation of the BAP2 gene in brewing yeast. *J Am Soc Brew Chem*. 2001;59:157–62.

43. Krogerus K, Magalhes F, Vidgren V, Gibson B. Novel brewing yeast hybrids: creation and application. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2016;101:65–78.
44. Kucharczyk K, Tuszyński T. The effect of pitching rate on fermentation, maturation and flavour compounds of beer produced on an industrial scale. *Inst Brew Distill.* 2015;121:349–55.
45. Laundaud S, Latrille E, Corrieu G. Top pressure and temperature control the fusel alcohol/ester ratio through yeast growth in beer. *J Inst Brew.* 2001;107:107–17.
46. Lee K, Hahn J. Interplay of Aro80 and GATA activators in regulation of genes for catabolism of aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol.* 2013;88:1120–34.
47. Lei H, Li H, Mo F, Zheng L, Zhao H, Zhao M. Effects of Lys and His supplementations on the regulation of nitrogen metabolism in lager yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97:8913–21.
48. Lei H, Xu H, Feng L, Yu Z, Zhao H, Zhao M. Fermentation performance of lager yeast in high gravity beer fermentations with different sugar supplementations. *J Biosci Bioeng.* 2016;122:583–8.
49. Lei H, Zhao H, Yu Z, Zhao M. Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Appl Biochem Biotechnol.* 2012;166:1562–74.
50. Lei H, Zheng L, Wang C, Zhao H, Zhao M. Effects of worts treated with proteases on the assimilation of free amino acids and fermentation performance of lager yeast. *Int J Food Microbiol.* 2013;161:76–83.
51. Libkind D, Hittinger CT, Dover J, Johnston M. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *PNAS.* 2011;108:14539–44.
52. Lipinski C, Lombardo F, Dominy B, Feeney P. Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings. *Adv Drug Deliv Rev.* 2001;46:3–26.
53. Liu SQ. Impact of yeast and bacteria on beer appearance and flavour. In: Hill A. *Brewing Microbiology.* Oxford: UK: Elsevier; 2015. p. 357–74.
54. Lodolo EJ, Kock JLF, Axcell BC, Brooks M. *Saccharomyces cerevisiae* The main character in beer brewing. *FEMS Yeast Res.* 2008;8:1018–36.
55. Loewith R, Hall MN. Target of Rapamycin (TOR) in nutrient signaling and growth control. *Genetics.* 2011;189:1177–201.
56. Loviso CL, Libkind D. Abril Síntesis y regulación de compuestos de aroma y sabor derivados de la levadura en la cerveza: ésteres. *Rev Argent Microbiol.* 2018;50:436–46.
57. Lyumugabe F, Uyisenga J, Songa E, Thonart P. Production of traditional sorghum beer "Ikigage" using *Saccharomyces cerevisiae*, *Lactobacillus fermentum* and *Issatchenkia orientalis* as starter cultures. *Food Nutr Sci.* 2014;5:507.
58. Meilgaard MC. Flavor chemistry of beer I. Flavor interaction between principal volatiles. *Tech Q Mast Brew Assoc Am.* 1975;12:107–17.
59. 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.
60. Michel M, Meier-Dörnberg T, Jacob F, Methner FJ, Wagner RS, Hutzler M. Pure non-*Saccharomyces* starter cultures for fermentation with a focus on secondary metabolites and practical application. *J Inst Brew.* 2016;122:569–87.
61. Muller EH, Richards EJ, Norbeck J, Byrne KL, Karlsson K, Pretorius GHJ, Meacock PA, Blomberg A, Hohmann S. Thiamine repression and pyruvate decarboxylase autoregulation independently control the expression of the *Saccharomyces cerevisiae* PDC5 gene. *FEBS.* 1999;449:245–50.
62. Nicola R, de Walker GM. Zinc interactions with brewing yeast: Impact on fermentation performance. *J Am Soc Brew Chem.* 2011;69:214–9.
63. Olaniran AO, Hiralal L, Mokoena MP, Pillay B. Flavour-active volatile compounds in beer: production, regulation and control. *Inst Brew Distill.* 2017;123:13–23.
64. Piddocke M, Kreis S, Heldt-Hansen H, Nielsen Fog K, Olsson L. Physiological characterization of brewer's yeast in high-gravity beer fermentations with glucose or maltose syrups as adjuncts. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;84:453–64.
65. Pires E, Teixeira J, Brányik T, Vicente A. Yeast: The soul of beer's aroma - A review of flavour-active esters and higher alcohols produced by the brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2014;98:1937–49.
66. Procopio S, Brunner M, Becker T. Differential transcribed yeast genes involved in flavour formation and its associated amino acid metabolism during brewery fermentation. *Eur Food Res Technol.* 2014;239:421–39.
67. Procopio S, Krause D, Hofmann T, Becker T. Significant amino acids in aroma compound profiling during yeast fermentation analyzed by PLS regression. *LWT - Food Sci Technol.* 2013;51:423–32.
68. Procopio S, Qian F, Becker T. Function and regulation of yeast genes involved in higher alcohol and ester metabolism during beverage fermentation. *Eur Food Res Technol.* 2011;233:721–9.
69. Procopio S, Sprung P, Becker T. Effect of amino acid supply on the transcription of flavour-related genes and aroma compound production during lager yeast fermentation. *LWT - Food Sci Technol.* 2015;63:289–97.
70. Rautio J, Huuskonen A, Vuokko H, Vidgren V, Londesborough J. Monitoring yeast physiology during very high gravity wort fermentations by frequent analysis of gene expression. *Yeast.* 2007;24:741–60.
71. Renger BRS, Hateren SH, van Luyben KCAM. The formation of esters and higher alcohols during brewery fermentation; the effect of carbon dioxide pressure. *J Inst Brew.* 1992;98:509–13.
72. Romagnoli G, Luttik MAH, Pronk JT, Daran J. Substrate specificity of thiamine pyrophosphate-dependent 2-oxo-acid decarboxylases in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2012;78:7538–48.
73. Saerens S, Verbelen P, Vanbeneden N, Thevelein J, Delvaux F. Monitoring the influence of high-gravity brewing and fermentation temperature on flavour formation by analysis of gene expression levels in brewing yeast. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2008;80:1039–51.
74. Saerens SMG, Delvaux F, Verstrepen KJ, van Dijck P, Thevelein JM, Delvaux FR. Parameters affecting ethyl ester production by *Saccharomyces cerevisiae* during fermentation. *Appl Environ Microbiol.* 2008;74:454–61.
75. Schoondermark-stolk SA, Jansen M, Verkleij AJ, Verrips CT, Euverink G, Dijkhuizen L, Boonstra J. Genome-wide transcription survey on flavour production in *Saccharomyces cerevisiae*. *World J Microbiol Biotechnol.* 2006;22:1347–56.
76. Schoondermark-stolk SA, Tabernero M, Chapman J, Schure EG, Verrips CT, Verkleij AJ, Boonstra J. Bat2p is essential in *Saccharomyces cerevisiae* for fusel alcohol production on the non-fermentable carbon source ethanol. *FEMS Yeast Res.* 2005;5:757–66.
77. Schreve JL, Garrett JM. Yeast Agp2p and Agp3p function as amino acid permeases in poor nutrient conditions. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;313:745–51.
78. Schure EG, Riel NAW, van Verrips CT. The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev.* 2000;24:67–83.
79. Seeboth P, Bohnsack K, Hollenberg C. *pdcl* mutants of *Saccharomyces cerevisiae* give evidence for an additional

- structural PDC gene: cloning of PDC5, a gene homologous to PDC1. *J Bacteriol.* 1990;172:678–85.
80. Steensels J, Verstrepen KJ. Taming wild yeast: Potential of conventional and nonconventional yeasts in industrial fermentations. *Annu Rev Microbiol.* 2014;68:61–80.
81. Stewart G. The influence of high gravity wort on the stress characteristics of brewer's yeast and related strains. *Cerevisia.* 2007;32:7.
82. Stribny J, Gamero A, Pérez-Torrado R, Querol A. *Saccharomyces kudriavzevii* and *Saccharomyces uvarum* differ from *Saccharomyces cerevisiae* during the production of aroma-active higher alcohols and acetate esters using their amino acidic precursors. *Int J Food Microbiol.* 2015;205:41–6.
83. Stribny J, Romagnoli G, Pérez-torrado R, Daran J, Querol A. Characterisation of the broad substrate specificity 2-keto acid decarboxylase Aro10p of *Saccharomyces kudriavzevii* and its implication in aroma development. *Microb Cell Fact.* 2016;15:1–12.
84. Styger G, Jacobson D, Bauer F. Identifying genes that impact on aroma profiles produced by *Saccharomyces cerevisiae* and the production of higher alcohols. *Appl Biochem Biotechnol.* 2011;91:713–30.
85. Styger G, Jacobson D, Prior B. Genetic analysis of the metabolic pathways responsible for aroma metabolite production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2013;97:4429–42.
86. Swinnen S, Thevelein JM, Nevoigt E. Genetic mapping of quantitative phenotypic traits in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS.* 2012;12:215–27.
87. Tai S, Boer V, Lapujade P, Walsh MC, Winde JH, Daran JM, Pronk JT. Two-dimensional transcriptome analysis in chemostat cultures: combinatorial effects of oxygen availability and macronutrient limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem.* 2005;280:437–47.
88. Trotter E, Collinson E, Dawes I, Grant C. Old yellow enzymes protect against acrolein toxicity in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2006;72:4885–92.
89. Urrestarazu A, Vissers S, Iraqui I, Grenson M. Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. *Mol Gen Genet.* 1998;257:230–7.
90. Verbelen PJ, Saerens SMG, van Mulders SE, Delvaux F, Delvaux F. The role of oxygen in yeast metabolism during high cell density brewery fermentations. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2009;82:1143–56.
91. Vidal EE, Billerbeck GM, de Simões DA, Schuler A, François JM, Antonio M Jr.D.M. Influence of nitrogen supply on the production of higher alcohols/esters and expression of flavour-related genes in cachaca fermentation. *Food Chem.* 2013;138:701–8.
92. Vuralhan Z, Luttik MAH, Tai SL, Boer VM, Morais MA, Schipper D, Almering MJH, Ko P, Dickinson JR, Daran J, Pronk JT. Physiological characterization of the ARO10-dependent broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2005;71:3276–84.
93. Vuralhan Z, Morais MA, Tai S, Piper MDW, Pronk JT. Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol.* 2003;69:4534–41.
94. Walker G. Metals in yeast fermentation process. *Adv Appl Microbiol.* 2004;54:197–230.
95. Walker G, Stewart GG. *Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages. *Beverages.* 2016;2:30.
96. Walther A, Hesselbart A, Wendland J. Genome sequence of *Saccharomyces carlsbergensis*, the World's First Pure Culture Lager Yeast G3 Genes|Genomes. *Genetics.* 2014;4:783–93.
97. Wang J, Jiang J, Jazwinski S. Gene regulatory changes in yeast during life extension by nutrient limitation. *Exp Gerontol.* 2010;45:621–31.
98. White C, Zainasheff J. Yeast: the practical guide to beer fermentation. Colorado, U.S.A: Brewers Publications; 2010. p. 76–7.
99. Yoshimoto H, Fukushige T, Yonezawa T, Sone H. Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2002;59:501–8.
100. Yu Z, Zhao H, Li H, Zhang Q, Lei H, Zhao M. Selection of *Saccharomyces pastorianus* variants with improved fermentation performance under very high gravity wort conditions. *Biotechnol Lett.* 2012;34:365–70, <http://dx.doi.org/10.1007/s10529-011-0780-8>.