



**Universidad
Europea VALENCIA**

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

Facultad de Ciencias de la Salud

Grado en Biotecnología

Trabajo Fin de Grado

Curso 2024-2025

**Estudio de los determinantes moleculares
en el uso eficiente del nitrógeno para la
optimización de levaduras involucradas en
fermentaciones de cerveza.**

Autor

López Navarro, Blanca

Tutor

Dr. Edgar Bernat Ponce (Tutor interno), Dr. Roberto Pérez Torrado (Tutor
externo)

Valencia, 2025

**Estudio de los determinantes moleculares
en el uso eficiente del nitrógeno para la
optimización de levaduras involucradas en
fermentaciones de cerveza.**

Trabajo Final de Grado, presentado por:

López Navarro, Blanca

Tutorizado por:

Dr. Bernat Ponce, Edgar (Tutor interno)

Dr. Roberto Pérez Torrado (Tutor externo)

GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

FACULTAD DE CIENCIAS DE LA SALUD

UNIVERSIDAD EUROPEA DE VALENCIA

VALENCIA

CURSO 2024-2025

Agradecimientos

Primeramente, querría agradecer a Roberto Pérez Torrado por acogerme dentro de su laboratorio en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos y formarme dentro del ámbito de la biotecnología alimentaria y dedicarme su tiempo, además de su guía y su amabilidad durante la realización del trabajo.

Por otra parte, me gustaría agradecer a Edgar Bernat Ponce por guiarme en la redacción y en la finalización de este trabajo como figura de tutor interno, brindándome su ayuda y ayudándome a terminar el trabajo.

Más allá, me gustaría agradecer a mis familiares a mi padre y a mi madre por ser un apoyo incondicional durante estos 4 años y por darme la oportunidad de seguir formándome.

Agradecer también a mis amigos a Rubén a María por acompañarme día a día y estar mano a mano en clase, por las risas, los momentos vividos juntos, y por ser parte de esta carrera y este trabajo día a día. A vosotros quiero agradecer ya que hemos vivido estos 4 años con intensidad, pero sobre todo con amor, espero llevarme vuestra amistad para toda la vida.

Índice de contenidos

• Portada	
• Contraportada	
• Agradecimientos.....	I
• Índice de figuras y tablas.....	III
• Listado de símbolos y siglas.....	IV
• Resumen y palabras clave.....	V-VI
• Introducción.....	1-7
• Hipótesis.....	8
• Objetivos.....	8
• Materiales y métodos.....	9-14
• Resultados.....	15-19
• Discusión.....	20-22
• Conclusiones.....	23
• Bibliografía.....	24-26
• Anexos.....	27 -28

Índice de figuras y Tablas

Figura 1. Evolución de la exportación de cerveza en España.....	1
Figura 2. Regulación de la captación de compuestos nitrogenados en la levadura.....	3
Figura 3. Mecanismo regulatorio NCR.....	4
Figura 4. Metabolismo regulatorio del nitrógeno en <i>S. cerevisiae</i> , CNM.....	5
Figura 5. Esquema de la regulación del nitrógeno en <i>S. cerevisiae</i> CNM y NCR.....	5
Figura 6. Estructura y contenido pUG6.....	11
Figura 7. Estructura y contenido gen <i>GAL 1</i>	12
Figura 8. Heat map de los valores de crecimiento, media de AUC.....	15
Figura 9. Pendiente de las 12 cepas seleccionadas.....	16
Figura 10. Parámetros de pérdida de peso de las cepas LNE.....	17
Figura 11. Parámetros de pérdida de peso de las cepas HNE.....	18
Figura 12. Comprobación del casete resistente a G418.....	19
Tabla 1. Colección de 60 cepas.....	9
Tabla 2. Composición medio SD.....	10
Tabla 3. Reactivos de PCR.....	12
Tabla 4. Ciclos, temperatura y tiempo del programa de PCR.....	12
Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos.....	13
Tabla 6. Composición mosto sintético de cerveza.....	27
Tabla 7. Proporción y composición Stock de aminoácidos.....	28
Tabla 8. Composición medio YPD.....	29

Listado de símbolos y siglas

- AAPs: Aminoácidos permeasas
- AUC: Área bajo la curva
- CNM: *Central Nitrogen Metabolism*, Metabolismo Central del Nitrógeno
- FAN: *Free Amino Nitrogen*, Contenido de Nitrógeno Libre
- HNE: *High Nitrogen Efficiency*, Alta eficiencia de Nitrógeno
- LNE: *Low Nitrogen Efficiency*, Baja eficiencia de Nitrógeno
- NCR: *Nitrogen Catabolite Repression*, Represión de Catabolitos de Nitrógeno
- NRV: *Nitrogen Reference Value*, Valor de Referencia de Nitrógeno
- OD: *Optical Density*, Densidad Óptica
- ODS: Obejtivos de Desarrollo Sostenible
- PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa
- PIB: Producto Interior Bruto
- RPM: Revoluciones por minuto
- SPS: Mecanismo regulatorio Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p
- SD: *Sulfate amonium and D-glucose*, Sulfato de amonio y D-glucosa
- YAN: *Yeast assimilable Nitrogen*, Cantidad asimilable de Nitrógeno de Levaduras.

Resumen y palabras clave

El contenido de nitrógeno presente en los mostos de malta es crucial para poder asegurar una fermentación óptima y una buena calidad final de la cerveza. Actualmente, hay una problemática y un desequilibrio en el contenido de nitrógeno en los mostos de malta, produciendo fermentaciones lentas y estancadas, produciendo una pérdida de las propiedades organolépticas de la cerveza y empeorando la calidad de esta. En el presente trabajo final de grado obtenemos nuevo conocimiento acerca de la eficiencia del uso del nitrógeno en cepas de levadura durante las fermentaciones de cerveza, revelando los mecanismos moleculares subyacentes a las diferencias fenotípicas en la fermentación de cerveza entre las cepas. Se ha realizado un análisis de los parámetros de crecimiento de las 60 cepas en mosto sintético de cerveza con YAN creciente de 30mg N/l a 250mg N/l mediante un análisis de la densidad óptica hasta el final de la fermentación, calculando el área bajo la curva de la media de las medidas. Permitiendo la clasificación de las cepas en baja eficiencia de uso del nitrógeno y alta eficiencia en el uso del nitrógeno mediante el cálculo de la pendiente de los valores del área bajo la curva desde el medio de 30mg N/L hasta el medio de 180mg N/L. En este estudio también se han analizado individualmente 5 cepas de carácter industrial y 5 cepas salvajes seleccionadas en función de la pendiente la cual determina su eficiencia en el uso del nitrógeno mediante la medición de la pérdida de peso en fermentaciones en mosto de cerveza sintético con concentración de 30mg N/L y 180mg N/L respectivamente para observar diferencias a nivel fenotípico entre ellas y revelar su eficiencia de uso del nitrógeno. De manera que se ha seleccionado una cepa CBS1782 la cual presentó diferencias en su perfil fenotípico con respecto a las cepas para ser analizada más exhaustivamente mediante un marcaje selectivo de la misma con genética. Hemos clasificado las 60 cepas de levadura en función de sus parámetros de crecimiento en cepas con alta y baja eficiencia de uso del nitrógeno aparte de establecer el valor de cantidad de nitrógeno asimilable por las levaduras para una fermentación y un crecimiento idóneo. Hemos obtenido el perfil fenotípico fermentativo de las 10 cepas analizadas individualmente observando diferencias entre los perfiles de fermentación de estas. Este conocimiento se puede trasladar a las empresas cerveceras para que tengan un mejor entendimiento de los requerimientos de las levaduras para fermentar cerveza industrialmente, para así poder ejercer una producción más sostenible eficiente y una mejor calidad del producto final.

Palabras clave: *S.cerevisiae* , Mosto de malta, fermentación, Cantidad asimilable de Nitrógeno de Levaduras, Alta eficiencia en el uso del nitrógeno, Baja eficiencia en el uso del nitrógeno.

Abstract and keywords

The nitrogen content present in malt wort is crucial to ensure optimal fermentation and good final beer quality. Currently, there is a problem and an imbalance in the nitrogen content in malt wort, producing slow and stagnant fermentations, resulting in a loss of the organoleptic properties of beer and worsening its quality. In the present final degree work we gain new knowledge about the efficiency of nitrogen use in yeast strains during beer fermentations, revealing the molecular mechanisms underlying the phenotypic differences in beer fermentation between yeast strains. An analysis of the growth parameters of the 60 strains in synthetic beer wort with increasing YAN from 30mg N/l to 250mg N/l was performed by optical density analysis until the end of fermentation, calculating the area under the curve of the mean of the measurements. Allowing the classification of strains into low nitrogen use efficiency and high nitrogen use efficiency by calculating the slope of the values of the area under the curve from the 30mg N/L medium to the 180mg N/L medium. In this study, 5 industrial strains and 5 wild strains selected according to the slope which determines their nitrogen use efficiency have also been individually analyzed by measuring the weight loss in fermentations in synthetic beer wort with 30mg N/L and 180mg N/L concentration respectively to observe differences at phenotypic level among them and reveal their nitrogen use efficiency. Therefore, a strain CBS1782, which showed differences in its phenotypic profile with respect to the other strains, was selected to be analyzed more exhaustively by selective labeling with geneticin. We classified the 60 yeast strains according to their growth parameters into strains with high and low nitrogen use efficiency and established the value of the amount of nitrogen assimilable by the yeast for ideal fermentation and growth. We have obtained the fermentative phenotypic profile of the 10 strains analyzed individually, observing differences between their fermentation profiles. This knowledge can be translated into the beer companies allowing a better understanding of the necessities of yeast in order to produce beer in a more sustainable, efficient way, improving the quality of the final product.

Keywords: Yeast assimilable Nitrogen, Low Nitrogen Efficiency , High Nitrogen Efficiency, *S. cerevisiae*, Malt wort, fermentation

1. Introducción

1.1 Sector cervecero y su importancia

La industria cervecera en España es una de las industrias económicamente más potentes en cuanto a exportaciones y producción a nivel europeo. En concreto, según el Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2023), el sector cervecero ha crecido a ritmos elevados estos últimos años, aumentando de manera significativa la exportación en millones de hectolitros de cerveza desde el 2013 (Figura 1). Destaca así el importante papel de España dentro de la producción y exportación total de cerveza a nivel mundial Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2023).

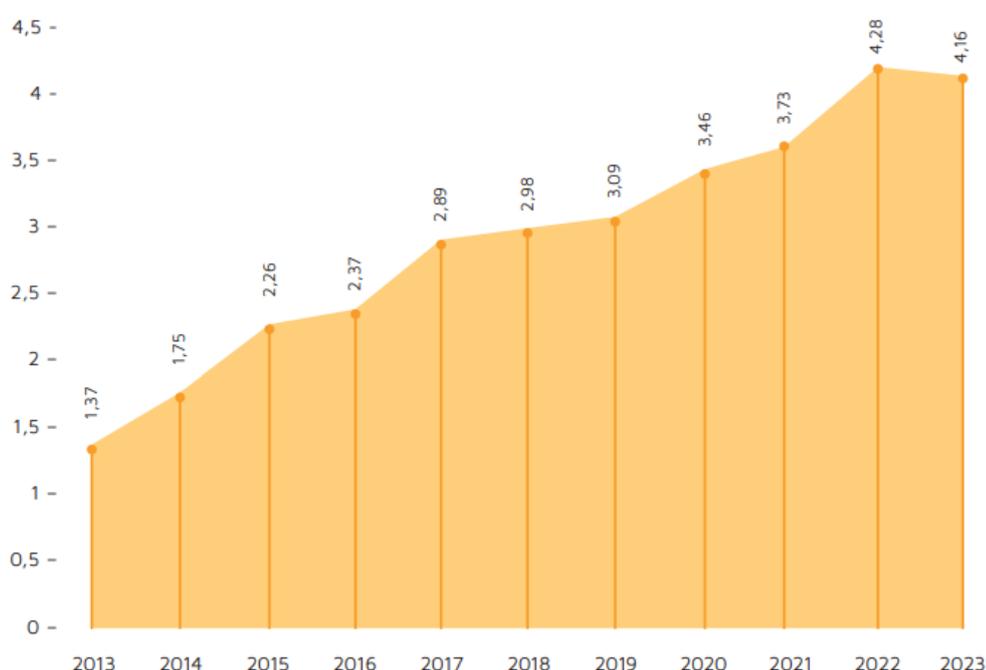


Figura 1. Evolución de la exportación de cerveza en España a nivel europeo de 2013 a 2023, las cantidades se representan en millones de hectolitros. En el eje Y se observan las cantidades exportadas en hectolitros de cerveza y en el eje X los años, podemos ver la tendencia aumentativa de la exportación de cerveza por parte de España, se observa cómo aumenta la exportación desde el 2013 alcanzando su máximo en el 2022, se detalla así el crecimiento del sector cervecero destacando su fuerte papel en la industria europea Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2023).

En concreto, el consumo de cerveza en España ascendió a un 2,48% con respecto al 2022 desde el 2013 siendo gran parte de contribución al consumo total por parte de los extranjeros. En concreto la industria cervecera contribuyó en un total de 17.200 millones de euros al PIB en 2022, lo que equivale al 1,3 % del PIB del país en dicho año (Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación 2023). Se sitúa así pues España como el segundo país con mayor producción de cerveza, solo detrás de Alemania a nivel europeo, en concreto España produjo 41,6 millones de hectolitros de cerveza en 2023 destaca así la importancia de la cerveza a nivel nacional Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2023) y Asociación de Cerveceros España (2023).

1.2 Materias primas para la fabricación de cerveza, la importancia del mosto de malta y del contenido de nitrógeno libre

El mosto de malta es un líquido obtenido principalmente a través de la maceración y malteado de la cebada, aunque puede contener otros cereales como el trigo (Cvengrošová, Šepel'ová, & Šmogrovicová, 2003; Stewart et al., 2013). En concreto una etapa crucial en la producción del mosto de malta es el proceso de malteado al cuál se somete la malta de cebada, que consiste en la germinación controlada de la cebada de manera que se activan las enzimas que degradan almidón y proteínas (Stewart et al., 2013). Por ende, este proceso es crucial para determinar la cantidad de glucosa, almidón y compuestos nitrogenados en el mosto (Stewart et al., 2013). En concreto, el mosto de malta es fundamental para la fermentación de las levaduras y la producción de cerveza, ya que su composición determina el metabolismo de la levadura, el rendimiento de la fermentación y la producción de aromas y sabor de la cerveza (Dekoninck et al., 2012; Stewart et al., 2013).

En concreto, uno de los elementos más importantes que debe contener el mosto de malta es el contenido de nitrógeno libre o FAN (Ferreira & Guido, 2018; Lei et al., 2012; Lekkas et al., 2005). El contenido de nitrógeno libre es la cantidad de aminoácidos libres y pequeños péptidos y compuestos nitrogenados que se encuentran en los mostos de malta y de los cuales las levaduras se alimentan para realizar sus funciones metabólicas esenciales (Lei et al., 2012; Lekkas et al., 2005; Stewart et al., 2013).

1.3 Metabolización del nitrógeno por parte de las levaduras durante la fermentación

Durante la fermentación, se metabolizan los componentes nitrogenados por las levaduras, de manera que es un elemento importante para las propiedades finales de la cerveza influyendo en las propiedades organolépticas finales del producto (Englezos et al., 2021; Hill & Stewart, 2019). Estudios previos muestran, que las levaduras utilizan los aminoácidos como la glutamina y arginina, y compuestos nitrogenados como el amonio como fuente de nitrógeno durante las fermentaciones de cerveza (Roca-mesa et al., 2020). Sin embargo, la concentración de estos metabolitos ricos en nitrógeno puede variar según las condiciones del mosto de malta, la estación del año y la calidad de los frutos de origen (Roca-Mesa et al., 2020).

En condiciones de cultivo mixto las levaduras tienen preferencia en cuanto a la utilización por ciertas fuentes de nitrógeno antes que por otras como por ejemplo por el amonio y por los aminoácidos como arginina, glutamato y tirosina (Su et al., 2020), para ello las clasificamos en fuentes ricas (usadas principalmente) y fuentes pobres (no tienen preferencia de uso) de nitrógeno. Esta clasificación se ha realizado a través de la evaluación de los parámetros de

crecimiento en función de la fuente de nitrógeno en 60 cepas comerciales de levadura estándar (Roca-Mesa et al., 2020; Su et al., 2020).

En cuanto a las rutas metabólicas por las cuales las levaduras asimilan los aminoácidos y otras fuentes de nitrógeno disponibles son mayoritariamente complejas. En cuanto a los aminoácidos, estos son importados al interior de la célula a través de las aminoácidos permeasas (AAPs) (Beltran et al., 2004; Gutiérrez et al., 2016). Cabe mencionar, que las AAPs son selectivas en cuánto a que aminoácidos se transportan, transportando un único grupo de aminoácidos, excepto Gap1, la cual permite el transporte de todo tipo de aminoácidos (Beltran et al., 2004; Gutiérrez et al., 2016). Las AAPs estas están reguladas por varios mecanismos entre ellos el Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p (SPS) (Figura 2), un complejo proteico localizado en la membrana plasmática que se activa en respuesta a aminoácidos extracelulares activando la transcripción de los genes de las AAPs (Beltran et al., 2004; Gutiérrez et al., 2016).

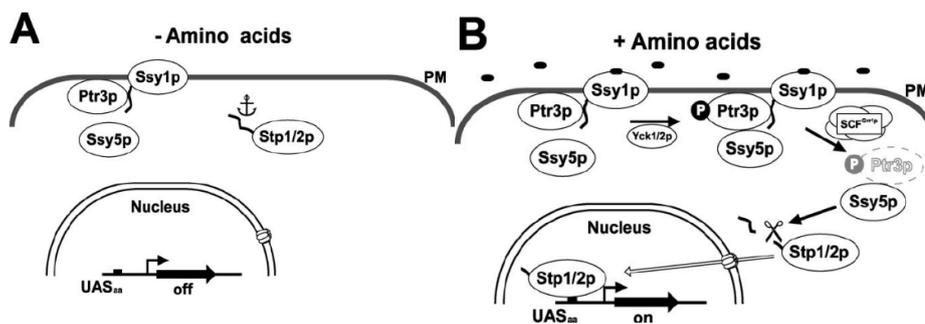


Figura 2. Regulación de la captación de compuestos nitrogenados en la levadura, complejo SPS, mecanismo y funcionamiento; **A)** Cuando la cantidad de aminoácidos en el medio es baja el sistema SPS no se activa de manera que no se transloca al núcleo y se transcriben los genes que codifican para la permeasa general de aminoácidos gap1, permitiendo la entrada de todo tipo de aminoácidos. **B)** Cuando hay aminoácidos de sobra en el medio se activa el complejo donde Ssy1p es una proteína de membrana que cambia su conformación a abierta o cerrada en función de la cantidad de aminoácidos en el medio, para así permitir el paso al interior de la célula de los aminoácidos. Cuando hay aminoácidos en el medio Ssy1p adopta la conformación abierta, a su vez interactúa con Ptr3p y esa interacción hace que Ptr3p sea fosforilada por la quinasa Yck1/2p de esa manera Ptr3p interactúa con Ssy5p. Esa interacción hace que Ssy5p active los factores de transcripción Stp1p y Stp2p de manera que se liberan sus dominios inhibitorios y Stp1p y Stp2p entran al núcleo uniéndose a las secuencias UAS_{aa} activando los promotores de genes de captación de aminoácido (Andréasson & Ljungdahl, 2004).

Otro método de regulación prioritario en *Saccharomyces cerevisiae* es el *Nitrogen Catabolite Represor* (NCR). En concreto, el NCR se encarga de priorizar que las levaduras utilicen las fuentes de nitrógeno ricas antes que las pobres en condiciones de cultivo donde ambas están presentes (Beltran et al., 2004; Su et al., 2020).

Las fuentes que el NCR considera como fuentes ricas de nitrógeno suelen ser los aminoácidos como glutamina, arginina y compuestos nitrogenados como el amonio (Roca-Mesa et al., 2020; Su et al., 2020). El NCR contiene una serie de proteínas regulatorias entre ellas Gln3 y Gat1 las cuales son factores de transcripción que se activan en presencia de aminoácidos extracelulares y activan la transcripción de genes que codifican para Gap 1 la permeasa general de aminoácidos y las permeasas específicas de amonio (MEP1, MEP2, MEP3) (Gutiérrez et al., 2012). Otra proteína reguladora también importante en el NCR es la Ure2. Esta proteína regula la expresión de Gln3 y Gat1, cuando las fuentes de nitrógeno son abundantes en la levadura se activa Ure2p inhibiendo la translocación de Gln3 y Gat1 al núcleo de manera que se inhibe la transcripción de genes importantes del NCR priorizando la utilización de las fuentes ricas de nitrógeno y previniendo la utilización de fuentes secundarias pobres de nitrógeno (Beltran et al., 2004; Coffman et al., 1994) (Figura 3). Cuando la cantidad de nitrógeno es limitada dentro de la levadura la proteína Ure2 no se activa de manera que la expresión de Gln3 y Gat1 se realiza con normalidad, permitiendo la utilización de las fuentes pobres de nitrógeno y la expresión de Gap 1 y las permeasas específicas de amonio (Figura 3) (Beltran et al., 2004). De esta manera el NCR regula la utilización de distintas fuentes de nitrógeno ricas o pobres dentro de la levadura (Beltran et al., 2004).

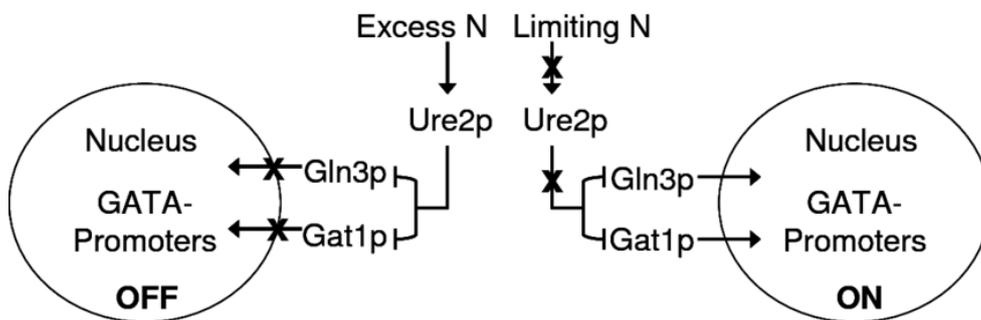


Figura 3. Mecanismo regulatorio dentro del NCR a través de la proteína Ure2p y los factores de transcripción Gln3 y Gat1; en presencia de cantidades excesivas de nitrógeno Ure2p se expresa inhibiendo la llegada de Gln3p y Gat1p al núcleo de manera que no se transcriben dando lugar a la entrada selectiva de aa por las AAPs. Sin embargo, cuando la cantidad de aminoácidos es limitada Ure2p no se expresa de manera que Gln3p y Gat1p entran al núcleo codificando para las permeasas generales de aminoácidos permitiendo la entrada de todo tipo de aminoácidos no selectivamente (Cooper, 2002).

Una vez dichas fuentes de nitrógeno son asimiladas se incorporan al *Central Nitrogen Metabolism* (CNM) para metabolizarse resultando como producto final glutamina y glutamato (van Riel, Giuseppin, ter Schure, & Verrips, 1998).

El CNM se compone de diversas proteínas entre ellas: NADPH-dependent Glutamate Dehydrogenase (NADPH-GDH), Glutamine Synthetase (GS), Glutamate Synthase (GOGAT), Glutaminase (GDA) y NADH-dependent Glutamate Dehydrogenase (NADH-GDH) (Figura 4) (van Riel, Giuseppin, ter Schure, & Verrips, 1998).

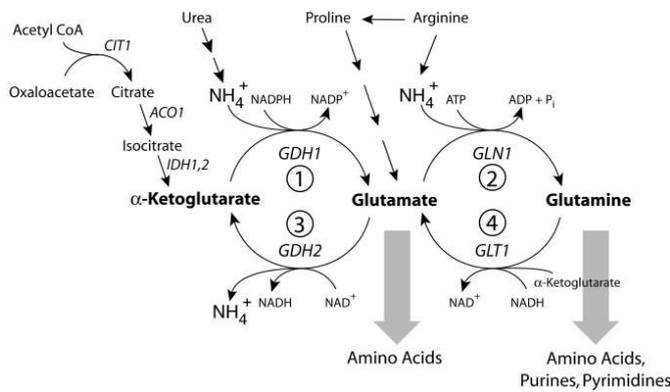


Figura 4. Metabolismo del nitrógeno en *S.cerevisiae* a través del CNM. Podemos observar las conversiones metabólicas que dan lugar a la síntesis de aminoácidos a partir de los compuestos nitrogenados como la urea, el amonio y la arginina (Magasanik & Kaiser, 2002).

Según Li et al. (2024) y Tesnière et al. (2015) en cuanto a la función de cada una de estas proteínas dentro del CNM encontramos, primeramente, que la NADPH-GDH se encarga de sintetizar glutamato a partir de amonio y α -ketoglutarato. GS se encarga de producir glutamina a partir de glutamato y amonio. GOGAT se encarga de convertir la glutamina y el α -ketoglutarato en dos moléculas de glutamato. La GDA se encarga de degradar la glutamina, el glutamato y amonio y por último la NADH-GDH se encarga de degradar el glutamato en α -ketoglutarato y amonio.

En la Figura 5 podemos observar cómo se combinan los sistemas de regulación Ure2p y el CNM para metabolizar el amonio y el glutamato, desde su entrada a la célula.

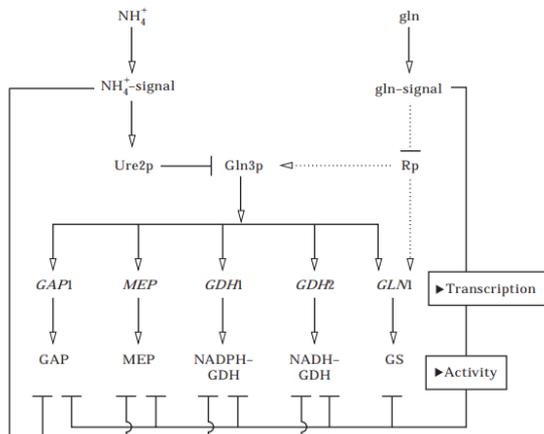


Figura 5. Esquema de la regulación del nitrógeno en *S.cerevisiae* tanto de NCR como de CNM, a partir de amonio (NH_4^+) y de glutamato (gln) se introducen a través del mecanismo Ure2p y el factor de transcripción Gln3p dando lugar al segundo metabolismo una vez entran a la célula el amonio y el glutamato (van Riel, 1998).

En la actualidad, existe un debate creciente en torno a cuál es la concentración ideal de nitrógeno que deben contener los medios de mosto de malta dónde se realizan las fermentaciones a escala industrial, es decir cuál es la YAN (Yeast Assimilable Nitrogen) idónea para maximizar el rendimiento y el crecimiento de las levaduras durante la fermentación (Li et al.,

2024; Tesnière et al., 2015). De manera estándar se ha establecido el valor de 140 mg N/L para fermentaciones tanto de cerveza, sin embargo, la YAN es dependiente del tipo de cepa, puesto que hay cepas que son capaces de crecer en cantidades limitadas de YAN y otras que necesitan cantidades más elevadas para crecer (Li et al., 2024; Tesnière et al., 2015).

1.4 Problemática actual en el contenido de nitrógeno de los mostos de malta

Es cierto, que hay estudios que determinan la cantidad de nutrientes necesarios para el crecimiento de las levaduras de manera óptima (Gutiérrez et al., 2012; Li et al., 2024). Sin embargo, los mecanismos genéticos y moleculares que señalan la variabilidad entre cepas al usar el nitrógeno en fermentaciones de cerveza todavía son inciertos (Gutiérrez et al., 2012).

Recientemente, las condiciones de cultivo y el conjunto de factores ambientales y humanos han influido en el cultivo de la malta, fuente principal para el mosto de malta el cual es la materia prima de la cerveza (Evans et al., 2023; Potterton & McCabe, 2018). En concreto, dichas condiciones ambientales cada vez más adversas debido al cambio climático afectan al contenido de proteína en grano de la cebada de manera que, se altera la FAN (contenido de nitrógeno libre) en los mostos de malta (Evans et al., 2023; Potterton & McCabe, 2018).

Por ello, los mostos de malta en los cuales se fabrica la cerveza y de los cuales se alimentan para realizar la fermentación alcohólica las cepas de levaduras a nivel industrial son distintos, debido a estas alteraciones en las condiciones de crecimiento de las de la malta. Esto da como resultado mostos de malta con alto contenido de Prolina un aminoácido que no es utilizado por las levaduras en la fermentación y mostos también con un pH entre 4.0 y 4.5 un pH elevado con respecto al pH óptimo de asimilación del nitrógeno que está en 3,8 (Mira de Orduña, 2010).

1.5 Justificación de la investigación

Como se ha descrito anteriormente las concentraciones de nitrógeno en los mostos son diferentes actualmente. Estas diferencias entre las concentraciones y por ende la deficiencia de nitrógeno o el uso incompleto del mismo son causantes de fermentaciones estancadas o lentas y de pérdida de propiedades organolépticas en la cerveza (Englezos et al., 2021). Por ese motivo, es necesario a nivel industrial, optimizar la utilización del nitrógeno por parte de las levaduras, de manera que todos los componentes ricos en nitrógeno presentes en el mosto sean utilizados completa y eficazmente para asegurar una buena calidad y unas óptimas propiedades finales de la cerveza (Li et al., 2024; Tesnière et al., 2013).

Por lo tanto, es necesario investigar para conocer la conexión a nivel fenotípico y genotípico que conduce a una peor o mejor utilización del nitrógeno por parte de las levaduras en la fermentación y contribuir a la selección o a la mejora genética de las principales cepas de levaduras involucradas en estas fermentaciones. La investigación desarrollada en este trabajo nos permitirá determinar los mecanismos moleculares y metabólicos que mejorarán la utilización del nitrógeno y conocer cómo enriquecer los medios con los aminoácidos más relevantes en función de la cepa de levadura empleada para dicha fermentación. Mediante esta investigación se contribuirá a la estabilización y mantenimiento de la calidad de la cerveza, asegurando una transferencia del conocimiento generado a las industrias.

El objetivo es maximizar el potencial de desarrollo de la tecnología y la aplicación de esta por parte de las industrias. Así pues, mediante el conocimiento la problemática de los medios limitantes en nitrógeno por el cambio climático estaría solventada de tal manera que ayudaría a la optimización de los procesos de producción de vino y cerveza, una de las industrias más potentes a nivel nacional Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación (2023), contribuyendo de manera significativa al producto interior bruto del país. Esta investigación en concreto contribuiría a cumplir con el Objetivo de Desarrollo Sostenible (ODS) número 12 “Producción y consumo sostenible” de la Agenda 2030, para garantizar la producción de productos alimenticios seguros, sostenibles y de alta calidad.

2. Hipótesis

Conocer las diferencias en la eficiencia del uso del nitrógeno comparando entre cepas salvajes e industriales nos permitirá a futuro conocer los mecanismos de uso del nitrógeno subyacentes, aplicando técnicas ómicas como la secuenciación e identificando los genes claves en el metabolismo del nitrógeno por parte de las levaduras. El análisis de los parámetros de crecimiento permitirá clasificar las cepas de estudio en cepas con alta y baja eficiencia del uso del nitrógeno, identificando la YAN idónea a la cual crecen y fermentan dichas cepas. El análisis individual permitirá comparar entre cepas LNE y HNE permitiendo la selección de las cepas más idóneas para la fermentación a gran escala.

3. Objetivos

El objetivo principal del presente Trabajo de Fin de Grado es obtener nuevo conocimiento acerca de la eficiencia del uso del nitrógeno en cepas de levadura durante las fermentaciones de cerveza, revelando los mecanismos moleculares subyacentes a las diferencias fenotípicas en la fermentación de cerveza entre las cepas.

Los objetivos específicos son los siguientes:

1. Clasificar las cepas de levadura en HNE y LNE según sus parámetros de crecimiento en medios con distintas concentraciones de nitrógeno y por ende distinta YAN.
2. Caracterizar fenotípicamente las levaduras en función de su eficiencia fermentadora y de crecimiento en medios con distinta concentración de nitrógeno.
3. Comparar entre cepas HNE y LNE mediante fermentaciones competitivas en mosto de malta, para poder seleccionar mejores y óptimas cepas para uso industrial.

4. Materiales y métodos

4.1 Colección de 60 cepas de levadura

Para este estudio se ha empleado una colección de 60 cepas de levaduras fermentadoras del grupo de investigación de Roberto Pérez Torrado almacenadas en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de los Alimentos (Valencia), son cepas de uso a nivel industrial y cepas salvajes, es decir, cepas derivadas de *S. cerevisiae* encontradas normalmente en la naturaleza no optimizadas para la fermentación de cerveza. Estas cepas de levadura se encuentran almacenadas en glicerol en una placa de 96 pocillos a -80°C (Tabla 1).

Tabla 1. Colección de 60 cepas de uso industrial y cepas salvajes utilizadas en el estudio. Se puede observar el nombre de todas las cepas empleadas en la tabla. Las cepas salvajes corresponden a las cepas con prefijo CBS.

4.5_WLP530	CBS1230	6.2_WLP570	YJM271	Laerdal 1	TUM 34/70
CBS6308	DBVPG6694	CBS7371	CLIB272_2	Sykkylven 1	TUM 59
CECT1462	DBVPG6693	CBS6503	CBS4255	Voss 1	TUM 128
CBS2165a	CBS1171	CBS6505	CBS382	BE007	TUM 204
NCYC_1187	CLIB227	CBS7957	CBS1175	BE008	TUM 165
1.6_Safale_S40	CCY_21-4-106	YJM193	TUM 209	BE009	TUM 177
Nottingham_ale_1.8_Lallemand	DBVPG6695	CLIB382_1b	CBS1398	BE010	TUM 141
CBS1248	UCD_06-645	CBS7958	YJM1478	BE011	CBS7539
1.3_Safale_US05	CBS422a	DBVPG6590	Laerdal Ebbgarde	BE034	BE040
5.5_WLP090	NCYC_88	CBS1782	Granvin 1	BE039	Hornindal1

4.2 Caracterización y clasificación de las cepas en función de sus parámetros de crecimiento

Las 60 cepas se clasificaron en función de sus parámetros de crecimiento en medios de mosto sintético de cerveza con concentraciones crecientes de nitrógeno, es decir, distinta YAN (30,60,90,120,150,180,210 y 250mg N/L) (Anexo 1). La determinación de los parámetros de crecimiento se hizo mediante *Microtiter Plate Screening Method* descrito por Warringer y Blomberg (2003) y Su et al. (2019). Se emplearon placas de 96 pocillos de Thermo Fischer en las cuales se inocularon 250 µL de los medios con las diversas YAN descritos anteriormente. Se inocularon unas 10⁶ células/mL de cada cepa en los medios y se hicieron por triplicado.

El crecimiento fue monitorizando mediante la medición de la densidad óptica (OD) a 600nm en el SPECTROstar Nano® microplate reader. Se midió cada 30 minutos hasta que el crecimiento alcanzó la fase estacionaria. Para cada cepa y condición se realizaron tres réplicas. Los parámetros de crecimiento se determinaron mediante el programa estadístico de Graph Pad en el cual se calculó el AUC (área bajo la curva) y se hizo la media de las AUC de cada cepa a partir de las 3 réplicas. De manera que por cada cepa se obtuvo un valor de AUC en cada medio con distinta YAN, de esta forma se obtuvo el parámetro de crecimiento que determina la eficiencia en el uso del nitrógeno de cada cepa. A partir de los parámetros de crecimiento se calculó la

pendiente de los resultados de OD de los medios desde 30 hasta 180 mg N/L ya que al aumentar la YAN por encima de dichos valores el crecimiento se veía disminuido drásticamente en todas las cepas.

4.3 Selección y fermentación a pequeña escala de 10 cepas

De las 60 cepas se seleccionaron 10 de una preselección de 12 cepas seleccionadas en función de su pendiente (mayor/menor), por ello las 10 que fueron seleccionadas fueron en función de sus pendientes de crecimiento obtenidas anteriormente y de su eficiencia fermentativa. Para ello, se seleccionaron cinco cepas con pendiente menor, es decir, mayor tasa de crecimiento y eficiencia fermentativa en medios con baja YAN y cinco cepas con pendiente mayor, es decir, cepas con mayor tasa de crecimiento y mayor eficiencia fermentativa en medios con alta YAN. Estas se seleccionaron para hacer fermentaciones de manera individual. La selección se realizó en función de la fiabilidad de los datos y de la diferencia entre las pendientes de las cepas, es decir, se seleccionaron cepas con pendientes distintas para poder comparar su perfil fenotípico y fermentativo. Las cepas seleccionadas fueron: 5.5_WLP090, CBS6503, CBS7958, CBS1398, UCD_06_645, NCYC_88, BE039, BE040, CBS1782 y BE034

Cada una de las 10 cepas seleccionadas fue cultivada en tubos estériles de 15 mL. Previamente se realizó un precultivo en matraces de 100mL con 40 mL del medio SD (Tabla 2) previamente filtrado en condiciones estériles mediante un filtro 0,22 µm. Las cepas, se incubaron durante 4 días a 28°C y 150 rpm de agitación, a los dos días se refrescó el medio conservando 2ml del medio anterior.

Tabla 2. Composición medio SD. Se detalla las cantidades por 1 litro de medio.

Reactivo	Cantidad
Yeast Nitrogen Base	1,7 g/L
Sulfato amónico	5 g/L
Glucosa	20 g/L

Una vez completado el precultivo se midió la OD a 600nm en el espectrofotómetro Fisher Scientific Cell Density Mether model 40. Para asegurar que nuestras muestras estaban en el rango óptimo de lectura (0,2-0,8 OD), se realizaron diluciones según necesidad. Posteriormente se calculó la OD real multiplicando por el factor de dilución

Se inocularon 3 réplicas de cada cepa en los dos medios de mosto sintético de cerveza (30mg N/L y 180 mg N/L) (Anexo 1), se dejaron los tubos entreabiertos de manera que se permitiese el intercambio de CO₂ sin comprometer el volumen, los tubos se incubaron a 28°C y 150 rpm, el parámetro que se midió para evaluar la fermentación fue la pérdida de peso, se midió el peso en gramos en la balanza analítica ABJ-NM/ABS-N de KERN desde el día 0 y hora 0 hasta la finalización de la fermentación.

4.4 Generación del casete de transformación resistente a Genética

Una vez realizadas las fermentaciones individuales en los tubos estériles de 15ml se seleccionó una cepa para ser marcada con Genética. Esta fue seleccionada en función de la eficiencia y el rendimiento de la fermentación para así poder comparar cepas en fermentaciones competitivas. En este caso, se seleccionó la cepa CBS1782 porque presentaba un mejor perfil de crecimiento y de fermentación en medios con baja YAN, debido a que fermentaba de manera más rápida y perdía peso de manera más rápida en el medio de 30mg N/L en comparación con el medio de 180mg N/L.

Para transformar las cepas se utilizó un casete con el gen de resistencia a la genética (Figura 6), de manera que se delectiona el gen *gal1* (Figura 7) y se introdujo el gen KanMX. Para generar el casete se realizó una PCR. La PCR se realizó con el kit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase Catalog Numbers F530S and F530L de Thermo Scientific. Se realizaron dos tubos de PCR, en ellos se añadieron los componentes de la Tabla 3. La PCR se realizó en el termociclador Gene Explorer de BIOER, los ciclos, la temperatura y el tiempo se pueden observar en la Tabla 4. La secuencia de los oligonucleótidos se puede observar en la Tabla 5.

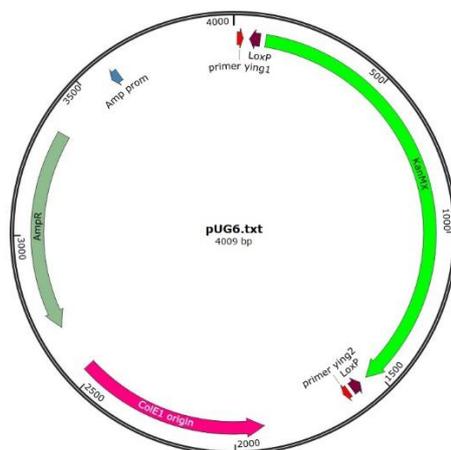


Figura 6. Plásmido pUG6, plásmido utilizado para transformar. Contiene el gen KanMX (verde) que es el que otorga resistencia a la genética, flanqueado por dos secuencias Lox P (granate) que servirán para poder hacer recombinación homóloga y delectonar el gen *GAL 1*. Se pueden observar los oligonucleótidos en rojo que son los cuales se utilizarán para amplificar la secuencia del gen KANMX mediante la PCR.

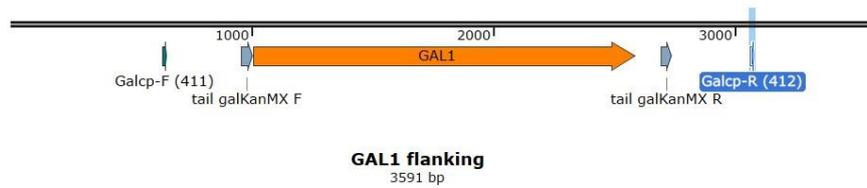


Figura 7. Gen *GAL1* (naranja) de *S.cerevisiae* este es el gen que se deleccionará y se sustituirá mediante recombinación homologa por el gen *KanMX* del plásmido PUG6, ya que tiene secuencias homólogas a las del oligonucleótido utilizado para amplificar el pUG6 de manera que sean reconocidas en la recombinación homologa, dichas secuencias se observan en la figura como tail galKanMX F y tail galKanMX R.

Tabla 3. Cantidades de reactivos por 50 microlitros en dos tubos de PCR para la generación del casete de resistencia a geneticina.

Reactivo	Cantidad
5X Phusion™ HF Buffer	10 µL
dNTPs	1 µL
Forward Primer (galKanMX F)	2,5 µL
Reverse Primer (galKanMX) R	2,5 µL
Dna molde (pUG6)	1 µL (7,5 ng)
Phusion™ High-Fidelity DNA	0,5 µL
Agua miliQ	32,5 µL

Tabla 4. Ciclos, temperatura y tiempo de las distintas etapas de PCR para la generación del casete de resistencia a geneticina. Los ciclos empleados corresponden a los mencionados en el kit Phusion™ High-Fidelity DNA Polymerase Catalog Numbers F530S and F530L de Thermo Scientific para una PCR de un paso.

Etapas del ciclo	Temperatura	Tiempo	Ciclos
Initial Denaturation	98°C	30s	1
Denaturation	98°C	5-10s	30
Annealing	62°C	30'	30
Extension	72°C	1'	30
Final extension	72°C	5'	1
Hold	4°C	Hold	Hold

Tabla 5. Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en la PCR para generar el casete de resistencia a Kanamicina.

Oligonucleótidos	Secuencia
galKanMX Forward. IDT	5'
Número de referencia: 511653073	atatacctctataactttaacgtcaaggagaaaaactatacagctgaagcttcgta cgc 3'
galKanMX Reverse . IDT	5'
Número de referencia: 511653074	aatcattattaagtagttgaagcatgtatgaactataaagcataggccactagtggatc 3'

Una vez finalizada la PCR se realizó una comprobación en gel de agarosa al 1% para certificar que se había generado el fragmento de ADN en torno a 1.700pb que corresponde al casete tras la PCR. Se utilizó un gel de agarosa al 1%. La solución de TAE 1X y agarosa se calentó en un microondas hasta obtener un color transparente sin llegar a ebullición y se añadió a la cubeta de electroforesis, se tiñó el gel con GelRed como agente intercalante. Se cargaron 6 µl de marcador de pesos moleculares (Geneladder 1kb Thermo Scientific) y 6 µl de la muestra de PCR (5 µL muestra de PCR + 1 µL de buffer de carga (6X loading buffer, Thermo Scientific)). Una vez las bandas se separaron correctamente se visualizó el gel en el transiluminador UV GelPrinter Plus, modelo ECX-26M de INILAB bajo la luz UV, con el fin de obtener una banda entorno a los 1.700 pb (tamaño casete)(Goldstein & McCusker, 1999).

4.5 Purificación del casete

El DNA resultante de la generación del casete fue purificado con el kit de Nzytech NZYGelpure NP071. Se transfirió el volumen de PCR total a un tubo de centrifuga de 1,5mL y se añadió 5 veces el volumen de muestra PCR de Binding Buffer, se mezcló invirtiendo varias veces el tubo y se centrifugó 3 veces en la Spectrafuge 24D de Labnet durante 1 minuto a 13,300 rpm.

Seguidamente se pasó el volumen total del tubo de 1,5 mL a la columna NYZ Spin Tech y se centrifugó durante 1 minuto a 11g, se descartó el sobrenadante. Se añadieron posteriormente 600 µL de Wash Buffer se centrifugó 1 minuto a 11g y se descartó el sobrenadante. Se centrifugó de nuevo 1 minuto a 11g para eliminar residuos de EtOH. Se pasó la columna NYZ spin tech a un tubo nuevo de 1,5mL y se añadieron 60 µL de Elution Buffer en el centro de la columna. Posteriormente, se incubó la columna con elution buffer durante 2 horas en nevera a 4°C. Una vez pasado el tiempo de incubación se centrifugó 1 minuto a 11g para eluir el DNA. Se descartó la columna y el DNA purificado fue cuantificado añadiendo 2 µl al Nanodrop Spectrophotometer ND-1000 de Thermo Fischer Scientific.

4.6 Transformación cepas de levadura

Un día antes de la transformación se realizó un precultivo de la cepa CBS1782 en condiciones estériles en un tubo estéril de 15ml con 5 ml de medio YPD (Anexo 1). Al día siguiente a las 9:00 de la mañana se refrescó una única vez en condiciones estériles el medio en 5 ml de YPD conservando 150µL o más según crecimiento del precultivo.

Una vez las células de levadura se duplicaron varias veces (se observó el medio de cultivo turbio sin llegar a haber precipitado celular). Para la transformación se hirvió el ssDNA (DNA Carrier) en el Heating Magnetic Stirrer de VELP durante 10 minutos pasado ese tiempo se dejó en hielo hasta su uso, el PEG (polietilenglicol) se dejó a temperatura ambiente. Se centrifugaron las células en la Eppendorf Centrifuge 5810 R a 4.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavaron las células en 1mL de agua destilada estéril, se trabajó en condiciones estériles. Posteriormente, se lavó con 1mL de LiAc 0,1M y se centrifugó de nuevo a 4.000 rpm durante 5 minutos. Se descartó el sobrenadante se añadieron 36 µL de LiAc 0,1M y posteriormente se añadieron 40 µL de LiAc 1M, 50 µL de DNA Carrier, 2 µg de casete de resistencia a geneticina y 240 µL de PEG (polietilenglicol).

Se realizaron 30 segundos de vortex para poder homogenizar todos los componentes y posteriormente se incubó durante 30 minutos a 30° con agitación a 150 rpm. Posteriormente se incubó a 42°C durante 30 minutos y se dejó en hielo durante 2 minutos. Se centrifugó de nuevo a 9.000 rpm durante 5 minutos, se descartó el sobrenadante y se lavó con 1 mL de agua destilada estéril. Se resuspendieron en 150 µL de medio YPD fresco estéril y se incubó durante 2:30h a 30° con agitación de 150 rpm. El volumen total en una placa de YPD con geneticina se incubó durante 2 días a 30°C para favorecer el crecimiento de las levaduras transformadas.

4.7 Análisis estadísticos

Cada experimento se hizo por triplicado y se calcularon funciones estadísticas básicas como la desviación estándar para ver la dispersión de los valores de con respecto a la media de los datos. Por otra parte, se realizó una prueba ANOVA en Excel con un nivel de significancia del 0,05 para asegurar la relevancia estadística de los datos y que las diferencias entre análisis eran significativas, se realizó la prueba en los datos de media de sumatorio de pérdida de peso en el medio de 30mg N/L y 180mg N/L de cada cepa en las fermentaciones individuales de las cepas para asegurar que la diferencia entre las condiciones de análisis (los distintos medios con diferente YAN) eran estadísticamente significativos y no se debían al azar.

5. Resultados

5.1 Parámetros de crecimiento y caracterización de las cepas en medios con diferente YAN

Las 60 cepas mostraron diferentes tendencias de crecimiento en las placas de 96 pocillos en los medios con distintas YAN, podemos observar el parámetro de crecimiento de las cepas en función de la escala de color en el heat map, siendo el color azul oscuro valores altos de crecimiento y los más claros valores más bajos de crecimiento (Figura 8). Las cepas mostraron un mayor crecimiento en los medios con una YAN mayor presentando su crecimiento óptimo en el medio de 180mg N/L, cuando la YAN se incrementaba en los medios de 210 y 250mg N/L respectivamente el crecimiento se veía disminuido de manera significativa en todas las cepas. El crecimiento menor se presentaba en el medio de 30mg N/L, todas las cepas tenían un crecimiento menor en los medios con baja YAN.

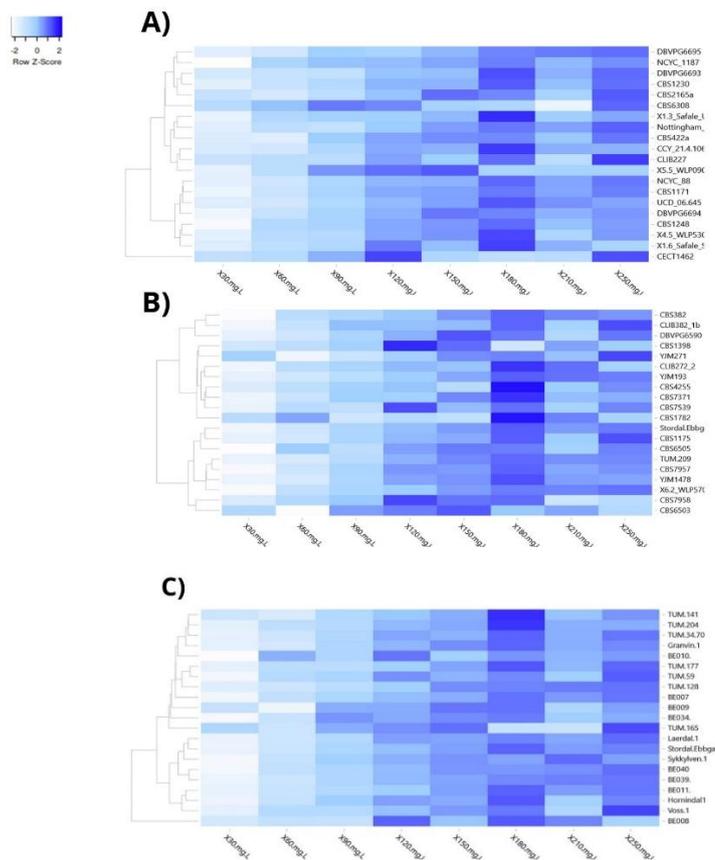


Figura 8. Heat map con un Row Z score de -2 a 2 de los valores de la media de la AUC de los parámetros de crecimiento de las cepas. (A) Se puede observar como las cepas de 1-20 presentan un mayor crecimiento en medios con YAN más elevada, así mismo con las cepas de la 21-40 (B) y de la 40-60 (C). Se puede observar la escala del diagrama de color en el margen superior izquierdo.

Mediante el cálculo de las pendientes a partir de los valores de el AUC de los medios se pudo certificar la clasificación de las 60 cepas en LNE (Low Nitrogen Efficiency) y HNE(High Nitrogen Efficiency). Se dividieron las cepas entre cepas con pendiente positiva las cuales se consideran HNE y cepas con pendiente menor las cuales se consideran LNE (Figura 9A). Por otra parte, las pendientes certifican el mejor crecimiento en medios con una YAN más elevada (Figura 9B).

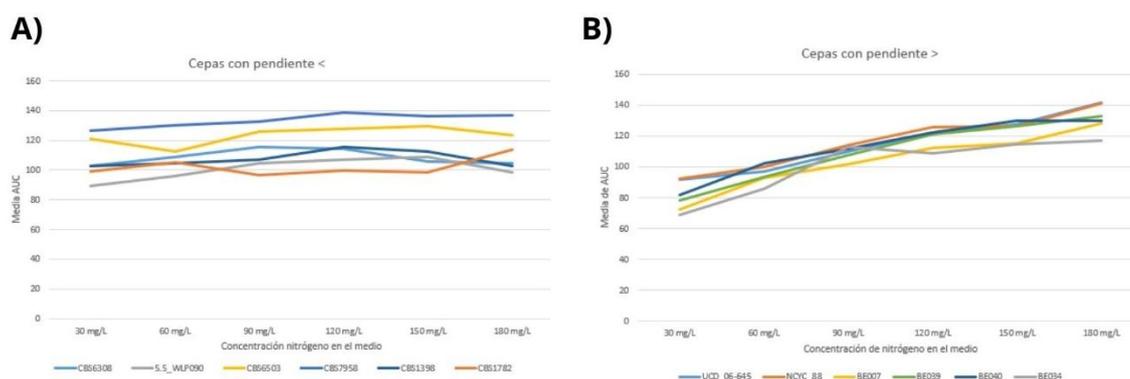


Figura 9. Pendiente de las 12 cepas preseleccionadas para la fermentación individual. A) Se observan las 6 cepas con pendiente menor las cuales se clasifican como LNE, de dichas cepas se seleccionaron la CBS7598, CBS1398, 5.5_WLP090, CBS6503, CBS1782. B) Se observan las 6 cepas con pendiente mayor, se clasifican como HNE, de dichas cepas se seleccionaron la NYC_88, BE034, BE039, UCD_06-645, BE040.

5.2 Rendimiento de las cepas seleccionadas en fermentaciones individuales en medios de 30 y 180mg N/L

Las cepas LNE mostraron un perfil fermentativo de mayor rendimiento en el medio de 180mg N/L .Las cepas presentaban un crecimiento mayor ya que el medio presenta una YAN mayor es decir, tiene una mayor cantidad de aminoácidos libres y compuestos nitrogenados que la levadura puede usar (Figura 10). La cepa CBS1782 presentó un perfil un poco diferente a las demás cepas, observamos como presentaba mayor crecimiento y mayor eficiencia fermentativa en el medio de 30mg N/L , es decir, en el medio con baja YAN, y además, la fermentación de dicha cepa era más rápida que las demás cepas analizadas (Figura 10A).

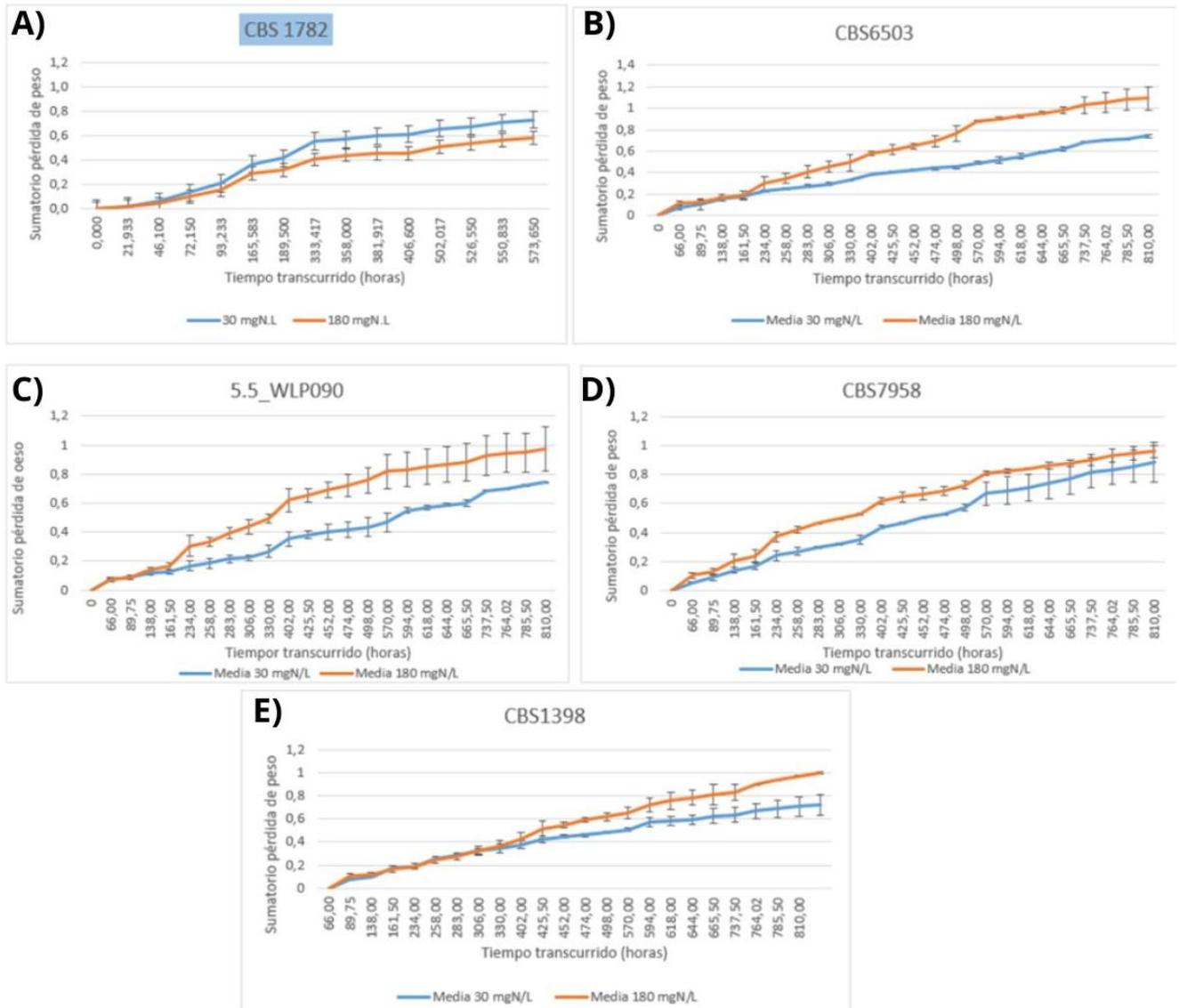


Figura 10. Rendimiento y eficiencia fermentativa de las 5 cepas LNE (A,B,C,D,E), es decir, las cepas con pendiente menor. En las gráficas podemos observar los resultados del análisis de la fermentación, es decir, el sumatorio de pérdida de peso, parámetro utilizado para medir la capacidad fermentativa de las cepas individualmente en el medio de mosto sintético 30mg N/L (azul) y 180mg N/L (naranja). Se observan las barras de error correspondientes a la desviación estándar de los datos analizados.

Por otra parte, la cepa CBS7598 (Figura 10D) y la cepa CBS1398 (Figura 10E) mostraron un rendimiento mayor en la fermentación en el medio de 30mg N/L con respecto a las demás cepas analizadas, mostrando un mayor dato de media de pérdida de peso y, por lo tanto, una mayor eficiencia fermentativa y de crecimiento comparadas con las otras cepas (Figura 11).

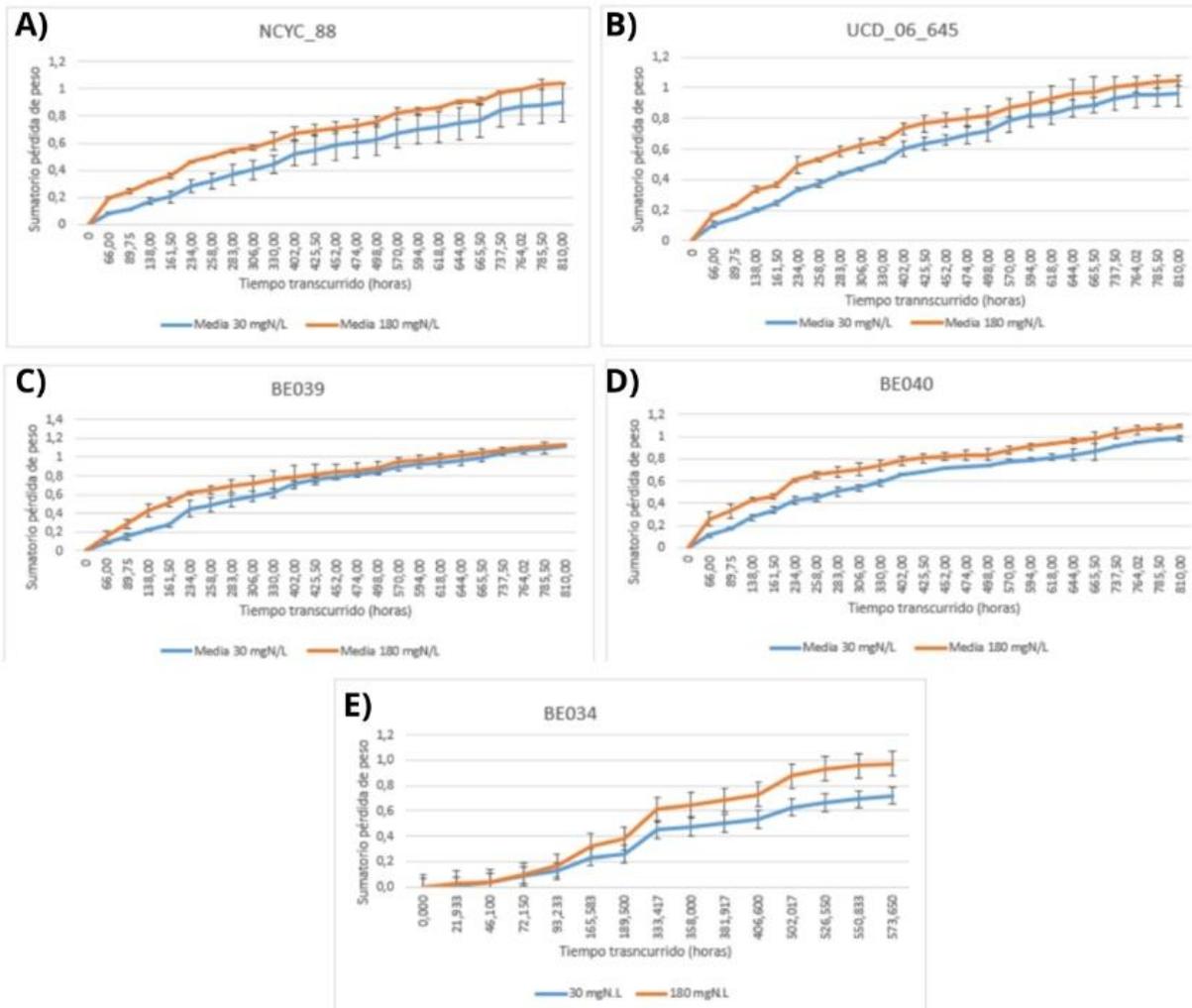


Figura 11. Rendimiento y eficiencia fermentativa de las 5 cepas HNE (A,B,C,D,E) , es decir, las cepas con pendiente mayor. En las gráficas podemos observar los resultados del análisis de la fermentación, es decir, el sumatorio de pérdida de peso, parámetro utilizado para medir la capacidad fermentativa de las cepas individualmente en el medio de mosto sintético 30mg N/L (azul) y 180mg N/L (naranja). Se observan las barras de error correspondientes a la desviación estándar de los datos analizados.

En la Figura 11 podemos observar los parámetros de crecimiento y la eficiencia de fermentación de las 5 cepas HNE. Se observa de nuevo que el crecimiento y fermentación es óptimo en todas las cepas en este caso en el medio con mayor YAN, es decir en el medio de 180mg N/L. Por otra parte, en comparación con las cepas LNE, estas cepas HNE presentan un ligero aumento del crecimiento en el medio con baja YAN, el medio de 30mg N/L.

Se certifica así la clasificación mediante el ensayo de las pendientes, de manera que las cepas HNE usan de manera más eficiente el nitrógeno que las cepas LNE, como podemos observar en la Figura 10 y 11 ya que presentan un mayor crecimiento en el mosto de cerveza sintético de 30mg N/L.

Se realizó la prueba estadística de ANOVA para ambas condiciones de fermentación, se comparó los valores de media de pérdida de peso en ambas condiciones de las 10 cepas, en el medio de 30mg N/L las cepas mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) nos indicó que las diferencias eran estadísticamente significativas entre los grupos. En el medio de 180mg N/L también se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,0001$) indicando diferencias estadísticamente significativas entre las condiciones.

5.3 Marcaje selectivo de la cepa CBS1782

En el gel de agarosa al 1% al ser excitado y revelado pudimos observar la banda del producto de PCR que correspondía al fragmento de casete de resistencia a geneticina, es decir, una banda en los 1.700 pb (Figura 12).

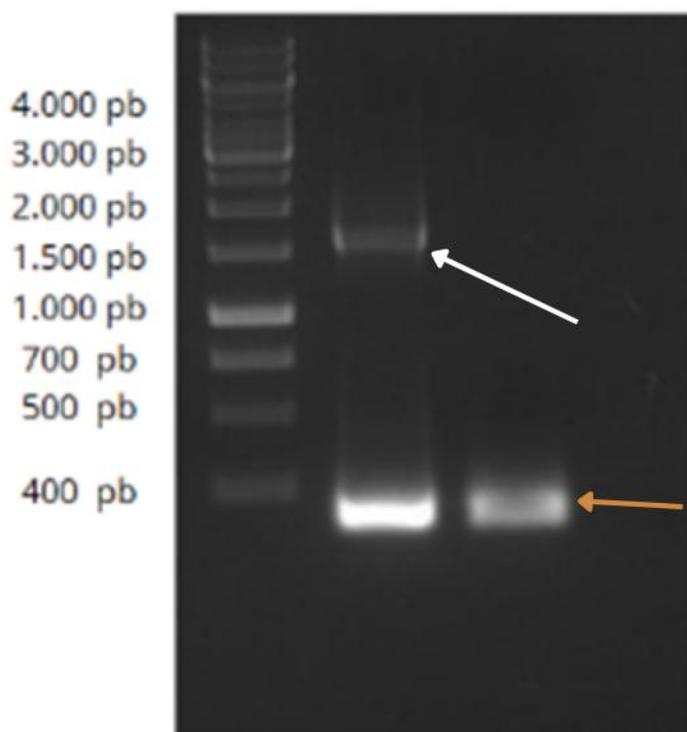


Figura 12. Gel en agarosa 1% del producto de la PCR para generar el casete. La banda en los 1.700pb (flecha blanca) corresponde al casete de resistencia a geneticina. Por otra parte, las bandas que se observan en 400pb (flecha naranja) corresponde a primer sin usar durante la PCR.

La transformación de la cepa CBS1782 no fue exitosa, no se obtuvieron colonias al sembrar en el medio selectivo de YPD con geneticina y tras una incubación de 7 días a 28°C, no se observaron colonias visibles en la placa.

6. Discusión

Las 60 cepas de la colección analizadas, entre ellas cepas salvajes derivadas de *S. cerevisiae* y cepas fermentadoras de uso industrial mostraron perfiles fenotípicos diferentes, mostrando parámetros de crecimiento diferentes en función de la YAN del medio.

Diversos estudios han demostrado que la YAN es un factor determinante en el crecimiento y la viabilidad de las cepas de *S.cerevisiae* salvajes e industriales durante la fermentación alcohólica. Según Martínez-Moreno et al. (2012) la cepa EC118 de *S.cerevisiae* cepa de carácter industrial, alcanzaba su crecimiento óptimo en una YAN entorno al rango de 140 a 180mg N/L dichos valores se respaldan por Mendes-Ferreira et al. (2004) y O'Connor-Cox & Ingledew (1991), los cuales definieron el rango mínimo de YAN entre 120 y 260 mg N/L dependiendo de la cepa y las condiciones para poder completar la fermentación alcohólica de manera eficiente. Según lo esperado, al analizar los parámetros de crecimiento de las 60 cepas, la mayoría de las cepas presentaban un crecimiento óptimo en el medio de 180mg N/L.

Sin embargo, contrariamente a lo descrito por Mendes-Ferreira et al. (2004) y O'Connor-Cox & Ingledew (1991), cuando los valores de YAN alcanzaban concentraciones más elevadas como 210 y 250mg N/L el crecimiento de todas las cepas de levadura se veía disminuido de manera drástica. Dicha disminución puede deberse a que el NRV (Nitrogen Reference Value) el cuál relaciona la cantidad de azúcares en el medio con la YAN no era el idóneo en dichos medios, los cuales presentaban cantidades de nitrógeno elevadas causando el estancamiento y disminución del crecimiento en las levaduras (Martínez-Moreno et al., 2012).

Por otra parte, en cuanto a la eficiencia en el uso del nitrógeno, estudios previos han demostrado que las cepas industriales muestran una alta eficiencia en la asimilación de los compuestos nitrogenados y aminoácidos durante la fermentación, debido a su optimización para completar las fermentaciones a nivel industrial inclusive en cantidades limitadas de nitrógeno(Kemsawasd et al., 2015; Martínez-Moreno et al., 2012). Dicha adaptación y optimización se traduce en una mayor producción de biomasa y un mayor crecimiento de dichas cepas (Kemsawasd et al., 2015; Martínez-Moreno et al., 2012).

Conforme a lo esperado y descrito, las cepas de carácter industrial como BE034, BE040, BE039, NYC_88 y UCD_06_645 presentaban parámetros de crecimiento más elevados y una pendiente mayor, por ende, una mayor eficiencia en el uso del nitrógeno certificando su clasificación como cepas HNE. Dicha eficiencia permite a las cepas fermentar y producir compuestos volátiles como el etanol de manera eficiente durante la fermentación, aunque las cantidades de nitrógeno en el mosto sean limitadas.

Al contrario, las levaduras salvajes derivadas de *S. cerevisiae* como son las CBS suelen presentar una menor eficiencia en cuanto a la asimilación y metabolización de los compuestos nitrogenados presentes en el mosto con respecto a las cepas industriales(Da Cruz et al., 2002). Por ende, las cepas salvajes de levadura necesitan concentraciones más elevadas de YAN con

respecto a las cepas industriales para completar la fermentación de manera eficiente produciendo la biomasa adecuada y los compuestos volátiles como el etanol (Martínez-Moreno et al., 2012). Conforme a lo descrito, las cepas salvajes mostraron un crecimiento menor en los medios con baja YAN como el de 30mg N/L con respecto a las cepas industriales, por ende su pendiente y sus parámetros de crecimiento fueron menores también, certificando su clasificación como LNE. Al ser cepas LNE necesitan mayor concentración de nitrógeno en el medio y por ende mayor YAN para fermentar de manera eficiente y presentar el crecimiento óptimo (Martínez-Moreno et al., 2012; Mendes-Ferreira et al., 2004; O'Connor-Cox & Ingledew, 1991).

Al realizar el estudio individual de las cepas observamos que las cepas salvajes CBS (CBS1782, CBS6503, CBS7958, CBS1398) y la cepa 5.5_WLP090 cepas LNE conforme a lo esperado, la mayoría presentaba un crecimiento óptimo y una eficiencia fermentativa mayor (mayor pérdida de peso) en el medio de 180mg N/L (Mendes-Ferreira et al., 2004; O'Connor-Cox & Ingledew, 1991; Su et al., 2019). Sin embargo, la cepa CBS1782 presentó un perfil distinto al resto de manera anómala, ya que presentaba una mayor eficiencia fermentativa en el medio de 30mg N/L. Según lo reportado por O'Connor-Cox y Ingledew (1991) y Su et al. (2019) algunas cepas salvajes como *S. uvarum* son capaces de crecer y fermentar de manera óptima en medios con baja YAN debido a su adaptación y capacidad de fermentar en medios con condiciones adversas. Así mismo puede ocurrir con CBS1782 y por ello presenta dicho comportamiento anómalo, al haber adquirido por un proceso de adaptación un fenotipo distinto al de las demás cepas.

Por otra parte, las cepas industriales UCD_06_645, BE034, BE039, BE040 y NYC_88 mostraron un perfil fenotípico fermentativo esperado, presentando una mayor eficiencia fermentativa en el medio de 180mg N/L y presentando valores más altos de pérdida de peso con respecto a las cepas salvajes CBS (Mendes-Ferreira et al., 2004; O'Connor-Cox & Ingledew, 1991).

La cepa CBS1782 fue analizada más exhaustivamente por presentar dicho comportamiento anómalo en la fermentación de manera individual. Se generó el casete de transformación de resistencia a genética de manera exitosa, sin embargo, la cepa CBS1782 no se pudo transformar de forma efectiva. A pesar de modificar los reactivos empleados para la transformación por un posible fallo en la preparación de estos, por posible presencia de una contaminación con SDS, un detergente que lisa a las células.

Al cambiar todos los reactivos no logró subsanarse el error y la transformación siguió sin producirse, las posibles causas del fallo en la misma residen en una cantidad de casete insuficiente para poder transformar, una degradación del casete al ser almacenado o una selección inadecuada con G418. Por otra parte, puede ser que la cepa CBS1782 presente fallos

en la maquinaria de recombinación homóloga o ser una cepa no competente por su carácter salvaje (Goldstein & McCusker, 1999).

La principal limitación del estudio residen en el fallo de transformación por lo mencionado anteriormente de la cepa CBS1782 el cual no permitió realizar un análisis más exhaustivo de la cepa y compararla con otras cepas salvajes en fermentaciones competitivas, de manera que en próximos estudios se podría modificar el método de transformación para poder marcar la cepa y comparar con otras CBS para obtener un perfil comparativo de las cepas salvajes fenotípicamente en el medio de 30mg N/L y 180mg N/L.

Por otra parte, otra limitación presente dentro del estudio es que las fermentaciones se realizaron en medio sintético de cerveza, por lo que se podría ampliar, realizando fermentaciones a escalas mayores en mostos de malta utilizados en fermentaciones industriales para ver si el comportamiento de las cepas es distinto o si mejora la eficiencia fermentativa en dichos mostos, permitiendo comparar entre diversos mostos.

A futuro, se pretende ampliar las cepas de estudio y comparar dichas cepas fenotípicamente mediante una fermentación competitiva para poder evaluar diferencias fenotípicas mediante. Se podrían también analizar las cepas a nivel individual genotípicamente en busca de diferencias dentro de los niveles regulatorios del NCR y CNM. Para complementar el estudio se pretende poder realizar un análisis transcriptómico y proteómico para analizar a nivel de expresión a nivel molecular, además de un análisis de la formación de compuestos volátiles durante la fermentación como el etanol y los aromas correspondientes de la cerveza.

Finalmente, todo este conocimiento generado se pretende trasladar a las empresas para que puedan implementarlo en los procesos de fermentación en mosto de malta para producir cerveza de manera más sostenible y de mayor calidad conforme al ODS número 12 "Producción y consumo sostenible" de la Agenda 2030.

7. Conclusiones

En función a los objetivos previamente planteados, se logró conocer el perfil fenotípico fermentativo de 60 cepas de levadura, observando perfiles diversos de fermentación en medios con distinta YAN, permitiendo dilucidar la eficiencia de uso del nitrógeno de dichas cepas:

1. Se clasificaron las 60 cepas analizadas en el estudio como cepas LNE y HNE gracias a la identificación de sus parámetros de crecimiento y su pendiente en medios con diversa YAN, obteniendo la clasificación en cepas con pendiente menor como LNE y cepas con pendiente mayor como HNE.

2. Se obtuvo el perfil fenotípico individual de 10 cepas entre ellas 5 LNE y 5 HNE obteniendo su perfil fermentador en función de su pérdida de peso en medios sintéticos de cerveza con una YAN de 30mg N/L y 180mg N/L. Logrando ver su perfil fermentativo y su eficiencia en medios con distinta YAN.

3. Debido al fallo en la transformación no se ha podido realizar la competición entre cepas en medios de mosto de malta, al no poder marcar las cepas con resistencia a G418 no se pudo observar el perfil comparativo mediante competición de las cepas.

Bibliografía

- Andréasson, C., & Ljungdahl, P. O. (2004). The N-Terminal Regulatory Domain of Stp1p Is Modular and, Fused to an Artificial Transcription Factor, Confers Full Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p Sensor Control. *Molecular and Cellular Biology*, 24(17), 7503–7513. <https://doi.org/10.1128/mcb.24.17.7503-7513.2004>
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 625–632. <https://doi.org/10.1016/j.femsyr.2003.12.004>
- Coffman, J. A., El Berry, H. M., & Cooper, T. G. (1994). The URE2 Protein Regulates Nitrogen Catabolic Gene Expression through the GATAA-Containing UASNTR Element in *Saccharomyces cerevisiae*. *JOURNAL OF BACTERIOLOGY* 176(24), 7503–7513.
- Cooper, T. G. (2002). Transmitting the signal of excess nitrogen in *Saccharomyces cerevisiae* from the Tor proteins to the GATA factors: connecting the dots. *FEMS Microbiology Reviews*, 26(3), 223–238. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2002.tb00612.x>
- Cvengrošová, M., Šepel'ová, G., & Šmogrovicová, D. (2003). Effect of mashing-in temperature on free amino nitrogen concentration and foam stability of beer. *Monatsschrift für Brauwissenschaft*, 56(7/8), 128–131.
- Da Cruz, S. H., Cilli, E. M., & Ernandes, J. R. (2002). Structural complexity of the nitrogen source and influence on yeast growth and fermentation. *Journal of the Institute of Brewing*, 108(1), 54–61. <https://doi.org/10.1002/j.2050-0416.2002.tb00124.x>
- Dekoninck, T. M. L., Verbelen, P. J., Delvaux, F., Van Mulders, S. E., & Delvaux, F. R. (2012). The importance of wort composition for yeast metabolism during accelerated brewery fermentations. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 70(3), 195–204. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2012-0809-01>
- Englezos, V., Cocolin, L., Rantsiou, K., Ortiz-Julien, A., Bloem, A., Seguinot, P., & Camarasa, C. (2021). Influence of Single Nitrogen Compounds on Growth and Fermentation Performance of *Starmerella bacillaris* and *Saccharomyces cerevisiae* during Alcoholic Fermentation. *Food Microbiology*, 95, 103683. <https://doi.org/10.1128/AEM.02485>
- Evans, D. E., Paynter, B. H., Izydorczyk, M. S., & Li, C. (2023). The impact of terroir on barley and malt quality – a critical review. *Journal of the Institute of Brewing*, 129(4), 211–258. <https://doi.org/10.58430/jib.v129i4.38>
- Ferreira, I. M., & Guido, L. F. (2018). Impact of wort amino acids on beer flavour: A review. *Fermentation*, 4, (2), 23. <https://doi.org/10.3390/fermentation4020023>
- Goldstein, A. L., & McCusker, J. H. (1999). Three new dominant drug resistance cassettes for gene disruption in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 15(15), 1541–1553. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(199910\)15:15<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(199910)15:15<1541::AID-YEA476>3.0.CO;2-K)
- Gutiérrez, A., Chiva, R., Sancho, M., Beltran, G., Arroyo-López, F. N., & Guillamon, J. M. (2012). Nitrogen requirements of commercial wine yeast strains during fermentation of a synthetic grape must. *Food Microbiology*, 31(1), 25–32. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2012.02.012>

- Gutiérrez, A., Sancho, M., Beltran, G., Guillamon, J. M., & Warringer, J. (2016). Replenishment and mobilization of intracellular nitrogen pools decouples wine yeast nitrogen uptake from growth. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *100*(7), 3255–3265. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-7273-y>
- Hill, A. E., & Stewart, G. G. (2019). Free amino nitrogen in brewing. *Fermentation*, *5*(1), 22. <https://doi.org/10.3390/fermentation5010022>
- Kemsawasd, V., Viana, T., Ardö, Y., & Arneborg, N. (2015). Influence of nitrogen sources on growth and fermentation performance of different wine yeast species during alcoholic fermentation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, *99*(23), 10191–10207. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6835-3>
- Lei, H., Zhao, H., Yu, Z., & Zhao, M. (2012). Effects of wort gravity and nitrogen level on fermentation performance of brewer's yeast and the formation of flavor volatiles. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *166*(6), 1562–1574. <https://doi.org/10.1007/s12010-012-9560-8>
- Lekkas, C., Stewart, G. G., Hill, A., Taidi, B., & Hodgson, J. (2005). *The Importance of Free Amino Nitrogen in Wort and Beer*. *42*(2), 113–116. <https://doi.org/10.1094/TQ-42-0113>
- Li, J., Yuan, M., Meng, N., Li, H., Sun, J., & Sun, B. (2024). Influence of nitrogen status on fermentation performances of non-Saccharomyces yeasts: a review. *Food Science and Human Wellness*, *13*(2), 556–567. <https://doi.org/10.26599/FSHW.2022.9250050>
- Magasanik, B., & Kaiser, C. A. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*, *290*(1–2), 1–18. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00560-3](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00560-3)
- Martínez-Moreno, R., Morales, P., Gonzalez, R., Mas, A., & Beltran, G. (2012). Biomass production and alcoholic fermentation performance of *Saccharomyces cerevisiae* as a function of nitrogen source. *FEMS Yeast Research*, *12*(4), 477–485. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2012.00802.x>
- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., & Leão, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology*, *97*(3), 540–545. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2004.02331.x>
- Mira de Orduña, R. (2010). Climate change associated effects on grape and wine quality and production. *Food Research International*, *43*(7), 1844–1855. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.05.001>
- O'Connor-Cox, E. S. C., & Ingledew, W. M. (1991). Alleviation of the effects of nitrogen limitation in high gravity worts through increased inoculation rates. In *Journal of Industrial Microbiology* (Vol. 7).
- Potterton, E. M., & McCabe, T. (2018). The effect of sowing date and nitrogen rate on the grain yield, grain quality and malt analyses of spring malting barley for distilling in Ireland. *Journal of Agricultural Science*, *156*(4), 515–527. <https://doi.org/10.1017/s002185961800059x>
- Roca-Mesa, H., Sendra, S., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M. J. (2020). Nitrogen preferences during alcoholic fermentation of different non-saccharomyces yeasts of oenological interest. *Microorganisms*, *8*(2). <https://doi.org/10.3390/microorganisms8020157>

- Stewart, G. G., Hill, A., & Lekkas, C. (2013). Wort FAN - Its characteristics and importance during fermentation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists*, 71(4), 179–185. <https://doi.org/10.1094/ASBCJ-2013-0921-01>
- Su, Y., Origone, A. C., Rodríguez, M. E., Querol, A., Guillamón, J. M., & Lopes, C. A. (2019). Fermentative behaviour and competition capacity of cryotolerant *Saccharomyces* species in different nitrogen conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 291, 111–120. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2018.11.020>
- Su, Y., Seguinot, P., Sanchez, I., Ortiz-Julien, A., Heras, J. M., Querol, A., Camarasa, C., & Guillamón, J. M. (2020). Nitrogen sources preferences of non-*Saccharomyces* yeasts to sustain growth and fermentation under winemaking conditions. *Food Microbiology*, 85, 103287 <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103287>
- Tesnière, C., Brice, C., & Blondin, B. (2015). Responses of *Saccharomyces cerevisiae* to nitrogen starvation in wine alcoholic fermentation. In *Applied Microbiology and Biotechnology*, 99(17), 7025–7034. Springer Verlag. <https://doi.org/10.1007/s00253-015-6810-z>
- Tesnière, C., Delobel, P., Pradal, M., & Blondin, B. (2013). Impact of Nutrient Imbalance on Wine Alcoholic Fermentations: Nitrogen Excess Enhances Yeast Cell Death in Lipid-Limited Must. *PLoS ONE*, 8(4), e61645 . <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0061645>
- van Riel, . Giuseppin, TerSchure, Verrips. (1998). A Structured, Minimal Parameter Model of the Central Nitrogen Metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: the Prediction of the Behaviour of Mutants. In *J. theor. Biol* (Vol. 191).
- Warringer, J. and Blomberg, A. (2003), Automated screening in environmental arrays allows analysis of quantitative phenotypic profiles in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 20: 53-67. <https://doi.org/10.1002/yea.931>

Anexo 1

1. Composición del medio sintético de cerveza:

Tabla 6. Composición del mosto de cerveza sintético, se detallan las cantidades en gramos de los reactivos por 1 litro y 5 litros de mosto. La concentración de nitrógeno se ajusta mediante el ajuste de las cantidades de la fuente de nitrógeno y del Stock 100X de aminoácidos.

MOSTO CERVEZA SINTÉTICO		
AZÚCARES	g/ litro	g/ 5 litros
Glucosa (S10)	20	100
Maltosa	70	350
		~ 5, 5 % Etanol
ÁCIDOS	g/ litro	g / 5 litros
Cítrico-1hidrato (S65)	0,2	1
Láctico	0,1	0,5
DL-Málico (S54)	0,1	0,5
MINERALES	g/ litro	g / 5 litros
KH ₂ PO ₄ (S61)	0,75	3,75
K ₂ SO ₄ (S60)	0,50	2,50
MgSO ₄ .7H ₂ O (S56)	0,50	2,5
CaCl ₂ .2H ₂ O (S51)	0,155	0,775
NaCl (S62)	0,20	1,00
Fte de Nitrógeno	1 litro	5 litros
STOCK 100X	10 ml	50 ml
		200 mg N/L
Sol. VITAMINAS (-20 °C)	10 ml	50 ml
Stock Riboflavina	1 mL	5 mL
Sol. OLIGOELEMENTOS (4 °C)	1 ml	5 ml
AJUSTAR pH a 5,0		

Tabla 7. Proporciones y cantidades de aminoácidos presentes en el Stock 100X. Se detallan las cantidades en mg de N/l y cuanto corresponde en g/mol. Se detalla la cantidad total de mgN/l en el Stock 100X.

Amino acid	Wort			STOCK 100X	
	mg N/l	g/mol	grups NH4	mg/l most	g/L
Asp	6	133,0	1	57,0	5,70
Glu	7,4	147,0	1	77,7	7,77
Ser	6	105,0	1	45,0	4,50
Gln	15	146,0	2	78,2	7,82
His	3,8	155,0	1	42,1	4,21
Gly	5,1	75,0	1	27,3	2,73
Thr	5,2	119,0	1	44,2	4,42
Arg	8,7	174,0	3	36,0	3,60
Ala	12,5	89,0	1	79,5	7,95
Tyr	10,5	181,0	1	135,8	13,58
Cis	1,6	121,0	1	13,8	1,38
Val	12,1	117,0	1	101,1	10,11
Met	2,4	149,0	1	25,5	2,55
Trp	3	204,0	1	43,7	4,37
Phe	7,8	165,0	1	91,9	9,19
Ile	5,2	131,0	1	48,7	4,87
Leu	12,9	131,0	1	120,7	12,07
Lys	8,7	146,0	2	45,4	4,54
Pro	44,1	115,0	1	362,3	36,23
NH4Cl	22	53,5	1	84,1	8,41
Total mg N/L	200			1560,0	156,00

1.2 Composición del medio YPD:

Tabla 8. Composición del medio YPD. Se detalla cada reactivo y la cantidad de gramos por litro de medio.

Reactivo	Cantidad
D (+) glucose anhidridous Pan React Applichem. Lote: 0002482173, número de referencia: 131341.1210	20g/L
Bacteriological Peptone CondaLab. Lote: 270334, número de referencia: 1616.00.	20g/L
Extracto de levadura CondaLab, lote: B11220, número de referencia: 1702.00.	10g/L
Agar bacteriológico europeo, CondaLab. Lote: A02299, número de referencia: 1800.00.	20g/L

