



Estudio de los cambios inducidos en las propiedades organolépticas de la cerveza tras modificación genética de la levadura.

Study of the changes induced in the organoleptic properties of beer after genetic modification of yeast.

Estudo dos cambios inducidos nas propiedades organolépticas da cervexa tras a modificación xenética do lévedo.

M^a Pilar París Huguet

A Coruña, Febrero de 2019



Estudio de los cambios inducidos en las propiedades organolépticas de la cerveza tras modificación genética de la levadura.

Study of the changes induced in the organoleptic properties of beer after genetic modification of yeast.

Estudo dos cambios inducidos nas propiedades organolépticas da cervexa tras a modificación xenética do lévedo.

Facultade de Ciencias, Universidade da Coruña.

Estrella Galicia. Hijos de Rivera S.A.U.



M^a Pilar París Huguet

A Coruña, Febrero de 2019

Dr. Manuel Becerra Fernández y Dr. José Manuel López Vilariño, en calidad de tutores de este trabajo autorizan su presentación ante el Tribunal Evaluador.

Dr. Manuel Becerra Fernández

Dr. José Manuel López Vilariño

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Manuel Becerra por ofrecerme la oportunidad de realizar este proyecto y por su apoyo y orientación durante este período.

Al Dr. José Manuel López por guiarme y aconsejarme a lo largo de la realización de este proyecto.

A Estrella Galicia y a las personas que forman parte del panel de catadores por su tiempo y su ayuda.

RESUMEN

Las propiedades organolépticas de un producto de la complejidad de la cerveza son gracias a la presencia de un gran número de moléculas, cuya concentración en la mezcla es debida tanto a las materias primas de partida, como a las condiciones de procesado y fermentación. En esta fermentación, para lograr un producto adecuado, son tan críticas tanto la levadura empleada como los parámetros físico-químicos del medio de elaboración. De este modo, en la mezcla final, tendremos la presencia de diferentes familias de polifenoles, ácidos orgánicos, aldehídos y pequeños péptidos, todos ellos en un proceso vivo de transformación química donde también influyen el pH y el equilibrio redox, que tendrá lugar en todo momento durante la vida útil del producto.

En un proceso en el que intervienen tal número de variables, es de una gran complejidad el poder estimar cómo va a influir la modificación de alguna de ellas en el resultado final.

Esta estimación, se hace más complicada todavía cuando estamos considerando el comportamiento de un organismo vivo como es la levadura. Por este motivo, se hacen necesarios estudios que nos doten de información parcial para poder entender a priori, qué es lo que puede ocurrir en nuestro proceso al introducir una modificación.

En este trabajo, se realizará una modificación genética de la levadura con el objetivo de alterar las propiedades organolépticas del producto, y de ese modo, poder predecir o vincular una determinada secuencia genética con un coproducto determinado. Esto permitirá en el futuro, seleccionar una cepa de levadura en función del perfil de cerveza que se quiera lograr.

ABSTRACT

The organoleptic properties of a product of the complexity of beer are due to the presence of a large number of molecules, whose concentration in the mixture is due both to the raw materials of departure, as well as to the conditions of processing and fermentation. In this fermentation, in order to achieve a suitable product, both the yeast used and the physical-chemical parameters of the production medium are as critical. Thus, in the final mixture, we will have the presence of different families of polyphenols, organic acids, aldehydes and small peptides, all of them in a living process of chemical transformation that is also influenced by the pH and redox balance, which will take place at all times throughout the useful life of the product.

In a process in which such a number of variables are involved, it is very complex to be able to estimate how the modification of any of them will influence the final result.

This estimation becomes even more complicated when we are considering the behaviour of a living organism such as yeast. For this reason, studies are necessary to provide us with partial information in order to understand a priori what can happen in our process when introducing a modification.

In this work, a genetic modification of the yeast will be carried out to alter the organoleptic properties of the product, and thus predict or link a particular genetic sequence with a particular co-product. This will allow, in the future, to select a yeast strain according to the beer profile to be achieved.

RESUMO

As propiedades organolépticas dun produto da complexidade da cervexa son grazas á presenza dun gran número de moléculas cuxa concentración na mestura é debido tanto as materias primas de partida, como ás condicións de procesamento e de fermentación. Nesta fermentación, para conseguir un produto axeitado, tanto a levadura utilizada como os parámetros físico-químicos do medio de procesamento son críticos. Así, na mestura final, teremos a presenza de polifenóis de diferentes familias, ácidos orgánicos, aldehidos e pequenos péptidos, todo nun proceso de transformación química vivo onde tamén inflúen o pH e o equilibrio redox, que terá lugar en todo momento durante a vida útil do produto.

Nun proceso no que interveñen tal número de variables, é dunha grande complexidade o poder estimar como vai a influír a modificación dalgunha delas no resultado final.

Esta estimación faise aínda máis complicada cando estamos considerando o comportamento dun organismo vivo como é o lévedo. Por este motivo, necesítanse estudos que nos proporcionen información parcial para poder comprender a priori o que pode suceder no noso proceso ao introducir unha modificación.

Neste traballo, realizaráse unha modificación xenética do lévedo co obxectivo de alterar as propiedades organolépticas do produto e, así, poder prever ou vincular unha secuencia xenética particular cun co-produto determinado. Isto permitirá no futuro seleccionar unha cepa de lévedo en función do perfil de cervexa que se desexe alcanzar.

1 Contenido

1.	Introducción	1
1.1	Contexto general.	1
1.2	Materias primas y proceso de elaboración de la cerveza.	1
1.2.1	El Agua.....	2
1.2.2	El Cereal.....	2
1.2.3	El Lúpulo.....	2
1.2.4	La Levadura.....	3
1.2.5	Proceso de elaboración.....	5
1.3	Parámetros críticos en la fermentación.	6
1.4	Análisis sensorial.....	7
1.5	Subproductos de la fermentación.	9
1.5.1	Regulación de la síntesis de ésteres de acetato: Expresión de la alcohol acetil transferasa.	16
1.6	Herramientas avanzadas de genética en el desarrollo de la cerveza.....	17
2.	Objetivos	19
3.	Materiales y métodos	20
3.1	Materiales.....	20
3.1.1	Líneas celulares	20
3.1.2	Enzimas	20
3.1.3	Plásmido.....	20
3.1.4	Medios de cultivo y su composición	21
3.2	Métodos.....	23
3.2.1	Extracción del DNA genómico	23
3.2.2	Amplificación del gen <i>ATF1</i> mediante PCR.....	24
3.2.3	Técnicas electroforéticas	26
3.2.4	Extracción del DNA plasmídico de bacterias y levaduras	26
3.2.5	Transformación de bacterias y levadura.....	26
3.2.6	Cultivos	28
3.2.7	Análisis sensorial.....	29
4	Resultados y discusión	29
4.1	Construcción de la cepa recombinante.....	29
4.2	Comparación de las cepas mediante cultivos	31
4.	Conclusiones	38
5.	Bibliografía	39



1. Introducción

1.1 Contexto general.

La cerveza es una bebida milenaria que a lo largo de los siglos ha tenido un fuerte vínculo con la sociedad. Probablemente, las primeras fermentaciones se llevaron a cabo por accidente, ya que en sus inicios no se conocía la bioquímica involucrada en el proceso, ni se sabía que la levadura que crecía naturalmente en el suelo y en las plantas era fundamental para llevar a cabo la fermentación (Pires and Brányik, 2015; White and Zainasheff, 2010).

En 1680, Anton van Leeuwenhoek fue el primero en observar, mediante un microscopio, que la levadura estaba compuesta de pequeños elementos interconectados, aunque no se conocía que era un organismo vivo. En esa época, la teoría aceptada sobre la fermentación era que se trataba de un proceso espontáneo, es decir, una reacción química promovida por el contacto con el aire, y que la levadura era un subproducto.

Un siglo más tarde, en 1789, Antoine-Laurent Lavoisier describió el proceso químico que se produce en la fermentación como azúcares que se convierten en dióxido de carbono y alcohol, y no fue hasta mediados de 1800 que Louis Pasteur estableció que la levadura era un microorganismo vivo. Este hallazgo permitió un mayor control y precisión del proceso de fermentación y condujo a la creación de un campo de estudio independiente llamado bioquímica. Los avances logrados, como resultado directo o indirecto de la investigación de la cerveza, nos llevaron a comprender cómo funcionan las células y sentaron las bases para muchos otros avances en la investigación científica (White and Zainasheff, 2010).

1.2 Materias primas y proceso de elaboración de la cerveza.

De forma general, se entiende por cerveza a la bebida alcohólica resultante de la fermentación de un mosto cargado de azúcares fermentables cuyo origen se encuentra en los cereales. Desde el principio han intervenido en el proceso de elaboración, ingredientes naturales como el agua, cereales, levadura y lúpulo (Hill, 2003; Kunze, 2006; White and Zainasheff, 2010).



1.2.1 El Agua

El agua es la materia prima mayoritaria en la cerveza (90%) y sus características son vitales para las cualidades finales del producto. Conscientes de la importancia de esta materia prima, históricamente, las fábricas de cerveza se instalaron siempre próximas a ríos o manantiales y aunque hoy en día se utiliza agua de las redes urbanas, todavía hay cerveceras que cuentan con sus propios pozos o fuentes.

El agua cervecera debe reunir unas características mínimas como cualquier agua de consumo humano: exenta de materia orgánica, microbiológicamente pura, con ausencia de olores y sabores extraños y su contenido en sales será variable en función de la variedad de cerveza que se quiera lograr (White and Zainasheff, 2010; Hill 2003; Kunze, 2006; Denby *et al.*, 2018).

1.2.2 El Cereal

Los granos de cereal tienen un alto contenido en polisacáridos (azúcares), pero en su estado natural estos azúcares no pueden ser aprovechados por la levadura, y tienen que ser sometidos a un proceso de malteado y macerado que consiste en la germinación controlada del embrión y su posterior secado y tostado mediante unas condiciones óptimas de humedad, temperatura y aireación, que permiten una serie de cambios en el grano que son fundamentales para el proceso de elaboración de cerveza como facilitar la formación de enzimas, principalmente, amilolíticas y proteolíticas, degradar las estructuras del endospermo para facilitar la acción de las amilasas sobre el almidón, y desarrollar sustancias colorantes y aromáticas (Kunze, 2006; Pires and Brányik, 2015).

1.2.3 El Lúpulo

El lúpulo (*Humulus lupulus*) es una planta trepadora de la familia de las *Cannabaceas* que se cultiva en todo el mundo principalmente para satisfacer las necesidades de la industria cervecera (Briggs *et al.*, 2004).

A lo largo de los años, se han ido cultivando y desarrollando diferentes especies de lúpulo que aportan matices y caracteres únicos a cada estilo de cerveza, y se clasifican en tres tipos: los lúpulos aromáticos, los amargos y los de doble función.



En la elaboración de cerveza únicamente se utiliza la planta femenina, de la que nacen las flores (llamadas conos) que contienen las glándulas de lupulina (Figura 1) (Roberts, 2016; De Keukeleire, 2000).

En la lupulina encontramos compuestos químicos como los alfa ácidos (α -ácidos) y los beta ácidos (β -ácidos), que son los principales responsables de conferir amargor a la cerveza; también encontramos aceites esenciales que se componen de compuestos químicos como ésteres, cetonas, alcoholes y ácidos orgánicos y que aportan sabor y aroma a la cerveza y taninos o polifenoles que aportan astringencia, y contribuyen a la formación y retención de espuma (Kunze, 2006).

Durante el proceso de elaboración de la cerveza, el lúpulo se añade y se hierve con mosto dulce, en este tiempo, los ácidos de las resinas se isomerizan formando los iso-ácidos y la mayor parte de los componentes de los aceites esenciales se evaporan, por lo que se puede añadir una porción de lúpulo aromático al final de la ebullición para reemplazar esta pérdida (Denby *et al.* 2018; Kunze, 2006; Pires and Brányik, 2015; Denby *et al.*, 2018; Bamforth, 2017).

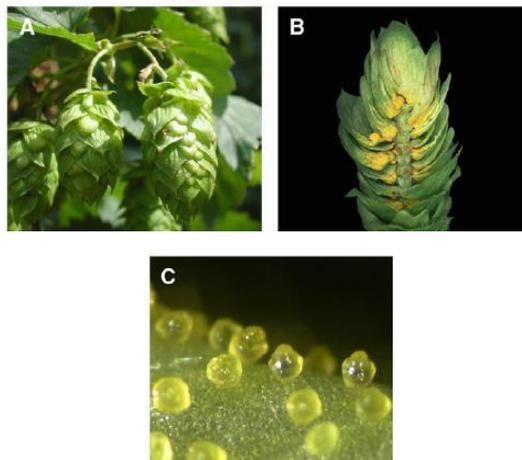


Figura 1 A. Morfología de los conos del lúpulo. B. Corte transversal de un cono. C. Glándulas de lupulina. (Cerdán, 2015)

1.2.4 La Levadura

La levadura, es un hongo unicelular, responsable de convertir el mosto en cerveza, consumiendo los azúcares fermentables y otras moléculas del mosto y transformándolos en alcohol, CO₂ y componentes orgánicos responsables de aromas y sabores. Es decir, la



levadura es la encargada directa de la fermentación y por lo tanto, es imprescindible para que se pueda hacer cerveza (White and Zainasheff, 2010).

El género de uso más extendido es el *Saccharomyces* aunque existen más géneros de levaduras que se pueden utilizar para fermentar cerveza, dentro de este género se conocen más de 30 especies y dentro de éstas, existen multitud de cepas diferentes.

La forma típica de propagación de la levadura en el proceso de elaboración de cerveza es la gemación (reproducción asexual) (Figura 2), siempre que se den las condiciones idóneas para su crecimiento, como son el oxígeno, los nutrientes del mosto y una temperatura ideal. Pero en condiciones adversas, como la falta de nutrientes, la célula es capaz de recurrir a la reproducción sexual, proceso que implica la producción de esporas sexuales o ascosporas, y que conduce a la activación de otras rutas metabólicas y por lo tanto, a la formación de otros compuestos (White and Zainasheff, 2010; Hill, 2003; Pires and Brányik, 2015).

El crecimiento de la levadura no se desarrolla a una velocidad constante, sino que se pueden diferenciar 4 fases:

La primera, es la fase de latencia, o de adaptación al medio. La levadura empieza a activar los mecanismos necesarios para poder utilizar la amplia variedad de constituyentes del mosto y requiere una cantidad importante de oxígeno disuelto. Desde el punto de vista cervecero, interesa que sea lo más rápido posible ya que cuanto antes arranque la fermentación, impedirá que cualquier otro organismo posible de infección se desarrolle y lo desplace; se produce una selección natural (Briggs, *et al.*, 2004; Pires and Brányik, 2015).

A continuación, empieza la fase exponencial donde el crecimiento celular está acelerado, las células se multiplican por gemación, llegando a multiplicar el volumen de levadura de 4 a 6 veces. En esta fase la levadura tiene su mayor vitalidad y debido a la actividad, el oxígeno empieza a escasear hasta acabarse totalmente y la levadura entra en la fase de fermentación propiamente dicha, en la que transforma los azúcares fermentables (glucosa) en alcohol y dióxido de carbono y se produce un aumento de la temperatura que resulta necesario controlar (White and Zainasheff, 2010).

Al terminar la fermentación, a menudo la levadura se recupera para ser usada en otra fermentación, es decir, puede tener varios ciclos de uso. El objetivo es recuperarla en el



momento de mayor vitalidad, al finalizar la fase exponencial (Briggs, *et al.*, 2004; Pires and Brányik, 2015).

La tercera, es la fase estacionaria, donde el número de microorganismos permanece constante y se establece un equilibrio entre la cantidad de células nuevas y las que mueren. Por último, se alcanza la fase de muerte celular, en la que el número de células que mueren, es mayor que las nuevas que se forman por propagación.

La duración de cada una de las fases de crecimiento viene influenciada esencialmente por la composición del mosto, la temperatura y el estado fisiológico de la levadura. El mosto debe de tener todos los nutrientes necesarios para el crecimiento, siendo decisivos también el valor de pH y la concentración de oxígeno del mosto.

Además del oxígeno, la levadura requiere para su desarrollo de una fuente de energía (azúcares fermentables), una fuente de nitrógeno, factores de crecimiento en forma de vitaminas y grasas e iones inorgánicos (Briggs, *et al.*, 2004; Pires and Brányik, 2015).

1.2.5 Proceso de elaboración

El proceso de elaboración de la cerveza es complejo y requiere de una serie de etapas (Figura 2). En primer lugar se lleva a cabo la elaboración y cocción del mosto, donde se dan las reacciones enzimáticas, seguido de un enfriamiento brusco. Después, el mosto llega a los tanques de fermentación donde se añadirá la levadura. La fase de fermentación es el momento más importante del proceso, ya que es cuando la levadura está trabajando activamente para transformar los azúcares del mosto.

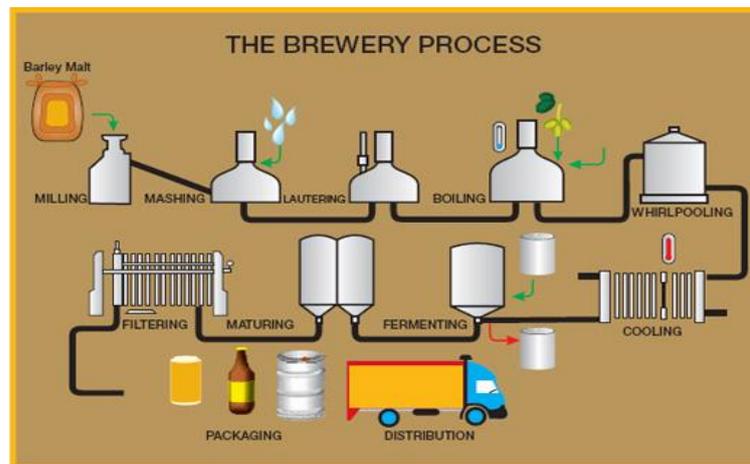


Figura 2 Proceso de elaboración de la cerveza
<https://www.eightdegrees.ie/brewing-process-2/>



Cuando la cerveza termina la fermentación, pasa al proceso de maduración, donde se deja reposar para que adquiera el aroma y sabor característico. El siguiente paso es la filtración, donde se produce una clarificación de la cerveza y tiene por objeto eliminar las proteínas que puedan causar turbidez, así como las células de levadura en suspensión. Por último, se lleva a cabo el envasado en los distintos formatos y pasteurización de la cerveza.

1.3 Parámetros críticos en la fermentación.

Como se ha comentado anteriormente, la fermentación es la etapa más importante del proceso de elaboración de la cerveza, y por ello, hay ciertos parámetros que son críticos para que se pueda llevar a cabo de forma óptima.

La levadura requiere de **fuentes de azúcar** y su actividad dependerá de la composición y la complejidad de éstas. Por lo general, los azúcares más simples son más fermentables que los azúcares más largos y complejos (White and Zainasheff, 2010).

El oxígeno es un factor crítico en el crecimiento de la levadura, y a menudo es un factor limitante. La levadura utiliza el oxígeno para la síntesis de esteroides y para mantener las paredes celulares flexibles (importante para el crecimiento celular y la salud de las células). La aireación del mosto refrigerado es necesaria para promover el crecimiento de la levadura, considerándose 8-10 ppm de oxígeno el nivel mínimo (White and Zainasheff, 2010).

Nutrientes

El mosto le proporciona a la levadura los nutrientes necesarios para su actividad ya que es una excelente fuente de nitrógeno, vitaminas y minerales. Suministra la mayoría de las vitaminas que la levadura necesita para una fermentación adecuada, como la riboflavina, el inositol y la biotina. La levadura también requiere algunos minerales clave, como el fósforo, el azufre, el cobre, el hierro, el zinc, el potasio, el calcio y el sodio. A medida que la levadura absorbe minerales y vitaminas del mosto, comienza a fabricar las enzimas necesarias para el crecimiento y la fermentación (White and Zainasheff, 2010).



Control de temperatura

Existen dos tipos de fermentación: *fermentación alta* y *fermentación baja*. Las cervezas de tipo *Ale* realizan la denominada fermentación alta (la levadura sube a la superficie) y requieren una temperatura comprendida entre 17 y 25 °C. En la cerveza de tipo *Lager*, por el contrario, las levaduras fermentan entre 4°C y 15°C en el fondo del tanque de fermentación. Además, cada cepa de levadura tiene unas temperaturas óptimas de trabajo (Hill, 2003; White and Zainasheff, 2010).

Debido a la diferencia de temperatura de fermentación en ales y lagers, hay una importante diferencia en el perfil sensorial de estas dos cervezas ya que a temperaturas más altas, más rápida es la formación de compuestos y mayor su concentración. Es por ello, que en las cervezas ale, (estilos belgas y británicos) se consideran aromas deseables, incluso imprescindibles determinados aromas como los afrutados o especiados. Por el contrario, en las cervezas tipo lager, que fermentan a temperaturas más bajas, la formación de estos compuestos no se ve tan favorecida, y tienen aromas “más puros” y limpios, sin notas afrutadas o especiadas (White and Zainasheff, 2010).

Cepa de levadura

Cada tipo de cerveza tiene su propio carácter aromático influido por la cepa de levadura empleada y los parámetros establecidos durante la fermentación (Pires and Brányik, 2015).

1.4 Análisis sensorial.

El análisis sensorial es una disciplina científica basada en la evaluación de todas aquellas características de un producto que son susceptibles de ser percibidas a través de los sentidos. Aunque se puede decir que el análisis sensorial comenzó a emplearse como ciencia sistemática en los años 40, el ser humano lleva evaluando y clasificando productos según criterios sensoriales desde tiempos inmemoriales (Bamforth, 2017; Sone, *et al.*, 2009).

A diferencia de otros métodos de prueba, que utilizan diversos instrumentos o equipos, la evaluación sensorial es realizada por individuos y se basa en su percepción sensorial. Es importante recalcar que, como en toda ciencia, las mediciones han de ser llevadas a cabo de forma precisa y rigurosa para obtener datos fiables y todas las sensaciones pueden ser



evaluadas ya sea por un consumidor o por un panel de catadores (Bamforth, 2017; Muresan *et al.*, 2014).

La evaluación sensorial es un método común en la evaluación de la cerveza, y hay cuatro aspectos diferentes que están bajo escrutinio: apariencia, aroma, sabor y sensación en la boca. La evaluación de la apariencia de una cerveza incluye notas sobre su color, la claridad y su espuma. Cuando se evalúa el aroma, hay una amplia gama de características que se presentan para la evaluación. También hay defectos de elaboración que pueden ser detectados en el aroma. En el sabor de la cerveza se combina su sabor y sus aromas y es igualmente complejo. El aspecto final de la evaluación sensorial, la sensación en boca, se relaciona con la textura de la cerveza. Se toman notas sobre su peso y cuerpo, así como sobre otras posibles sensaciones como el calor o la astringencia. Los niveles de carbonatación y la textura de la carbonatación también juegan un papel importante en la sensación en boca de una cerveza (Bamforth, 2017; Hughes, 2009; Muresan *et al.*, 2014).

El primero de los sistemas para la evaluación de la cerveza, fue desarrollado en 1975 y estaba basado en la asignación de una puntuación de unidades de flavor (UFs) a cada uno de los constituyentes de flavor de la cerveza. Las unidades de flavor se definen como la relación entre la concentración de un compuesto y su umbral de reconocimiento. Todos aquellos componentes de una cerveza que tuvieran UFs superiores a “2.0” serían los constituyentes primarios, y si no estuvieran presentes en el producto, el perfil de flavor del mismo se vería gravemente modificado. Algunos constituyentes primarios comunes a todas las cervezas serían el amargor y el dióxido de carbono. Los constituyentes secundarios serían aquellos que tienen UFs comprendidas entre “0.5” y “2.0”, y constituyen una parte primordial del sabor de una cerveza, ya que son los que le conferirán características propias al actuar en conjunto. Por último estarían los constituyentes terciarios, con UFs comprendidas entre “0.1” y “0.5” y que son responsables de notas muy sutiles, pero que contribuyen al flavor del producto (Bickham, 1997; Meilgaard, *et al.*, 1979; Meilgaard, 1993; Sone, *et al.*, 2009). El segundo de los sistemas se basó en la rueda de flavor de Meilgaard (Figura 3) (Meilgaard, *et al.*, 1979), desarrollada en los años 70, cuyo principal objetivo es estandarizar el lenguaje del análisis sensorial de cerveza. Esta rueda agrupa los principales sabores de la cerveza en



14 categorías. Es un léxico desarrollado para el análisis descriptivo de los productos, por lo que las categorías no se agrupan en cuanto a opiniones subjetivas como si es un aroma “bueno” o “malo” ((Meilgaard, *et al.*, 1979; Schmelzle, 2009).

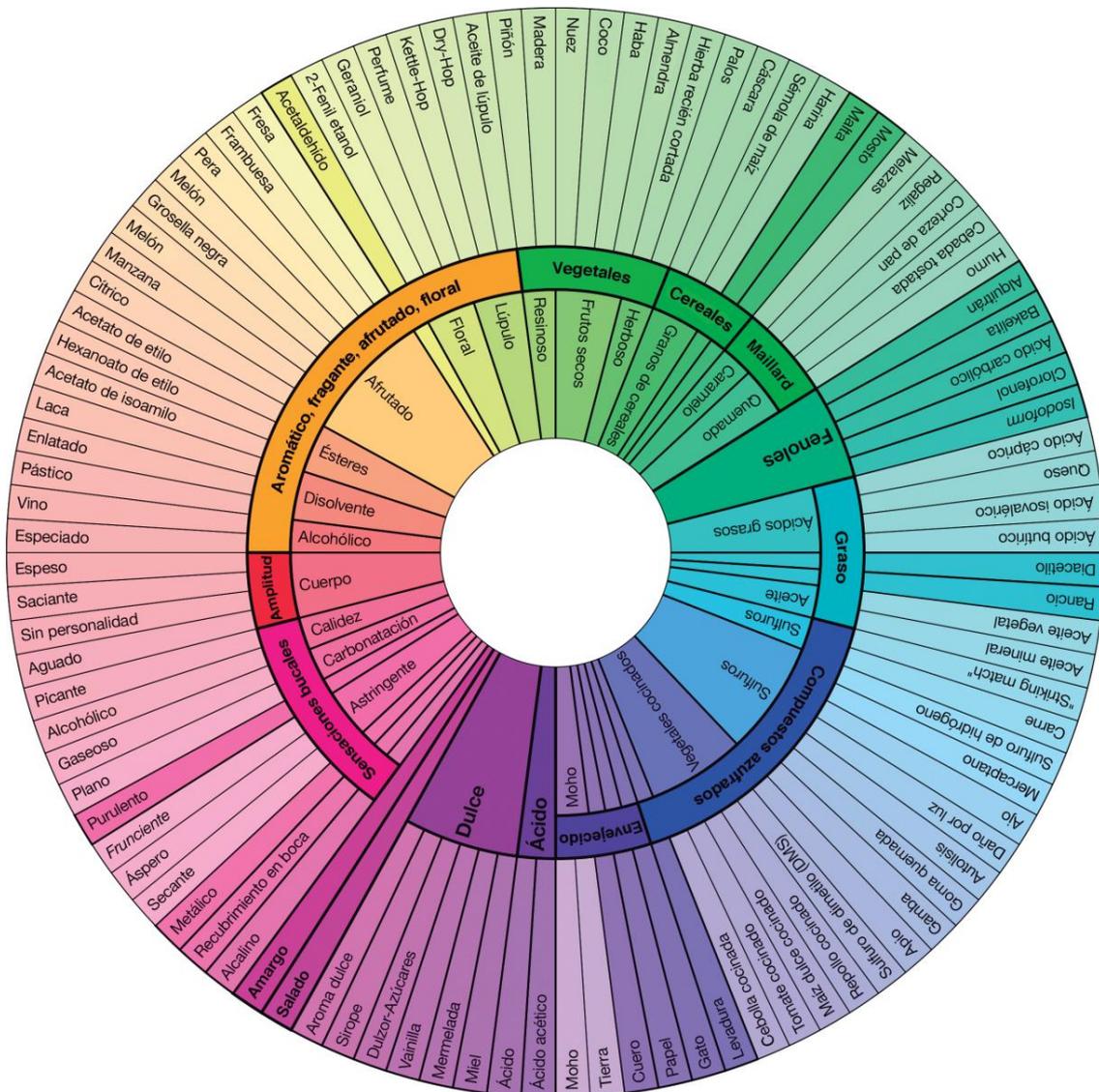


Figura 3 Rueda de flavor de Meilgaard "Beer flavor wheel" (Meilgaard *et al.* 1979).

1.5 Subproductos de la fermentación.

Las levaduras, durante el proceso de elaboración de cerveza, producen más de 500 compuestos químicos y éstos pueden impactar tanto negativa como positivamente en las características organolépticas de la cerveza. En los últimos años, y en particular gracias al



avance de la biología molecular y la genómica, se han logrado progresos notables en el conocimiento de las bases moleculares y celulares de la síntesis y regulación de muchos de los compuestos que inciden directamente en la calidad de la cerveza y en lo que se denomina flavor (aroma y sabor), es decir, el conjunto de moléculas que definen el perfil sensorial de la cerveza (Loviso and Libkind, 2018).

Todos los componentes que influyen en el perfil de flavor de la cerveza deben mantenerse dentro de ciertos límites, ya que, un solo compuesto o grupo de compuestos puede modificar o deteriorar el equilibrio del sabor. Además, los compuestos aromáticos como los ésteres pueden actuar en sinergia con otros componentes que afectan el sabor/aroma de la cerveza en concentraciones muy por debajo de su valor umbral (Loviso and Libkind, 2018; Meilgaard, *et al.*, 2000).

Los alcoholes superiores, los ésteres y las dicetonas vecinales (VDK) son compuestos producidos por la levadura, que influyen en la calidad final de la cerveza. Mientras que los alcoholes y ésteres superiores son hasta cierto punto componentes volátiles deseables, los VDK (diacetilo y pentanodiona) a menudo se consideran como sabores desagradables. Además, el metabolismo de la levadura contribuye a la formación y conversión de los ácidos orgánicos, los compuestos de azufre y aldehídos (Tabla 1).

Las rutas metabólicas centrales para la formación de alcoholes superiores, ésteres y diacetilo (Figura 4) se inician cuando la glucosa, que se encuentra en el mosto, entra en la célula de la levadura y es fosforilada por las hexoquinasas (Hxk 1/2). La glucosa-6-fosfato, ingresa a la vía glucolítica que la divide en dos moléculas de piruvato. Posteriormente, el piruvato entra en la mitocondria donde se oxida en el complejo de la piruvato deshidrogenasa para formar acetil coenzima A (acetil-CoA). Aún en la mitocondria, el acetil-CoA directa o indirectamente a través de intermedios del ciclo del ácido cítrico originará la mayoría de los aminoácidos a través de la síntesis *de novo*. En paralelo, tiene lugar otra vía biosintética de aminoácidos (isoleucina, leucina, valina - ILV) a través de la unión de dos moléculas de piruvato para formar α -acetolactato. Esta primera reacción es catalizada por la enzima codificada por *ILV2*: acetohidroxiácido sintasa (Ahas). La segunda reacción en la vía de ILV es catalizada por la acetohidroxiácido reductoisomerasa (Ahar) codificada por *ILV5*. La



acumulación de α -acetolactato dentro de las mitocondrias dificulta la actividad de la enzima codificada por *ILV5*, y por lo tanto, la levadura la excreta.

Tabla 1 Compuestos más influyentes en el perfil de la cerveza. Adaptado de Kishimoto, et al., 2018.

Compuesto	Atributo/Descriptor
Acetato de Isoamilo	Plátano
Hexanoato de etilo	Afrutado, manzana
Propionato de etilo	Afrutado, manzana
Butirato de etilo	Afrutado, piña, tropicales
Acetaldehído	Manzana golpeada, sidra, manzana seca
Benzaldehído	Almendra amarga, cereza
Limonene	Afrutado, cítrico, limón
Decanal	Naranja
b-Phenylethyl acetate	Manzana, afrutado, ácido
Octanoato de etilo	Manzana, dulce, afrutado
Acetato de etilo	Afrutado, piña, quitaesmalte, disolvente
Furaneol	Caramelo
2,3-butanediona - Diacetilo	Mantequilla, dulce
2,3-pentanediona	Toffee, mantequilla
Dimethyl sulfide (DMS)	Tomate, maíz cocinado
2-Acetylpyridine	"Malty"
Eugenol	Especiado, clavo de olor
4-Vinyl guaiacol	Fenólico, especiado
Etanol	Alcohol
n-Propanol	Alcohol dulce
Isobutanol	Alcohol, disolvente
Amyl alcohol	Alcohol, disolvente
Linalool	Floral
Geraniol	Floral, rosas
Furfural	Almendra, pan
Guaiacol	Ahumado
Methional	Patata, autólisis levadura
Methanethiol	Mercaptano, alcantarilla
E-2-Nonenal	Papel, cartón mojado, oxidado

Fuera de la célula, el α -acetolactato se descarboxila espontáneamente para formar diacetilo, compuesto que produce olor a mantequilla en la cerveza. Los alcoholes superiores se forman a través de la vía de Ehrlich, ya sea a partir de aminoácidos absorbidos (a través de permeasas) o de aquellos que surgen de la biosíntesis *de novo*.



El acetil-CoA citosólico se origina a partir del exceso de citrato formado dentro de las mitocondrias. Por lo tanto, fuera del orgánulo, el citrato se convierte en acetil-CoA y oxalacetato. Luego, en el citosol, el acetil-CoA se puede condensar enzimáticamente (mediante alcohol acetiltransferasas-AAT) con un alcohol superior para formar ésteres de acetato. Los ésteres etílicos se forman a través de una reacción de condensación entre una unidad acil-CoA y etanol, catalizada por dos acil-CoA: etanol O-aciltransferasas (AEAT) (Pires and Brányik, 2015).

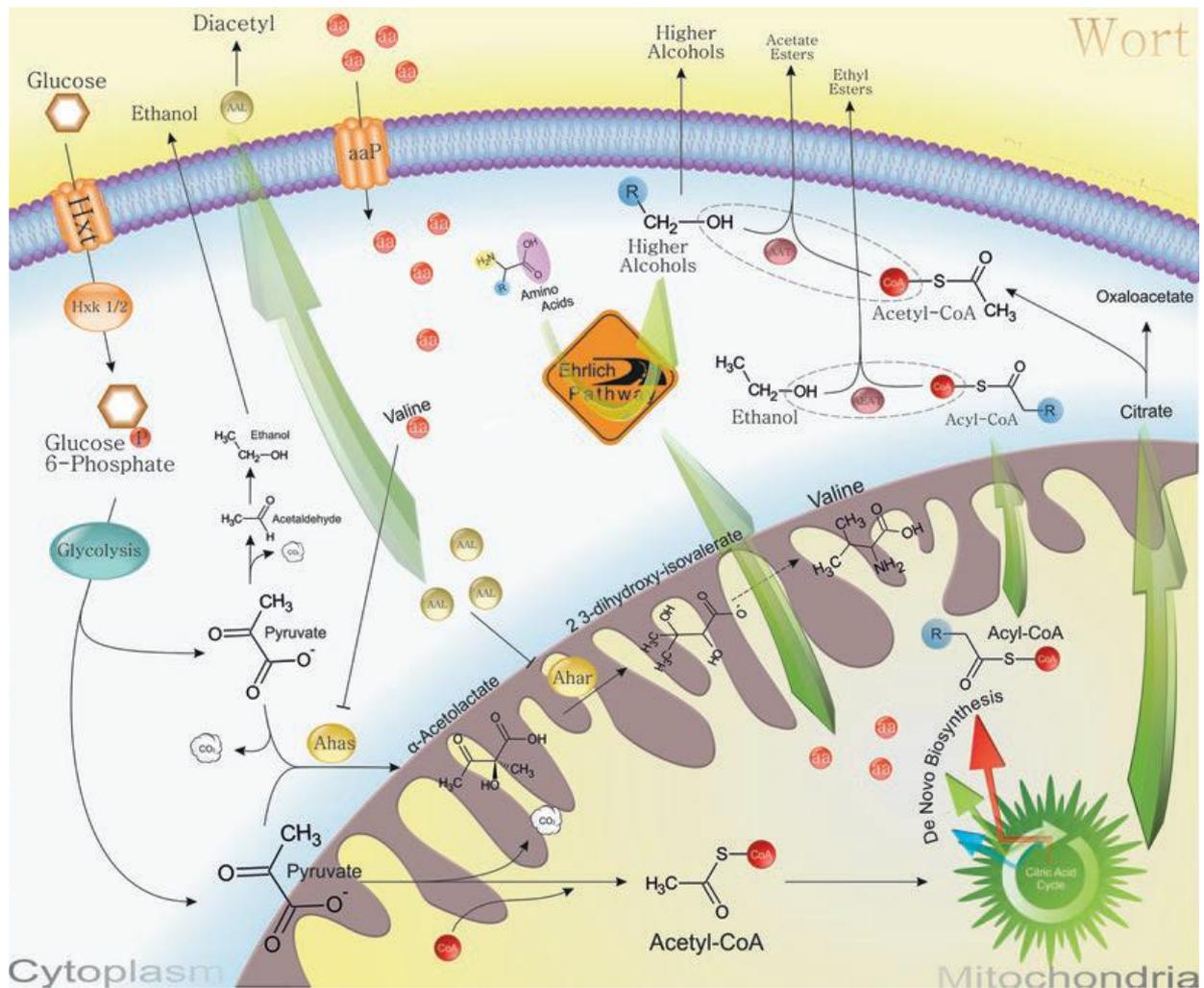


Figura 4 Esquema de las rutas metabólicas centrales para la formación de alcoholes superiores, ésteres y diacetilo. (Pires and Brányik, 2015).



Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores tales como el n-propanol, el alcohol isoamílico y el isobutanol aportan sabores cálidos, picantes o solventes a la cerveza dependiendo del tipo y concentración. De los alcoholes superiores, la cerveza principalmente contiene alcoholes de amilo, como el alcohol isoamílico (Pires and Brányik, 2015).

Durante la fase de latencia de la fermentación, las levaduras comienzan a formar alcoholes superiores, ya sea a partir de piruvato y acetyl-CoA durante la síntesis de aminoácidos o a partir de la absorción de aminoácidos. La formación de alcoholes superiores implica la reoxidación de NADH a NAD⁺ en el paso final, y se intuye que la levadura produce los alcoholes para obtener NAD⁺ y tener disponibilidad de nuevo para la glicólisis (Pires and Brányik, 2015).

La concentración de alcoholes producidos, aumenta con la temperatura de fermentación, por lo que la cantidad final vendrá determinada por la cepa de levadura utilizada (fermentación alta o baja). Sin embargo, las condiciones de fermentación también tienen un efecto en la producción de alcoholes superiores, ya que las condiciones de fermentación que promueven el crecimiento celular, como la temperatura, la aireación y el nitrógeno, dan lugar a niveles más altos de alcoholes. Cuando hay más sustrato de alcoholes, hay una mayor oportunidad de formación de ésteres con cualquier acetyl-CoA presente (Pires and Brányik, 2015).

Dicetonas vecinales

El diacetilo es un pequeño compuesto orgánico que pertenece al grupo químico de las cetonas. Otra cetona muy similar al diacetilo, es la 2,3-pentanediona. Los niveles de dicetona vecinal incluyen tanto el diacetilo como el 2,3-pentanediona

Por lo general, el diacetilo, se considera un defecto que le da a la cerveza un aroma a mantequilla o a caramelo, y su presencia suele ser un indicador de un posible problema durante la fermentación o de contaminación.

La vía para producir el diacetilo es relativamente simple. La valina es uno de los aminoácidos que la levadura produce durante la fase de retardo y exponencial, y uno de los compuestos intermedios es el acetolactato. No todos los productos de levadura de acetolactato se convierten en valina, ya que algunos salen de la célula hacia el medio y se oxidan



químicamente en diacetilo. Afortunadamente, la levadura reabsorberá el diacetilo y lo reducirá a acetoína para regenerar NAD.

Ácidos orgánicos

Durante la fermentación, la levadura también produce diferentes niveles de ácidos orgánicos, tales como acético, láctico, butírico y caproico. Estos ácidos tienen sabores y aromas indeseados como descripciones de vinagre, vómito y animales de corral. Sin embargo, estos ácidos son necesarios en etapas intermedias ya que desempeñan un papel clave en la formación de ésteres (Bamforth, 2001; Denby *et al.*, 2018; Pires and Brányik, 2015).

Compuestos del azufre

La levadura produce compuestos de azufre en grandes cantidades durante la fermentación, pero estos compuestos generalmente son lo suficientemente volátiles como para que el CO₂ liberado de la fermentación los transporte, reduciendo en gran medida los niveles de azufre (Bamforth, 2001; Denby *et al.*, 2018).

Los compuestos de azufre que se encuentran típicamente en la cerveza son el sulfuro de dimetilo (DMS), dióxido de azufre, sulfuro de hidrógeno y mercaptanos. Algunos de estos compuestos de azufre proceden de la malta, mientras que otros proceden de la levadura o de una combinación de ambas.

En el caso del DMS, que se forma por la reducción del dimetil sulfóxido (DMSO) por parte de la levadura, aporta sabores de maíz en lata y repollo cocido en la cerveza.

Las levaduras producen dióxido de azufre, que no sólo da sabor a la cerveza, sino que también le confiere propiedades antioxidantes. La gente a menudo describe el aroma del dióxido de azufre como similar a un fósforo quemado. El dióxido de azufre se reduce fácilmente a otro compuesto de azufre, el sulfuro de hidrógeno, que es el compuesto con un olor a huevo podrido (Hughes, 2009; Pires and Brányik, 2015).

Fenoles

Los compuestos fenólicos, que son anillos de carbono aromáticos hidroxilados, pueden provenir de las materias primas o de la fermentación. Se describen organolépticamente como medicinales, plásticos, tiritas, ahumados y picantes. Son menos volátiles que los alcoholes



superiores, lo que significa que permanecen en la cerveza durante el envejecimiento. En la mayoría de los estilos de cerveza, los sabores fenólicos son un defecto (Saerens *et al.*, 2010). El principal compuesto fenólico que producen la mayoría de las levaduras es el 4-vinil guaiacol (4 VG). La levadura produce 4 VG a partir de la descarboxilación del ácido ferúlico suministrado por la malta y el lúpulo, gracias a la enzima ácido ferúlico descarboxilasa. Las levaduras que producen fenoles tienen un gen fenólico intacto (*POF*), que es necesario para codificar la ácido ferúlico descarboxilasa, si bien, la mayoría de las cepas de levadura de cerveza tienen una mutación natural en el gen *POF* que les impide producir 4 VG (Roberts, 2016; Saerens *et al.*, 2010).

Ésteres

Los ésteres constituyen el conjunto más importante de los compuestos producidos por la levadura. Son muy volátiles y los responsables del aroma afrutado, dulce y perfumado muy deseado en algunos tipos de cerveza como las Belgas (Saerens *et al.*, 2010; Verstrepen *et al.*, 2003a; Kishimoto *et al.*, 2018).

Existen dos categorías principales de ésteres que influyen en la cerveza: los ésteres de acetato, como el acetato de etilo (aroma similar al del disolvente), el acetato de isoamilo (aroma de plátano), el acetato de isobutilo (aroma afrutado) y el acetato de fenilo etílico (rosas, miel). El segundo grupo comprende los ésteres etílicos de los ácidos grasos de cadena media, que incluye el hexanoato de etilo (anís, aroma similar al de las manzanas) y el octanoato de etilo (aroma a manzanas ácidas) (Holt, 2019; Loviso and Libkind, 2018; Saerens *et al.*, 2010; Verstrepen *et al.*, 2003a).

De estos dos grupos, los ésteres de acetato han recibido más atención y los genes involucrados en su síntesis se han descubierto antes, porque se producen en niveles mucho más altos y por lo tanto son más fáciles de medir y más influyentes en el producto final (Saerens *et al.* 2010).

Con su distintivo sabor a banana, el acetato de isoamilo es el éster de acetato más influyente, presente en la mayoría de las cervezas y objetivo del desarrollo que se realizará en este trabajo de fin de máster.



1.5.1 Regulación de la síntesis de ésteres de acetato: Expresión de la alcohol acetil transferasa.

Los ésteres juegan un papel fundamental en la calidad sensorial de la cerveza y se sintetizan a través de varias vías metabólicas complejas. Es por ello que es de gran importancia conocer y entender la síntesis y regulación de estos compuestos producidos por la levadura.

La alcohol acetil transferasa I y II (AATasa I y II; EC 2.3.1.84), codificada por los genes *ATF1* y *ATF2*, catalizan la síntesis de ésteres de acetato (Loviso and Libkind, 2018; Saerens *et al.*, 2010; Verstrepen *et al.*, 2003b).

Los niveles de expresión de *ATF1* y *ATF2* afectan en gran medida a la producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo. Además, Atf1p y Atf2p son también responsables de la formación de una amplia gama de ésteres menos volátiles, como el acetato de propilo, acetato de isobutilo, acetato de pentilo, acetato de hexilo, acetato de heptilo, acetato de octilo y acetato de feniletilo. Atf2p parece jugar un papel menor comparado con el Atf1p en la síntesis de ésteres (Verstrepen *et al.*, 2003b). De hecho, las cepas de levadura que sobreexpresan el gen *ATF1*, producen hasta 30 veces más acetato de etilo y hasta 180 veces más acetato de isoamilo que las células silvestres (Verstrepen *et al.*, 2003b).

La sobreexpresión de los alelos de *ATF1* y *ATF2* en diferentes cepas de levaduras, conducen a diferentes tasas de producción de ésteres, lo que indica que las diferencias en los perfiles aromáticos producidos por las cepas de levadura pueden deberse, al menos parcialmente, a mutaciones específicas en sus genes *ATF* (Saerens *et al.*, 2010).

Básicamente, hay tres factores importantes que influyen en la tasa de formación de ésteres de acetato: la concentración de los dos sustratos, acetil-CoA y un alcohol, y la actividad total de las enzimas implicadas en la formación y descomposición del éster respectivo (Saerens *et al.*, 2010). Mientras que las concentraciones de sustrato ciertamente influyen en la producción de ésteres de acetato, en general los niveles de expresión de las conocidas acetiltransferasas *ATF1* y *ATF2* son el factor más importante que determina los niveles de ésteres de acetato durante la fermentación (Saerens *et al.*, 2010).

En la industria cervecera se conoce que las variables de la fermentación como la cepa de levadura utilizada, la composición del medio de fermentación, el oxígeno disuelto y las condiciones de fermentación, afectan a la producción de ésteres por parte de las levaduras.



La influencia de las diferentes concentraciones de sustrato en la producción de ésteres de acetato puede explicarse por los mecanismos de regulación. Se sabe que el contenido total de azúcar del medio, que se refleja en la gravedad específica de las fermentaciones de la cerveza, junto con la cantidad óptima de nitrógeno disponible en el medio, tiene una influencia positiva importante en la producción de ésteres (Saerens *et al.*, 2010).

En 1997, Fujii *et al.* demostraron que la expresión del gen *ATF1* está directamente reprimida por los ácidos grasos insaturados (AGU) y el oxígeno. Se demostró que los AGU y el oxígeno reprimen la transcripción *ATF1* por una vía reguladora diferente y que la transcripción *ATF1* es corregida por el mismo mecanismo que el gen *OLE1* en respuesta a los AGU (Fujiwara *et al.*, 1998). La represión de la expresión de *ATF1* por el oxígeno está principalmente mediada por el complejo represor hipóxico Rox1-Tup1-Ssn6 mientras que la represión por parte de los AGU está regulada a través de un elemento de respuesta de bajo contenido de oxígeno. Este elemento promotor se activa en condiciones hipóxicas y es reprimido selectivamente por los AGU.

La transcripción de *ATF1* se induce por la adición de glucosa, regulada por la vía de señalización de nutrientes Ras/cAMP/PKA, y por la adición de maltosa y compuestos de nitrógeno a través de la vía de crecimiento en medio inducido. La expresión *ATF1* también está influenciada por el etanol y el estrés térmico (Saerens *et al.*, 2010; Verstrepen *et al.*, 2003b).

Los ésteres aromatizantes se forman en el interior de la célula durante la fermentación y se difunden a través de la membrana plasmática hasta el medio ya que son liposolubles. A diferencia de la difusión de ésteres de acetato, que es rápida y completa, la transferencia de ésteres etílicos al medio de fermentación depende de su composición y disminuye drásticamente con el aumento de la longitud de la cadena (Saerens *et al.*, 2010).

1.6 Herramientas avanzadas de genética en el desarrollo de la cerveza.

Aunque hoy en día la ingeniería genética no está aceptada por el consumidor en la industria alimentaria, es de vital importancia conocer los mecanismos que regulan el metabolismo de la levadura, así como la producción o degradación de compuestos. Es necesario el estudio y



conocimiento de los factores que pueden influir para desarrollar nuevas formulaciones o prever el resultado antes de realizar ese cambio de forma experimental.

La ingeniería genética de la levadura ha demostrado ser una herramienta poderosa para la ciencia del sabor. Una combinación de estos nuevos métodos nos permitirá entender el mecanismo de la formación del sabor en mayor detalle y controlar el sabor de la cerveza para contribuir a la satisfacción del consumidor (Sone, *et al.*, 1999).

Dentro de las diferentes técnicas disponibles hoy en día, uno de los métodos utilizados para la modificación genética de la levadura es a través de la recombinación homóloga (Figura 5), que será la base para el trabajo experimental que se presenta a continuación.

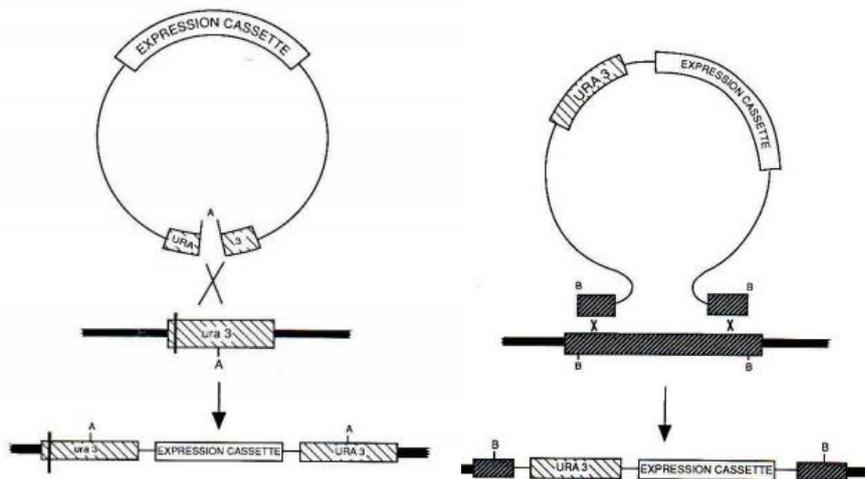


Figura 5 Integración cromosómica de ADN por recombinación homóloga

La recombinación homóloga se define como el intercambio recíproco de información genética entre dos moléculas de ADN idénticas y ha sido ampliamente estudiada en bacterias como *Escherichia coli* y la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Hoy en día es posible realizar una modificación genética de estos microorganismos con eficiencia y relativa facilidad (Santoyo, 2008).



2. Objetivos

El objetivo de este trabajo es tratar de alterar el perfil de las moléculas influyentes en las propiedades organolépticas de la cerveza mediante la sobreexpresión de un gen de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Para ello se proponen los siguientes objetivos específicos:

- Inducir, mediante técnicas de biología molecular, la sobreexpresión del gen *ATF1* vinculado a la generación de algunos ésteres, en una cepa de laboratorio de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.
- Evaluar la producción de acetato de isoamilo y acetato de etilo, así como otros parámetros de la levadura modificada.
- Estudiar la capacidad de un panel de cata entrenado, para evaluar la alteración del perfil organoléptico provocado con la modificación genética ensayada.



3. Materiales y métodos

3.1 Materiales

3.1.1 Líneas celulares

- *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 [*pep4: HIS3, prb-Δ1.6R HIS3, lys2-208, trp1-Δ101, ura 3-52, gal2, can1*] (Eastman Kodak Company).
- *Escherichia coli* XL1-Blue [*recA1 endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac* [*F'proAB lacIqZDM15 Tn10 (Tetr)*]], (Stratagene Cloning Systems).

3.1.2 Enzimas

- *NruI* (casa TAKARA).
- *SalI* (de NZYTech).
- *BamHI* (de NZYTech).

3.1.3 Plásmido

- YE_pFLAG1 [*amp^r ori 2μ FLAG TRP1*] (Eastman Kodak Company) (Figura 7).

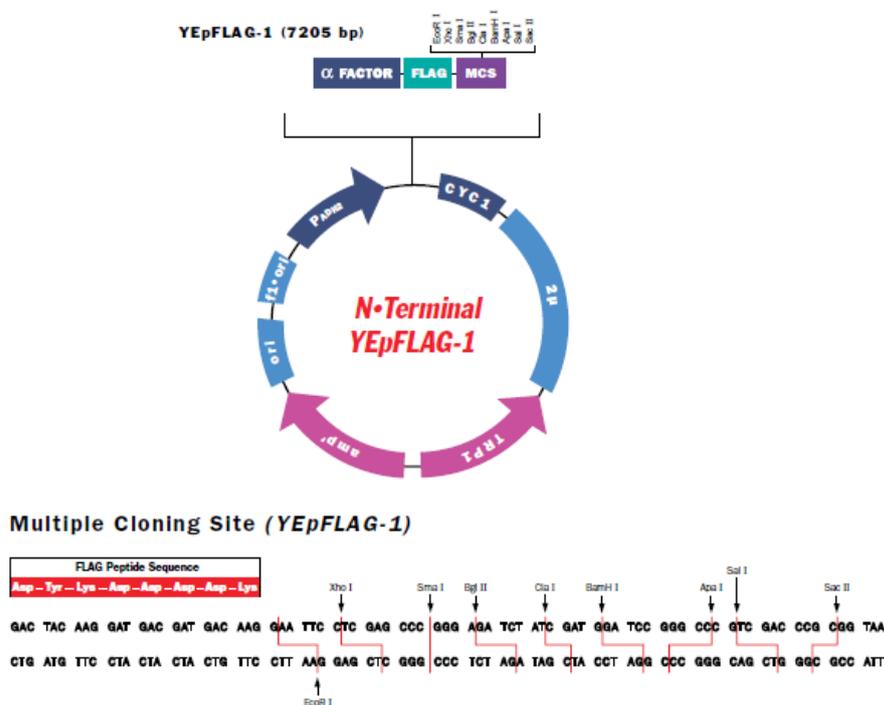


Figura 6 Vector de clonación YE_pFLAG1 empleado para expresar el gen ATF1.
Sigma Aldrich <https://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/docs/Sigma/Vector/e9020vec.pdf>



3.1.4 Medios de cultivo y su composición

- Medios de cultivo para levaduras:

Para crecimiento de levaduras, se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

- YPD 2% (Yeast Peptone Dextrose)

Bacto peptona	2%
Bacto-Yeast Extract	1%
Glucosa	2%

- CM (Medio Completo) 200 mL

Glucosa	4 g
Histidina	8 mg
Adenina	8 mg
Uracilo	8 mg
Tirosina	8 mg
Leucina	8 mg
Triptófano	6 mg
Mezcla de aminoácidos (200X)*	1 mL
Agua destilada	185,2 mL
YNB (Yeast Nitrogen Base)**	13,4 mL

Mezcla de aminoácidos 200X:*

	Para un litro:
Arginina, Metionina, Treonina.	2 g (cada aminoácido)
Isoleucina, Fenil-alanina	12 g (cada aminoácido)
Lisina	8 g



YNB**:

	Para un litro:
Mezcla de vitaminas 300X***	50 ml
Sales traza 150X****	100 ml
Sulfato amónico ⁽¹⁾	75 g
KH ₂ PO ₄	15 g
MgSO ₄	7,5 g
NaCl	1,5 g
CaCl ₂	1,5 g

⁽¹⁾Se añadió después de disolver el resto de los componentes para evitar que precipite.

*Mezcla de vitaminas 300X***:*

*Sales traza 150X****:*

	Para un litro:
Biotina	0,6 mg
Pantotenato cálcico	120 mg
Ácido fólico	0,6 mg
Inositol	600 mg
Niacina	120 mg
p-Aminobenzoico	60 mg
Piridoxina	120 mg
Riboflavina	60 mg
Tiamina	120 mg

	Para un litro:
Ácido bórico	75 mg
Sulfato cúprico	6 mg
Ioduro potásico	15 mg
Cloruro férrico	30 mg
Sulfato manganeso	60 mg
Molibdato sódico	30 mg
Sulfato de zinc	60 mg

● YPHSM

Bacto peptona	8%
Extracto de levadura	1%
Glucosa	1%
Glicerol	3%

Para la selección de recombinantes así como para el crecimiento de los transformantes obtenidos bajo presión de selección se utilizó el siguiente medio de cultivo:



● CM -trp (Medio mínimo)	1 Litro
<hr/>	
Mezcla de Aminoácidos 200 X	5ml
Histidina, Leucina, Uracilo, Adenina y Tirosina	40 mg/ml
Dextrosa	2%
YNB (Yeast Nitrogen Base)	67 ml
<hr/>	

- Medios de cultivo para bacterias:

Para el crecimiento de bacterias se utilizaron los siguientes medios de cultivo:

● LB (Luria-Bertani)

Bacto triptona	1%
Bacto Yeast Extract	0,5%
NaCl	0,5%
Dextrosa	0,1%
<hr/>	

● LBA (Luria-Bertani con Ampicilina)

Bacto triptona	1%
Bacto Yeast Extract	0,5%
NaCl	0,5%
Dextrosa	0,1%
Ampicilina	0,01%
<hr/>	

Todos los medios de cultivo se prepararon en agua destilada, añadiendo 1,5% de agar cuando se necesitó preparar medios sólidos. Así mismo, todos los medios se esterilizaron en un autoclave durante 20 minutos a 121°C y 2 Ba de presión.

3.2 Métodos

3.2.1 Extracción del DNA genómico

Para la extracción del DNA genómico de la cepa de levadura *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 se utilizó el protocolo de aislamiento rápido de DNA cromosómico de levadura (Maniatis, *et al.*, 1989).



Se preparó un cultivo de 10 ml de levadura en medio YPD y se dejó crecer una noche. Una vez crecido el cultivo se inició el protocolo de extracción centrifugando durante 5 min a 4.000 rpm, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 500 microlitros de agua para lavar las células y eliminar restos de medio de cultivo. Se transfirió a un tubo eppendorf y se centrifugó durante 10 segundos a 13.000 r.p.m. A continuación, se eliminó el sobrenadante y se resuspendieron las células con pipeta en 200 microlitros de *Breaking Buffer**. Se añadieron 0,3 g de perlas de diámetro pequeño y 200 microlitros de fenol cloroformo. Se agitó en vórtex 3 minutos a velocidad baja (15-20 Hertz) lo suficiente para conseguir la rotura de las células pero intentando no fragmentar el DNA cromosómico.

A continuación, se añadieron 200 microlitros de Buffer 1xTE (Tris-HCl 10 mM, pH 7,5 y EDTA 1mM) y se agitó en vórtex brevemente durante 4 segundos aproximadamente.

Se centrifugó durante 5 min a 13.000 r.p.m y se transfirió el sobrenadante a un tubo limpio. Se añadió 1 ml de etanol 95%, se mezcló por inversión y se dejó enfriar 10 minutos en hielo. Por último, se centrifugó durante 5 min a 13.000 r.p.m, se eliminó el sobrenadante y se lavó con Etanol 70%. Se centrifugó de nuevo, se eliminó el sobrenadante y se resuspendió en 100 microlitros de agua bidestilada.

**Breaking Buffer* (para 10 ml, con soluciones stock de laboratorio):

-2% (v/v) Triton X-100 (200 microlitros Triton X-100).

-1% (v/v) SDS (500 microlitros SDS 20%).

-100 mM NaCl (200 microlitros NaCl 5M).

-10 mM Tris-ClH, pH 8.0 (100 microlitros Tris-ClH 1M, pH 8.0).

-1 mM EDTA, pH 8.0 (20 microlitros EDTA 0.5M pH 8.0).

(Para 10 ml: añadir 8,80 ml de H₂O_{bd}).

3.2.2 Amplificación del gen *ATF1* mediante PCR

Se utilizó como molde el DNA genómico extraído de *Saccharomyces cerevisiae* BJ3505 para amplificar el gen *ATF1*, que codifica para la alcohol acetil transferasa, mediante PCR y para ello se utilizaron los siguientes *primers* de la casa comercial *STABVIDA*.



FORWARD:

CTATATCGTAATACACCAAGCTCGACCTCGCGATGAATGAAATCGATGAGAA

Cola de recombinación del plásmido YE_pFLAG1

20 primeros nucleótidos inicio del gen *ATF1*

REVERSE:

TGGGACGCTCGACGGATCAGCGGCCGCTTACTAAGGGCCTAAAAGGAGAG

Cola de recombinación del plásmido YE_pFLAG1

20 últimos nucleótidos del gen *ATF1*

En el forward se escogió la zona de recombinación de forma que se eliminó la señal de secreción del factor alfa de la levadura ya que no es necesaria la secreción del producto del gen, y también la etiqueta FLAG para la purificación de la proteína.

El reverse se diseñó para que la recombinación se produzca en el comienzo de la región de terminación *CYC1* del plásmido.

Protocolo de la PCR

Se amplificó mediante PCR el gen de la Alcohol acetil transferasa, *ATF-1* (Gene ID: 854559), de 1578 pb.

Para llevar a cabo la PCR se preparó 1 μ L de ADN genómico de la levadura (20 ng), y se incubó con 3 μ L de cada uno de los cebadores (a una concentración de 10 pMoles/ μ L), 2 μ L de dNTPs 0,25 mM, 4 μ L de tampón 5X de la polimerasa y se le añadieron 5 μ L de agua destilada hasta volumen final de 20 μ L teniendo en cuenta que faltarían por agregar 2 μ L de la DNA polimerasa de alta fidelidad (Phusion High Fidelity DNA polymerase de *ThermoFisher Scientific*).

Se llevó a cabo una PCR de 30 ciclos, dividida en un primera etapa inicial de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos y a continuación, 30 ciclos de desnaturalización a 94°C durante 1 minuto, seguido de hibridación a 65°C durante 1 minuto, con la posterior elongación del cebador a 72° C durante 1 minuto y por último se realizó una elongación final a 72°C durante 10 minutos.



Después, se realizó una purificación del producto de la PCR para eliminar los restos de cebadores y nucleótidos que pudieran quedar, y para ello se siguieron las instrucciones del GeneJET Gel Extraction Kit de la casa comercial *ThermoFisher*.

El resultado de la PCR se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa.

3.2.3 Técnicas electroforéticas

Se prepararon geles con agarosa al 0,7%, utilizando el tampón Tris-EDTA-Acetato (Tris 0,04 M, EDTA 1mM, acetato sódico 20 mM, ácido acético 30 mM). Las electroforesis se realizaron a un voltaje de unos 60 mV por espacio de 1 hora aproximadamente. Como referencia de tamaños se utilizó el marcador de peso molecular GeneRuler 1 Kb DNA Ladder (*ThermoFisher Scientific*). La composición del tampón de carga 10x fue la siguiente: 0,25% de azul de bromofenol, 0,25% de xilen-cianol y 30% de glicerol en 1xTE. Como agente intercalante para teñir los ácidos nucleicos se empleó el GelGreen de la casa comercial *Biotium*. Para visualizar las muestras se utilizó el aparato Gel Doc XR+ System (*BioRad*).

3.2.4 Extracción del DNA plasmídico de bacterias y levaduras

Para obtener gran cantidad del vector YEpFLAG1 es necesario extraerlo de las células bacterianas que lo portan, para ello se utilizó el kit GeneJet Plasmid Miniprep Kit de *ThermoFisher Scientific* siguiendo las instrucciones del proveedor. Este mismo kit se empleó para la obtención de los plásmidos recombinantes de las células de levadura.

Una vez extraído el vector YEpFLAG1, se procedió a linearizarlo con las enzimas de restricción *NruI* (TAKARA) y *Sall* (de NZYTech) utilizando el tampón recomendado por la casa comercial NZYTech que da máxima eficiencia de corte para ambas enzimas. A continuación, se comprobó mediante electroforesis en gel la correcta digestión del plásmido (Ver apartado 3.2.3 Técnicas electroforéticas).

3.2.5 Transformación de bacterias y levadura

3.2.5.1 Transformación de bacterias

Para la preparación de células competentes de bacterias, las células se cultivaron en 100 ml de medio SOC (bactotripton 2%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 10 mM y KCl 2,5 mM) hasta que alcanzaron una A600 de 0,6, momento en el que se paró el crecimiento enfriando



el matraz en hielo durante unos 10 minutos. A continuación, se centrifugaron a 4°C a 5.000 r.p.m. durante 5 minutos. Al sedimento celular se le añadieron 30 ml de tampón Tfb-1 (Cl₂Rb 100 mM, Cl₂Mn 50 mM, acetato potásico 30 mM, Cl₂Ca 10 mM y glicerol 15%, pH 5,8) en frío. Se volvió a centrifugar, se resuspendieron las células en 4 ml de tampón Tfb-2 (MOPS 10 mM pH 7, Cl₂Rb 10 mM, Cl₂Ca 75 mM y glicerol 15%) y se repartieron en alícuotas para congelarlas a -80°C. En el momento de la transformación, se descongeló una alícuota de 100 µl de células competentes y se le añadió el ADN plasmídico. Se incubó 20 minutos en hielo y se le dio un choque térmico a 42°C durante 90 segundos, tras los cuales se incubó 3 minutos en hielo. A continuación, se añadieron 400 µl de medio LB y se incubó durante 1 hora a 37°C. Las células transformadas se centrifugaron a 3.000 r.p.m. y se sembraron en placas selectivas.

3.2.5.2 Transformación de levaduras

Para realizar la transformación de la levadura se siguió el protocolo del kit de transformación Frozen-EZ Yeast Transformation II de Zymo Research.

Preparación de células competentes

En primer lugar se prepararon las células de levaduras competentes y para ello, se dejaron crecer las células a 30°C en 10 ml de YPD (medio líquido).

A continuación, se centrifugó durante 4 min a 3000-4000 r.p.m y se descartó el sobrenadante. Después se añadieron 10 mL de la solución EZ1 para lavar el pellet. Se volvió a centrifugar y se descartó el sobrenadante. Por último, se añadió 1 mL de la solución EZ2 para resuspender el pellet. Tanto la solución EZ1 como la EZ2 se incluyen en el kit.

Transformación con el producto de la PCR y el plásmido.

Para realizar la transformación con el producto de PCR y el plásmido YEpFLAG1 digerido, se siguió el protocolo del kit Frozen-EZ Yeast Transformation II de Zymo Research.

El medio para resembrar las células son placas CM-Trp.

Se puso un control negativo de transformación (sin añadir DNA) para poder descartar que no se produjo ninguna contaminación, y otro control negativo transformando sólo con el DNA plasmídico digerido (sin inserto), para verificar que el plásmido YEpFLAG1 se digirió correctamente, y por tanto, que no hay transformantes.



De los transformantes obtenidos, se extrajo el DNA plasmídico de la levadura mediante el kit GeneJet Plasmid Miniprep Kit de *ThermoFisher Scientific* y se verificó mediante secuenciación en la casa comercial STABVIDA la correcta inserción en pauta de lectura del gen en la construcción y que no se introdujo durante el proceso alguna mutación que pudiera afectar a la funcionalidad de la proteína.

3.2.6 Cultivos

Para determinar la producción de acetato de etilo y de acetato de isoamilo mediante cromatografía de gases, se hicieron cultivos de la cepa transformada y la no transformada con el fin de recoger alícuotas a lo largo del tiempo.

Los cultivos se realizaron en CM-Trp, de la cepa transformada sólo con el plásmido YEpFLAG y de la cepa con el plásmido y el gen *ATF1*.

Se dejaron creciendo toda la noche para utilizarlos como inóculo. Una vez crecidas, se les midió la absorbancia a 600nm para inocular la misma cantidad y que todos los cultivos iniciaran en la misma absorbancia de 0,1 en un volumen final de 50 ml, en medio CM-Trp, YPD y YPHSM. Se dejaron en el agitador a 250 r.p.m y a 30°C.

Se pusieron 6 cultivos, 3 con la cepa transformada únicamente con el plásmido (control) y 3 con la cepa transformada con el plásmido y el gen *ATF1*, en los medios CM-Trp (para mantener la presión de selección del plásmido en los dos casos), en YPD (medio rico) y en YPHSM (recomendado por la casa comercial para la expresión de proteínas).

Se fueron sacando alícuotas a lo largo del tiempo (a las 6 horas, 24 horas, 30 horas, 48 horas, 56 horas, 72 horas, 80 horas, 97 horas y 153 horas), para medir la producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo, entre otros compuestos volátiles, mediante cromatografía de gases en la Unidad de Técnicas Cromatográficas del SAI (Servizo de Apoio á Investigación) de la UDC.

También se midieron otros parámetros para comparar ambas cepas, como la densidad óptica a 600 nm, y parámetros físico-químicos (mediante el densímetro y alcoholímetro AntonPaar) como el extracto original (azúcares fermentables iniciales por 100 mL de muestra), extracto aparente (azúcares fermentables por 100 mL de muestra), el alcohol y el grado real de fermentación.



3.2.7 Análisis sensorial

Para el análisis sensorial de las diferentes muestras, se pusieron a crecer las dos cepas (la transformada con el plásmido y la transformada con el plásmido y el gen *ATF1*) en mosto cervecero cedido por Estrella Galicia y las muestras fueron analizadas por el panel de catadores de Estrella Galicia en sus instalaciones. 12 catadores expertos en análisis sensorial de cerveza, realizaron una prueba descriptiva de las muestras, indicando la intensidad con la que apreciaban cada uno de los atributos para poder realizar el perfil de flavor de las muestras (AENOR, 2010).

4 Resultados y discusión

Tal y como se ha indicado, el objetivo principal del presente trabajo es evaluar si la sobreexpresión de un determinado gen, como el *ATF1* (gen que codifica para la alcohol acetil transferasa) en una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* de laboratorio es capaz de influir y aumentar los niveles de acetato de etilo y de acetato de isoamilo en un nivel suficiente como para ser percibido por un panel de cata entrenado. De ser así, el día de mañana se podrían buscar determinadas cepas comerciales, con la presencia de determinadas expresiones de genes, en función de las tipologías de cerveza que se quieran desarrollar. Para lograr este resultado se han seguido las siguientes etapas que se describen a continuación.

4.1 Construcción de la cepa recombinante

Comprobación de la digestión de YEpFLAG.

Una vez extraído el DNA plasmídico se digirió con las enzimas *NruI* y *SalI* para linearizarlo y eliminar la señal de secreción, el péptido FLAG y el MCS.

El plásmido original tiene un tamaño de 7.205 pb y el digerido de 6.872 pb (Figura 8).

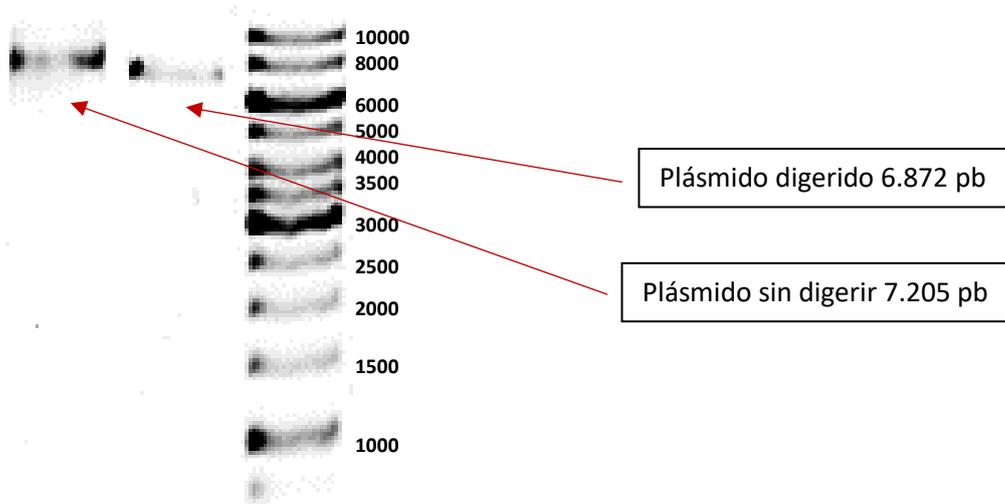


Figura 7 Comprobación de la digestión del plásmido YEpFLAG.

Comprobación del producto de la PCR.

Así mismo, se verificó mediante electroforesis en gel de agarosa la correcta amplificación del gen *ATF1* mediante PCR a partir del DNA genómico extraído de la cepa de levadura BJ3505 de *S. cerevisiae* (Figura 9).

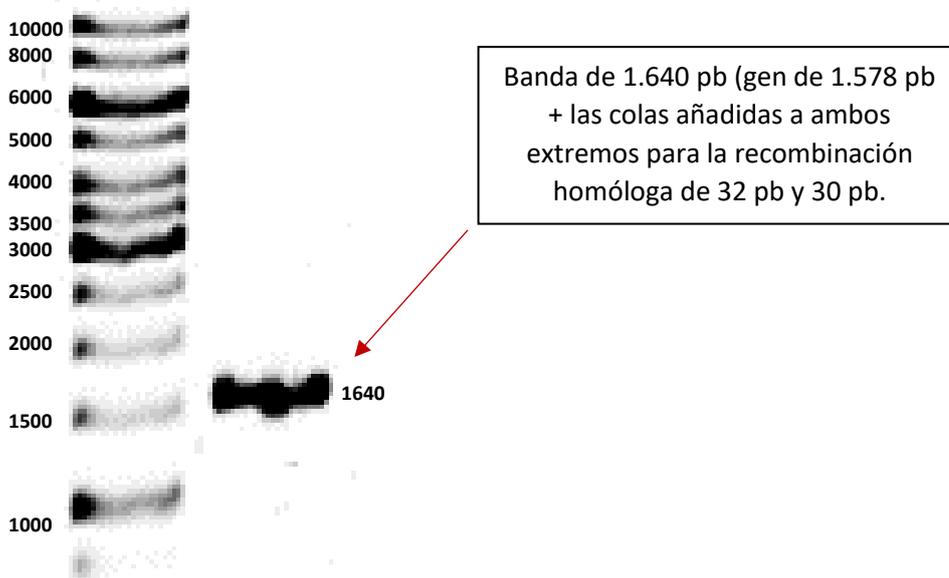


Figura 8 Comprobación del producto de la PCR.

Cotransformación con el producto de la PCR y el plásmido digerido.

Tras verificar la correcta amplificación del gen *ATF1* y la linearización del vector YEpFLAG, ambos se utilizaron para cotransformar la cepa de levadura BJ3505 con idea de



que se produjese una recombinación homóloga de ambos fragmentos (vector e inserto) utilizando la maquinaria propia de la levadura para así obtener el vector recombinante y al mismo tiempo la cepa recombinante. La selección se realizó en placas CM-Trp.

Digestión del candidato con el inserto

De las colonias obtenidas en el paso anterior, se seleccionaron 10 al azar, para extraer el ADN plasmídico y verificar la inserción del gen en el plásmido mediante electroforesis. Todos los candidatos se digirieron con las enzimas de restricción *NruI* y *BamHI* para extraer parte del inserto. En la imagen se puede observar el resultado de la electroforesis donde se ve la banda de 1.426 pb del gen y la de banda de 7.024 del vector (Figura 10).

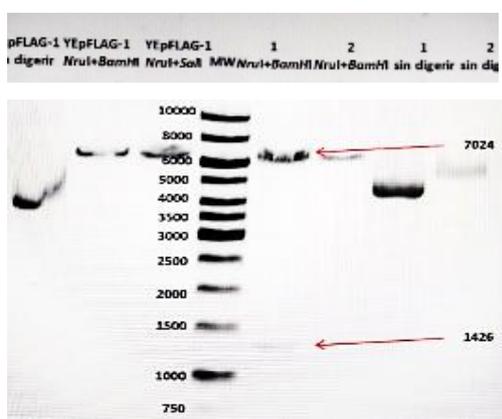


Figura 9 Comprobación de la digestión del candidato digerido.

La construcción se comprobó mediante secuenciación en STABVIDA para verificar la correcta amplificación del gen y la construcción obtenida. No observándose ninguna mutación.

4.2 Comparación de las cepas mediante cultivos

Para determinar la producción de acetato de isoamilo y acetato de etilo, así como el crecimiento y la estabilidad plasmídica de la cepa transformada obtenida se realizaron cultivos en tres medios diferentes: CM-Trp, YPD y YPHSM. Como cepa control se utilizó la misma cepa de levadura BJ3505 transformada con el plásmido YE pFLAG.

Absorbancia a 600nm

Se midió la absorbancia de los 6 cultivos (cepa control y transformada en CM-Trp YPD y YPHSM), para ver el crecimiento celular. Como se puede ver en el Gráfico 1, el mayor



crecimiento se obtuvo en la cepa control (solo con el plásmido YEpFLAG1). En cuanto a los medios de cultivo, el que favorece más el crecimiento es el YPD. Así mismo se observa un crecimiento similar en ambas cepas (control y recombinante) para cada uno de los medios ensayados.

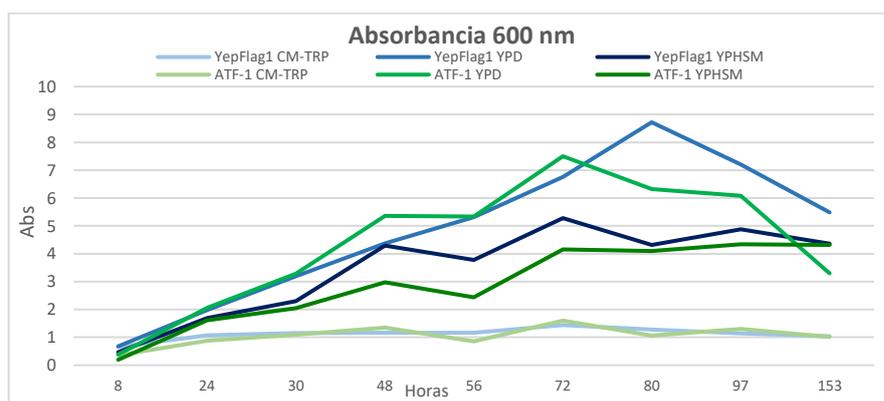


Gráfico 1 Valores de absorbancia a 600nm de la cepa control y la transformada.

Estabilidad plasmídica

Se determinó la estabilidad plasmídica (Tabla 2) al cabo de 174 horas en los medios no selectivos YPD y YPHSM, obteniéndose un 58,17% y un 41,04% respectivamente. Estos datos son muy superiores a los obtenidos por otros autores (López- López *et al*, 2010; Álvarez-Cao *et al*, 2017).

Tabla 2 Estabilidad plasmídica a las 174 horas en los medios YPHSM y YPD.

CULTIVO ATF-1 en YPHSM	Número de colonias
CM	385
CM-Trp	158
Estabilidad plasmídica	41,04%

CULTIVO ATF-1 en YPD	Número de colonias
CM	459
CM-Trp	267
Estabilidad plasmídica	58,17%

Cromatografía de gases

Para completar la información que se pretendía obtener en el análisis mediante el panel de cata entrenado, se han sometido las muestras a una determinación empleando cromatografía de gases con detector de masas en tándem e inyección de muestra mediante un sistema de espacio de cabeza. De ese modo ha sido posible cuantificar la concentración presente en el medio de cultivo de los acetatos de isoamilo y acetato de etilo.



En los resultados obtenidos en el análisis de volátiles se observa una producción mayor de acetato de etilo que de acetato de isoamilo en la cepa control para todos los medios ensayados (Gráfico 2). Esta diferencia se mantiene en la cepa sobreexpresando el gen *ATF1* creciendo en medio CM-Trp, pero se invierte en los otros dos medios. De tal forma que la cepa sobreexpresando *ATF1* presenta una mayor producción de acetato de isoamilo que de etilo a lo largo del tiempo del cultivo (salvo a las 72 horas) en medio YPD y durante las primeras 56 horas de cultivo en medio YPHSM.

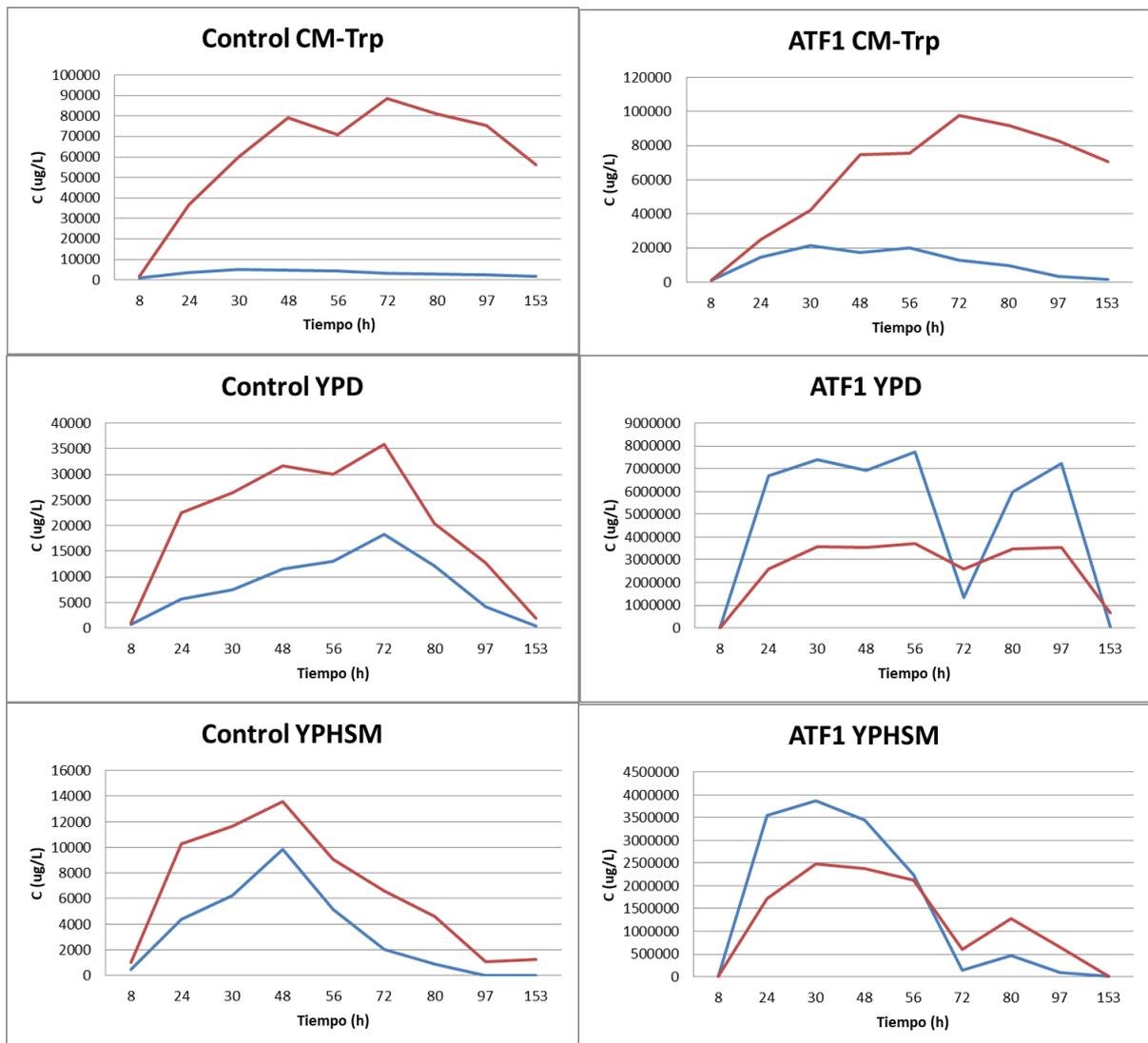


Gráfico 2 Producción de acetato de etilo (rojo) y acetato de isoamilo (azul) de la cepa control y transformada con *ATF1* en los diferentes medios ensayados.



Cabe también destacar que tanto la producción de acetato de isoamilo como la de acetato de etilo ha sido muy superior en la cepa sobreexpresando el gen *ATF1* que en la cepa control (Gráfico 3) para todos los medios ensayados con la salvedad de la producción de acetato de etilo en medio CM-Trp que es prácticamente similar en ambas cepas (control y transformada).

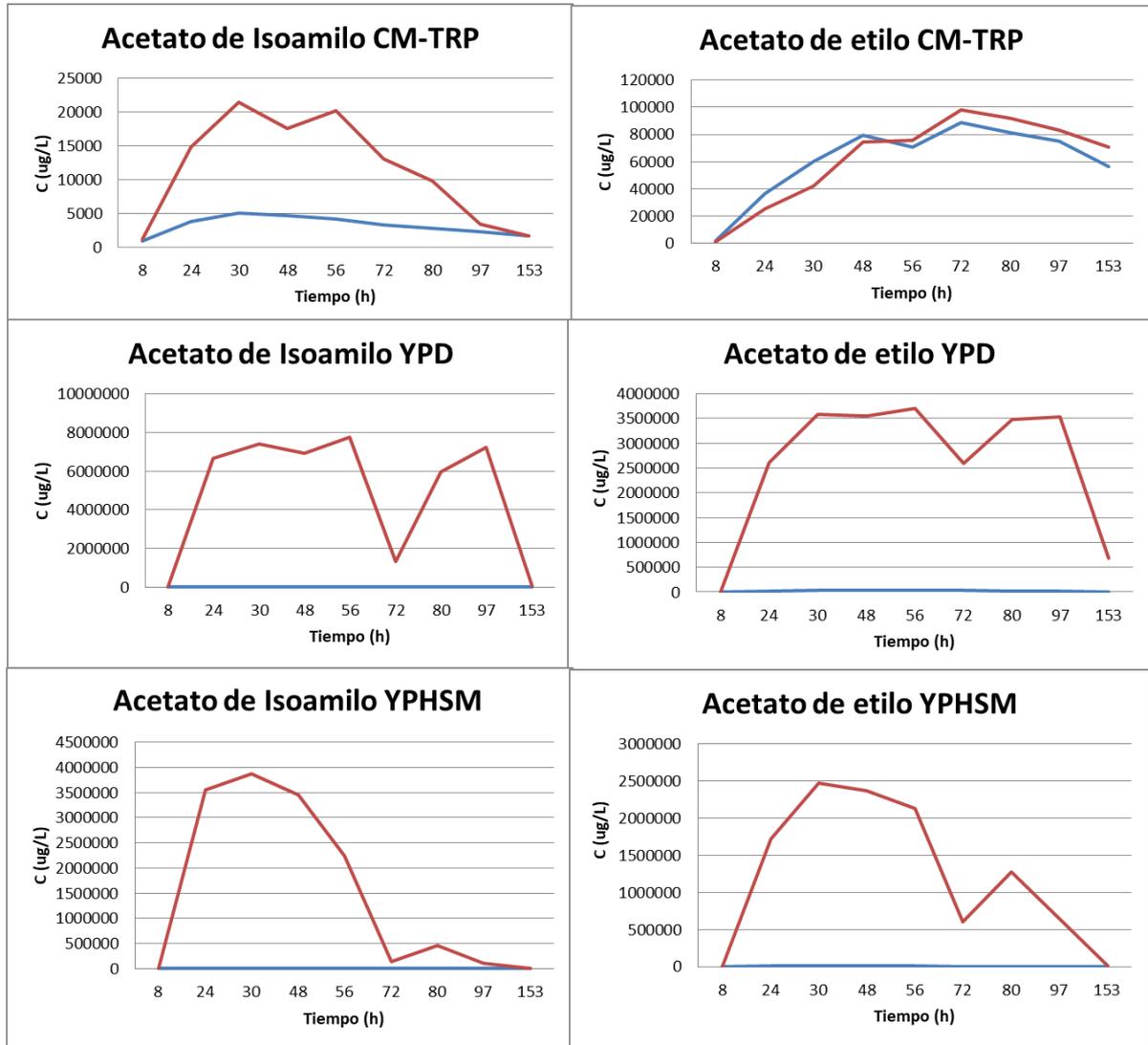


Gráfico 3 Producción de acetato de isoamilo y acetato de etilo de la cepa control (azul) y transformada con *ATF1* (rojo) en los diferentes medios ensayados.

Cabe destacar que se ha conseguido una producción de 4.2, 985 y 619 veces más de acetato de isoamilo en la cepa sobreexpresando *ATF1* con respecto a la control en medio CM-Trp, YPD y YPHSM respectivamente a las 30 horas de cultivo. Mientras que se ha conseguido



incrementar la producción de acetato de etilo en 136 y 212 veces más en la cepa sobreexpresando *ATF1* con respecto a la control en los medios YPD y YPHSM respectivamente a las 30 horas de cultivo (Gráfico 3). Estos valores obtenidos son muy superiores a los descritos en la literatura. Fujii y colaboradores (Fujii *et al*, 1994) consiguieron a las 24 horas en un medio con un 15% de glucosa 27 veces más de producción de acetato de isoamilo y 9 veces más de acetato de etilo en una cepa sobreexpresando el gen *ATF1* con respecto a una control. Más recientemente, Verstrepen y colaboradores (Verstrepen *et al*, 2003b) alcanzaron en un medio con 8% de glucosa a las 36 horas 180 veces más de acetato de isoamilo y 30 veces más de acetato de etilo en una cepa sobreexpresando el gen *ATF1* con respecto a la control. Por lo tanto, en nuestro caso, en el mejor de los casos, hemos conseguido mejorar en 5.5 veces la producción de acetato de isoamilo y 7 veces la producción de acetato de etilo con respecto a los datos obtenidos por otros autores.

Por último, tanto la producción de acetato de isoamilo (Gráfico 4) como la de acetato de etilo (Gráfico 5) fue muy superior cuando la cepa sobreexpresando el gen *ATF1* crece en medio YPD.

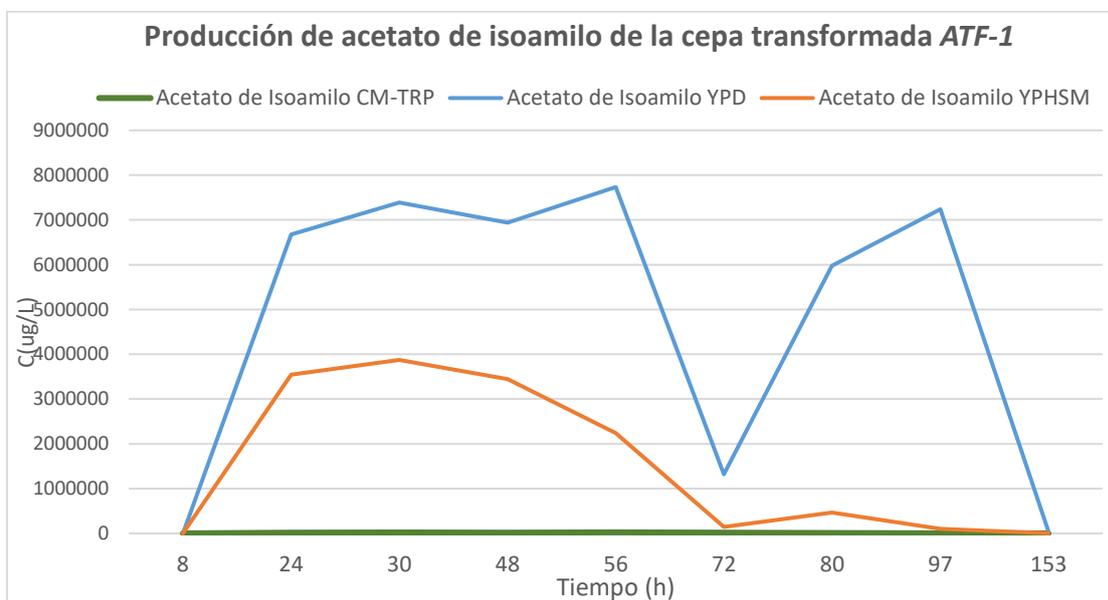


Gráfico 4 Producción de acetato de isoamilo de la cepa transformada.

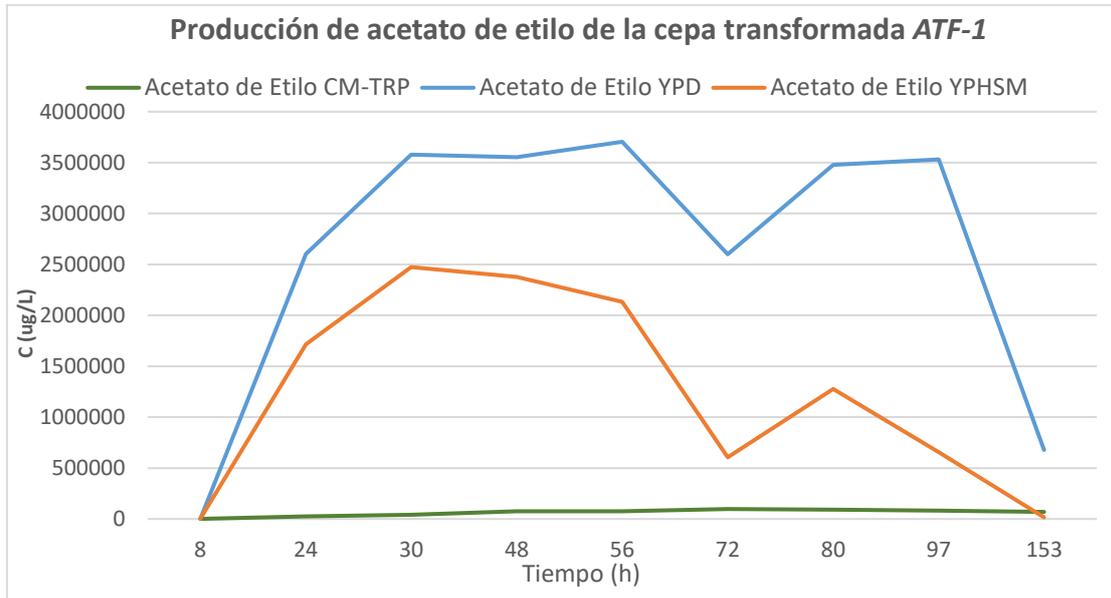


Gráfico 5 Producción de acetato de etilo de la cepa transformada.

Fermentación

Tanto la levadura transformada como la cepa control se pusieron a fermentar en mosto cervecero para poder ver diferencias en cuanto a su actividad y perfil organoléptico. La cepa transformada produce menos alcohol que la cepa silvestre a lo largo del tiempo (Tabla 3). El alcohol es un indicativo de la fermentación ya que a lo largo de ésta se van consumiendo los azúcares para producirlo. La cepa control tiene mayor actividad fermentativa, ya que a las 120 horas ha consumido más azúcares (extracto aparente), y el grado real de fermentación es más alto.

Tabla 3 Resultados físico-químicos de la fermentación.

Nombre de la muestra	Tiempo	Alcohol (%v/v)	p (extracto original) (% w/w)	Ea (extracto aparente) (% w/w)	RDF (grado real de fermentación)
Mosto	120 horas	-0,04	16,04	16,12	-0,42
CEPA Control	120 horas	1,09	15,06	13,11	11,15
CEPA + ATF1	120 horas	0,79	15,14	13,72	8,07

Análisis sensorial

Los resultados obtenidos de la cata de las muestras se ven reflejados en el Gráfico 6, donde se observan los perfiles de flavor de las dos muestras.



El resultado del cultivo de ambas cepas posee un perfil de flavor muy parecido pero el cultivo obtenido con la cepa control de *Saccharomyces cerevisiae*, es un poco más ácida, con notas tostadas, afrutadas y especiadas y un marcado aroma láctico.

En cambio, el cultivo con la cepa sobreexpresando el gen *ATF1*, da un perfil más dulce y menos ácido. Destaca por su aroma afrutado, concretamente a plátano, piña y cereza proveniente de la mayor cantidad de acetato de isoamilo presente en la muestra. Además tiene un marcado aroma a disolvente o esmalte de uñas que vendría de la mayor cantidad de acetato de etilo.

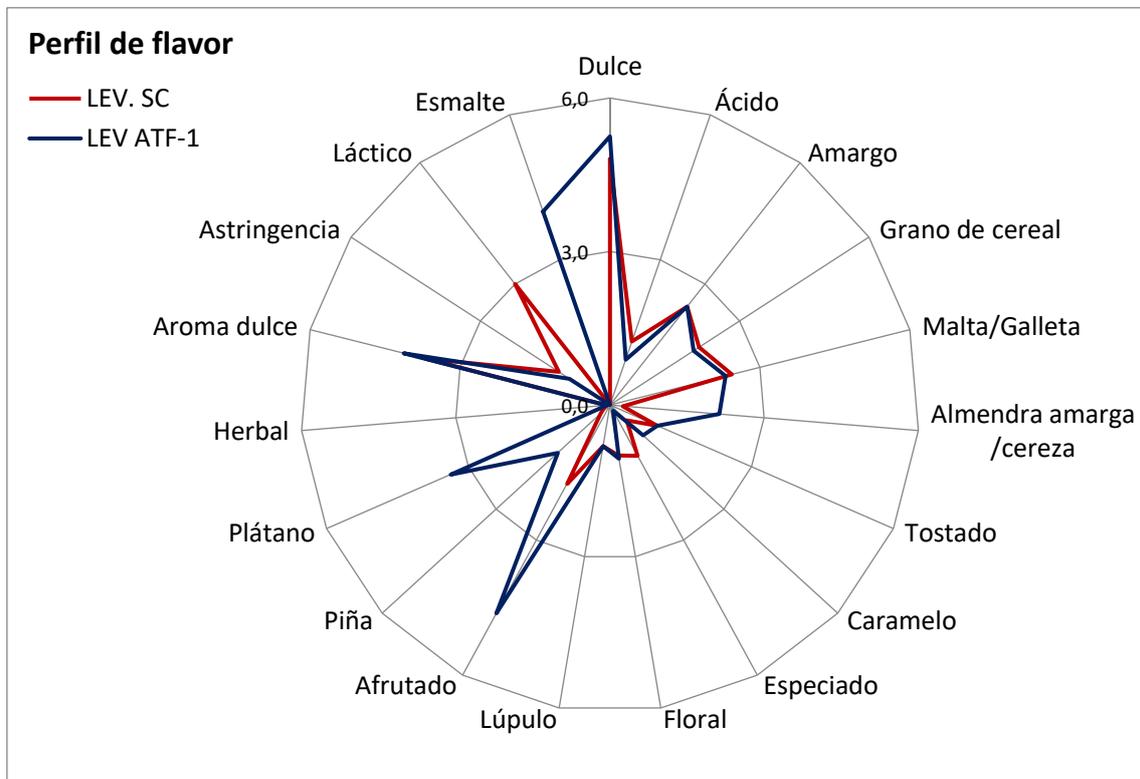


Gráfico 6 Perfil de flavor de la levadura control *Saccharomyces cerevisiae* (rojo) y la levadura sobreexpresando el gen *ATF1*(azul).



4. Conclusiones

De este estudio, se pueden extraer las siguientes conclusiones:

- Se ha construido una cepa de *Saccharomyces cerevisiae* modificada genéticamente que sobreexpresa el gen *ATF1*.
- La cepa así obtenida es capaz de producir hasta 985 veces más de acetato de isoamilo con respecto a la control en medio YPD a las 30 horas de cultivo. Y 212 veces más de acetato de etilo con respecto a la control en medio YPHSM a las mismas horas de cultivo.
- Se ha comprobado mediante el control efectuado por un panel de cata entrenado que esta modificación produce concentraciones suficientes de acetato de isoamilo y de acetato de etilo como para modificar el perfil sensorial del medio de cultivo.



5. Bibliografía

- AENOR (Asociación Española de Normalización y Certificación). 2010. Análisis Sensorial. Normas UNE. 2nd Ed. AENOR Ediciones. Madrid (España)
- Álvarez-Cao, M.E. 2017. Optimización de la producción heteróloga de la enzima β -galactosidasa de *Saccharomyces cerevisiae* a partir de residuos agroindustriales. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias, Universidade da Coruña.
- Bamforth, C.W. 2001. Beer flavour: sulfur substances.
- Bamforth, C. W. 2017. *Brewing New Technologies*. Woodhead Publishing Limited and CRC Press LLC. USA. ISBN-10: 1-84569-003-6
- Briggs, D. E., Brooks, C., Stevens, R. 2004. *Brewing Science and Practice*.
- Denby, C. M., Li, R. A., Vu, V. T., Costello, Z., Lin, W., Jade, L., Williams, J. 2018. "Industrial Brewing Yeast Engineered for the Production of Primary Flavor Determinants in Hopped Beer." *Nature Communications* 9 (1): 1–10.
- Flavor, Beer. 1999. "Beer Flavor Profiles," 167–68.
- Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y. and Hamachi, M. 1994. "Molecular cloning, sequence analysis and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene". *Applied and Environmental Microbiology*, 60: 2786-2792.
- Fujiwara, T, K Tanaka, a Mino, M Kikyo, K Takahashi, K Shimizu, and Y Takai. 1998. "Rho1p-Bni1p-Spa2p Interactions: Implication in Localization of Bni1p at the Bud Site and Regulation of the Actin Cytoskeleton in *Saccharomyces Cerevisiae*." *Molecular Biology of the Cell* 9 (5): 1221–33..
- Hill, A. E. 2003. *Brewing Microbiology*.
- Holt, S., Miks, M. H., de Carvalho, T., Foulquié-Moreno, M. R., Thevelein, J. M. 2018. The molecular biology of fruity and floral aromas in beer and other alcoholic beverages. *FEMS Microbiology Reviews*. In press.
- Hughes, P. 2009. *Beer Flavor. Beer*. Elsevier Inc.
- Kishimoto, T., Noba, S., Yako, N., Kobayashi, M., Watanabe, T. 2018. "Simulation of Pilsner-Type Beer Aroma Using 76 Odor-Active Compounds." *Journal of Bioscience and Bioengineering* 126 (3): 330–38.
- Kruis, A. J., Gallone, G., Jonker, T., Mars A., Van Rijswijck, I. M. H., Wolkers–Rooijackers, J. C. M., Smid, E. J. 2018. "Contribution of Eat1 and Other Alcohol Acyltransferases to Ester Production in *Saccharomyces cerevisiae*." *Submitted* 9 (December): 1–11.
- Kunze, W. 2006. *Tecnología Para Cerveceros y Malteros*. Editorial VLB Berlin. ISBN: 9783921690543
- Loviso, C. L., Libkind, D. 2018. "Synthesis and Regulation of Flavor Compounds Derived from Brewing Yeast: Esters | Síntesis y Regulación de Compuestos Del Aroma y El Sabor Derivados de La Levadura En La Cerveza: Ésteres." *Revista Argentina de Microbiología*.
- Meilgaard, M. C. Dalglueth, C. E., Clapperton, J. F. 1979. "Beer Flavour Terminology". *Journal of the Institute of Brewing*, 85: 38–42.
- Muresan, C., Pop, A., Muste, S., Socaci, S., Scrob, S., Baraian, C. 2014. "Sensory Analysis of Beer with Different Flavors." *Journal of Agroalimentary Processes and Technologies* 20 (4): 391–95.
- Pires, E., Brányik, T. 2015. *Springer briefs in biochemistry and molecular biology. Biochemistry of Beer Fermentation*.
- Saerens, S. M. G., Delvaux, F. R., Verstrepen, K. J., Thevelein, J. M. 2010. "Production and Biological Function of Volatile Esters in *Saccharomyces cerevisiae*." *Microbial Biotechnology* 3 (2): 165–77.



Estudio de los cambios inducidos en las propiedades organolépticas de la cerveza tras modificación genética de la levadura.

- Santoyo. 2008. "A Prospective and Retrospective Study of Attributional Style, Perceptions of Control, Social Support, and the Life Events-Illness Relationship." *Dissertation Abstracts International* 48 (1-B): 268.
- Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G. U. Y., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S., Delvaux, F. R., Box, P. O., Osmond, G., Sa, A. 2003a. "Flavor-Active Esters : Adding Fruitiness to Beer. NA" 96 (2).
- Verstrepen, K. J., Stijn D. M. Van Laere, Bart M. P. Vanderhaegen, Guy Derdelinckx, Jean-Pierre Dufour, Isak S. Pretorius, Joris Winderickx, Johan M. Thevelein, and and Freddy R. Delvaux. 2003b. "Expression Levels of the Yeast Alcohol Acetyltransferase Genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* Control the Formation of a Broad Range of Volatile Esters" 69 (9): 5228–37.
- White, C., Zainasheff, J. 2010. *Yeast. The Practical Guide to Beer Fermentation.*