

Millores biotecnològiques en els llevats cervesers

Biotechnological improvements in brewer's yeasts



GUILLEM RUIZ

Graduat en ciència i tecnologia dels aliments (CTA), Universitat Autònoma de Barcelona (UAB). Cervesa Espiga. Companyia Artesana Maians, SL.



JORDI SALDO

Professor titular del Departament de Ciència Animal i dels Aliments, Facultat de Veterinària, Universitat Autònoma de Barcelona (UAB).

RESUM: En els darrers anys, el desenvolupament biotecnològic aplicat als llevats cervesers ha esdevingut una línia clau per optimitzar l'eficiència i qualitat del procés de fermentació en la indústria cervesera. El treball revisa en profunditat les millores biotecnològiques centrades en dues propietats fonamentals dels llevats: la floculació, o capacitat d'agregació i sedimentació cel·lular, i l'atenuació, entesa com la capacitat de transformar els sucres fermentables en etanol.

Els llevats del gènere *Saccharomyces*, especialment *S. cerevisiae* i *S. pastorianus*, són les espècies més utilitzades, tot i que el paper de llevats no convencionals (com *Brettanomyces* o *Torulaspora*) també s'està investigant per millorar perfils organolèptics o reduir l'alcohol. Les diferències entre soques, la composició de la paret cel·lular i les vies metabòliques influeixen directament en la floculació i en l'eficiència fermentativa, factors decisius en l'elecció del llevat per a cada estil de cervesa.

La biotecnologia té una gran importància estratègica en el desenvolupament de llevats adaptats a nous reptes industrials, com la fermentació a baixes temperatures, la reducció del temps de producció o l'optimització dels perfils sensorials. Les eines moleculars actuals obren la porta a una nova generació de llevats cervesers més eficients i versàtils.

PARAULES CLAU: floculació, atenuació, *Saccharomyces*, paret cel·lular, efecte Crabtree, estratègies biotecnològiques.

ABSTRACT: *In recent years, biotechnological development applied to brewer's yeasts has become a key line of activity to optimize the efficiency and quality of the fermentation process in the brewing industry. This study reviews in depth the biotechnological improvements relating to two fundamental properties of yeasts: flocculation, or the capacity for cellular aggregation and sedimentation, and attenuation, understood as the capacity to transform fermentable sugars into ethanol.*

Yeasts of the genus Saccharomyces, especially S. cerevisiae and S. pastorianus, are the most widely used species, although the role of unconventional yeasts (such as Brettanomyces or Torulaspora) is also being investigated to improve organoleptic profiles or reduce alcohol. Differences between strains, cell wall composition and metabolic pathways directly influence flocculation and fermentation efficiency, which are decisive factors in the choice of yeast for each style of beer.

Biotechnology has a great strategic importance in the development of yeasts adapted to new industrial challenges, such as fermentation at low temperatures, reduction of production time, or optimization of sensory profiles. Current molecular tools open the door to a new generation of more efficient and versatile brewer's yeasts.

KEYWORDS: *flocculation, attenuation, Saccharomyces, cell wall, Crabtree effect, biotechnological strategies.*

INTRODUCCIÓ

Els llevats cervesers són microorganismes essencials en la producció de cervesa, i les seves característiques intrínseques exerceixen una influència determinant sobre la qualitat final del producte i l'eficiència global del procés de fermentació. La major part de la variabilitat dels llevats emprats actualment s'ha desenvolupat a partir de l'any 1600, coincidint amb l'inici dels processos industrials de producció, en què s'ha fet ús de tècniques d'evolució adaptativa per millorar-ne tant l'eficiència fermentativa (atenuació) com la resposta fisiològica del llevat a condicions industrials (Gibson *et al.*, 2020). Aquesta revisió bibliogràfica se centra en les millores biotecnològiques aplicades als llevats cervesers durant els darrers anys, amb un èmfasi particular en dues propietats tecnològiques fonamentals: la floculació i l'atenuació.

La selecció de la soca de llevat més adequada per a cada estil de cervesa depèn críticament dels seus atributs fenotípics. La floculació es refereix a la capacitat de les cèl·lules de llevat per agregar-se espontàniament, formant flocs que sedimenten i faciliten la separació del llevat de la cervesa al final de la fermentació. Una floculació insuficient pot requerir etapes addicionals de clarificació física per obtenir una cervesa límpida. La floculació dels llevats està regulada a través del genoma dels llevats (gen *Flo*, proteïnes floculines) (Verbelen *et al.*, 2006). Per altra banda, l'atenuació mesura la capacitat del llevat per metabolitzar els sucres fermentables presents en el most cerveser. Un alt grau d'atenuació implica una conversió eficient de sucres en etanol i diòxid de carboni, cosa que ocasiona sovint cicles de fermentació més curts i un major rendiment alcohòlic.

Ambdues característiques, floculació i atenuació, estan fortament determinades pel genotip de la soca de llevat. Les particularitats estructurals de la paret cel·lular i les especificitats de les vies metabòliques tenen una rellevància especial, ja que influeixen directament en el comportament floculant i en la capacitat d'atenuació del llevat. La comprensió i manipulació d'aquests factors mitjançant eines biotecnològiques constitueixen un camp d'investigació actiu per a la millora contínua dels llevats cervesers.

CERVESES I PROCESSOS FERMENTATIUS

D'acord amb la normativa vigent (Reial decret 678/2016), la cervesa es defineix com el producte alimentari resultant de la fermentació alcohòlica, mitjançant llevats seleccionats, d'un most cerveser elaborat a partir de matèries primeres naturals. El most cerveser és el líquid ensucrat obtingut principalment per l'extracció i hidròlisi enzimàtica del midó contingut en cereals maltats, típicament ordi. El procés de maceració, que consisteix a barrejar la malta molta amb aigua calenta, facilita l'extracció del midó, el qual és posteriorment hidrolitzat a sucres fermentables per l'acció d'enzims endògens de la malta (amilases) (Baxter *et al.*, 2003).

El perfil de sucres fermentables del most (principalment maltosa, maltotriosa, glucosa i fructosa) depèn tant de la matèria primera (tipus de malta) com de les condicions del procés de maceració. És rellevant destacar que *Saccharomyces cerevisiae* és capaç de fermentar eficientment tots aquests sucres, inclosa la maltotriosa, mentre que altres espècies poden tenir limitada la seva capacitat per utilitzar aquest trisacàrid, cosa que n'afecta l'eficiència.

Taula 1. Tipus de cervesa més coneguts

TIPUS DE CERVESA	FERMENTACIÓ	TEMPERATURA	ESPÈCIES DE LLEVATS	CARACTERÍSTIQUES	ESTILS
Ale	Part superior del tanc (<i>top fermenting</i>)	16 - 24 °C	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Àmplia varietat de flavors i aromes (molts èsters) Més fàcils i ràpides de produir	Pale Ale (IPA) i Bitter
Lager	Part inferior del tanc (<i>bottom fermenting</i>)	7 - 15 °C	<i>Saccharomyces pastorianus</i> (híbrid entre <i>S. cerevisiae</i> i <i>S. ebyanus</i>)	Llarga maduració a baixa temperatura (<i>lagering</i>) Gust net i neutre (menys èsters, més diacetil)	Lager pàl·lida, Pilsner, Bock
Làmbic	Espontània	Depenent del lloc de producció	Llevats silvestres com <i>Brettanomyces bruxellensis</i> i altres	Gust lleugerament àcid Poc amargues	Gueuze, Faro, Kriek

Font: Elaboració pròpia.

cia fermentativa global en mostos cervesers estàndard (Cubillos *et al.*, 2019).

Els llevats inoculats determinen en gran manera el tipus de cervesa produïda. Tradicionalment, es distingeixen els llevats de fermentació alta (per a cerveses *ale*) i els de fermentació baixa (per a cerveses *lager*) (Hughes, 2014). La taula 1 resumeix les característiques principals dels tipus de cervesa més comuns.

IMPORTÀNCIA DELS LLEVATS

Encara que s'estima l'existència de més de 1.500 espècies de llevats descrites, la producció industrial de cervesa es basa predominantment en l'ús d'espècies del gènere *Saccharomyces*, principalment *S. cerevisiae* i *S. pastorianus* (Hughes, 2014). No obstant això, hi ha un interès creixent en l'aplicació de llevats no *Saccharomyces* per les seves característiques particulars. Aquests llevats poden contribuir a la producció de cerveses amb baix contingut alcohòlic, millorar perfils aromàtics i gustatius, o fins i tot modular l'atenuació. Exemples d'aquests llevats inclouen espècies de *Brettanomyces*, *Hanseniaspora*, *Pichia*, *Torulaspora* i *Wickerhamomyces* (Cubillos *et al.*, 2019).

El rol fonamental dels llevats en la cerveseria és la fermentació dels sucres del most en condicions predominantment anaeròbiques i produir etanol i diòxid de carboni com a productes principals, juntament amb un ampli espectre de compostos secundaris (èsters, alcohols superiors, compostos fenòlics, compostos de sofre) que contribueixen decisivament al perfil organolèptic final de la cervesa (Jeyaram i Rai, 2017; Astola *et al.*, 2023). Per tant, la selecció acurada de la soca de llevat és un factor crític que determina les característiques sensorials i fisicoquímiques del producte acabat.

Històricament, les soques de *S. cerevisiae* utilitzades en cerveseria han estat seleccionades empíricament per propietats tecnològicament desitjables com la floculació eficient, la capacitat d'utilitzar els sucres del most i la producció d'un perfil organolèptic adequat. En el cas de les cerveses *lager*, el llevat *S. pastorianus*, un híbrid natural entre *S. cerevisiae* i *S. eubayanus*, és el responsable del perfil aromàtic característic i de la capacitat de fermentar a baixes temperatures. No obstant això, algunes soques parentals com *S. eubayanus* mostren limitacions, com la incapacitat de metabolitzar la maltotriosa i una floculació deficient (Gibson *et al.*, 2013; Cubillos *et al.*, 2019).

Aquesta diversitat natural i les limitacions inherents han impulsat la recerca i el desenvolupament de noves soques de llevat amb perfils de propietats optimitzats per a aplicacions cerveseres específiques, sovint mitjançant eines biotecnològiques. L'interès en aquest camp es reflecteix en un nombre sostingut de publicacions científiques.

CARACTERÍSTIQUES DELS LLEVATS

La majoria dels llevats són organismes aerobis estrictes. Tanmateix, els llevats cervesers (*Saccharomyces* spp.) són anaerobis facultatius. En presència d'altres concentracions de sucres fermentables i absència o limitació d'oxigen, reprimeixen la respiració (efecte Crabtree o efecte Pasteur segons el context) i prioritzen la fermentació alcohòlica per a la producció d'energia, desacoblant-la parcialment de la producció de biomassa. Els seus requisits nutricionals són relativament simples; necessiten una font de carboni (sucres), nitrogen (aminoàcids, pèptids, amini), minerals i vitamines (especialment biotina, àcid pantotènic i tiamina) (Bamforth i Cook, 2019).

Morfològicament, *S. cerevisiae* i *S. pastorianus* són eucariotes unicel·lulars, generalment de forma esfèrica o

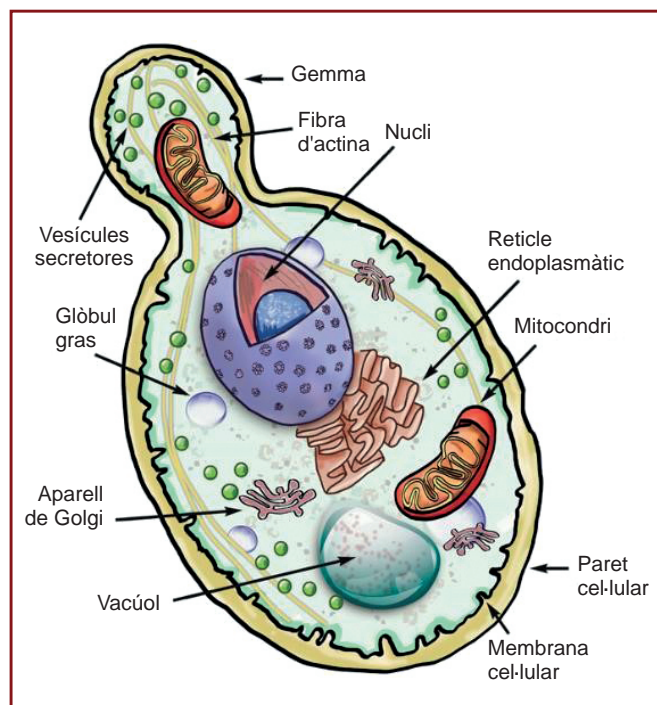


Figura 1 Diagrama de les parts del llevat *Saccharomyces cerevisiae*. Font: Reproduït de Walker i Stewart (2016), sota llicència Creative Commons Reconeixement (CC by 4.0 Internacional) (<https://doi.org/10.3390/beverages2040030>).

el·lipsoidal, amb un diàmetre aproximat de 5-10 μm (Bamforth i Cook, 2019). El seu material genètic s'organitza en cromosomes ubicats dins del nucli. Els llevats haploides del gènere *Saccharomyces* contenen típicament 16 cromosomes. En funció del nombre de jocs cromosòmics, es classifiquen com a haploides (n), diploides ($2n$) o poliploides ($>2n$). Moltes soques cerveseres industrials són poliploides o aneuploides, una característica que sovint confereix major estabilitat genètica i robustesa fisiològica, cosa que permet reutilitzar-les en cicles de fermentació successius (*repitching*). A més, la poliploidia pot donar com a resultat la sobreexpressió de gens clau per a la utilització de sucres, fet que millora potencialment l'eficiència fermentativa (Bamforth, 2006; Stewart *et al.*, 2017). La figura 1 mostra un esquema general de la cèl·lula de llevat.

Els llevats són els agents biològics responsables de la fermentació primària del most, que transformen sucres en etanol, CO_2 i altres subproductes (Walker i Stewart, 2016). Certes característiques morfològiques (especialment de la paret cel·lular) i metabòliques tenen un impacte directe i significatiu sobre els processos de floculació i atenuació.

MORFOLOGIA DE LA PARET CEL·LULAR DELS LLEVATS RELACIONADA AMB LA FLOCULACIÓ

La paret cel·lular dels llevats (amb un gruix d'aproximadament 100-200 nm) és una estructura extracel·lular essencial i multifuncional. Proporciona rigidesa estructural i forma a la cèl·lula, actua com a barrera protectora osmòtica i física, i participa en processos d'adhesió i interacció cel·lular. Des del punt de vista cerveser, la seva implicació en la interacció cèl·lula-cèl·lula, és a dir, la floculació, és de gran interès tecnològic (Bamforth, 2006; Stewart *et al.*, 2017).

Estructuralment, la paret està composta principalment per polisacàrids: β -glucans (majoritàriament β -1,3-glucans amb ramificacions β -1,6), que formen l'esquelet intern, i mannopteïnes altament glicosilades, que constitueixen la capa externa. També conté quantitats menors de quitina (principalment al septe de gemmació), lípids i altres proteïnes. Les mannopteïnes de la superfície cel·lular, particularment les floculines, són determinants clau en el procés de floculació, ja que actuen com a lectines que

medien l'agregació cel·lular (Stewart *et al.*, 2017; Karabín *et al.*, 2018).

La floculació es defineix com l'agregació asexual, reversible i dependent de cations divalents (principalment Ca^{2+}) de les cèl·lules de llevat. El mecanisme molecular subjacent implica la unió específica de proteïnes floculines (codificades pels gens *Flo*), exposades a la superfície cel·lular, a residus de mannoosa presents en les mannopteïnes de cèl·lules adjacents (Wang *et al.*, 2023). Existeix una variabilitat considerable en el grau i tipus de floculació entre diferents soques de llevat, la qual cosa reflecteix diferències en l'expressió i estructura dels gens *Flo* i altres factors reguladors (Bamforth i Cook, 2019).

VIES METABÒLIQUES RELACIONADES AMB L'ATENUACIÓ

El most cerveser conté un perfil complex de carbohidrats, incloent-hi sucres fermentables com glucosa (~10%), fructosa (~2%), sacarosa (~5%), maltosa (~45%) i maltotriosa (~15%), a més de dextrines no fermentables per a la majoria de llevats cervesers (~23%) (Bamforth i Cook, 2019). La capacitat d'utilitzar eficientment aquests sucres, especialment la maltosa i la maltotriosa (els més abundants), determina en gran part el grau d'atenuació del llevat.

Tant en la maltosa com en la maltotriosa, l'encarregat de separar les glucoses unides pels enllaços glicosídics és l'enzim α -glucosidasa, amb la internalització prèvia dels sucres mitjançant transportadors específics de membrana (permeases). En canvi, per obtenir les glucoses de la sacarosa i la melibiosa serà necessari l'enzim invertasa i α -galactosidasa, respectivament, que actuen extracel·lularment (Bamforth i Cook, 2019). La capacitat de transportar i metabolitzar la maltotriosa és variable entre soques i espècies, i sovint és un factor limitant per a una atenuació completa. Algunes soques posseeixen transportadors específics per a la maltotriosa, com les proteïnes Malt (Baker i Hittinger, 2019).

Un cop els sucres són internalitzats o convertits a hexoses (glucosa, fructosa), aquestes entren a la via glicolítica central (via d'Embden-Meyerhof-Parnas, EMP) per ser convertides a piruvat (figura 2). En condicions anaeròbiques o microaeròfiles i amb suficient sucre disponible (condicions típiques de la fermentació cervesera), el piruvat és descarboxilat a acetaldehid, el qual és posteriorment reduït a etanol per l'alcohol deshidrogenasa, que regenera NAD^+ necessari per mantenir el flux

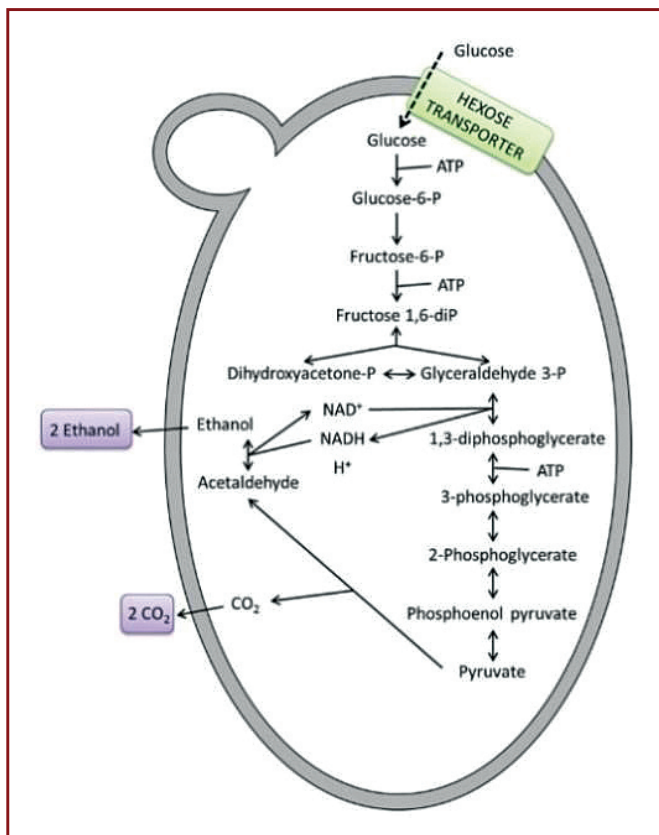


Figura 2. Via d'Embden-Meyerhof-Parnas i la fermentació alcohòlica. Font: Maicas (2020), sota llicència Creative Commons Reconeixement (CC by 4.0 Internacional) (<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>).

glicolític (Bamforth i Cook, 2019). Aquest procés constitueix la fermentació alcohòlica. No totes les espècies de llevat exhibeixen un efecte Crabtree tan pronunciat com *Saccharomyces*, la qual cosa afecta la seva producció d'etanol.

PROBLEMES ACTUALS DELS LLEVATS CERVESERS

Les propietats de floculació i atenuació són paràmetres crítics en la selecció de soques de llevat per a processos cervesers industrials. Aquestes dues característiques estan sovint interrelacionades: una floculació prematura o excessiva pot provocar una atenuació incompleta (fermentació «aturada»), ja que les cèl·lules sedimenten abans d'haver consumit tots els sucres disponibles. Per contra, una floculació insuficient pot dificultar la clarificació de la cervesa, cosa que pot requerir processos addicionals de separació (centrifugació, filtració) i afectar negativament la qualitat final (Karabín *et al.*, 2018).

L'atenuació, que reflecteix l'eficiència de la conversió de sucres en alcohol (mesurable per la disminució de la

densitat del most), és un factor determinant de l'eficiència global del procés i del contingut alcohòlic final. Soques amb baixa capacitat d'atenuació poden deixar un contingut elevat de sucres residuals, la qual cosa afecta el cos i la dolçor de la cervesa, i representar una pèrdua d'eficiència. La millora de l'atenuació, per exemple, augmentant la capacitat d'utilitzar sucres complexos com la maltotriosa o les dextrines, és un objectiu clau de la biotecnologia aplicada als llevats cervesers (Karabín *et al.*, 2018). A més, perquè el grau d'atenuació sigui alt, també és necessari que el contingut de sucre inicial del most sigui alt, de manera que el llevat maximitza l'eficiència amb la qual utilitza aquest sucre (Bamforth i Cook, 2019). A l'apartat següent mostrarem com s'associa un major grau d'atenuació mitjançant l'enginyeria genètica per fer que els llevats puguin fermentar el nombre més elevat de sucres possible.

La floculació és essencial per a la separació eficient del llevat al final de la fermentació primària, especialment en sistemes tradicionals sense filtració o centrifugació. El grau i moment òptims de floculació varien segons el tipus de cervesa i el disseny del procés. Una floculació massa ràpida condueix a baixa atenuació, mentre que una floculació tardana o feble complica la collita del llevat i la clarificació. Encara que l'addició de calci pot afavorir la floculació en algunes soques, el control precís d'aquest fenomen depèn principalment de factors genètics intrínsecs del llevat (Bamforth i Cook, 2019). La modulació genètica de la floculació és, per tant, una altra àrea d'interès biotecnològic.

ESTRATÈGIES BIOTECNOLÒGIQUES PER A LA MILLORA DELS LLEVATS CERVESERS

En el context de la millora de les propietats tecnològiques dels llevats cervesers, especialment en termes de floculació i atenuació, s'han explorat diverses estratègies biotecnològiques amb l'objectiu d'obtenir soques més eficients i adaptades als requisits de la indústria. La taula 2 recull de manera comparativa les principals tècniques emprades en aquest àmbit, des de mètodes clàssics com la hibridació i la mutagènesi aleatòria fins a enfocaments més moderns i precisos com l'enginyeria genètica dirigida, l'enginyeria metabòlica i l'ús de la tecnologia CRISPR/Cas9. Aquesta classificació permet entendre el grau de complexitat, especificitat i aplicabilitat de cada tècnica, així com el seu potencial per introduir millores concretes en les soques de *Saccharomyces* i altres llevats utilitzats en la producció de cervesa.

Taula 2. Principals tècniques de millora biotecnològica dels llevats

TÈCNiques	DESCRIPCIÓ	ARTICLES
Hibridació	Consisteix a creuar dues soques per obtenir el fenotip «ideal» del llevat combinant les propietats específiques que es volen conservar de cada soca. És un procés bastant aleatori.	Iorizzo <i>et al.</i> , 2021; Nikulin <i>et al.</i> , 2018; Wauters <i>et al.</i> , 2023.
Mutagènesi aleatòria: mutació dels gens mitjançant llum ultraviolada (UV) o mutàgens químics	S'indueix una mutació dels gens del llevat mitjançant llum ultraviolada o mutàgens químics. No s'utilitza gaire actualment, ja que, en produir-se mutacions aleatòries, requereix un procés de selecció laboriós i complex. També hi poden tenir lloc mutacions no desitjades i provocar inconvenients.	Wang i Hou, 2010.
Genètica molecular: tècniques d'enginyeria de l'ADN recombinant	Consisteix a introduir un gen prèviament seleccionat per produir proteïnes recombinants. Els vectors introduïts també contenen gens de resistència de l'antibiòtic de selecció. Existeix la possibilitat d'introduir el gen dins el genoma del llevat. Són tècniques molt útils quan els gens estan associats a trets concrets.	Chao <i>et al.</i> , 2015; Gnügge i Rudolf, 2017.
Genètica molecular: tècnica d'enginyeria metabòlica dirigida	Permet modificar específicament la informació genètica i el fenotip. És necessari un coneixement exhaustiu de les vies metabòliques implicades en el procés que volem alterar, de manera que podem incorporar o silenciar gens que produeixen o inhibeixen enzims que modifiquin aquestes vies.	Cejnar <i>et al.</i> , 2016 i 2017.
Tècnica CRISPR/Cas9	És una tècnica de recombinació homòloga que permet l'edició genètica dirigida amb una alta eficiència d'integració del gen.	Raschmanová <i>et al.</i> , 2018; Walter <i>et al.</i> , 2016.

Font: Elaboració pròpia.

MILLORES BIOTECNOLÒGIQUES DE LA FLOCULACIÓ

La floculació en *Saccharomyces* està controlada principalment per una família de gens anomenats *Flo* (com *Flo1*, *Flo5*, *Flo9*, *Flo10*, *Flo11*), que codifiquen per a les proteïnes floculines, encarregades de l'agregació entre les cèl·lules de llevat. L'expressió d'aquests gens és complexa i està regulada per diversos factors ambientals i vies de senyalització intracel·lular, incloent la concentració de calci i, de manera important, la via de la integritat de la paret cel·lular (CWI, *cell wall integrity pathway*) (Wang *et al.*, 2023).

La via CWI s'activa en resposta a diferents tipus d'estrès que afecten la paret cel·lular (tèrmic, osmòtic, químic) i és crucial per mantenir l'homeòstasi d'aquesta estructura. S'ha demostrat que aquesta via també regula l'expressió dels gens *Flo*. Un component clau és la proteïna quinasa activada per mitògens (MAPK) Slt2. La fosforilació i activació de Slt2 en resposta a l'estrès de paret condueixen a l'activació de factors de transcripció que regulen els gens *Flo*, cosa que promou l'agregació cel·lular. De fet, la delecció del gen *Slt3* generalment suprimeix la floculació (Sariki *et al.*, 2019).

Un altre gen determinant en la floculació és l'*Rlm1*, que codifica per un factor de transcripció que també es troba involucrat en la via de senyalització CWI, el qual, en

fosforilar-se per la Slt2, activa la transcripció de gens involucrats en la biosíntesi i manteniment de la paret cel·lular (Sariki *et al.*, 2019; Wang *et al.*, 2023). Sariki *et al.* (2019) van proposar un model per a la regulació de la floculació per la via CWI, en què l'activació de Slt2 i *Rlm1* conduiria a la desrepressió dels gens *Flo* mitjançant la modulació de complexos repressors com Tup1/Cyc8, possiblement amb la intervenció d'altres factors com *Sen1*. Quan el llevat està sotmès a condicions d'estrès —com ara agents que danyen la paret cel·lular o temperatures elevades— o mutacions genètiques, es produeixen canvis en la composició bioquímica de la paret cel·lular. Aquests canvis activen la via CWI mitjançant la fosforilació de la proteïna quinasa Slt2. Un cop activada, Slt2 segueix una translocació al nucli, on activa *Rlm1*. Aquest, en cooperació amb factors de transcripció generals com TBP, Pol II i el complex remodelador de cromatina SWI/SNF, forma el complex preiniciador (PIC), que permet l'expulsió del repressor Tup1 i transforma l'estat repressor (*off*) dels gens *Flo* en un estat actiu (*on*). *Sen1* actua com a facilitador d'aquest procés, probablement en cooperació amb *Rlm1* i altres components de la

«La floculació en *Saccharomyces* està controlada principalment per una família de gens anomenats *Flo*.»

maquinària transcripcional, cosa que afavoreix l'expressió dels gens responsables de la floculació.

La comprensió d'aquests mecanismes reguladors obre vies per a la manipulació biotecnològica de la floculació, per exemple, modificant l'expressió o activitat de components clau de la via CWI (Slr2, *Rlm1*) o directament dels gens *Flo*, per ajustar el fenotip floculant a les necessitats específiques del procés cerveser. No obstant això, la implementació pràctica d'aquestes modificacions en soques industrials requereix una consideració acurada dels possibles efectes pleiotròpics sobre altres característiques del llevat.

MILLORES BIOTECNOLÒGIQUES DE LA CAPACITAT D'ATENUACIÓ

Un factor limitant clau per a l'atenuació completa en molts llevats cervesers és la seva capacitat limitada per transportar i metabolitzar la maltotriosa. S'ha identificat que algunes soques, com certes variants de *S. eubayanus*, posseeixen transportadors de maltotriosa més eficients, codificats per gens de la família *Malt* (com *Malt1-4*). Mitjançant tècniques d'ADN recombinant, s'ha aconseguit sobreexpressar aquests gens en soques que originalment no podien utilitzar la maltotriosa de manera eficient i millorar significativament el seu grau d'atenuació (Baker i Hittinger, 2019).

Una altra estratègia reeixida ha estat la hibridació inter-específica (taula 2). Es va demostrar que, hibridant una soca parental de *S. cerevisiae* i el llevat de referència *S. pastorianus*, s'obté una fermentació més ràpida i una major atenuació (Mertens *et al.*, 2015). Amb la mateixa tècnica, s'ha assolit una millora de la capacitat d'atenuació utilitzant soques de *S. arboricola*, *S. mikatae* i *S. uvarum*, de manera que es permet l'ús d'híbrids artificials, com a alternativa de *S. pastorianus*, per a la producció de cerveses *lager* (Nikulin *et al.*, 2018). La creació d'aquests nous híbrids amplia la diversitat genètica disponible per als cervesers i permet explorar noves combinacions de rutes metabòliques per optimitzar el rendiment (Cubillos *et al.*, 2019).

A més de la capacitat d'utilitzar sucres específics, altres factors com el grau de ploïdia poden influir en l'atenuació, possiblement a través de l'efecte de dosi gènica sobre enzims clau de la fermentació (Gibson *et al.*, 2017). Com s'ha mencionat anteriorment, les condicions del most, com la concentració inicial de sucres, també tenen un paper en l'eficiència global de l'atenuació (Bamforth i Cook, 2019). L'enginyeria metabòlica dirigida a optimitzar el flux a través de la via glicolítica o a millorar la

«La creació d'aquests nous híbrids amplia la diversitat genètica disponible per als cervesers.»

tolerància a l'estrès (etanòlic, osmòtic) representa una altra via per potenciar la capacitat d'atenuació dels llevats.

CONCLUSIONS

L'enginyeria genètica i la biotecnologia ofereixen eines poderoses per a l'optimització dels llevats cervesers, que permeten potenciar característiques desitjables com l'atenuació i la floculació i minimitzar trets indesitjables (per exemple, producció de compostos aromàtics desagradables). El camp de la millora biotecnològica dels llevats està en constant evolució i ofereix solucions potencials a reptes persistents de la indústria cervesera.

Estratègies com la hibridació de soques i l'ús de tècniques d'ADN recombinant han demostrat ser eficaces per millorar les propietats fermentatives, incloent-hi l'atenuació, i per generar noves variants de llevats (per exemple, híbrids per a *lager*) amb rendiments optimitzats. Aquestes aproximacions augmenten l'eficiència del procés productiu, tant en termes de temps com d'utilització de recursos.

Pel que fa a la floculació, tot i que s'ha avançat significativament en la comprensió dels mecanismes moleculars subjacents (implicació de la via CWI i els gens *Flo*), sembla necessari aprofundir en l'aplicació pràctica d'aquests coneixements per a la modulació fina i controlada d'aquesta propietat en el context industrial cerveser. Una limitació observada durant aquesta revisió ha estat la relativa escassetat d'estudis publicats que demostrin millores concretes de la floculació mitjançant enginyeria genètica directament aplicades i validades en producció de cervesa, tot i que la base de coneixement sobre els gens implicats en *S. cerevisiae* és sòlida.

En conclusió, les tècniques de millora genètica de llevats representen una àrea de gran potencial per a la indústria cervesera. No només permeten abordar problemes existents, sinó que també obren noves vies per a la innovació, el desenvolupament de nous estils de cervesa i l'adaptació als reptes futurs del sector, com la sostenibilitat i la demanda de productes diferenciats.

REFERÈNCIES

- ASTOLA, A.; DURÁN-GUERRERO, E.; DÍAZ, A. B.; LASANTA, C.; CASTRO, R. (2023). «Impact of the genetic improvement of fermenting yeasts on the organoleptic properties of beer». *European Food Research and Technology* [en línia], 249 (7), p. 1677-1687. <<https://doi.org/10.1007/s00217-023-04251-8>>.
- BAKER, E. P.; HITTINGER, C. T. (2019). «Evolution of a novel chimeric maltotriose transporter in *Saccharomyces eubayanus* from parent proteins unable to perform this function». *PLOS Genetics* [en línia], 15 (4), e1007786. <<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007786>>.
- BAMFORTH, C. W. (2006). «Brewing: New technologies». A: BAMFORTH, C. W. (ed.). *Brewing: New technologies* [en línia]. Londres: Elsevier Inc. <<https://doi.org/10.1533/9781845691738>>.
- BAMFORTH, C. W.; COOK, D. J. (2019). *Food, fermentation, and microorganisms* [en línia]. Nova York: John Wiley & Sons Ltd. <<https://doi.org/10.1002/9781119557456>>.
- BAXTER, E. D.; HUGHES, P. S. (2003). *Cerveza: Calidad, higiene y características nutricionales* [en línia]. Saragossa: Acribia. <https://www.editorialacribia.com/libro/cerveza-calidad-higiene-y-caracteristicas-nutricionales_53683/> [Consulta: 10 abril 2025].
- CEJNAR, R.; HLOŽKOVÁ, K.; JELÍNEK, L.; KOTRBA, P.; DOSTÁLEK, P. (2017). «Development of engineered yeast for biosorption of beer haze-active polyphenols». *Applied Microbiology and Biotechnology* [en línia], 101 (4), p. 1477-1485. <<https://doi.org/10.1007/s00253-016-7923-8>>.
- CEJNAR, R.; HLOŽKOVÁ, K.; KOTRBA, P.; DOSTÁLEK, P. (2016). «Surface-engineered *Saccharomyces cerevisiae* displaying α -acetolactate decarboxylase from *Acetobacter acetii* ssp. *Xylinum*». *Biotechnology Letters* [en línia], 38 (12), p. 2145-2151. <<https://doi.org/10.1007/s10529-016-2205-1>>.
- CHAO, R.; YUAN, Y.; ZHAO, H. (2015). «Recent advances in DNA assembly technologies». *FEMS Yeast Research* [en línia], 15 (1), p. 1-9. <<https://doi.org/10.1111/10.1111/1567-1364.12171>>.
- CUBILLOS, F. A.; GIBSON, B.; GRIJALVA-VALLEJOS, N.; KROGERUS, K.; NIKULIN, J. (2019). «Bioprospecting for brewers: Exploiting natural diversity for naturally diverse beers». *Yeast* [en línia], 36 (6), p. 383-398. <<https://doi.org/10.1002/yea.3380>>.
- GALLONE, B.; STEENSELS, J.; PRAHL, T.; SORIAGA, L.; SAELS, V.; HERRERA-MALAYER, B.; MERLEVEDE, A.; RONCORONI, M.; VOORDECKERS, K.; MIRAGLIA, L.; TEILING, C.; STEFFY, B.; TAYLOR, M.; SCHWARTZ, A.; RICHARDSON, T.; WHITE, C.; BAELE, G.; MAERE, S.; VERSTREPEN, K. J. (2016). «Domestication and divergence of *Saccharomyces cerevisiae* beer yeasts». *Cell* [en línia], 166 (6), p. 1397-1410.e16. <<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.020>>.
- GIBSON, B.; DAHABIEH, M.; KROGERUS, K.; MAGALHÃES, F. (2020). «Adaptive laboratory evolution of brewing yeast for improved fermentation performance». *FEMS Yeast Research* [en línia], 20 (7), foaa057. <<https://doi.org/10.1093/femsyr/foaa057>>.
- GIBSON, B.; GEERTMAN, J.-M. A.; HITTINGER, C. T.; KROGERUS, K.; LIBKIND, D.; LOUIS, E. J.; MAGALHÃES, F.; SAMPAIO, J. P. (2017). «New yeasts—new brews: Modern approaches to brewing yeast design and development». *FEMS Yeast Research* [en línia], 17 (4). <<https://doi.org/10.1093/femsyr/fox038>>.
- GIBSON, B. R.; STORGÅRDS, E.; KROGERUS, K.; VIDGREN, V. (2013). «Comparative physiology and fermentation performance of Saaz and Froberg lager yeast strains and the parental species *Saccharomyces eubayanus*». *Yeast* [en línia], 30 (7), p. 255-266. <<https://doi.org/10.1002/YEA.2960>>.
- GNÜGGE, R.; RUDOLF, F. (2017). «*Saccharomyces cerevisiae* shuttle vectors». *Yeast* [en línia], 34 (5), p. 205-221. <<https://doi.org/10.1002/yea.3228>>.
- HUGHES, G. (2014). *Cómo elaborar cerveza casera*. Barcelona: Ediciones Omega.
- IORIZZO, M.; COPPOLA, F.; LETIZIA, F.; TESTA, B.; SORRENTINO, E. (2021). «Role of yeasts in the brewing process: tradition and innovation». *Processes* 2021 [en línia], 9 (5), p. 839. <<https://doi.org/10.3390/PR9050839>>.
- JEYARAM, K.; RAI, A. K. (2017). «Role of yeasts in food fermentation». *Yeast Diversity in Human Welfare* [en línia], p. 83-113. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-26218_4>.
- KARABÍN, M.; JELÍNEK, L.; KOTRBA, P.; CEJNAR, R.; DOSTÁLEK, P. (2018). «Enhancing the performance of brewing yeasts». *Biotechnology Advances* [en línia], 36 (3), p. 691-706. <<https://doi.org/10.1016/J.BIOTECHADV.2017.12.014>>.
- MAICAS, S. (2020). «The role of yeasts in fermentation processes». *Microorganisms* [en línia], 8 (8), 1142. <<https://doi.org/10.3390/microorganisms8081142>>.
- MERTENS, S.; STEENSELS, J.; SAELS, V.; ROUCK, G. de; AERTS, G.; VERSTREPEN, K. J. (2015). «A large set of newly created interspecific *Saccharomyces hybrids* increases aromatic diversity in lager beers». *Applied and Environmental Microbiology* [en línia], 81 (23), p. 8202-8214. <https://doi.org/10.1128/AEM.0246415/SUPPL_FILE/ZAM999116762SO1.PDF>.
- NIKULIN, J.; KROGERUS, K.; GIBSON, B. (2018). «Alternative *Saccharomyces* interspecies hybrid combinations and their potential for low-temperature wort fermentation». *Yeast* [en línia], 35 (1), p. 113-127. <<https://doi.org/10.1002/yea.3246>>.
- RASCHMANOVÁ, H.; WENINGER, A.; GLIEDER, A.; KOVAR, K.; VOGL, T. (2018). «Implementing CRISPR-Cas technologies in conventional and non-conventional yeasts: Current state and future prospects». *Biotechnology Advances* [en línia], 36 (3), p. 641-665. <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.01.006>>.
- SARIKI, S. K.; KUMAWAT, R.; SINGH, V.; TOMAR, R. S. (2019). «Flocculation of *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on activation of Slt2 and Rlm1 regulated by the cell wall integrity pathway». *Molecular Microbiology* [en línia], 112 (4), p. 1350-1369. <<https://doi.org/10.1111/mmi.14375>>.
- SCHWARZHANS, J.-P.; LUTTERMANN, T.; GEIER, M.; KALINOWSKI, J.; FRIEHS, K. (2017). «Towards systems metabolic engineering in *Pichia pastoris*». *Biotechnology Advances* [en línia], 35 (6), p. 681-710. <<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.07.009>>.
- STEWART, G. G.; RUSSELL, I.; ANSTRUTHER, A. (2017). *Handbook of brewing* [en línia]. 3a ed. Boca Raton, Florida: CRC Press. <<https://doi.org/10.1201/9781351228336>>.
- VERBELEN, P. J.; SCHUTTER, D. P. de; DELVAUX, F.; DELVAUX, F. R. (2006). «The role of flocculation in brewing». *Yeast* [en línia], 23 (6), p. 411-436. <<https://doi.org/10.1002/yea.1374>>.
- WALKER, G.; STEWART, G. (2016). «*Saccharomyces cerevisiae* in the production of fermented beverages». *Beverages* [en línia], 2 (4), p. 30. <<https://doi.org/10.3390/beverages2040030>>.
- WALTER, J. M.; CHANDRAN, S. S.; HORWITZ, A. A. (2016). «CRISPR-Cas-assisted multiplexing (CAM): Simple same-day multi-locus engineering in yeast». *Journal of Cellular Physiology* [en línia], 231 (12), p. 2563-2569. <<https://doi.org/10.1002/jcp.25375>>.
- WANG, H.; HOU, L. (2010). «Genome shuffling to improve fermentation properties of top-fermenting yeast by the improvement of stress tolerance». *Food Science and Biotechnology* [en línia], 19 (1), p. 145-150. <<https://doi.org/10.1007/s10068-010-0020-3>>.
- WANG, X.; ZHANG, Y.; WANG, Y.; FU, X.; MU, Y.; GUO, L.; LIU, X.; WU, X.; CHEN, Y. (2023). «Revealing potential genes affecting flocculation and/or viability of *Saccharomyces pastorianus* by comparative genomic analysis». *Journal of Agricultural and Food Chemistry* [en línia], 71 (41), p. 15417-15428. <<https://doi.org/10.1021/acs.jafc.3c06585>>.
- WAUTERS, R.; HERRERA-MALAYER, B.; SCHREURS, M.; BIRCHAM, P.; CAUTEREELS, C.; CORTEBEECK, J.; DUFFIN, P. M.; STEENSELS, J.; VERSTREPEN, K. J. (2023). «Novel *Saccharomyces cerevisiae* variants slow down the accumulation of staling aldehydes and improve beer shelf-life». *Food Chemistry* [en línia], 398, 133863. <<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2022.133863>>.