

## REUTILIZACIÓN DE LA LEVADURA EN FERMENTACIONES DE LA CERVEZA: SIMULACIONES POR ORDENADOR

Marta Ginovart<sup>1\*</sup>, Xavier Portell<sup>2</sup> y Moisés Silbert<sup>3</sup>

1: Departamento de Matemática Aplicada III  
Escuela Superior de Agricultura de Barcelona  
Universidad Politécnica de Cataluña  
Edifici D4. Avda. Canal Olímpic, 15. 08860-Castelldefels (Barcelona) Spain  
e-mail: marta.ginovart@upc.edu

2: Departamento de Ingeniería Agroalimentaria y Biotecnología  
Escuela Superior de Agricultura de Barcelona  
Universidad Politécnica de Cataluña  
Edifici D4. Avda. Canal Olímpic, 15. 08860-Castelldefels (Barcelona) Spain  
e-mail: xavier.portell@upc.edu

3: Institute of Food Research  
Norwich Research Park, Colney  
Norwich NR4 7UA, UK  
e-mail: moises.silbert@BBSRC.AC.UK

**Palabras clave:** Reutilización de levadura, edad genealógica, Modelo basado en el individuo, INDISIM-YEAST.

**Resumen.** Las fermentaciones industriales de cerveza no desechan la levadura después de su uso y la reutilizan varias veces. La selección artificial de una población enriquecida con células vírgenes, jóvenes, o de edad avanzada, influye en el rendimiento de una fermentación. El objetivo de este trabajo es mostrar y explorar las posibilidades de utilizar la modelización basada en el individuo y el simulador INDISIM-YEAST para el estudio del efecto de las edades genealógicas de las células de levadura en los perfiles de la fermentación. Simulaciones con inóculos de células de edades diferentes han generado evoluciones distintas.

### 1. INTRODUCCIÓN

La levadura *Saccharomyces cerevisiae* tiene una vida replicativa útil limitada. Cada célula

dentro de una población es sólo capaz de realizar un número finito de divisiones antes de su senectud y muerte. El envejecimiento replicativo de la levadura es función del número de divisiones o gemaciones emprendidas por una célula individual, y puede ser medido enumerando el número de cicatrices que cada una de las gemas ha ido dejando en su membrana celular (edad genealógica). Estudios sobre el envejecimiento en cepas cerveceras y de laboratorio han indicado que como consecuencia de la senescencia, las células de levadura están sujetas a cambios morfológicos, metabólicos y genéticos [1, 2]. Las fermentaciones industriales que se realizan para producir cerveza son las únicas dentro de la industria de bebidas alcohólicas en las que la levadura no es desechada después de su uso, ya que se mantiene y se reutiliza varias veces en un proceso llamado «serial repitching» [1, 2]. La tarea de asegurar tanto la calidad de la cerveza producida como mantener la vitalidad de la levadura, expone a ésta a un número considerable de tensiones o “stresses”.

Hacia el final de las fermentaciones cerveceras, el contenido del recipiente se enfría hasta 2-4°C, lo que facilita la sedimentación de la levadura en la estructura cónica del fermentador, con las células grandes depositándose más rápidamente que las células más pequeñas. Esto conduce a que las células más viejas son más abundantes en la parte baja de la estructura que en la parte superior, produciéndose una estratificación por edades genealógicas. La presencia de un gradiente de edad dentro de este recipiente en forma de cono es significativa, ya que pueden ser diversos los mecanismos por los cuales se extrae la levadura que será reutilizada en las siguientes fermentaciones, generando por tanto poblaciones de características distintas [1, 2].

En este trabajo haremos uso de los modelos basados en los individuos (Individual-based Models, IbMs), en los que los elementos bióticos y abióticos del conjunto interactúan dinámicamente entre sí como componentes estructurales del sistema virtual. Este tipo de modelización discreta ya se ha utilizado para abordar el estudio de cultivos bacterianos [3] y para tratar con distintos aspectos de los cultivos de levaduras [4, 5]. El simulador INDISIM-YEAST, que utiliza como referencia la célula *S. cerevisiae*, modeliza el comportamiento de una población virtual de levaduras mediante el establecimiento de normas de actuación para cada célula, de acuerdo a sus propias reglas biológicas (absorción de nutriente, metabolización de éste, reproducción por gemación, viabilidad, etc.) y a sus características individuales (biomasa, edad genealógica o número de gemas producidas, fase y estado en el ciclo de reproducción celular por gemación, vitalidad, etc) [4, 5].

El trabajo de Powell y co-autores han proporcionado pruebas que sugieren que la selección artificial para una población de levaduras enriquecida con células vírgenes (células hijas que aún no han gemado), o con células jóvenes (células madre con pocas cicatrices) o con células viejas (células con muchas cicatrices, de edad genealógica avanzada) puede influir en el rendimiento de la fermentación [2]. El objetivo de este trabajo es mostrar y explorar las posibilidades de utilizar el simulador INDISIM-YEAST para abordar el estudio del impacto que tiene la selección de las edades genealógicas de las células de levadura en los perfiles de la fermentación, así como mostrar las posibilidades de futuro en el diseño de una versión específica del modelo para el estudio del proceso que tiene lugar en la fermentación cervecera, que contemple la manipulación y reutilización que se hace de la levadura.

## 2. EL MODELO DE SIMULACIÓN INDISIM-YEAST

La descripción detallada del primer simulador INDISIM aplicado al estudio de cultivos bacterianos, y los principales conceptos en la modelización y simulación de los cultivos de levaduras, se pueden encontrar en trabajos anteriores de Ginovart y co-autores [3, 4].

INDISIM-YEAST es discreto en el espacio y el tiempo. El dominio físico donde tiene lugar la fermentación se divide en pequeños cubos espaciales que contienen medio líquido con células de levadura, partículas de glucosa como nutriente principal y partículas de etanol como producto excretado. El tiempo de evolución de la población de levadura se divide en intervalos iguales que identificamos como pasos de tiempo o pasos de programa. El simulador tiene diferentes secciones: (i) inicialización, con la introducción de datos que fija la configuración inicial de la población y del medio donde ésta evolucionará, (ii) bucle principal (paso del tiempo), donde acciones sobre cada una de las células de levadura y sobre el medio se llevan a cabo, hasta el término de la simulación, y (iii) generación de datos al final de cada paso de tiempo para obtener los resultados. Se modeliza el comportamiento de cada una de las levaduras mediante las siguientes acciones: (a) movimiento, (b) absorción de glucosa, (c) mantenimiento celular, (d) producción de nueva biomasa, (e) excreción al exterior del etanol, (f) reproducción por gemación con dos fases diferenciadas, la fase 1 o de no gemación, donde la célula se prepara para generar una nueva gema, y la fase 2 o de gemación, donde la gema crece hasta poder separarse de la célula madre, apareciendo una nueva levadura hija, de edad genealógica 0 (o célula virgen), con lo que la célula madre incrementa en uno el número de sus cicatrices, (g) control de la viabilidad celular, con la posible pérdida de ésta, etc. Cada célula de levadura se caracteriza por: i) su biomasa, que la podemos relacionar con una geometría esférica para obtener su superficie celular, ii) su edad de genealógica o número de cicatrices de su membrana celular, iii) el estado en el ciclo reproductor, con las masas y los tiempos de permanencia de la madre y de la gema en cada una de las fases y, iv) tiempo que puede sobrevivir sin satisfacer las necesidades metabólicas de mantenimiento. Tanto para caracterizar cada una de las células de levadura como para implementar las acciones individuales, se utilizan variables aleatorias con determinadas distribuciones de probabilidad [4, 5].

En el desarrollo de las distintas partes del modelo de levadura se tienen en cuenta, entre otros, los efectos derivados de: a) las cicatrices provocadas por las gemas, ya que estas afectan a la membrana celular, b) del estrés químico causado por el etanol del medio sobre la célula, que frena la producción de nueva biomasa, c) el aumento de volumen o biomasa de las células madres que pasan por sucesivas generaciones aumentando su edad genealógica, y d) las distintas duraciones de las fases de gemación y de no gemación, ya que éstas requieren condicionantes tanto de tiempo de permanencia como de incrementos de masas específicos para pasar de una a otra [4, 5].

La simulación puede devolver un gran número de variables que pueden clasificarse en variables orientadas hacia la presentación de las características globales del sistema, y variables pertenecientes a las células de levadura individuales [4, 5]. En el primer grupo encontramos diversas evoluciones temporales: número de partículas de glucosa, número

de partículas de etanol, consumo medio de nutriente (número de partículas de nutrientes metabolizadas en un paso del tiempo dividido por el número total de células viables), número de células viables, número de células no viables, biomasa viable de levadura, biomasa no viable de levadura, disipación de calor del sistema, y energía de mantenimiento de la población (número de partículas de nutriente metabolizadas no usadas en la producción de nueva biomasa). En el segundo grupo de variables encontramos las distribuciones de la edad genealógica y las distribuciones de masa del conjunto de células del sistema, lo que posibilita conocer la estructura de la población a lo largo de la fermentación. En la página Web <https://aneto.upc.es/simulacio/hoja-portada> se puede encontrar una versión base de INDISIM-YEAST que permite ejecutar simulaciones de fermentaciones, y visualizar las representaciones gráficas de algunas de las variables controladas por el simulador.

### 3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Para iniciar el estudio del impacto de la selección de las edades genealógicas de las células en la fermentación, se llevaron a cabo con INDISIM-YEAST cuatro simulaciones, variando únicamente este parámetro edad en el inóculo inicial. La obtención de los inóculos se hizo utilizando una simulación de fermentación, que produjo una población heterogénea de células, con distintas edades genealógicas, y por tanto, con distintas biomásas. De esta población virtual generada, se escogieron como inóculos para las siguientes simulaciones, células de características diferentes: una célula de edad genealógica 0 (célula virgen o hija), una de edad genealógica 3 (con tres cicatrices), otra de edad 7 y finalmente otra de edad 10. Los resultados obtenidos para estas cuatro simulaciones mostraron que la edad de la célula inicial tenía influencia en el crecimiento de la población, y en la tasa de utilización de azúcar y producción de etanol (Figuras 1 y 2). Las características individuales de estas células iniciales, y principalmente su ciclo reproductor, su capacidad para crecer y multiplicarse, condicionaron la evolución de la población resultante (Figura 1). Como sugiere Powell y co-autores [2], y nuestras simulaciones reflejan, las células vírgenes no cumplen con los requisitos necesarios para la reproducción, y necesitan de un mayor tiempo de permanencia en la primera fase del ciclo reproductor, fase previa a la gemación y proliferación, generando una fase de latencia mayor. Necesitan alcanzar un cierto tamaño “crítico”, para lo que deben asimilar nutrientes y convertirlos en nueva biomasa, destinando la etapa inicial de la fermentación a este proceso.

Estos primeros resultados obtenidos con el simulador sintonizan con los resultados experimentales y la discusión que presentan Powell y co-autores [1, 2]. Cada uno de los inóculos simulados produjo un perfil distinto de fermentación, siendo más significativa la diferencia entre la célula virgen y la célula joven, que entre células madre con varias cicatrices (Figura 2). Esto indica que un cultivo enriquecido con células hijas o con células madres realizaría la fermentación de una manera diferente. Este comportamiento se puede explicar a partir del efecto que tiene la relación superficie celular respecto al volumen celular, los tamaños de edades distintas, y las duraciones de las dos fases del ciclo

reproductor [1, 2], aspectos que ya incorpora nuestro modelo de simulación INDISIM-YEAST [4, 5]. No obstante, existen también otros factores que deben comprenderse y considerarse para realizar un estudio más profundo sobre los mecanismos precisos del envejecimiento de la levadura y su impacto sobre la fermentación cervecera [1, 2].

Estos primeros resultados muestran que un simulador como INDISIM-YEAST, que tiene la capacidad de modelizar aspectos diversos a nivel de célula e integrarlos en la dinámica de una población, brinda una oportunidad interesante e indiscutible para avanzar en el conocimiento y comprensión de estos fenómenos, a la vez que puede servir para contrastar y comparar teorías actuales que se encuentran en discusión y que necesitan ser revisadas [1, 2].

Aunque los resultados obtenidos en estas simulaciones son promisorios, sugieren que este enfoque de modelización y simulación puede ayudar a los procedimientos más empíricos en decidir la selección de levaduras a usar en el proceso del “serial repitching”, así como avanzar en la comprensión de estos sistemas.

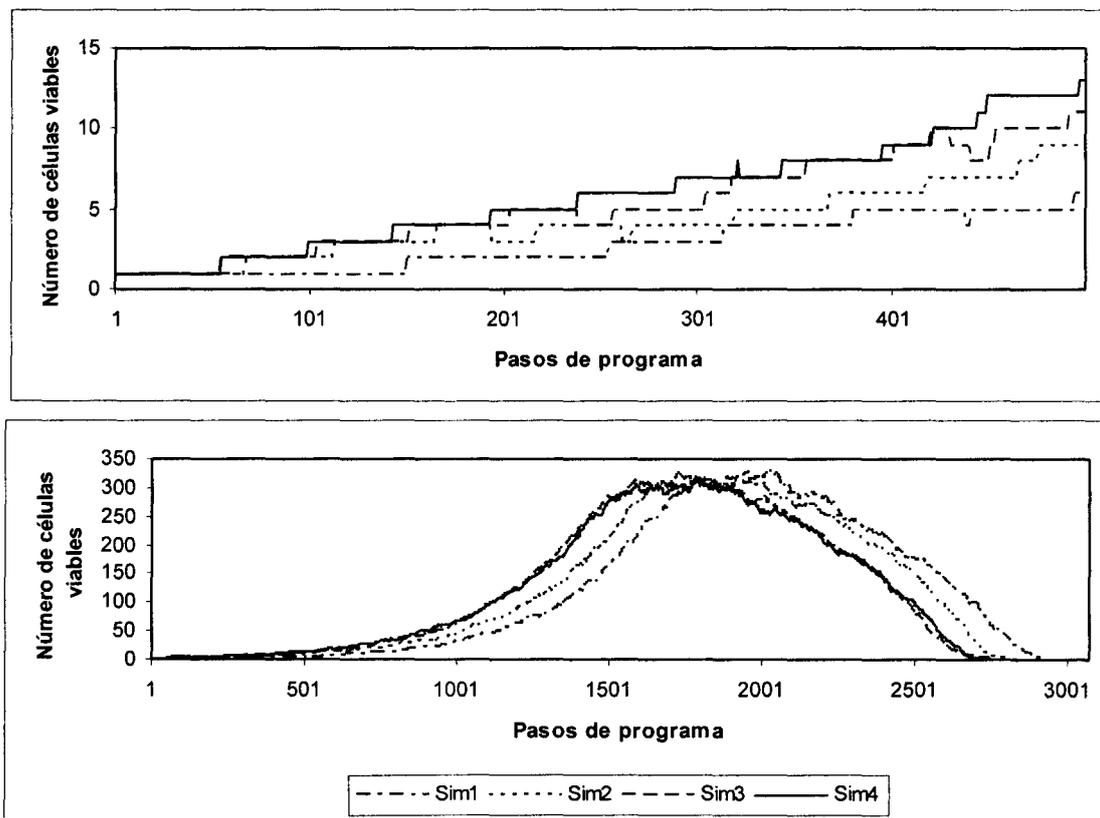


Figura 1. Evolución del número de células viables en las simulaciones de fermentación realizadas con INDISIM-YEAST. a) Detalle del crecimiento inicial, b) Evolución completa. La edad genealógica de la célula inicial que origina la población es: 0 en Sim1, 3 en Sim2, 7 en Sim3 y 10 en Sim4.

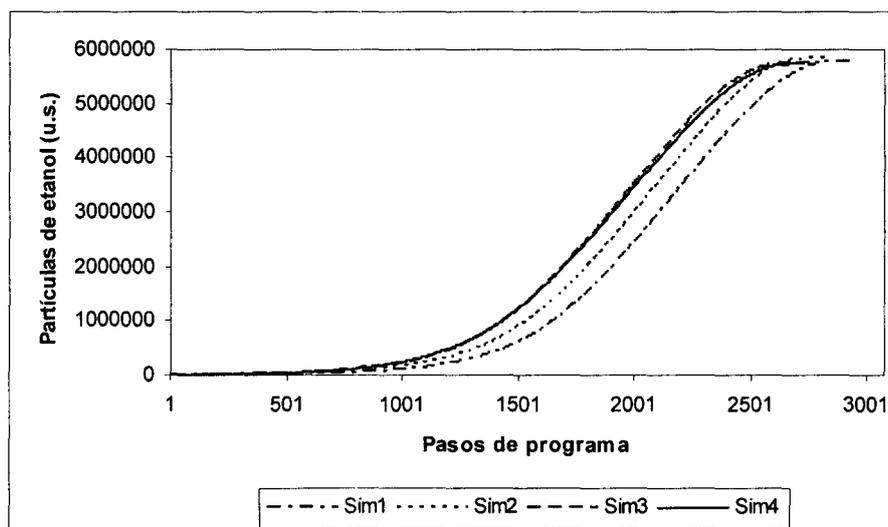


Figura 2. Evolución temporal del etanol producido por la población de levaduras en las simulaciones de fermentación realizadas con INDISIM-YEAST. La edad genealógica de la célula inicial que origina la población es: 0 en Sim1, 3 en Sim2, 7 en Sim3 y 10 en Sim4.

**Agradecimientos.** Reconocemos y agradecemos gratamente la ayuda financiera recibida del plan Nacional I+D+i del Ministerio de Educación y Ciencia CGL2007-65142/BOS, así como de la European Social Fund y AGAUR-Generalitat de Catalunya 2008FIA-00307. Agradecemos a la Dra. Rosa Carbó sus comentarios y sugerencias.

## REFERENCIAS

- [1] C.D. Powell, S.M. Van Zandycke, D.E. Quain y K.A. Smart, "Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentations", *Microbiology* Vol. **14**, pp. 1023-1034, (2000).
- [2] C.D. Powell, D.E. Quain y K.A. Smart, "The impact of brewing yeas cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation", *FEMS Yeast Research* Vol. **3**, pp. 149-157, (2003).
- [3] M. Ginovart, D. López y J. Valls, "INDISIM, an individual-based simulation model to study bacterial cultures", *J. Theor. Biol.* Vol. **214**, pp. 305-309, (2002).
- [4] M. Ginovart, J. Xifré, D. López y M. Silbert, *INDISIM-YEAST, an individual-based model to study yeast population in batch cultures*. En: A. Méndez-Vilas (Ed.), *Microbiology Book Series nº 1 Vol. 1, Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology*, Formatex, Badajoz (2007), pp. 401-409.
- [5] M. Ginovart y J.C. Cañadas, "INDISIM-YEAST: an individual-based simulator on a website for experimenting and investigating diverse dynamics of yeast populations in liquid media", *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* (in press).