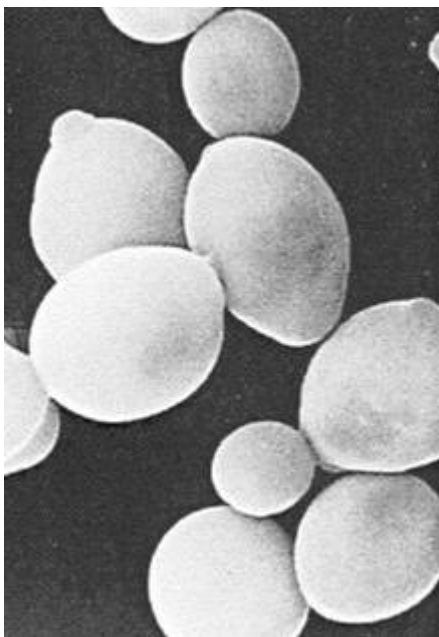


Evolución de *Saccharomyces cerevisiae*, el mejor amigo del hombre

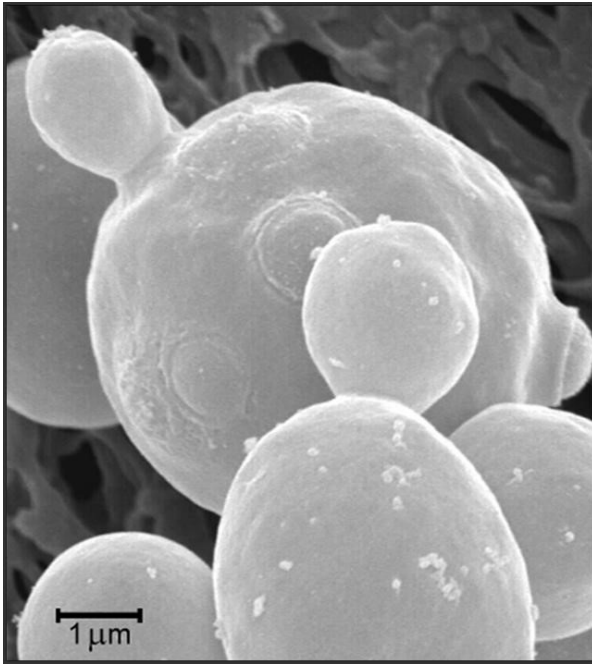
por Víctor Jiménez Cid.

Departamento de Microbiología II. Universidad Complutense de Madrid.

Cuando los bávaros promulgaron su famosa ley de la pureza de 1516 (*nur Hopfen, Malz und Wasser*, “solo lúpulo, malta y agua”) aún ignoraban “el cuarto elemento”, el responsable de la magia ancestral de la Ninkasi babilónica: la invisible levadura. Hasta que Louis Pasteur y sus contemporáneos no la responsabilizaron de la fermentación alcohólica hace tan solo siglo y medio, la levadura era una incógnita dentro de la ya desarrollada y milenaria tecnología cervecera. Hoy sabemos que cada cerveza requiere su levadura y que no es un simple ingrediente esencial sino la responsable de que la cerveza sea un alimento “vivo” hasta el momento del embotellado e, incluso, en el caso de las cervezas tradicionales o artesanales, en la propia botella.

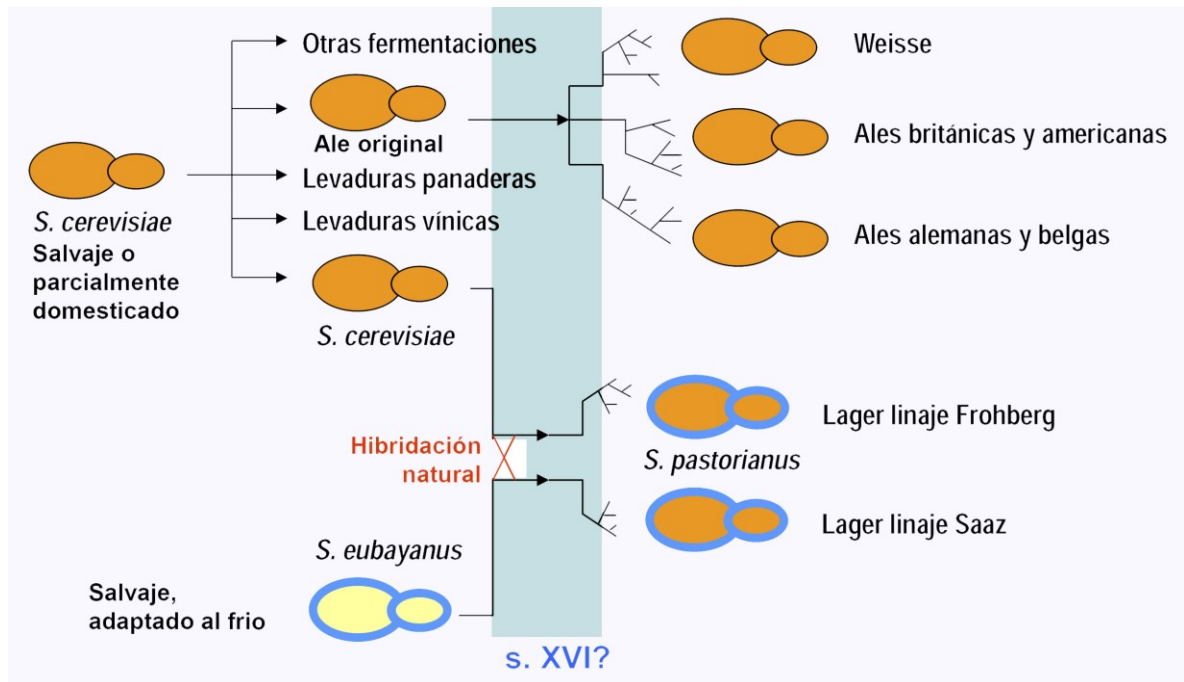


Inconscientemente, sin conocer su existencia, hemos domesticado y optimizado a este hongo desde el Neolítico. Los últimos estudios que la moderna tecnología genómica está permitiendo realizar avalan la hipótesis de que –al igual que en casos más tangibles, como los cereales, la vid, o las razas de animales de interés agropecuario o de compañía– la actividad humana ha seleccionado las cepas e híbridos más apropiados para la elaboración de nuestras bebidas fermentadas. Los análisis de genómica comparativa además muestran que la evolución hacia la domesticación de las levaduras cerveceras es especialmente rápida en comparación con las vnicas. Dos estudios publicados recientemente (Gonçalves et al., 2016; Gallone et al., 2016) por investigadores portugueses (el equipo de José Paulo Sampaio, Universidad Nueva de Lisboa) y belgas (el equipo de Kevin Verstrepen, en la Universidad de Lovaina) comparan por primera vez los genomas de 28 y 157 cepas de levadura, respectivamente.



Contrastar las secuencias genómicas permite a los investigadores trazar su historia evolutiva a partir de un hipotético ancestro común, lo que técnicamente se denomina filogenia. Las conclusiones de ambos estudios son similares: la variedad de cepas cerveceras de que disponemos hoy ha evolucionado a partir de unos pocos ancestros y divergen significativamente de las levaduras salvajes, lo que supone un claro ejemplo de domesticación. Aunque sin salir del complejo mosaico del mundo cervecero, también se han domesticado la cebada y el lúpulo a partir de sus primitivas variedades silvestres, si bien de manera más consciente.

Más moderna que el caso del lobo y el perro, que probablemente comenzó en las primitivas tribus de cazadores-recolectores, la domesticación de la invisible levadura se inició en las primeras sociedades sedentarias en las que se desarrolló la ganadería y la agricultura. Dichas sociedades se convirtieron así en asentamientos sostenibles que no requerían de la caza para subsistir y que son la base de nuestra civilización y cultura actuales. Teniendo además en cuenta la influencia del consumo de alguna bebida fermentada por *Saccharomyces* en muchas grandes decisiones de la historia, cabe preguntarse ahora ¿quién es “el mejor amigo del hombre”? Si tu respuesta es “el perro” sigues en el Paleolítico.



Investigando a la levadura en el s. XXI: la tecnología genómica

Desde que el danés Emil Christian Hansen (1842-1909) en los laboratorios Carlsberg en Copenhague aisló por primera vez en 1883 cultivos puros de la levadura lager que bautizó como *Saccharomyces carlsbergensis*, se han cocido muchas cosas. El trabajo de Hansen marcó un hito no solo en la industria cervecera, permitiendo la selección y cultivo puro de la levadura, sino en la historia de la Genética. Al abrigo de este descubrimiento múltiples investigadores comenzaron a desarrollar estudios genéticos en cepas diploides de *Saccharomyces cerevisiae*, lo que convirtió a esta levadura en un modelo ideal para demostrar las leyes de Mendel.

Gracias al esfuerzo de muchos científicos, algunos al abrigo de la industria cervecera para la mejora de cepas, en la década de los 80 del s. XX la levadura se había consagrado ya como un modelo básico de estudio en biología molecular y celular, así como en una plataforma para la biotecnología en el ámbito biosanitario (producción de fármacos recombinantes) y energético (producción de biodiésel). La secuencia de los 16 cromosomas del genoma de *S. cerevisiae*, publicada en 1996 supuso el conocimiento del primer genoma completo de un organismo eucariótico, pues hasta la fecha solo se habían descifrado genomas bacterianos, mucho más sencillos. En ella participamos 70 laboratorios europeos junto con otros de EE. UU. y Japón, allanando el camino para abordar con garantías la secuenciación de genomas más complejos, como el humano, cuyo borrador se publicó en los albores del milenio, en 2001. Este hito abrió la denominada “era post-genómica”, en la que la levadura ha seguido obviamente a la vanguardia. Podemos afirmar que *S. cerevisiae* es uno de los modelos biológicos mejor conocidos y más explotados en investigación. Baste mencionar que el premio Nobel de Medicina en 2016, Yoshimori Ohsumi, realizó sus trabajos sobre el proceso de autofagia esencialmente utilizando la levadura *S. cerevisiae* como modelo. El genoma de la cebada se publicaría en 2012, también a cargo de un consorcio internacional (IBGSC, 2012) y el del lúpulo en 2015 por un equipo japonés (Natsume et al., 2015). No obstante, hoy en día la tecnología ha evolucionado vertiginosamente, de modo que lo que en los 90 era un proyecto millonario que implicó a cientos de investigadores está ya al alcance de un solo equipo que disponga de un secuenciador de última generación.

De ahí que estén surgiendo en nuestros días los primeros trabajos que comparan cientos de genomas de distintas cepas de levaduras de interés industrial.

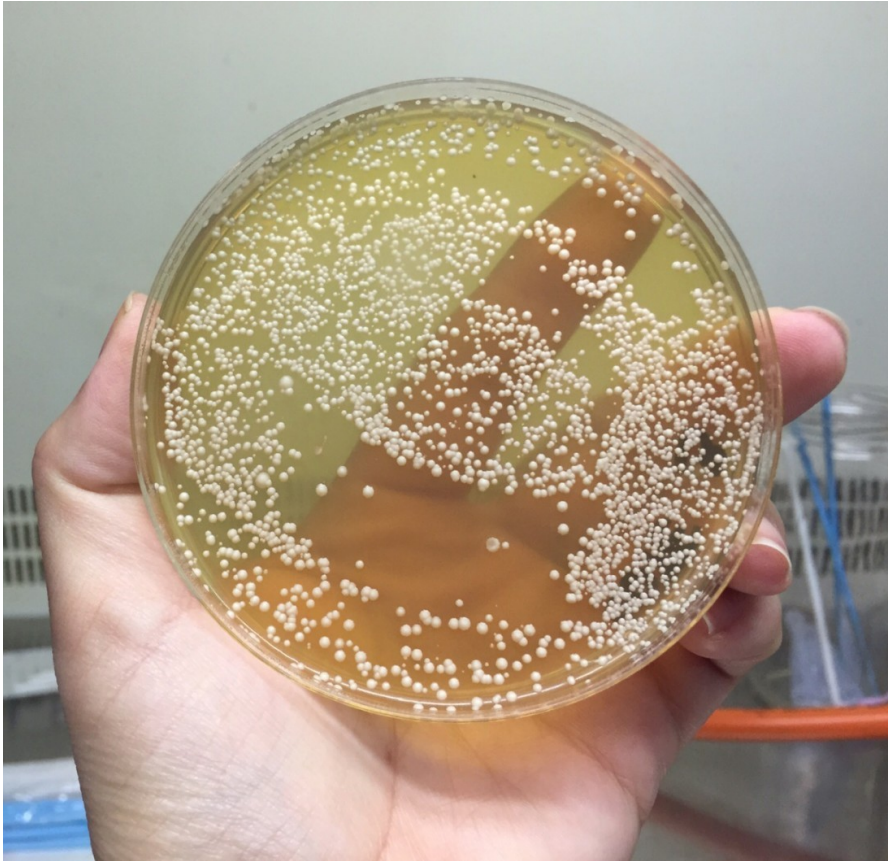
La familia de alta: un caso de frenesí evolutivo

Al aplicar los “relojes moleculares” que los investigadores en filogenia utilizan basándose en comparaciones y alineamientos de secuencias de ADN, estos estudios de genómica comparativa a gran escala prueban que las levaduras cerveceras “de alta” (de la especie *S. cerevisiae*) son “polifiléticas”, es decir, no todas proceden de un único ancestro: dentro de la diversidad de cepas estudiadas las hay emparentadas con cepas vínicas, panaderas y otras cepas industriales, como las que se usan para fabricar bebidas alcohólicas destiladas. Sin embargo, aparecen dos ramas evolutivas con un “pedigree” bien definido y una de ellas se corresponde a su vez con muchas de las más auténticas cepas “ale” que, según uno de los estudios, se divide a su vez en tres ramas: una que incluye cepas británicas, otra divergente que incluye a las Altbier alemanas más las ales belgas y una tercera que engloba las utilizadas para elaborar Weizen, las cervezas blancas de trigo (Gonçalves et al., 2016). El otro estudio revela claramente que las cepas cerveceras americanas provienen de las británicas, y datan la divergencia evolutiva en el s.XVII, indicando que las levaduras viajaron con los colonos ingleses a EE. UU. (Gallone et al., 2016). Hilando aún más fino, parece que el último ancestro común de esta rama, la “cepa madre” de la mayoría de las ales habría existido en torno a 1573–1604, el momento en que comenzaron los gremios cerveceros y abadías a consolidar su actividad comercial. Sin embargo, hay cierta controversia entre los científicos sobre la exactitud de estos cálculos, por lo que es posible que la domesticación de estas cepas date de tiempos algo más pretéritos, acaso en la Edad Media, aunque nunca a los tiempos míticos de la civilización babilónica, como algunos esperaban.

La “velocidad” de la evolución se mide en la acumulación de mutaciones a lo largo del tiempo y la gran revelación de estos estudios es que las levaduras cerveceras han evolucionado en los últimos siglos “a toda caña” en comparación con las vínicas. Tras la sorpresa inicial, parece ser que el fenómeno tiene una interpretación sencilla: las mutaciones se producen durante la división celular y las levaduras en la cervecería tradicional, hasta que se racionalizó su uso en el s. XX, trabajaban de manera ininterrumpida... Si consideramos que en la fermentación de un lote de cerveza la levadura se duplica unas tres veces y que los cerveceros cocían en promedio un lote a la semana, asumiendo además que la re-inoculación de levadura a partir del lote anterior fuese una práctica generalizada nos salen más de 150 generaciones al año. ¡Un ritmo frenético comparado al de las levaduras vínicas, que trabajan una vez al año! Al perfeccionar sus recetas, los cerveceros fueron seleccionando empírica, pero rápidamente levaduras con más capacidad de atenuación en la fermentación, menos aromas desagradables y más estabilidad genética: mientras las levaduras vínicas tendían a hibridar con levaduras silvestres en sus largas temporadas de vacaciones, las cerveceras, siempre trabajando, no tenían disponían de tiempo libre para el sexo y se acabaron volviendo estériles.

¿Cómo han evolucionado los genomas levaduras ale durante su domesticación? Rasgos muy obvios son la duplicación de genes para el metabolismo de la maltosa y maltotriosa o la pérdida de *fitness* de la alcohol deshidrogenasa codificada por el gen *ADRI* que favorece el consumo de alcohol en lugar de su producción, así como la pérdida de los

genes *PADI* y *FDCI*, responsables de la síntesis del 4-vinil-guayacol, el volátil de aroma a clavo tan característico de las Weisse bávaras y las Wit belgas de trigo que resultaría indeseable en la mayoría de los estilos elaborados solo con malta de cebada. Las cepas que se usan en las Weisse son una excepción y mantienen esta última actividad, claro está.



Levaduras de baja: el milagro que surgió del frío

Sin embargo, aproximadamente el 90% de la cerveza que se bebe en el mundo no está producida por ninguna de las citadas *S. cerevisiae*, sino por una especie de hermana bastarda, *Saccharomyces pastorianus*, el nombre hoy oficial de la *S. carlsbergensis* de Hansen. En 2011, la secuencia genómica reveló que las levaduras “de baja” fermentación, las *lagers*, son en realidad un híbrido cuyo genoma procede de la combinación de dos especies: *S. cerevisiae* y *S. eubayanus* (Libkind et al., 2011). El origen de esta combinación de genomas procede probablemente de cruces que tuvieron lugar de forma natural hace quizás unos 500 años, en las frías cuevas subalpinas en las que los bávaros almacenaban sus cervezas (almacenar en alemán es *lagern*) para conservarlas. Los cronistas argumentan que los bávaros promulgaron un edicto en 1553 que restringía la elaboración de cerveza al período desde San Miguel a San Jorge, es decir, los fríos meses de otoño e invierno. La especie *S. eubayanus* es una levadura ambiental adaptada al frío que sólo conocíamos de manera indirecta, por haberle prestado medio genoma a su prima *S. cerevisiae* en los híbridos, no solo en *S. pastorianus*, sino en otros véricos conocidos como *S. bayanus*. Sin embargo, en los últimos años se han aislado *S. eubayanus* “pura sangre” de bosques fríos de caducifolios de muy diversos lugares del planeta: en la Patagonia en Sudamérica, en Norteamérica, en el Tíbet y las estepas del Asia Central y en Nueva Zelanda... (Eberlein et al., 2015). Pero no en los cinco continentes: curiosamente falta Europa, de modo que el origen de

la cepa que hibridó con *S. cerevisiae*, teóricamente en el corazón de nuestro continente, sigue siendo un misterio ¿Es autóctona de Centroeuropa o viajó con la madera de robles que se importaron de regiones remotas para las barricas cerveceras?

Las cepas lager, sin embargo, no son tan variopintas como las ales: conocemos solo dos linajes de los que parecen proceder todas las cepas: el linaje Saaz de las cepas bohemias y el Frohberg de las bávaras-germanas. Al principio se creía que sendos linajes procedían de un único raro evento de hibridación, pero después de unos años de debate entre genetistas evolutivos, los datos genómicos más recientes (Baker et al., 2016) parecen indicar que sendos linajes son fruto de dos eventos distintos. En ambos, cepas de *S. eubayanus* casi idénticas hibridaron de forma independiente con dos cepas bastante divergentes entre sí de *S. cerevisiae*. Tras este peculiar matrimonio entre una levadura silvestre del frío y una fermentadora cosmopolita, el ritmo evolutivo de su domesticación ha sido rápido, similar al observado para las cepas de tipo ale.

Conocer las características genéticas y evolutivas de nuestras levaduras cerveceras favoritas mediante el estudio de su genoma será la llave para entender su capacidad metabólica, lo que conocemos como “metaboloma” o conjunto global de metabolitos característicos de la actividad celular. Hansen dio el primer paso para acabar la edad del empirismo cervecero. Ahora entendemos mejor por qué cada estilo de cerveza requiere su levadura: la cerveza es un alimento vivo y los estilos que conocemos han evolucionado a lo largo de los siglos... Y con ellos, sus levaduras. Es una suerte de comunión perfecta entre la naturaleza y la capacidad creadora del ser humano. Darwin estaría de acuerdo con nosotros en afirmar que la presión selectiva para esta evolución no ha sido otra que el arte del maestro cervecero.

BIBLIOGRAFÍA:

Baker E, Wang B, Bellora N, Peris D, Hulfachor AB, Koshalek JA, Adams M, Libkind D, Hittinger CT. 2015. The Genome Sequence of *Saccharomyces eubayanus* and the Domestication of Lager-Brewing Yeasts. *Mol Biol Evol.* 32:2818-31. doi: 10.1093/molbev/msv168.

Eberlein C, Leducq JB, Landry CR. The genomics of wild yeast populations sheds light on the domestication of man's best (micro) friend. 2015. *Mol Ecol.* 24:5309-11. doi: 10.1111/mec.13380.

Gallone B, Steensels J, Prahl T, Soriaga L, Saels V, Herrera-Malaver 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 KJ. 2016. Domestication and Divergence of *Saccharomyces cerevisiae* Beer Yeasts. *Cell.* 166:1397-1410.e16. doi: 10.1016/j.cell.2016.08.020

Gonçalves M, Pontes A, Almeida P, Barbosa R, Serra M, Libkind D, Hutzler M, Gonçalves P, Sampaio JP. 2016. Distinct Domestication Trajectories in Top-Fermenting Beer Yeasts and Wine Yeasts. *Curr Biol.* 26:2750-2761. doi:10.1016/j.cub.2016.08.040.

International Barley Genome Sequencing Consortium., Mayer KF, Waugh R, Brown JW, Schulman A, Langridge P, Platzer M, Fincher GB, Muehlbauer GJ, Sato K, Close

TJ, Wise RP, Stein N. 2012. A physical, genetic and functional sequence assembly of the barley genome. *Nature*. 491:711-6. doi: 10.1038/nature11543.

Libkind D, Hittinger CT, Valério E, Gonçalves C, Dover J, Johnston M, Gonçalves P, Sampaio JP. 2011. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:14539-44. doi: 10.1073/pnas.1105430108.

Natsume S, Takagi H, Shiraishi A, Murata J, Toyonaga H, Patzak J, Takagi M, Yaegashi H, Uemura A, Mitsuoka C, Yoshida K, Krofta K, Satake H, Terauchi R, Ono E. 2015. The Draft Genome of Hop (*Humulus lupulus*), an Essence for Brewing. *Plant Cell Physiol*. 56:428-41.