

“M73 BORN IN ALBORAIA” LEVADURA AUTÓCTONA DE LA HUERTA VALENCIANA

Autor: Manuel Fuentes Ramajo, Cofundador y maestro cervecero de ZETA BEER

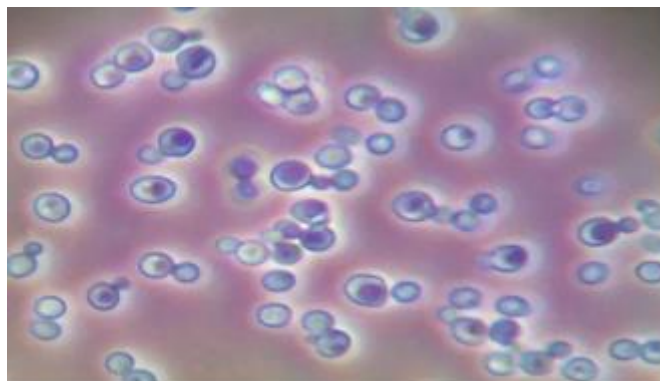
INTRODUCCION

De la huerta de Alborai a una cerveza, como dirían los buenos cocineros “de la huerta a la mesa”. Esto es lo que consiste nuestro proyecto, que llevamos realizando durante mas tres años para llevar una levadura en estado salvaje (sin domesticar) a una fermentación en cerveza.

Debido al valor de este proyecto, desde Zeta Beer hemos decido compartir el proyecto con la comunidad de cerveceros porque no hay nada mejor que compartir los conocimientos entre todos y así mejorar en su conjunto. Este artículo es el primero de dos, en los cuales se empezará contando el proyecto de aislamiento de la levadura y en el segundo consistirá en la elección de la levadura y de cómo se diseñó la cerveza “Salvatge”.

Todo empezó allá por le 2016 cuando me compre el libro “Sour Beers”, en él se habla de cómo varias empresas americanas habían atrapado levaduras locales, cosa que me genero curiosidad, asi fue como empezó todo.

Unos meses después le comenté a Lynne Yenush (subdirectora del IBMCP) la posibilidad de que notros lleváramos a cabo un proyecto como tal. Meses después apareció Mónica Navarro (estudiante de tecnología de los alimentos, UPV) con ella ya teníamos el combo perfecto, una fábrica de cervezas interesada en encontrar una levadura local para fermentar una cerveza, una profesora con los conocimientos suficientes para llevar el proyecto y una estudiante para realizar un TFG de algo que le apasiona. Con todo ello nació nuestra M73 (M de Mónica y 73 por ser la muestra 73 del proyecto).



Hemos diferenciado este trabajo en tres etapas:

- Muestreo.
- Fase de caracterización fenotípica.
- Fase de caracterización molecular.

En el muestreo tomamos las muestras sobre las que trabajar. En la fase de caracterización fenotípica seleccionamos los posibles candidatos de *Saccharomyces cerevisiae* para luego en la fase de caracterización molecular confirmar estos posibles candidatos.

METODOLOGÍA EMPLEADA:

Las muestras se tomaron con ayuda de una espátula, evitando no tomar demasiada materia para que más tarde, en la caracterización de las muestras, no nos impidiese observar el crecimiento en los tubos. Se depositaron en tubos eppendorf de 1,5 mL que contenían 200 µL de medio PBS con 0,1% Tween 20 y se guardaron a 4°C.

Medios de cultivo empleados:

- YPD, Yeast extract Peptone Dextrose (Está compuesto por: 10g extracto de levadura, 20g peptona y 20g glucosa por litro). Aquí crecen todo tipo de organismos.
- El medio selectivo con etanol (Está compuesto por: 3g extracto de levadura, 3g extracto de malta, 5g peptona, 10g sacarosa, 1 mL HCl 1M, 76 mL etanol y 10 mg cloranfenicol por litro. Este medio selectivo es preferente para el crecimiento del *Sacharomyces Cerevisae*).
- Medio Agar Lisina, el cual es selectivo para especies no-*Saccharomyces*; El medio Agar Lisina está compuesto por: 20g agar, 2,5g L-lisina-HCl y 11,75g Yeast Carbon Base por cada litro (este último componente lo añadimos tras el autoclave, poniéndolo previamente en tubo Falcon de 15 mL, enrasándolo a 10 mL con agua destilada y filtrándolo mediante jeringa con membrana de 0,45 µm).
- Medio Agar Sulfito Etanol (A.S.E.), el cual es selectivo para *Saccharomyces*; El medio A.S.E. está compuesto por: 20g glucosa, 5g peptona, 5g extracto de levadura, 20g agar, 0,15 g metabisulfito sódico y 120 mL de etanol 12% (v/v) por litro (este último componente lo añadimos tras el autoclave para evitar su volatilización).

Controles positivos y negativos utilizados para control morfológico:

- Las cepas controles utilizadas en este estudio nos van a permitir validar los diferentes experimentos, por ello:
 - o Se cultiva como control positivo utilizamos dos cepas de *Saccharomyces cerevisiae* (WLP001, White Labs) y *carlsbergensis* (WLP830, White Labs).
 - o Como control negativo utilizamos *Candida tropicalis*.

Estas cepas de control positivo y negativo se cultivaron a 28 °C durante 48 h en medio YPD, y se mantuvieron a 4 °C durante un mes como máximo, procedentes de stocks glicerizados que estaban almacenados a -80 °C.

- Determinamos el crecimiento de cada candidato midiendo la turbidez a través de la densidad óptica (D.O.), a 600nm en cubeta de plástico, con un espectrofotómetro.

Protocolo de extracción de ADN de los microorganismos para caracterización molecular:

- Centrifugamos los cultivos YPD.
- Retiramos el sobrenadante por decantación, y añadimos 0,5 mL de agua estéril para facilitar su transferencia a tubos eppendorf de 1,5 mL.
- Centrifugamos para quitarle el agua añadida y retiramos el sobrenadante por aspiración a vacío.
- Pesamos los eppendorf para calcular la masa del pellet de cada uno, habiéndolos pesado previamente vacíos. En base a la masa del pellet calculamos el volumen de *Yeast Protein Extraction Reagent* (en adelante Y-PER) requerido, con una relación de 8 μ L Y-PER/ 1 mg pellet.
- Añadimos 600 μ L de alcohol isopropílico.
- Homogeneizamos por inversión.
- Centrifugamos durante 10 min a 13000 x g.
- Eliminamos el sobrenadante por aspiración.
- Añadimos 1,5 mL de etanol 70%.
- Homogeneizamos invirtiendo.
- Centrifugamos 1min a 13000 x g para lavar posibles restos.
- Secamos por centrifuga conectada a vacío.
- Añadimos 50 μ L Tris buffer.
- Esperamos 5 minutos y homogeneizamos.
- Tras concluir la extracción del ADN, conservamos los productos obtenidos a -20°C.

Para mejorar la pureza del ADN genómico obtenido, realizamos una extracción fenol-cloroformo sobre el ADN conservado a -20°C. Para ello:

- Añadimos 200 μ L de agua miliQ, y 300 μ L de fenol- cloroformo.
- Homogeneizamos en vórtex.
- Llevamos a centrifuga durante 5 min a 13000 rpm, tras lo cual se separaron las fases quedando el ADN en la fase acuosa y las proteínas coaguladas en la interfase. Traspasamos el sobrenadante, que contiene el ADN, a nuevos tubos eppendorf. Repetimos la extracción fenol-cloroformo para asegurar una óptima purificación del ADN.
- Precipitamos los ácidos nucleicos del sobrenadante con acetato sódico (1/10 partes del volumen) y etanol absoluto (2 volúmenes).
- Homogeneizamos volteando los eppendorf.
- Centrifugamos durante 10 min a 13000 rpm.
- Retiramos el sobrenadante aspirando a vacío.
- Añadimos 500 μ L etanol 70% para lavar y centrifugamos durante 5 min a 13000 rpm.
- Retiramos el sobrenadante por aspiración a vacío.
- Por último, centrifugamos a vacío para asegurarnos de haber retirado todo el líquido posible.
- Añadimos 50 μ L de 10 mM Tris-Cl, pH 8.5 para resuspender el pellet.

Los microsatélites (Sjakste *et al.*, 2014) y minisatélites (Vergnaud y Denoeud, 2000) son secuencias cortas que se repiten a lo largo del genoma de manera abundante y al azar. Las secuencias de los microsatélites las forman no más de 10 pb, mientras que los minisatélites tienen entre 10 y 100 pb. Son buenos marcadores moleculares para la identificación intra e interespecífica, debido a que son altamente variables entre especies. La variabilidad de estas secuencias se detecta mediante amplificación por PCR usando oligonucleótidos específicos. Los productos amplificados pueden visualizarse en geles de agarosa.

La identificación de microsatélites, se puede realizar a partir de genotecas, completas o enriquecidas en secuencias microsatélite. La identificación de estas repeticiones *in silico* se puede realizar a partir de bases de datos como: Repeat master, Sputnik, Tandem Repeat Finder. Base de datos de repeticiones en tándem.

AISLAMIENTO DE LAS LEVADURAS

- MUESTREO

Con el objetivo de obtener una levadura autóctona, concretamente *Saccharomyces cerevisiae*, se procedió a la toma de muestras en el municipio de Alboraya y sus municipios colindantes, donde se realizaron dos tandas de muestreo de 40 muestras aproximadamente cada una.



Se tomaron de las siguientes plantas: nisperero, berenjena, bananero, alcachofa, limonero, higuera, naranjo y olivo, dos tandas de 75 muestras del suelo, hojas (haz y envés), fruto y tronco de la planta.

Con el objetivo de cultivar posibles candidatos, se procedió a:

- Inocular en tubos de 10 mL 0,2 ml de las muestras contenidas en PBS + 0,1% Tween 20, habiéndose homogeneizado previamente en 9,8 ml de medio selectivo 7.6% (v/v) etanol que aísla preferentemente *Saccharomyces cerevisiae*.
- Se incubaron las muestras durante 21 días aproximadamente manteniendo una temperatura de 28 °C.
- Como control positivo y negativo de la presencia de microorganismos en las muestras recogidas, en paralelo inoculamos 0,2 ml en tubos de 10 mL que contenían medio YPD. Como controles positivos empleamos WLP001 y WLP830 y como control negativo *Candida tropicalis*, además de un tubo sin inocular.
- De aquellas muestras que presentaban crecimiento en el medio selectivo realizamos diluciones seriadas (1:10, 1:100 y 1:1000) para obtener colonias individuales. Sembramos 0,2 mL de cada dilución en el medio no restrictivo (YPD) para asegurar su crecimiento, repartiendo uniformemente el líquido por la placa con ayuda de canicas de vidrio. Seleccionamos dos colonias individuales de cada muestra y lo llevamos a 1 mL de YPD líquido, donde lo dejamos crecer durante 24h a 28°C en constante agitación.
- De estos cultivos tomamos 750 µL y los llevamos a crioviales junto con 250 µL de glicerol al 80%, para la conservación de las muestras. Homogeneizamos con ayuda de la pipeta, los tapamos y los llevamos a -80 °C.

- FASE DE CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA

En esta primera fase tratamos de aislar las posibles *Saccharomyces cerevisiae* presentes en las muestras. **Para ello nos basamos en el crecimiento selectivo apto para esta especie**, es decir en aquellas muestras que han mostrado crecimiento en el medio selectivo con alcohol.

Pasados 21 días desde su inoculación, centrifugamos los tubos del medio selectivo durante 6 min a 4400 rpm para concentrar la muestra. Tras esto, retiramos el sobrenadante y tomamos 4 µL del pellet y lo posamos sobre un portaobjetos para observarlo en el microscopio a 40x.

El análisis morfológico lo realizamos con el propósito de descartar aquellos candidatos que no tuviesen la misma morfología que *S. cerevisiae*, (control positivo) independientemente de si presentaban crecimiento o no, para evitar descartar falsos negativos.

Tras obtener los presuntos candidatos iniciales, **que son aquellos que han crecido en el medio selectivo y han presentado una morfología similar a *S. cerevisiae***, realizamos una comparación de las características de crecimiento de cada levadura en dos medios diferentes:

- Medio selectivo con etanol para *Saccharomyces cerevisiae*.
- Medio no selectivo (YPD).

Inoculamos cultivos líquidos en medio YPD partiendo de colonias aisladas de cada cepa a estudiar. Tras incubar durante 24 horas en constante agitación a 28°C hasta saturar el crecimiento de cada cepa, sembramos 3 mL en medio selectivo y también de forma paralela 3 mL en YPD en tubos de 10 mL. Ajustamos la densidad óptica inicial de cada candidato, realizando diluciones hasta obtener una D.O.600 nm = 0,1.

Los cultivos se mantuvieron creciendo a 28 °C y medimos la densidad óptica de cada cepa en cada uno de los dos medios en intervalos de 12 horas hasta transcurridas las 72 horas desde la inoculación.

Para obtener más datos sobre las características del crecimiento de los candidatos, realizamos ensayos adicionales de crecimiento selectivo en medios sólidos.

Los medios que empleamos fueron los siguientes:

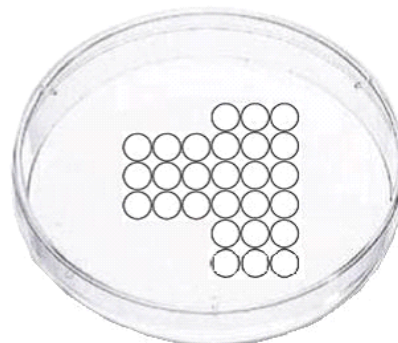
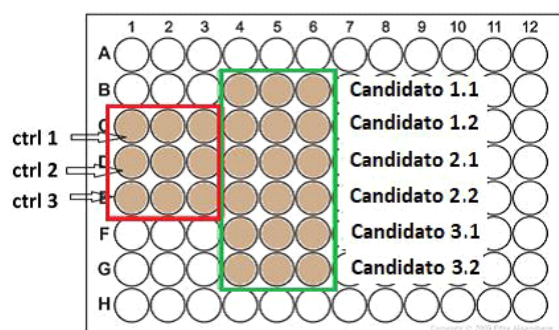
- Medio Agar Lisina., el cual es selectivo para especies no-*Saccharomyces*;
- Medio Agar Sulfito Etanol (en adelante A.S.E.), el cual es selectivo para *Saccharomyces*;
- Medio YPD. Preparamos los medios con un volumen final por placa de 25 mL.

Las cepas de los posibles candidatos y controles que empleamos para realizar estos ensayos, las tomamos de cultivos líquidos YPD, que han estado en constante agitación durante 24h a 28°C.

En una placa de 96 pocillos preparamos las diferentes cepas realizando dilución seriada (1:10, 1:100 y 1:1000) sobre 200 µL utilizando agua estéril.

Inoculamos en los diferentes medios con ayuda de un replicador, el cual deposita 2-3 µL de cultivo sobre el medio sólido.

Mantuvimos las placas en incubación a 28°C durante 72h. Controlamos el crecimiento de cada cepa visualizando las placas tras las 24, 48 y 72h de la inoculación.



- FASE DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

En esta segunda fase se procede a la identificación de los posibles candidatos obtenidos de la fase de caracterización fenotípica mediante métodos moleculares.

Con el propósito de identificar la especie de cada una de nuestras cepas, hemos de analizar el ADN de estas, y para ello hemos de realizar primero una extracción del ADN genómico.

Para obtener la biomasa a la que realizamos el proceso de extracción de ADN, inoculamos en placa YPD los candidatos, además de los controles WLP001, WLP830 y *C. tropicalis*. Llevamos las placas inoculadas a incubar a 28°C durante 48 h. Transcurrido este tiempo, sembramos en 10 mL de YPD líquido durante 24h.

Medimos la cantidad de ADN que habíamos extraído de cada muestra mediante un espectrofotómetro NanoDrop .

Realizamos dos reacciones de PCR:

- Una para la identificación del grupo *Saccharomyces* mediante la secuenciación de los dominios D1/D2 del extremo 5' del gen 28S rRNA con los cebadores NL1 y NL4 obteniendo un amplicón de 600pb.
- y otra PCR para secuenciar la región ITS con los cebadores ITS1 e ITS4 obteniendo un amplicón de longitud variable según la cepa, que posteriormente secuenciamos y además realizamos una digestión con enzimas de restricción.

Las secuencias de los cebadores son las siguientes:

NL 1: (5'-GCATATCAATAAGCGGAGGAAAAG)

NL 4: (5'-GGTCCGTGTTTCAAGACGG)

ITS 1: (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG)

ITS 4: (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC)

La electroforesis en gel de agarosa es una técnica fácil y sencilla que nos permite separar moléculas en función de su carga, tamaño y forma. Esta técnica nos va a permitir evaluar el éxito de la amplificación del fragmento de interés tras la PCR.

Para observar los productos de la PCR, tanto de la reacción NL como ITS, se prepararon 30 mL de gel de agarosa al 1%, añadiendo 1,5 µL bromuro de etidio, que es un compuesto que se intercala entre las bases nitrogenadas del ADN y el ARN, el cual se excita con luz ultravioleta de onda corta, y emite su fluorescencia como luz visible, de color rosado-anaranjado. De esta forma permite la visualización de los ácidos nucleicos en geles de agarosa y poliacrilamida.

Para cada producto de PCR de cada reacción se tomaron 5 µL y se le añadió 1 µL tampón de carga, el cual facilita la sedimentación de las muestras en los pocillos evitando su dispersión y permite visualizar el frente de corrida de las muestras. Se utilizaron 4 µL del marcador molecular 100 bp DNA Ladder. Se conectó a 60 V durante 1,5 horas aproximadamente.

Tras la corrida de las muestras, se observó el gel aplicando luz ultravioleta. Observamos los fragmentos de cada muestra, y en base al marcador del peso molecular pudimos conocer sus tamaños.

Tras la amplificación del fragmento de ADN de interés mediante un termociclador y su posterior visualización en gel de agarosa 1% para comprobar que se había efectuado correctamente la PCR, se llevaron los candidatos además de WLP001, WLP830 y *Candida tropicalis*, al servicio de secuenciación del IBMCP.

Una vez tuvimos nuestros fragmentos amplificados y secuenciados, seleccionamos aquellos resultados que coincidían en un 100% de identidad con nuestra secuencia de interés.

Realizamos las digestiones para cada producto de PCR de las secuencias ITS, para los aislados y los controles.

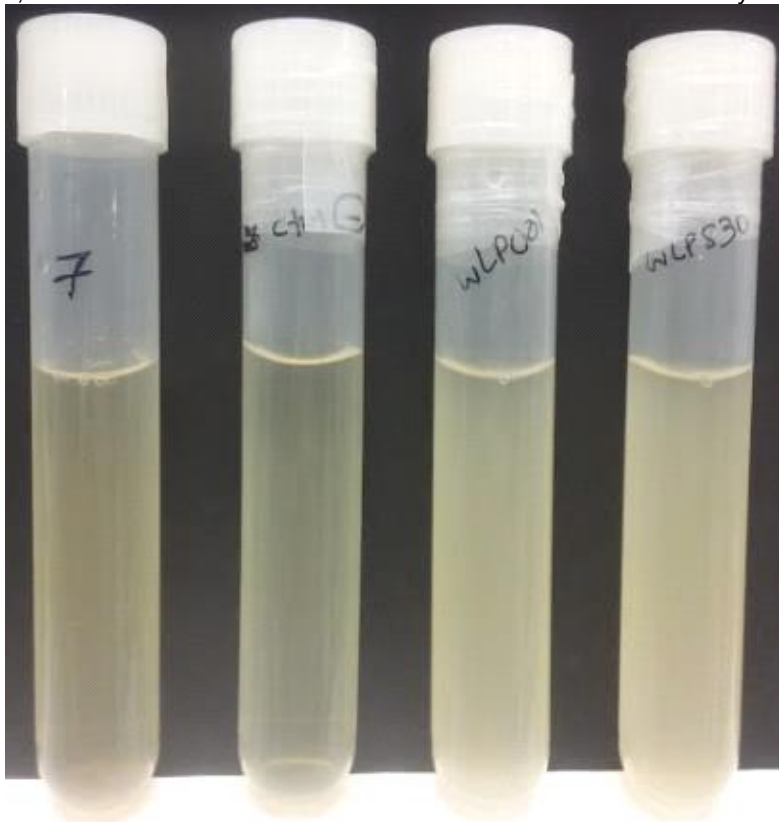
Con este análisis, no fue posible identificar a nivel de especie uno de los candidatos, por lo que realizamos una digestión adicional con la enzima Taq I. Como control utilizamos *Saccharomyces cerevisiae*. Para conocer el tamaño de las bandas esperado de esta especie, realizamos una digestión virtual empleando dicha enzima.

Posteriormente, visualizamos el tamaño de los fragmentos tras la digestión con Taq I preparando 30 mL de gel de agarosa al 2% con 1,5 μ L de bromuro de etidio. Utilizamos como marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder.

RESULTADOS

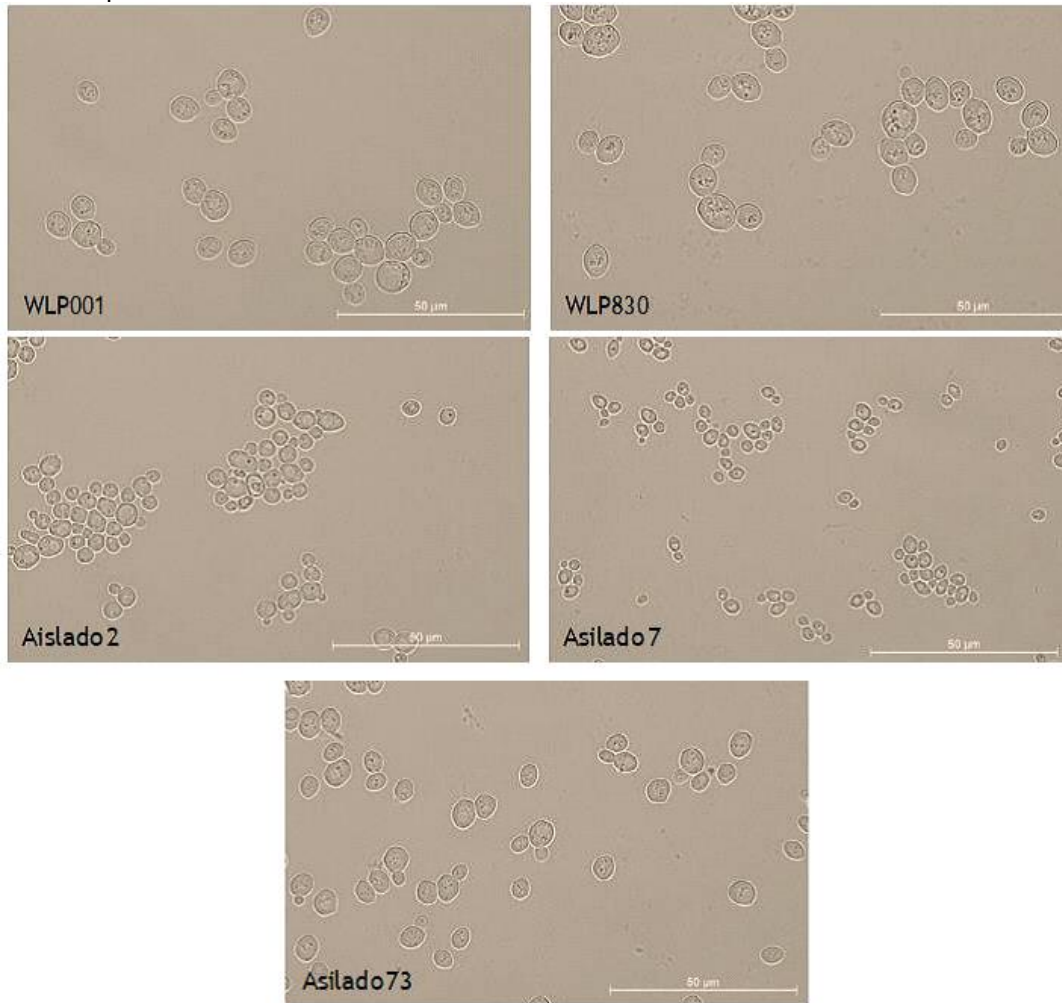
Transcurridos 21 días desde la inoculación en el medio selectivo, de las 75 muestras tomadas, observamos crecimiento en las muestras n° 2, 7 y 73, además de los controles WLP001, WLP830 y *C. tropicalis*. En el medio YPD crecieron todas las cepas.

Como se puede observar el n° 7 presenta crecimiento, a diferencia del control negativo. Aunque, este crecimiento es notablemente menor al de las WLP001 y WLP830.



Tras determinar qué tubos presentaban crecimiento, observamos en el microscopio todas las muestras, presentasen o no crecimiento. La morfología que presentaban al microscopio los candidatos 2, 7 y 73, que fueron los que presentaban crecimiento. De aquellas muestras que no presentaron un crecimiento marcado en el medio selectivo no se detectaron células en el

microscopio.



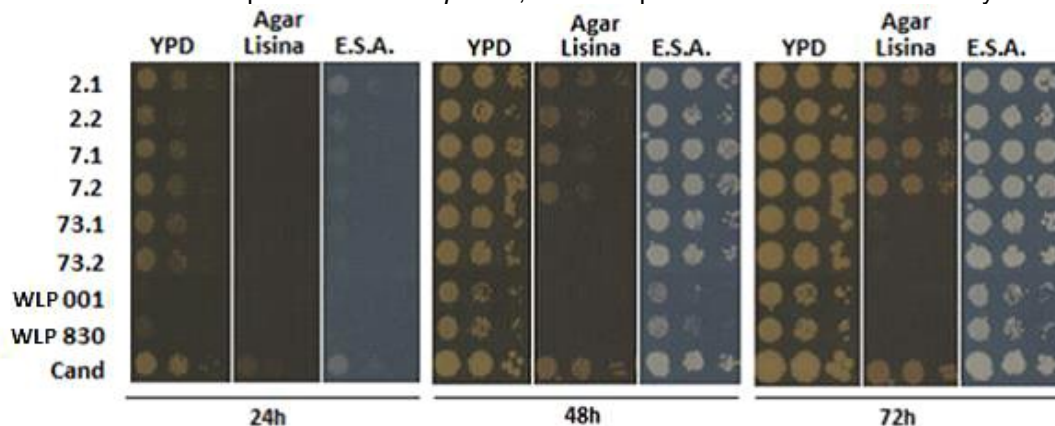
Una vez observada la morfología de cada muestra, caracterizamos el crecimiento de cada candidato. En el medio YPD crecieron los candidatos y los controles como era de esperar. Puede observarse cómo el candidato n° 73 junto con *Candida tropicalis*, presentaron un crecimiento a las 24 h muy marcado.

En el medio selectivo, el crecimiento de todas las cepas se ve notablemente reducido respecto al que presentan en YPD. Aun así, el número 73 crece de forma considerable durante las primeras 24 horas en comparación con el resto de microorganismos, los cuales tienen un crecimiento más tardío respecto a este. Las WLP001 y WLP830, presentan un crecimiento en este medio muy similar al resto de cepas.

En cuanto a los ensayos de crecimiento en placa, en el medio YPD han crecido todas las cepas, como era de esperar.

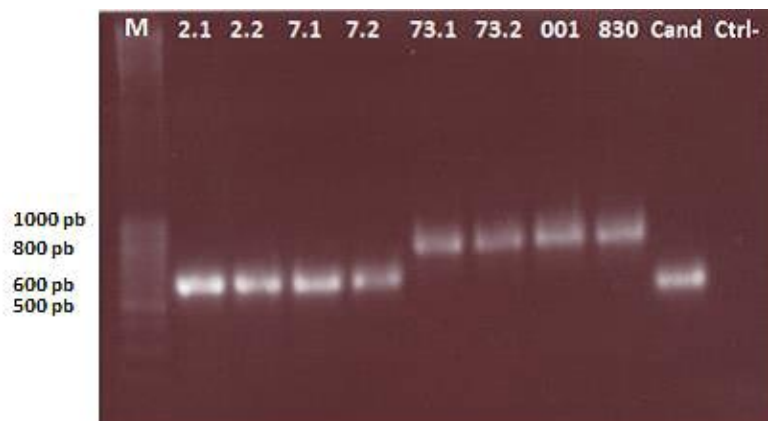
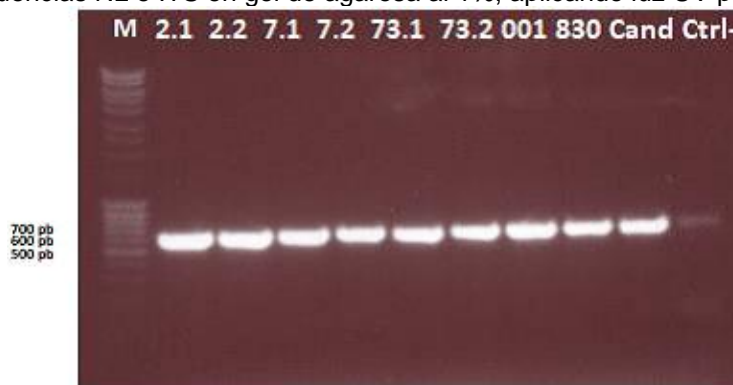
En el caso del medio Agar Lisina, observamos que las cepas control de *Saccharomyces cerevisiae* (WLP001 y WLP830) no son capaces de crecer, al igual que los candidatos 73.1 y 73.2, mientras que los aislados 2 y 7 crecen, al igual que *Candida tropicalis*.

En el medio E.S.A. han crecido todas las cepas debido probablemente a la volatilización del etanol. Por otro lado, todas las cepas presentaban un color blanco-crema, con colonias de un tamaño similar excepto *Candida tropicalis*, la cual presentaba colonias de mayor tamaño.



Una vez realizada la caracterización fenotípica, procedimos a la caracterización molecular para confirmar los posibles candidatos obtenidos, que eran el número 2, 7 y 73.

Comenzamos con la extracción del ADN seguida de una extracción fenol-cloroformo. Tras extraer y purificar el ADN genómico, amplificamos por PCR las regiones de interés. Para comprobar que la PCR se había llevado a cabo correctamente, visualizamos los productos de la PCR de las secuencias NL e ITS en gel de agarosa al 1%, aplicando luz UV para observarlas.



Para la secuencia NL como puede observarse, el tamaño de las bandas obtenido es el mismo para todas las especies. Sin embargo, los tamaños de los fragmentos obtenidos de la secuencia ITS, son característicos para cada especie.

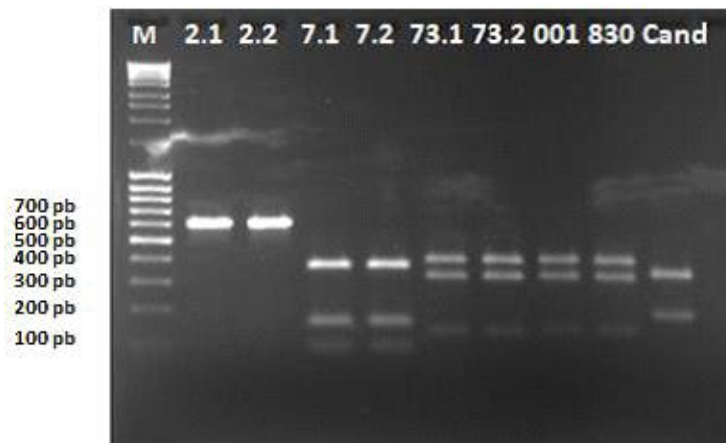
El tamaño de las bandas del candidato 73 coincide con el tamaño de las bandas de los controles WLP001 y WLP830. Esto es una evidencia adicional de que se trata de *S. cerevisiae*. Por el contrario, para el caso de los candidatos 2 y 7, el hecho de que presentan bandas de distinto tamaño a los controles WLP001 y WLP830, nos indica de que se trata de especies diferentes.

Sabiendo que se habían amplificado correctamente las regiones de interés de los candidatos y los controles, se llevaron al servicio de secuenciación del IBMCP. Introdujimos en Chromas las secuencias acotándolas, seleccionando aquellas regiones de mayor calidad, e introdujimos estas secuencias acotadas.

Los resultados obtenidos con un 100% de identidad para cada candidato dicen que hay una especie, máximo dos, que coinciden en ambas secuencias NL e ITS. Estos resultados sugieren que el aislado 2 corresponde a *Wickerhamomyces ciferrii*, mientras que el aislado 7 coincide tanto con *Meyerozyma caribbica* como con *Meyerozyma guilliermondii*.

Finalmente, el aislado 73 comparte homología con *Saccharomyces cerevisiae*.

Para confirmar estos resultados, realizamos una digestión con las enzimas de restricción HpaII, HaeIII y SrfI. En estas dos figuras, puede observarse cómo el candidato 73 coincide en el tamaño de los fragmentos obtenidos con los controles WLP001 y WLP830, para las tres enzimas utilizadas. *Candida tropicalis*, muestra tamaños de fragmentos distintos a las WLP001 y WLP830.



CONCLUSIONES

Tras todo el trabajo realizado finalmente nos quedaremos con las muestras:

Muestra N°2	<i>Wickerhamomyces ciferrii</i>	Suelo <i>Eriobotrya japonica</i>
Muestra N°7	<i>Meyerozyma caribbica</i>	Suelo <i>Citrus x limón</i>
Muestra N°73	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Suelo <i>Ficus carica</i>

De estas muestras, ahora tendremos que ponerlas con fermentaciones reales y con mostos reales, realizando una prueba de fermentación forzada. De ahí, obtendremos el grado de atenuación máxima que nos ofrecería la levadura en cuestión. También habría que analizar las propiedades organolépticas que nos ofrecería cada cepa de levadura.

En el siguiente artículo explicaremos cual fue la levadura que seleccionamos para realizar nuestra cerveza "Salvatge", además de la explicación de la elección del estilo empleado. Para ello utilizaremos un lenguaje menos microbiológico y más cervecero que el empleado en este artículo.

Quiero agradecer en especial a la gente que ha trabajado en este proyecto, primero a nivel de laboratorio y de campo (Mónica y Lynne) y segundo a todo el personal de fábrica de Zeta Beer, por haber realizado en conjunto un magnífico trabajo.

Salud.