



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSITAT POLITÈCNICA DE VALÈNCIA

Instituto Universitario de Ingeniería de Alimentos para
el Desarrollo

Papel de la respuesta retrógrada de levadura en la
regulación del metabolismo durante fermentaciones de
alimentos

Trabajo Fin de Máster

Máster Universitario en Gestión de la Seguridad y Calidad
Alimentaria

AUTOR/A: Molla Marti, Esperanza

Tutor/a: Jiménez Belenguer, Ana Isabel

Cotutor/a externo: ARANDA FERNANDEZ, AGUSTIN

CURSO ACADÉMICO: 2021/2022

ÍNDICE

RESUMEN.....	2
RESUM	2
ABSTRACT.....	2
1. INTRODUCCIÓN.....	4
2. MATERIALES Y MÉTODOS	6
2.1. Cepas de levadura y manipulación genética	6
2.2. Medios de cultivo	8
2.3. Condiciones de crecimiento.....	8
2.3.1. Goteos en placa	8
2.3.2. Microfermentaciones y medida glicerol.....	9
2.3.3. Curvas de crecimiento en distintos medios	9
3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	10
3.1. Construcción de la cepa Cinta Roja mutante para Mks1	10
3.2. Construcción de la cepa SafAle mutante para Mks1.....	10
3.3. Efecto de la delección de <i>MKS1</i> en una cepa panadera en la producción de CO ₂ en microfermentaciones	11
3.4. Producción de glicerol.....	12
3.5. Respuesta a estrés osmótico y metabólico (goteos).....	14
3.6. Curvas de crecimiento en diferentes medios	15
4. CONCLUSIONES.....	17
5. REFERENCIAS	18

RESUMEN

La respuesta retrógrada fue el principal mecanismo de comunicación entre las mitocondrias y el núcleo, y fue descubierta en *Saccharomyces cerevisiae*. Consiste en una vía de señalización que implican a proteínas transductoras de señales para inducir genes diana nucleares. En presencia de estrés metabólico, osmótico o dependiendo de las señales nutricionales, se emite una respuesta a través de la vía de señalización diana de la rapamicina (TOR), que es la que controla la expresión de los genes implicados en rutas biosintéticas de aminoácidos que se activan en respuesta a diversas tensiones fisiológicas mediante los factores: RTG1, RTG2, RTG3 y MKS1. El metabolismo fermentativo de *S.cerevisiae*, es de gran interés biotecnológico por su capacidad de producir productos de interés. En este estudio, se pretende estudiar el comportamiento de una cepa panadera Cinta Roja (CR) y una cepa cervecera (SafAle) en relación con cepas vínicas en condiciones que simulan fermentaciones industriales, y conocer el papel de la respuesta retrógrada, mediante la construcción de mutantes *mks1Δ*.

Palabras clave: respuesta retrógrada (RTG), ruta TOR, T73, Cinta Roja, SafAle, glicerol, fermentación, biomasa

RESUM

La resposta retrògrada va ser el principal mecanisme de comunicació entre els mitocondris i el nucli, i va ser descoberta a *Saccharomyces cerevisiae*. Consisteix en una via de senyalització que impliquen proteïnes transductores de senyals per induir gens diana nuclears. En presència d'estrès metabòlic, osmòtic o dependent dels senyals nutricionals, s'emete una resposta a través de la via de senyalització diana de la rapamicina (TOR), que és la que controla l'expressió dels gens implicats en rutes biosintètiques d'aminoàcids que s'activen en resposta a diverses tensions fisiològiques mitjançant els factors: RTG1, RTG2, RTG3 i MKS1. El metabolisme fermentatiu de *S.cerevisiae* és de gran interès biotecnològic per la seva capacitat de produir productes d'interès. En aquest estudi, es pretén estudiar el comportament d'un cep forner Cinta Roja (CR) i un cep cerveser (SafAle) en relació amb ceps vínic en condicions que simulen fermentacions industrials, i conèixer el paper de la resposta retrògrada, mitjançant la construcció de mutants *mks1Δ*.

Paraules clau: resposta retrògrada (RTG), ruta TOR, T73, Cinta Roja, SafAle, glicerol, fermentació, biomassa

ABSTRACT

The retrograde response was the main communication mechanism between the mitochondria and the nucleus and was discovered in *Saccharomyces cerevisiae*. It consists of a signaling pathway involving signal transducing proteins

to induce nuclear target genes. In the presence of metabolic or osmotic stress or depending on nutritional signals, a response is emitted through the target of rapamycin (TOR) signaling pathway, which is what controls the expression of genes involved in amino acid biosynthetic pathways that they are activated in response to various physiological stresses by the factors: RTG1, RTG2, RTG3 and MKS1. The fermentative metabolism of *S. cerevisiae* is of great biotechnological interest due to its ability to produce products of interest. In this study, we intend to study the behavior of a Cinta Roja (CR) bakery strain and a beer strain (SafAle) in relation to wine strains under conditions that simulate industrial fermentations, and to know the role of the retrograde response, through the construction of *mks1* Δ mutants.

Key words: retrograde response (RTG), TOR pathway, T73, Red Ribbon, SafAle, glycerol, fermentation, biomass

1. INTRODUCCIÓN

Cuando se estableció una simbiosis entre una bacteria primitiva y una célula protoeucariota, se transfirió la mayor parte de la información genética desde la mitocondria resultante hasta el núcleo celular. Por tanto, se debe tener en consideración una integración de procesos que requiera una estrecha coordinación de funciones. El primer mecanismo de comunicación entre las mitocondrias al núcleo fue la respuesta retrógrada, una vía de señalización descubierta en *Saccharomyces cerevisiae*, que involucra una serie de proteínas de transducción de señales para inducir una amplia gama de genes diana nucleares (Jazwinski, 2013, 2014).

En presencia de estrés metabólico, de estrés osmótico o en consecuencia de señales nutricionales, se modula la respuesta a través de la vía de señalización diana de la rapamicina (TOR), que controla la expresión de genes implicados en varias vías biosintéticas sensibles a los nutrientes (Dilova et al., 2002; Jazwinski, 2014). Los factores que se activan en respuesta a diversas tensiones fisiológicas, como el agotamiento de aminoácidos, son los genes RTG (*RTG1*, *RTG2*, *RTG3* y *MKS1*), que codifican reguladores de la respuesta ReTróGrada (RTG). El punto clave en la señalización retrógrada en presencia del activador Rtg2, es la translocación del citoplasma al núcleo de los factores de transcripción Rtg1-Rtg3, que funcionan juntos formando un heterodímero. En ausencia de Rtg2, el heterodímero permanece en el citoplasma. No obstante, la presencia de Rtg2 para la localización nuclear del factor de transcripción Rtg1-Rtg2 se puede anular mediante la eliminación simultánea del represor Mks1. Mientras que Mks1 regula negativamente la localización nuclear Rtg1/Rtg3, la unión de Rtg2 a Mks1 alivia esta inhibición (Druseikis & Covo, 2022; Jazwinski, 2014). La vía RTG está regulada negativamente a través de Mks1 por la ruta TOR. Cuando TOR está completamente activo, Mks1 no se une a Rtg2, de forma que Rtg1/Rtg3 es citoplasmático, lo que significa que la vía RTG está desactivada. Tras la inhibición de TOR, Rtg2 se une a Mks1 y la expresión de los genes diana de RTG aumenta, por lo que la vía de RTG está activa (Dilova et al., 2002; Liu et al., 2003). En la Figura 1 se resume esquemáticamente las interacciones entre los componentes encargados de la regulación de los genes Rtg, en la ruta TOR. Si se inhibe la señalización de TOR con rapamicina o se elimina el gen Mks1, se activa la expresión del gen Rtg, y por tanto de la ruta retrógrada. Esta activación conlleva el aumento de la producción de α -cetoglutarato y la activación de las rutas de síntesis de aminoácidos, como glutamato y glutamina y los genes Lys. Por el contrario, si se elimina Rtg2 se inhibe por completo la ruta retrógrada. La activación de la respuesta retrógrada activa la síntesis de las enzimas iniciales del ciclo del ácido tricarbóxico (TCA) o ciclo de Krebs (Dilova et al., 2002).

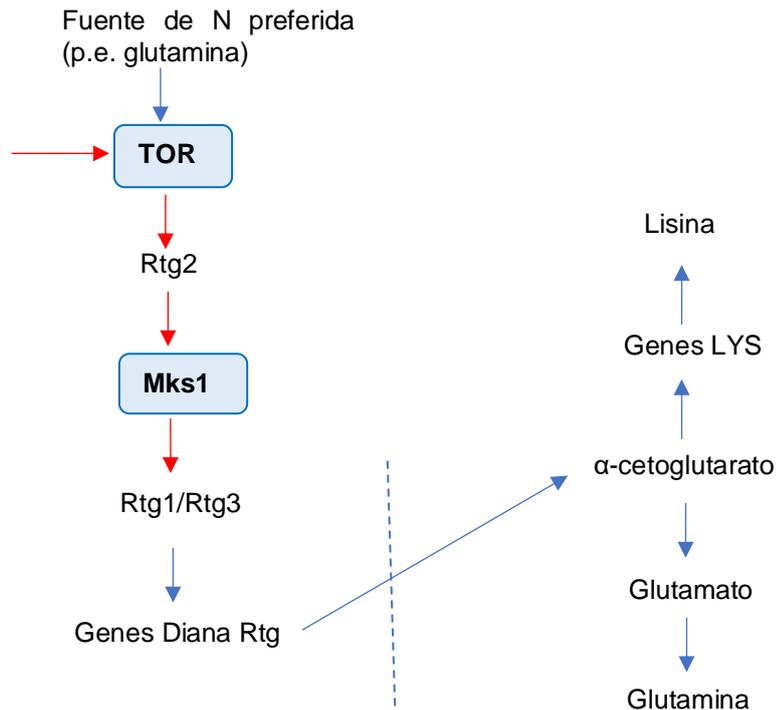


Figura 1. Resumen esquemático de las interacciones entre los componentes encargados de la regulación de los genes Rtg, en la ruta TOR. TOR está ligado a la expresión de los genes de la ruta retrógrada a través de la interacción entre Rtg2 y Mks1. Por tanto, la Rtg2 es un inhibidor de Mks1, que al mismo tiempo es un regulador negativo de Rtg1 y/o Rtg3.

El metabolismo fermentativo la levadura *Saccharomyces cerevisiae* presenta un gran interés biotecnológico por su capacidad de adaptarse de forma eficiente a los ambientes variables y desfavorables (Matallana & Aranda, 2017). Para la industria del vino, las cepas vínicas son esenciales para fermentar la glucosa y fructosa presentes en el mosto de la uva, produciendo etanol, CO₂ y otras moléculas de interés. Las levaduras tienen preferencia por algunos nutrientes sobre otros, produciendo una represión catabólica sobre el uso de los menos favoritos. Por ejemplo, *S. cerevisiae*, prefiere la fermentación de la glucosa frente a otros monosacáridos y disacáridos. (Conrad et al., 2014). Por tanto, cuando la glucosa se encuentra por encima de un umbral, el uso de los otros sustratos se reprime, así como genes implicados en la absorción y el metabolismo de carbohidratos alternativos, así como genes implicados en la respiración (efecto Crabtree) (Randez-Gil et al., 2013). No obstante, las cepas industriales tienden a usar la sacarosa más rápido que la glucosa, por lo que la represión de la glucosa no es tan estricta. Además, se ha demostrado que las levaduras vínicas son más tolerantes que las cepas de laboratorio a la 2-desoxiglucosa, un análogo no metabolizable de la glucosa, que induce la represión de la glucosa en presencia de sacarosa (Meneses et al., 2002; Vallejo et al., 2020).

Las cepas panaderas de *S. cerevisiae* aportan el gas necesario para fermentar la masa mediante la fermentación alcohólica de los azúcares, principalmente la maltosa. En este caso, en las cepas panaderas también se

pueden encontrar los mecanismos de represión de otros sustratos en presencia de glucosa, así como en presencia de sacarosa, principal fuente de carbono en la melaza utilizada para producir biomasa. Por tanto, el mecanismo de represión de la glucosa tiene efectos negativos sobre la producción de biomasa, aumentando el tiempo de fermentación debido a la generación de un retraso en la producción de CO₂ a partir de la maltosa, el principal azúcar de la harina de trigo (Busti et al., 2010; Randez-Gil et al., 2013).

La cerveza se obtiene mediante la fermentación de mostos derivados de la malta, convirtiendo los azúcares procedentes del mosto en etanol, CO₂ y otros compuestos que contribuyen al sabor de la cerveza (Bonatto, 2021). Ale y lager son los dos tipos principales de cervezas, y son fermentados por distintas especies de *Saccharomyces*: *S.cerevisiae* y *S.carlsbergensis* respectivamente. Las de tipo ale son de fermentación en superficie, y las lager fermentan en el fondo del biorreactor. Esto explica las diferencias entre las cervezas (Gerhards et al., 2021).

El objetivo de este estudio es analizar el papel que posee la respuesta retrógrada en cepas panadera y cervecera durante las fermentaciones de masa panadera y malta, en comparación con el efecto en la fermentación vínica, donde se sabe que está implicada en la producción de glicerol, un metabolito organolécticamente positivo, así como el crecimiento de las cepas en diferentes medios y respuesta a estrés. Para ello se estudia el papel de la delección del gen MKS1 en dos cepas diploides (vínica y panadera) y en una cepa tetraploide (cervecera) por delección de este gen, tanto en medios de laboratorio como en microfermentaciones, probando inhibidores de las rutas de estudio.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Cepas de levadura y manipulación genética

Las cuatro cepas de *S.cerevisiae* empleadas para el ensayo fueron T73 y 71B como cepas vínicas, Cinta Roja como cepa panadera y SafAle como cepa cervecera. Las cepas diploide T73 y 71B delecionadas en el gen MKS1 y T73 delecionada en el gen RTG2 fueron aportadas por el tutor, previamente aisladas en el laboratorio. Se realizaron mutantes de delección *mks1Δ* en la cepa diploide Cinta Roja mediante CRISPR-Cas utilizando el plásmido pRCC-K, y en la cepa tetraploide SafAle. La delección de la primera copia del gen MKS1 en SafAle se llevó a cabo por recombinación homóloga con un fragmento de extremos del gen y con el marcador kan MX, amplificado por PCR a partir del plásmido pUG6. Este marcador contiene los sitios lox P para ser empalmados por la recombinasa Cre del plásmido YEp-cre-cyh (Ferrer-Pinós et al., 2021).

Las transformaciones de levadura se realizaron mediante el método de acetato de litio, que consiste en introducir un plásmido específico en una cepa de levadura con el objetivo de recuperar y analizar un número de transformantes.

Las células a transformar se inoculan en 5 mL de YPD y se incuban toda la noche en un agitador rotatorio a 200 rpm y 30 °C. Se mide la OD₆₀₀ en una dilución 1:20 y se prepara un cultivo de 50 mL de YPD a una OD₆₀₀ de 0,2. Se deja incubar en agitación 4-5 horas hasta una OD₆₀₀ de 2. A continuación se añade el precultivo a un corning de 50 mL y se centrifuga 2' a 4000 rpm, se elimina sobrenadante, se lava con 25 mL de H₂O, se centrifuga y se vuelve a eliminar el sobrenadante. Se resuspende el pellet en 1 mL de H₂O y se pasa a eppendorf. Se centrifuga 30" a 12.000 rpm, se elimina sobrenadante y se añade 1000 µL (depende de la OD₆₀₀). Se preparan dos eppendorfs y se añade 100 µL del pellet resuspendido: uno será el control y el otro la transformación. Se centrifuga 30" a velocidad máxima, se quita sobrenadante y se añade un volumen total de 360 µL tal y como se indica en la Tabla 1. Previamente se debe hervir el DNA carrier 5' y mantenerse en hielo. Finalmente se realizará un choque térmico: 20' a 30°C y 20' a 42°C. se centrifuga 1' a 500 rpm, se elimina sobrenadante, se añade 100 L de H₂O estéril, y se siembran en YPD agar. Al día siguiente se hace una réplica en placa con geneticina para comprobar que las colonias que crecen contienen el plásmido de interés. (Gietz & Woods, 2002).

Tabla 1. Volumen de cada reactivo que se añade al vial control y al vial con el DNA de interés.

Reactivos	Control	Transformantes
PEG 3500 (50% (p/v))	240 µL	240 µL
LiAc	36 µL	36 µL
DNA Carrier	50 µL	50 µL
H2O	34 µL	-
DNA + H2O	-	34 µL

Para comprobar si son mutantes para el gen Mks1 las colonias que han crecido, se lleva a cabo un protocolo PCR de colonias. El primer paso es añadir 3 µL de NaOH 0.01 M a los tubos de PCR y con una punta de pipeta se toma una pequeña cantidad de colonia y se introduce en el tubito. A continuación, se realiza un choque térmico (1' a -80°C y 10' a 95°C) y se prepara el mix de PCR. Para 1 tubo: 18,3 µL de H₂O, 0.5 µL dNTPs (10 mM), 2.5 µL tampón 10X, 3 µL DNA colonia (ya puesto), 0.5 µL Taq polimerasa, 0.1 µL cebador 1 y 0.1 µL cebador 2. Los cebadores utilizados presentan la nomenclatura de la Figura 2. Serán mutantes para el gen Mks1 cuando salga banda en la electroforesis con los cebadores c-e y cuando no salga banda con los cebadores c-d.

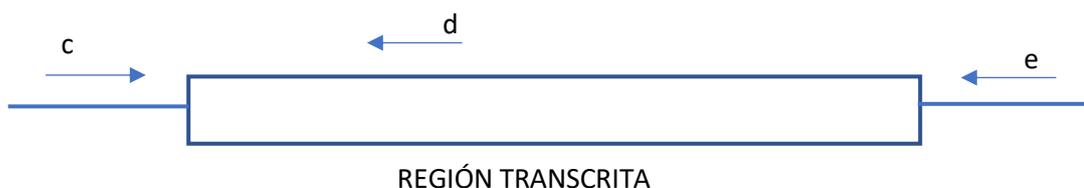


Figura 2. Esquema de la nomenclatura de los cebadores utilizados para la PCR

Las condiciones de la PCR en el termociclador son: 5' iniciales a 95°C para la activación de la Taq pol, 30 ciclos con 15" a 95°C para la desnaturalización de las hebras, 15" a 57°C para la unión al cebador y 1' a 72°C para la elongación de la cadena, y 5' finales a 72°C para la extensión final (Bergkessel & Guthrie, 2013). El resultado de la PCR se observa en un gel de agarosa al 1% en medio TBE, añadiendo Gold Safe a la mezcla como tinte de los ácidos nucleicos. El tampón de carga se añade a las muestras amplificadas, y se cargan 15 µL a un voltaje de 120 V durante 20'. El resultado se observa en una lámpara ultravioleta.

2.2. Medios de cultivo

Por defecto, las levaduras se cultivaron en un medio rico en YPD (extracto de levadura al 1%, bactopectona al 2%, glucosa al 2%). Las placas sólidas contenían agar al 2%, y para la selección de transformantes se añaden 20 µg/mL de geneticina. Se obtuvieron otros medios ricos cambiando la fuente de carbono: YPS que contenía un 2% de sacarosa, YPM al 2% de maltosa. El medio mínimo SD contenía 0.17% de base de nitrógeno de levadura, 0.5% de sulfato de amonio y 2% de glucosa (Ferrer-Pinós et al., 2021). Para observar el crecimiento en las diluciones seriadas, es decir, en los goteos, se utilizó SD + 3AT (aminotriazol) 10 mM, SD + AEC (aminoetilcisteína) 35 mg/l, SD + SM (sulfometuronmetilo) a 1 mg/l, SD + AZC (ácido azetidín carboxílico) 5 mM. Para averiguar el efecto de la congelación durante 48h, se cultivan las células de interés en un medio YPD y en melaza de remolacha al 6% de sacarosa, produciendo así biomasa que posteriormente se mantendrán a -18°C.

El primer medio de cultivo utilizado para las micro-fermentaciones panaderas fue un sistema modelo de masa líquida (LD) sin harina para imitar la composición principal del azúcar de la masa madre, añadiendo vitaminas necesarias para el crecimiento celular. Se preparó con 5 g de MgSO₄ · 7H₂O, 2 g de KCl, 11,75 g de (NH₄)₂HPO₄, un stock de vitaminas 4 mg de tiamina, 4 mg de piridoxina y 40 mg de ácido nicotínico en un volumen final de 250 ml de tampón citrato 0,75 M (pH 5,5). Se añadieron veinte mililitros de la solución nutritiva concentrada a un tubo que contenía 0,5 g de extracto de levadura, 3 g de glucosa, 9 g de maltosa, 12 g de sorbitol y 25 g de sacarosa, y la mezcla se disolvió mediante sonicación. Se añadió agua destilada hasta un volumen final de 100 ml y la solución se esterilizó en autoclave (Panadero et al., 2005). El segundo medio utilizado fue un medio similar al mosto, elaborado con 180 g/l de malta granulada suplementada con 10 g/l de extracto de levadura (Sanchez et al., 2012).

2.3. Condiciones de crecimiento

2.3.1. Goteos en placa

Para el estudio del crecimiento celular con diferentes inhibidores, se utilizó el método de goteos en placa, que consiste en obtener un conjunto de diluciones seriadas de cada cultivo (Corral-Lugo et al., 2012) y con ayuda de una plantilla,

añadir 5 μ L en el lugar que le corresponde. Para las diluciones seriadas, previamente se obtiene un precultivo O/N a 30°C de las cepas a estudiar: T73, T73Mks1, CR y CRMks1. Para que el ensayo sea representativo, se mide la OD₆₀₀ y se ajusta la cantidad de células para que sean las mismas, y luego se realizarán las diluciones que se crean necesarias. En este caso: 10⁻¹, 10⁻², 10⁻³, 10⁻⁴.

2.3.2. Microfermentaciones y medida glicerol

Para las microfermentaciones, se deben tener los precultivos de las levaduras objeto de estudio (T73, T73 Mks1, CR, CRMks1, SafAle, SafAleMks1) O/N a 30°C en agitación. Se mide la OD₆₀₀ y se ajusta a 0,2 para que todos los viales tengan la misma concentración celular. Se preparan los medios de cultivo y la malta, se inocula la cantidad de células calculada y se añaden 11,5 mL de la mezcla a cada vial de microfermentación. Se deja en agitación a 80 rpm y a 30°C y se pesa a lo largo del tiempo. Los resultados se darán en gramos de CO₂ producidos por cada 100 mL (g CO₂/100mL) de muestra a lo largo del tiempo.

Para la medida de glicerol en medio LD+Vitaminas, se prepara de igual manera el cultivo celular de CR y CRMks1, pero en este caso, las microfermentaciones no se realizarán en viales especiales, si no en corning de 50 mL sin cerrar del todo para que no exploten por la producción de gas. Por tanto, se mide el glicerol después de 1, 2 y 4 horas tanto en la cepa WT como en la mutante. Para ello, se recogen a su tiempo debido 1 mL de cada una de las muestras, se centrifuga y el sobrenadante se guarda a -18°C para uso posterior. Una vez se tienen todas las muestras, se mide glicerol con el kit comercial X (Megazyme, Irlanda) en una placa multipocillo mediante el dispositivo "Thermo Scientific™ Varioskan™ LUX". Los resultados se expresan como miligramos de glicerol por gramo de células de levadura.

2.3.3. Curvas de crecimiento en distintos medios

Para el estudio de la producción de biomasa en distintos medios, se utilizó una placa multipocillo y el dispositivo Thermo Scientific™ Multiskan™ GO Microplate Spectrophotometer a 600 nm, y se dejó en marcha durante 24 horas a 24 °C con agitación para permitir el crecimiento celular. Los medios utilizados para el crecimiento celular fueron YPD, YPS, YPM, y las cepas usadas fueron: T73, T73Mks1, T73Rtg2, CR, CRMks1, SafAle, SafAle Mks1. Se realiza una dilución a partir de un cultivo estacionario en 5 ml de YPD crecidos toda la noche, hasta conseguir una OD₆₀₀=0.1. 200 μ l de cada cultivo se añadieron en cada pocillo, por triplicado.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. Construcción de la cepa Cinta Roja mutante para Mks1

La delección del gen *MKS1* en la cepa panadera CR, se realizó mediante CRISPR/Cas9 (Figura 3), una técnica de edición genética de alta precisión. La unión específica de la nucleasa Cas9 está mediada por un pequeño RNA guía (sgRNA), que se diseña fácilmente para dirigirse a cualquier locus del genoma (Zhang et al., 2014). En este caso, se han transformado las células con el plásmido pRCC-K, que expresa el casete Cas9 y sgRNA en *S.cerevisiae*, en el que previamente se introdujo mediante PCR una secuencia diana específica para *MKS1* de 20 nucleótidos (GCTATCGCACAGGGTGCTCA). Cas9 reconoce el DNA diana gracias a una secuencia conocida como motivo adyacente del protoespaciador (PAM), que varía según la Cas9 utilizada. La interacción entre la nucleasa y la guía conlleva a la unión específica por complementariedad de secuencia. Se produce el corte de la doble hebra en las copias de *MKS1* de una cepa diploide como CR y se repara por recombinación no homóloga (Non-homologous DNA end joining, NHEJ), añadiendo un oligonucleótido guía que se aparea en los extremos de la región que se pretende eliminar.

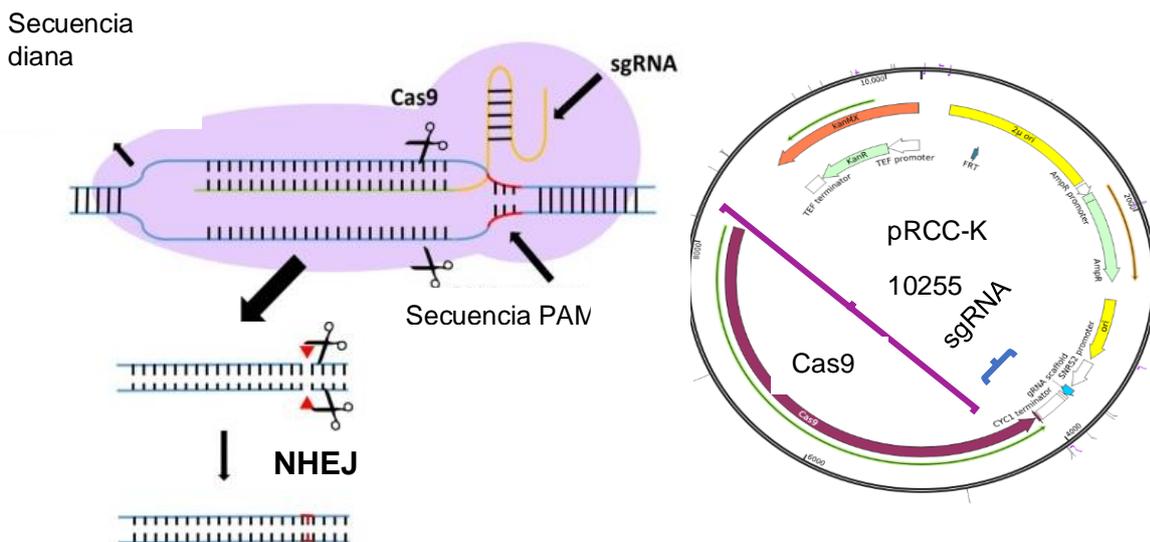


Figura 3 . Esquema de la delección de un gen mediante CrisprCas. Plásmido que contiene la Cas9 y el RNA guía.

3.2. Construcción de la cepa SafAle mutante para Mks1

La cepa cervecera SafAle es tetraploide, es decir, tiene 4 copias del gen *MKS1*, por lo que la eliminación de este gen en las 4 copias supone una mayor complicación respecto a una cepa diploide y no se pudo obtener en un solo evento de edición genética. Es por ello, que la estrategia usada para obtener SafAle *mks1Δ* fue mediante la delección de una copia mediante recombinación homóloga con un fragmento de PCR con extremos homólogos al gen de interés y la eliminación del gen marcador mediante el sistema Cre-loxP (Delneri et al., 2000). Este sistema contiene dos elementos clave: la recombinasa Cre y dos secuencias específicas, *loxP*, que son el blanco de la recombinasa. La recombinasa Cre cataliza la reacción de intercambio de las moléculas de DNA

que participan en la recombinación (Rosas Quijano & Gaillardin, 2011). A partir del vector pUG6 con el marcador seleccionable *kan* MX entre los sitios loxP se genera un fragmento de PCR con extremos homólogos a la secuencia de *MKS1*, lo que permite su fácil escisión a través de la recombinasa cre del vector YEp-*cyh-cre* en un segundo evento de transformación. De esta manera, tenemos una copia de *MKS1* delecionada. La transformación con el plásmido de CRISPR-Cas9 pRCC-K-*Mks1*, producirá el corte en las tres copias restantes, permitiendo su reparación utilizando la copia *mks1::loxP* como molde.

3.3. Efecto de la deleción de *MKS1* en una cepa panadera en la producción de CO₂ en microfermentaciones

Para analizar el papel de *Mks1* en condiciones de elaboración de pan, se midió la producción de CO₂ por cada 100 mL de cultivo en un sistema de masa modelo con alto contenido en azúcares, sin harina (Liquid Dough, LD) enriquecido con vitaminas (Figura 4), tanto en la cepa salvaje como en la cepa mutante en los fondos 71B y Cinta Roja (CR). Como se puede observar en la Figura 4.A, el rendimiento fermentativo entre la salvaje y la mutante de la cepa vínica es similar. En ambas, la producción de CO₂ es prácticamente inmediata, y por tanto la fermentación de los azúcares. En los primeros 10 días, la fermentación presenta un mayor incremento, y a partir del día 10 tiende a estabilizarse. En la Figura 4.B se puede comprobar que el rendimiento fermentativo de CR*mks1* es mayor que la salvaje, porque la cantidad de CO₂ por cada 100 mL de cultivo es mayor. En este caso, tanto la mutante como la salvaje les cuesta más arrancar el proceso de fermentación, y la producción de CO₂ es más suave hasta los 12 días que tiende a estabilizarse.

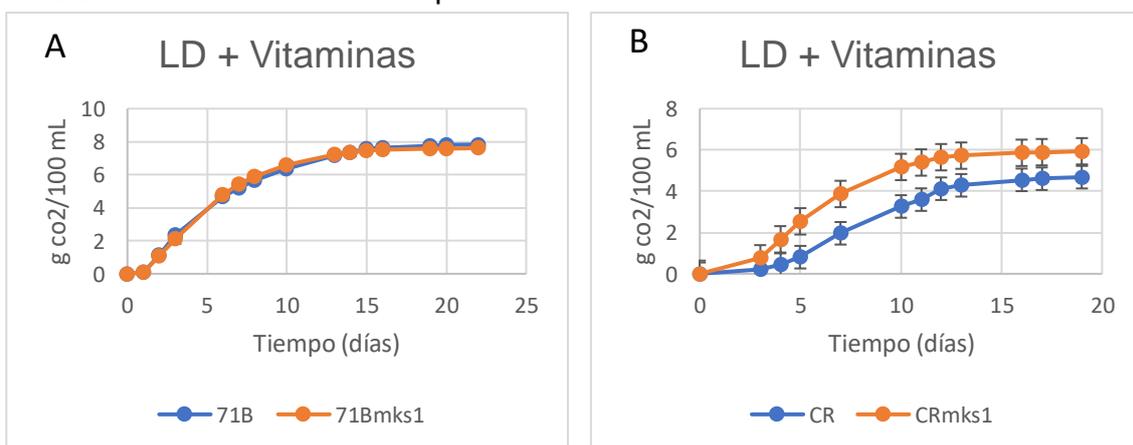


Figura 4. Relación entre las actividades de levadura vínica (A) y panadera (B) en un medio LD + vitaminas. Las medidas se realizaron durante 22 días en el caso de A, y durante 19 días en el caso de B. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C y 80 rpm. Experimento por triplicado, se muestra el valor promedio y la desviación estándar.

Lo mismo se comparó en un medio de cultivo de Malta (Figura 5). En este caso, a penas se observan diferencias en el rendimiento fermentativo entre la salvaje y la mutante, tanto como en la cepa vínica (A) como en la panadera (B), como en la cervecera (C).

Como se puede observar en la Figura 5, la fermentación de las cepas vínica y panadera presenta actividad durante los 3 primeros días, hasta que se consume todos los azúcares. Después de 3 días la producción de CO₂, y por tanto la actividad fermentativa, se estabiliza. En el caso de la cepa cervecera, también presenta actividad fermentativa durante los 3 primeros días, y posteriormente se mantiene, pero a diferencia de las otras dos cepas, la fermentación de ambas no van a la par, sino que la cepa salvaje presenta una mayor actividad los dos primeros días que la mutante.

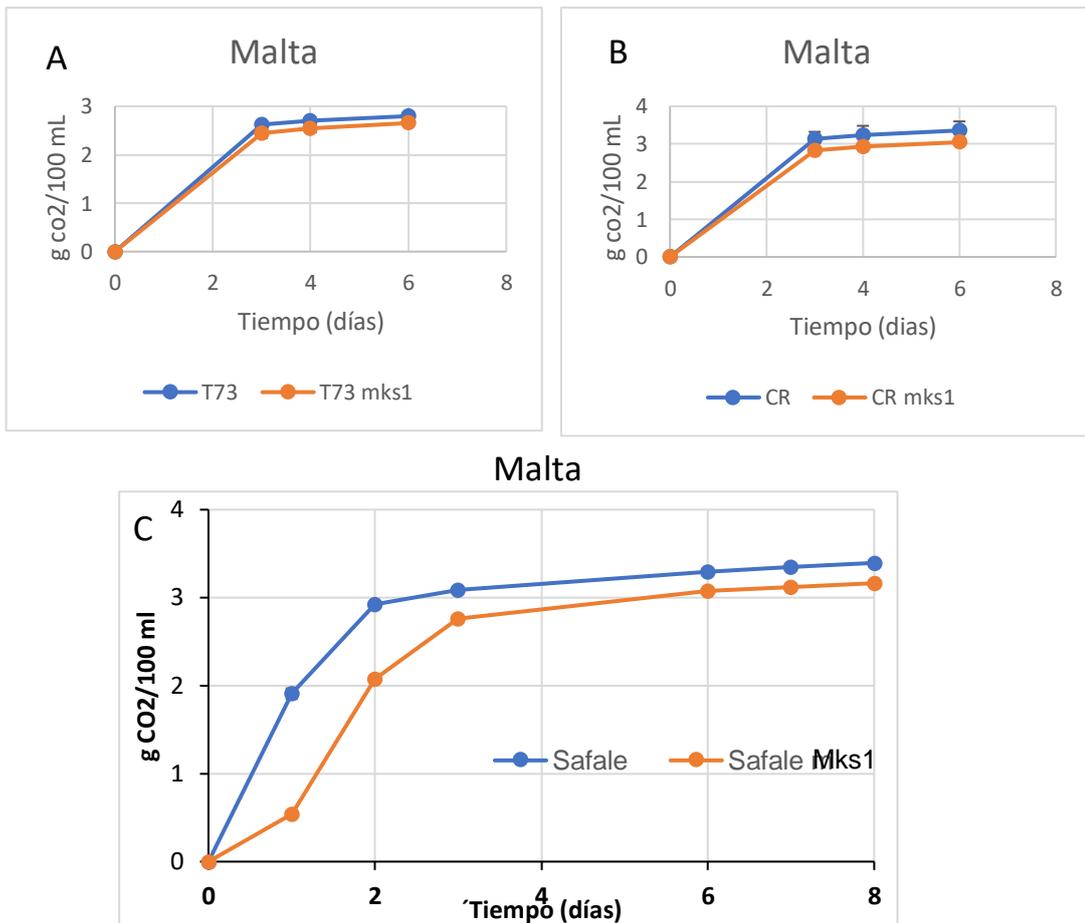


Figura 5 Relación entre las actividades de levadura vínica (A) y panadera (B) en un medio LD + vitaminas. C. Fermentación de una cepa cervecera en malta de cebada. Las medidas se realizaron durante 22 días en el caso de A, y durante 19 días en el caso de B. Las incubaciones se llevaron a cabo a 30°C y 80 rpm.

3.4. Producción de glicerol

Uno de los principales subproductos del metabolismo de la levadura es el glicerol, y presenta un papel importante en la fisiología de la levadura, como el equilibrio redox, tolerancia al choque hiperosmótico, protección contra el estrés oxidativo, respuesta al choque térmico, entre otros (Orozco et al., 2016). Se analizó el contenido de éste en la cepa mutante y salvaje CR y SafAle, en un medio LD + Vitaminas, rico en azúcares y en malta, respectivamente. Se recoge

el sobrenadante del extracto a diferentes horas, y el resultado obtenido se encuentra en la Figura 6A y 6B.

En la figura 6A se observa que en la primera hora de fermentación a penas hay diferencias en la producción de glicerol entre la cepa salvaje y la mutante, presentando un contenido de glicerol en mg por gramo de células y hora de 4,9 y 5,4 respectivamente. En la siguiente hora, a producción de glicerol continúa pero a menor velocidad, es decir, 2,8 y 3,6 mg de glicerol por gramo de células y hora. En las dos últimas horas, el aumento del glicerol es más notorio en la cepa mutante que en la salvaje, siendo 2.5 mg la salvaje respecto 4 mg de la mutante por gramo de células y hora.

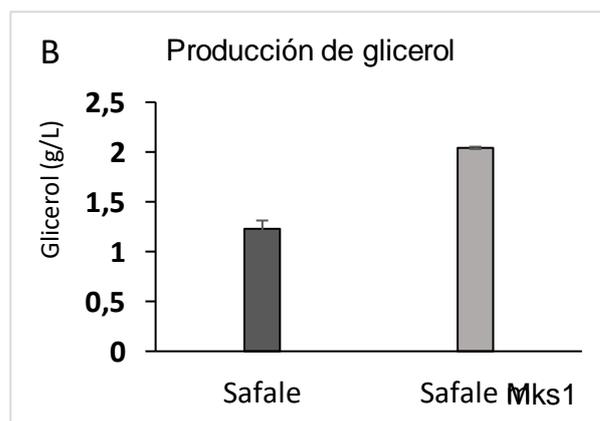
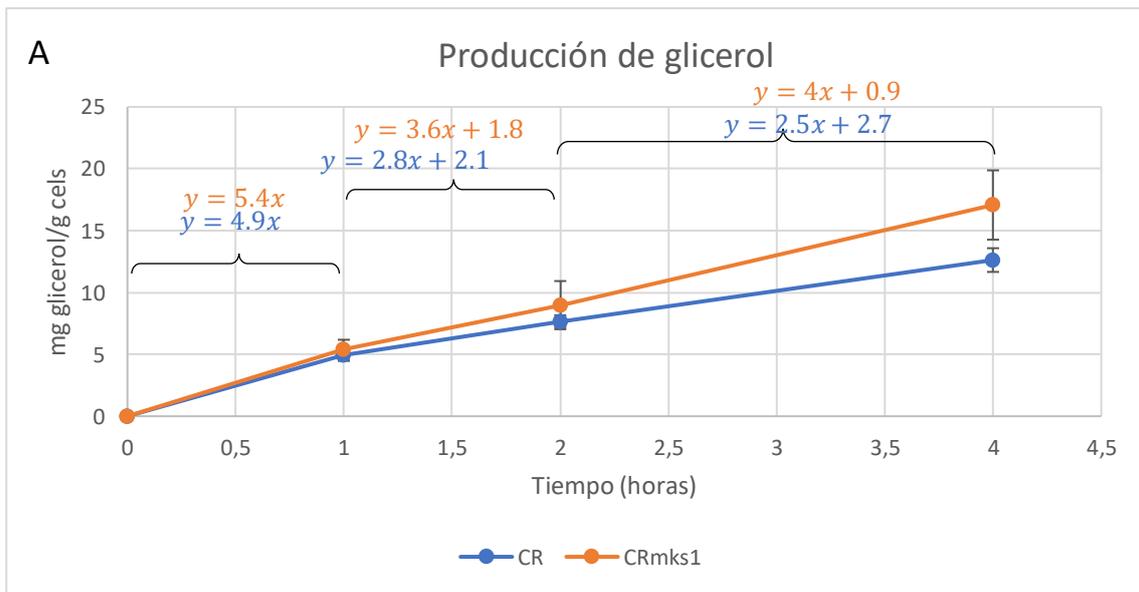


Figura 6. A. Producción de glicerol extracelular. Análisis del contenido de glicerol a tiempo 0, 1, 2 y 4 horas. B. Producción de glicerol extracelular. Análisis del contenido de los subproductos de la fermentación de la malta a tiempo 8. Incubación a 30°C y 80 rpm. Los experimentos se realizaron por triplicado

En la figura 6B se analiza la producción de glicerol, a tiempo 8 días, y como se puede comprobar, la cepa SafAleMks1 presenta mayor cantidad de glicerol en el medio respecto la cepa salvaje

3.5. Respuesta a estrés osmótico y metabólico (goteos)

Durante los procesos de fermentación, las células de levadura están sometidas a una variedad de tensiones ambientales, por lo que estas condiciones de estrés severas pueden reducir su eficiencia de fermentación. Es por ello por lo que se desea tanto la tolerancia celular a condiciones adversas para sus aplicaciones biotecnológicas. En diferentes condiciones de estrés, se cultivaron las cepas salvaje y mutante de la levadura vínica T73 y la panadera CR, y los resultados se observan a continuación (Figura 7).

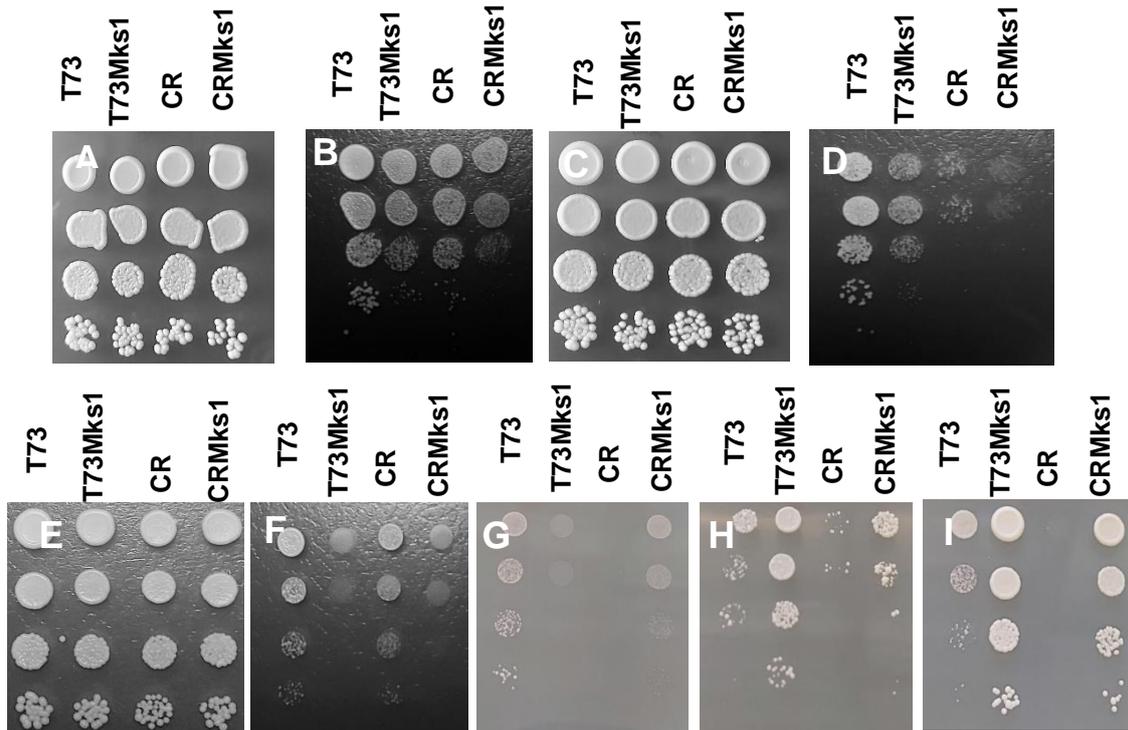


Figura 7. Diluciones seriadas de cultivos celulares de las cepas salvaje y mutante de T73 y CR en distintas condiciones de estrés. A. Control YPD. Cepas cultivadas en YPD y sembradas en YPD. B. Células sometidas a congelación durante 48 h, a una temperatura de -18°C en medio YPD. C. Control YPD. Células cultivadas en melaza y sembradas en YPD. D. Lo mismo que B, pero congeladas en melaza de remolacha al 6%. E. Control de crecimiento celular en medio SD. F. SD+ SM (sulfometuronmetilo) a 1 mg/l. G. SD + AZC (ácido azetidín carboxílico) 5 mM. H. SD+ 3AT (aminotriazol) 10 mM. I. SD + AEC (aminoetilcisteína) 35 mg/l. Las placas se incubaron 24 h a 30°C .

Cuando las levaduras se someten a estrés por congelación en medio YPD (Fig.7B), no se observa mucha diferencia entre cepas salvajes y mutante. Eso indica que este gen no tiene particular relevancia en la tolerancia a congelación. En el caso de someterse a congelación en melaza de remolacha al 6% de sacarosa (Fig.7D), la cepa panadera presenta un menor crecimiento, tanto la salvaje como la mutante. Eso es posible que sea debido al medio de congelación, siendo la cepa vínica más resistente a la congelación en medio similar al mosto que la cepa panadera en el mismo medio. En presencia de inhibidores de síntesis de aminoácidos, se encuentran grandes diferencias de crecimiento. El sulfometuronmetilo (SM) inhibe la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada valina, leucina e isoleucina (Jia et al., 2000), y como se puede comprobar en la Fig.7E, las cepas mutantes son más sensibles porque tienen el metabolismo de aminoácidos más enfocado a la lisina y menos enfocado hacia

el resto, retrasando en mayor medida su crecimiento. El ácido azetidín carboxílico (AZC) es un análogo tóxico de la prolina, que provoca el plegamiento incorrecto y la inestabilidad térmica de las proteínas en las que se incorpora de manera competitiva con la prolina y, por lo tanto, inhibe el crecimiento celular (Trotter et al., 2002). Esto se puede observar en la Fig.7G, donde hay presencia de biomasa en la cepa salvaje T73, ausencia de crecimiento en la cepa salvaje de CR, indicando que la cepa panadera es mucho más sensible que la vínica frente a este inhibidor. El aminotriazol (3AT) es un inhibidor de la síntesis de histidina (Natarajan et al., 2001), y como se puede comprobar en la Fig.7H, las cepas mutantes presentan un mayor crecimiento que las salvajes. En la Fig.7I se observa el mayor crecimiento del mutante en presencia de aminoetilcisteína (AEC), un análogo de la lisina. El fenotipo resultante confirma la delección del gen *MKS1* en ambos casos debido al mayor crecimiento en las cepas mutantes.

3.6. Curvas de crecimiento en diferentes medios

Se pretende comprobar el comportamiento bajo diferentes fuentes de carbono de las distintas cepas utilizadas con el fin de determinar el papel de la respuesta retrógrada. Se comparó en primer lugar el crecimiento de las dos cepas vínicas mutantes (T73rtg2 y T73mks1) con el crecimiento de la cepa salvaje T73, ya que solo se dispone del mutante en el gen *RTG2* en este fondo genético (Figura 8). Las levaduras se cultivaron en un medio rico que contenía, como fuente de carbono, glucosa (YPD), sacarosa (YPS) y maltosa (YPM). YPD es el medio estándar de referencia, pero la sacarosa y la maltosa son más propios de medios industriales como melazas y maltas.

También se compara la cepa panadera CR (Figura 9) y la cervecera SafAle (Figura 10), tanto la salvaje como la mutante en los medios YPD e YPM. El crecimiento se llevó a cabo en placas multipocillo a 30°C durante 24 h (en el caso de las cepas diploides) o 48 h (en el caso de la cepa tetraploide SafAle) en Multiskan, donde quedaba registrado la OD_{600} a lo largo de las horas y se obtenían parámetros como la velocidad máxima de crecimiento (V_{max}), la OD_{600max} y el tiempo de latencia.

Teniendo en cuenta la Figura 8, en los tres medios de cultivo, se observa que no hay a penas diferencias de crecimiento entre T73 salvaje y T73rtg2. La producción de biomasa en todos los casos no empieza hasta las 5 horas, pero son la cepa salvaje y la mutante *rtg2Δ* las que tienen mayor velocidad de crecimiento en todos los casos, siendo así la mutante *mks1Δ* la cepa con menor producción de biomasa. La velocidad máxima de crecimiento la presenta la cepa salvaje en los tres casos, y la OD_{600max} es mayor en T73 *rtg2* en medio YPM e YPS, y en YPD es mayor en la cepa salvaje.

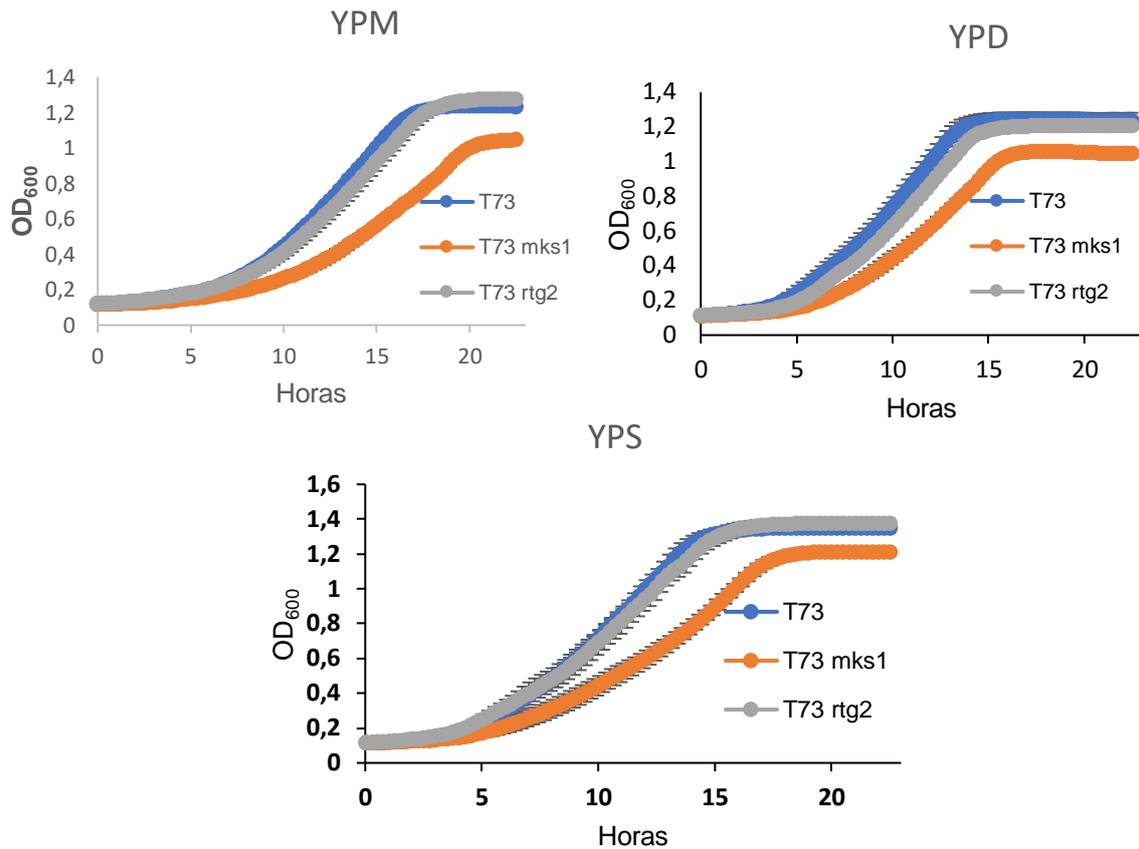


Figura 8. Curvas de crecimiento por medición de la OD₆₀₀ en medio YPM, YPD e YPS, de la cepa salvaje T73 y las cepas mutantes en los dos genes, mks1 y rtg2. Se muestra el promedio de tres réplicas.

A continuación, en la Figura 9 se compara el crecimiento celular en la cepa panadera CR, tanto la salvaje como la mutante mks1 en los medios YPD e YPM. Al igual que anteriormente, hasta las 5 horas no empieza el crecimiento, y es la CR salvaje en medio estándar YPD, rico en glucosa, la que presenta mayor velocidad de crecimiento y mayor biomasa obtenida. Le sigue la cepa salvaje en medio YPM, la cepa mutante en medio YPD y por último, la cepa mutante en medio YPM.

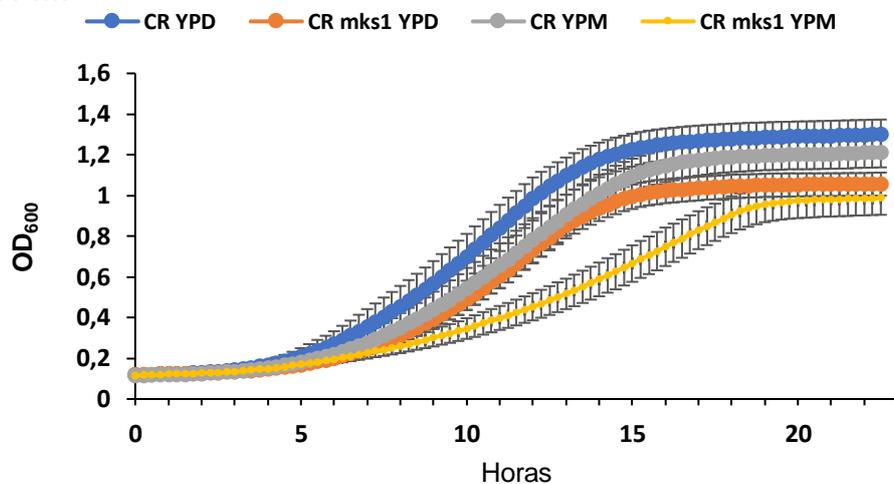


Figura 9. Comparativa de las curvas de crecimiento de la cepa panadera CR, tanto salvaje como mutante mks1, en medio YPD e YPM. Se muestra el promedio de tres réplicas.

La última curva de crecimiento analizada se observa en la Figura 10, donde se compara el crecimiento celular en la cepa cervecera SafAle, tanto la salvaje como la mutante *mks1Δ* en los medios YPD e YPM. En este caso, al ser una cepa tetraploide, el crecimiento es más lento, ya que el material genético tiene que replicarse el doble de veces que en una cepa diploide. A diferencia que las anteriores, se observa que el crecimiento celular empieza a las 10 horas, en vez de a las 5 horas, pero sigue prácticamente el mismo comportamiento que las anteriores: SafAle salvaje en medio estándar YPD, rico en glucosa, la que presenta mayor velocidad de crecimiento y mayor biomasa obtenida, aunque en este caso se llega al máximo de biomasa obtenida a las 17 horas de incubación. Le sigue la cepa salvaje en medio YPM, la velocidad de crecimiento es menor, y alcanza a las 20 horas el máximo obtenido de biomasa. La cepa mutante en medio YPD presenta una velocidad de crecimiento menor, y después de las 30 horas llega a su máxima biomasa. Por último, la cepa mutante en medio YPM, presenta un aumento de biomasa constante, es decir, la velocidad de crecimiento es constante a lo largo de las horas. A las 45 horas se paró el experimento, pero se supone que llegará a la mayor biomasa unas horas después y sin llegar a sobrepasar al resto.

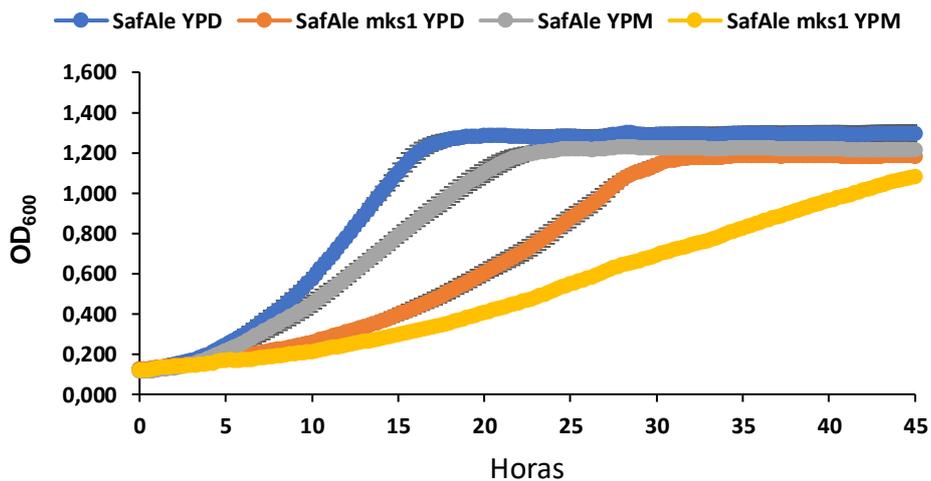


Figura 10. Comparativa de las curvas de crecimiento de la cepa cervecera SafAle, tanto la salvaje como la mutante *mks1*, en medio YPD e YPM. Se muestra el promedio de tres réplicas

4. CONCLUSIONES

El objetivo de este trabajo fue estudiar el papel de la respuesta retrógrada en diferentes cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae*, panadera (CR) y cervecera (SafAle) en condiciones de crecimiento que simulan fermentaciones implicadas en la producción de alimentos, en comparación con lo ya conocido en levaduras vínicas. Este estudio se realizó utilizando las cepas y sus respectivos mutantes *mks1Δ*, de forma que se elimina el represor de la respuesta retrógrada.

La cantidad de glicerol producido como subproducto de la fermentación, es mayor en CR*mks1* que en CR salvaje y en SafAle*mks1* frente a SafAle, con lo que se prueba que esta ruta es importante en la producción de este metabolito

en fermentaciones panaderas y cerveceras, como ya se sabía de las fermentaciones vínicas. Fenotípicamente, en presencia de inhibidores de síntesis de aminoácidos, como el SM, AZC, 3AT o AEC, se observan grandes diferencias entre las cepas salvajes y mutantes tanto como en T73 como en CR, demostrando así el papel de la respuesta retrógrada frente al crecimiento celular, pero en ambos casos se confirma que la delección de *MKS1* aumenta la tolerancia a AEC, con lo que los mecanismos moleculares están conservados en ambos tipos de levadura. La delección de *MKS1* causa defectos en el crecimiento en todas las cepas en diversas fuentes de carbono, lo que indica que es una ruta importante en fermentaciones industriales.

5. REFERENCIAS

- Bergkessel, M., & Guthrie, C. (2013). Colony PCR. *Methods in Enzymology*, 529, 299–309. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-418687-3.00025-2>
- Bonato, D. (2021). The diversity of commercially available ale and lager yeast strains and the impact of brewer's preferential yeast choice on the fermentative beer profiles. *Food Research International*, 141(January), 110125. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110125>
- Busti, S., Coccetti, P., Alberghina, L., & Vanoni, M. (2010). Glucose signaling-mediated coordination of cell growth and cell cycle in *Saccharomyces Cerevisiae*. *Sensors*, 10(6), 6195–6240. <https://doi.org/10.3390/s100606195>
- Conrad, M., Schothorst, J., Kankipati, H. N., Van Zeebroeck, G., Rubio-Teixeira, M., & Thevelein, J. M. (2014). Nutrient sensing and signaling in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 254–299. <https://doi.org/10.1111/1574-6976.12065>
- Corral-Lugo, A., Morales-García, Y. E., Pazos-Rojas, L. A., Ramírez-Valverde, A., Martínez-Contreras, R. D., & Muñoz-Rojas, J. (2012). Cuantificación de bacterias cultivables mediante el método de “Goteo en Placa por Sellado (o estampado) Masivo.” *Revista Colombiana de Biotecnología*, 14(2), 147–156. <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/37416/40417>
- Delneri, D., Tomlin, G. C., Wixon, J. L., Hutter, A., Sefton, M., Louis, E. J., & Oliver, S. G. (2000). Exploring redundancy in the yeast genome: An improved strategy for use of the cre-loxP system. *Gene*, 252(1–2), 127–135. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(00\)00217-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(00)00217-1)
- Dilova, I., Chen, C. Y., & Powers, T. (2002). Mks1 in concert with TOR signaling negatively regulates RTG target gene expression in *S. cerevisiae*. *Current Biology*, 12(5), 389–395. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00677-2](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00677-2)
- Druseikis, M. E., & Covo, S. (2022). Checks and balances of the RTG pathway under arginine deprivation and canavanine exposure in *Saccharomyces cerevisiae*. *BioRxiv*.
- Ferrer-Pinós, A., Garrigós, V., Matallana, E., & Aranda, A. (2021). Mechanisms of metabolic adaptation in wine yeasts: Role of *gln3* transcription factor. *Fermentation*, 7(3). <https://doi.org/10.3390/fermentation7030181>
- Gerhards, S., Talaverano, M. I., Andrés, A. I., Sánchez-Vicente, C., Lozano, J., García-Latorre, C., Petró, M. J., & Rodrigo, S. (2021). Different dry hopping and fermentation methods: influence on beer nutritional quality. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 101(7), 2828–2835. <https://doi.org/10.1002/jsfa.10912>
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in Enzymology*, 350(February), 87–96.

[https://doi.org/10.1016/S0076-6879\(02\)50957-5](https://doi.org/10.1016/S0076-6879(02)50957-5)

- Jazwinski, S. M. (2013). The Retrograde Response: When Mitochondrial Quality Control Is Not Enough. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1833 (2), 400–409.
- Jazwinski, S. M. (2014). The Retrograde Response- A Conserved Compensatory Reaction to Damage from Within and from Without. *Progress in Molecular Biology and Translational Science*, 127, 133–154.
- Jia, M. H., Larossa, R. A., Lee, J. M., Rafalski, A., Derose, E., Gonye, G., & Xue, Z. (2000). Global expression profiling of yeast treated with an inhibitor of amino acid biosynthesis, sulfometuron methyl. *Physiological Genomics*, 2000(3), 83–92. <https://doi.org/10.1152/physiolgenomics.2000.3.2.83>
- Liu, Z., Sekito, T., SŠpiřek, M., Thornton, J., & Butow, R. A. (2003). Retrograde signaling is regulated by the dynamic interaction between Rtg2p and Mks1p. *Molecular Cell*, 12(2), 401–411. [https://doi.org/10.1016/S1097-2765\(03\)00285-5](https://doi.org/10.1016/S1097-2765(03)00285-5)
- Matallana, E., & Aranda, A. (2017). Biotechnological impact of stress response on wine yeast. *Letters in Applied Microbiology*, 64(2), 103–110. <https://doi.org/10.1111/lam.12677>
- Meneses, F. J., Henschke, P. a, & Jiranek, V. (2002). A survey of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* reveals numerous altered patterns of maltose and sucrose utilisation. *J. Inst. Brew.*, 108, 310–321.
- Natarajan, K., Meyer, M. R., Jackson, B. M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A. G., & Marton, M. J. (2001). Transcriptional Profiling Shows that Gcn4p Is a Master Regulator of Gene Expression during Amino Acid Starvation in Yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 21(13), 4347–4368. <https://doi.org/10.1128/mcb.21.13.4347-4368.2001>
- Orozco, H., Sepúlveda, A., Picazo, C., Matallana, E., & Aranda, A. (2016). RNA binding protein Pub1p regulates glycerol production and stress tolerance by controlling Gpd1p activity during winemaking. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(11), 5017–5027. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7340-z>
- Panadero, J., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2005). Validation of a flour-free model dough system for throughput studies of baker's yeast. *Applied and Environmental Microbiology*, 71(3), 1142–1147. <https://doi.org/10.1128/AEM.71.3.1142-1147.2005>
- Randez-Gil, F., Corcoles-Saez, I., & Prieto, J. A. (2013). Genetic and phenotypic characteristics of baker's yeast: Relevance to baking. *Annual Review of Food Science and Technology*, 4(1), 191–214. <https://doi.org/10.1146/annurev-food-030212-182609>
- Rosas Quijano, R., & Gaillardin, C. (2011). El sistema Cre/loxP1 como una herramienta genética en *Yarrowia lipolytica*. *Revista Mexicana de Micología*, 33, 17–25.
- Sanchez, R. G., Solodovnikova, N., & Wendland, J. (2012). Breeding of lager yeast with *Saccharomyces cerevisiae* improves stress resistance and fermentation performance. *Yeast*, 29(8), 343–355. <https://doi.org/10.1002/yea.2914>
- Trotter, E. W., Kao, C. M. F., Berenfeld, L., Botstein, D., Petsko, G. A., & Gray, J. V. (2002). Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 277(47), 44817–44825. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204686200>
- Vallejo, B., Peltier, E., Garrigós, V., Matallana, E., Marullo, P., & Aranda, A. (2020). Role of *Saccharomyces cerevisiae* Nutrient Signaling Pathways During Winemaking: A Phenomics Approach. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00853>
- Zhang, F., Wen, Y., & Guo, X. (2014). CRISPR/Cas9 for genome editing: Progress, implications and challenges. *Human Molecular Genetics*, 23(R1), 40–46. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddu125>