

DEPARTAMENT DE BIOQUÍMICA I BIOLOGIA
MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN Y MEJORA DE LA RESISTENCIA DE
LAS LEVADURAS VÍNICAS A LA DESHIDRATACIÓN EN
LA PRODUCCIÓN DE LEVADURA SECA ACTIVA

ELENA GARRE GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALÈNCIA
Servei de Publicacions
2008

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 6 de març de 2008 davant un tribunal format per:

- D. Juan Carlos Argüelles Ordoñez
- D^a. Elisa Cabiscol Catalá
- D. Antonio Tomás Palacios García
- D. José Manuel Guillamón Navarro
- D^a. Paula Martínez Alepuz

Va ser dirigida per:

D^a. Emilia Matallana Redondo

©Copyright: Servei de Publicacions
Elena Garre García

Depòsit legal:

I.S.B.N.:978-84-370-7128-2

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115

VNIVERSITAT  VALÈNCIA

Facultat de Ciències Biològiques

**Caracterización y mejora de la
resistencia de las levaduras vínicas
a la deshidratación en la producción
de Levadura Seca Activa**

Elena Garre García

Tesis Doctoral, 2008



CARACTERIZACIÓN Y MEJORA DE LA RESISTENCIA DE LAS LEVADURAS VÍNICAS A LA DESHIDRATACIÓN EN LA PRODUCCIÓN DE LEVADURA SECA ACTIVA



Trabajo realizado por ELENA GARRE GARCÍA en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València y en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, para optar al grado de Doctora en Biología.



Valencia, 24 de Enero de 2008

EMILIA MATALLANA REDONDO, doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de València

CERTIFICA que la presente Tesis Doctoral titulada “Caracterización y mejora de la resistencia de las levaduras vínicas a la deshidratación en la producción de levadura seca activa” ha sido realizada por la Licenciada en Biología, Srta. Elena Garre García, bajo su dirección en su laboratorio del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos.

Valencia, Enero de 2008

Fdo: Emilia Matallana Redondo

*A todos mis seres queridos, familia y amigos, porque todos
sois parte de mi vida os dedico un pedacito de este trabajo.*

A mi abuela Delfina.

Resulta difícil plasmar sobre el papel lo increíble que han sido para mí estos años de tesis pero aun más reflejar la gratitud que siento hacia muchas personas que me han rodeado, ayudado y apoyado durante este proyecto. Aunque unas pocas líneas no son suficientes para reflejar todos los momentos vividos durante este periodo, quisiera al menos mostrar mi agradecimiento a aquellas personas que han sido esenciales para conseguir que llegara hasta donde estoy hoy, escribiendo estas palabras.

A Emilia, gracias por darme la oportunidad de adentrarme en el mundo de la investigación y guiarme por él durante estos años. Pero también y de forma destacada por ser una amiga con la que compartir penas y glorias. Admiro tu gran implicación e ilusión en todas las empresas en las que te adentras tanto en lo profesional como en lo personal y me enorgullezco de haber formado parte de una de ellas.

A los compañer@s de laboratorio, tan importantes cuando el trabajo va más allá de unas simples horas al día y requiere una implicación en muchas ocasiones emocional: Agustín, Geno, Fernando, Marce, Aurora, Bea, Miguel, Verónica, Rocío, y Marisa. Geno, gracias por tus enseñanzas en el día a día del banco de laboratorio y por escucharme en los momentos más difíciles. Fernando, espalda con espalda desde los inicios, gracias por tu compañerismo y las charlas científicas y no científicas que han hecho las horas más amenas. Miguel, gracias por poner orden en el laboratorio y por prestarme tus manos cuando las mías ya no daban abasto. Marce, por prestarme tu ayuda y atención siempre que la he necesitado. Agustín, por tus consejos y resolver las numerosas dudas experimentales con las que te bombardeé algunas (bastantes) veces. Marisa, gracias por traer esa locura gaditana y por tu compañía hasta horas intempestivas, me alegro de que el par de semanas fueran al final dos años a tu lado. Y a la gente que ha formado parte de esta familia por un periodo corto pero suficiente para dejar huella, Noelia, Elisa, Rebeca, Claudia, Päivi, Gemma y Josep Vicent.

A Rocío, la alegría del laboratorio. Ha sido un placer poder compartir contigo los últimos tres años, tan intensos y cargados de risas, inquietudes, juergas y alguna que otra lagrimilla. Gracias por esa energía inagotable y tu curiosidad insaciable, has sido mi “chispa adecuada”. Gracias por ser ese empujoncito que me hace falta en muchos momentos.

Al laboratorio vecino 304. Al grupo de respuesta frente a patógeno, Carmen, Mariola, Iván, Begoña y Patricia, y al grupo de inmunotecnología, Antonio, Celia, Jorge, Jovi y Laura. Gracias por enseñarme otros aspectos de la ciencia fuera del mundo de las levaduras y por estar siempre dispuestos a echar una mano. En especial a Iván, Celia y Laura, gracias por vuestra amistad y

apoyo y sobretodo por esas conversaciones delirantes post-comida que me reponen de energía positiva para el resto del día.

A Mariola, empezamos hombro con hombro (literalmente) y el roce al final hace el cariño. Gracias por esas discusiones acerca de todo y de nada, por desvariar conmigo de vez en cuando (fantasear un poco libera la mente) y por tus frases celebres (creo que nos dan ya para editar un libro) que siempre consiguen arrancar la carcajada incluso en los momentos más críticos.

A todo el Departamento de Biotecnología del I.A.T.A, en especial al personal de la tercera planta con los que he compartido todo este tiempo. A Amparo y Teresa y la gente del laboratorio 307, por aguantar estoicamente los seminarios a las 9.30 de la mañana. A Roseta y nuestras conversaciones de pasillo. A Paqui y José Antonio y la gente del laboratorio 303, por prestarme vuestra ayuda y material en numerosas ocasiones.

A Anne-Ortiz Julien, Françoise Raginel, Pierrine, Celine y todo el personal del *Laboratory of Research and Development* en Toulouse (Francia). Gracias por acogerme en vuestro laboratorio y por las enseñanzas sobre producciones industriales que han sido fundamentales para realizar esta tesis. A Antonio Palacios, gracias por ayudarme en el contacto con la empresa y con los trámites de la estancia. A los *stagiaires* (Christelle, Marika, Elodie, Dorothée y Sabine) y a Aurelie, gracias por hacerme un huequito en vuestra vida durante los tres meses de estancia y por las conversaciones inglés-francés-español tan entretenidas (para haberlas grabado).

A mis amig@s: Silvia, Virgi, Ana, Abel, Guille, Laura, Jaime, Miriam, Rey, Conchín, Elena, Ismael, Ely, Yaiza, Arantxa, Germán, Patricia, Diego, Edu, Laura D. y el peque, sois mi válvula de escape. Gracias por todos los momentos que hemos compartido, que en algunos casos ha sido casi toda una vida, y los que quedan por llegar.

A mis compañeras de Biología, M^a José y Patri, por compartir ilusiones e incertidumbres durante cinco años de carrera. Gracias por mantener esta amistad aunque nuestros caminos hayan tomado cada uno su rumbo.

A mis amigas de la farándula, Ester, Alicia, Celia, Susana, Vero e Isabel. Tras un largo día de trabajo, descargar tensiones a vuestro lado al ritmo de *Fly me to the moon* ha sido todo un lujo.

A Roberto, gracias por transmitirme tu pasión por la ciencia que me llevó a embarcarme en este proyecto. Por haber sido mi maestro de pipeta. Estar a tu lado todos estos años (que ya son unos cuantos), abriendo y cerrando etapas, como esta que ya se acaba, y madurar juntos como personas es fantástico. A ver que nos espera tras la siguiente puerta...

A mis padres, porque vuestro esfuerzo diario ha permitido que yo sea una privilegiada y haya podido cumplir mis sueños, porque principalmente a vosotros os debo lo que soy y donde estoy. A mi prima María que ya casi está hecha una artista, porque me alegras la vista con tus cuadros. En general, a mi familia, abuelos, tíos, primos, por vuestro cariño y apoyo incondicional.

De forma especial, a todas las mujeres que me rodean, familiares, amigas y compañeras (que como se puede ver en estas líneas son muchas), por ser un ejemplo a seguir, luchadoras y emprendedoras, capaces de compaginar familia, trabajo y sueños. Valientes para afrontar aspectos de la vida que muchas veces no resultan tan fáciles como el resto del mundo cree.

La realización de este trabajo ha sido posible gracias a la concesión de una ayuda predoctoral de Formación de Personal Investigador (FPI) del Ministerio de Educación y Ciencia (BES-2003-0971). Este trabajo se enmarca dentro del proyecto “Desarrollo de estrategias para la mejora de la respuesta a estreses característicos del uso industrial de levaduras vínicas” del Ministerio de Educación y Ciencia (AGL2002-01109).

ÍNDICE

<u>Índice</u>	8
<u>Abreviaturas</u>	12
<u>Introducción</u>	16
1. Las levaduras vínicas y su uso como cultivos iniciadores	17
1.1. Las levaduras vínicas	17
1.2. Los cultivos iniciadores	19
1.3. Mejora genética de levaduras vínicas	20
2. La producción industrial de levadura vínica seca activa (LSA)	28
2.1. Mantenimiento de cultivos puros	28
2.2. Obtención de la biomasa: fermentación	28
2.3. Deshidratación de la biomasa	30
2.4. Rehidratación de la levadura seca activa	31
3. La respuesta a estrés durante la producción de levadura seca activa	33
3.1. Mecanismos moleculares de respuesta a estrés ambiental	33
3.1.1. Ruta de respuesta general a estrés	33
3.1.2. Respuesta a estrés térmico	34
3.1.3. Respuesta a estrés hiperosmótico	36
3.1.4. Respuesta a estrés oxidativo	37
3.2. Respuesta a estrés durante la obtención de la biomasa de levadura	44
3.3. Respuesta a estrés durante la deshidratación y la rehidratación	46
4. Función de la trehalosa en la levadura <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	50
4.1. Metabolismo de la trehalosa y su implicación en la respuesta a estrés	50
4.2. Papel de la trehalosa durante la deshidratación-rehidratación	54
<u>Objetivos</u>	57
<u>Materiales y Métodos</u>	59
1. Materiales	60
1.1. Cepas de microorganismos	60
1.2. Plásmidos	61
1.3. Oligonucleótidos	62
2. Medios y condiciones de cultivos	66
2.1. Bacterias	66
2.2. Levaduras	66

2.2.1. Condiciones de laboratorio	66
2.2.2. Condiciones industriales	67
2.3. Medida de viabilidad	68
3. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos	69
3.1. Obtención de DNA	69
3.1.1. DNA plasmídico bacteriano	69
3.1.2. DNA genómico de levadura	69
3.2. Obtención de RNA total de levaduras	69
3.3. Tratamientos enzimáticos del DNA	70
3.4. Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)	70
3.5. Transcripción reversa-PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) en dos pasos	70
3.6. Electroforesis de ácidos nucleicos	71
3.6.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	71
3.6.2. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa	72
3.7. Aislamiento de fragmentos de DNA en geles de agarosa	72
3.8. Transferencia de ácidos nucleicos a filtros	72
3.9. Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA	73
3.10. Hibridación de ácidos nucleicos	74
3.11. Autorradiografía	74
4. Métodos de manipulación de microorganismos	75
4.1. Transformación de <i>Escherichia coli</i>	75
4.2. Transformación de levadura	75
4.3. Eliminación del marcador de selección integrado en el genoma	75
4.4. Análisis de la eliminación o inserción de secuencias de DNA	76
5. Cuantificaciones metabólicas	77
5.1. Cuantificación de azúcares	77
5.1.1. Cuantificación de glucosa mediante el método enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa	77
5.1.2. Cuantificación de trehalosa	77
5.2. Determinación de actividades trehalasa	77
5.3. Cuantificación de glutatión	78
5.4. Determinación de la peroxidación de los lípidos	79
5.5. Determinación enzimática del etanol	80
5.6. Cuantificación de la capacidad fermentativa	80
<u>Resultados y Discusión</u>	81

I. Simulación a escala de laboratorio y en planta piloto de las condiciones de secado industrial para la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73.	82
1.1. Condiciones de obtención de biomasa	83
1.2. Condiciones de deshidratación	87
1.3. Comparación de las propiedades de la LSA obtenida a escala de laboratorio y en planta piloto	89
1.4. Discusión	92
II. Caracterización de la respuesta a estrés durante la deshidratación en la levadura vínica T73	96
2.1. Expresión de genes marcadores de estrés durante la deshidratación a escala de laboratorio	97
2.2. Estudio de la respuesta a estrés oxidativo durante la etapa de deshidratación en la obtención de LSA a escala de laboratorio	100
2.3. Estudio de la respuesta a estrés durante la etapa de deshidratación en la obtención de LSA a escala de planta piloto	104
2.4. Comparación de la LSA obtenida a escala de laboratorio y en planta piloto con los lotes industriales	112
2.5. Discusión	113
III. Estudio del papel de la trehalosa y su metabolismo durante la deshidratación.	122
3.1. Estudio del papel de la trehalosa y su movilización durante el estrés salino: aproximación a la problemática de la deshidratación con cepas y condiciones de laboratorio	123
3.1.1. Análisis de la expresión génica de las enzimas trehalasa, de sus actividades correspondientes y de su efecto sobre la acumulación de trehalosa durante el estrés salino	123
3.1.2. Movilización de la trehalosa durante la recuperación tras estrés salino	131
3.2. Papel de la trehalosa y de las enzimas trehalasa durante la deshidratación de T73. Modificaciones genéticas para la mejora del proceso de deshidratación industrial	134
3.3. Discusión	142
<u>Conclusiones generales</u>	150
<u>Listado de tablas y figuras</u>	152
<u>Bibliografía</u>	157

ABREVIATURAS

5-FOA	Ácido 5-fluororótico
A	Adenina
AA	Aminoácido
ATP	Adenosina trifosfato
BSA	Seroalbúmina bovina
C	Citosina
cAMP	AMP cíclico
CECT	Colección española de cultivos tipo
CoA	Coenzima A
Cys	Cisteína
D.O. ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
dCTP	Desoxicitosina trifosfato
DHAP	Dihidroxiacetona fosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
dNTPs	Desoxinucleótidos trifosfato
DTNB	Ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico
EDTA	Sal disódica del ácido etilen diamino tetraacético
G	Guanina
Glu	Glutámico
Gly	Glicina
GRX	Glutarredoxina
GSH	Glutación reducido
GSSG	Glutación oxidado
HOG	<i>High Osmolarity Glycerol</i> (Elevada osmolaridad por glicerol)
HSE	<i>Heat Shock Element</i> (Elemento de respuesta a choque térmico)
HSP	Proteína de choque térmico
kb	Kilobases de RNA o Kilo pares de bases de DNA
LEA	<i>Late Embryogenesis Abundant</i> (Proteínas abundantes en estadios tardíos de la embriogénesis)
LiAc	Acetato de litio
LSA	Levadura seca activa
MAPK	Proteína quinasa activada por mitógeno
MAPKK	Proteína quinasa quinasa activada por mitógeno
MAPKKK	Proteína quinasa quinasa quinasa activada por mitógeno
MDA	Malondialdehido

MES	Ácido 2-(N-morfolino) etanosulfúrico
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
NAD ⁺	Nicotín adenín dinucleótido oxidado
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NADP ⁺	Nicotín adenín dinucleótido fosfato oxidado
NADPH	Nicotín adenín dinucleótido fosfato reducido
NES	Señal de exportación nuclear
nm	nanómetro
OD	Oxígeno disuelto
OMG	Organismo Modificado Genéticamente
p/v	Peso/volumen
PAPS	3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PEG	Polietilenglicol
pF	picofaradio
PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
PKC1	Proteína quinasa C
PVP	Polivinil pirrolidona
QRT-PCR	Transcripción reversa-PCR cuantitativa en tiempo real
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
ROS	Especies reactivas del oxígeno
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
SDS	Dodecil sulfato sódico
Ser/Thr	Serina/treonina
STRE	<i>Stress Responsive Element</i> (Elemento de respuesta a estrés)
T	Timina
TCA	Ácido tricloroacético
<i>T_m</i>	Temperatura de transición de fase
TNB	Tionitrobenzoato
T°	Temperatura
TOR	Diana de la rapamicina
Tris	Tris(hidroximetil)aminometano

Trx	Tiorredoxina
Tyr	Tirosina
U	Unidad
UDP	Uridina difosfato
v/v	Volumen/volumen
VVM	Volumen de aire por volumen de medio por minuto
YAP	<i>Yeast AP-1</i> (Proteína activadora 1 de levadura)
YRE	<i>Yap Response Element</i> (Elemento de respuesta a la proteína activadora 1 de levadura)

INTRODUCCIÓN

1. LAS LEVADURA VÍNICAS Y SU USO COMO CULTIVOS INICIADORES

1.1. Las levaduras vínicas

La transformación del mosto de uva en vino es un proceso complejo en el que intervienen diferentes especies microbianas, como son hongos filamentosos, levaduras y bacterias (lácticas y acéticas) (Pretorius, 2000). A pesar de que el mosto de uva es un medio de crecimiento completo, su pH ácido y su elevado contenido en azúcares ejerce una fuerte presión selectiva sobre estos microorganismos y solo unas pocas especies son capaces de crecer en él (Romano *et al.*, 2006). Entre todos los microorganismos presentes en la uva, son las levaduras las principales responsables de la transformación bioquímica del mosto. La variedad de uva, la climatología, las prácticas vitivinícolas y las lesiones en las uvas causadas por mohos, insectos y pájaros son factores determinantes en la variedad y proporción de las diferentes especies de levadura en el mosto (Pretorius, 2000).

En general, las especies de levadura más abundantes en la superficie del grano de uva son del género *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) suponiendo un 50-75 % del total de la población de levaduras. En menor proporción se encuentran especies de los géneros *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* y *Rhodotorula* (Pretorius, 2000). La población de especies del género *Saccharomyces* (ej. *S. cerevisiae*) en la superficie de la uva es extremadamente baja en contradicción con su imposición a lo largo de la vinificación. Aun hoy el origen de *S. cerevisiae* es controvertido, diferentes investigaciones apuntan a diferentes procedencias (Querol *et al.*, 2003). Su limitado número en las uvas, la evidencia de no estar específicamente asociada a los viñedos u otros sustratos naturales (Martini, 1993) y su abundancia en las superficies y el equipamiento de las bodegas ha llevado a algunos investigadores a concluir que su origen no es “natural” sino que es el resultado de la selección realizada por el hombre. En cambio para otros, su presencia en la uva aunque minoritaria y su aislamiento en experimentos de fermentación espontánea en condiciones de esterilidad impidiendo la contaminación externa a la microflora de la uva (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2001; Valero *et al.*, 2007), indican que su fuente original son los viñedos. Por último, también se ha postulado que *S. cerevisiae* se ha originado a partir de *Saccharomyces paradoxus*, que se encuentra de forma natural asociada a insectos, a los exudados de los árboles y en extractos de plantas fermentados (Naumov, 1996).

Durante las fermentaciones espontáneas, las condiciones de anaerobiosis, la adición de sulfito como agente antimicrobiano, el consumo de nutrientes y el aumento del etanol ejercen una importante selección sobre la población de levaduras. En estadios tempranos, la microflora es

bastante similar a la hallada en las uvas, predominando levaduras no *Saccharomyces* como *Hanseniaspora* (*Kloeckera*), *Candida*, *Pichia* y *Metschnikowia*. Hacia la mitad del proceso, estas poblaciones empiezan a desaparecer siendo el etanol (5-7 %) producido por *S. cerevisiae* el principal responsable. En algunos casos, especies de *Hanseniaspora* (*Kloeckera*) y *Candida* pueden contribuir significativamente al aroma del vino, como es el caso de las fermentaciones a bajas temperaturas (15-20 °C) que disminuyen su sensibilidad al etanol (Erten, 2002). Pero, en general, son las levaduras vínicas del grupo *Saccharomyces sensu stricto* las que se imponen durante el resto de la fermentación, principalmente *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* y *S. paradoxus* (Romano *et al.*, 2006). Al final de la fermentación alcohólica, la población de *S. cerevisiae* empieza a disminuir. Si las condiciones de vinificación han sido adecuadas y los azúcares han sido consumidos rápidamente y en su totalidad, no suelen aparecer otras especies de levaduras (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2001). Cuando las condiciones no han sido las óptimas, otras levaduras pueden contaminar el vino, como especies de *Brettanomyces*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces*, *Torulaspota* y *Zygosaccharomyces*, influyendo negativamente en la calidad sensorial del producto final. Durante el envejecimiento y en la botella, en vinos con azúcares residuales y vinos dulces se pueden producir refermentaciones principalmente causadas por las especies *Saccharomycodes ludwigii*, *Zygosaccharomyces bailii* y algunas cepas de *S. cerevisiae* (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2001).

Debido a su predominancia en las fermentaciones vínicas, gracias a su elevado poder fermentativo y resistencia al etanol, *S. cerevisiae* es considerada la levadura vínica por excelencia. Las cepas industriales de esta especie poseen ciertas características genómicas y fisiológicas posiblemente implicadas en su adaptación a los procesos fermentativos industriales (Querol *et al.*, 2003). Mientras que las cepas usadas en el laboratorio son haploides o diploides, las levaduras vínicas son predominantemente diploides o aneuploides y en algunos casos poliploides. Algunos experimentos han relacionado el grado de poliploidía con sus diferencias físicas y metabólicas (Salmon, 1997). Otra característica es la generación de mutantes *petite*, (mutantes respiro-defectivos caracterizados por grandes deleciones o la eliminación completa del DNA mitocondrial) que ocurre espontáneamente con gran frecuencia en estas cepas. La aparición de estos mutantes se ha asociado a menudo con la habilidad de crecer anaeróbicamente. Estudios recientes (Merico *et al.*, 2007) con más de 40 cepas, la mayoría del complejo *Saccharomyces*, muestran que los linajes de levadura que sufrieron la duplicación del genoma presentan la habilidad de crecer sin oxígeno y de generar mutantes *petite*, mientras que la mayoría de especies anteriores a esta duplicación no son capaces de generar mutantes *petite* viables y necesitan oxígeno para crecer. La presencia de estas características en al menos una especie de cada género sugiere que el progenitor del complejo *Saccharomyces* ya poseía la capacidad de fermentar. La mayoría de las cepas vínicas halladas en los viñedos y bodegas son

homotálicas, tras la esporulación las formas haploides pueden cambiar de tipo sexual y conjugar rápidamente con células de la misma colonia produciendo células diploides completamente homocigotas. De esta forma, cepas que acumulan mutaciones recesivas en heterocigosis pueden pasar a ser diploides homocigotas favoreciendo la selección o la eliminación de alelos recesivos beneficiosos o deletéreos, respectivamente (Barrio *et al.*, 2006; Mortimer *et al.*, 1994). Este proceso conocido como “renovación genómica” permite a las levaduras vínicas una rápida adaptación a las condiciones cambiantes del medio. Esta adaptación también puede deberse a otros mecanismos presentes en las levaduras vínicas, como son las mutaciones espontáneas, la translocación cromosómica promovida por elementos Ty (Rachidi *et al.*, 1999) y la conversión génica (Puig *et al.*, 2000) que explican el alto grado de polimorfismo cromosómico de las cepas industriales. Además son capaces de reorganizar sus cromosomas durante el crecimiento mitótico (Longo y Vézinhel, 1993). El fenómeno *killer* es otra característica genética importante de *S. cerevisiae*, se basa en la capacidad para producir y secretar la toxina *killer* (zimocina) que es letal para cepas sensibles de la misma especie; en las cepas aisladas en mosto predominan las de tipo K₂ y K₂₈ que presentan una actividad máxima a pH bajos (Pretorius, 2000).

1.2. Los cultivos iniciadores

El concepto de inoculación del mosto con un cultivo puro de levadura para llevar a cabo la fermentación vínica fue introducido en 1890 por Müller-Thurgau (Pretorius, 2000). Las principales funciones de estos cultivos iniciadores son garantizar un rápido inicio de la fermentación, evitar las paradas de fermentación y asegurar la reproducibilidad de la calidad del vino (Degre, 1993). Para ello, es necesario que las levaduras inoculadas crezcan activamente imponiéndose sobre las especies de levadura nativas presentes en el mosto. Estudios realizados en tanques de fermentación de vino tinto y vino blanco inoculados con diferentes cultivos iniciadores en forma de levadura seca activa demuestran que, en general, son capaces de implantarse exitosamente (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2001).

Numerosos viticultores y enólogos defienden que la práctica de fermentaciones espontáneas permite obtener un vino con un estilo y calidad distintivos, y que la mezcla de diferentes poblaciones de levadura permite no solo la transformación del azúcar en alcohol sino la obtención de otros productos finales que aportan al vino mayor complejidad. Sin embargo, en algunas ocasiones esta diversidad da lugar a fermentaciones lentas e incluso paradas de la fermentación, mientras que la presencia de un número pequeño de cepas dominantes se caracteriza por una fermentación rápida y completa (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2001). La dependencia de las fermentaciones espontáneas del número y diversidad de las levaduras presentes, de la variedad y estado de la uva y del procesado hace difícil predecir y reproducir las características del producto final. En las grandes bodegas donde son condiciones esenciales que

la fermentación sea rápida y que el producto final tenga una elevada reproducibilidad y una calidad predecible, se prefiere el uso de inóculos puros de levaduras seleccionadas (Pretorius, 2000).

Actualmente, el uso de cultivos iniciadores no solo se restringe a poder elegir cepas con una buena capacidad fermentativa y obtener un mayor rendimiento y reproducibilidad sino que permite la selección de cepas específicas para determinados procesos de vinificación y que generen unas características organolépticas determinadas.

1.3. Mejora genética de levaduras vínicas

Como anteriormente se ha mencionado, el uso de cultivos iniciadores permite inocular el mosto con cepas que presenten características enológicas deseables para el proceso (Tabla I.1). De esta forma se han podido seleccionar cepas de ambientes naturales que presentan alguna de estas características, pero es difícil encontrar cepas que presenten varias de ellas simultáneamente. El uso de técnicas de modificación genética está permitiendo reunir varias propiedades de interés en una misma cepa (revisado en Pretorius, 2000; Dequin, 2001; Schuller y Casal, 2005; Verstrepen *et al.*, 2006). Tradicionalmente, las técnicas de genética clásica como la mutagénesis, la formación de híbridos, la fusión de esferoplastos (aunque es una técnica de genética clásica el organismo obtenido tras la fusión es considerado OMG y por tanto no está permitido su uso a nivel de bodega) o la citoducción, han formado parte importante de los programas de mejora de levaduras vínicas generando algunas cepas de interés enológico, pero estas técnicas presentan una limitación importante, carecen de especificidad en el cambio que se quiere introducir, de forma que la mejora de ciertos aspectos pueden ir acompañados del detrimento de otros. En cambio, la ingeniería genética permite introducir modificaciones específicas y dirigidas hacia el aspecto de interés, además permite introducir genes heterólogos ofreciendo un gran abanico de posibilidades. La principal desventaja del uso de estas levaduras modificadas genéticamente es la percepción negativa generalizada que tiene el consumidor hacia los productos considerados OMG (Organismo Modificado Genéticamente), aunque una información adecuada y detallada acerca de la seguridad e impacto ecológico del producto y una legislación eficiente puede facilitar que la actitud del consumidor cambie.

La ingeniería genética está permitiendo abordar las diferentes etapas de la producción del vino en las que están implicadas las levaduras, desde mejorar las etapas previas como es la producción de levadura seca activa hasta facilitar los procesos post-fermentativos (Tabla I.2) (revisado en Ramón, 2005).

Tabla I.1. Características enológicas importantes en la selección de las levaduras vínicas *S. cerevisiae*. (Adaptado de Degre, 1993; Schuller y Casal, 2005).

Característica	Comentario	Deseable
Vigor fermentativo	Máxima cantidad de etanol (% v/v) producida al final de la fermentación.	Elevada producción de etanol y tolerancia a estas elevadas concentraciones. Fermentación completa del azúcar.
Velocidad fermentativa	Gramos de CO ₂ producidos durante las primeras 48 horas.	Rápido inicio de la fermentación. Mínima fase de latencia tras la rehidratación.
Modo de crecer en medio líquido	Células dispersas o floculantes. Velocidad de sedimentación.	Células dispersas pero que sedimenten al final del proceso.
Producción de espuma		No poseer propiedades espumantes.
Acidez volátil	Debida principalmente a la producción de ácido acético.	No generar más de 100-400 mg/L.
Producción o degradación de ácido málico		Depende de las características del mosto.
Producción de glicerol	Contribuye al dulzor y cuerpo del vino.	Producción entre 5-8 g/L.
Producción de acetaldehído	Importante en la selección de cepas responsables del envejecimiento biológico.	Deseable en determinados vinos (de jerez, de Oporto, dulces)
Producción de ésteres, alcoholes superiores y otros compuestos volátiles.	Importante contribución al aroma del vino.	Producción de cantidades determinadas contribuye positivamente a las características sensoriales del vino.
Producción de H₂S	Afecta negativamente al aroma del vino.	No deseable.

Tabla I.1. (continuación).

Característica	Comentario	Deseable
Producción y tolerancia al SO₂	Agente antioxidante y antimicrobiano añadido durante la vinificación.	Elevada capacidad fermentativa en presencia de SO ₂ . Baja producción de SO ₂ .
Fenómeno <i>killer</i>		Producción de toxinas <i>killer</i> y resistencia frente a las toxinas de otras cepas.
Formación de carbamato de etilo	Compuesto tóxico y posiblemente cancerígeno.	Baja producción de urea (precursor).
Resistencia a estrés	Fermentación a bajas temperaturas (18-28 °C). Elevadas concentraciones de cobre pueden causar paradas de la fermentación. Estrés osmótico, ácido, oxidativo y térmico. Importantes durante la vinificación. Afectan a la viabilidad y vitalidad de las células durante la producción de la LSA.	Capacidad de fermentar a bajas temperaturas. Resistencia a diferentes estreses en una misma cepa. Termotolerancia y criotolerancia.

El estado fisiológico, la viabilidad y la vitalidad de los cultivos de levadura seca activa repercuten directamente en la capacidad para implantarse y llevar a cabo adecuadamente la fermentación alcohólica durante el proceso de vinificación. Mediante ingeniería genética se han obtenido levaduras vínicas que acumulan más glucógeno, sobreexpresando el gen *GSY2* que codifica la principal enzima responsable de la actividad glucógeno sintasa. Este metabolito es la principal reserva de carbohidratos de las levaduras y su mayor acumulación aumenta la viabilidad de las células en condiciones de ausencia de glucosa y palía la pérdida de capacidad fermentativa tras la deshidratación en la producción de levadura seca activa (LSA) (Pérez-Torrado *et al*, 2002; Pérez-Torrado, 2004). La modificación de los sistemas de respuesta a estrés, como la sobreexpresión del gen *TRX2* codificante de una tiorredoxina citoplasmática, también permiten la mejora de la capacidad fermentativa de la levadura seca activa indicando la importancia del estado fisiológico tras la obtención de cultivos iniciadores (Pérez-Torrado,

2004). La importancia de una adecuada respuesta a estrés en el comportamiento tecnológico de las levaduras vínicas ha sido puesta de manifiesto también mediante la sustitución de una copia del promotor del gen *MSN2* por el promotor del gen *SPII* (proteína estructural de la pared celular, inducida en fase estacionaria y en condiciones de estrés) (Cardona *et al.*, 2007). La cepa genéticamente modificada obtenida es más resistente a choque térmico, pH ácido, etanol y ausencia de nutrientes, con una reducida fase de latencia al inocularla en mosto y una elevada viabilidad hasta el final de la vinificación.

Se han generado cepas con mayor producción de glicerol y menor producción de etanol mediante la sobreexpresión de los genes *GPD1* o *GPD2* (Michnick *et al.*, 1997; Remize *et al.*, 1999; Eglinton *et al.*, 2002), además estas cepas también presentaron una mayor velocidad fermentativa y consumo de la glucosa. El excesivo nivel de ácido acético producido por estas cepas puede solventarse delecionando el gen *ALD6* (aldehído deshidrogenasa) como se ha demostrado en cepas de laboratorio (Eglinton *et al.*, 2002). Otras estrategias para controlar los niveles de acidez del vino se han basado en la producción de ácido láctico por las levaduras, introduciendo en ellas el gen *LDH* (lactato deshidrogenasa) de diferentes orígenes (*Lactobacillus casei*, Dequin y Barre, 1994; *Bifidobacterium longum* y bovino, Ishida *et al.*, 2005) o construyendo levaduras capaces de llevar a cabo la fermentación maloláctica mediante la coexpresión de las enzimas *mleS* (enzima maloláctico) de *Lactococcus lactis* y *maeI* (malato-permeasa) de *Schizosaccharomyces pombe* (Bony *et al.*, 1997).

La utilización de cepas vínicas recombinantes que expresan peptinasas, celulasas y hemicelulasas mejora la extracción del zumo y facilita la clarificación y extracción del color (Pérez-González *et al.*, 1993; González-Candelas *et al.*, 1995; Gil *et al.*, 2005; Louw *et al.*, 2006). Además estas estrategias pueden combinarse con la expresión de actividades arabinofuranosidasa (Sánchez-Torres *et al.*, 1996), ramnosidasa (Manzanares *et al.*, 2003) y glucosidasa (Sánchez-Torres *et al.*, 1998) incrementando la fracción volátil de terpenos que aportan el aroma afrutado al vino.

Se han abordado numerosas estrategias con el fin de mejorar las características organolépticas del vino. Entre ellas se encuentra la modificación directa del metabolismo de los ésteres volátiles, principales responsables del aroma del vino, mediante la sobreexpresión de los genes de las actividades alcohol acetiltransferasa (*ATF1*, *ATF2* y *EHT1*) (Lilly *et al.*, 2000 y 2006a) y, la combinación de la sobreexpresión del gen *ATF1* con la eliminación de la actividad esterasa *Iah1p* (Uber, 2005). También se ha buscado el mismo objetivo de forma indirecta, mediante la modulación de la relación acetil-CoA/CoA por manipulación genética de la actividad carnitina acetiltransferasa *Cat2p* (Cordente *et al.*, 2007). La variación del perfil de producción de alcoholes superiores se ha intentado mediante la modificación de enzimas implicados en su

síntesis a partir de la degradación de aminoácidos, como por ejemplo la sobreexpresión de los genes *BAT1* y *BAT2* (actividad transaminasa de aminoácidos ramificados) (Lilly *et al.*, 2006b). El aumento de la concentración de fenoles volátiles se ha conseguido mediante la construcción de levaduras vínicas transgénicas con los genes *PADC* de *Bacillus subtilis* y *PDC* de *Lactobacillus plantarum* que codifican descarboxilasas de ácidos fenólicos (Smit *et al.*, 2003).

El control microbiológico del mosto es otro aspecto interesante que se ha abordado mediante la ingeniería genética. Se han construido levaduras modificadas en la síntesis del factor killer (Boone *et al.*, 1990) y levaduras con capacidad bactericida gracias a la expresión del gen de la pediocina (*PedA*) de *Pediococcus acidilactici* (Schoeman *et al.*, 1999) o la producción de peróxido de hidrógeno al introducir el gen de la glucosa oxidasa (*Gox1*) de *Aspergillus niger* (Malherbe *et al.*, 2003).

Por otro lado, también la reducción de la turbidez producida por agregados proteicos procedentes de la uva puede conseguirse utilizando esta tecnología para la sobreexpresión de las manoproteínas Hpf1p y Hpf2p (Brown *et al.*, 2007).

Un aspecto particularmente interesante es la obtención de vinos más saludables incrementando el contenido en resveratrol o disminuyendo los niveles de carbamato de etilo en los vinos. El aumento del resveratrol en los vinos se ha conseguido con la construcción de levaduras transgénicas que expresan el gen de la β -glucosidasa (*bglN*) de *Candida molischiana* (González-Candela *et al.*, 2000) o que coexpresan el gen de la CoA ligasa del alamo y el gen de la resveratrol sintasa de la uva (Becker *et al.*, 2003). La reducción de la formación de carbamato de etilo se ha abordado mediante la obtención de cepas recombinantes incapaces de sintetizar urea debido a la delección del gen *CARI* (actividad arginasa) (Kitamoto *et al.*, 1991).

Tabla I.2. Ejemplos de modificaciones genéticas realizadas en *S. cerevisiae* y su aplicación en la producción de vino.

Objetivo	Gen	Producto	Referencia
Mejora del estado fisiológico del cultivo iniciador.	<i>GSY2</i>	Glucógeno sintasa II	Pérez-Torrado <i>et al.</i> , 2002
	<i>TRX2</i>	Tiorredoxina II	Pérez-Torrado, 2004
	<i>MSN2</i>	Factor transcripcional	Cardona <i>et al.</i> , 2007
Aumento de la producción de glicerol y reducción del contenido alcohólico.	<i>GPD1</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa I	Michnick <i>et al.</i> , 1997 Remize <i>et al.</i> , 1999
	<i>GPD2</i>	Glicerol-3-fosfato deshidrogenasa II	Eglinton <i>et al.</i> , 2002
Reducción de la acidez	<i>ALD6</i>	Aldehído deshidrogenasa	Eglinton <i>et al.</i> , 2002
	<i>LDH</i>	Lactato deshidrogenasa (<i>Lactobacillus casei</i>)	Dequin y Barre, 1994
		(<i>Bifidobacterium longum</i> y <i>Bos taurus</i>)	Ishida <i>et al.</i> , 2005
	<i>mleS</i>	Enzima málico (<i>Lactococcus lactis</i>)	Bony <i>et al.</i> , 1997
Mejora de la extracción del color y del clarificado, aumento de la fracción volátil		Malato permeasa	
	<i>mae1</i>	(<i>Schizosaccharomyces pombe</i>)	
	<i>egl1</i>	β (1-4)-endoglucanasa (<i>Trichoderma longibrachiatum</i>)	Pérez-González <i>et al.</i> , 1993
	<i>pelA</i>	Pectato liasa (<i>Fusarium solana</i> f. <i>sp. pisi</i>)	González-Candelas <i>et al.</i> , 1995
	<i>EXG1</i>	Exo-(1,3)- β -glucanasa	Gil <i>et al.</i> , 2005
	<i>XYN2</i>	Endo- β (1,4)-xilanasas (<i>Trichoderma reesei</i>)	Louw <i>et al.</i> , 2006
	<i>END1</i>	Endo- β (1,4)-glucanasa (<i>Butyrivibrio fibrisolvens</i>)	

Tabla I.2. (continuación).

Objetivo	Gen	Producto	Referencia
	<i>abfB</i>	α -L-arabinofuranosidasa (<i>Aspergillus niger</i>)	Sánchez-Torres <i>et al.</i> , 1996
	<i>bglN</i>	β -D-glucosidasa (<i>Candida molischiana</i>)	Sánchez-Torres <i>et al.</i> , 1998
	<i>rhaA</i>	α -L-ramnosidasa (<i>Aspergillus aculeatus</i>)	Manzanares <i>et al.</i> , 2003
Modificación del perfil de ésteres volátiles	<i>ATF1</i>	Alcohol acetiltransferasa I	Lilly <i>et al.</i> , 2000
	<i>ATF2</i>	Alcohol acetiltransferasa II	Lilly <i>et al.</i> , 2006a
	<i>EHT1</i>	Alcohol acetiltransferasa	
	<i>IAH1</i>	Esterasa II	Uber, 2005
	<i>CAT2</i>	Carnitina acetiltransferasa	Cordente <i>et al.</i> , 2007
Modificación del perfil de alcoholes superiores	<i>BAT1</i>	Aminoácido transaminasa mitocondrial	Lilly <i>et al.</i> , 2006b
	<i>BAT2</i>	Aminoácido transaminasa citosólica	
Aumento de la concentración de fenoles volátiles	<i>PADC</i>	Descarboxilasa de ácidos fenólicos (<i>Bacillus subtilis</i>)	Smit <i>et al.</i> , 2003
	<i>PDC</i>	Descarboxilasa de ácido p-cumárico (<i>Lactobacillus plantarum</i>)	
Control microbiológico	<i>KIL-K1</i>	Toxina killer K1	Boone <i>et al.</i> , 1990
	<i>PedA</i>	Pediocina (<i>Pediococcus acidilactici</i>)	Schoeman <i>et al.</i> , 1999
	<i>Gox1</i>	Glucosa oxidasa (<i>Aspergillus niger</i>)	Malherbe <i>et al.</i> , 2003
Reducción de la turbidez	<i>HPF1</i>	Manoproteína	Brown <i>et al.</i> , 2007
	<i>HPF2</i>	Manoproteína	

Tabla I.2. (continuación).

Objetivo	Gen	Producto	Referencia
Aumento resveratrol	<i>bglN</i>	β -D-glucosidasa (<i>Candida molischiana</i>)	González-Candelas <i>et al.</i> , 2000
	<i>4CL216</i>	CoA ligasa (<i>Populus hybrids</i>)	Becker <i>et al.</i> , 2003
	<i>vst1</i>	Resveratrol sintasa (<i>Vitis ssp</i>)	
Reducción de la formación de carbamato de etilo	<i>CARI</i>	Arginasa	Kitamoto <i>et al.</i> , 1991

2. LA PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE LEVADURA VÍNICA SECA ACTIVA (LSA)

La producción industrial de levaduras vínicas (revisado en Chen y Chiger, 1985; Degre, 1993; González *et al.*, 2005) no difiere en gran medida de la producción de levaduras panaderas, al menos en las dos primeras etapas, el mantenimiento de los cultivos puros y su propagación, lo que explica que fueran estas empresas las primeras en comercializarlas a principios de los años 60. En estos primeros años el producto final tenía las mismas características que la levadura prensada de panadería pero debido al uso estacional de las levaduras vínicas fue necesario desarrollar nuevas formas de conservación, como es el secado, dando lugar a un producto más estable.

2.1. Mantenimiento de los cultivos puros

Una adecuada conservación de los cultivos puros que van a ser propagados y utilizados como cultivos iniciadores es crucial para asegurar la pureza y la estabilidad de las características por las que fueron seleccionados. La congelación de las células en suspensión en un líquido crioprotector, como el glicerol, es el método más eficaz de conservación a largo plazo. Es conveniente que la temperatura de conservación sea lo más baja posible para evitar la recristalización del agua que afecta negativamente a la viabilidad celular. Su almacenamiento en nitrógeno líquido o a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ resulta suficiente para mantener la estabilidad de las células durante varios años (Degre, 1993; García *et al.*, 2005). Como método de conservación a corto plazo, se suele utilizar tubos con medios de agar en pendiente que pueden mantenerse entre 3 y 6 meses a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Cada tubo debe utilizarse una sola vez para inocular las fermentaciones escaladas. Además, es recomendable que el medio sólido utilizado sea el mismo que el usado en el primer paso de propagación, asegurando así un rápido inicio de la fermentación (Degre, 1993).

2.2. Obtención de la biomasa: fermentación

Para la propagación de las levaduras se utiliza medio melaza que además de ser rico en fuente de carbono, es barato, un factor relevante en los procesos industriales. La melaza es el subproducto de desecho mayoritario de las plantas de refinamiento de azúcar a partir de remolacha o de caña de azúcar. El uso de una u otra melaza depende prácticamente de su disponibilidad y precio en el mercado, siendo habitual el uso de melazas producidas en la misma región o regiones cercanas. En España, el azúcar es obtenido a partir de cultivos de remolacha siendo el subproducto resultante el utilizado por las empresas de producción de levadura. El principal azúcar presente en las melazas es la sacarosa (50-65 %), que es fácilmente asimilable por *Saccharomyces cerevisiae* gracias a que posee una elevada actividad invertasa

que le permite una rápida hidrólisis en glucosa y fructosa. En cambio, las melazas no resultan una buena fuente de nitrógeno, de fósforo ni de magnesio, siendo necesario adicionarlos normalmente en forma de sales de amonio, urea, ácido fosfórico y sulfato de magnesio. También es necesario suplementarlas con vitaminas, principalmente con biotina (Ough, 1992) ya que las levaduras son incapaces de sintetizarla, tiamina y ácido pantoténico. La carencia de este último está relacionada con la formación de compuestos no deseables como el ácido acético y el sulfuro de hidrógeno (Wang *et al.*, 2003; Aranda *et al.*, 2005). Hay que tener en cuenta que al tratarse de un subproducto de otra actividad industrial, estas melazas no suelen estar sometidas a controles y procesos de estandarización por lo que es posible hallar compuestos tóxicos capaces de inhibir el crecimiento de las levaduras como metales pesados, fertilizantes, insecticidas, herbicidas, nitritos y SO₂. En las empresas de producción de levaduras es habitual verificar la composición de cada lote y mezclar diferentes lotes para minimizar los posibles efectos negativos (Pérez-Torrado, 2004; González *et al.*, 2005). Otro factor importante es el pH de las melazas, que es necesario ajustar entre 4,5 y 5,0 para un crecimiento óptimo de las levaduras en este medio. Antes de suplementar y ajustar el pH de las melazas, estas son diluidas y sometidas a tratamientos de clarificación y esterilización, de esta forma pueden ser almacenadas, normalmente a 4 °C, hasta su utilización (Degre, 1993).

La propagación de las levaduras (Figura I.1) (Degre, 1993; Pérez-Torrado, 2004) se inicia a partir de un crecimiento del cultivo puro a escala de laboratorio. A partir de él se inocula el primer fermentador de una secuencia de fermentaciones¹ escalando a fermentadores de mayor volumen en cada paso. Las primeras fermentaciones¹ se realizan en condiciones de *batch* (cultivo discontinuo, todos los componentes se añaden desde el principio y no se renuevan) permitiendo que las células consuman el etanol producido antes de ser inoculadas en la siguiente fermentación¹. El resto de fermentaciones¹ hasta llegar a la fermentación¹ comercial se realizan en condiciones de *fed-batch* (la alimentación del cultivo se hace de forma controlada a lo largo del proceso), favoreciendo el metabolismo respiratorio que permite obtener un gran rendimiento en biomasa, ya que la oxidación de la glucosa durante la respiración genera un rendimiento energético por mol de azúcar consumido mayor que el obtenido mediante el metabolismo fermentativo. Al final del primer cultivo en *fed-batch*, las células pueden ser recogidas, lavadas y centrifugadas, la crema resultante es almacenada a 2-4 °C hasta su uso como inóculo de la siguiente fermentación¹.

¹Nota: tradicionalmente en microbiología industrial se utiliza el término *fermentación* para describir los procesos de cultivo de microorganismos con propósitos industriales. No hay que confundir con su acepción estrictamente bioquímica que se refiere a la obtención de energía en ausencia de oxígeno.

Una adecuada aireación durante la propagación de la biomasa en condiciones de *fed-batch* es fundamental para alcanzar un buen rendimiento y calidad del producto. La disponibilidad de oxígeno es imprescindible para el consumo del azúcar a través de la respiración y minimizar el proceso fermentativo. También es necesaria para la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides, principalmente ergosterol ya que la carencia de estos compuestos afecta a la estructura y función de la membrana plasmática, limitando la capacidad de las levaduras para fermentar el mosto principalmente debido a la reducción de la tolerancia al etanol (Degre, 1993; Aranda *et al.*, 2005; González *et al.*, 2005).

Otro aspecto crítico es la velocidad de alimentación. Para evitar el metabolismo fermentativo es necesario que la concentración de glucosa no supere 0,1-0,5 mg/L. Por encima de este umbral, aun en presencia de oxígeno, parte del azúcar se destina a la producción de etanol, fenómeno que se conoce como efecto *Crabtree*. Los elevados niveles de glucosa juegan un doble papel en este efecto. Por un lado, se genera una gran acumulación de piruvato intracelular a través de la glicólisis, debido a la saturación de las actividades piruvato deshidrogenasa, acetaldehído deshidrogenasa y acetil CoA sintasa, favoreciendo su degradación vía piruvato descarboxilasa (Postma *et al.*, 1989; Frick y Wittmann, 2005; González *et al.*, 2005). Por otro, ejercen una represión tanto a nivel de expresión génica como de inactivación enzimática sobre los componentes del ciclo de Krebs y la cadena respiratoria (Aranda *et al.*, 2005).

Al final de la obtención de biomasa, se lleva a cabo la etapa de maduración durante 1-2 horas. Se mantiene el cultivo sin alimentar asegurando que los sustratos son totalmente consumidos y las células terminan de dividirse entrando en fase estacionaria (Jorgensen *et al.*, 2002). Esta etapa es importante para que la biomasa obtenida tenga activos sus mecanismos de respuesta estrés y acumule metabolitos de reserva (glucógeno) y de protección (trehalosa), para poder sobrevivir al proceso de secado y mantener una adecuada capacidad fermentativa tras la rehidratación.

2.3. Deshidratación de la biomasa

La biomasa obtenida tras la fermentación comercial es lavada y concentrada mediante centrifugación hasta obtener una crema de levadura libre de melaza (Figura I.1). Como se mencionó anteriormente, esta crema puede almacenarse a 4 °C con ajuste de pH a 3,5 para evitar contaminaciones por otros microorganismos.

La crema es filtrada en filtros rotativos al vacío o filtros prensa hasta conseguir una pasta con un 30-35 % de materia seca. Seguidamente, esta pasta se divide en finos filamentos que facilitarán el posterior secado mediante extrusión a través de un plato perforado.

El secado es llevado a cabo con aire caliente hasta obtener una materia seca con menos de un 8 % de humedad residual, incluso en muchos casos por debajo del 6 %. Aunque existen varios tipos de deshidratadores, el más extendido es el de tipo lecho fluidizado. Este deshidratador hace circular aire caliente de forma continua a través de la masa permitiendo una rápida pérdida del agua y evitando que la temperatura de la levadura exceda una temperatura determinada, normalmente 35 °C o 41 °C, a lo largo del secado. La duración del proceso puede variar entre 15-60 min dependiendo del volumen de materia a secar y las condiciones empleadas.

Finalmente, la levadura seca activa es empaquetada al vacío, en presencia de un gas inerte o de CO₂, con el fin de reducir la oxidación del producto. Se estima que la pérdida de viabilidad es entre el 10 % y el 25 % por año a 20 °C, por lo que los productores recomiendan su almacenamiento a 4 °C y en un ambiente seco durante máximo tres años.

2.4. Rehidratación de la levadura seca activa

Esta etapa previa a la inoculación en el mosto permite a las células recuperar su actividad metabólica y la funcionalidad de sus membranas, facilitando un rápido inicio de la fermentación alcohólica. Una adecuada rehidratación de la LSA, minimizando los daños en la membrana plasmática y la pérdida de componentes intracelulares repercute notablemente en la viabilidad y vitalidad de las células (Poirier *et al.*, 1999).

Habitualmente, la rehidratación se realiza en agua tibia entre 35 °C y 40 °C, algunos protocolos recomiendan el uso de mezclas de agua y azúcar o de agua y mosto (1:1) aunque este último protocolo no es muy recomendable debido a la posible presencia de inhibidores en el mosto fresco que dificulten la rehidratación. El tiempo de rehidratación no debe ser demasiado prolongado para evitar el consumo de los metabolitos de reserva y las pérdidas de viabilidad por choque hipoosmótico, normalmente 20-30 min se considera suficiente tiempo para que la activación celular tenga lugar. Inicialmente, las levaduras se vierten sobre el medio de rehidratación, durante los primeros 5-10 min se mantiene en estático y posteriormente las células son resuspendidas e incubadas 10-20 min más en agitación. La introducción de una etapa estática inicial durante la rehidratación reduce las pérdidas de viabilidad observadas cuando se realiza la posterior agitación vigorosa (Degre, 1993; González *et al.*, 2005; Novo, 2006). Experimentos recientes muestran que la adición de una etapa de preadaptación en mosto tras la rehidratación y antes de su inoculación al tanque de vinificación puede reducir significativamente la fase de latencia y mejorar la fermentación vínica especialmente en fermentaciones a bajas temperaturas (Novo *et al.*, 2003).

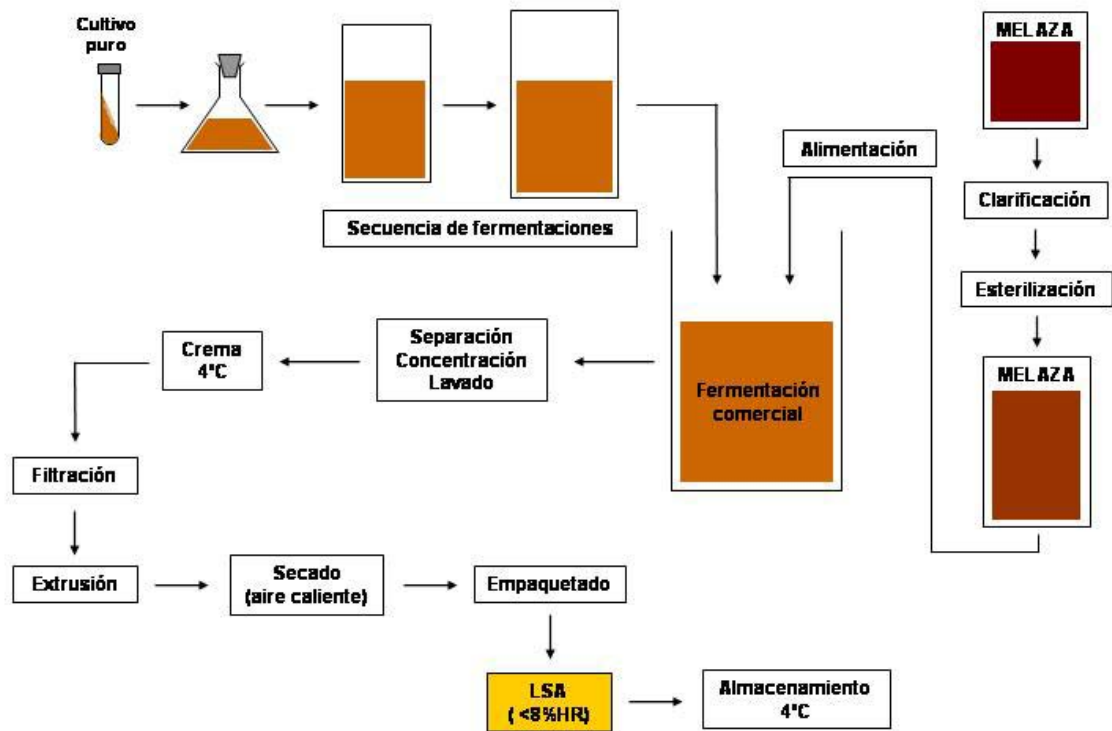


Figura I.1. Esquema del proceso industrial de obtención de levadura seca activa (HR, humedad relativa).

3. LA RESPUESTA A ESTRÉS DURANTE LA PRODUCCIÓN DE LEVADURA SECA ACTIVA

La producción de LSA, como se ha descrito en el apartado anterior, es un proceso complejo formado por varias etapas y que implica someter a las levaduras a ambientes totalmente diferentes en cada una de ellas. La capacidad de las levaduras para responder a estos cambios es crucial para obtener un buen rendimiento de producción en biomasa y un producto final con una viabilidad y vitalidad adecuada para, posteriormente, llevar a cabo la fermentación vínica exitosamente. Aunque las levaduras industriales de *Saccharomyces cerevisiae* poseen características que demuestran su gran adaptación al proceso industrial, el estudio de su respuesta a estrés puede aportar información útil para la mejora de este proceso, tanto a nivel de microorganismo como tecnológico, obteniendo un producto de mejor calidad.

3.1. Mecanismos moleculares de respuesta a estrés ambiental

3.1.1. Ruta de respuesta general a estrés

La capacidad de las levaduras al aplicarles un estrés medio para desarrollar tolerancia no solo a ese tipo de estrés si no a otros (protección cruzada) es debida a la existencia de una ruta común de integración de la señal, la ruta de respuesta general a estrés (Estruch, 2000). La respuesta a estrés se encuentra conservada entre diferentes especies de levadura tan dispares como *Saccharomyces cerevisiae* y la levadura de fisión *Schizosacchaomyces pombe* aunque la regulación y coordinación de ésta depende de factores transcripcionales diferentes. En cambio, en otras levaduras como *Candida albicans*, esta respuesta no parece estar tan conservada, posiblemente relacionado con la adaptación a nichos específicos, aunque existen algunas evidencias de características comunes (Gasch, 2007). En *Saccharomyces cerevisiae*, la inducción de la expresión de los genes de respuesta a estrés mediada por esta ruta depende de la presencia de elementos *cis*-reguladores STRE (*Stress Responsive Element*, secuencia consenso CCCCT) en sus promotores y su capacidad de interacción con los factores *trans*-activadores Msn2p y Msn4p. La capacidad de Msn2p/Msn4p para activar la transcripción está ligada a su localización celular. Varios estudios indican que la ruta de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) actúa directa e indirectamente sobre la localización subcelular de Msn2p/Msn4p (Görner *et al.*, 1998; Garreau *et al.*, 2000); mediante la fosforilación directa en el dominio señal de importación nuclear de Msn2p que inhibe su translocación al núcleo (Görner *et al.*, 2002) y a través de la exportina Msn5p que controla la salida de él (Estruch, 2000). Por otro lado, la interacción de Msn2p/Msn4p con la proteína citoplasmática Bmh2p estimulada por la ruta TOR

durante el crecimiento en presencia de fuentes de carbono y nitrógeno, también está implicada en su localización citoplasmática (Beck y Hall, 1999).

En condiciones de crecimiento exponencial en presencia de glucosa y en ausencia de estrés se induce la producción de cAMP por la activación de la enzima adenilato ciclasa Cyr1p mediado por las proteínas Ras1p y Ras2p junto con el complejo receptor acoplado a proteínas G, Gpr1p-Gpa2p (Thevelein y Winde, 1999). El cAMP se une a la subunidad reguladora Bcy1p de la PKA promoviendo la disociación de las subunidades catalíticas Tpk1p, Tpk2p y Tpk3p que actúan inhibiendo la respuesta general a estrés. En condiciones de estrés se reduce la actividad de la ruta cAMP-PKA, la acumulación de proteínas desnaturalizadas recluta proteínas Hsp (carabinas moleculares), entre ellas Hsp70p que es un regulador positivo de la ruta Ras vía Cdc25p (factor intercambiador de nucleótidos de guanina), posibilitando así la translocación de Msn2p/Msn4p al núcleo y la expresión de genes de respuesta general a estrés (Estruch, 2000). Bose y colaboradores (2005) propone un modelo donde la proteína quinasa Srb10p permitiría la regulación fina de la transcripción mediada por Msn2p. Esta quinasa actuaría conjuntamente con la ruta cAMP-PKA en células no estresadas, inhibiendo la transcripción de los genes STRE al fosforilar prematuramente la subunidad grande de la enzima RNA polimerasa II previniendo la formación del complejo de preiniciación y en menor medida fosforilando a Msn2p. Y, en células estresadas, cuando Msn2p se encuentra mayoritariamente en el núcleo unido a los elementos STRE, Srb10p hiperfosforilaría a Msn2p mediando su degradación nuclear vía proteasoma 26S (Lallet *et al.* 2004 y 2006).

Esta ruta controla la expresión de numerosos genes implicados en diferentes tipos de estrés, como muestra la elevada sensibilidad del mutante *msn2msn4* frente al agotamiento de la fuente de carbono, estrés térmico, osmótico y oxidativo (Martínez-Pastor *et al.*, 1996). Sin embargo, la presencia de este fenotipo solo en condiciones de estrés severo indica la existencia de otros mecanismos involucrados en la respuesta a estrés (Boy-Marcotte *et al.*, 1999).

3.1.2. Respuesta a estrés térmico

La exposición a elevadas temperaturas induce la síntesis de un grupo específico de proteínas, las proteínas de choque térmico (Hsps). Las dos familias de Hsps más conservadas y mejor caracterizadas son Hsp70 que incluye las familias Ssa y Ssb, y Hsp100. Estas proteínas actúan como carabinas moleculares manteniendo solubles otras proteínas parcialmente desnaturalizadas y facilitando su plegamiento correcto (Morano *et al.*, 1998). Incluso, como en el caso de Hsp104p (familia Hsp100), son capaces de rescatar proteínas inactivadas de los agregados insolubles de forma que estén accesibles a la acción de otras carabinas moleculares (Glover y Lindquist, 1998; Glover y Tkach, 2001). También pueden promover la proteólisis de proteínas

inadecuadamente plegadas o desnaturalizadas y participar directamente en la regulación de la respuesta a estrés térmico como es el caso de la familia Hsp70 (Craig y Gross, 1991; Estruch, 2000).

La transcripción de genes que codifican proteínas Hsp depende de la presencia en sus promotores de elementos *cis* HSE (*Heat Shock Element*, secuencia repetitiva nGAAn) que son sitio de unión del factor activador de la transcripción Hsf1p (*Heat Shock Factor*), de elementos STRE dependientes de la ruta de respuesta general a estrés o de ambos elementos *cis* (Boy-Marcotte *et al.*, 1999; Amorós y Estruch, 2001). Aunque ambas rutas actúan durante el choque térmico, la regulación vía Msn2p/Msn4p implica principalmente genes relacionados con cambios metabólicos generales y diversos tipos de estrés como genes del metabolismo del carbono (*TPS1*, *PGM2*, *HXK1*, *UGP1*, *GALI* y *GLK1* entre otros) y de respuesta a estrés oxidativo (*CTT1*, *SOD1* y *CPPI*). En cambio, la activación de la transcripción por Hsf1p implica básicamente genes que codifican carabinas moleculares y proteínas asociadas (Boy-Marcotte *et al.*, 1999). Más recientemente, se ha identificado al complejo formado por la ubiquitina ligasa Rsp5p y Bul1p/Bul2p como un nuevo componente implicado en la expresión de genes con elementos HSE y/o STRE, además su actuación parece ser independiente del factor Hsf1p (Kaida *et al.*, 2003)

Cómo se regula la actividad de Hsf1p en respuesta a estrés térmico es aun incierto. No depende de su localización subcelular, como ocurre en el caso de Msn2p/Msn4p. En ausencia de estrés, Hsf1p se localiza en el núcleo formando trímeros unidos a promotores, con una actividad transcripcional basal que mantiene una cierta expresión de proteínas Hsp necesarias para el crecimiento normal (Estruch, 2000; Piper, 1997). En condiciones de choque térmico se produce un fuerte incremento de su actividad transcripcional aumentando drásticamente los niveles de mRNA codificantes de Hsps. Estos cambios en la actividad de Hsf1p involucran diferentes modificaciones postraduccionales como la hiperfosforilación (Piper, 1997) y los cambios conformacionales (Chen y Parker, 2002). Otros mecanismos que parecen estar implicados son: I) la alteración de la estructura de la cromatina durante el estrés térmico facilitando la formación de uniones fuertes entre Hsf1p y los promotores con sitios de baja afinidad (Estruch, 2000); II) la acumulación de trehalosa que actúa como un regulador positivo de la actividad de Hsf1p (Conlin y Nelson, 2007); III) la presencia de proteínas semidesnaturalizadas (Trotter *et al.*, 2002); IV) la interacción directa de Hsp70p con Hsf1p (Craig y Gross, 1991; Halladay y Craig, 1995; Bonner *et al.*, 2000). En este último caso, la interacción con Hsp70p mantiene a Hsf1p en una forma de baja actividad y se ha propuesto que en condiciones de estrés térmico el aumento de proteínas desnaturalizadas reclutaría a las proteínas Hsp70p de forma que no estarían disponibles para interactuar con Hsf1p y daría lugar a la forma de elevada actividad.

3.1.3. Respuesta a estrés hiperosmótico

Cuando las levaduras son sometidas a choque hiperosmótico se produce una rápida pérdida de presión de turgor y de volumen celular debido a la salida masiva de agua a través de la membrana, junto con el colapso del citoesqueleto y la parada del crecimiento (Escoté *et al.*, 2004). La adaptación de las células conlleva el influjo de agua de la vacuola al citoplasma y la síntesis de osmolitos compatibles como el glicerol (Walker y Van Dijck, 2006; Mager y Siderius, 2002). Una vez recuperado la presión de turgor, siempre y cuando la intensidad del estrés haya sido fisiológicamente aceptable, la célula es capaz de recuperar su capacidad proliferativa.

El sistema de señalización específico de respuesta a estrés osmótico ha sido ampliamente estudiado (revisado en Hohmann, 2002; Hohmann *et al.*, 2007; de Nadal *et al.*, 2002) y se conoce como la vía HOG (*High Osmolarity Glycerol*). Esta vía consiste en una cascada de activación de MAP quinasas hasta la fosforilación y activación de la proteína quinasa Hog1p, permitiendo su translocación al núcleo y la inducción de una gran variedad de genes a través de varios factores transcripcionales: Sgd1p (Akhtar *et al.*, 2000; Lin *et al.*, 2001), Hot1p (Alepuz *et al.*, 2001), Sko1p (Prof. *et al.*, 2001), Smp1p (de Nadal *et al.*, 2003), Msn1p (Rep *et al.*, 1999) y Msn2p/Msn4p (Rep *et al.*, 2000). Además la proteína Hog1p es reclutada por los promotores de sus propias dianas actuando ella misma como factor transcripcional (Alepuz *et al.*, 2003).

Aunque no se sabe exactamente cómo la célula percibe el estrés osmótico, parece que la señal es el cambio físico en la membrana, la pérdida de la presión de turgor y no el déficit de moléculas de agua *per se* (Tamás *et al.*, 2000). Se han caracterizado dos osmosensores en la membrana plasmática que participan en la transducción de la señal, Sln1p-Ypd1p y Sho1p. Sln1p, junto con el sistema Ypd1p-Ssk1p, actúa como regulador negativo durante el crecimiento normal. En condiciones de estrés osmótico, Sln1p-Ypd1p deja de estar activo, de forma que la MAPKKK compuesta por dos proteínas redundantes Ssk2p/Ssk22p puede fosforilar a la MAPKK Pbs2p que a su vez fosforila a la MAPK Hog1p activándola. Sho1p activa la vía HOG a través de la MAPKKK Ste11p que fosforila a Pbs2p. Una vez se alcanza la adaptación celular (por ejemplo la recuperación del volumen y la presión de turgor mediada por la acumulación de glicerol) y/o se recuperan las condiciones fisiológicas, Hog1p es desactivada por la acción de Ser/Thr fosfatasas (Ptc1p, Ptc2p y Ptc3p) y Tyr fosfatasas (Ptp2p y Ptp3p). Esta desactivación es esencial, ya que la activación constitutiva de Hog1p es letal (revisado en Mager y Siderius, 2002 y Westfall *et al.*, 2004).

Entre los genes inducidos por la ruta HOG se encuentran los genes *GPD1* y *GPP2*, implicados en la síntesis de glicerol. El glicerol forma parte del grupo de moléculas consideradas osmolitos

compatibles. Se acumula en grandes cantidades en la célula para contrarrestar los efectos de la deshidratación sin afectar al funcionamiento de ésta. Se forma a partir de la reducción de DHAP (dihidroxiacetona fosfato) a glicerol-3-fosfato por la enzima glicerol-3-fosfato deshidrogenasa NAD-dependiente (genes *GPD1* y *GPD2*) seguida de la desfosforilación por la enzima glicerol-3-fosfato fosfatasa NAD-dependiente (genes *GPP1* y *GPP2*). El análisis del patrón de expresión de estos genes muestra que *GPD1* y *GPP2* se inducen por estrés osmótico mientras que *GPD2* y *GPP1* son inducidos en condiciones de crecimiento anaerobio (Palman *et al.*, 2001; Ansell *et al.*, 1997).

La acumulación de glicerol en el interior celular durante el estrés hiperosmótico es el resultado de un conjunto de acciones: el aumento de su biosíntesis, la reducción de su catabolismo y el aumento de su internalización y retención. La internalización es llevada a cabo de forma activa por el transportador de tipo simporte glicerol/H⁺, Stl1p (Neves *et al.*, 2004; Ferreira *et al.*, 2005; Ferreira y Lucas, 2007). La retención del glicerol acumulado es mediada por la proteína canal Fps1p que está regulada por los cambios osmóticos, de manera que en condiciones hiperosmóticas se cierra el canal impidiendo la salida del glicerol (Luyten *et al.*, 1995).

3.1.4. Respuesta a estrés oxidativo

El estrés oxidativo es causado por las especies reactivas de oxígeno (ROS) como el peróxido de hidrógeno (H₂O₂), el radical hidroxilo (HO·) y el anión superóxido (O₂⁻). Estas formas reactivas de oxígeno causan importantes daños en la célula: la carbonilación de proteínas dando lugar a su inactivación o a su marcaje para degradación, la peroxidación de lípidos insaturados que puede desencadenar la unión cruzada entre ácidos grasos de diferentes membranas y la oxidación de las bases del DNA. Las ROS son generadas de forma natural por el propio metabolismo celular, durante la respiración y la β-oxidación de los ácidos grasos. Su generación se puede incrementar exponiendo a las células a radiaciones ionizantes, a químicos de reciclaje redox o a metales pesados. En condiciones normales, las células mantienen el equilibrio redox intracelular gracias a diversos sistemas de defensa antioxidante, el estrés oxidativo se produce cuando la concentración de las ROS supera la capacidad de estos sistemas.

Las levaduras poseen sistemas de defensa antioxidante de tipo enzimático y no enzimático (Tablas I.3 e I.4, respectivamente). La defensa enzimática está formada por varias enzimas capaces de eliminar radicales de oxígeno y sus productos y reparar el daño celular. La defensa no enzimática consiste en pequeñas moléculas, solubles en agua o en ambientes lipídicos, que reaccionan con las ROS evitando su acción oxidante sobre otros constituyentes celulares (Jamienson, 1998).

Tabla I.3. Los sistemas enzimáticos más relevantes de defensa antioxidante de *S. cerevisiae*. (Adaptado de Jamienson, 1998; Estruch, 2000; Grant, 2001; Folch-Mallol *et al.*, 2004 y Walker y Van Dijck, 2006)

Sistemas enzimáticos	Proteínas	Función
Catalasa	Cta1p (peroxisoma) Ctt1p (citósol)	Descomposición del H ₂ O ₂ en O ₂ y H ₂ O.
Superóxido dismutasa	Sod1p (Cu/Zn-SOD citoplasmática) Sod2p (Mn-SOD mitocondrial)	Dismutación del anión superóxido en O ₂ y H ₂ O.
Enzimas de la ruta de las pentosas fosfato	Zwf1p (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa) Tk11p (transcetolasa) Rpe1p (Ribulosa-5-fosfato epimerasa)	Producción de poder reductor (NADPH).
Glutación reductasa	Glr1p (citósol, mitocondria)	Reducción del glutatión oxidado (GSSG).
Glutación peroxidasa	Gpx1p, Gpx2p, Gpx3p	Reducción de H ₂ O ₂ y peróxidos orgánicos usando GSH (glutatión reducido) como reductor.
Tiorredoxina peroxidasa	Tsa1p, Tsa2p, Ahp1p (citósol) Prx1p (mitocondria) Dot5p (núcleo)	Reducción de H ₂ O ₂ y alquil-hidroperóxidos usando tiorredoxina como donadora de protones.
Tiorredoxina reductasa	Trr1p (citósol) Trr2p (mitocondria)	Reducción de tiorredoxinas oxidadas.

Tabla I.4. Los sistemas no enzimáticos más relevantes de defensa antioxidante de *S. cerevisiae*.
(Adaptado de Jamienson, 1998; Estruch, 2000; Grant, 2001; Folch-Mallol *et al.*, 2004 y Walker y Van Dijck, 2006)

Sistemas no enzimáticos	Descripción	Función
Glutati3n	Trip3ptido γ -L-glutamil-L-cisteinilglicina	Reacci3n directa con las ROS. Forma reducida reacciona con oxidantes generando GSSG. Formaci3n de conjugados con compuestos t3xicos electr3filos. Formaci3n de puentes disulfuro con prote3nas.
Glutarredoxina	Prote3na peque1a termoestable con residuos de ciste3na en su sitio activo. Grx1p (citosol) Grx2p (citosol, mitocondria) Grx3p, Grx4p (n3cleo) Grx5p (mitocondria) Grx6p, Grx7p (ret3culo endoplasm3tico) (Herrero, 2007, comunicaci3n personal)	Reducci3n puentes disulfuro entre prote3nas y complejos prote3na-glutati3n. Actividad glutati3n peroxidasa. Actividad glutati3n S-transferasa (formaci3n de conjugados glutati3n-sustratos electr3filos para su detoxificaci3n).
Tiorredoxina	Prote3na peque1a termoestable con residuos de ciste3na en su sitio activo. Trx1p, Trx2p (citosol) Trx3p (mitocondria)	Reducci3n puentes disulfuro entre prote3nas.
Poliaminas	Cationes polivalentes con dos o m3s grupos amino. Espermina y espermidina.	Reaccionan con diversas ROS, principalmente con O_2^- .
Metalotione3nas	Prote3na peque1a ricas en ciste3na capaces de unir iones met3licos. Cup1p, Crs5p	Almacenamiento de metales en una forma no t3xica. Evitan producci3n de ROS por la reacci3n de Fenton.

Dos de los sistemas de defensa antioxidante más importantes en *S. cerevisiae*, y que comprenden diferentes componentes de la respuesta a estrés oxidativo, son el sistema glutatión/glutarredoxinas y el sistema tiorredoxina (Figura I.2) (revisado en Grant, 2001 y Wheeler y Grant, 2004).

A) Sistema glutatión/glutarredoxinas:

El glutatión (revisado en Penninckx, 2002 y Pocsy *et al.*, 2004) es la molécula tiol no proteica de bajo peso molecular más abundante en la levadura y su importancia biológica está ligada, en gran medida, al elevado potencial reductor de su grupo sulfhidrilo libre. Entre sus principales funciones se encuentran: (I) mantener el equilibrio redox celular mediante la relación GSH/GSSG; (II) servir de fuente de azufre y nitrógeno en situaciones de carencia; (III) formar conjugados espontáneamente o vía glutatión-S-transferasa con compuestos electrófilos como los xenobióticos para facilitar su eliminación; (IV) acomplejarse con metales pesados como el Cd^{2+} para su detoxificación a través de la vacuola (Li *et al.*, 1997); (V) proteger frente a estrés oxidativo gracias a su capacidad de reaccionar directamente con radicales libres y/o actuar como cofactor de enzimas antioxidantes, como glutatión-S-transferasas, glutatión peroxidasas y glutarredoxinas. Se ha observado que cepas mutantes *gsh1* incapaces de sintetizar glutatión son más sensibles a H_2O_2 y anión superóxido pero son capaces de generar una respuesta adaptativa implicando la participación de otros sistemas en la respuesta a estrés oxidativo (Stephen y Jamienson, 1996). Además estos mutantes necesitan GSH exógeno para crecer en medio mínimo de acuerdo con su actuación como reductor durante el crecimiento normal (Grant *et al.*, 1996; Spector *et al.*, 2001). La incapacidad de estas cepas para crecer en fuentes de carbono no fermentables reflejó la esencialidad del glutatión para el funcionamiento mitocondrial como posteriormente fue demostrado por Lee y colaboradores (2001). El intermediario γ -Glu-Cys es capaz de suplir el papel del glutatión en la integridad mitocondrial y, en parte, en la tolerancia a estrés (Grant *et al.*, 1997). El incremento de los niveles del dipéptido al complementar la mutación *gsh2* con un plásmido multicopia del gen *GSH1* elimina el fenotipo de crecimiento deficiente de esta cepa pero no aumenta la resistencia a Cd^{2+} o a H_2O_2 (Wheeler *et al.*, 2002).

Las glutarredoxinas (GRX) (revisado en Herrero *et al.*, 2006; Herrero y de la Torre-Ruiz, 2007) poseen en su sitio activo residuos de cisteína responsables de la reducción de puentes disulfuro entre proteínas y complejos proteína-glutatión utilizando GSH como donador de átomos de hidrógeno. En *S. cerevisiae* se han descrito dos subfamilias en función del número de cisteínas en su sitio activo, GRX ditiol (Grx1p, Grx2p) y GRX monotiol (Grx3p, Grx4p, Grx5p). Grx1p y Grx2p presentan un 64 % de similitud de secuencia entre si pero realizan diferentes funciones durante el crecimiento normal y en condiciones de estrés oxidativo. Grx2p es responsable de la

mayoría de la actividad oxidorreductasa durante el crecimiento exponencial y está implicada en la respuesta a estrés por H₂O₂, mientras que Grx1p está implicada en la defensa frente a anión superóxido (Luikenhuis *et al.*, 1998). Más recientemente, se ha demostrado que tanto Grx1p como Grx2p son activas como glutatión peroxidasa (Collinson *et al.*, 2002) y glutatión S-transferasas (Collinson y Grant, 2003). Posteriormente, Rodríguez-Manzaneque y colaboradores (1999) identificaron la familia GRX monotiol que también posee actividad oxidorreductasa durante el crecimiento exponencial. El mutante *grx5* es particularmente sensible a estrés oxidativo, en presencia de H₂O₂ y menadiona, mostrando una elevada pérdida de viabilidad acompañada de una elevada carbonilación de proteínas. Este fenotipo es debido a la implicación de Grx5p en el metabolismo del hierro, la excesiva acumulación de hierro intracelular en el mutante *grx5* aumenta la sensibilidad a los oxidantes (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002). Además la delección doble *grx2grx5* es inviable, indicando el solapamiento funcional de estas dos glutarredoxinas, apoyado por la localización mitocondrial de ambas (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002; Pedrajas *et al.*, 2002). Recientemente, se han identificado dos posibles nuevas glutarredoxinas, Grx6p y Grx7p, asociadas al retículo endoplásmico que podrían estar implicadas en el mantenimiento redox de las proteínas de nueva síntesis (Herrero, 2007, comunicación personal).

B) Sistema tiorredoxina:

Las tiorredoxinas son pequeñas oxidorreductasas similares a las glutarredoxinas, en particular en su centro activo donde presentan dos residuos de cisteína. La principal diferencia es que son reducidas directamente por el NADPH mediante la acción de la enzima tiorredoxina reductasa (Trr1p, Trr2p) mientras que las glutarredoxinas son reducidas indirectamente por el NADPH a través del GSH.

El sistema tiorredoxina citoplasmático está compuesto por Trx1p y Trx2p y la tiorredoxina reductasa, Trr1p (Gan, 1991). La delección de ambas tiorredoxinas es viable pero está asociado a una serie de fenotipos que incluye la alteración en el ciclo celular, la auxotrofia para la metionina (Muller, 1991) y una mayor sensibilidad a estrés oxidativo (Garrido y Grant, 2002, Trotter y Grant, 2005). Trx1p y Trx2p parecen tener actividades antioxidantes redundantes, ya que los mutantes sencillos *trx1* o *trx2* presentan una resistencia a H₂O₂ similar a la cepa control durante el crecimiento exponencial, la sobreexpresión del gen *TRX1* o *TRX2* aumenta por igual la resistencia a hidroperóxidos y ambas son capaces de actuar como cofactor de la tiorredoxina peroxidasa Tsa1p (Garrido y Grant, 2002).

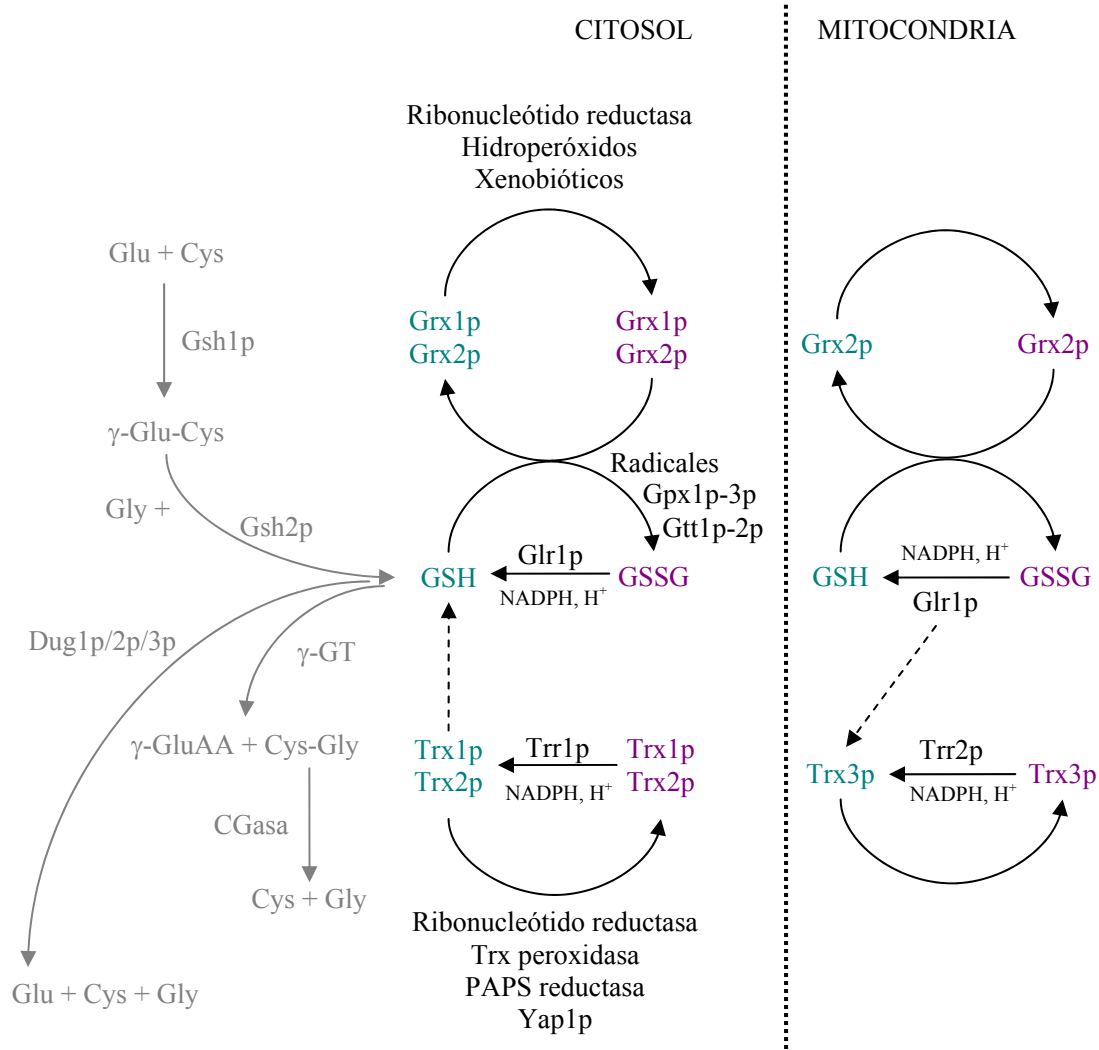


Figura I.2. Esquema de los sistemas glutatión/glutarredoxinas y tiorredoxina citosólicos y mitocondriales (Adaptado de Penninckx, 2002; Trotter y Grant, 2003 y 2005; Wheeler y Grant, 2004; Toledano *et al.*, 2007). La levadura contiene dos pares de genes que codifican las glutarredoxinas (*GRX1* y *GRX2*) y las tiorredoxinas (*TRX1* y *TRX2*) citoplasmáticas. La forma oxidada (■) de las tiorredoxinas es reducida (■) directamente por la tiorredoxina reductasa Trr1p. En cambio, las glutarredoxinas oxidadas (■) son reducidas (■) por el GSH (forma reducida del glutatión, ■) que se oxida (GSSG, ■). La reducción del GSSG es catalizada por la enzima glutatión oxidorreductasa (Glr1p). Estos sistemas también están presentes en la mitocondria. Existe un sistema tiorredoxina mitocondrial completo, formado por la tiorredoxina Trx3p y la tiorredoxina reductasa Trr2p. El sistema glutatión/glutarredoxina mitocondrial se debe a la colocalización de Grx2p y Glr1p en este orgánulo y en el citoplasma. Glr1p junto con Trr2p son responsables del mantenimiento del estado reducido de la tiorredoxina mitocondrial Trx3p. El sistema tiorredoxina citosólico influye en el sistema glutatión/glutarredoxina de forma indirecta a través de su papel regulador de Yap1p y de la respuesta a estrés oxidativo en la que se incluye la inducción de la síntesis del glutatión. La síntesis de glutatión es llevada a cabo en el citoplasma en dos reacciones secuenciales mediadas por las enzimas γ -glutamilcisteína sintetasa (*GSH1*) y glutatión sintetasa (*GSH2*). Su degradación depende de las actividades γ -glutamiltranspeptidasa (γ -GT) (Jaspers *et al.*, 1985) y L-cisteinilglicina dipeptidasa (CGasa) y de una vía alternativa dependiente del complejo multienzimático Dug1p/2p/3p (Ganguli *et al.*, 2007).

La presencia de un sistema completo en la mitocondria formado por la tiorredoxina Trx3p y la tiorredoxina reductasa Trr2p fue identificado por Pedrajas y colaboradores (1999). El estado de oxidación de Trx3p parece depender solo de Trr2p cuando las células son expuestas a un estrés oxidativo, mientras que en condiciones de crecimiento normal se mantiene en su forma reducida independientemente de la presencia del gen *TRR2* (Trotter y Grant, 2005).

La funcionalidad de ambos sistemas, citoplasmático y mitocondrial, no es esencial para la supervivencia celular, además la pérdida de uno de los sistemas no influye en el estado redox del otro sistema tiorredoxina. Aunque ambos sistemas son independientes pueden desarrollar funciones solapantes, por ejemplo durante el crecimiento en fuentes de carbono no fermentables y en la resistencia a hidroperóxidos, donde Trr2p es requerida en ausencia de Trr1p (Trotter y Grant, 2005).

Existen numerosas evidencias del solapamiento funcional y de la interacción entre el sistema glutatión/glutarredoxinas y el sistema tiorredoxina. La primera evidencia fue identificar al gen de la glutatión reductasa, *GLR1*, en una búsqueda genética de mutaciones que confieren el requerimiento de las tiorredoxinas (Muller, 1996). Otras evidencias fueron que la pérdida de las tiorredoxinas citoplasmáticas fue acompañada del incremento en los niveles de glutatión tanto reducido como oxidado (Garrido y Grant, 2002) y la necesidad de al menos un sistema disulfuro reductasa funcional ya que el cuádruple mutante *trx1trx2grx1grx2* es inviable, (Draculic *et al.*, 2000). Mientras que las tiorredoxinas citoplasmáticas regulan su estado redox de forma independiente del sistema glutatión/glutarredoxinas (Trotter y Grant, 2003), el estado de oxidación de la tiorredoxina mitocondrial depende de Trr2p y Glr1p durante el crecimiento normal, tanto en condiciones aerobias como en anaerobiosis, y en presencia de estrés oxidativo (Trotter y Grant, 2005). El sistema tiorredoxina influye en el sistema glutatión/glutarredoxina a través de Trr1p, el mutante *trr1* presenta las glutarredoxinas mayoritariamente en su estado reducido mientras que en cepas sin modificar hay prácticamente la misma cantidad de formas reducidas que oxidadas (Trotter y Grant, 2003).

En la regulación de la respuesta a estrés oxidativo intervienen diferentes factores transcripcionales: Msn2p/Msn4p, Yap1p y Skn7p. Yap1p forma parte de la familia de factores transcripcionales YAP que reconocen elementos *cis* YRE (*Yap Response Element*, TTAC/GTAA) en los promotores de los genes que regulan. Al igual que Msn2p/Msn4p su actividad transcripcional depende de su localización subcelular (Kuge *et al.*, 1997). En condiciones de crecimiento normal, el dominio C-terminal que posee una señal de exportación fuera del núcleo (NES) interacciona con la exportina Crm1p y es transportado fuera del núcleo. En presencia de estrés oxidativo inducido por H₂O₂, el residuo Cys-598 próximo al dominio NES forma un puente disulfuro con un residuo de cisteína oxidado de la glutatión peroxidasa

Gpx3p, este puente disulfuro pasa rápidamente a ser intramolecular entre la Cys-598 y la Cys-303. Esta conformación de Yap1p posiblemente impide la interacción del dominio NES con Crm1p, resultando en la acumulación de Yap1p en el núcleo y la activación de sus genes diana. En cambio, electrófilos como la quinona o generadores de aniones superóxido como la menadiona son capaces de modificar directamente a Yap1p siendo suficiente para su localización en el núcleo (revisado en Rodrigues-Pousadas *et al.*, 2004; Ikner y Shiozaki, 2005). Skn7p posee un dominio aceptor de fosfato y forma parte de la señalización a través del sensor Sln1p-Ypd1p involucrado en la respuesta a estrés hiperosmótico, en cambio la inducción de la expresión génica mediada por Skn7p durante el estrés oxidativo parece independiente de este sensor.

En presencia de estrés oxidativo, Yap1p induce la expresión de genes implicados en la síntesis y reducción del glutatión como *GSH1*, *GSH2* y *GLR1* así como también de genes implicados en la defensa antioxidante dependiente de GSH (*GPX2* y *GTT1*). La inducción de los genes *TRX2*, *TRR1* y *TSAI*, constituyentes del sistema tiorredoxina, es llevada a cabo por Yap1p y Skn7p aunque su unión a los promotores es independiente una de otra (Grant, 2001). En cambio, la transcripción de los genes *GRX1* y *GRX2* es dependiente de la presencia de elementos STRE en sus promotores (Grant *et al.*, 2000).

3.2. Respuesta a estrés durante la obtención de la biomasa de levadura

En las primeras etapas de la obtención de la biomasa, las células son cultivadas en *batch*. En esta modalidad de cultivo, las levaduras son inoculadas en un medio melaza con un elevado contenido en azúcares y con todos los nutrientes esenciales en la concentración necesaria para alcanzar el rendimiento deseado. No hay una adición de nutrientes a lo largo del proceso de forma que el final de la fermentación está determinado por el agotamiento de éstos. Esta forma de crecimiento impone a la levadura la experimentación de importantes cambios en su metabolismo.

En primer lugar, la elevada concentración de glucosa en el medio causa en las levaduras la represión del metabolismo respiratorio (efecto *Crabtree*, vease apartado 2.2), de forma que la glucosa es consumida principalmente por la vía fermentativa generando etanol y CO₂. Además se ha observado que el inóculo de las células en este medio con elevada concentración de azúcares supone un importante choque osmótico, desencadenando la respuesta molecular típica a este estrés como es la inducción del gen *GPD1* (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) implicado en la síntesis del osmolito compatible glicerol (Pérez-Torrado *et al.*, 2005).

Mediante el análisis de genes marcadores de estrés, se ha detectado una respuesta importante a estrés oxidativo (Pérez-Torrado, 2004; Pérez-Torrado *et al.*, 2005) debido a la aireación de los cultivos desde el principio del proceso. Esta aireación es necesaria para la respiración del etanol producido tras el agotamiento de la glucosa. El estudio de genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo como los genes *TRX2* (tioredoxina) y *GRE1* (función desconocida) en condiciones de fermentación con aireación y sin aireación durante el consumo de la sacarosa, mostró que, durante el metabolismo fermentativo de las levaduras, la elevada aireación podía dirigir una pequeña parte del consumo de la glucosa hacia la vía oxidativa. Este metabolismo generaría especies reactivas de oxígeno (ROS) que desencadenaría la inducción de los mecanismos de respuesta a estrés oxidativo. Experimentos en condiciones de laboratorio han mostrado una mayor carbonilación de proteínas en levaduras creciendo en medio con fuente de carbono fermentable que en condiciones oxidativas (Cabiscol *et al.*, 2000), indicando que el efecto de las ROS es mayor durante el metabolismo fermentativo que durante la respiración. Estos datos sugieren que la aireación desde el inicio de la fermentación podría tener un efecto negativo sobre la viabilidad y vitalidad de la levadura, y que la modificación del proceso reduciendo la aireación al período de respiración del etanol (donde es imprescindible la presencia de oxígeno) podría paliarlos. Sin embargo, la prolongada parada del crecimiento durante el cambio diáuxico (cambio del metabolismo fermentativo al respiratorio tras el agotamiento de los azúcares) observada en los experimentos sin aireación indica que es necesario un estudio más amplio de la repercusión de este efecto (Pérez-Torrado, 2004), que actualmente está en curso en nuestro laboratorio.

Durante el cultivo en *fed-batch* se pretende obtener el máximo rendimiento del proceso (cantidad de biomasa obtenida por cantidad de melaza consumida), manteniendo al mínimo el metabolismo fermentativo y favoreciendo el metabolismo oxidativo de la glucosa. Para ello, el cultivo es fuertemente aireado y la adición de medio se realiza de forma que asegure niveles bajos de azúcar sin superar el umbral de concentración de glucosa que produce la represión de la respiración. El metabolismo respiratorio que caracteriza esta etapa desencadena un estrés oxidativo que es puesto de manifiesto por la inducción de la expresión de los genes *TRX2* y *GPD1* (la concentración de azúcares durante el *fed-batch* no es suficiente para generar una respuesta a estrés osmótico). La expresión de estos genes es gradual al contrario que durante la fase de *batch*, probablemente debido a que las células proceden de un cultivo en fase estacionaria, en la cual se han activado los sistemas de defensas dependientes de la ruta general de respuesta a estrés (Pérez-Torrado *et al.*, 2005). Este estrés oxidativo también se ha observado en otros estudios comparativos entre crecimientos *fed-batch* en melaza y en medio sintético (Shima *et al.*, 2005), donde se inducen los genes *GRX4* (glutarredoxina monotiol) y *HSP13*

(recientemente identificado como un gen implicado en la protección frente a estrés oxidativo, Skoneczna *et al.*, 2007).

En general, la fuerte inducción del gen *HSP12* (proteína de choque térmico, implicada en resistencia a la deshidratación y en la respuesta a numerosos tipos de estrés) como indicador de activación de la respuesta general a estrés muestra que la levadura percibe estrés durante las diferentes etapas de la obtención de la biomasa (Pérez-Torrado *et al.*, 2005).

3.3. Respuesta a estrés durante la deshidratación y la rehidratación

Saccharomyces cerevisiae es considerado un organismo tolerante a la desecación, capaz de sobrevivir en estado de anhidrobiosis durante largos períodos de tiempo y revivir rápidamente cuando es rehidratado. Aun así la capacidad de la levadura para soportar la desecación y reasumir un metabolismo activo en presencia de agua está fuertemente ligada a su estado fisiológico y a las condiciones en las que se lleve a cabo la deshidratación y la rehidratación.

Durante la deshidratación se produce la detención del crecimiento (Singh *et al.*, 2005) y numerosos cambios que afectan a la estructura y funcionalidad de las membranas y de las proteínas (Potts, 1994). Las moléculas de agua son necesarias tanto para mantener la conformación de las proteínas como para las reacciones enzimáticas. Su pérdida produce la desnaturalización y agregación de las proteínas con la consecuente pérdida de actividad que en algunos casos se mantiene irreversible tras la rehidratación (Prestrelski *et al.*, 1993). El efecto de la pérdida de moléculas de agua sobre la fase de transición de los lípidos de membrana se ha descrito como uno de los daños más graves de la deshidratación (Crowe *et al.*, 1992). En estado hidratado y a la temperatura fisiológica, la bicapa lipídica se mantiene en fase de cristal-líquido o fluida (las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos se mantienen móviles). En la deshidratación, la eliminación de moléculas de agua que interaccionan con la bicapa aumenta el empaquetamiento de las cabezas polares de los lípidos, facilitando una mayor formación de interacciones de van der Waals entre las cadenas hidrocarbonadas que fuerza la transición de la membrana a la fase de gel (las cadenas hidrocarbonadas de los lípidos están rígidas). Durante la rehidratación, la membrana debe sufrir otra transición de fase y retornar al estado de cristal-líquido. La temperatura de transición de fase (T_m) varía dependiendo de la naturaleza del fosfolípido (tamaño de la cadena hidrocarbonada, nivel de insaturación y presencia de esteroides) y de la presencia de agua. La composición lipídica de las membranas biológicas es heterogénea de forma que durante la rehidratación coexisten regiones en fase de cristal-líquido con regiones en fase de gel, incapaces de interaccionar correctamente entre sí, causando la pérdida de las propiedades de barrera de la membrana con la consecuente pérdida del contenido citoplasmático. Esta liberación al medio de constituyentes celulares puede desencadenar la

muerte celular. Numerosos estudios muestran que se produce una elevada mortalidad cuando la rehidratación tiene lugar a temperaturas cercanas a la T_m de la membrana, al coincidir un elevado flujo de agua con una membrana inestable en fase de transición. Productores de levaduras y bodegueros sabían desde muchos años atrás que era conveniente realizar la rehidratación de la LSA en agua caliente (normalmente 40 °C). Apoyando esta idea empírica Leslie y colaboradores (1994) establecieron experimentalmente que la temperatura de transición de fase de las células de *S. cerevisiae* en fase estacionaria deshidratadas era aproximadamente 40 °C y que la rehidratación por encima de esta temperatura disminuía la pérdida de componentes celulares y aumentaba la viabilidad. Estudios posteriores han mostrado que rehidrataciones por debajo de la T_m de la membrana de la levadura totalmente hidratada (10 °C) también permite mantener un elevado número de células viables (Beney *et al.*, 2001; Laroche y Gervais, 2003). La integridad celular parece estar fuertemente afectada por los cambios en la fluidez de la membrana. Experimentos de deshidratación y rehidratación a la misma temperatura conllevan menores cambios en la fluidez y presentan un mayor porcentaje de viabilidad celular que realizados a diferentes temperaturas (Laroche y Gervais, 2003; Guyot *et al.*, 2006).

Otro evento relacionado con la muerte celular durante la deshidratación-rehidratación, es la formación de endovesículas. El plegamiento de la membrana debido a la pérdida del agua intracelular facilita la formación de estas endovesículas con la consecuente reducción del área celular superficial. Cuando las células son rehidratadas, el aumento de volumen produce la lisis celular (Simonin *et al.*, 2007).

Las levaduras presentan diferentes estrategias para mantener la fluidez de la membrana (Beney *et al.*, 2001). La presencia de ergosterol es una de ellas, su estructura rígida intercalada entre los fosfolípidos desarrolla una función estructural similar al colesterol en células animales, estabilizando las membranas, haciendo la fase de gel más fluida y la fase de cristal-líquido más rígida (Leslie *et al.*, 1994). Su síntesis durante la producción de biomasa es crucial para la tolerancia a etanol durante la fermentación vínica (Zuzuarregui *et al.*, 2005) pero también está implicado en la resistencia a estrés térmico (Swan y Watson, 1998). Teniendo en cuenta que el secado de la levadura vínica se realiza entre 35 °C y 41 °C, una elevada presencia de esta molécula en las membranas puede ayudar a mantener la viabilidad celular durante esta etapa de la obtención de LSA.

En condiciones extremas de desecación, las plantas superiores acumulan gran cantidad de proteínas LEA (*Late Embryogenesis Abundant*) que se caracterizan por su gran hidrofiliidad y su elevado porcentaje de glicinas. Estudios comparativos basados en estas proteínas han identificado otras similares en diferentes organismos, renombrándolas como hidrofílinas (Garay-Arroyo *et al.*, 2000). En *Saccharomyces cerevisiae* se han identificado nueve

(codificadas por los genes *GON7*, *GRE1*, *SIP18*, *STF2*, *HSP12*, *YBR016W*, *YJL144W* e *YNL190W*) que también parecen estar implicadas en la respuesta a déficit de agua. Todos estos genes se inducen en condiciones de estrés osmótico y cuatro de ellos están relacionados con la membrana plasmática y la pared celular. El gen *GON7* está involucrado en la biosíntesis de manoproteínas de la pared celular, los productos de los genes *HSP12* e *YBR016W* se localizan en la membrana plasmática y el gen *YNL190W* codifica una proteína de pared celular. De la mayoría se desconoce su función, como *GRE1* y *SIP18*, pero aparecen fuertemente inducidos en células deshidratadas (Singh *et al.*, 2005), además están implicados en la respuesta a otros tipos de estrés como osmótico (ambos), oxidativo, iónico y metales pesados (*GRE1*). El gen de esta familia mejor caracterizado hasta la fecha es *HSP12*, su producto se encuentra tanto en el citoplasma como asociado a la membrana plasmática y a la pared celular. Es capaz de proteger la integridad estructural de los liposomas durante la deshidratación cuando se encuentra presente en el exterior o en ambas partes de la membrana. Estudios recientes indican que actúa como un plastificante de la pared celular aportando flexibilidad, permitiendo la expansión y contracción durante cambios osmóticos en el ambiente, previniendo así la rotura celular (Sales *et al.*, 2000; Motshwene *et al.*, 2004; Karreman *et al.*, 2007).

Además, el estrés por déficit de agua aumenta la formación de ROS que contribuyen al daño celular actuando sobre lípidos, proteínas y ácidos nucleicos (França *et al.*, 2007). Los estudios realizados por Hieda (1981) mostraron que la exposición de las levaduras deshidratadas a oxígeno producía importantes cambios genéticos apuntando ya a la importancia del daño oxidativo en la deshidratación. En cepas de laboratorio se ha observado un incremento de la oxidación intracelular superior a 10 veces tras la deshidratación, acompañado de una mayor peroxidación de los lípidos (hasta dos veces más que en células frescas) (Pereira *et al.*, 2003; Espindola *et al.*, 2003; França *et al.*, 2005). En células deshidratadas se ha verificado que durante el almacenamiento aumenta el nivel de carbonilación de las proteínas y esto parece correlacionar con una menor viabilidad (França *et al.*, 2007). El origen de los radicales libres generados durante la pérdida de agua se desconoce pero parece estar ligado al desacoplamiento de la cadena de transporte electrónico mitocondrial causado por la deshidratación (Leprince *et al.*, 1994). Durante la deshidratación, varios cambios pueden favorecer la acumulación de ROS como son la pérdida de moléculas de agua de la capa de solvatación de las moléculas y la reducción del tamaño de la célula que produce la concentración de sus componentes afectando a la fuerza iónica y al pH. Estos cambios pueden alterar el funcionamiento de determinados enzimas e impedir la actuación de los sistemas de defensa antioxidante (França *et al.*, 2007).

La importancia de los sistemas de defensa antioxidante, tanto enzimáticos como no enzimáticos, en la deshidratación ha sido puesta de manifiesto por varios estudios. La sobreexpresión de los

genes *SOD1* (superóxido dismutasa citosólica) y *SOD2* (superóxido dismutasa mitocondrial) en una cepa de laboratorio aumenta el porcentaje de supervivencia a la deshidratación hasta ocho veces con respecto a la cepa parental (Pereira *et al.*, 2003). Este mismo estudio demuestra que la presencia de una sola isoforma Sod es suficiente para mantener la tolerancia a la deshidratación y unos niveles de actividad similares a los presentados en la cepa control poseedora de las dos isoformas. Tanto la enzima citosólica como la mitocondrial son capaces de asumir totalmente la función protectora frente al daño oxidativo en ausencia de la otra actividad. Mutantes carentes de catalasa T citosólica (*Ctt1p*) son más sensibles a la pérdida de agua (una reducción del 70 % en la viabilidad respecto de la cepa control) aunque la actividad catalasa se mantiene similar a la presente en la cepa parental, indicando que el aumento de la actividad catalasa peroxisomal (*Cta1p*) no es suficiente para proteger frente a la deshidratación (França *et al.*, 2005). El glutatión juega un papel importante en la protección de la membrana celular durante el secado, ya que cepas mutantes incapaces de sintetizar esta molécula muestran una gran peroxidación lipídica tanto en células frescas como en células deshidratadas (hasta cuatro veces más en el mutante *gsh1* que en la cepa de referencia). La adición de glutatión monoetil éster a las células que carecían de GSH no solo restauró sino que duplicó el porcentaje de células viables respecto de la cepa control tras la deshidratación, confirmando la importancia del glutatión para tolerar este estrés (Espindola *et al.*, 2003). Los análisis de expresión global (Rossignol *et al.*, 2006) muestran una fuerte inducción en células deshidratadas de genes relacionados con la respuesta a estrés oxidativo, como *CTT1*, *SOD1*, *SOD2*, *GTT1* y *GTT2* (glutatión-S transferasa), apoyando los datos previos obtenidos con cepas mutantes.

4. FUNCIÓN DE LA TREHALOSA EN LA LEVADURA *Saccharomyces cerevisiae*

La trehalosa (α -D-glucopiranosil (1-1)- α -D-glucopiranosido) es un disacárido ampliamente distribuido en la naturaleza. Está presente en bacterias, hongos, levaduras, plantas superiores e incluso en el reino animal. Tanto es así que aunque las células de mamífero no acumulan trehalosa, los humanos poseemos la enzima trehalasa en células epiteliales del intestino y en células renales del túbulo proximal. Las funciones que desempeña son diversas y dependientes del organismo. Es usada como fuente de energía en el vuelo de los insectos y en los primeros estadios de la germinación de las esporas fúngicas. Actúa como componente estructural de la pared celular de algunas bacterias, como micobacterias y corinobacterias, formando parte del factor de virulencia *cord factor*. Participa en la regulación del crecimiento en plantas y de forma similar en el control del flujo glicolítico en levaduras. Y finalmente, en numerosos organismos actúa como molécula de protección frente a estrés (revisado en Argüelles, 2000 y Elbein *et al.*, 2003).

Las levaduras industriales, tanto panaderas como cerveceras y vnicas, acumulan grandes cantidades de este metabolito pudiendo alcanzar concentraciones del 20 % del peso seco de la levadura (Degre, 1993). En cepas silvestres aisladas de ambientes fermentativos tradicionales se ha correlacionado las elevadas cantidades de trehalosa con una elevada tolerancia a estreses comunes en las prácticas industriales y una elevada capacidad fermentativa (Nishida *et al.*, 2004; Vianna *et al.*, 2007). Así, el contenido en trehalosa de las levaduras vnicas se considera un parámetro importante para la estabilidad y viabilidad del producto final, incluso en la industria se realizan tratamientos especiales, como el choque térmico o el aumento de la presión osmótica, para incrementar su contenido antes de someter a las levaduras al secado (Degre, 1993).

4.1. Metabolismo de la trehalosa y su implicación en la respuesta a estrés

En *Saccharomyces cerevisiae*, la síntesis de trehalosa es llevada a cabo en el citosol en dos reacciones secuenciales (Figura I.3): en primer lugar, la enzima Tps1p (actividad trehalosa-6-fosfato sintasa) cataliza la síntesis de trehalosa-6-fosfato a partir de glucosa-6-fosfato y UDP-glucosa, posteriormente, Tps2p (actividad trehalosa-6-fosfato fosfatasa) desfosforila la trehalosa-6-fosfato generando trehalosa. Estas dos subunidades catalíticas forman parte del complejo multienzimático trehalosa sintasa junto con otras dos subunidades, Tsl1p y Tps3p (identificada por homología de secuencia con Tsl1p), de las que se desconoce su función pero parecen estar implicadas en la regulación y mantenimiento de la integridad del complejo (Bell *et al.*, 1998).

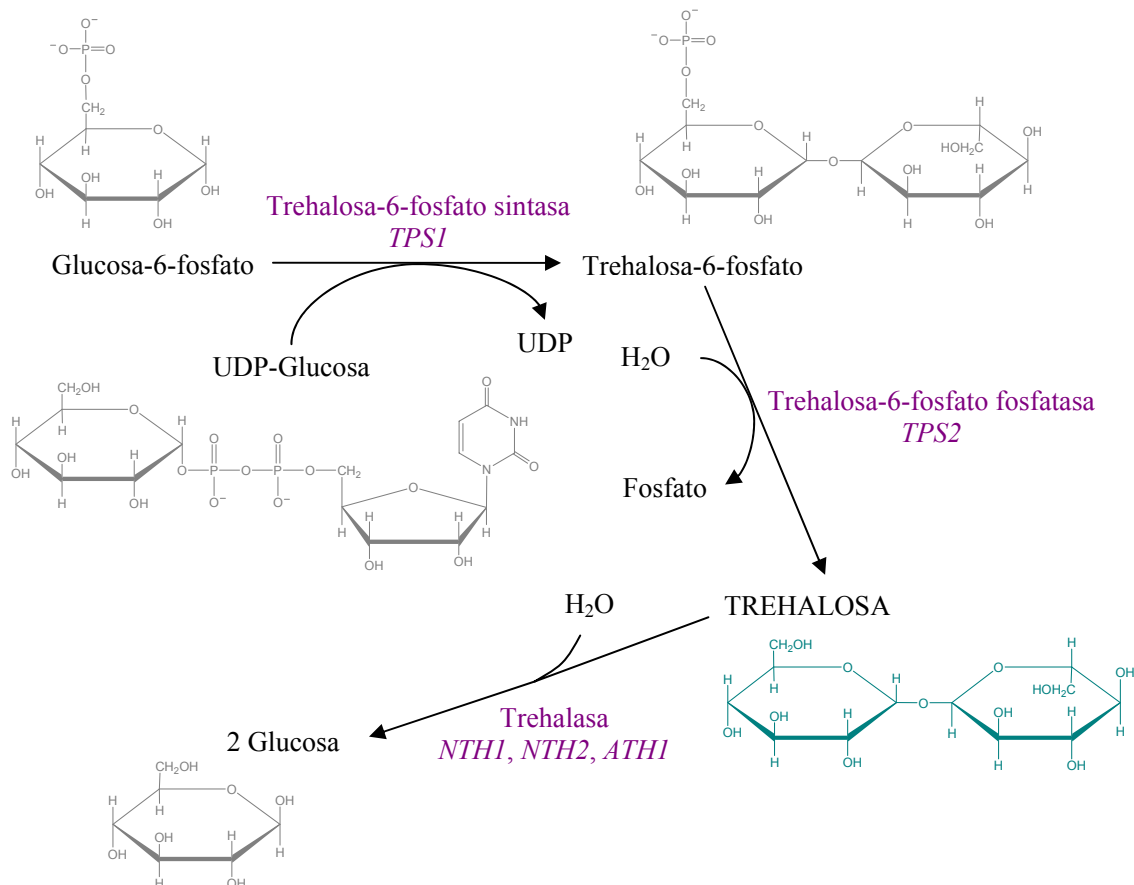


Figura I.3. Metabolismo de la trehalosa en la levadura *S. cerevisiae* (Adaptado de Singer y Lindquist, 1998; *Saccharomyces cerevisiae* Genome Database). La síntesis de la trehalosa se produce en el citosol mediada por el complejo multienzimático trehalosa sintasa formado por Tps1p con actividad trehalosa-6-fosfato sintasa, Tps2p con actividad trehalosa-6-fosfato fosfatasa y dos subunidades reguladoras, Tsl1p y Tps3p. La degradación de este metabolito en dos moléculas de glucosa es llevada a cabo por la enzima trehalasa neutra Nth1p en el citosol y por la enzima trehalasa ácida Ath1p en la vacuola y/o en el espacio periplásmico. El gen *NTH2* fue identificado por su elevado grado de homología con *NTH1* aunque hasta ahora no se había detectado actividad trehalasa asociada a este gen.

La degradación de la trehalosa en dos moléculas de glucosa es realizada por las enzimas trehalasa (Figura I.3). En *S. cerevisiae* se han descrito dos actividades (Londesborough y Varimo, 1984): la trehalasa neutra (App y Holzer, 1989), codificada por el gen *NTH1*, localizada en el citosol y con actividad máxima a pH 7,0; y la trehalasa ácida, codificada por el gen *ATH1* (Alizadeh y Klionsky, 1996), con actividad máxima a pH 4,5 y localizada en la vacuola (Harris y Cotter, 1988; Huang *et al.*, 2007) aunque algunos estudios apuntan a que también podría localizarse en el espacio periplásmico (Jules *et al.*, 2004). Por homología de secuencia (77 %) con *NTH1* se identificó el gen *NTH2* (Wolfe y Lohan, 1994). Aunque se ha detectado transcripción del gen *NTH2* y se ha observado su inducción cuando la glucosa es totalmente consumida, la delección de este gen no afecta a los niveles de trehalosa ni a los niveles de actividad trehalasa neutra. El único fenotipo descrito para el mutante *nth2* es una

mayor sensibilidad frente a choque térmico a 50 °C (Nwaka *et al.*, 1995b). Tradicionalmente, se ha considerado que Nth1p es la principal responsable de la degradación de la trehalosa intracelular (San Miguel y Argüelles, 1994; Nwaka *et al.*, 1994), mientras que Ath1p se encargaría de la degradación de la trehalosa extracelular para su utilización como fuente de carbono (Nwaka *et al.*, 1996; Basu *et al.*, 2006). Aunque algunos estudios apuntan a que existe cierto solapamiento de funciones entre ambas trehalasas. La cepa mutante *ath1* que en un principio se había descrito como incapaz de crecer en trehalosa como única fuente de carbono (Nwaka *et al.*, 1996), en el estudio realizado por Jules y colaboradores (2004) sí fue capaz de crecer pero presentó una larga fase de latencia, este mismo comportamiento fue presentado por la cepa *nth1*, mientras que la cepa doble mutante para la trehalasa ácida y para el transportador de trehalosa, *ath1ag1*, fue incapaz de crecer. Estos resultados han llevado a estos autores a proponer una vía alternativa de asimilación de trehalosa extracelular donde la trehalosa sería internalizada por el transportador Agt1p (Plourde-Owobi *et al.*, 1999) y una vez en el citosol sería degradada por Nth1p. Además, el mutante *nth1* presenta un crecimiento pobre en glicerol que es una fuente de carbono no fermentable, indicando que en condiciones donde el aporte energético de la fuente de carbono es muy bajo podría ser necesario degradar la trehalosa intracelular como aporte energético adicional. Este mismo fenotipo fue mostrado por el mutante *ath1* y fue aun más acusado en el doble mutante *nth1ath1*, apuntando a la participación de Ath1p en la degradación de la trehalosa intracelular (Nwaka *et al.*, 1995a). Trabajos realizados en nuestro laboratorio también apoyan esta función de la trehalasa ácida (Gimeno-Alcañiz, 2000). En ellos se observó una disminución de los niveles de trehalosa hacia el final de la fase estacionaria en el mutante *nth1* coincidiendo con un pico de actividad trehalasa ácida, y el mutante *ath1* presentó un ligero aumento de los niveles de trehalosa con respecto a la cepa silvestre.

En un principio se propuso que el papel de la trehalosa en *Saccharomyces cerevisiae* era actuar como azúcar de reserva, pero su ciclo de síntesis y degradación no concuerda con el seguido por otros metabolitos de reserva. Al contrario que el glucógeno (la reserva de carbohidratos más importante de esta levadura), que se acumula durante la fase exponencial, cuando hay una gran disposición de glucosa en el medio, la trehalosa no se acumula hasta que la glucosa es consumida y las células entran en el cambio diáuxico. Además, no se metaboliza hasta el final de la fase estacionaria coincidiendo con el comienzo de la muerte celular (Lillie y Pringle, 1980; Wiemken, 1990). Durante el crecimiento exponencial de *S. cerevisiae* existe expresión basal de los genes de síntesis de trehalosa *TPS1* y *TPS2*, a pesar de estar parcialmente reprimidos por glucosa, pero la acumulación de trehalosa es prácticamente nula debido a que en esta fase también se expresa el gen *NTH1* siendo su producto activo (Parrou *et al.*, 1997; Parrou *et al.*, 1999; San Miguel y Argüelles, 1994). Este ciclo fútil se ha relacionado con la regulación del

flujo glicolítico, como un sistema que mantendría los niveles de fosfato libre necesarios para el funcionamiento de esta ruta (Thevelein y Hohmann, 1995) aunque también existen datos que contradicen esta hipótesis (revisado en Gancedo y Flores, 2004). Como se ha mencionado anteriormente, la acumulación de trehalosa tiene lugar después del cambio diáuxico, coincidiendo con la inactivación de la PKA por ausencia de glucosa, lo que implica la desrepresión de los genes de síntesis de trehalosa y la inactivación de la trehalasa neutra. La trehalosa es metabolizada hacia el final de la fase estacionaria coincidiendo con la actividad trehalasa ácida aunque también se ha descrito la presencia de actividad trehalasa neutra residual (Gimeno-Alcañiz, 2000).

Actualmente y confirmado por numerosas observaciones, se considera que la función principal de este metabolito es actuar como molécula protectora durante condiciones de estrés. Niveles elevados de este disacárido mejoran la viabilidad de las células al someterlas a determinados tipos de estrés como el térmico (De Virgilio *et al.*, 1994), osmótico (Hounsa *et al.*, 1998), estrés por ácido acético (Lewis *et al.*, 1997), o desecación (Hottiger *et al.*, 1987a). En cambio, en otras condiciones de estrés no existe una correlación clara entre el nivel de trehalosa y la tolerancia, como es el caso del estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno (Pedreño *et al.*, 2002). Los cuatro genes implicados en la biosíntesis de trehalosa (*TPS1*, *TPS2*, *TPS3* y *TSL1*) poseen secuencias STRE en sus promotores y se inducen durante numerosos estreses como estrés salino, elevadas temperaturas y carencia de nutrientes (Winderickx *et al.*, 1996), posiblemente regulados por la ruta de respuesta general a estrés como se ha demostrado para el gen *TPS1* en condiciones de estrés osmótico y térmico (Parrou *et al.*, 1997). También se ha propuesto la inducción de la expresión de los genes *TPS1* y *TPS2* a través del factor transcripcional Yap1p en presencia de estrés oxidativo, temperatura elevada, cicloheximida o NaCl (Lee *et al.*, 1999; Gounalaki y Thireos, 1999). El aumento de la síntesis de trehalosa durante las condiciones de estrés no solo depende de la acumulación de las proteínas implicadas en este proceso sino que puede depender de otros mecanismos de regulación como el aumento de las actividades enzimáticas trehalosa-6-fosfato sintasa y trehalosa-6-fosfato fosfatasa observado en células sometidas a un choque térmico a 40 °C (Neves y François, 1992).

La trehalasa neutra también es inducida en múltiples condiciones de estrés y al menos en la respuesta a estrés térmico y osmótico está controlada por elementos STRE y los factores transcripcionales Msn2/Msn4 (Zähringer *et al.*, 2000). El caso más estudiado es la respuesta a estrés por elevadas temperaturas, donde un choque térmico a 40 °C aumenta la actividad enzimática Nth1p debido a la inducción de la transcripción del gen *NTH1* (Nwaka *et al.*, 1995a) y a la estabilización de Nth1p mediante fosforilación dependiente de las subunidades catalíticas de la PKA, Tpk1p y Tpk2p (Zähringer *et al.*, 1998). Por encima de esta temperatura, a 42 °C, no

se detecta inducción del gen *NTH1* pero la enzima es funcional, lo que explica que el mutante *nth1* acumule más trehalosa que la cepa salvaje en estas condiciones (Parrou *et al.*, 1997). Estos datos, conjuntamente con el hecho de que la mutación *nth1* da lugar a un retraso en la recuperación del crecimiento tras el choque térmico y un ligero defecto en la termotolerancia (fenotipo de “recuperación pobre tras choque térmico”) (Nwaka *et al.*, 1995a), indican que tanto la síntesis como la degradación de la trehalosa son necesarias para la adquisición de tolerancia a elevadas temperaturas. Singuer y Lindquist (1998) propusieron un modelo de actuación conjunta entre la trehalosa y las proteínas Hsp donde durante el estrés térmico la trehalosa interaccionaría con las proteínas evitando su desnaturalización y también con las proteínas desnaturalizadas para evitar su agregación. Una vez desaparecido el estrés, la persistencia de la trehalosa en el mutante *nth1* estaría impidiendo el repliegamiento espontáneo de las proteínas parcialmente desnaturalizadas o mediado por las carabinas moleculares Hsp, interfiriendo en la recuperación celular. Recientemente, se ha propuesto que la acumulación de trehalosa también podría estar actuando como activador/regulador de la respuesta molecular a estrés térmico, de forma indirecta aumentando la osmolaridad celular que desencadena la activación de la vía PKC1 (Mensonides *et al.*, 2005) o de forma directa modificando la estructura del factor transcripcional Hsf1p (Bulman y Nelson, 2005; Conlin y Nelson, 2007). Este fenotipo del mutante *nth1* también ha sido descrito para otras condiciones de estrés (Gimeno-Alcañiz, 2000; Pedreño *et al.*, 2002). Además, se ha propuesto la participación de la trehalasa neutra de forma independiente a la acumulación de trehalosa en la protección frente a tratamientos con agentes químicos tóxicos (CuSO₄ o NaAsO₂) o con peróxido de hidrógeno (Zähringer *et al.*, 1997; Pedreño *et al.*, 2002), donde se produce inducción de la transcripción del gen *NTH1* pero no cambios en la acumulación del disacárido.

En contraposición, el gen *ATH1* carece de secuencias STRE en su promotor y no es necesario para la supervivencia a las condiciones de estrés anteriormente mencionadas, lo que parece indicar que la trehalasa ácida no estaría implicada en la respuesta a estrés. Sin embargo, en estudios realizados en nuestro laboratorio y en otros laboratorios, se muestra como la mutación *nth1ath1* revierte el fenotipo de “recuperación pobre tras choque térmico” del mutante *nth1*, y elimina su retraso en el crecimiento observado en medio hiperosmótico, con etanol como única fuente de carbono (Gimeno-Alcañiz, 2000) y en presencia de peróxido de hidrógeno (Pedreño *et al.*, 2002). Sugiriendo que, la mutación *ath1* tiene un fenotipo asociado a estrés que es dependiente de la presencia de la mutación *nth1*.

4.2. Papel de la trehalosa durante la deshidratación-rehidratación

Numerosos organismos capaces de soportar largos períodos de tiempo en estado de anhidrobiosis (prácticamente deshidratados, con apenas un 0,1 % de contenido en agua)

acumulan grandes concentraciones de disacáridos, normalmente trehalosa aunque las semillas de plantas superiores acumulan sacarosa. Cómo la trehalosa es capaz de proteger las células en estado deshidratado ha sido durante largo tiempo objeto de debate y dos mecanismos de actuación independientes, aunque no excluyentes, han sido propuestos. Actualmente se tiende a pensar que ambos están implicados en la protección:

- a) Reemplazamiento de las moléculas de agua: la trehalosa es capaz de interactuar directamente mediante uniones de sus grupos hidroxilo con los grupos fosfato de los fosfolípidos, sustituyendo así a las moléculas de agua que se pierden por evaporación. Estas interacciones mantendrían la bicapa expandida durante la deshidratación evitando la transición de los lípidos a fase de gel (Crowe *et al.*, 1992). También a través de sus grupos hidroxilo puede interactuar con los residuos polares de las proteínas, estabilizándolas. Apoyando esta hipótesis se ha determinado que la acumulación de trehalosa en células integras deshidratadas disminuye la T_m de 60 °C (en ausencia de trehalosa) a 40 °C (Leslie *et al.*, 1994) y que porcentajes por encima del 2 % de trehalosa disminuyen el número de moléculas de agua ligadas a membranas y proteínas (Sano *et al.*, 1999).
- b) Vitricación: se basa en la capacidad de los azúcares, como la trehalosa o la sacarosa, para formar cristales. En este estado, los azúcares, poseen una elevada viscosidad y una baja movilidad. Se ha sugerido que la vitricación aumentaría la viscosidad del citoplasma y esto podría proteger membranas y proteínas al limitar el movimiento molecular, la agregación de las proteínas y suprimir las reacciones degenerativas que están asociadas al proceso de deshidratación. Aunque se ha detectado la presencia de cristales en la levadura seca activa (Schebor *et al.*, 2000), numerosas evidencias indican que aunque la vitricación puede ser necesaria no es suficiente por si sola para estabilizar las células en estado deshidratado (revisado por Crowe *et al.*, 1998; Cerrutti *et al.*, 2000).

Independientemente de la forma de actuación, la trehalosa afecta a la supervivencia de las levaduras a la deshidratación, siendo también importante su cantidad. En levaduras panaderas con solo un 5 % de trehalosa la supervivencia al secado fue tres veces menor que en células con un 20 % (Cerrutti *et al.*, 2000). Hasta que punto *Saccharomyces cerevisiae* requiere su presencia es un aspecto controvertido, mientras que algunos datos indican que es imprescindible y que además es necesario que se encuentre en ambos lados de la membrana para conferir una protección adecuada (Eleuterio *et al.*, 1993; Sales *et al.*, 2000), datos recientes obtenidos con el mutante *tps1* (incapaz de sintetizar trehalosa) en fase postdiáuxica apuntan a que existen otros mecanismos activos en esta etapa de crecimiento que son capaces de conferir cierta resistencia a la deshidratación (Ratnakumar y Tunnacliffe, 2006).

Como se mencionó en el apartado 3.3 entre los efectos nocivos de la deshidratación se encuentra el estrés oxidativo. La protección de los componentes celulares al ataque de las ROS podría formar parte de la tolerancia a la deshidratación ligada a la trehalosa. La adición de trehalosa externa o el pretratamiento térmico para aumentar su producción por la célula aumentan la supervivencia y reducen la oxidación intracelular producida por los agentes oxidantes menadiona y peróxido de hidrógeno combinado con cloruro férrico (generadores de aniones superóxido) (Benaroudj *et al.*, 2001; Herdeiro *et al.*, 2006). Esta protección se detecta tanto a nivel de carbonilación de proteínas como en la peroxidación de los lípidos. Esto último fue corroborado por Oku y colaboradores (2003) que detectaron que la trehalosa interacciona *in vitro* con los ácidos grasos insaturados reduciendo su oxidación. En células deshidratadas también se ha observado algo similar, la adición de un 10 % de trehalosa disminuye la oxidación intracelular y la peroxidación lipídica y aumenta el número de células viables tras la deshidratación, especialmente cuando las células carecen de actividad superóxido dismutasa (Pereira *et al.*, 2003). El efecto protector de la trehalosa parece ser dependiente del tipo de estrés oxidativo al que es sometida la célula, en experimentos con peróxidos como H₂O₂ y terbutilhidroperóxido no existe una correlación entre la presencia de trehalosa y la tolerancia al estrés (Pereira *et al.*, 2001; Pedreño *et al.*, 2002; Herdeiro *et al.*, 2006).

Se han llevado a cabo varios estudios basados en el metabolismo de la trehalosa con el fin de mejorar la resistencia de las levaduras a la deshidratación. Un claro ejemplo de las aplicaciones de este metabolito en el proceso industrial fue mostrado por Eleutherio y colaboradores (1997), donde, simplemente, aplicando un estrés osmótico en *Saccharomyces uvarum* var. *carlsbergensis* (variedad que acumula poca trehalosa durante la fase estacionaria del crecimiento y no sobrevive a la deshidratación) se inducía la acumulación de trehalosa y esto fue suficiente para conseguir viabilidades de hasta un 60 % tras el secado. Otras aproximaciones han consistido en la eliminación de las actividades catabólicas de la trehalosa (Kim *et al.*, 1996, Shima *et al.*, 1999). Esta estrategia aplicada a levaduras panaderas ha generado interesantes resultados, los mutantes que carecían de actividad trehalasa neutra o trehalasa ácida acumularon más trehalosa y presentaron más poder gasificante en masas panarias dulces y saladas (Shima *et al.*, 1999).

OBJETIVOS

En el transcurso de este trabajo se han abordado los siguientes objetivos:

1. Diseño de un protocolo de deshidratación a escala de laboratorio de levaduras vínicas para la obtención de levadura seca activa y comparación del mismo con los procesos industriales de secado.
 - a. Obtención de biomasa a partir de la levadura vínica T73 en fermentaciones controladas y seguimiento de los parámetros fisicoquímicos de la fermentación. Determinación del contenido de humedad, trehalosa y capacidad fermentativa de las muestras obtenidas a lo largo de la deshidratación a escala de laboratorio y a nivel de planta piloto.

2. Caracterización molecular del estado fisiológico de las levaduras vínicas durante la deshidratación en condiciones de laboratorio y en condiciones industriales.
 - a. Análisis de la expresión de genes marcadores de diferentes tipos de estrés como estudio previo para determinar cual es la respuesta celular más relevante durante el proceso de deshidratación.
 - b. Estudio de la respuesta a estrés oxidativo y su efecto sobre la biomasa deshidratada mediante el análisis de la expresión de genes relacionadas con dicho estrés, determinación de metabolitos de defensa como el glutatión y evaluación del daño celular como es la peroxidación lipídica.

3. Estudio del papel del metabolismo de la trehalosa en la respuesta a estrés y en la resistencia a la deshidratación, y diseño de estrategias de mejora genética para la obtención de levadura seca activa.
 - a. Estudio previo del efecto de la sobreacumulación de trehalosa en cepas de laboratorio mutantes en genes que codifican las actividades trehalasa bajo condiciones de deshidratación osmótica por estrés salino. Abordado mediante el análisis de la expresión de los genes *NTH1* y *ATH1* y sus actividades trehalasa asociadas, la determinación de la trehalosa intracelular y la evaluación de la capacidad para recuperar el crecimiento normal tras estrés.
 - b. Efecto de la carencia de determinadas actividades trehalasa en la cepa vínica T73 durante el proceso de deshidratación en estufa mediante la determinación de las actividades trehalasa restantes, contenido en trehalosa, capacidad fermentativa y peroxidación lipídica.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Cepas de microorganismos

En este trabajo se han empleado las cepas de levadura *Saccharomyces cerevisiae* de laboratorio que se incluyen en la Tabla M.1 y las cepas industriales incluidas en la Tabla M.2.

Tabla M.1. Cepas de laboratorio de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Procedencia
MCY1264	<i>MATα, gal, Δhis3, leu2::HIS3, lys2-801, ura3-52</i>	M. Carlson
<i>nth1</i>	MCY1264 Δ <i>nth1</i>	Gimeno-Alcañiz, 2000
<i>ath1</i>	MCY1264 Δ <i>ath1</i>	Gimeno-Alcañiz, 2000
<i>nth1ath1</i>	MCY1264 Δ <i>nth1</i> Δ <i>ath1</i>	Gimeno-Alcañiz, 2000
<i>nth1nth2ath1</i>	MCY1264 Δ <i>nth1</i> Δ <i>nth2</i> Δ <i>ath1</i>	Construida en este trabajo.
<i>nth1nth2ath1agt1</i>	MCY1264 Δ <i>nth1</i> Δ <i>nth2</i> Δ <i>ath1</i> Δ <i>agt1</i>	Construida en este trabajo.
<i>hog1</i>	MCY1264 Δ <i>hog1</i>	Pérez-Torrado

Tabla M.2. Cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cepa	Genotipo	Procedencia
T73 (CECT 1894)	Cepa vínica industrial	Querol <i>et al.</i> , 1992. Lallemand Inc.
T73-4	T73 <i>ura3::470/ura3::470</i>	Puig, 1998
T73-4 URA	T73-4 <i>ura3::470/URA3</i>	Construida en este trabajo.
T73 Δ <i>nth1</i>	T73-4 <i>nth1Δ1::loxP/nth1Δ1::loxP/ nth1Δ2::loxP</i>	Gimeno-Alcañiz, 2000
T <i>nth1</i>	T73 Δ <i>nth1</i> <i>ura3::470/URA3</i>	Construida en este trabajo.
T <i>ath1</i>	T73-4 <i>ath1Δ1::loxP/ath1Δ1::loxP, ura3::470/URA3</i>	Construida en este trabajo.

Tabla M.2. (continuación).

Cepa	Genotipo	Procedencia
<i>Tnth1ath1</i>	<i>T73Δnth1</i> <i>ath1ΔI::loxP/ath1ΔI::loxP</i> , <i>ura3::470/URA3</i>	Construida en este trabajo.
<i>Tnth1nth2ath1</i>	<i>Tnthath1</i> <i>nth2ΔI::loxP/nth2ΔI::loxP</i> , <i>ura3::470/URA3</i>	Construida en este trabajo.

1.2. Plásmidos

Los plásmidos utilizados en este trabajo se describen en la Tabla M.3.

Tabla M.3. Plásmidos utilizados en este trabajo.

Plásmido	Descripción	Procedencia
pHSP12	Plásmido bacteriano pUC18 en el que se ha clonado el fragmento <i>EcoRI</i> de 600 pb que contiene el gen de levadura <i>HSP12</i> ; marcador <i>URA3</i> .	Praekelt y Meacock, 1990
pSH47	Plásmido de levadura pBS39 que contiene el gen de la recombinasa Cre bajo el control de un promotor <i>GAL</i> ; marcador <i>URA3</i> .	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pUG6	Plásmido bacteriano pFA6-kanMX4 que contiene el gen de resistencia a genética kanMX4 flanqueado por sitios loxP.	Güldener <i>et al.</i> , 1996
pURA3	Plásmido bacteriano pUC18 en el que se ha clonado el fragmento <i>HindIII</i> de 1170 pb que contiene el gen de levadura <i>URA3</i> .	Puig, 1998
YEp-STII	Plásmido de levadura YEp24 en el que se ha clonado un fragmento de 9 kb que contiene el gen de levadura <i>STII</i> ; marcador <i>URA3</i> .	Nicolet y Craig, 1989

1.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR y QRT-PCR fueron diseñados utilizando los programas Gene Runner y Primer Express respectivamente y sintetizados por la casa comercial Isogen. Su secuencia y uso concreto se describen en la Tabla M.4 y Tabla M.5 respectivamente.

Los oligonucleótidos para QRT-PCR reúnen una serie de características especiales que se detallan a continuación: todos tienen una T_m de 60 °C ($T_m = 2\text{ °C} \times (A + T) + 4\text{ °C} \times (G + C)$), el tamaño del amplificado varía entre 50 y 153 pb y se sitúa próximo al extremo 3' del gen.

Tabla M.4. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Uso
AGT1 S1¹	<u>AACATTTCTGAGTCTTCAAGAGA</u> <u>TATTGTAAACCAACAGGCGTAC</u> GCTGCAGGTCGAC	Casete de delección del gen <i>AGTI</i> .
AGT1 C2¹	<u>CCCTTTTACTTAAACATTTATCAG</u> <u>CTGCATTTAATTCTCGCACTAGT</u> GGATCTGATATC	Casete de delección del gen <i>AGTI</i> .
AGT1 A1	GCCATAGATTCTACTCGGTC	Comprobación de la delección del gen <i>AGTI</i> .
AGT1 A2	GACACTAATATGGACCACAGG	Comprobación de la delección del gen <i>AGTI</i> .
ATH1.1	CTTGAATGGACACGAAGGG	Obtención de la sonda <i>ATHI</i> .
ATH1.2	CGCCTGTTTAATCTCCAC	Obtención de la sonda <i>ATHI</i> .
ATH1 S1¹	<u>TTTAACAAAGAGTTCCAGGCTTA</u> <u>CATACTCACATGCCTCGCGTACG</u> CTGCAGGTCGAC	Casete de delección del gen <i>ATHI</i> .
ATH1 C2¹	<u>CGACTGGTTGCGACTTGCTTCGT</u> <u>AGTATGGCTCACTTGGGACTAGT</u> GGATCTGATATC	Casete de delección del gen <i>ATHI</i> .
ATH1 A1	ACGACAAACCAACAGCCG	Comprobación de la delección del gen <i>ATHI</i> .

Tabla M.4. (continuación).

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Uso
ATH1 A2	CCGATGTGCCAGATTTC	Comprobación de la delección del gen <i>ATH1</i> .
ATH1 A3	CCAGGCTTACATACTCACATGC	Comprobación de la delección del gen <i>ATH1</i> .
ATH1 A4	GCTTCGTAGTATGGCTCACTTG	Comprobación de la delección del gen <i>ATH1</i> .
GPD1.1	TTGAATGCTGGTAGAAAG	Obtención de la sonda <i>GPD1</i> .
GPD1.2	TGACCGAATCTGATGATC	Obtención de la sonda <i>GPD1</i> .
GRX2.1	GTATCCCAGGAAACAGTTGC	Obtención de la sonda <i>GRX2</i> .
GRX2.2	GTTTCCAAATCGCTGTTACC	Obtención de la sonda <i>GRX2</i> .
GRX5.1	CATAAGGTCATTTTCCCCC	Obtención de la sonda <i>GRX5</i> .
GRX5.2	CTTCTTCAGGTACCAATGCC	Obtención de la sonda <i>GRX5</i> .
GSH1.1	CCCGATGAAGTCATTAACA	Obtención de la sonda <i>GSH1</i> .
GSH1.2	GGAAAAGGTCAAAAATGCT	Obtención de la sonda <i>GSH1</i> .
K2	GGGACAATTCAACGCGTCTG	Comprobación de la integración del gen Kan ^R .
K3	CCTCGACATCATCTGCCAG	Comprobación de la integración del gen Kan ^R .
NTH1 A1	GGATTTTTCAGGAGCGAGG	Obtención de la sonda <i>NTH1</i> .
NTH1 A2	GCTCCACCATACTCTTGC	Obtención de la sonda <i>NTH1</i> .
NTH2 S1 ¹	<u>ATTTGACGCAGGTTCCGGATCAGA</u> <u>CATTTGGTATATAAGGACGTACG</u> CTGCAGGTCGAC	Casete de delección del gen <i>NTH2</i> .
NTH2 C2 ¹	<u>TTACACAACCTTGATTAATAATAT</u> <u>TTGACCTTACTCTAACTAGTGGA</u> TCTGATATC	Casete de delección del gen <i>NTH2</i> .
NTH2 A1	AGGTTCGGATCAGACATTTG	Comprobación de la delección del gen <i>NTH2</i> .

Tabla M.4. (continuación).

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Uso
NTH2 A2	GGGTATAATCCTTCATTCCG	Comprobación de la delección del gen <i>NTH2</i> .
NTH2 A3	GTTATAGCGCTTGTAGGAACTG	Comprobación de la delección del gen <i>NTH2</i> .
TRR1.1	ATGAAGGTATGATGGCGAAC	Obtención de la sonda <i>TRR1</i> .
TRR1.2	ATCCTGAACATCACCAGCAG	Obtención de la sonda <i>TRR1</i> .
TRX2.1	AAATCCGCTTCTGAATAC	Obtención de la sonda <i>TRX2</i> .
TRX2.2	CTATACGTTGGAAGCAATAG	Obtención de la sonda <i>TRX2</i> .
TSA1.1	CAAGTTCAAAAGCAAGCTCC	Obtención de la sonda <i>TSA1</i> .
TSA1.2	TCAACCAATCTCAAGGCTTC	Obtención de la sonda <i>TSA1</i> .
URA 1	AATGTGGCTGTGGTTTCAGG	Comprobación de la complementación de la auxotrofia <i>ura3</i> .
URA 2	TCTACCTTAGCATCCCTTCCC	Comprobación de la complementación de la auxotrofia <i>ura3</i> .
URA 4	GGCGAGGTATTGGATAGTTCC	Comprobación de la complementación de la auxotrofia <i>ura3</i> .

¹ La secuencia subrayada corresponde al extremo 5' (S1) o 3' (C2) de los genes correspondientes. La secuencia sin subrayar corresponde a la secuencia del plásmido pUG6 utilizado como molde.

Tabla M.5. Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de QRT-PCR.

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Gen
18S.RT.F	TTGCGATAACGAACGAGACC	<i>RDN18</i>
18S.RT.R	CATCGGCTTGAAACCGATAG	<i>RDN18</i>
ACT1.RT.F	CATGTTCCCAGGTATTGCCG	<i>ACT1</i>

Tabla M.5. (continuación).

Oligonucleótido	Secuencia (5' a 3')	Gen
ACT1.RT.R	GCCAAAGCGGTGATTCCT	<i>ACT1</i>
GPD1.RT.F	GGTGAGATCATCAGATTCGG	<i>GPD1</i>
GPD1.RT.R	CCTAGCAACCTTGACGTTTC	<i>GPD1</i>
GRX2.RT.F	AATCCAAGGCCCTTGTGTTG	<i>GRX2</i>
GRX2.RT.R	GTACAGTTTTTTGGCCCGAG	<i>GRX2</i>
GRX5.RT.F	GACCCAGAGCTACGTGAAG	<i>GRX5</i>
GRX5.RT.R	CCAGAGCGTGCCATACTTG	<i>GRX5</i>
GSH1.RT.F	CCGGACAAAAAGGATTCTCC	<i>GSH1</i>
GSH1.RT.R	CGGAATACGCAGCGTTCTC	<i>GSH1</i>
HSP12.RT.F	TGACAAGGCCGACAAGGTC	<i>HSP12</i>
HSP12.RT.R	GCGGCTCCCATGTAATCTC	<i>HSP12</i>
STI1.RT.F	CGGAGGCGTATGTAAACCC	<i>STI1</i>
STI1.RT.R	CATTCGGCCAATCACTCTTG	<i>STI1</i>
TRR1.RT.F	GAAACCGATTTGCCAGTCAG	<i>TRR1</i>
TRR1.RT.R	GCTTCATCAGTGTCGACTTG	<i>TRR1</i>
TRX2.RT.F	GCTGAAGTTTCTTCCATGCC	<i>TRX2</i>
TRX2.RT.R	GACTCTGGTAACCTCCTTAC	<i>TRX2</i>
TSA1.RT.F	CCTTGAGATTGGTTGAAGCC	<i>TSA1</i>
TSA1.RT.R	GCACCTGGAGTCCAGTTAC	<i>TSA1</i>

2. MEDIOS Y CONDICIONES DE CULTIVO

2.1. Bacterias

Los cultivos de *Escherichia coli* se llevaron a cabo a 37 °C con agitación (200 rpm) en medio LB (extracto de levadura 0,5 % (p/v), bacto triptona 1 % (p/v), NaCl 1 % (p/v)), suplementado con agar al 2 % (p/v) para los cultivos en placa. Para la selección de cepas con plásmido se añadió al medio ampicilina (50 mg/L).

2.2. Levaduras

Los distintos medios y condiciones de cultivo utilizados se describen a continuación. El crecimiento del cultivo en medios líquidos se estimó midiendo la D.O.₆₀₀, en algunos casos también se realizó el conteo del número de células por mL de cultivo en cámara cuantaglobulos Neubauer.

2.2.1. Condiciones de laboratorio

Las distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* se cultivaron a 30 °C, con agitación orbital (200 rpm) para los medios líquidos siguiendo las recomendaciones descritas por Sherman y colaboradores (1995).

El medio rico (extracto de levadura 1 % (p/v), bacto peptona 2 % (p/v)) fue suplementado con glucosa 2 % (p/v) (YPD), galactosa 2 % (p/v) (YPGal) o glucosa 10 % (p/v) más fructosa 10 % (p/v) (YPGF). El medio mínimo (SD) utilizado contenía base nitrogenada para levadura sin aminoácidos (YNB) 0,17 % (p/v), (NH₄)SO₄ 0,5 % (p/v) y glucosa 2 % (p/v). Para cepas que albergaban auxotrofías se añadieron los requerimientos necesarios a una concentración final de 20 mg/L (histidina, triptófano, adenina y uracilo), 30 mg/L (lisina) o 100 mg/L (leucina). Los medios sólidos fueron suplementados con agar 2 % (p/v).

La selección de transformantes con resistencia a geneticina se llevó a cabo en medio sólido YPD con geneticina (G418, Gibco BRL) 100 mg/L o 200 mg/L.

La selección de células auxotrofas para el uracilo se realizó en medio sólido SD con uracilo y ácido 5-fluoro-orótico (SD-FOA) al 0,1 % (p/v).

Los experimentos de estrés se realizaron en condiciones de laboratorio. A partir de precultivos en YPD se inocularon cultivos del mismo medio que crecieron hasta alcanzar la D.O.₆₀₀ de 1,0 en los experimentos de estrés osmótico y estrés por ausencia de glucosa, y hasta D.O.₆₀₀ 6,0 en

los experimentos de estrés salino. Se recogieron las células por centrifugación a 3500 rpm durante 3 min, se lavaron con agua destilada y se inocularon en YPD suplementado con sorbitol 0,9 M (estrés osmótico) donde se mantuvieron durante 1, 3 y 6 horas; o con NaCl 1,2 M (estrés salino) donde se tomaron muestras a las 1, 3, 6 y 24 horas; o en YP (extracto de levadura 1 % (p/v), bactopectona 2 % (p/v)) para el estrés por ausencia de glucosa donde fueron incubadas durante 8 y 24 horas.

Los experimentos de deshidratación a escala de laboratorio se realizaron con biomasa obtenida de cultivos en YPD en fase estacionaria (48 horas) o de fermentación en melaza (*vease* Condiciones industriales). Se recogieron las células por centrifugación a 3500 rpm 3 min y se lavaron con agua destilada, la crema resultante tras la centrifugación fue extendida en capa fina y secada en una estufa de convección (Incubator, Sanyo) a 35 °C. Se tomaron muestras a diferentes tiempos de secado y se calculó el contenido en humedad residual en función de la pérdida de peso de la biomasa.

2.2.2. Condiciones industriales

La simulación en el laboratorio de la producción industrial de levaduras se realizó en un biorreactor BIOFLO III (NBS, New Jersey, USA) de 5 L de capacidad máxima. El medio utilizado durante todo el proceso de propagación de las levaduras fue jarabe de melaza diluido hasta alcanzar una concentración de sacarosa de 6,1 % (p/v) en el *batch* y 10 % (p/v) en el medio de alimentación (*fed-batch*). En los dos casos se suplementó con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0,75 % (p/v), KH_2PO_4 0,35 % (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,075 % (p/v), biotina 0,5 mg/L, pantotenato cálcico 1 mg/L e hidroclorehidrato de tiamina 1 mg/L. A los 2 L de medio en la fase de *batch* se añadió 1 L durante la fase de *fed-batch*. La agitación varió entre 300-500 rpm automáticamente para mantener la concentración de O_2 siempre superior al 20 %, determinada por un electrodo de oxígeno (Metler, Toledo). La temperatura de crecimiento se mantuvo a 30 °C mediante una camisa de agua refrigerada. El pH del medio de crecimiento se ajustó inicialmente a 4,5 con H_3PO_4 42 % (v/v) y se siguió su variación durante el *batch*. En el periodo de *fed-batch* se mantuvo constante a 4,5 añadiendo NaOH 1 M. Las medidas se realizaron en línea con el electrodo de pH (Ingold). Se administró un caudal de aire de 0,5-1,5 Kg/cm^3 . La velocidad de alimentación se incrementó de forma discontinua de 0,5 a 1,5 mL/min. Se añadió antiespumante (antifoam 204, Sigma) hasta una concentración final de 0,05 % (v/v).

La producción de biomasa a escala de planta piloto (*Laboratory of Research and Development*, Lallemand S.A.S., Toulouse, Francia) abarcó 72 horas y se llevó a cabo en un biorreactor BIOFLO 4500 (New Brunswick Scientific) con capacidad para 30 L. Para la etapa de *batch* se inocularon 10 L de medio rico pH 4,8 (80 g/L de azúcar, Lallemand S.A.S.) con 20 mL de un

precultivo de 50 mL del mismo medio crecido 24 horas a 30 °C en agitación. Transcurridas 24 horas de *batch*, se eliminó parte del contenido del fermentador, quedando 33,75 g de biomasa que sirvieron de inóculo para la etapa de *fed-batch*. Se ajustó a 11 L de volumen con agua estéril y se inició la alimentación del cultivo. Durante la etapa de *fed-batch*, el cultivo se alimentó con medio MELAZA (300 g/L de azúcar, pH 4,8, suplementada con ácido pantoténico, biotina, tiamina, sulfato de zinc, MgSO₄ y ácido fosfórico, Lallemand S.A.S.) y NH₄OH 5 %, siguiendo una rampa de velocidad de alimentación automatizada y monitorizada por un ordenador (Lallemand S.A.S.). Durante todo el proceso, se mantuvieron constantes la temperatura a 30 °C, el pH a 4,8 mediante NaOH y H₂SO₄ y también la aireación (1 V aire/V medio). La agitación durante la etapa de *batch* se mantuvo constante a 250 rpm durante las 7 primeras horas y a 400 rpm las siguientes 17 horas. Durante la etapa de *fed-batch*, la agitación osciló entre 400 y 650 rpm dependiendo de los requerimientos de aireación del cultivo a lo largo del crecimiento. Transcurridas 24 horas de *fed-batch*, se llevó a cabo la etapa de maduración donde el cultivo se mantuvo sin alimentar durante 1-2 horas antes de recoger la biomasa generada para su deshidratación.

Para llevar a cabo la deshidratación a escala de planta piloto, primero la biomasa fue centrifugada en una centrífuga Westfalia Separator AG hasta obtener una crema de levadura 3 veces más concentrada y libre de melaza. Parte de la crema resultante se procesó inmediatamente mientras que otra parte fue almacenada a 4 °C hasta su procesamiento tras 20 o 24 horas, en algunas de las cremas almacenadas se ajustó el pH a 3,5 con H₂SO₄. Para facilitar la disgregación de las células durante el secado se añadió a la crema una mezcla de monoestearato de sorbitán y NaOH. La crema fue filtrada y posteriormente se dividió por extrusión en filamentos para facilitar y acelerar el secado. El secado fue llevado a cabo en un deshidratador de tipo lecho fluidizado (Lit Fluidisé Versa-Glatt GPCG Type 1) hasta obtener un producto final con una humedad residual por debajo del 8 %. La temperatura de la biomasa de levadura no superó los 35 °C o los 41 °C. El contenido en agua residual se analizó en un desecador (Sartorius MA30).

2.3. Medida de viabilidad

Se tomó una alícuota del cultivo y se ajustó a una D.O.₆₀₀ de 1,0 con agua destilada, a partir de ésta se realizaron diluciones seriadas (1×10^{-2} , 5×10^{-2} , $2,5 \times 10^{-2}$, $1,25 \times 10^{-3}$ y $6,25 \times 10^{-4}$), de las que se depositaron gotas de 5 µL sobre placas de YPD. En el experimento de estrés salino se realizó una dilución más ($3,125 \times 10^{-4}$). Las placas fueron incubadas a 30 °C durante 1-2 días y se comparó el crecimiento de colonias en las gotas correspondientes a las distintas diluciones.

3. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS

3.1. Obtención de DNA

3.1.1. DNA plasmídico bacteriano

Las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se realizaron según el protocolo basado en la lisis alcalina descrito por Sambrook y Rusell (2001) a partir de 4 mL de cultivo LB con ampicilina. Para obtener mayores cantidades se inocularon cultivos de 50 mL y se utilizaron distintos sistemas comerciales (Perfectprep[®] Plasmid Midi, Eppendorf; Plasmid Midi Kit, Quiagen).

3.1.2. DNA genómico de levadura

La obtención de DNA genómico de levadura se llevó a cabo a partir de cultivos de 5 mL de YPD según lo descrito con anterioridad por Hoffman y Winston (1987).

3.2. Obtención de RNA total de levaduras

Se recogieron 50-70 mg de peso seco de células por centrifugación a 3500 rpm, se lavaron con agua destilada, se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron congeladas a -80 °C hasta su procesamiento.

Para la obtención de RNA, las células se descongelaron en hielo y fueron sometidas a diferentes métodos de rotura celular dependiendo del estado de las células y de la cantidad y calidad necesarias del RNA. El tratamiento con fenol caliente descrito por Kohrer y Domdey (1991) fue aplicado a células recogidas directamente de medio de cultivo y que fueron analizadas por Northern Blot. Las células se resuspendieron en 0,5 mL de tampón TES (Tris-HCl 0,01 M pH 7,5, EDTA 0,01 M pH 8,0, SDS 0,5 % (p/v)), se añadió 0,5 mL de fenol saturado pH 4,3 (Amresco) y se incubaron a 65 °C durante 45 min agitando brevemente cada 10 min. Las células procedentes de diferentes etapas de deshidratación y las muestras que se analizaron por QRT-PCR se resuspendieron en 0,5 mL de tampón LETS (LiCl 0,1 M, EDTA 0,01 M, SDS 0,2 % (p/v), Tris-HCl 0,01 M pH 7,4), se le añadieron 0,5 mL de fenol saturado pH 4,3 y 0,5 mL de perlas de vidrio y se rompieron alternando 3 veces de 30 s de agitación vigorosa con 30 s en hielo. Posteriormente, todas las muestras se centrifugaron 5 min a 12000 rpm en una centrífuga refrigerada a 15 °C. El sobrenadante se extrajo una vez con un volumen de fenol:cloroformo (5:1) (v:v) y otra con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) (v:v:v). El RNA se precipitó con un volumen de LiCl 5 M a -20 °C durante al menos 3 horas. El precipitado se recogió por centrifugación durante 15 min a 12000 rpm (4 °C), se lavó con etanol 70 % (v/v) y una vez seco fue resuspendido en agua destilada estéril. La concentración de RNA se valoró

espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm de una dilución adecuada de la disolución.

El material utilizado fue previamente autoclavado y manipulado con guantes para evitar la presencia de RNasas.

3.3. Tratamientos enzimáticos del DNA

Las digestiones de DNA genómico o plasmídico con endonucleasas de restricción se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante (Boehringer-Manheim, Amersham Pharmacia Biotech o Promega).

3.4. Reacción en cadena de la DNA polimerasa (PCR)

La PCR se utilizó para la síntesis de casetes de disrupción, sondas de hibridación y para la comprobación de modificaciones genéticas. Estas reacciones se realizaron en un volumen final de 25 μ L (analítica) o 50 μ L (preparativa) con 3 ng/ μ L de DNA genómico o 0,4 ng/ μ L de DNA plasmídico, 1 pmol/ μ L de cada oligonucleótido, dNTPs 0,25 mM, 1 U de polimerasa (BioTaq, Bio-21040, Bioline; DNA pol, Biotools), MgCl₂ 3 mM y el tampón suministrado por la casa comercial. Las condiciones de reacción fueron: 2 min a 94 °C; 30 ciclos de 15 s a 94 °C, 30 s a la temperatura óptima de hibridación para cada par de oligonucleótidos y un tiempo variable (1 min/kb) a 72 °C; finalmente 10 min a 72 °C.

En algunos casos, para las PCR analíticas se utilizó como molde directamente las células de una colonia de levadura resuspendida en la mezcla de reacción, incluyendo un paso previo de incubación de la mezcla a 95 °C durante 10 min, tras el cual se añadió la polimerasa y se prosiguió con las condiciones antes descritas.

3.5. Transcripción reversa-PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) en dos pasos

El análisis de expresión génica de las muestras procedentes de los experimentos en planta piloto y de los lotes industriales se realizó mediante transcripción reversa-PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) en un aparato LightCycler[®] 2.0 (Roche). En la QRT-PCR en dos pasos, la transcripción reversa de RNA a cDNA se realiza separadamente del resto de reacciones y fuera del sistema LightCycler[®].

Primero se obtuvo el cDNA con el kit comercial Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit (Roche) por retrotranscripción mediante cebadores de hexámeros al azar a partir de 1 μ g de RNA total, siguiendo las instrucciones de los fabricantes. La concentración de cDNA se valoró

espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm de una dilución adecuada de la disolución y también se comprobó su estado amplificando con la pareja de oligos 18S por PCR convencional.

En segundo lugar se realizó la PCR en tiempo real usando como sonda fluorescente SYBR Green. Para la obtención y marcaje de los amplificadores se utilizó el kit comercial LightCycler® FastStart DNA Master^{PLUS} SYBR Green I (Roche) siguiendo las recomendaciones del fabricante con algunas pequeñas modificaciones. Las características de los oligonucleótidos utilizados y los genes analizados se detallan en el apartado 1.3 y en la Tabla M.5. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µL. El protocolo de amplificación utilizado se diseñó siguiendo las recomendaciones del kit de marcaje y del fabricante del aparato: 10 min de desnaturalización previa a 95 °C; 40 ciclos de 10 s de desnaturalización a 95 °C, 5 s de apareamiento a 55 °C y 6 s de extensión a 72 °C; 1 ciclo para obtener las curvas de fusión, 10 s a 95 °C, 15 s a 65 °C y 0 s a 95 °C con una rampa de 0,1 °C/s; finalmente, una etapa de enfriamiento de 30 s a 40 °C. Para la cuantificación y comprobación de la eficiencia de amplificación, se realizaron rectas de calibrado para cada gen analizado a partir de diluciones seriadas de una mezcla de 6 muestras de cDNA representativas del proceso estudiado; las diluciones relativas utilizadas para el gen *RDNI8* fueron 4×10^{-2} , 2×10^{-2} , 1×10^{-2} , 5×10^{-3} , 2×10^{-3} y 1×10^{-3} , para el resto de genes las diluciones fueron 2×10^{-1} , 1×10^{-1} , 4×10^{-2} , 2×10^{-2} y 1×10^{-2} . Para el análisis de amplificación en las muestras se realizó una dilución 4×10^{-2} excepto para el gen *RDNI8* (1×10^{-2}).

Para la normalización se utilizaron 3 genes que presentaban una expresión estable durante el proceso estudiado, *ACT1*, *HSP12* y *RDNI8*. El factor de normalización utilizado fue la media geométrica de la expresión relativa de los genes de referencia calculada mediante el programa geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002; Nailis *et al.*, 2006).

3.6. Electroforesis de ácidos nucleicos

3.6.1. Electroforesis de DNA en geles de agarosa

Las electroforesis analíticas se realizaron en geles de agarosa a una concentración variable entre 1-3 % (p/v) en función del tamaño de los fragmentos a separar. Los geles se prepararon en tampón TBE 0,5x (Tris-HCl 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1,25 mM), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xilen cianol 0,25 % (p/v), glicerol 30 % (v/v)) y la electroforesis se realizó a voltaje constante entre 2-10 V/cm.

Las electroforesis preparativas se realizaron en geles de agarosa preparados con tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético glacial 4 M, EDTA 1 mM pH 8,0) que también fue usado como tampón de electroforesis.

3.6.2. Electroforesis de RNA en geles desnaturizantes de agarosa

Las muestras se prepararon en un volumen final de 20 μ L conteniendo: 10-50 μ g de RNA disuelto en agua estéril hasta un volumen de 5 μ L, 2 μ l de MOPS 10x, 3 μ l de formaldehído y 10 μ l de formamida desionizada. Se incubaron a 65 °C durante 15 min y se dejaron enfriar en hielo. Se les añadió 4 μ l de tampón de carga 6x (glicerol 50 % (v/v), EDTA 1 mM pH 8,0, azul de bromofenol 0,25 % (p/v), xilen cianol 0,25 % (p/v)).

La separación del RNA total de levadura se realizó en geles desnaturizantes de agarosa al 1-1,5 % (p/v) con formaldehído 2,2 M y tampón MOPS 1x (MOPS 20 mM, acetato sódico 8 mM, EDTA 1 mM, pH 7,0). Se utilizó el MOPS 1x como tampón de electroforesis. Los geles se tñieron con una solución de bromuro de etidio (1 μ g/mL) durante 1 min y se destñieron en agua destilada durante al menos 1 hora.

Las imágenes de los geles de RNA se capturaron con una cámara Kodak Digital Science DC120 y para el análisis de la intensidad de las bandas fue utilizado el software de análisis de imagen Kodak Digital Science 1D.

3.7. Aislamiento de fragmentos de DNA en geles de agarosa

Los fragmentos de DNA se separaron en geles de agarosa de bajo punto de fusión para facilitar la recuperación del DNA. El tampón de electroforesis utilizado fue TAE 1x. Se recortó la banda de interés y se utilizaron los kits comerciales QUIAEX[®] II (Quiagen) o E.Z.N.A.[®] Gel Extraction Kit (Omega Bio-Tek) para el aislamiento del DNA del bloque de agarosa, siguiendo las instrucciones de los fabricantes.

3.8. Transferencia de ácidos nucleicos a filtros

Para la transferencia de DNA, los fragmentos fueron separados en geles analíticos de agarosa y seguidamente el gel fue tratado para que tuviera lugar la rotura y desnaturización de estos fragmentos con: 1 lavado de 15 min con HCl 0,25 M, 2 lavados de 15 min con disolución de desnaturización (NaCl 0,25 M, NaOH 0,5 M, pH 13,0) y 1 lavado de 30 min con disolución de neutralización (Tris 0,5 M, NaCl 1,5 M, EDTA 1 mM, pH 7,2). En el caso del RNA, la transferencia se realizó sin tratamientos previos del gel.

La transferencia se realizó en tampón SSC 6x (citrató sódico 0,09 M, NaCl 0,9 M, pH 7,0) según lo descrito por Sambrook y Rusell (2001). Se utilizaron membranas de nylon Hybond-N (Amersham Pharmacia Biotech). La fijación de los ácidos nucleicos a la membrana se realizó mediante exposición a luz ultravioleta durante al menos 20 segundos en un aparato BLX-254 (Vibler Lourmat, Francia).

3.9. Marcaje radiactivo de fragmentos de DNA

Los fragmentos de DNA utilizados como sondas (Tabla M.6) fueron marcados radiactivamente mediante la técnica de cebado aleatorio (Feinberg y Vogelstein, 1983) utilizando como nucleótido marcado [α - 32 P]-dCTP. Se utilizaron los kits comerciales Rediprime (Amersham Biosciences) y High Prime (Roche). La radiactividad incorporada se cuantificó en un contador de centelleo como se describe en Sambrook y Rusell (2001).

Tabla M.6. Sondas utilizadas.

Gen	Tamaño (pb)	Obtención
<i>AGT1</i>	611	PCR, cebadores AGT1 A1 y AGT1 A2.
<i>ATH1</i>	358 y 1102	PCR, cebadores ATH1.1 y ATH1.2 para Northern Blot, cebadores ATH1 A1 y ATH1 A2 para Southern Blot.
<i>GPD1</i>	800	PCR, cebadores GPD1.1 y GPD1.2.
<i>GRX2</i>	275	PCR, cebadores GRX2.1 y GRX2.2.
<i>GRX5</i>	407	PCR, cebadores GRX5.1 y GRX5.2.
<i>GSH1</i>	945	PCR, cebadores GSH1.1 y GSH1.2.
<i>HSP12</i>	600	Fragmento de restricción <i>EcoRI</i> del plásmido <i>pHSP12</i> .
<i>NTH1</i>	926	Fragmento de restricción <i>EcoRI</i> del producto de PCR, cebadores NTH1 A1 y NTH1 A2.
<i>NTH2</i>	369	PCR, cebadores NTH2 A1 y NTH2 A2.
<i>STII</i>	1485	Fragmento de restricción <i>KpnI-SacI</i> del plásmido YEp- <i>STII</i> .
<i>TRR1</i>	779	PCR, cebadores TRR1.1 y TRR1.2.
<i>TRX2</i>	300	PCR, cebadores TRX2.1 y TRX2.2.
<i>TSA1</i>	461	PCR, cebadores TSA1.1 y TSA1.2.

3.10. Hibridación de ácidos nucleicos

Las membranas se preincubaron en solución de prehibridación (tampón SSPE 5x (NaCl 0,9 M, fosfato sódico 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,7), Denhardt 5x (BSA 0,1 % (p/v), Ficoll 0,1 % (p/v), PVP 0,1 % (p/v)) y DNA de esperma de arenque (100 µg/mL)) a 42 °C durante al menos 30 min para DNA o 2 horas para RNA. Posteriormente, esta solución fue sustituida por solución de hibridación (SSPE 5x, Denhardt 1x, formamida desionizada 50 % (v/v), sulfato dextrano 10 % (p/v) y DNA de esperma de arenque desnaturalizado (200 µg/mL)) a la que fue añadida la sonda radiactiva previamente desnaturalizada. La hibridación tuvo lugar a 42 °C durante 16-24 horas, tras lo que se procedió al lavado de los filtros (10 min a temperatura ambiente en SSPE 1x, SDS 0,1 % (p/v); 15 min a 65 °C en SSPE 1x, SDS 0,1 % (p/v); 10 min a 65 °C en SSPE 0,1x, SDS 0,1 % (p/v)).

En algunos casos, las membranas con RNA se hibridaron siguiendo una metodología diferente a la anteriormente descrita. La prehibridación e hibridación se realizaron a 65 °C con SDS 7 % (p/v), fosfato sódico 0,5 M pH 7,2 y EDTA 1 mM pH 7,0. La sonda marcada radiactivamente y purificada (MicroSpin™ S-300 HR Columns, GE Healthcare) se añadió directamente a esta solución. Se realizaron dos lavados con SSC 0,5x (NaCl 75 mM, citrato sódico 7,5 mM) y SDS 0,1 % (p/v), uno en el propio tubo de hibridación a T° ambiente y otro a 65 °C durante 10 min.

Los filtros fueron hibridados en repetidas ocasiones eliminando previamente la radiactividad mediante lavados con SDS 0,1-0,2 % (p/v) hirviendo y comprobando la desaparición de la sonda con un contador Geiger (900 minimonitor, Mini-Instruments Ltd.).

3.11. Autorradiografía

Para la autorradiografía de los filtros hibridados con sondas radiactivas se utilizaron películas Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech) y cassetes de exposición (Amersham Pharmacia Biotech) provistos de pantallas intensificadoras Kodak X-Omatic. La exposición se realizó en oscuridad a -80 °C. Las películas fueron reveladas con una máquina reveladora automática Curix 60 (AGFA).

La cuantificación de la intensidad de la banda se realizó con un sistema de autorradiografía electrónica Phosphorimager FLA3000 (Fujifilm). Para el análisis de la imagen se utilizó el software Image Gauge (Fujifilm).

4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE MICROORGANISMOS

4.1. Transformación de *Escherichia coli*

Las transformaciones de *E. coli* se realizaron según el protocolo descrito por Hanahan (1983).

4.2. Transformación de levadura.

Las distintas cepas de *Saccharomyces cerevisiae* fueron transformadas siguiendo el protocolo basado en la incubación con acetato de litio optimizado por Gietz y colaboradores (1995). En el caso de las transformaciones con plásmidos que complementan auxotrofías de la cepa, tras el choque térmico se sembró la mezcla de transformación en medio mínimo selectivo.

Las transformaciones integrativas para la eliminación o sustitución de secuencias en el genoma se llevaron a cabo con el sistema descrito por Güldener y colaboradores (1996). El DNA transformante se sintetizó en una reacción de PCR en la que se utilizó como molde el plásmido pUG6 (*vease* Tabla M.2) que contiene el gen de resistencia a geneticina. Los cebadores utilizados (S1 y C2) poseen en su zona 5' secuencias de 40 bases homólogas a los extremos de la secuencia diana. De esta forma, el fragmento de PCR sintetizado contiene el gen marcador flanqueado por secuencias homólogas a los extremos de la secuencia que se quiere eliminar o reemplazar. Estos extremos homólogos dirigen la integración hacia el locus deseado, y mediante recombinación homóloga producen la sustitución de la secuencia silvestre por la del gen marcador.

En las transformaciones integrativas, las células se recuperaron tras el choque térmico en medio completo YPD a 30 °C con agitación durante al menos 3 horas. Tras esta recuperación, las células se sembraron en placas de medio selectivo YPD con geneticina (100 o 200 mg/L). Los transformantes estables formadores de colonias grandes fueron seleccionados entre los transformantes abortivos formadores de microcolonias.

4.3. Eliminación del marcador de selección integrado en el genoma

Para la obtención de mutantes completos en la cepa T73, es necesaria la eliminación de, al menos, dos copias génicas (Puig, 1998). Para simplificar el proceso se utilizó el sistema diseñado por Güldener y colaboradores (1996) que permite eliminar el marcador de selección integrado en el genoma y así poder utilizar el mismo marcador en transformaciones sucesivas. En este sistema el gen marcador está flanqueado por secuencias loxP, estas secuencias son reconocidas por la recombinasa Cre del bacteriófago P1 de *Escherichia coli*, que cataliza la recombinación entre ellas y, por tanto, la eliminación del gen marcador.

Las cepas en las que se había insertado el marcador de resistencia a geneticina fueron transformadas con plásmidos que poseían la secuencia codificante de la recombinasa Cre bajo el control de un promotor inducible por galactosa. Para cepas con auxotrofia para el uracilo se utilizó el plásmido pSH47 (Güldener *et al.*, 1996, *vease* Tabla M.3) que posee el marcador *URA3* que permite la selección de las células transformadas. Posteriormente, se indujo la expresión de la recombinasa Cre en medio YPGal durante 2 horas a 30 °C con agitación y se sembraron aproximadamente 150 células por placa de YPD. Las colonias crecidas fueron replicadas en medio selectivo YPD con geneticina. Se seleccionaron las colonias que eran capaces de crecer en YPD pero no en presencia de geneticina.

La eliminación del plásmido pSH47 se realizó sembrando las cepas en SD-FOA, impidiendo el crecimiento de las células protótrofas para el uracilo.

4.4. Análisis de la eliminación o inserción de secuencias de DNA

Los transformantes estables fueron analizados mediante PCR para comprobar si había tenido lugar la inserción en el lugar correcto del genoma o la eliminación de secuencias del genoma. La PCR se hizo directamente a partir de una colonia transformante usando los cebadores detallados en la Tabla M.4. Los cebadores A (A1, A2, A3, A4) hibridan en la secuencia de interés en el genoma, de manera que la inserción o la eliminación de la secuencia de DNA se detectó por la modificación del tamaño o por la ausencia de los amplificados obtenidos a partir de ellos. Los cebadores K (K2, K3) hibridan en la secuencia del gen *KanMX4* y, junto con los cebadores A, generaron amplificados si esta secuencia había sido insertada en el genoma de la levadura. Este rastreo se utilizó para seleccionar colonias que albergaban la inserción o la eliminación correcta, seleccionándose algunas de ellas para la confirmación de su genotipo mediante Southern Blot.

5. CUANTIFICACIONES METABÓLICAS

5.1. Cuantificación de azúcares

5.1.1. Cuantificación de glucosa mediante el método enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa

La muestra a valorar se diluyó en agua destilada en un volumen final de 100 μ L, al que se le añadieron 400 μ L de la mezcla de reacción (7,8 U de glucosa oxidasa, 0,4 U de peroxidasa, 0,9 mM O-dianisidina, en tampón fosfato potásico 100 mM pH 7,0). La reacción se llevó a cabo a 30 °C durante 15 min, y fue detenida por adición de 0,5 mL de HCl 6 M. Para cada ensayo se realizó una recta patrón de glucosa de 0 a 10 μ g. La cantidad de glucosa se calculó interpolando la absorbancia a 540 nm de cada muestra en la recta patrón.

5.1.2. Cuantificación de trehalosa

Se recogieron 10 mg (peso seco) de células por centrifugación, se lavaron con agua destilada, se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -20 °C hasta su procesamiento.

Los extractos para la cuantificación de trehalosa se obtuvieron según describen Parrou y François (1997). Una vez descongeladas, las células fueron resuspendidas en 0,25 mL de Na_2CO_3 250 mM y se incubaron a 95 °C durante 4 horas. Tras este tratamiento se añadieron 0,75 mL de una mezcla de ácido acético 1 M y tampón acetato sódico 0,2 M pH 5,2 (1:4) y se centrifugaron las muestras a 12000 rpm durante 30 s. Se incubaron 150 μ l del sobrenadante con 8,4 mU de trehalasa comercial (Sigma) a 37 °C durante 12-16 horas con agitación. Se incluyeron blancos con extracto sin trehalasa comercial. Para cada ensayo, se realizó una recta patrón de trehalosa entre 0 y 20 μ g que fue procesada de la misma forma que los sobrenadantes obtenidos. Seguidamente, se hirvieron las muestras para detener la reacción, se centrifugaron y se valoró la glucosa liberada mediante el ensayo enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa. La cantidad de trehalosa intracelular se expresó en μ g de trehalosa por mg de peso seco de células.

El peso seco se obtuvo secando las células en una estufa a 100 °C o 80 °C durante 24 o 48 horas respectivamente.

5.2. Determinación de actividades trehalasa

El protocolo utilizado fue el descrito por San Miguel y Argüelles (1994) con algunas modificaciones. Este ensayo se basa en la actividad diferencial de las trehalasas de *Saccharomyces cerevisiae* en función del pH, así incubando los extractos con un tampón neutro

la actividad predominante será la actividad trehalasa neutra, mientras que en condiciones ácidas lo será la actividad trehalasa ácida.

Para la obtención del extracto celular se recogieron 70 mg de peso seco de células por centrifugación a 4 °C y se lavaron con agua destilada estéril fría. Se resuspendieron en 1 mL de tampón MES 10 mM pH 6,0 y se rompieron las células con perlas de vidrio en un homogeneizador Mini-beadbeater durante 5 períodos de 30 s a 4600 rpm intercalados con periodos de 30 s en hielo. Los extractos se centrifugaron a 13000 rpm durante 5 min a 4 °C, se trasvasaron los sobrenadantes a tubos de 1,5 mL y se centrifugaron de nuevo.

Se incubaron 50 µL de extracto celular con 200 µL de trehalosa (Sigma) 200 mM preparada en tampón MES 25 mM pH 7,1, CaCl₂ 125 µM para determinar la actividad trehalasa neutra o de trehalosa 200 mM preparada en tampón citrato sódico 0,2 M pH 4,5, EDTA 1 mM para determinar la actividad trehalasa ácida, durante 30 min a 30 °C. Para detener la reacción se hirvieron las muestras durante 4 min. La glucosa liberada por la acción de las trehalasas se determinó mediante el método enzimático glucosa oxidasa/peroxidasa y se expresó en nmoles de glucosa liberados por minuto y por mg de proteína total.

De cada muestra se hicieron 3 réplicas para cada actividad y se incluyeron controles sin trehalosa para tener en cuenta la glucosa ya presente en la muestra, y sin extracto celular para determinar si la trehalosa comercial estaba parcialmente degradada.

La proteína total fue determinada por el método descrito por Lowry y colaboradores (1951) usando el kit comercial Bio Rad Protein Assay (Bio Rad Laboratorios GmbH).

5.3. Cuantificación de glutatión

Parar la determinación de glutatión se utilizó un método colorimétrico basado en la reacción de esta molécula con el ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico (DTNB). El protocolo realizado es una modificación de los descritos originalmente por Tietze (1969) y Griffith (1980). Se recogieron 100 mg de células en diferentes etapas de deshidratación y se resuspendieron en 1 mL de HCl 8 mM y ácido 5-sulfosalicílico 1,3 % (p/v) a 4 °C. Las células se rompieron con 0,6 g de perlas de vidrio, alternando 4 veces de 1 min de agitación vigorosa con incubaciones de 1 min en hielo. Tras la rotura se mantuvieron en hielo 15 min más y finalmente se recuperó el sobrenadante mediante una centrifugación de 15 min a 13000 rpm (4 °C).

La valoración de glutatión total se realizó mezclando 200 µL de muestra con 120 µL de cóctel enzimático, preparado en el momento, que contenía 0,4 mg/mL NADP⁺ (Sigma), 0,16 mg/mL

glucosa-6-fosfato (Sigma), 3 $\mu\text{g/mL}$ de glucosa-6-fosfato deshidrogenasa (Sigma), 1 mU de glutathion reductasa (Sigma), 0,2 M MES y EDTA 2 mM disueltos en tampón fosfato sódico 0,1 M pH 6,0. Se añadieron 480 μL de DTNB 200 μM , se incubó 20 min exactos en agitación y oscuridad y se midió la absorbancia a 412 nm. Para la valoración de glutathión oxidado (GSSG), los 200 μL de muestra se incubaron previamente 1 hora con 2-vinilpiridina 1 M (Sigma) que acompleja el glutathión en su forma reducida impidiendo su reacción con el DTNB. En ambos casos, se realizaron rectas patrón de 0 a 16 μM de GSSG (Sigma) que fueron sometidas a los mismos tratamientos que las muestras. La cantidad de glutathión reducido (GSH) se calculó por diferencia entre el glutathión total y el glutathión oxidado. Los resultados se expresaron en nmoles de glutathión por mg de células.

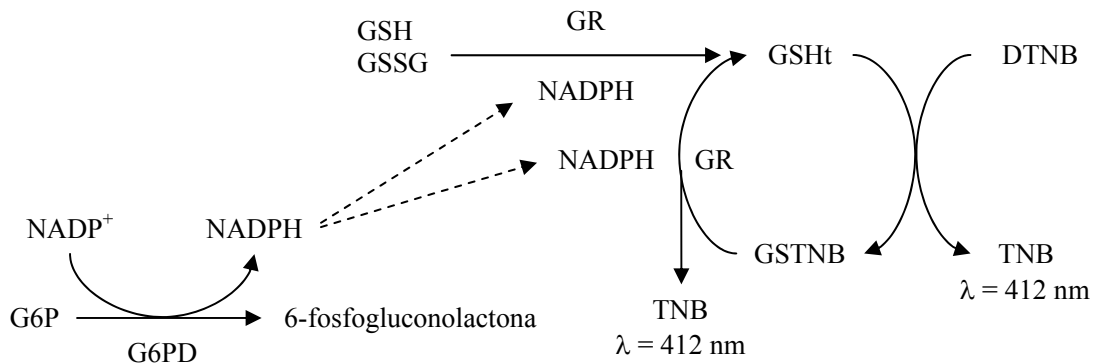


Figura M.1. Determinación colorimétrica del glutathión total mediante dos reacciones acopladas (adaptado de *GSH Assay Kit*, World Precision Instrument). GSH (glutathión reducido), GSSG (glutathión oxidado), GSHt (glutathión total), GR (glutathion reductasa), DTNB (ácido 5,5-ditiobis-2-nitrobenzoico), TNB (tinitrobenzoato), G6P (glucosa-6-fosfato), G6PD (glucosa-6-fosfato deshidrogenasa).

5.4. Determinación de la peroxidación de los lípidos

La peroxidación de los lípidos se determinó mediante el ensayo colorimétrico descrito por Buege y Aust (1978) con algunas modificaciones (Espindola *et al.*, 2003), basado en la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), producto de la rotura de los ácidos grasos poliinsaturados. A partir de 50 mg de células, se realizó el extracto en tampón fosfato sódico 50 mM pH 6,0 con ácido tricloroacético 10 % y 0,3 g de perlas de vidrio, alternando 3 veces de 1 min con agitación vigorosa con incubaciones de 1 min en hielo. Se recogió el sobrenadante centrifugando durante 10 min a 12000 rpm. Se mezclaron 300 μL de extracto con 100 μL de EDTA 0,1 M y 600 μL de ácido tiobarbitúrico 1 % (p/v) disuelto en NaOH 0,05 M.

Esta mezcla se incubó 15 min en un termobloque a 100 °C y posteriormente se dejó enfriar en hielo durante 5 min. Se centrifugó 5 min a 12000 rpm para eliminar los posibles precipitados. La reacción del ácido tiobarbitúrico con las moléculas de MDA generó especies rojas detectables a 535 nm. Los resultados se expresaron en pmoles de MDA por mg de células.

5.5. Determinación enzimática del etanol

La cuantificación de etanol en el medio se realizó de forma indirecta mediante la detección colorimétrica a 340 nm del NADH formado durante la oxidación del etanol en acetaldehído por la acción de la enzima alcohol deshidrogenasa.

El ensayo se llevo a cabo con 200 µL de medio que previamente había sido centrifugado para evitar la presencia de células. Se diluyó en 1 mL de tampón Gly/Tris (glicina 0,2 M, Tris 0,3 M, pH 9,7) y se añadió NAD⁺ 2 mM. Antes de añadir la enzima se midió la absorbancia a 340 nm y se utilizó como blanco para cada muestra. Para mediar la reacción de oxidación se añadió la enzima alcohol deshidrogenasa 20 U/mL y se incubó a T° ambiente durante 15 min y se detectó la formación de NADH en el colorímetro. La recta patrón de etanol entre 0 y 0,15 mM se procesó igual que el resto de las muestras. Las absorbancias obtenidas se interpolaron en la recta patrón y la concentración de etanol se expresó en unidades de concentración (mM).

5.6. Cuantificación de la capacidad fermentativa

La capacidad fermentativa se determinó a partir de la producción de CO₂ durante la fermentación con un aparato de Chittick (*American Association of Cereal Chemists*, 12-10) modificado. Se utilizaron botellas de 250 mL con 100 mL de medio YPGF inoculados con aproximadamente 1×10^7 células/mL. Para determinar el número exacto de células se tomó una alícuota de cada botella y se realizó un conteo en cámara cuentaglobulos Neubauer. Los cultivos se colocaron en un baño de agua a 30 °C con una agitación de 65 rpm. Cada 20 min durante 3-4 horas se tomó medida del volumen de CO₂ producido (en mL). En algunos casos, estas medidas se complementaron con la determinación de etanol en el medio (*vease* apartado 5.5). La capacidad fermentativa se expresó como el volumen de CO₂ (mL) o la concentración de etanol (mM) producidos por unidad de tiempo y por número de células.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

I

SIMULACIÓN A ESCALA DE LABORATORIO Y EN PLANTA PILOTO DE LAS CONDICIONES DE SECADO INDUSTRIAL PARA LA CEPA *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73

La producción de levaduras vínicas y su posterior deshidratación hasta obtener la levadura seca activa es un proceso estandarizado en las plantas de producción industrial pero debido a sus numerosas etapas no es un sistema de fácil simulación a nivel de laboratorio. Incluso entre las distintas plantas de producción existen variaciones en los protocolos empleados. Las diferencias empiezan por el origen de las melazas que, dependiendo de la región, puede ser de caña de azúcar o de remolacha y esto afecta notablemente a su composición (Hongisto y Laakso, 1978), incluso cuando la procedencia es la misma existen diferencias entre los distintos lotes. Durante la obtención de la biomasa cada empresa optimiza los medios y condiciones utilizadas para obtener el mayor rendimiento tanto en producto como en tiempo y costes. En la deshidratación también existen variaciones, como la adición de emulsionantes y estabilizantes (Chen y Chiger, 1985) a las levaduras antes del secado para proteger y facilitar la disgregación, el uso de diferentes instrumentos de secado, aunque el más utilizado actualmente es el secador de lecho fluidizado, y la elección de distintas temperaturas de secado. Todas estas variaciones suponen una seria dificultad a la hora de intentar desarrollar un proceso controlado similar a escala de laboratorio de forma que se puedan obtener unos datos repetitivos capaces de aportar una información extrapolable a la industria.

En este trabajo además de caracterizar la respuesta de la levadura vínica en la última etapa de la producción de LSA, la deshidratación, y debido a las dificultades para poder contrastar nuestros datos con los obtenidos en las empresas del sector, nos planteamos la comparación de la producción desarrollada en el laboratorio con procesos más cercanos a la industria como es la producción en planta piloto. Los experimentos en planta piloto fueron posibles gracias a la colaboración de la empresa Lallemand S.A.S. y a la estancia realizada en sus instalaciones en el *Laboratory of Research and Development* en Toulouse (Francia).

En nuestro laboratorio se ha puesto a punto un sistema de simulación del proceso de propagación de la biomasa (Pérez-Torrado, 2004; Pérez-Torrado *et al.*, 2005) usando medio

melaza de remolacha y simplificando la secuencia de fermentaciones, reduciéndolas a dos, una etapa de *batch* y una etapa de *fed-batch*. Este diseño simplificado ha permitido a nuestro grupo de investigación poder abordar el estudio molecular de estas dos fases. Partiendo de esta biomasa se realizaron las deshidrataciones a escala de laboratorio en una estufa de convección a 35 °C. La viabilidad y vitalidad del producto final está ligado tanto al secado como a las condiciones de cultivo, de las que depende que las células hayan acumulado mayor o menor cantidad de metabolitos de reserva y de protección y el estado de sus sistemas de respuesta a estrés. Por esta razón, decidimos comparar con las condiciones de planta piloto no solo el comportamiento de la levadura vínica T73 durante la deshidratación sino también los parámetros con los que se llevó a cabo la producción de la biomasa y el rendimiento obtenido.

1.1. Condiciones de obtención de biomasa.

El proceso de propagación de la biomasa a partir de la levadura vínica T73 a escala de planta piloto se llevó a cabo en un biorreactor BIOFLO 4500 con capacidad para 30 L tal y como se realiza en el *Laboratory of Research and Development* de la empresa Lallemand S.A.S. Se dividió en tres etapas de 24 horas de duración cada una. Primero, se realizó un preinóculo en matraz, en 50 mL del mismo medio rico empleado para la etapa de *batch* y fue incubado a 30 °C con agitación. A partir de este preinóculo se inoculó el biorreactor y se llevó a cabo la etapa de cultivo en *batch*. En esta modalidad de cultivo, el medio utilizado contiene todos los nutrientes esenciales en la concentración necesaria para alcanzar el rendimiento deseado y el final del proceso está determinado por el agotamiento de estos. El contenido inicial de azúcar fue 80 g/L de forma que el metabolismo de las levaduras fue principalmente fermentativo debido al efecto *Crabtree*, caracterizado por la represión de la síntesis de las enzimas mitocondriales del ciclo de Krebs y de los constituyentes de la cadena respiratoria (Aranda *et al.*, 2005). El seguimiento del crecimiento celular se realizó mediante la medida de la capacitancia (medida de la carga eléctrica almacenada por un capacitor) (Figura 1.1, panel A) que se basa en la propiedad de las células intactas para actuar como pequeños capacitores al ser sometidos a un campo eléctrico (Gencer y Mutharasan, 1979; Austin *et al.*, 1994). Otro parámetro usado como indicativo del crecimiento celular fue el oxígeno disuelto en el medio de cultivo, cuando las células están creciendo con un metabolismo activo a pesar de ser un crecimiento fermentativo parte del oxígeno es consumido vía oxidativa debido a la necesidad de sintetizar intermediarios dependientes de esta ruta. Además, la presencia de un mínimo de oxígeno disuelto durante la etapa de *batch* en procesos donde las levaduras respiran el etanol producido, como en el caso de la simulación a escala de laboratorio, se hace indispensable. La regulación del contenido de oxígeno en el medio depende del flujo de aire introducido en el fermentador y la velocidad de

agitación que facilita la rotura de las burbujas de aire y su disolución. Este crecimiento estuvo dividido en tres fases bien definidas:

- *Fase de “lag” o latencia:* el número de células permanece constante. Durante esta fase, el metabolismo de las células se ajusta a las condiciones del nuevo cultivo. En la Figura 1.1 (panel A) podemos observar como abarcó aproximadamente las seis primeras horas, durante este periodo la capacitancia se mantuvo lineal y el contenido en oxígeno disuelto (OD) permaneció próximo al 100 %.

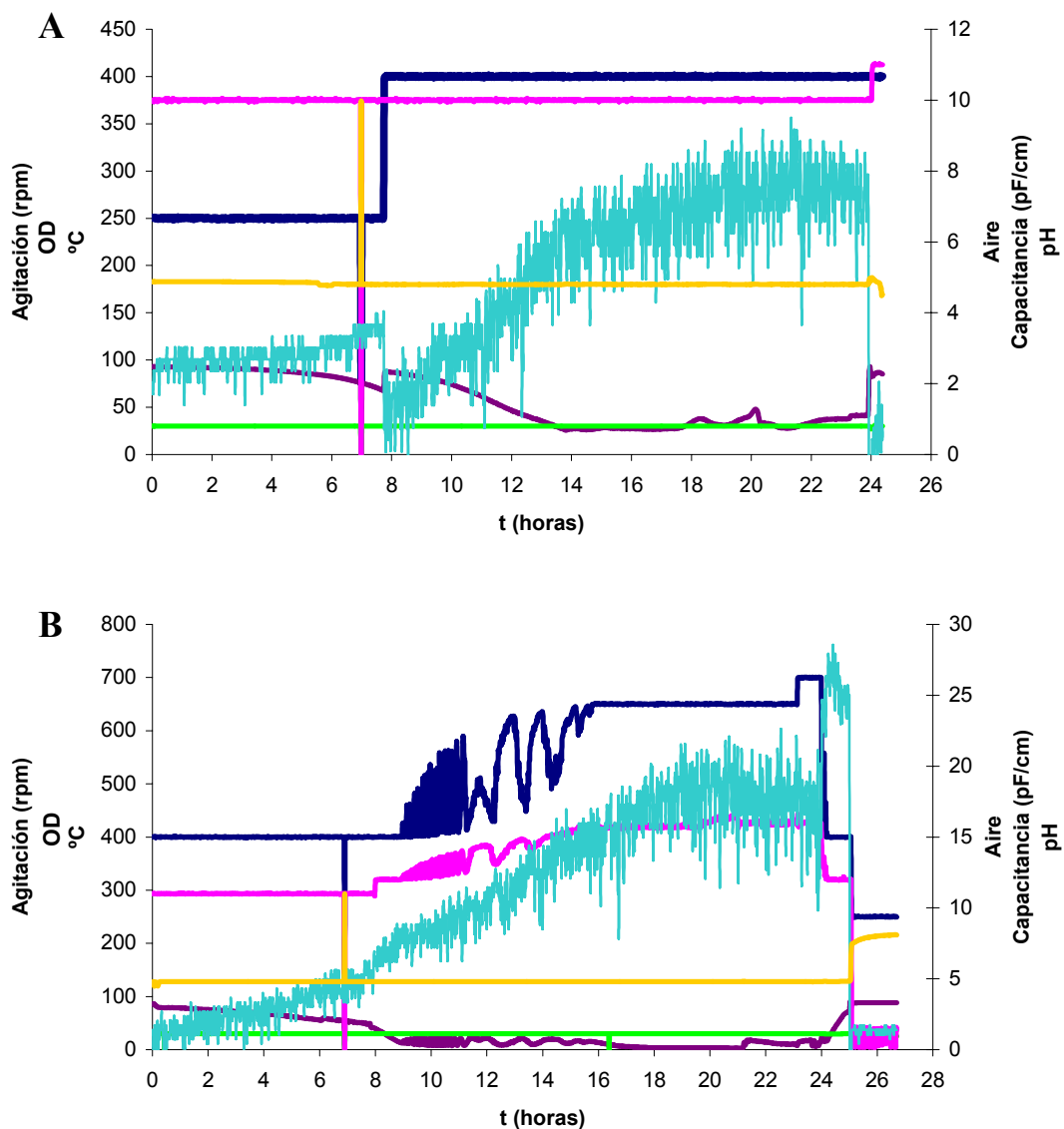


Figura 1.1. Monitorización de los parámetros físico-químicos durante el proceso de propagación de la biomasa para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73 a escala de planta piloto. Fase de *batch* (panel A) y fase de *fed-batch* (panel B). Parámetros: agitación en rpm (■), oxígeno disuelto (OD) en % de saturación (■), temperatura (■), aireación en VVM (volumen de aire por volumen de medio por minuto) (■), capacitancia en pF/cm (■) y pH (■).

- *Fase exponencial*: el balance metabólico es óptimo y las células se multiplican exponencialmente. Esta fase estuvo marcada por el incremento exponencial de la capacitancia y la disminución del contenido en oxígeno disuelto, abarcando las siguientes 7 horas del proceso.
- *Fase estacionaria*: la velocidad de crecimiento y de autólisis son aproximadamente iguales, no hay crecimiento neto de la población, como se puede observar por la estabilización de los valores de capacitancia y del oxígeno disuelto. La autólisis celular es el resultado del agotamiento de los nutrientes o de la acumulación de metabolitos tóxicos (Boulton *et al.*, 1996).

Tras la etapa de *batch* y utilizando como inóculo parte de la biomasa obtenida, tuvo lugar la etapa de cultivo en *fed-batch*. En esta, el cultivo de levadura es alimentado progresivamente con melaza fresca obtenida a partir de una mezcla de melaza de remolacha y caña de azúcar (300 g de azúcar/L), siguiendo una rampa de velocidad de alimentación que permite que el metabolismo celular sea oxidativo. De esta forma, se consiguen elevados rendimientos de biomasa, alcanzándose $(0,47 \pm 0,01)$ g de biomasa/g de azúcar. En la Figura 1.1 (panel B) se puede observar como se diferencian dos fases. La primera de ellas abarcó las primeras 18 horas del proceso y es un crecimiento exponencial que se corresponde con un aumento de la velocidad de alimentación también exponencial y con una disminución del oxígeno disuelto hasta el límite mínimo fijado. Para evitar el consumo total del oxígeno necesario para la utilización de la glucosa por la vía oxidativa, la agitación va aumentando a medida que aumenta el número de células. En la segunda fase, la velocidad de alimentación se mantiene en el valor máximo posible sin que se produzca fermentación, de forma que la velocidad de crecimiento es constante y esto se refleja en una agitación y cantidad de oxígeno disuelto también constantes.

Una vez finalizada la etapa de *fed-batch*, el cultivo se mantuvo sin alimentar entre 1 y 2 horas (etapa de maduración) para permitir que el azúcar residual presente en el cultivo fuera totalmente consumido y las células entraran en fase estacionaria.

La simulación de la fermentación industrial a escala de laboratorio fue realizada en un biorreactor BIOFLO III de 5,0 L de capacidad. Se dividió en las tres mismas etapas que las fermentaciones de planta piloto pero la duración de cada una de ellas fue variable. La fase de *batch* se realizó en medio melaza de remolacha conteniendo 61 g/L de sacarosa iniciales. Tras la inoculación se produjo un periodo de latencia de varias horas, seguidamente comenzó el crecimiento exponencial y por último, al agotarse los azúcares fermentables, tuvo lugar el cambio diáuxico (Figura 1.2, panel A). Al igual que en la producción en planta piloto inicialmente fue un crecimiento fermentativo debido al efecto *Crabtree* producido por la

elevada concentración de azúcar. En esta modalidad de cultivo, tras el consumo de las fuentes de carbono fermentables a las 17-18 horas, se deja que las células respiren el etanol producido, cambio metabólico que viene marcado por un aumento del consumo de oxígeno y por lo tanto un aumento fuerte de la agitación para mantener el oxígeno disuelto en el límite mínimo fijado (25 %) (Figura 1.2, panel B). A diferencia de lo observado en los experimentos en la planta piloto, el pH no se mantiene constante a 4,5 durante la fase de *batch*, se ajusta inicialmente a este valor pero durante el cultivo se deja variar libremente. La variación de pH durante la fase de *batch* permite, indirectamente, hacer un seguimiento de los cambios metabólicos que tienen lugar durante esta etapa de crecimiento. Se puede observar que durante la fermentación de los azúcares, el pH disminuye hasta valores próximos a 4,1 debido a la producción de CO₂ que se disuelve en el medio y lo acidifica. Una vez agotada la principal fuente de carbono fermentable, la levadura comienza a consumir los productos de la fermentación, en primer lugar el ácido acético aumentando el pH por encima de 4,5 y, posteriormente, el consumo del etanol por la vía oxidativa que de nuevo produce CO₂ disminuyendo el pH. La transición de la fase de *batch* a *fed-batch* se produjo a las 40-45 horas de cultivo y estuvo marcada por el aumento rápido del contenido en oxígeno disuelto hasta alcanzar cerca del 100 % de saturación simultáneo a la caída de la agitación. Estos cambios rápidos de los parámetros del cultivo indican que el etanol se ha agotado y las células han frenado su metabolismo y por tanto disminuido su requerimiento de oxígeno (Figura 1.2, paneles A y B).

De forma similar a lo realizado en planta piloto, en la fase de *fed-batch* en condiciones de laboratorio se realizó una rampa de velocidad de alimentación con melaza (100 g de azúcar/L) que asegurara el crecimiento exponencial del cultivo y el metabolismo oxidativo con el fin de obtener el mayor rendimiento en biomasa posible y evitar la formación de etanol. La rampa de alimentación depende del requerimiento de oxígeno de las células. A medida que la biomasa va aumentando, el consumo de oxígeno es mayor indicando que es posible aumentar el flujo de entrada de glucosa al cultivo, de esta manera la velocidad de alimentación se va incrementando poco a poco, evitando un exceso de azúcar que de lugar a un metabolismo fermentativo (detectado porque el consumo de oxígeno disminuye notablemente acompañado de la caída de la agitación), hasta alcanzar la máxima velocidad de crecimiento oxidativo. En general, se comenzó a una velocidad próxima a los 100 mg sacarosa/min y se fue incrementando hasta 180 mg sacarosa/min. La fase de cultivo en *fed-batch* abarcó aproximadamente 67 horas. El rendimiento obtenido en estas condiciones fue de $(0,18 \pm 0,017)$ g biomasa/g azúcar (Pérez-Torrado, 2004; Pérez-Torrado *et al.*, 2005). A lo largo de esta etapa se produce gran cantidad de CO₂ por lo que el pH se mantuvo constante a 4,5 mediante la adición controlada de NaOH 1 M y H₃PO₃ 42 % (v/v) y así evitar el posible efecto nocivo de esta acidificación continuada del medio (Figura 1.2, paneles A y B).

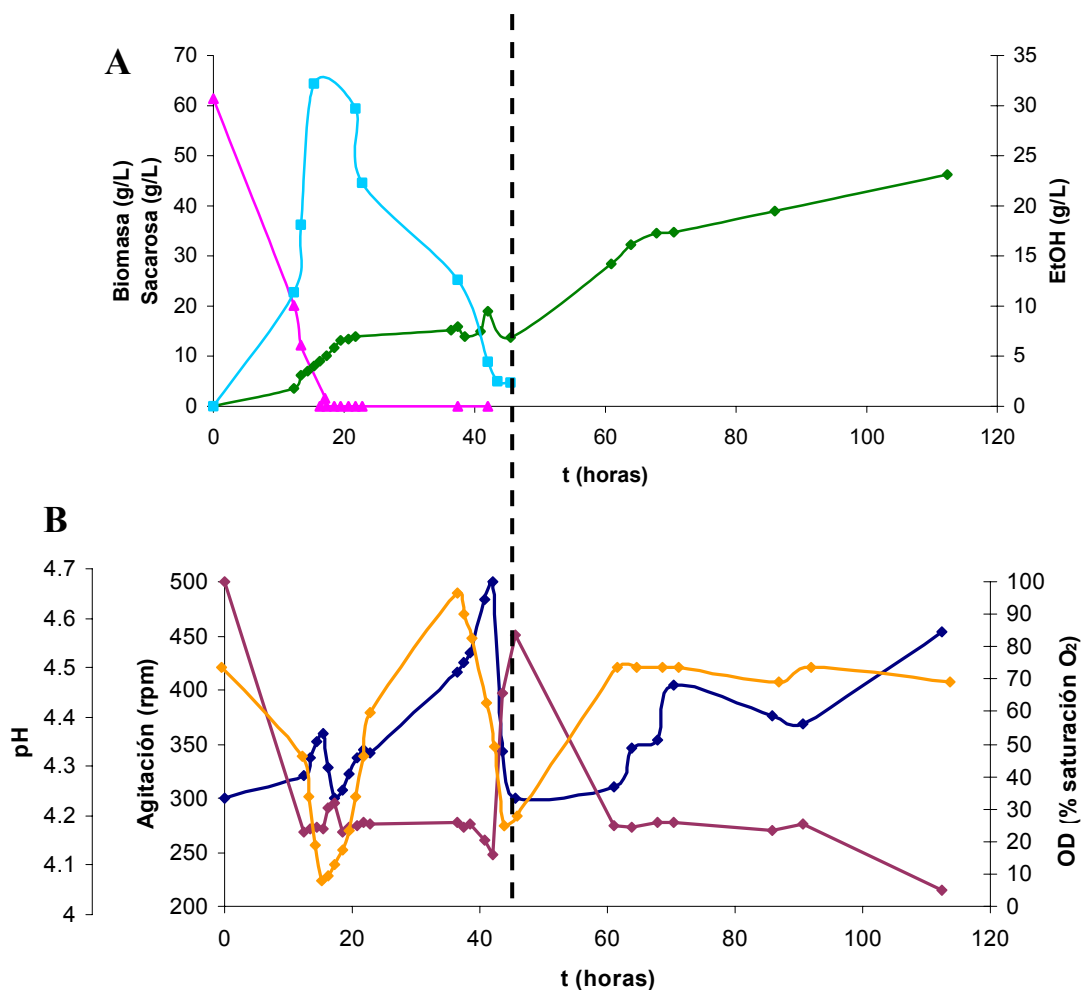


Figura 1.2. Seguimiento de algunos parámetros del proceso de propagación de la biomasa para la cepa *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin T73 a escala de laboratorio. Panel A: biomasa en g/L (◆), sacarosa en g/L (▲), etanol (EtOH) en g/L (■). Panel B: agitación en rpm (◆), oxígeno disuelto (OD) en % de saturación (◆) y pH (◆).

1.2. Condiciones de deshidratación.

Una vez obtenida la biomasa se procedió a su deshidratación hasta obtener un producto final con una humedad residual por debajo del 8 %. La biomasa obtenida en la planta piloto que alcanzó un volumen final de entre 16 y 16,5 L, fue concentrada en una centrífuga Westfalia Separador AG que separa la levadura del medio, resultando una crema de levadura 3 veces más concentrada y libre de melaza. A la crema obtenida se le añadió una mezcla de monoestearato de sorbitán y NaOH, y fue filtrada para eliminar el exceso de agua, reduciéndose un 25 % - 30 % su contenido en humedad (Figura 1.3, panel B). Posteriormente, se realizó la extrusión dividiendo la masa en finos hilos que permiten un rápido y efectivo secado. Durante este

proceso no hubo pérdida de agua, de forma que el proceso de secado con aire caliente fue llevado a cabo con una biomasa de levadura que contenía un 70 % de humedad residual. El secado de tipo lecho fluidizado se hizo a dos temperaturas diferentes, 35 °C y 41 °C, que son una práctica habitual en la producción de LSA en la industria. A los 8 minutos de secado, en ambas condiciones la pérdida de agua fue aproximadamente del 25 % respecto del producto filtrado. Tras 18 minutos, la humedad residual del producto secado a 41 °C estaba por debajo del 8 % mientras que a 35 °C aun quedaba un 13 %. Tras comprobar que la humedad residual de la masa estaba por debajo del 8 % se detuvo el secado, de forma que los productos finales presentaron una humedad residual de 4,77 % \pm 0,26 % en el secado a 41 °C y 5,51 % \pm 0,38 % en el secado a 35 °C (Figura 1.3, panel B).

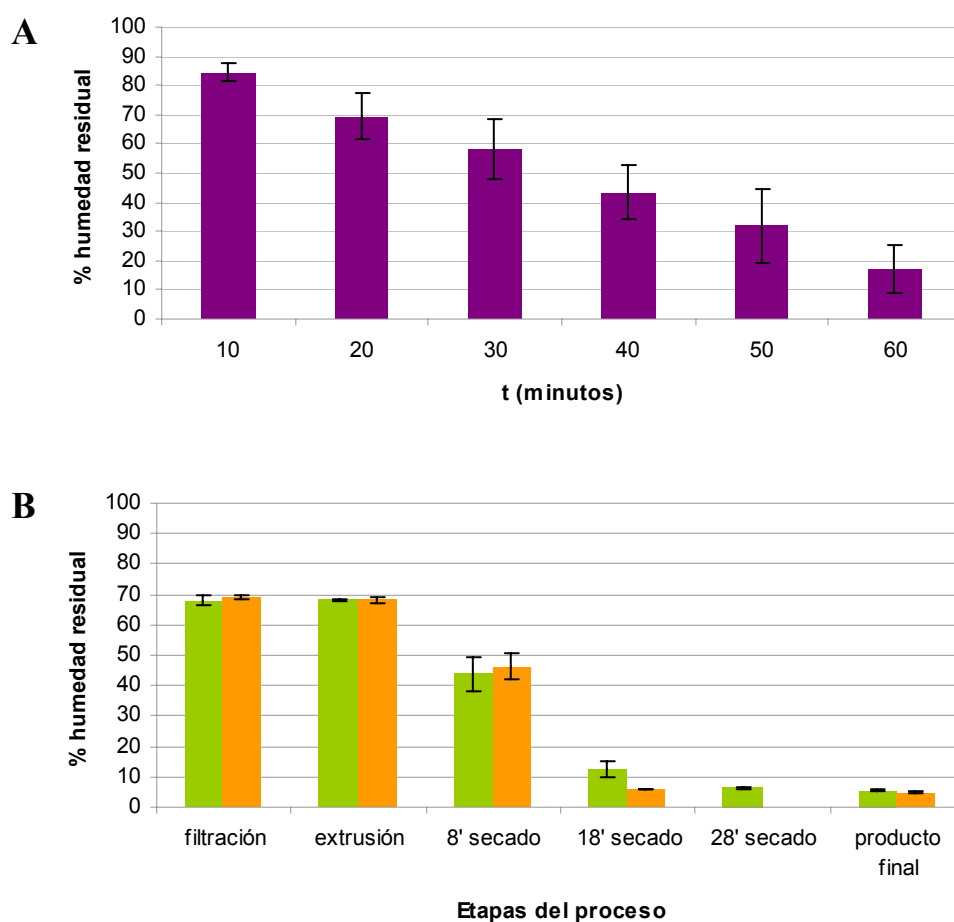


Figura 1.3. Pérdida de humedad durante la deshidratación. El secado a escala de laboratorio (panel A) se realizó en una estufa de convección a 35 °C, se tomaron muestras a diferentes tiempos y se determinó el % de humedad residual en función de la pérdida de peso respecto de la crema sin secar. Las medias corresponden a tres deshidrataciones independientes a partir de producciones de biomasa independientes. En la planta piloto (panel B), la deshidratación se dividió en tres etapas, filtración, extrusión y secado, este último se realizó a dos temperaturas diferentes, 35 °C (■) y 41 °C (■). A 41 °C el secado finalizó tras 18 minutos. Las medias corresponden a cuatro deshidrataciones independientes para cada temperatura a partir de dos producciones de biomasa independientes.

En la deshidratación realizada en el laboratorio, la biomasa fue centrifugada y lavada repetidas veces hasta eliminar los restos de melaza. El sedimento de células obtenido fue extendido en una capa fina con la intención de que el secado fuera lo más homogéneo posible. El secado se realizó en una estufa de convección de laboratorio a 35 °C. Se ha considerado como crema el sedimento obtenido tras la centrifugación. Una vez introducido en la estufa se extrajeron muestras a diferentes tiempos durante una hora y el porcentaje de humedad residual se calculó en función del peso perdido. Como producto final se tomaron las células tras 24 horas de secado, donde el análisis de múltiples curvas de secado aseguró que ya no había variación de peso, pudiéndolas considerar prácticamente secas. La pérdida de agua durante este secado fue más gradual y lenta que en el secado realizado en la planta piloto, de manera que la humedad residual disminuyó entre 12 % - 15 % cada 10 minutos de secado. La biomasa alcanzó el 13 % de humedad residual tras 60 minutos de secado mientras que en la planta piloto fue en la mitad de tiempo (Figura 1.3, panel A).

1.3. Comparación de las propiedades de la LSA obtenida a escala de laboratorio y en planta piloto.

Como se puede observar el proceso de obtención de levadura seca activa en el laboratorio, principalmente el protocolo de deshidratación, presenta diferencias con respecto al realizado en la planta piloto, pero a su vez el proceso seguido en la planta piloto es una simplificación del proceso desarrollado a nivel de planta industrial. Con el fin de comprobar si el producto final obtenido a ambas escalas era similar entre si y a la LSA comercializada, se analizó el contenido en trehalosa y la capacidad fermentativa y se comparó con lotes de la cepa T73 de producción industrial facilitados por la empresa Lallemand S.A.S. Dos de los lotes industriales analizados procedían de la misma planta de producción en Viena (Austria), V1 y V2, mientras que el otro había sido producido en otra planta industrial en Grenaa (Dinamarca), G.

Como se comenta en la Introducción, la trehalosa es un metabolito de respuesta a estrés capaz de proteger las estructuras celulares durante la deshidratación. Comienza a acumularse en grandes cantidades tras el cambio diáuxico por lo que es altamente recomendable un etapa de maduración tras la etapa de *fed-batch* para asegurar la entrada en fase estacionaria de las células. Unos niveles elevados de trehalosa en la biomasa final y en el producto seco suelen asociarse a una elevada viabilidad y vitalidad celular (Degre, 1993). La valoración de la cantidad de trehalosa en las células a lo largo de la deshidratación muestra como al final de la producción de biomasa a escala de laboratorio (Figura 1.4, crema) se alcanzan niveles elevados de trehalosa ((225 ± 38) µg trehalosa/mg células) similares a los obtenidos en la planta piloto ((181 ± 17) µg trehalosa/mg células). Durante los primeros 20 minutos de secado en estufa de convección a

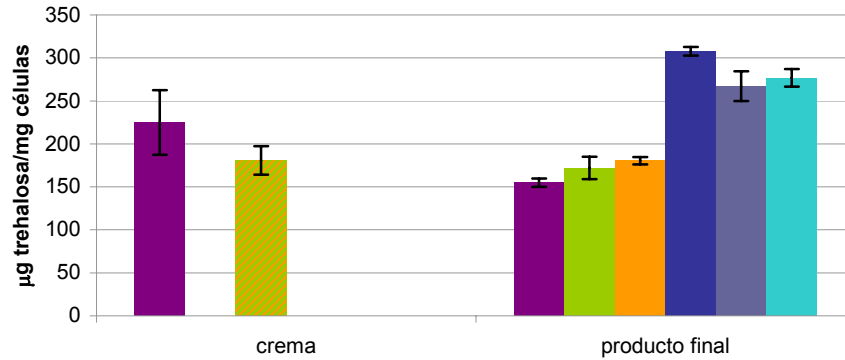


Figura 1.4. Niveles de trehalosa intracelular presentes en las cremas y en la levadura deshidratada. Comparación entre el proceso a escala de laboratorio (■), a escala de planta piloto (crema ■, secado a 35 °C ■ y 41 °C ■) y los lotes industriales (V1 ■, V2 ■, G ■). Las medias han sido calculadas como mínimo con los valores de tres deshidrataciones independientes a partir de biomasa obtenida al menos en dos producciones independientes, excepto para los lotes industriales donde la barra de error corresponde a la desviación estándar entre réplicas de la misma muestra.

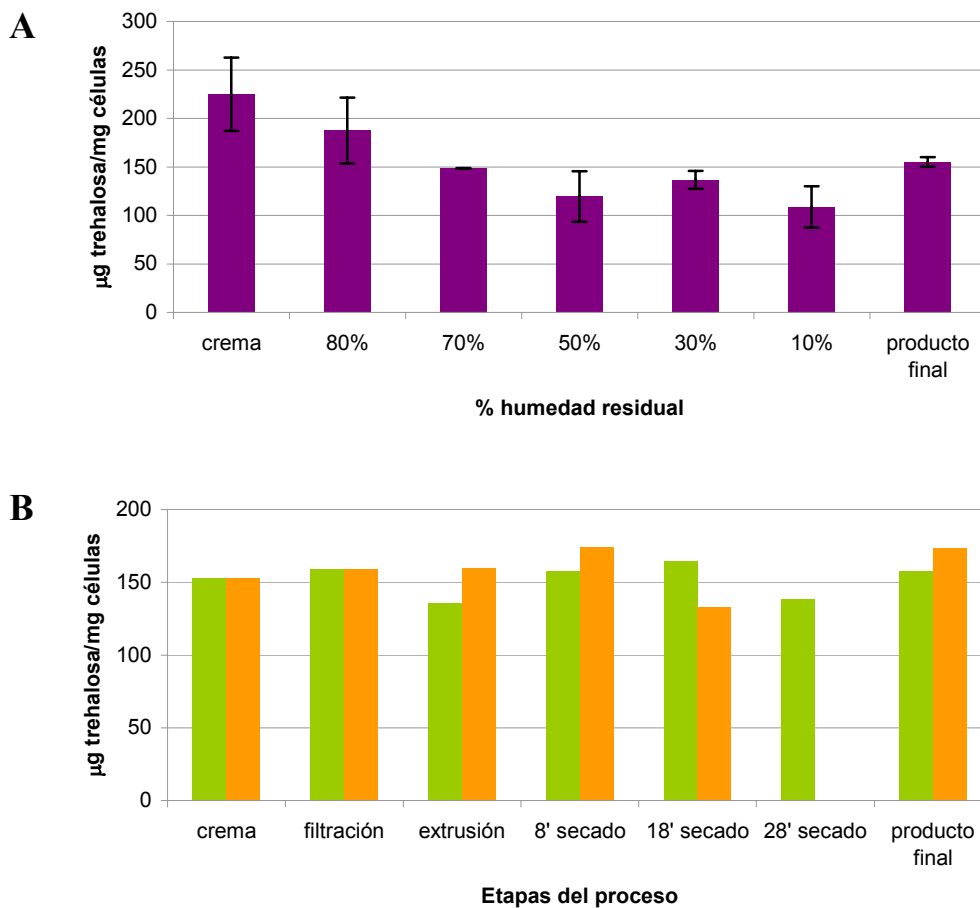


Figura 1.5. Seguimiento de los niveles de trehalosa intracelular durante la deshidratación a escala de laboratorio a 35 °C (panel A) y en planta piloto (panel B) a 35 °C (■) y a 41 °C (■). A 41 °C el secado finalizó tras 18 minutos. Las medias del panel A corresponden a tres deshidrataciones independientes a partir de producciones de biomasa independientes. En el panel B se muestra un experimento representativo.

35 °C (condiciones de laboratorio, Figura 1.5 panel A) hubo una movilización de este metabolito de hasta el 31 %, mientras que durante la deshidratación a escala de planta piloto no se produjo variaciones significativas en los niveles de trehalosa en ninguna de las dos temperaturas ensayadas (Figura 1.5, panel B). Los tres lotes industriales analizados presentaron niveles mayores de este disacárido que los productos secos obtenidos en el laboratorio y en la planta piloto, con incrementos que oscilaron entre 113 μg trehalosa/mg células y 153 μg trehalosa/mg células (Figura 1.4).

Uno de los aspectos más importantes en la producción de levadura seca activa es obtener un producto que mantenga una elevada capacidad de fermentar los azúcares del mosto y tenga una fase de latencia corta tras la rehidratación. El análisis de la capacidad fermentativa durante las primeras horas de los diferentes productos finales tras ser rehidratados (Figura 1.6), mostró que las levaduras secas procedentes de la planta piloto poseían un comportamiento fermentativo similar a los lotes industriales alcanzando una velocidad de 0,10 – 0,12 $\text{mL CO}_2/10^7$ células/min a los 240 minutos de ensayo, incluso ligeramente mayor para las células deshidratadas a 41 °C (0,13 $\text{mL CO}_2/10^7$ células/min). A su vez, los lotes industriales entre si también mostraron pequeñas diferencias, el lote G procedente de una planta industrial diferente a V1 y V2 produjo niveles más bajos de CO_2 . La levadura seca obtenida a escala de laboratorio fue la que presentó menor capacidad fermentativa con una velocidad de producción de CO_2 de 0,07 $\text{mL}/10^7$ células/min.

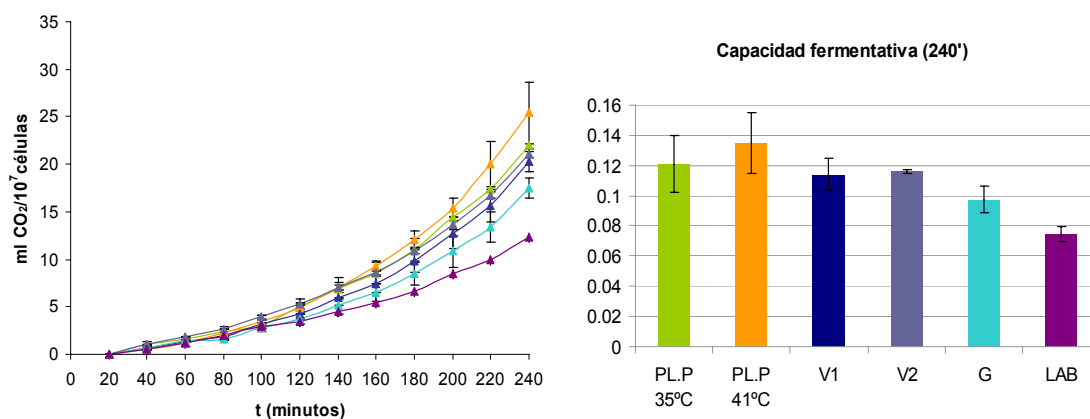


Figura 1.6. Análisis de la capacidad fermentativa de la levadura seca obtenida a escala de laboratorio (LAB) y en planta piloto (PL.P) y comparación con los lotes industriales (V1, V2 y G). Las células fueron rehidratadas en agua a 37 °C durante 20 min y posteriormente inoculadas en medio YPGF (10 % fructosa y 10 % glucosa). Se siguió la producción de CO_2 durante 240 minutos y la capacidad fermentativa se expresó como mL de CO_2 producido por número de células y por unidad de tiempo ($\text{mL CO}_2/10^7$ células/min). Se muestran las medias de dos experimentos independientes a partir de LSA obtenida de forma independiente, excepto para los lotes industriales que corresponden a dos réplicas de experimentos realizados con la misma LSA.

1.4. Discusión.

El primer objetivo de este trabajo fue desarrollar un protocolo de deshidratación de levadura a escala de laboratorio que nos permitiera abordar el estudio molecular de este proceso, como anteriormente se había realizado en nuestro laboratorio para la etapa de propagación de la biomasa (Pérez-Torrado, 2004). El protocolo diseñado es una simplificación del proceso industrial basado en el instrumental accesible para un laboratorio y en la escasa información de la que disponíamos al inicio de estos estudios, ya que existen pocas publicaciones acerca de la obtención de levadura seca activa alguna de ellas bastante reciente (Chen y Chiger, 1985; Degre, 1993; González *et al.*, 2005). La mayoría de los trabajos publicados sobre producción industrial se refieren a levaduras panaderas que normalmente se comercializan en forma de levadura prensada húmeda, además entre los estudios realizados sobre deshidratación no existe un protocolo consenso (Eleutherio *et al.*, 1997; Poirier *et al.*, 1999; Cerrutti *et al.*, 2000; Singh *et al.*, 2005), a lo que se suma la elevada dificultad de acceder a la información del sector industrial. Por estas razones nos pareció imprescindible contrastar el proceso y el producto seco obtenido en la simulación a escala de laboratorio con la producción y deshidratación en planta piloto que es un paso previo generalmente utilizado por las empresas para testar los productos que luego generaran a nivel industrial.

La propagación de la biomasa a escala de laboratorio es bastante similar a la desarrollada en planta piloto, ambas han sido reducidas a los dos tipos básicos de cultivo, *batch* y *fed-batch*. El crecimiento celular sigue el mismo patrón, con una fase de latencia, una fase de crecimiento exponencial y una fase estacionaria en el cultivo en *batch*, y un crecimiento oxidativo exponencial durante la fase de *fed-batch* hasta alcanzar el nivel máximo de alimentación sin que se produzca fermentación. El rendimiento en biomasa alcanzado al final del proceso de producción en planta piloto es similar a los alcanzados en industria (entre 0,4-0,5 g biomasa/g azúcar, Jorgensen *et al.*, 2002) pero casi tres veces mayor que el obtenido en el laboratorio. Esta diferencia de rendimiento puede deberse a cada uno de los distintos factores que varían de un protocolo a otro o una mezcla de ellos. Uno de los factores a tener en cuenta es la presencia habitual de inhibidores del crecimiento en la melaza, aspecto que las industrias solventan normalmente mezclando diferentes lotes con el fin de minimizar dicho efecto. El uso de un solo lote de melaza en la producción a escala de laboratorio puede estar condicionado a la presencia de inhibidores que estén limitando el crecimiento como han demostrado trabajos previos desarrollados en nuestro laboratorio (Pérez-Torrado, 2004). En cambio, en la planta piloto durante el crecimiento en *batch* se utilizó un medio rico que contiene melaza diluida y azúcar añadido y durante la fase de *fed-batch* se alimentó con una mezcla de dos lotes de melaza, lo que podría estar diluyendo la posible toxicidad presente en algunos de ellos. Otra diferencia

relevante es que en la planta piloto el cultivo en *batch* abarcó 24 horas y solo una pequeña parte de la biomasa obtenida fue diluida y utilizada como inóculo del *fed-batch*. En cambio en la simulación en laboratorio, la fase de *batch* duró casi el doble de tiempo para asegurar la ausencia total de etanol y la alimentación fue añadiéndose directamente a la totalidad del cultivo obtenido. Como se observa en la Figura 1.2 (panel A), el consumo total del etanol no se lleva a cabo hasta aproximadamente las 45 horas, lo que indica que las células producidas en la planta piloto deben estar aun en fase postdiáuxica cuando se da por finalizado el crecimiento en *batch* mientras que, las células cultivadas a escala de laboratorio se encuentran en fase estacionaria estricta. En estas condiciones, la elevada concentración de células y su estado en fase estacionaria también pueden limitar el crecimiento del cultivo durante la fase de alimentación. Ashrafi y colaboradores (1999) mostraron que células procedentes de fase estacionaria presentaban una vida media replicativa menor que células que no habían atravesado esta fase. Por último, en la planta piloto al igual que en las plantas industriales el sistema de alimentación está totalmente monitorizado y la rampa de alimentación está cuidadosamente diseñada y programada para obtener el máximo rendimiento en biomasa en el mínimo tiempo posible además de ser un proceso estandarizado y rutinario. En cambio en la simulación a escala de laboratorio, la rampa de alimentación se realizó de forma manual en función del comportamiento del cultivo.

El protocolo de deshidratación desarrollado en el laboratorio difiere en gran medida del realizado en la planta piloto. En esta última, parte del contenido en agua es eliminada en las etapas de filtración y extrusión, de forma que los filamentos de levadura introducidos en el deshidratador contienen un 70 % de humedad residual, mientras que en el laboratorio estas dos etapas se han reducido a una simple centrifugación. El deshidratador de tipo lecho fluidizado usado en la planta piloto inyecta aire inicialmente a elevadas temperaturas (60 °C) que atraviesa la masa de filamentos y va disminuyendo de temperatura a medida que la masa alcanza la temperatura fijada, en nuestro caso 35 °C y 41 °C. Este sistema asegura un secado rápido y homogéneo de la biomasa. Varios estudios asocian una mayor viabilidad a una cinética gradual de deshidratación donde el flujo de pérdida de agua a través de la membrana es lento y homogéneo (Gervais *et al.*, 1992; Gervais y Marechal, 1994). En la simulación a escala de laboratorio, la estufa de convección genera corrientes de aire pero a una temperatura constante (35 °C) y no atraviesa la masa sino que la seca en superficie, lo que produce una pérdida de agua más lenta y gradual, esto que en principio debería ser menos agresivo para las células posiblemente no lo es porque el secado resulta menos homogéneo.

A pesar de las diferencias existentes entre los procesos de producción y deshidratación a ambas escalas, los niveles de trehalosa presentes en la crema y en el producto final son comparables y

están de acuerdo con el rango descrito en la literatura para las levaduras vínicas, entre el 12 % y el 20 % del peso de la levadura (Degre, 1993). La pérdida lenta de agua en la estufa de convección permite la movilización de parte de la trehalosa durante los primeros 20 minutos, cuando la célula aun tiene humedad suficiente para mantener un metabolismo relativamente activo y podría usarla como fuente de carbono (Degre, 1993; Sillje *et al.*, 1999). Esa movilización no se observa durante el proceso de deshidratación en planta piloto, probablemente debido a la rapidez con que las células ven reducido su contenido en agua. El contenido en trehalosa es considerado uno de los factores más importantes implicados en la resistencia de las levaduras a la deshidratación y a la posterior rehidratación (Hottiger *et al.*, 1987a; Leslie *et al.*, 1994), debido a su capacidad de interaccionar con membranas y proteínas reemplazando a las moléculas de agua (Crowe *et al.*, 1992) y a su capacidad de formar cristales (Crowe *et al.*, 1998; Schebor *et al.*, 2000). En función de los niveles de trehalosa parece que el producto final obtenido en ambas simulaciones es similar pero al analizar la producción de CO₂ de la biomasa rehidratada se observa que la levadura seca producida en el laboratorio tiene alrededor de un 30 % – 50 % menos de capacidad fermentativa. Un dato llamativo es el observado en los lotes industriales que acumulan grandes cantidades de trehalosa, considerablemente superiores al resto, pero presentan la misma capacidad fermentativa que el producto final obtenido en la planta piloto. Estos datos indican que la diferencia en la capacidad fermentativa entre la levadura seca producida en el laboratorio y la producida en la planta piloto no depende de la cantidad de trehalosa acumulada, al menos cuando se trata de niveles tan elevados como los que presentan estas células. Existen en la bibliografía ejemplos de condiciones de estrés donde no se observa correlación entre mayor acumulación de este disacárido y mejor adaptación (Lewis *et al.*, 1997; Pedreño *et al.*, 2002), concretamente en deshidratación, estudios recientes con un mutante *tps1* incapaz de sintetizar trehalosa indican que otras adaptaciones pueden ser suficientes para aportar tolerancia a este proceso (Ratnakumar y Tunnacliffé, 2006).

Las variaciones en la capacidad fermentativa pueden estar asociadas a las diferencias en las cinéticas de secado de acuerdo con lo mencionado anteriormente. Otro de los factores que afecta a la capacidad fermentativa es la velocidad específica de crecimiento durante el *fed-batch* (van Hoek *et al.*, 2000), existiendo una fuerte correlación positiva entre ellas. Según los datos de rendimiento obtenidos y el tiempo de alimentación, cabe esperar que la velocidad específica de alimentación haya sido menor en la simulación a escala de laboratorio que en la planta piloto. Como se comentará con mayor profundidad en los siguientes capítulos, también podría deberse a una mayor acumulación de otras moléculas protectoras o de reserva, o a una mejor respuesta a estrés. Incluso podría estar relacionada con la adición de emulsionantes y/o estabilizantes a las levaduras antes de su deshidratación, práctica habitual en la industria y en la planta piloto. En

nuestro caso durante la producción de LSA en la planta piloto se añadió monoestearato de sorbitán que puede reducir la pérdida de contenido celular sufrido durante la rehidratación y por tanto la mortalidad celular (Chen y Chiger, 1985).

Este análisis previo de los procesos de simulación de producción de LSA y su comparación con lotes procedentes de la industria indican que las diferencias existentes entre los tres protocolos necesariamente van a verse reflejadas en el estado metabólico del producto final. Sin embargo, la complejidad de este proceso y sus múltiples etapas hacen necesario una simplificación a la hora de ser simulado tanto a escala de laboratorio como en planta piloto.

II

CARACTERIZACIÓN DE LA RESPUESTA A ESTRÉS DURANTE LA DESHIDRATACIÓN EN LA LEVADURA VÍNICA T73

Durante la producción de LSA, la levadura está sometida a múltiples cambios en su ambiente, como cambios osmóticos al pasar del precultivo a la melaza fresca en el inicio de la producción o durante la deshidratación, variación en la disponibilidad de nutrientes, presencia de productos tóxicos como el etanol, el CO₂ y el acetaldehído, estrés térmico durante el secado, etc. De la capacidad de la levadura para percibir estos cambios y responder a ellos va a depender el estado fisiológico del producto final y por tanto su eficiencia para llevar a cabo la vinificación (Ivorra *et al.*, 1999). El estudio a nivel molecular de la respuesta a estrés aporta información acerca del estado fisiológico de la levadura. Durante el proceso de producción de LSA estos conocimientos pueden ayudar a comprender mejor qué tipo de estrés está percibiendo la célula de forma más relevante, cuáles son los puntos clave del proceso y de qué formas pueden llevarse a cabo mejoras biotecnológicas. La relevancia de este tipo de estudio ha sido puesta de manifiesto por nuestro grupo de investigación en varias ocasiones tanto durante el proceso de propagación de la biomasa (Pérez-Torrado *et al.*, 2005) como en la vinificación (Carrasco *et al.*, 2001; Pérez-Torrado *et al.*, 2002; Zuzuarregui y del Olmo, 2004a; Zuzuarregui y del Olmo, 2004b; Zuzuarregui *et al.*, 2005). En cuanto a la deshidratación, existen numerosos estudios moleculares pero la mayoría de ellos han sido realizados con cepas y condiciones de laboratorio. Los escasos estudios desarrollados hasta la fecha con levaduras vínicas no abarcan todas las etapas del proceso de deshidratación de LSA, sino que se restringen a comparaciones entre levadura seca y rehidratada (Singh *et al.*, 2005; Rossignol *et al.*, 2006; Novo *et al.*, 2007). En este trabajo se ha utilizado la cepa vínica T73 y se ha realizado la caracterización de la respuesta a estrés en las diferentes etapas de manipulación de la levadura desde la crema obtenida tras la propagación de la biomasa hasta la LSA.

Como una primera aproximación a la caracterización de la respuesta a estrés durante este proceso, se analizó la expresión de una serie de genes marcadores de estrés previamente seleccionados en nuestro laboratorio por su especificidad frente a determinadas condiciones subóptimas de crecimiento (Pérez-Torrado, 2004). Estudios previos han demostrado que el

análisis de la expresión de genes marcadores es una herramienta útil en la caracterización de la respuesta estrés en procesos industriales (Ivorra *et al.*, 1999; Pérez-Torrado *et al.*, 2002; Pérez-Torrado *et al.*, 2005; Higgins *et al.*, 2003). Este análisis fue realizado en células deshidratadas a escala de laboratorio procedentes de cultivos en medio YPD o de cultivos en melaza simulando las condiciones industriales. Una vez se determinó que la respuesta a estrés oxidativo era una de las más relevantes durante la deshidratación, se amplió el análisis de expresión génica a otros genes implicados en los sistemas de defensa frente a estrés oxidativo y se analizaron otros marcadores no génicos indicativos de este estrés, como el glutatión (molécula protectora) y la peroxidación lipídica (daño celular). Por último, se llevó a cabo el mismo estudio a escala de planta piloto y los resultados se contrastaron con los obtenidos en la simulación a escala de laboratorio.

2.1. Expresión de genes marcadores de estrés durante la deshidratación a escala de laboratorio

Para determinar que tipo de respuesta a estrés era predominante durante la deshidratación se analizó la expresión de una serie de genes marcadores de estrés, cada uno específico para una condición. Los genes analizados fueron *STII* (co-carabina de Hsp90p) como marcador de estrés térmico, *GPD1* (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa NAD-dependiente) para el estrés osmótico y *TRX2* (tioredoxina citoplasmática) como marcador de estrés oxidativo. También se incluyó como indicador de estrés oxidativo el gen *GSH1* (γ -glutamilcisteína sintetasa) como representante del sistema glutatión/glutarredoxinas aunque estudios previos desarrollados en nuestro laboratorio no habían mostrado inducción significativa de este gen frente a los tipos de estrés analizados en dicho estudio (Pérez-Torrado, 2004). Como gen modelo indicativo de la activación de la ruta general de respuesta a estrés se analizó la expresión del gen *HSP12* (proteína de choque térmico, hidrofílica). Para este estudio de expresión se aplicó la técnica Northern Blot. El mismo filtro fue hibridado con las cinco sondas en hibridaciones sucesivas, manteniendo una sonda común como patrón interno de la señal de hibridación. Se cuantificó la radiactividad específica de cada sonda marcada y también la cantidad relativa de RNA de cada muestra mediante la señal del rRNA. Por último, los datos obtenidos en el análisis de imagen de las autorradiografías fueron normalizados utilizando tres parámetros: la cantidad de rRNA de cada muestra, la radiactividad específica de cada sonda y la señal media de una hibridación respecto a la anterior.

El estudio se realizó previamente en células tomadas a lo largo de la deshidratación procedentes de cultivos en YPD, donde en la mayoría de los casos se pudo observar una inducción de los

cinco genes marcadores alcanzando inducciones de 2-3 veces en muestras con un 50 % de humedad residual (Figura 2.1). Las diferencias de inducción entre los genes no fueron muy significativas y además variaron entre experimentos, lo que no permitió establecer si alguno de los tipos de estrés analizados era predominante sobre los demás.

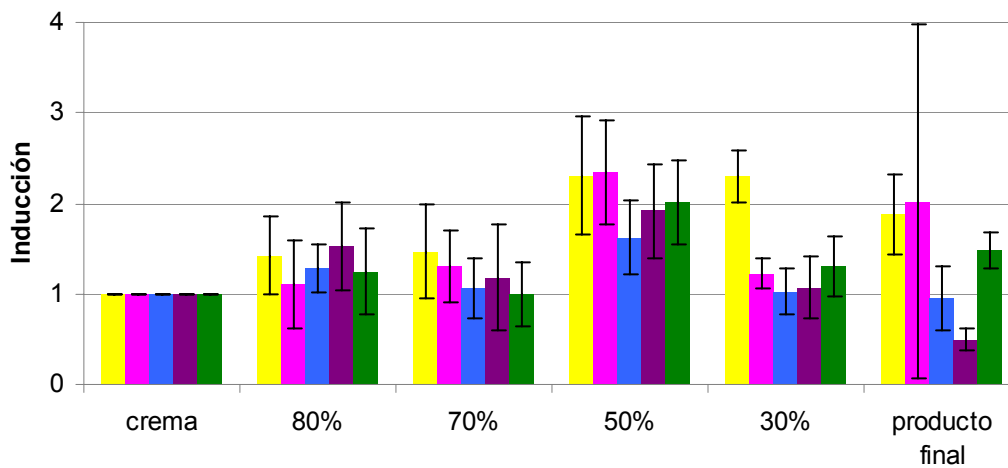


Figura 2.1. Análisis mediante Northern Blot de la expresión de genes marcadores de estrés durante la deshidratación de la biomasa obtenida de cultivos en medio YPD y secada en estufa de convección a 35 °C. Los niveles normalizados de mRNA fueron relativizados respecto del valor obtenido en la crema antes de deshidratar. Se muestra la media de tres deshidrataciones independientes a partir de producciones de biomasa independientes. Genes marcadores de estrés: *HSP12* (■), *STI1* (■), *GPD1* (■), *GSH1* (■) y *TRX2* (■).

Posteriormente, se aplicó el mismo análisis a células cultivadas en melaza simulando las condiciones industriales de propagación de la biomasa. Los valores obtenidos se relativizaron respecto del valor obtenido en las células lavadas y concentradas justo antes de introducirlas en la estufa (crema). Como se muestra en la Figura 2.2 no se detectaron inducciones significativas de ningún gen analizado si tenemos en cuenta que en la técnica Northern Blot no se suelen considerar significativas inducciones por debajo de 2-3 veces, incluso la mayoría estaban ligeramente reprimidos. Únicamente se puede observar una pequeña inducción (no llegó a ser de 2 veces) de los genes marcadores de estrés oxidativo en el rango de 80 % - 50 % de humedad residual. El gen inducido es diferente entre los dos experimentos realizados, en el experimento A es *GSH1* mientras que en el experimento B es *TRX2*. Solo en el experimento A se observa una ligera inducción del gen *HSP12* en el producto totalmente deshidratado (producto final).

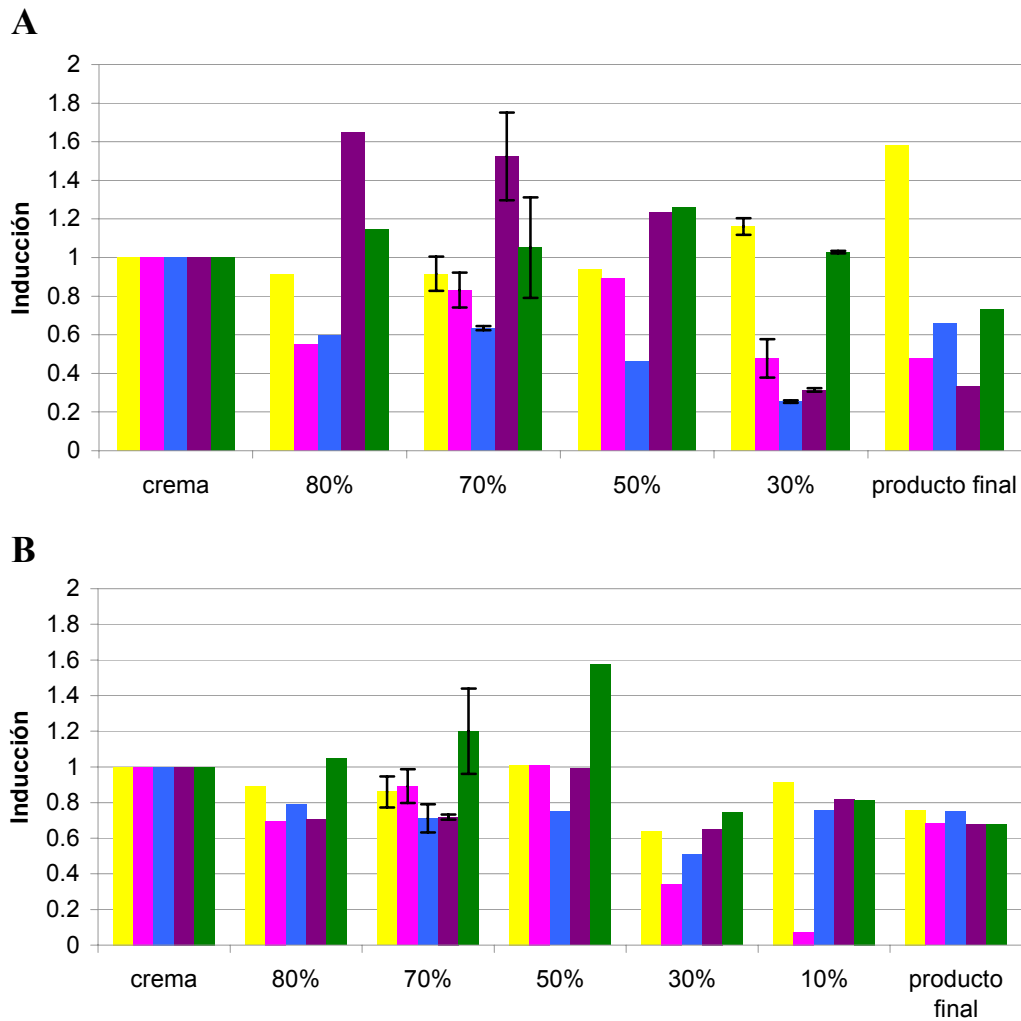


Figura 2.2. Análisis mediante Northern Blot de la expresión de genes marcadores de estrés durante la deshidratación de la biomasa obtenida en producciones a escala de laboratorio y secada en estufa de convección a 35 °C. Los niveles normalizados de mRNA fueron relativizados respecto del valor obtenido en la crema antes de deshidratar.² El panel A y B muestran los resultados de dos deshidrataciones independientes a partir de producciones de biomasa independientes. Genes marcadores de estrés: *HSP12* (■), *STII* (■), *GPD1* (■), *GSH1* (■) y *TRX2* (■).

Las diferencias en los resultados obtenidos en ambas condiciones corroboran que la forma de propagación de la biomasa (la composición del medio y el tipo de crecimiento) afecta al estado fisiológico y molecular de la célula (Shima *et al.*, 2005). De forma que la simulación de las condiciones industriales para la obtención de la biomasa se hacía imprescindible para conseguir que este estudio de caracterización fuera lo más cercano posible al estado fisiológico de las

²Nota: mediante las curvas de secado se hicieron aproximaciones sobre el tiempo necesario para alcanzar un estado de deshidratación determinado pero en algunas ocasiones en un mismo experimento se obtuvieron muestras con porcentajes de humedad residual similares. Estas muestras se han utilizado para hacer medias dentro de un mismo experimento y calcular sus desviaciones.

levaduras durante el proceso industrial. Basándonos en los datos obtenidos en células cultivadas en melaza donde solo se puede apreciar una respuesta pobre y es frente a estrés oxidativo, en datos previos obtenidos en nuestro laboratorio donde la sobreexpresión del gen *TRX2* mejora la vitalidad de las células tras el secado (Pérez-Torrado, 2004) y en la bibliografía donde cada vez aparecen más indicios de la importancia del daño oxidativo durante la deshidratación (Espindola *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2003; França *et al.*, 2005; França *et al.*, 2007), decidimos profundizar más en esta respuesta analizando la expresión de otros genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo y también otros marcadores no génicos.

2.2. Estudio de la respuesta a estrés oxidativo durante la etapa de deshidratación en la obtención de LSA a escala de laboratorio

Como se ha comentado en la Introducción, entre los mecanismos de defensa frente a estrés oxidativo descritos en levadura se encuentran los sistemas glutatión/glutarredoxinas y tiorredoxina. Como el análisis previo de genes marcadores no fue concluyente acerca de la implicación de ambos sistemas en la respuesta celular durante la deshidratación, se decidió ampliar el análisis de expresión génica con otros genes involucrados en estos sistemas. Se realizó una búsqueda en la base de datos *Saccharomyces Genome Database* y se seleccionaron algunos de los genes que presentaban mayor inducción frente a diferentes tipos de estrés oxidativo. Los genes seleccionados fueron cuatro:

- *GRX2* (glutarredoxina ditiol), su expresión es inducida fuerte y rápidamente por diferentes agentes oxidantes (H_2O_2 , menadiona, ditioneitol y diamida) (Grant *et al.*, 2000).
- *GRX5* (glutarredoxina monotiol), se induce en presencia de H_2O_2 y diamida. La delección de este gen va acompañada de un aumento de la carbonilación proteica y de la sensibilidad a estrés oxidativo y osmótico (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999).
- *TRR1* (tiorredoxina reductasa), su expresión aumenta notablemente en presencia de H_2O_2 , menadiona y diamida (Gasch *et al.*, 2000).
- *TSA1* (tiorredoxina peroxidasa), se induce fuertemente por agentes oxidantes como H_2O_2 , menadiona y diamida, y también por choque térmico (Gasch *et al.*, 2000).

Este estudio se llevo a cabo en tres deshidrataciones independientes, realizadas con biomasa obtenida en simulaciones de producción a escala de laboratorio independientes. En la Figura 2.3 se muestran los datos obtenidos para dos de ellas, que fueron analizadas por Northern Blot. De nuevo, la expresión de los genes fue variable entre las deshidrataciones analizadas. El único gen

que se indujo en las tres deshidrataciones y en algunos casos con niveles significativos (2-6 veces) fue *TRRI*, aunque los diferentes experimentos mostraron variabilidad en los niveles de inducción alcanzados y en el patrón de expresión.

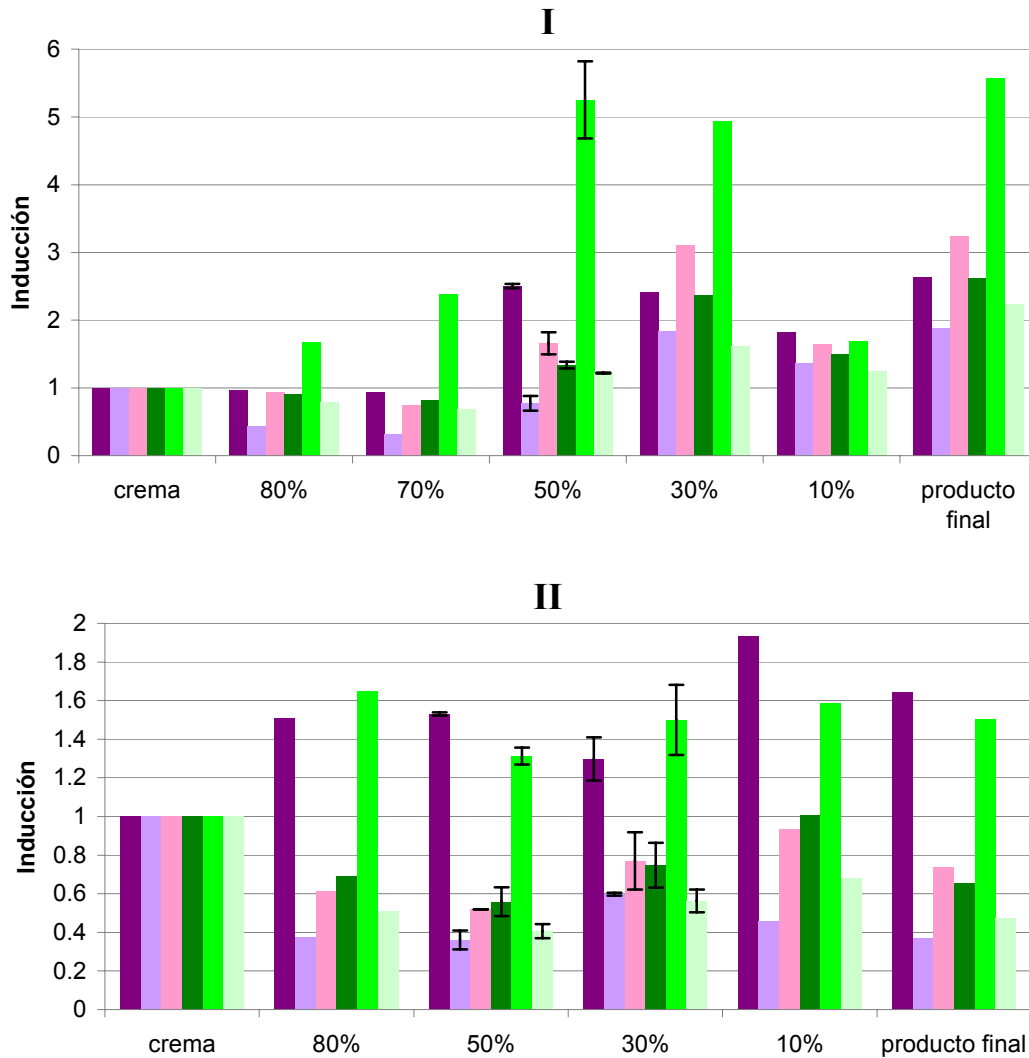


Figura 2.3. Análisis mediante Northern Blot de la expresión de genes implicados en los sistemas de defensa antioxidante durante la deshidratación de la biomasa obtenida en producciones a escala de laboratorio y secada en estufa de convección a 35 °C. Los niveles normalizados de mRNA fueron relativizados respecto del valor obtenido en la crema antes de deshidratar. Se muestra el resultado de dos experimentos (deshidrataciones I y II) de los tres experimentos independientes realizados (vease ²Nota) Genes: *GSH1* (■), *GRX2* (□), *GRX5* (■), *TRX2* (■), *TRRI* (■) y *TSAI* (□).

El glutatión es uno de los metabolitos de protección frente a estrés oxidativo más importantes, a parte de tener otras funciones relevantes en el mantenimiento celular. La valoración del glutatión total así como la proporción en forma oxidada (GSSG) y en forma reducida (GSH) permite establecer si en un momento determinado se está produciendo un aumento en la oxidación celular. El método de valoración se basa en la capacidad del DTNB para reaccionar con la forma reducida del glutatión liberando el cromóforo TNB que absorbe a 412 nm.

En la Figura 2.4 se muestra la cuantificación del glutatión total y de las formas GSH y GSSG para las tres deshidrataciones realizadas. Los tres experimentos mostraron un comportamiento similar pero la variabilidad en los niveles alcanzados en cada uno de ellos imposibilitó el cálculo de medias. Cabe reseñar que esta variabilidad en los experimentos realizados a escala de laboratorio probablemente es debida a la dificultad que conlleva el diseño experimental, en el que el estado de la biomasa depende de un proceso largo y con múltiples variables como es la producción en un biorreactor utilizando medio melaza. Como se comenta en el capítulo I y se puede observar más adelante en el apartado 2.3, este tipo de experimentos en la planta piloto se realizan de forma rutinaria, están totalmente estandarizados y además son llevados a cabo con un equipamiento más adecuado, lo que ha permitido una mayor repetitividad de los resultados obtenidos. Se observa que durante el secado se produce acumulación del glutatión total que se inicia cuando las células presentan entre un 80 % y un 50 % de humedad residual en función del experimento, pero en todas, el producto final presenta un $90,52 \% \pm 19,14 \%$ más de glutatión que la crema inicial. Este incremento se debe principalmente a un aumento en los niveles del glutatión reducido. En cuanto a los niveles de la forma oxidada, se mantienen bajos durante los 10-20 minutos iniciales del secado (80 % - 50 % de humedad residual) pero luego se produce un aumento que abarca un rango de secado entre el 70 % - 10 % de humedad residual dependiendo del experimento, para posteriormente volver a disminuir en el producto final hasta niveles próximos a los iniciales. Este incremento en la oxidación durante un período del secado, normalmente tras 20-30 minutos en la estufa, también se refleja en la relación GSH/GSSG que se muestra en la Tabla 2.1. Durante el secado, la relación GSH/GSSG primero aumenta debido a la síntesis de glutatión pero después disminuye indicando que la proporción de forma oxidada ha aumentado frente a la forma reducida y se mantiene durante el resto de la primera hora analizada, pero en el tiempo que transcurre hasta obtener el producto final (las 23 horas restantes) se produce una recuperación de los niveles de la forma reducida.

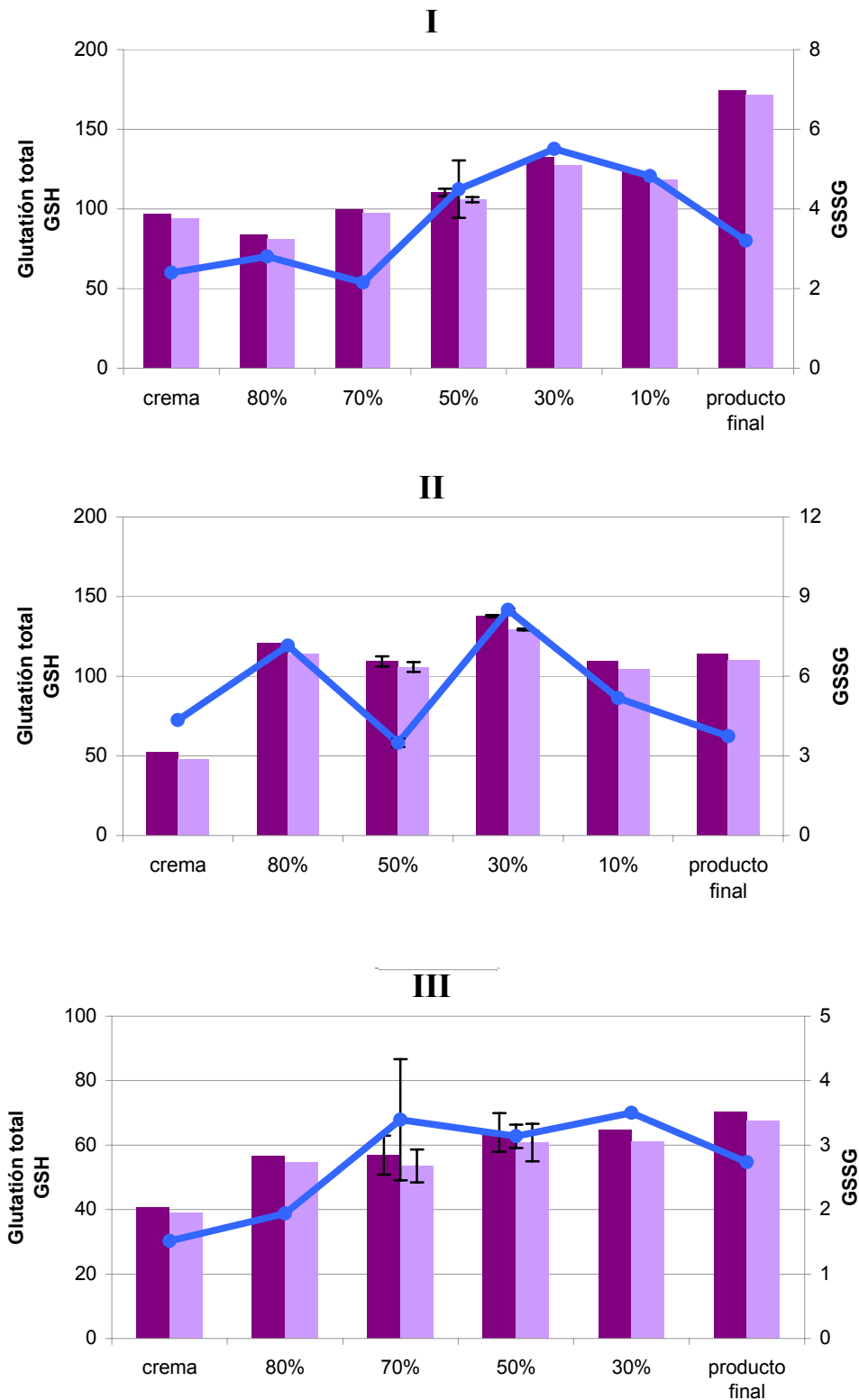


Figura 2.4. Determinación del glutatión intracelular durante la deshidratación de la biomasa obtenida en producciones a escala de laboratorio y secada en estufa de convección a 35 °C. Se muestran los datos obtenidos de glutatión total (■), glutatión reducido (GSH, □) y glutatión oxidado (GSSG, ●) para tres deshidrataciones independientes a partir de producciones de biomasa independientes (vease ²Nota) Unidades: nmoles de glutatión/mg de células. (Las producciones I y II se realizaron como se describe en el capítulo I, en cambio la producción III estuvo caracterizada por una etapa de *fed-batch* notablemente más corta, 28 horas).

Tabla 2.1. Relación GSH/GSSG en las deshidrataciones realizadas a escala de laboratorio. Se muestran los valores obtenidos para los tres experimentos independientes realizados (*vease* ²Nota).

	I	II	III
Crema	39,33	11,06	25,77
80%	29,01	15,93	28,24
70%	45,35		16,63 ± 3,10
50%	24,09 ± 3,50	30,34 ± 0,42	19,33 ± 0,73
30%	23,12	15,22 ± 0,02	17,49
10%	24,55	20,15	
Producto final	53,51	29,50	24,74

Entre los múltiples daños que producen las ROS está la peroxidación de los lípidos insaturados, responsable del deterioro de las membranas. Teniendo en cuenta que la integridad de las membranas es un factor determinante en la resistencia a la deshidratación, pareció adecuado realizar la valoración de la peroxidación de los lípidos como indicativo directo del daño oxidativo durante este proceso. Se utilizó un método colorimétrico basado en la reacción del ácido tiobarbitúrico con el malondialdehído (MDA), producto de la rotura de los ácidos grasos poliinsaturados. Como se puede observar en la Figura 2.5, en muestras con una pérdida tan solo del 20 % de humedad (aproximadamente 10 minutos de secado) ya hay un aumento de los niveles de MDA que luego disminuye a lo largo de la deshidratación. El comportamiento es bastante similar en las tres deshidrataciones realizadas aunque dependiendo del experimento, el incremento y la disminución fueron más marcados y puntuales (Figura 2.5 deshidratación I) o más graduales (Figura 2.5, deshidrataciones II y III). La peroxidación lipídica tras el secado (producto final) fue mayor que en la crema pero los niveles alcanzados variaron notablemente entre los experimentos I, II y III (85,8 %, 17,6 % y 23,1 % respectivamente).

2.3. Estudio de la respuesta a estrés durante la etapa de deshidratación en la obtención de LSA a escala de planta piloto

El mismo estudio descrito en los apartados anteriores se realizó en muestras obtenidas de producciones de LSA en la planta piloto del *Laboratory of Research and Development*, Lallemand S.A.S (*vease* capítulo I). Se realizaron dos producciones independientes de la cepa T73, la crema obtenida de cada una de ellas se dividió y se sometió a diferentes tratamientos.

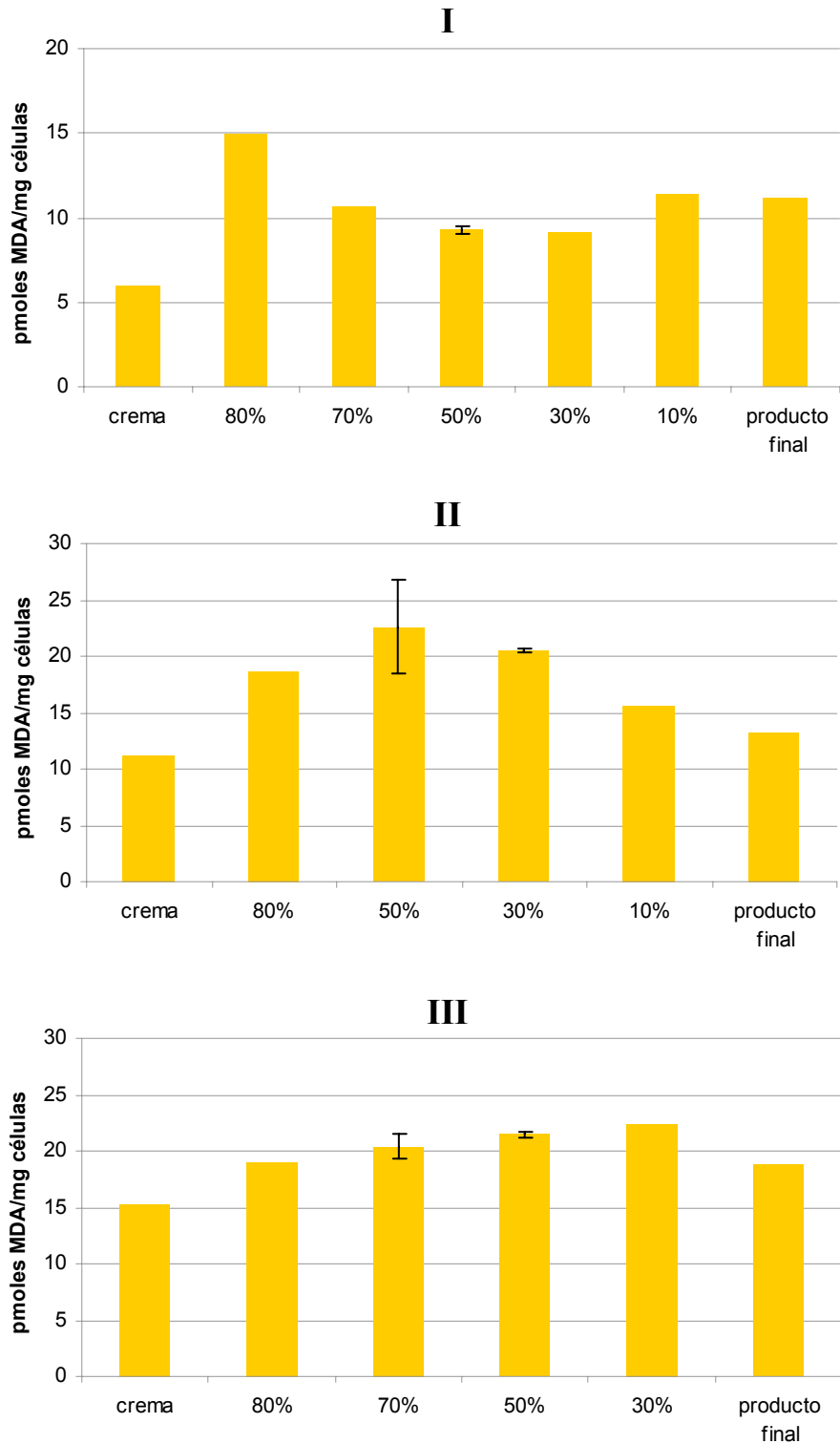


Figura 2.5. Nivel de peroxidación de los lípidos durante la deshidratación de la biomasa obtenida en producciones a escala de laboratorio y secada en estufa de convección a 35 °C. Se muestran los datos obtenidos para tres deshidrataciones independientes a partir de producciones de biomasa independientes (vease ²Nota).

Una parte fue procesada inmediatamente (cremas sin tratar) y otra fue almacenada a 4°C entre 20 y 24 horas. En las cremas almacenadas parte fue ajustada a pH 3,5 con H₂SO₄ puro (práctica habitual en la planta piloto para evitar contaminaciones bacterianas durante el período de almacenamiento) y parte se almacenó sin ajustar el pH (el pH de la crema antes de ser procesada fue 5,7). Como se mencionó en el capítulo I, tras la etapa de extrusión, los filamentos de levadura fueron secados a dos temperaturas diferentes, 35 °C y 41 °C. En los análisis realizados no se observó diferencias significativas entre los tratamientos de las cremas, de forma que como representación de los resultados obtenidos solo se muestran las medias correspondientes a las cremas sin tratar que fueron procesadas justo después de su producción.

En lo que se refiere a los análisis de expresión de genes marcadores de estrés, debido a la poca cantidad de RNA obtenida en estas muestras y la imposibilidad de repetir los experimentos para obtener más, no se pudo realizar el análisis mediante la técnica de Northern Blot. En este caso se recurrió a la técnica de transcripción reversa-PCR cuantitativa en tiempo real (QRT-PCR) que nos permitió el uso de concentraciones bajas de RNA (0,5-2 ng/μL) gracias a la amplificación de la señal durante la PCR. Esta técnica tiene una gran sensibilidad pero depende de la eficiencia en la obtención del cDNA y de la posterior PCR, esto supone que es necesario no solo partir de la misma cantidad de RNA sino también tener genes que puedan considerarse constitutivos y que actúen como controles internos (Bustin, 2002). Es difícil encontrar algún gen que mantenga constante su expresión en cualquier estado de la célula; la mayoría de ellos son estables durante una determinada etapa de crecimiento pero no en otras, en condiciones óptimas de crecimiento pero no frente a estrés, varían dependiendo de la disponibilidad de nutrientes, etc. Esta dificultad se incrementa cuando se trata de procesos poco estudiados como es el caso de la deshidratación. En estos casos, algunas publicaciones recientes recomiendan el uso de varios genes considerados constitutivos (Thellin *et al.*, 1999; Vandesompele *et al.*, 2002; Nailis *et al.*, 2006). En este estudio se seleccionaron tres genes como controles internos. A partir de los datos de expresión obtenidos de ellos, se calculó la media geométrica mediante el programa geNorm (Vandesompele *et al.*, 2002), y se utilizó como factor de normalización. Los genes empleados como controles internos fueron:

- *ACT1* (actina), es ampliamente usado como control tanto en RT-PCR cuantitativas y semi-cuantitativas como en Northern Blot. Se considera un gen de expresión constitutiva aunque se ha demostrado que su expresión en fase estacionaria es menor que en fase exponencial (Gasch *et al.*, 2000). En este trabajo no cabría esperar esta variación ya que se parte de células en estado estacionario libres de medio de cultivo.
- *RDNI8* (rRNA 18S), los rRNA representan el 90 % - 95 % del RNA total y su expresión es bastante estable aunque en determinadas situaciones no son representativos

del nivel de mRNA. Este desequilibrio puede deberse a varios factores, por ejemplo una regulación diferencial de las RNA polimerasas I y II (Solanas *et al.*, 2001). Dado que los filtros de las deshidrataciones a escala de laboratorio analizados por Northern Blot fueron normalizados usando el rRNA, incluirlo como control en este análisis facilita la comparación de los datos obtenidos con ambas técnicas.

- *HSP12* (proteína de choque térmico 12), su expresión es inducida en fase estacionaria y en respuesta a numerosas condiciones de estrés (Gasch *et al.*, 2000). En el estudio de expresión de genes marcadores a escala de laboratorio dio una señal radiactiva mucho mayor que el resto de genes analizados y se mantuvo relativamente constante desde la crema hasta el final del secado en la biomasa procedente de cultivos en melaza (vease Figura 2.2).

Para comprobar la repetitividad de los datos analizados con una y otra técnica, las muestras de RNA procedentes de la deshidratación II a escala de laboratorio (mostrada en la Figura 2.3) fueron analizadas también por QRT-PCR. Aunque las inducciones detectadas con esta técnica fueron ligeramente superiores, el patrón de expresión se mantuvo, indicando que ambas técnicas con las normalizaciones pertinentes son comparables (datos no mostrados).

En las figuras 2.6 y 2.7 se muestran los datos obtenidos en el análisis de la expresión de genes marcadores de estrés y de respuesta a estrés oxidativo. Tras el filtrado y la extrusión no hay variaciones significativas en la expresión de los genes analizados respecto de la crema, es durante el secado cuando se produce la inducción de determinados genes alcanzando su máximo en el producto final. En el secado a 35 °C (Figura 2.6, panel A) el gen que presenta mayor inducción es *GSH1*, 2 veces tras 28 minutos de secado y superior a 3 veces en el producto final. También en el producto final, *GPD1* aparece inducido aproximadamente 2 veces. En el análisis de la expresión de otros genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo (Figura 2.6, panel B) se observa la inducción gradual de *TRRI* a lo largo del secado superando a *GSH1* en el producto final (hasta 5 veces aumenta su expresión respecto de la crema). En cuanto al resto de genes, únicamente la expresión de *GRX5* presenta un ligero incremento cercano a 2 veces. De forma similar, durante el secado a 41 °C (Figura 2.7, paneles A y B) se inducen los genes *GSH1* y *TRRI* pero adelantados en el tiempo, tras 18 minutos de secado. En el producto final no se conserva la inducción de *GPD1* observada a 35 °C pero sí presenta mayor nivel de expresión el gen *STII* (aproximadamente el doble que en la crema). Otra diferencia es la inducción de hasta 3 veces del gen *GRX5*.

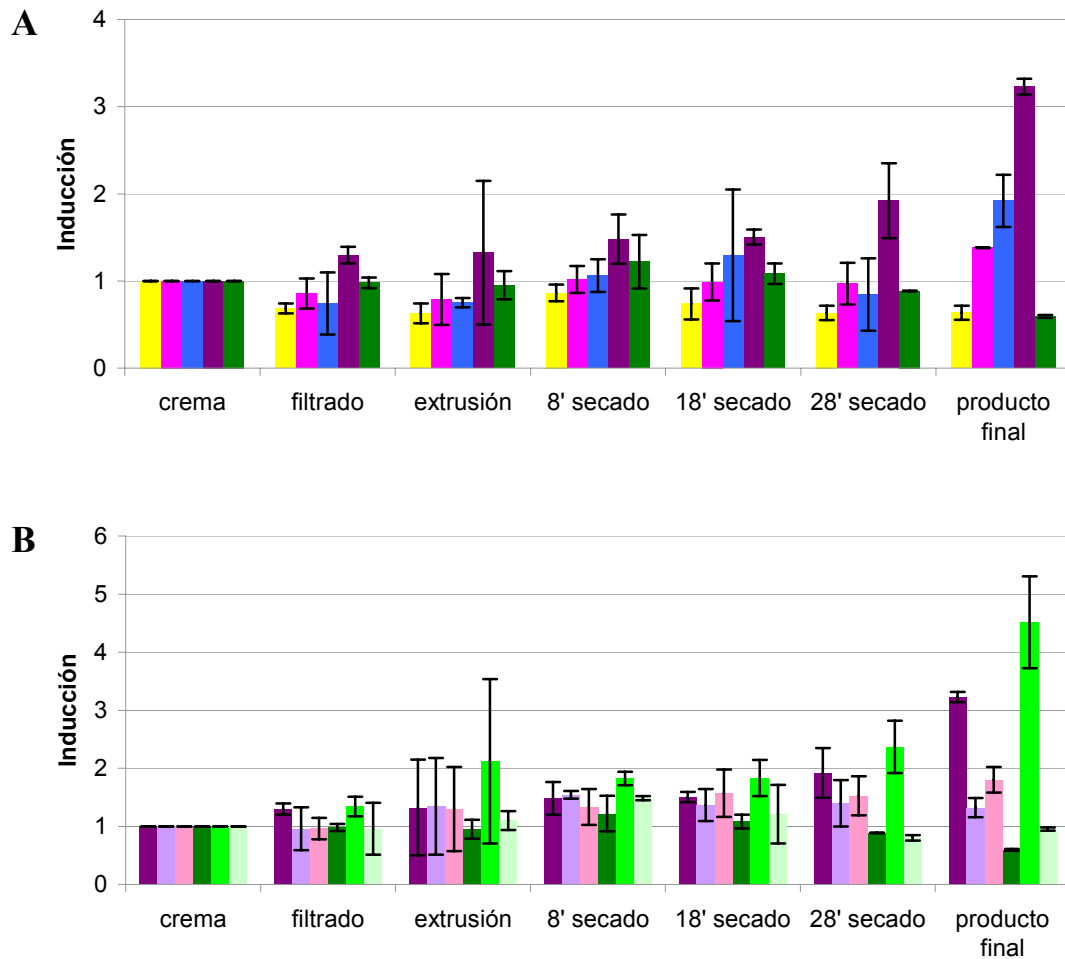


Figura 2.6. Análisis mediante QRT-PCR de la expresión de genes marcadores de estrés (panel A) y de genes implicados en los sistemas de defensa antioxidante (panel B) durante la deshidratación de la biomasa obtenida y deshidratada en planta piloto a 35 °C. Los niveles normalizados de mRNA fueron relativizados respecto del valor obtenido en la crema antes de deshidratar. Los datos mostrados corresponden a las medias de dos deshidrataciones independientes a partir de producciones de biomasa independientes. Genes: *HSP12* (■), *ST11* (■), *GPD1* (■), *GSH1* (■), *TRX2* (■), *GRX2* (■), *GRX5* (■), *TRR1* (■) y *TSA1* (■).

También se realizaron los análisis del contenido en glutatión y de la peroxidación lipídica como parámetros bioquímicos indicadores de estrés oxidativo. Los resultados obtenidos en la cuantificación de los niveles de glutatión intracelular durante la deshidratación en planta piloto (Figura 2.8, paneles A y B) indican que este metabolito se acumula durante este proceso en su forma reducida (GSH). Durante la extrusión hay un pequeño incremento pero donde empieza a ser evidente es tras 8 minutos de secado y continúa acumulándose hasta alcanzar en el producto final un 54,56 % ± 0,01 % más de glutatión total que el inicial en la crema para células secadas a 35 °C y un 34,69 % ± 1,27 % para la levadura secada a 41 °C. En cambio, los niveles de la

forma oxidada (GSSG) se mantienen bajos durante todo el proceso y prácticamente estables entorno a 6-8 nmoles de glutatión/mg de células, excepto un pequeño pico de acumulación detectado tras 8 minutos de secado que rápidamente (en los 10 minutos siguientes) desaparece. Este comportamiento fue común a ambas temperaturas ensayadas. De nuevo, la disminución de la relación GSH/GSSG tras 8 minutos de secado (Tabla 2.2) refleja este pico de oxidación que rápidamente es subsanado como muestra el aumento de la relación en los siguientes 10 minutos.

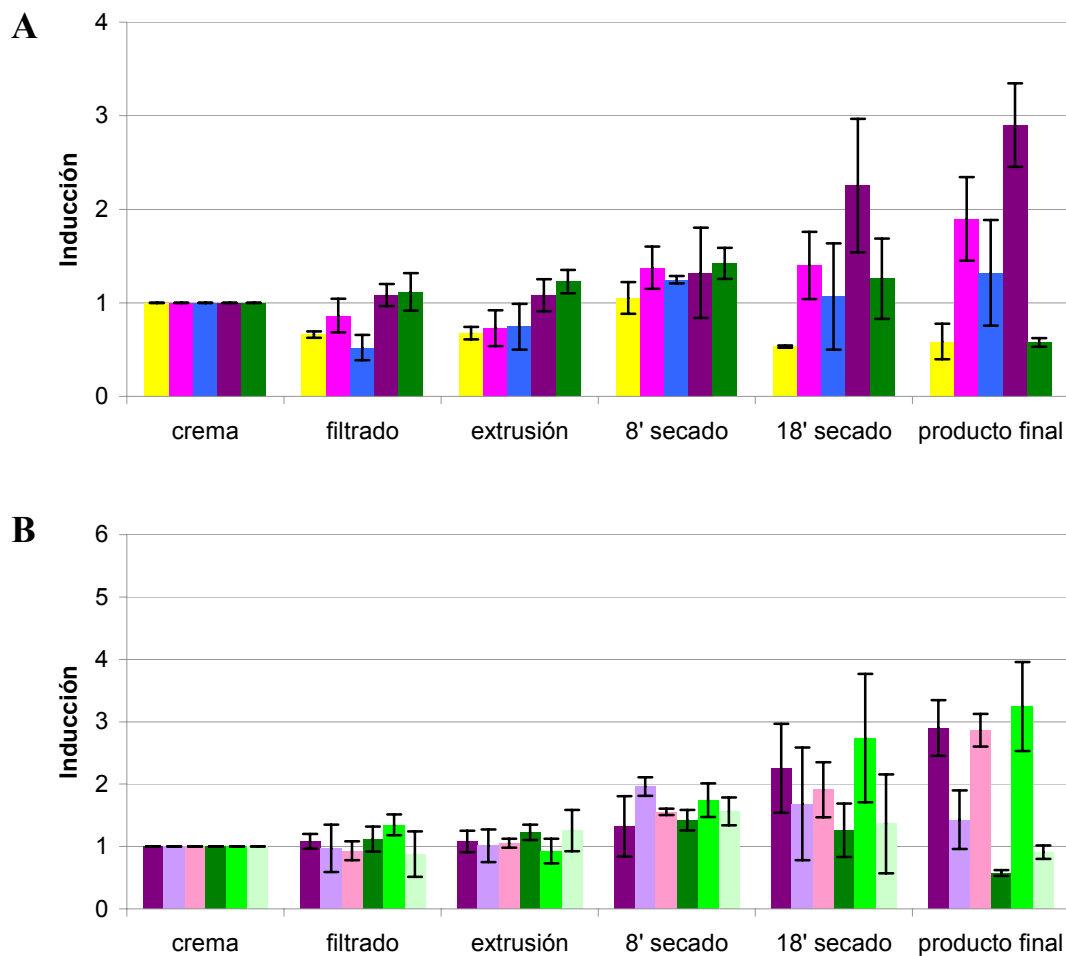


Figura 2.7. Análisis mediante QRT-PCR de la expresión de genes marcadores de estrés (panel A) y de genes implicados en los sistemas de defensa antioxidante (panel B) durante la deshidratación de la biomasa obtenida y deshidratada en planta piloto a 41 °C. Los niveles normalizados de mRNA fueron relativizados respecto del valor obtenido en la crema antes de deshidratar. Los datos mostrados corresponden a las medias de dos deshidrataciones independientes a partir de producciones de biomasa independientes. Genes: *HSP12* (■), *STII* (■), *GPD1* (■), *GSH1* (■), *TRX2* (■), *GRX2* (■), *GRX5* (■), *TRR1* (■) y *TSAI* (■).

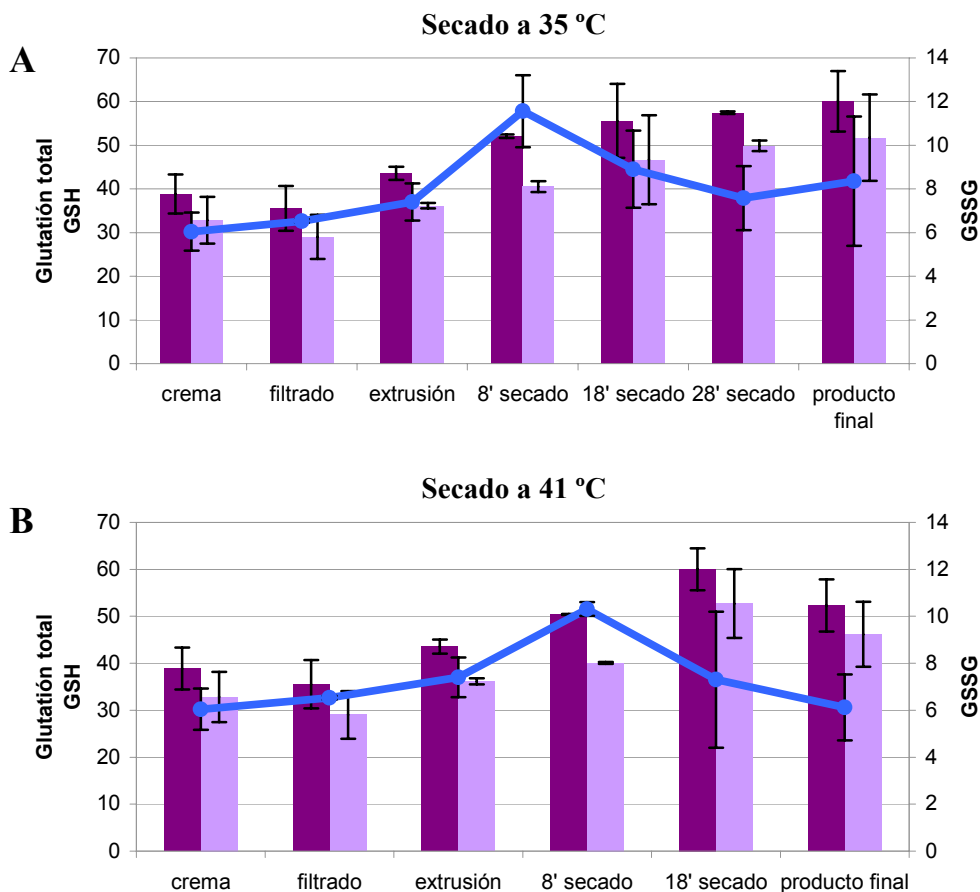


Figura 2.8. Determinación del glutatión intracelular durante la deshidratación de la biomasa obtenida y deshidratada en planta piloto a 35 °C (panel A) y 41 °C (panel B). Se muestran los valores medios de glutatión total (■), glutatión reducido (GSH, □) y glutatión oxidado (GSSG, ●) obtenidos a partir de dos deshidrataciones independientes para cada temperatura de secado a partir de producciones de biomasa independientes. Unidades: nmoles de glutatión/mg de células.

Tabla 2.2. Relación GSH/GSSG en las deshidrataciones realizadas en planta piloto. Los valores son medias de dos deshidrataciones independientes para cada temperatura de secado a partir de producciones de biomasa independientes.

	35 °C	41 °C
Crema	5,68 ± 1,71	
Filtrado	4,68 ± 0,47	
Extrusión	4,99 ± 0,51	
8' secado	3,59 ± 0,62	3,89 ± 0,13
18' secado	5,69 ± 2,27	9,04 ± 4,58
28' secado	6,87 ± 1,49	
Producto final	7,57 ± 3,87	8,23 ± 3,02

Como se puede observar en la Figura 2.9, el nivel de peroxidación de los lípidos también aumenta durante este proceso, pero esta peroxidación no tiene lugar hasta que las células son sometidas al secado con aire caliente. En el secado a 35 °C (Figura 2.9, panel A) los niveles de peroxidación aumentan tras 18 minutos alcanzando niveles similares a los detectados en el producto final. En el secado a 41 °C (Figura 2.9, panel B) ocurre algo similar pero en menos tiempo, los lípidos de las células secadas 8 minutos ya presentan elevados niveles de MDA. Los niveles de peroxidación lipídica en los productos finales obtenidos en ambos secados son similares, 15-16 pmoles de MDA/mg de células, lo que representa un incremento del 30 % - 40% respecto de la crema.

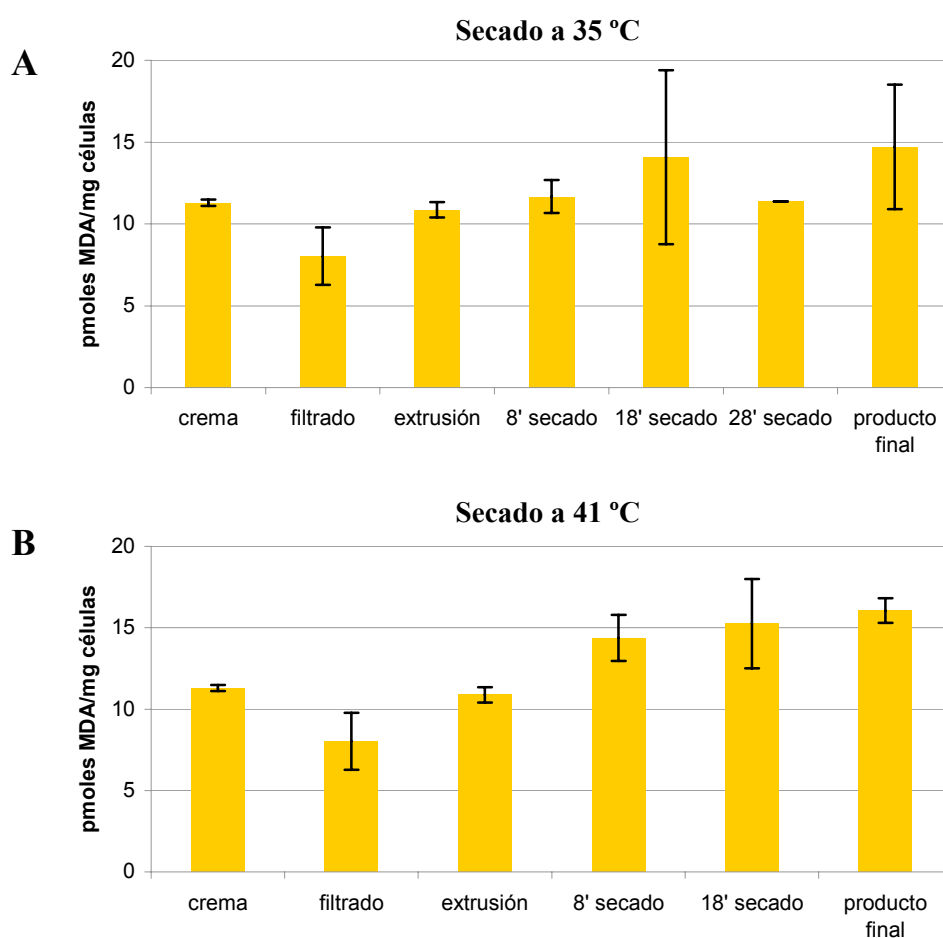


Figura 2.9. Nivel de peroxidación de los lípidos durante la deshidratación de la biomasa obtenida y deshidratada en planta piloto a 35 °C (panel A) y 41 °C (panel B). Se muestran las medias obtenidas a partir de dos deshidrataciones independientes para cada temperatura de secado a partir de producciones de biomasa independientes.

2.4. Comparación de la LSA obtenida a escala de laboratorio y en planta piloto con los lotes industriales

Por último, se analizaron los lotes industriales descritos en el capítulo I (apartado 1.3). El análisis de la expresión génica se realizó mediante QRT-PCR de la misma forma que se describe en el apartado anterior. Los valores obtenidos fueron relativizados respecto a los valores de las cremas obtenidas en planta piloto, ya que no se tuvo acceso a las cremas originales obtenidas en la industria.

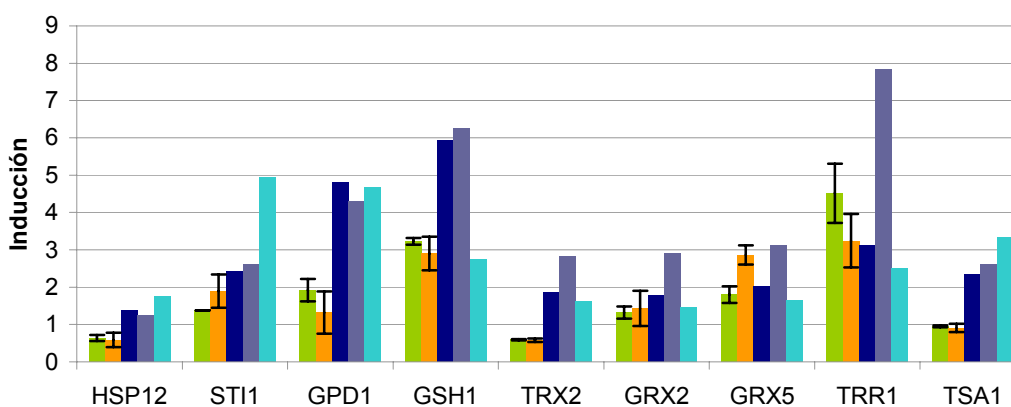


Figura 2.10. Análisis mediante QRT-PCR de la expresión de genes marcadores de estrés y de genes implicados en los sistemas de defensa antioxidante en los lotes industriales (V1 ■, V2 ■, G ■) y comparación con los productos finales obtenidos a escala de planta piloto (35 °C ■ y 41 °C ■). Los niveles normalizados de mRNA en los lotes industriales fueron relativizados respecto del valor obtenido en la crema producida en la planta piloto.

En la Figura 2.10 se muestran los datos de expresión génica de los lotes industriales junto con los datos de los productos finales obtenidos en la planta piloto. No se ha hecho la comparación con la levadura deshidratada en laboratorio porque, como se comentó en el apartado 2.2, la expresión fue bastante variable de un experimento a otro y es difícil establecer un patrón común. A grandes rasgos, los lotes industriales procedentes de la misma planta industrial (V1 y V2) son similares a nivel de expresión génica aunque existen ciertas diferencias entre las que destaca que V1 no presenta una inducción tan fuerte del gen *TRR1* como V2. Estas diferencias se hacen más notables si el lote procede de otra planta, el lote G presenta una fuerte inducción de *STI1* pero no de *GSH1* ni de *TRR1*. Aun así algunos datos son comunes a los 3 lotes, como la inducción de *GPD1* (superior a 4 veces) y los niveles de inducción generalmente bajos de los genes *HSP12*, *GRX2*, *GRX5*, *TRX2* y *TSA1*. Partiendo de la suposición de que las cremas obtenidas en la planta piloto y en la industria tienen características similares y que las inducciones detectadas en la LSA obtenida en planta piloto en general son más bajas, se puede observar que el patrón de

expresión presentado por el producto final de planta piloto es similar al obtenido en los lotes industriales de LSA. Cabe destacar la inducción del gen *TRRI* en todos los productos finales, normalmente con una inducción superior a 3 veces, también observada durante la deshidratación a escala de laboratorio y la inducción de *GSHI* observada en el producto de planta piloto y en los lotes industriales.

Como se puede observar en la Tabla 2.3, la relación GSH/GSSG es bastante similar en los tres lotes industriales de LSA analizados, donde la proporción de glutatión reducido es entre 22-30 veces superior a la forma oxidada. Estos valores son similares a los presentados por la LSA obtenida a escala de laboratorio (vease Tabla 2.1). En cambio, el producto final obtenido en planta piloto a ambas temperaturas de secado presentó una relación GSH/GSSG hasta 5 veces menor que a escala de laboratorio (vease Tabla 2.2), es decir, la proporción de glutatión oxidado en la LSA de planta piloto fue entre 3 y 5 veces mayor que en el resto de células deshidratadas (condiciones de laboratorio y lotes industriales).

Tabla 2.3. Relación GSH/GSSG y niveles de peroxidación lipídica en los lotes industriales.

	GSH/GSSH	pmoles MDA/mg células
V1	29,28	4,29
V2	23,13	10,22
G	22,43	6,27

A pesar de que las relaciones GSH/GSSG son diferentes, los valores de peroxidación de lípidos en los productos deshidratados obtenidos en el laboratorio y en planta piloto son muy similares, $(14,40 \pm 3,22)$ pmoles de MDA/mg de células y $(15,38 \pm 0,68)$ pmoles de MDA/mg de células de media respectivamente. No ocurre lo mismo en los lotes industriales (Tabla 2.3), tienen valores menores de peroxidación pero son muy variables dependiendo del lote, no pudiéndose establecer una relación ni siquiera por origen común.

2.5. Discusión

Desde hace tiempo en nuestro laboratorio, al igual que en otros grupos de investigación, se utiliza el análisis de la expresión de genes marcadores como una aproximación para el estudio de la respuesta a estrés de las levaduras en condiciones industriales. Estas aproximaciones han

permitido, por ejemplo, determinar que el inicio de la vinificación supone un importante estrés osmótico con una fuerte inducción de la expresión del gen *GPD1* (Pérez-Torrado *et al.*, 2002; Zuzuarregui *et al.*, 2005); que existe una correlación directa entre la resistencia a estrés de distintas cepas vínicas y la expresión del gen *HSP12* y esto correlaciona inversamente con las paradas de fermentación (Ivorra *et al.*, 1999); y que durante el cultivo en *batch* en la producción de biomasa de LSA existe un fuerte estrés oxidativo marcado por la notable inducción del gen *TRX2*, dependiente de la aireación (Pérez-Torrado *et al.*, 2005). La aplicación de este tipo de análisis en las distintas condiciones de deshidratación realizadas en este estudio dio lugar a resultados dependientes de las condiciones de producción y secado, indicando el efecto notable que tienen las condiciones de cultivo y el diseño experimental en el estado fisiológico y molecular de la célula. No es de extrañar que las inducciones obtenidas no sean muy elevadas en la mayoría de los casos, ya que partimos de células en fase post-diáuxica o ya en fase estacionaria, condiciones en las que la expresión de la mayoría de los genes analizados está aumentada (DeRisi *et al.*, 1997, Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001).

Las variaciones observadas entre las células cultivadas en medio YPD y las obtenidas en las simulaciones del proceso industrial a escala de laboratorio, donde el protocolo de secado fue el mismo, podrían deberse a los diferentes medios y condiciones de cultivo utilizadas (Shima *et al.*, 2005). Estudios previos realizados en nuestro laboratorio muestran que la biomasa obtenida al final del *fed-batch* presenta mayor nivel de mRNA de algunos genes marcadores analizados, como *HSP12* (3 veces más) y *GPD1* (2 veces más) que los precultivos de YPD utilizados como inóculos (Pérez-Torrado *et al.*, 2005). Además, durante la producción de biomasa en el biorreactor, las células están sujetas a una fuerte aireación tanto en la fase de *batch* como en la fase de *fed-batch*, que desencadena un importante estrés oxidativo. El inicio de la fase de *batch* está marcado por un fuerte estrés osmótico debido a la elevada concentración de azúcares (61 g/L), seguramente mayor al generado por la concentración de glucosa presente en el medio YPD (20 g/L). Por otro lado, el consumo fermentativo de esta elevada concentración de azúcares genera altas concentraciones de etanol más elevadas que en los cultivos en medio YPD. También hay que tener en cuenta, la presencia de inhibidores del crecimiento en las melazas que están ausentes en el medio YPD. La presencia continuada de condiciones adversas, aunque subletales, puede desencadenar la adquisición de tolerancia a otros tipos de estrés debido a la síntesis y acumulación de moléculas protectoras y/o a la activación de proteínas capaces de actuar frente a diferentes estreses (Lewis *et al.*, 1995; Attfield, 1997; Estruch, 2000; Garay-Arroyo *et al.*, 2003). Esto explicaría la ausencia de inducción de los genes marcadores de estrés durante el secado en las células cultivadas en melaza mientras que en células procedentes de cultivos en medio YPD tiene lugar la inducción de los cinco genes marcadores, a pesar de proceder de cultivos en fase post-diáuxica o incluso estacionaria donde han acumulado

metabolitos de protección y de reserva y la ruta de respuesta general a estrés está activa. Este fenómeno, denominado protección cruzada, se ha descrito para numerosas condiciones de estrés. Por ejemplo, el estrés oxidativo induce tolerancia a varios estreses como elevadas temperaturas (Moraitis y Curran, 2004), estrés salino, elevadas concentraciones de ácido acético (Lewis *et al.*, 1997) y elevadas presiones hidrostáticas (Palhano *et al.*, 2004). El estrés salino induce tolerancia a la congelación y al choque térmico (Lewis *et al.*, 1995). El tratamiento osmótico aumenta la resistencia al secado (Eleutherio *et al.*, 1997), etc. En cuanto a las diferencias observadas entre la biomasa obtenida en simulaciones del proceso industrial a nivel de planta piloto y a escala de laboratorio, parte de ellas podría ser consecuencia de las variaciones en el protocolo de propagación de la biomasa (analizado en el capítulo I). Esto podría explicar los niveles elevados de glutatión presentes en las cremas obtenidas a escala de laboratorio, coincidiendo con una etapa de *fed-batch* más prolongada, y correlacionando con los niveles más bajos obtenidos en la producción III a escala de laboratorio y las producciones a nivel de planta piloto donde la fase de *fed-batch* duró solo 24 horas (vease Figura 2.4 y Figura 2.8). Otra parte de estas diferencias, probablemente, sea debida a los protocolos de deshidratación empleados. Un ejemplo puede ser la inducción del gen *GPDI* en el producto final obtenido en el secado en planta piloto, indicando que las células están percibiendo un estrés osmótico más severo que las deshidratadas a escala de laboratorio y esto podría ser consecuencia de la mayor velocidad de pérdida de moléculas de agua durante el secado en planta piloto.

A pesar de estas diferencias, las dos simulaciones también mostraron similitudes en la expresión génica. La ausencia de aumento en la expresión del gen *STII* durante el secado a 35 °C en ambos protocolos indica que para la biomasa obtenida en procesos industriales alcanzar esta temperatura no supone un estrés térmico, mientras que el secado a 41 °C sí genera una respuesta. Estos datos concuerdan con la robustez de las cepas industriales frente a las cepas de laboratorio (Querol, *et al.*, 2003) y corroboran la importancia de las condiciones de propagación de la biomasa para conferir resistencia a posteriores condiciones subóptimas. La inducción en la simulación a escala de laboratorio, aunque ligera y variable entre experimentos, de los genes marcadores *TRX2* y *GSHI* sugería al estrés oxidativo como un factor relevante para la célula durante la deshidratación, como fue confirmado posteriormente por la significativa inducción del gen *GSHI* durante el secado en planta piloto, tanto a 35 °C como a 41 °C, destacando sobre el resto de genes marcadores de estrés.

En el análisis de expresión de los genes implicados en la respuesta a estrés oxidativo destaca la expresión de dos genes, *GSHI* y *TRRI*, cada uno perteneciente a un sistema de defensa antioxidante diferente. La ausencia de inducción del resto de genes analizados impide

determinar con certeza si alguno de los dos sistemas de defensa predomina sobre el otro, pero en función de los resultados obtenidos cabe esperar que ambos sean de igual relevancia durante este proceso. Estudios previos (Gasch *et al.*, 2000; Causton *et al.*, 2001) indican que los niveles de mRNA de ambos genes no se incrementan durante el cambio diáxico ni en la entrada en fase estacionaria (incluso la expresión del gen *TRR1* está reprimida en esa etapa de crecimiento). Además en nuestro estudio, la inducción se detecta una vez las células son introducidas en el secador y no durante las etapas previas de filtración y extrusión, por lo que se puede considerar a *GSH1* pero principalmente a *TRR1*, por su inducción destacada en todos los experimentos, genes inducidos específicamente por el proceso de secado y no, dependientes del procesamiento anterior de la biomasa obtenida en simulaciones de fermentaciones industriales. Mientras que la expresión de *GSH1* puede estar afectada por la presencia de ROS y por calor, como se comentará más adelante, la inducción del gen *TRR1* parece estar directamente ligada al aumento de la oxidación producida por la deshidratación, no a la elevada temperatura de secado (Kim *et al.*, 2006).

El gen *TRR1* codifica para la enzima tiorredoxina reductasa citosólica, la principal encargada de mantener en su forma reducida a las tiorredoxinas citosólicas, Trx1p y Trx2p (Trotter y Grant, 2003). La elevada inducción de este gen en ausencia de inducción del gen *TRX2*, puede significar que la oxidación de las tiorredoxinas citosólicas está siendo elevada y se necesita su reducción. La regulación del estado redox de las tiorredoxinas es de gran relevancia en la respuesta a estrés oxidativo. Trx1p, junto con las tiorredoxinas citosólicas, resultan claves en la regulación de la transcripción dependiente del factor transcripcional Yap1p. La oxidación del factor Yap1p evita su exportación del núcleo de forma que puede activar la expresión de numerosos genes entre los que se encuentra *TRR1* y *TRX2*. Este mismo sistema tiorredoxina es el responsable de reducir Yap1p y desactivarlo (Izawa *et al.*, 1999; Delaunay *et al.*, 2000). Es decir, existe un lazo de autorregulación, el daño oxidativo activa Yap1p y por tanto los sistemas de recuperación, que a su vez inactivan Yap1p para frenar la respuesta una vez se restablece el equilibrio (Temple *et al.*, 2005). Otras connotaciones importantes que tiene el mantenimiento adecuado del sistema de reducción de las tiorredoxinas se deben a su participación en el ciclo celular como reductoras casi exclusivas de la enzima ribonucleótido reductasa y en el metabolismo del azufre como donadoras de hidrógenos a la enzima PAPS reductasa (3'-fosfoadenosin 5'-fosfosulfato reductasa) (Toledano *et al.*, 2007). Los niveles elevados de Trx1p pueden permitir una rápida recuperación de las tiorredoxinas citosólicas oxidadas de forma que cuando las células sean rehidratadas, puedan reducir rápidamente a Yap1p poniendo fin a esta respuesta y puedan participar en funciones de recuperación del crecimiento como es la replicación del DNA o la síntesis de aminoácidos azufrados.

El glutatión se ha descrito en numerosos organismos, desde bacterias hasta pequeños vertebrados, como una molécula fundamental en la tolerancia a la deshidratación, gracias a su capacidad de actuar como cofactor de enzimas antioxidantes y de reaccionar directamente con las ROS y con los grupos tioles de las proteínas (Espindola *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2003; França *et al.*, 2007). Parte de esta importancia se debe a que es un metabolito muy abundante en las células de levadura. Se ha descrito que alcanza entre 0,1 % y 1 % del peso seco de la célula (Pocsi *et al.*, 2004). En las condiciones de crecimiento de simulación industrial realizadas en este trabajo, las células llegaron a superar el 1 % de glutatión y este porcentaje aumentó durante la deshidratación alcanzando hasta el 3 %. Espindola y colaboradores (2003) han relacionado la presencia de glutatión con la protección de las membranas en condiciones de anhidrobiosis. De acuerdo con estos autores, las grandes cantidades de glutatión acumuladas por la levadura industrial T73 en nuestro estudio pueden estar relacionadas con los bajos niveles de peroxidación de lípidos observados tanto en biomasa fresca como deshidratada. Estos niveles son entre 5-10 veces menores que los observados por los mismos autores en cepas de laboratorio, siendo esto quizá otro factor que justifique la elevada tolerancia frente a estrés de las cepas industriales. Esta acumulación de glutatión comienza a observarse al poco tiempo de introducir las células en la estufa o en el deshidratador de tipo lecho fluidizado y, al menos en las simulaciones en planta piloto, coincide con el aumento de expresión del gen *GSH1* (γ -glutamilcisteína sintetasa) que codifica para la primera enzima implicada en la biosíntesis de esta molécula (Ohtake y Yabuuchi, 1991). La elevada temperatura a la que se lleva a cabo el secado en planta piloto puede ser la responsable de la significativa inducción de la expresión del gen *GSH1* y por tanto de la síntesis de glutatión (Sugiyama *et al.*, 2000a). Esto explicaría porque en condiciones de laboratorio donde la temperatura del aire de secado es menor, la inducción del gen también es menor pero no explica los elevados niveles de glutatión alcanzados durante este proceso. Es ampliamente conocido que existe solapamiento entre la respuesta a estrés térmico y a estrés oxidativo (Moraitis y Curran, 2004 y 2007), tanto durante la exposición de las levaduras a agentes oxidantes como el H₂O₂ donde se inducen proteínas hsp (Pereira *et al.*, 2001) como frente a elevadas temperaturas que inducen la expresión y acumulación de proteínas implicadas en la defensa antioxidante (Sugiyama *et al.*, 2000a y 2000b; Kim *et al.*, 2006). En las condiciones en las que se realiza el secado, las células están sometidas a la pérdida de moléculas de agua a la misma vez que a elevadas temperaturas de secado, de forma que no es posible determinar si la inducción de la biosíntesis de glutatión es debida a un factor, a otro o a un efecto conjunto. En estas condiciones no es de extrañar que una de las respuestas más relevantes de la levadura sea frente a estrés oxidativo. Las elevadas temperaturas producen la acumulación de ROS posiblemente por el aumento de la respiración mitocondrial (Sugiyama *et al.*, 2000a) y la pérdida de moléculas de agua también favorece la formación y concentración de los radicales libres (Leprince *et al.*, 1994; França *et al.*, 2007).

Esta acumulación de ROS durante el secado no solo se ve reflejada en la inducción de la síntesis de glutatión sino también en el incremento de los niveles de GSSG y de malondialdehído (producto de la peroxidación de los lípidos) (Espindola *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2003; França *et al.*, 2005).

Un dato destacado en ambos protocolos de deshidratación es que los niveles de GSSG que inicialmente se incrementan indicando la existencia de estrés oxidativo durante el secado, vuelven a disminuir. Entre las enzimas antioxidantes inducidas por calor se encuentra la enzima glutatión reductasa, Glr1p (Kim *et al.*, 2006), que es la encargada de reducir el GSSG de nuevo a GSH utilizando NADPH como poder reductor. Las elevadas temperaturas del aire (50 °C - 60 °C inicialmente) utilizadas en el secado en planta piloto podrían haber desencadenado un incremento más rápido y elevado de esta enzima permitiendo la rápida recuperación observada del GSH; en cambio, a escala de laboratorio la temperatura del aire de secado al ser menor (35 °C) podría haber inducido la misma respuesta pero más lentamente. En estas condiciones de laboratorio, donde el proceso de secado es más largo y la pérdida de agua más progresiva, la respuesta celular al estrés oxidativo a pesar de estar en condiciones de baja actividad de agua consigue en parte paliar los efectos nocivos disminuyendo los niveles de peroxidación de lípidos (Espindola *et al.*, 2003). Posiblemente este efecto no se ve reflejado en condiciones de planta piloto por la rapidez del proceso. La rápida inducción de los sistemas antioxidantes, promovida por las condiciones de secado llevadas a cabo en la industria, puede estar relacionada con la elevada tolerancia a la deshidratación que muestran las levaduras industriales. En *Saccharomyces cerevisiae* se ha establecido que la acumulación de ROS induce la apoptosis y que este efecto se acentúa en cepas que carecen de glutatión (Madeo *et al.*, 1999). En líquenes y plantas, el estado redox del par GSH/GSSG y la capacidad de reducir la forma GSSG durante la rehidratación influyen de forma determinante en su tolerancia a la deshidratación (Kranter, 2002; Kranter *et al.*, 2002; Kranter *et al.*, 2006). En estos mismos organismos, también se ha observado correlación entre la muerte celular y el aumento de los niveles de GSSG, junto con la disminución del contenido total en glutatión.

Entre los experimentos realizados en planta piloto a diferentes temperaturas de secado no hubo apenas diferencias, la única variación notable en el producto final obtenido a 41 °C fue la mayor inducción del gen *GRX5* que codifica para una glutarredoxina monotiol. A diferencia de las glutarredoxinas ditiol, las glutarredoxinas monotiol no parecen estar relacionadas directamente con la defensa frente a estrés oxidativo. Estudios recientes han descubierto que están implicadas en el metabolismo del hierro (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 2002; Pujol-Carrión *et al.*, 2006; Ojeda *et al.*, 2006). Por lo tanto, el aumento de oxidación en las proteínas y la hipersensibilidad a agentes oxidantes observado en el mutante *grx5* (Rodríguez-Manzaneque *et al.*, 1999) se ha

vinculado a la formación de ROS debida a la reacción de Fenton y/o a la inactivación de enzimas como por ejemplo Sod2p, propiciada por la acumulación de hierro libre consecuencia del desacoplamiento de la síntesis de los centros Fe-S en la mitocondria (revisado en Herrero y de la Torre-Ruiz, 2007). El análisis de la expresión de este gen frente a diferentes condiciones de estrés, realizado por Rodríguez-Manzaneque y colaboradores (1999), indicó que no se induce en respuesta a agentes oxidantes, condiciones hiperosmóticas o aumento de temperatura. En función de esos estudios, cabe esperar que la inducción observada en el presente trabajo no sea debida a un efecto directo de la temperatura de secado, sin embargo, de forma indirecta la temperatura más elevada desencadena la aceleración de una serie de procesos como la pérdida de las moléculas de agua, acelerando la desestabilización de estructuras celulares (por ejemplo, la mitocondria) y la desnaturalización de proteínas, y la reducción del volumen celular produciendo la concentración de las moléculas intracelulares (por ejemplo, los iones metálicos), que pueden ser los responsables de esta inducción transcripcional. El aumento en la expresión del gen *GRX5* en procesos de deshidratación rápida apunta a un mayor requerimiento de proteínas con centros Fe-S o del mantenimiento de la homeostasis del hierro.

El análisis de las muestras de LSA de lotes industriales, pone de nuevo en evidencia el efecto que tienen las condiciones de cultivo y de deshidratación en el estado fisiológico de las células. Al no tener una biomasa en crema de referencia, los datos de expresión se relativizaron respecto de las cremas obtenidas en planta piloto pero, como se ha discutido anteriormente, las condiciones de obtención de la biomasa no son exactamente las mismas y esto puede conllevar una serie de cambios metabólicos que dificulten su comparación. Con la premisa de que las células obtenidas en planta piloto y en la industria proceden de cultivos en *fed-batch* con rampas de alimentación similares, los genes que destacan por su inducción en los lotes industriales son *GPD1*, *GSH1*, *STII* y *TRRI*, coincidiendo con el análisis en planta piloto. A pesar de las diferencias observadas tanto a nivel de expresión génica como en los niveles de peroxidación de lípidos y en la relación GSH/GSSG entre los mismos lotes industriales y en comparación con los productos obtenidos en planta piloto, la capacidad fermentativa (como se muestra en el capítulo I, Figura 1.6) no se ve notablemente afectada entre ellos pero sí con respecto a las levaduras deshidratadas a escala de laboratorio. La adición de emulsionantes y estabilizantes (en nuestro caso el monoestearato de sorbitán) y su papel protector durante la deshidratación podría ser causante de las diferencias de capacidad fermentativa observadas entre las dos simulaciones.

En resumen, los resultados obtenidos en medio YPD muestran que las condiciones de crecimiento influyen enormemente en el estado fisiológico de la biomasa final y en la respuesta celular durante procesamientos posteriores, por lo que la simulación de las condiciones industriales de propagación de biomasa a escala de laboratorio es imprescindible como

aproximación a las condiciones reales. En cuanto al proceso de deshidratación, las diferencias entre la simulación a escala de laboratorio y el proceso en planta piloto son evidentes pero los resultados obtenidos en este trabajo indican que los efectos que conllevan son similares y que la simulación es útil como una primera aproximación a la problemática industrial. Básicamente, en ambas deshidrataciones, la célula está sometida a temperaturas elevadas, pérdida de moléculas de agua y reducción del volumen celular, estos procesos facilitan la formación de ROS capaces de generar daños en múltiples constituyentes celulares. El presente estudio muestra la existencia de estrés oxidativo durante la deshidratación y la respuesta a este estrés como una de las más relevantes durante este proceso corroborando lo ya observado por otros autores en condiciones de laboratorio (Espindola *et al.*, 2003; Pereira *et al.*, 2003; França *et al.*, 2005 y 2007).

III

ESTUDIO DEL PAPEL DE LA TREHALOSA Y SU METABOLISMO DURANTE LA DESHIDRATACIÓN

La trehalosa es uno de los metabolitos más abundantes en las células de levadura y de forma destacada en las cepas vínicas industriales donde puede alcanzar un 20 % del peso seco de la célula (Degre, 1993). Su función como molécula protectora frente a diversos estreses ha sido descrita en numerosas ocasiones (revisado en Wiemken, 1990 y Elbein *et al.*, 2003). Sus características físicoquímicas, como son su elevada estabilidad e hidrofiliidad, su capacidad de formar cristales y de establecer interacciones a través de sus grupos hidroxilo (-OH) con los grupos fosfato de los fosfolípidos y los residuos polares de las proteínas, confieren a este metabolito unas propiedades excelentes para actuar como molécula de protección frente a la deshidratación (Crowe *et al.*, 1992; Argüelles, 2000). Las industrias productoras de levaduras suelen estimular la acumulación de este metabolito (y de otras moléculas implicadas en la respuesta a estrés), permitiendo la entrada en fase estacionaria de las células durante la etapa de maduración e incluso sometiénolas a condiciones moderadas de estrés (Degre, 1993; Eleutherio *et al.*, 1997). La síntesis de trehalosa es un factor importante en la tolerancia a condiciones subóptimas de crecimiento pero también es necesaria su movilización para generar una protección adecuada (revisado en Singer y Lindquist, 1998b).

En este capítulo se desarrolla el estudio realizado sobre la acumulación de trehalosa y la participación de las enzimas responsables de su degradación, las trehalasas, en la resistencia a la deshidratación en la levadura vínica T73. En primer lugar, se analizó la relevancia de la movilización de la trehalosa en la respuesta a estrés en cepas y condiciones de laboratorio, para posteriormente extrapolarlo a la cepa de levadura vínica T73 y a condiciones de deshidratación. Para abordar este estudio se han utilizado un conjunto de mutantes (construidos por nuestro grupo de investigación y algunos de ellos durante este trabajo) con delecciones sencillas y múltiples de genes implicados en la degradación y movilización de este disacárido, obtenidos en un fondo genético de cepa de laboratorio y también de cepa vínica.

3.1. Estudio del papel de la trehalosa y su movilización durante el estrés salino: aproximación a la problemática de la deshidratación con cepas y condiciones de laboratorio

Trabajos previos realizados en nuestro laboratorio (Gimeno-Alcañiz, 2000) acerca del metabolismo de la trehalosa en la cepa de laboratorio MCY1264 describieron la implicación de las enzimas de degradación de este metabolito en la tolerancia a estrés térmico, hiperosmótico y por etanol. Corroboraron el fenotipo de recuperación pobre del mutante *nth1* observado por otros autores (Nwaka *et al.*, 1995a y b; Wera *et al.*, 1999; Iwahashi *et al.*, 2000) y mostraron indicios de la participación de la trehalasa ácida en la respuesta a estrés. En base a estos resultados y gracias a la disponibilidad de una serie de mutantes en los genes que codifican las enzimas trehalasa en el fondo genético MCY1264 (los mutantes simples *nth1* y *ath1* y el doble mutante *nth1ath1*), se realizó un análisis preliminar de expresión génica de *NTH1* y *ATH1* en diferentes condiciones de estrés en las que se había descrito la participación de la trehalosa y/o de la trehalasa neutra: térmico, oxidativo, osmótico, salino y por ausencia de glucosa. Los resultados más significativos se obtuvieron en los tres últimos tipos, destacando el estrés salino donde se llevaron a cabo el resto de análisis que se describen a continuación.

3.1.1. Análisis de la expresión génica de las enzimas trehalasa, de sus actividades correspondientes y de su efecto sobre la acumulación de trehalosa durante el estrés salino

Los experimentos de estrés salino se llevaron a cabo a partir de células cultivadas en medio YPD hasta fase estacionaria que fueron transferidas a medio fresco YPD con NaCl 1,2 M y mantenidas en estas condiciones durante 1, 3, 6 y 24 horas. En las figuras 3.1 y 3.2 se muestran los datos de expresión de los genes *NTH1* y *ATH1* y la cuantificación de sus actividades enzimáticas correspondientes.

Como se observa en la Figura 3.1, la inoculación de las células de la cepa MCY1264 en medio fresco YPD en las condiciones control (panel A, barras sólidas azules) produce una disminución en los niveles de mRNA del gen *NTH1* por debajo del 50 % en las primeras 6 horas del experimento, seguramente debido a la represión por glucosa a la que está sujeto este gen (Parrou *et al.*, 1999; Zahringer *et al.*, 2000; François y Parrou, 2001). En cambio la presencia de NaCl 1,2 M mantiene constantes los niveles de expresión de *NTH1* durante las 24 horas analizadas (panel A, barras rayadas azules). Algo similar se observa en la actividad trehalasa neutra (Figura 3.1, panel B, barras azules), en las condiciones control la actividad se reduce al mismo nivel que la expresión génica, mientras que durante el estrés salino la actividad trehalasa neutra es elevada

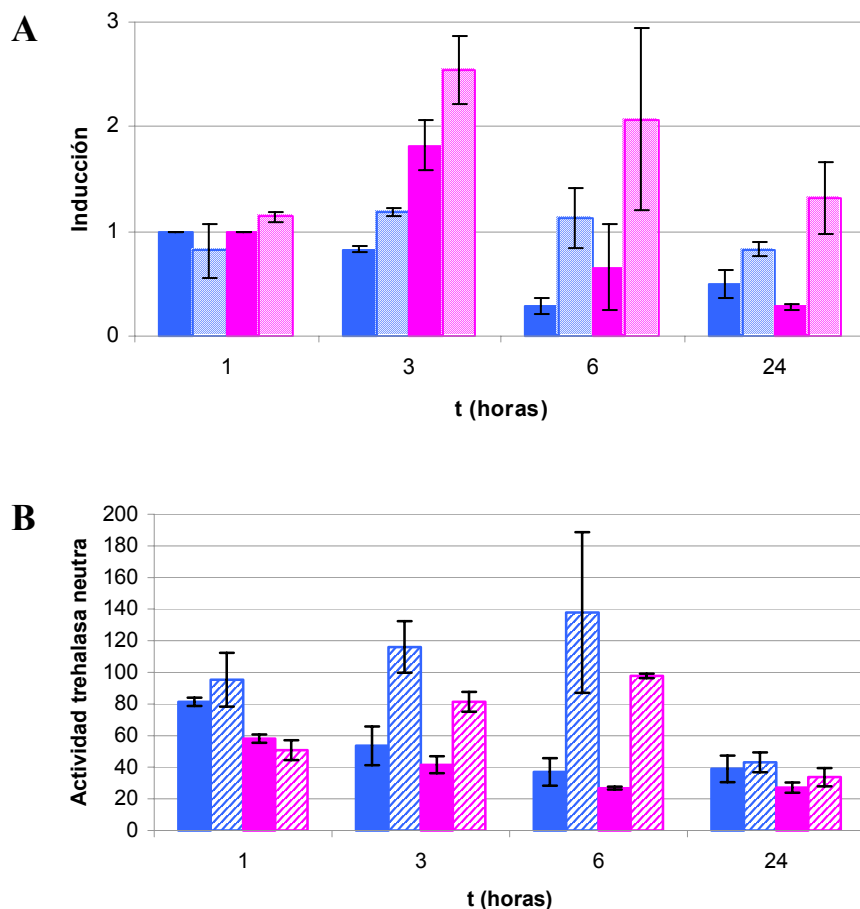


Figura 3.1. Niveles de mRNA del gen *NTH1* (panel A) y actividad trehalasa neutra (panel B, unidades: nmoles de glucosa/min/mg de proteína) en cepas de laboratorio durante el estrés salino. Los experimentos de estrés se realizaron a partir de cultivos en YPD crecidos hasta D.O.₆₀₀ 6,0, se recogieron las células y se inocularon en medio control YPD (barras sólidas) o en medio YPD con NaCl 1,2 M (barras rayadas). Las muestras se tomaron tras 1, 3, 6 y 24 horas de incubación a 30 °C en agitación. El análisis de la expresión génica se realizó mediante Northern Blot. Los valores mostrados corresponden a la media de al menos dos experimentos independientes. Cepas: MCY1264 (■) y *ath1* (■).

al menos, durante las primeras 6 horas de incubación. Cabe puntualizar que la actividad Nth1p detectada en la primera hora de incubación en ausencia de estrés (barras sólidas azules) fue más elevada de la que correspondería a células en fase estacionaria. Estudios realizados por San Miguel y Argüelles (1994) muestran que la adición de YPD a células desreprimidas produce un aumento temporal de la actividad trehalasa neutra durante la primera hora y una caída de la actividad trehalasa ácida, lo que explicaría los niveles observados en nuestras condiciones control. Los datos obtenidos para Nth1p en la cepa de referencia MCY1264 no coinciden con algunos estudios previos donde el uso de elevadas concentraciones de NaCl (1,5 M) evita la inducción de la expresión del gen *NTH1* y de su actividad asociada que sí se da a

concentraciones más bajas (Nwaka *et al.*, 1995b; Zahringer *et al.*, 1997; Zahringer *et al.*, 2000; Parrou *et al.*, 1997). Las diferencias podrían ser debidas a que esos estudios están realizados con células en fase exponencial y en períodos cortos de exposición a estrés (entre 40 minutos y 1 hora) mientras que, en este trabajo, los aumentos de expresión y actividad empiezan a manifestarse en incubaciones prolongadas (a partir de 3 horas) en células procedentes de cultivos en fase estacionaria.

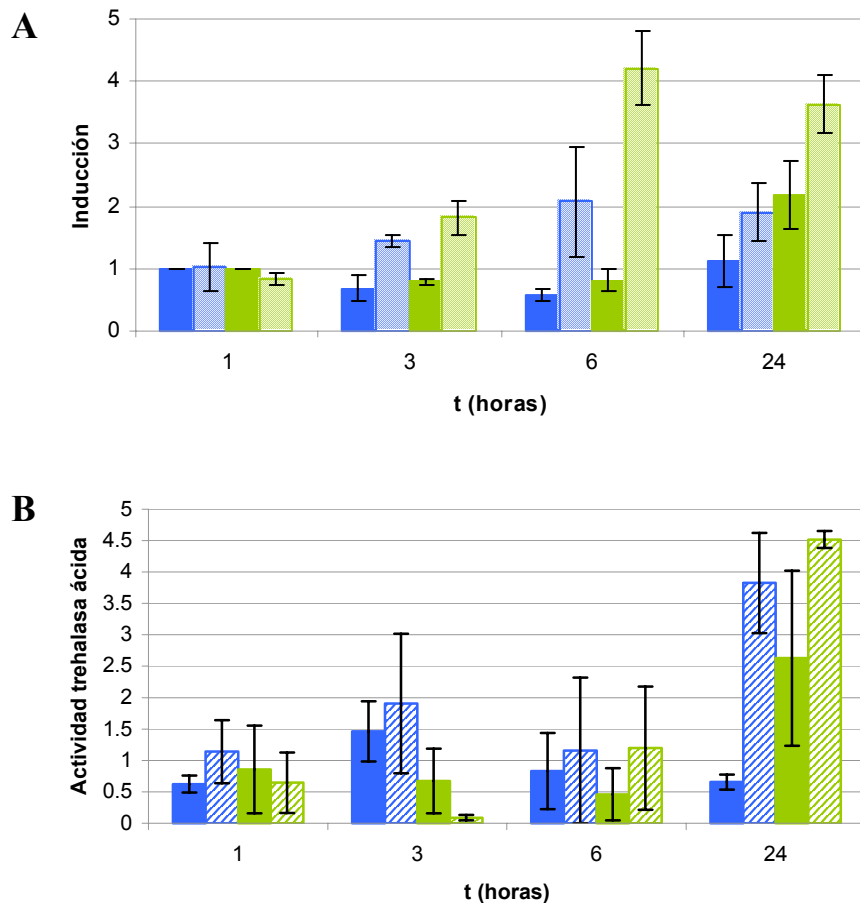


Figura 3.2. Niveles de mRNA del gen *ATH1* (panel A) y actividad trehalasa ácida (panel B, unidades: nmoles de glucosa/min/mg de proteína) en cepas de laboratorio durante el estrés salino. Los experimentos de estrés se realizaron a partir de cultivos en YPD crecidos hasta D.O.₆₀₀ 6,0, se recogieron las células y se inocularon en medio control YPD (barras sólidas) o en medio YPD con NaCl 1,2 M (barras rayadas). Las muestras se tomaron tras 1, 3, 6 y 24 horas de incubación a 30 °C en agitación. El análisis de la expresión génica se realizó mediante Northern Blot. Los valores mostrados corresponden a la media de al menos dos experimentos independientes. Cepas: MCY1264 (■) y *nth1* (■).

En la Figura 3.2 se muestra el análisis de expresión para el gen *ATH1* (panel A) y la actividad trehalasa ácida (panel B) en condiciones de estrés salino. Hasta el momento no se había descrito que el gen *ATH1* fuera inducible por estrés, pero en las condiciones ensayadas en este estudio los niveles de mRNA del gen *ATH1* en la cepa MCY1264 aumentan tras 3 horas de estrés salino

(Figura 3.2, panel A, barras rayadas azules), además esta inducción va acompañada del incremento de la actividad trehalasa ácida entre las 6 y 24 horas de estrés (Figura 3.2, panel B, barras rayadas azules). Comportamientos similares fueron obtenidos en los experimentos de estrés osmótico con sorbitol 0,9 M y en condiciones de privación de glucosa (Figura 3.3). Durante el estrés por sorbitol 0,9 M, la expresión del gen *ATH1* se induce progresivamente desde la primera hora de incubación, alcanzando niveles elevados tras 6 horas (Figura 3.3, panel A, izquierda) que coinciden con el incremento en la actividad trehalasa ácida (Figura 3.3, panel B, izquierda). En el estrés por ausencia de glucosa, el aumento en los niveles de mRNA se da tras 24 horas de incubación en medio sin glucosa YP (Figura 3.3, panel A, derecha) y de nuevo, concuerda con una elevada actividad de Ath1p (Figura 3.3, panel B, derecha).

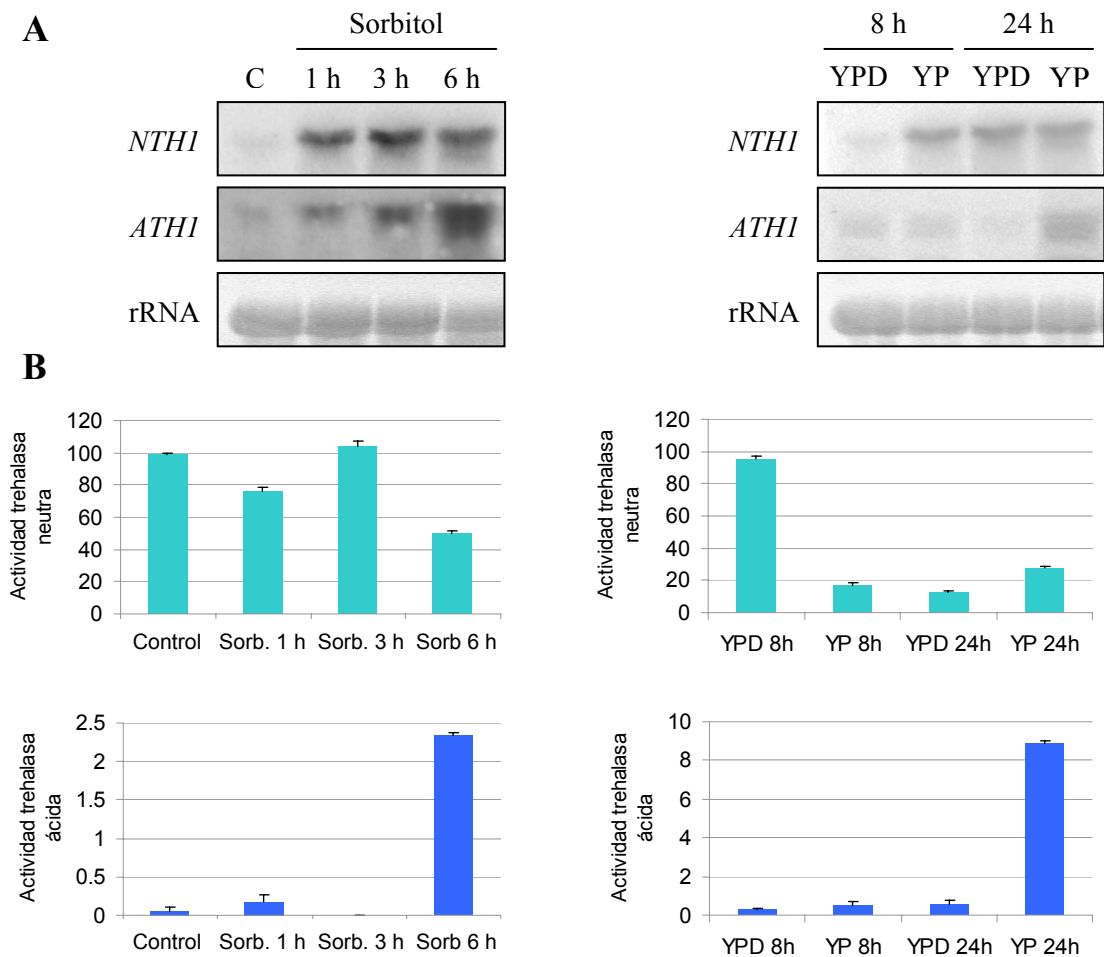


Figura 3.3. Expresión de los genes *NTH1* y *ATH1* (panel A) y actividades trehalasa (panel B) en cepas de laboratorio durante el estrés osmótico y en condiciones de privación de glucosa. Los experimentos de estrés se realizaron a partir de cultivos en YPD crecidos hasta D.O.₆₀₀ 1,0, se recogieron las células y se inocularon en medio control YPD, en medio YPD con sorbitol 0,9 M o en medio YP (sin glucosa). Las actividades trehalasa, neutra y ácida, se expresaron en nmoles de glucosa/min/mg de proteína. Los datos mostrados son representativos de 2 experimentos independientes.

La respuesta a estrés osmótico, ya sea por adición de NaCl o de sorbitol, está regulada por la vía HOG (Posas *et al.*, 2000; Rep *et al.*, 2000) y se ha descrito que la inducción del gen *NTH1* en condiciones hiperosmóticas depende de esta vía (Zahringer *et al.*, 2000). Con el fin de comprobar si ocurría algo similar con el gen *ATH1*, se aplicaron las mismas condiciones de estrés salino a una cepa en la que se había deletado el gen *HOG1* en paralelo con la cepa control MCY1264. El análisis de la expresión génica (Figura 3.4, panel A y panel B izquierda) muestra que la cepa *hog1* pierde la inducción de la transcripción del gen *ATH1* por estrés salino severo observada en la cepa de referencia MCY1264, siendo ésta la primera vez que se describe la regulación transcripcional dependiente de Hog1p para este gen. Simultáneamente se analizó la expresión del gen *NTH1* (Figura 3.4, panel B derecha) donde el efecto de la delección del gen *HOG1* sobre su inducción fue mínima y solo se observó una reducción clara en la exposición a NaCl 1,2 M durante 24 horas.

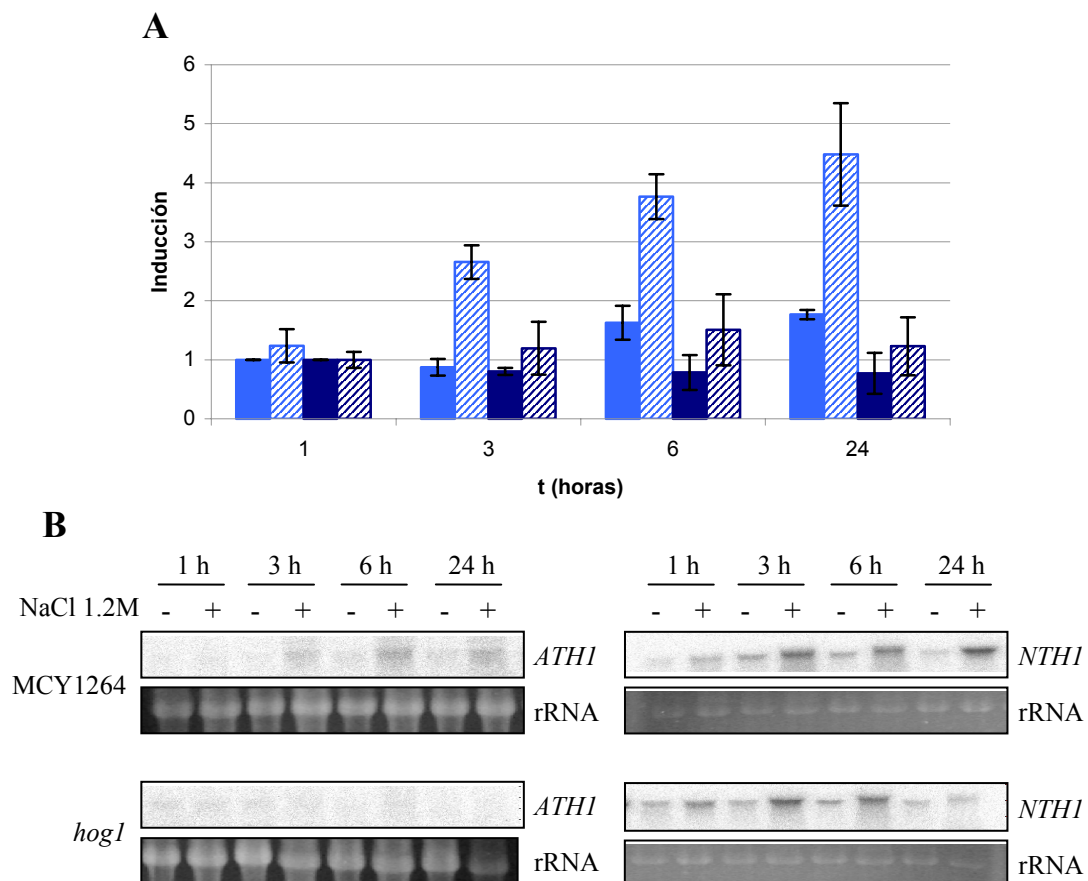


Figura 3.4. Efecto de la delección del gen *HOG1* en la inducción de la expresión del gen *ATH1* durante el estrés salino en la cepa de laboratorio MCY1264. Los experimentos de estrés se realizaron a partir de cultivos en YPD crecidos hasta D.O.₆₀₀ 6,0, se recogieron las células y se inocularon en medio control YPD (barras sólidas) o en medio YPD con NaCl 1,2 M (barras rayadas). Las muestras se tomaron tras 1, 3, 6 y 24 horas de incubación a 30 °C en agitación. En el panel A se muestra la media de dos experimentos independientes, la cuantificación fue realizada mediante autorradiografía electrónica. En el panel B se muestra el Northern Blot de uno de los experimentos para el gen *ATH1* y también se incluye uno de los Northern Blot realizados con la sonda del gen *NTH1*. Cepas: MCY1264 (■) y *hog1* (■).

Los resultados obtenidos para los mutantes simples *nth1* y *ath1* indican que la eliminación del gen de una de las enzimas trehalasa afecta a nivel transcripcional y a nivel de actividad enzimática a la otra trehalasa presente. La delección del gen *ATH1* (Figura 3.1, barras rosas) va acompañada de una mayor inducción de la expresión del gen *NTH1* tanto en las condiciones control como, de forma más notable, en presencia de estrés salino (panel A) en cambio, la actividad trehalasa neutra es menor que en la cepa control (panel B). De forma similar, el mutante *nth1* (Figura 3.2, barras verdes) presenta mayor acumulación de mRNA del gen *ATH1* durante el estrés salino (panel A), pero no mayor actividad enzimática trehalasa ácida excepto tras 24 horas de incubación en medio YPD (panel B).

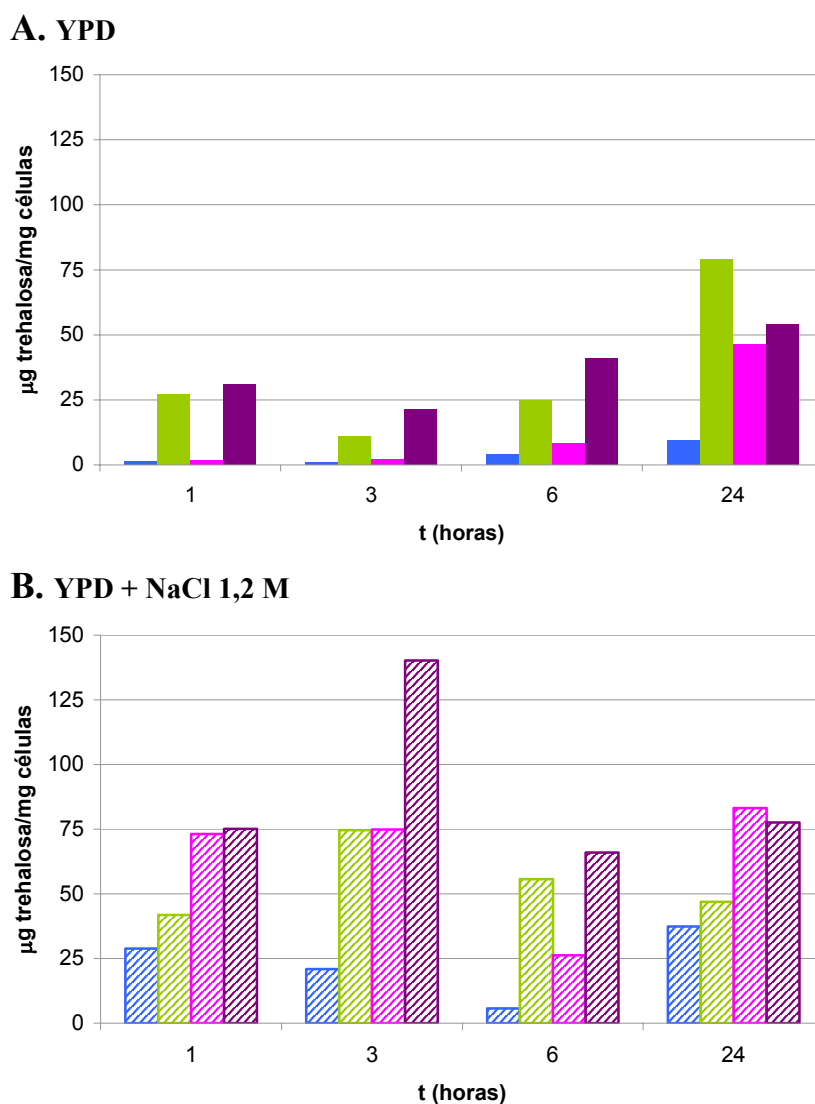


Figura 3.5. Acumulación de trehalosa en cepas de laboratorio durante el estrés salino. Los experimentos de estrés se realizaron a partir de cultivos en YPD crecidos hasta D.O.₆₀₀ 6,0, se recogieron las células y se inocularon en medio control YPD (panel A) o en medio YPD con NaCl 1,2 M (panel B). Las muestras se tomaron tras 1, 3, 6 y 24 horas de incubación a 30 °C en agitación. Los datos mostrados corresponden a un experimento representativo. Cepas: MCY1264 (■), *nth1* (■), *ath1* (■) y *nth1ath1* (■).

También se llevaron a cabo determinaciones de los niveles intracelulares de trehalosa en las cepas y condiciones descritas (Figura 3.5). En la cepa de referencia MCY1264 se observa que el estrés salino, al igual que otras condiciones de estrés (Attfield, 1987; Neves y François, 1992; Sharma, 1997; Kandror *et al.*, 2004), desencadena la acumulación de este metabolito (Figura 3.5, barras azules, paneles A y B). Como se ha comentado anteriormente para la actividad enzimática de Nth1p, los niveles de trehalosa presentados por la cepa MCY1264 tras la primera hora de incubación en las condiciones control son más bajos de los que cabría esperar para células en fase estacionaria (Figura 3.5, panel A), posiblemente debido a la elevada actividad de trehalasa neutra detectada como consecuencia de la adición de medio fresco. En incubaciones más prolongadas en medio YPD en ausencia de estrés, ya comienza a detectarse acumulación de este disacárido (entre las 6 y 24 horas) coincidiendo con la disminución de la actividad de Nth1p (vease Figura 3.1, panel B). La existencia de reciclaje de este metabolito, entendido como la existencia de síntesis y degradación simultánea de la trehalosa, se pone de manifiesto en los mutantes para las enzimas trehalasa que acumulan más cantidad de trehalosa que la cepa de referencia en condiciones de crecimiento en YPD y en presencia de NaCl 1,2 M (Figura 3.5, paneles A y B). A pesar de las diferencias notablemente significativas observadas en los niveles de actividad de Nth1p y Ath1p, la participación de ambas trehalasas en este reciclaje de la trehalosa es similar, principalmente en condiciones de estrés salino, donde el mutante *ath1* (panel B, barras rosas) acumula cantidades de este metabolito iguales e incluso en algunos puntos mayores que el mutante *nth1* (panel B, barras verdes). La mutación doble *nth1ath1* (barras moradas) no siempre produce un efecto aditivo, este mutante presenta niveles de trehalosa similares o algo superiores a los mutantes simples en la mayoría de los puntos analizados tanto en condiciones control como en presencia de NaCl.

Los datos moleculares y bioquímicos mencionados se completaron con un análisis de recuperación del crecimiento donde parte de las células fueron inoculadas en placas de YPD y se analizó su capacidad para crecer tras haber sido sometidas a estrés salino (Figura 3.6). La cepa MCY1264 y el mutante *nth1* presentan dificultades para crecer en YPD tras haber sido sometidas a estrés salino durante 1, 3 y 6 horas. Este fenotipo de crecimiento pobre no se observa en los mutantes *ath1* y *nth1ath1*, es decir la delección del gen *ATH1* mejora la tolerancia a estrés salino, hecho que se manifiesta durante la fase de recuperación una vez transcurre el estrés. Estas diferencias entre las cepas desaparecieron cuando las células fueron sometidas a estrés durante periodos prolongados (24 horas). En otras condiciones de estrés menos severas, como son el estrés osmótico con sorbitol 0,9 M o la deprivación de glucosa (Figura 3.7), las cepas mutantes no presentan estas diferencias de comportamiento.

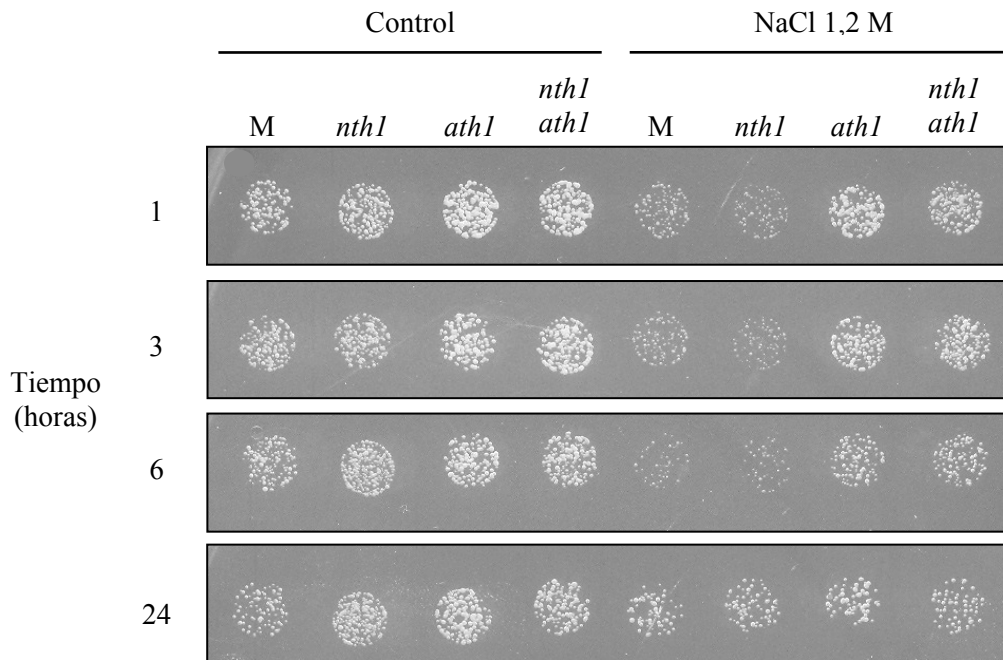


Figura 3.6. Crecimiento en placa de la cepa de laboratorio MCY1264 (M) y los mutantes para las enzimas trehalasa tras someterlas a estrés salino. Los goteos en placas de YPD se hicieron a partir de células incubadas durante 1, 3, 6 y 24 horas en medio líquido YPD (control) o en YPD con NaCl 1,2 M. Las placas fueron incubadas 25 horas a 30 °C. En la imagen se muestra la dilución 1×10^{-2} a partir de una dilución ajustada a D.O.₆₀₀ 1,0.

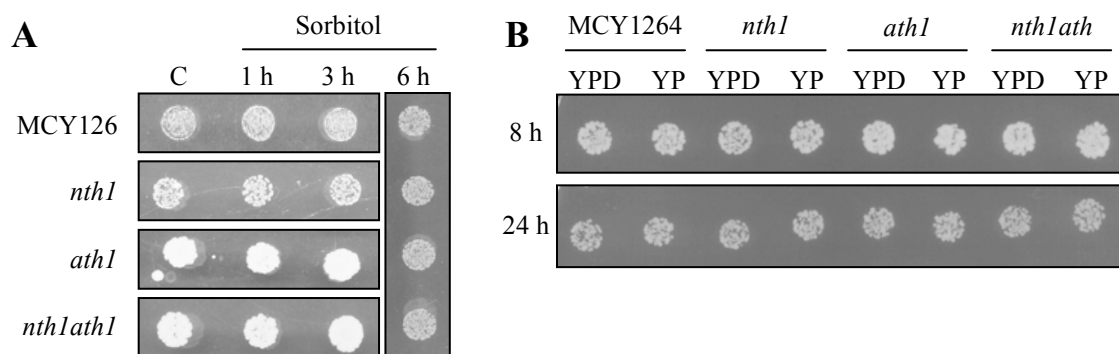


Figura 3.7. Crecimiento en placa de la cepa de laboratorio MCY1264 y los mutantes para las enzimas trehalasa tras someterlas a estrés osmótico con sorbitol 0,9 M (panel A) y en condiciones de privación de glucosa (medio YP) (panel B). Las condiciones de estrés aplicadas son las mismas que las descritas en la Figura 3.3 y en Materiales y Métodos. Se muestra la dilución 5×10^{-2} a partir de una dilución ajustada a D.O.₆₀₀ 1,0.

3.1.2 Movilización de la trehalosa durante la recuperación tras estrés salino

Los datos obtenidos indican que la participación de las trehalasas en la tolerancia a estrés está vinculada a la etapa de reanudación del crecimiento cuando se recuperan las condiciones óptimas. Para comprobar esta hipótesis se realizaron experimentos de recuperación tras someter a la cepa MCY1264 y sus derivados *nth1*, *ath1* y *nth1ath1* a 3 horas de estrés salino. Se hizo un seguimiento del crecimiento en medio líquido tras estrés (Figura 3.8, panel A) que confirmó los datos observados en medio sólido. Los mutantes *ath1* (trazo rosa) y *nth1ath1* (trazo morado) reanudan el crecimiento más rápidamente y alcanzan densidades celulares superiores que la cepa control (trazo azul) y el mutante *nth1* (trazo verde), empezando a mostrar diferencias notables tras 4 horas de recuperación. En la cuantificación del contenido de trehalosa (Figura 3.8, panel B), al igual que en los experimentos de estrés del apartado anterior (vease Figura 3.5, panel A, 3 horas), se observa que las cepas mutantes en los genes de las enzimas trehalasa acumulan más trehalosa durante el estrés salino que la cepa control (Figura 3.8, panel B, punto 0) y este efecto se agudiza en la cepa doble mutante *nth1ath1* (trazo morado), indicando que ambas enzimas trehalasa son responsables del reciclaje de la trehalosa durante condiciones de estrés salino. En la cepa control (trazo azul) y en el mutante *ath1* (trazo rosa) los niveles de trehalosa decaen drásticamente durante los primeros 30 minutos de incubación en medio fresco YPD en ausencia de estrés, mientras que en el mutante *nth1* (trazo verde) los niveles de trehalosa disminuyen lentamente a lo largo de la recuperación, indicando que la trehalasa neutra es la principal actividad implicada en la movilización rápida de la trehalosa tras estrés salino. Un resultado llamativo fue el observado en la cepa doble mutante, donde se habían eliminado las dos actividades hidrolasa descritas hasta el momento como responsables de la degradación de la trehalosa. Este mutante acumula grandes cantidades de este metabolito pero a diferencia de lo esperado, es capaz de movilizarlo hasta alcanzar niveles similares a los observados para el mutante *nth1* tras 4 horas de recuperación, lo que implica la existencia de otras actividades o procesos no descritos vinculados a la movilización de este disacárido.

El siguiente objetivo fue el estudio de otros genes candidatos a participar en la movilización de la trehalosa, utilizando la misma estrategia de delección empleada para los genes *NTH1* y *ATH1*. Uno de los genes seleccionados fue *NTH2* que se identificó en *Saccharomyces cerevisiae* por su elevado grado de identidad de secuencia (77 %) con el gen *NTH1* (Wolfe y Lohan, 1994). Hasta la fecha se habían detectado cambios a nivel transcripcional pero no se le había asociado ningún efecto sobre la movilización de la trehalosa (Nwaka *et al.*, 1995a y b). Se llevó a cabo la delección de este gen en el fondo genético MCY1264 y en el mutante *nth1ath1* obteniendo el mutante simple *nth2* y el triple mutante *nth1nth2ath1*. Los experimentos de recuperación del crecimiento en medio sólido mostraron que la mutación simple *nth2* no afectaba de forma

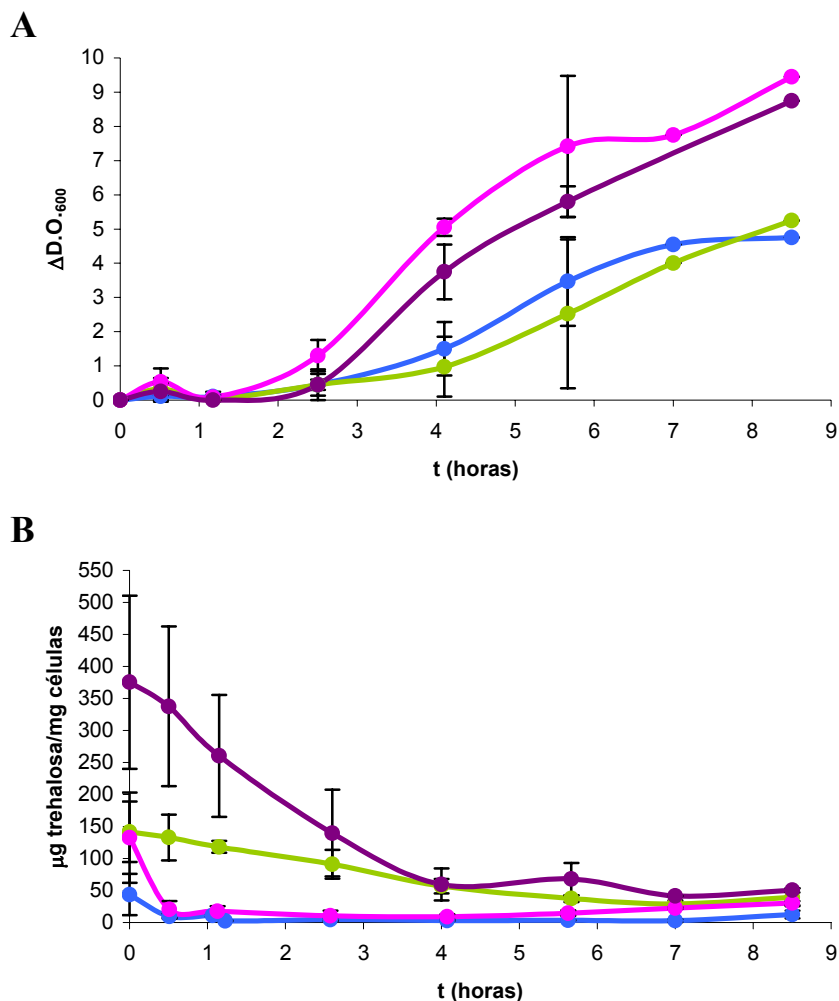


Figura 3.8. Incremento del crecimiento (panel A) y movilización de la trehalosa (panel B) en cepas de laboratorio durante la recuperación tras estrés salino. Las células crecidas hasta D.O.₆₀₀ 6,0 fueron incubadas 3 horas en medio YPD con NaCl 1,2 M, posteriormente se recogieron y se transfirieron al medio de recuperación (YPD líquido) donde se incubaron a 30 °C con agitación orbital durante 8,5 horas. Los valores mostrados corresponden a la media de al menos 3 experimentos independientes. Cepas: MCY1264 (●), *nth1* (●), *ath1* (●) y *nth1ath1* (●).

significativa al crecimiento tras 3 horas de estrés salino pero el triple mutante sí presentaba un fenotipo acusado de crecimiento pobre (Figura 3.9, panel A). Este resultado indica que el defecto observado en el mutante *nth1nth2ath1* no está asociado a la delección simple del gen *NTH2* sino a la suma de delecciones en los genes que codifican las trehalasas. Los datos obtenidos para el triple mutante fueron confirmados durante el crecimiento en medio líquido YPD (Figura 3.9, panel B, trazo naranja) donde la fase de latencia se extendió hasta las 4 horas de incubación y alcanzó densidades celulares por debajo de la cepa control MCY1264 (trazo azul). La acumulación de trehalosa en el mutante *nth1nth2ath1* durante el estrés fue mayor que en la cepa control pero por debajo de los niveles obtenidos para el doble mutante

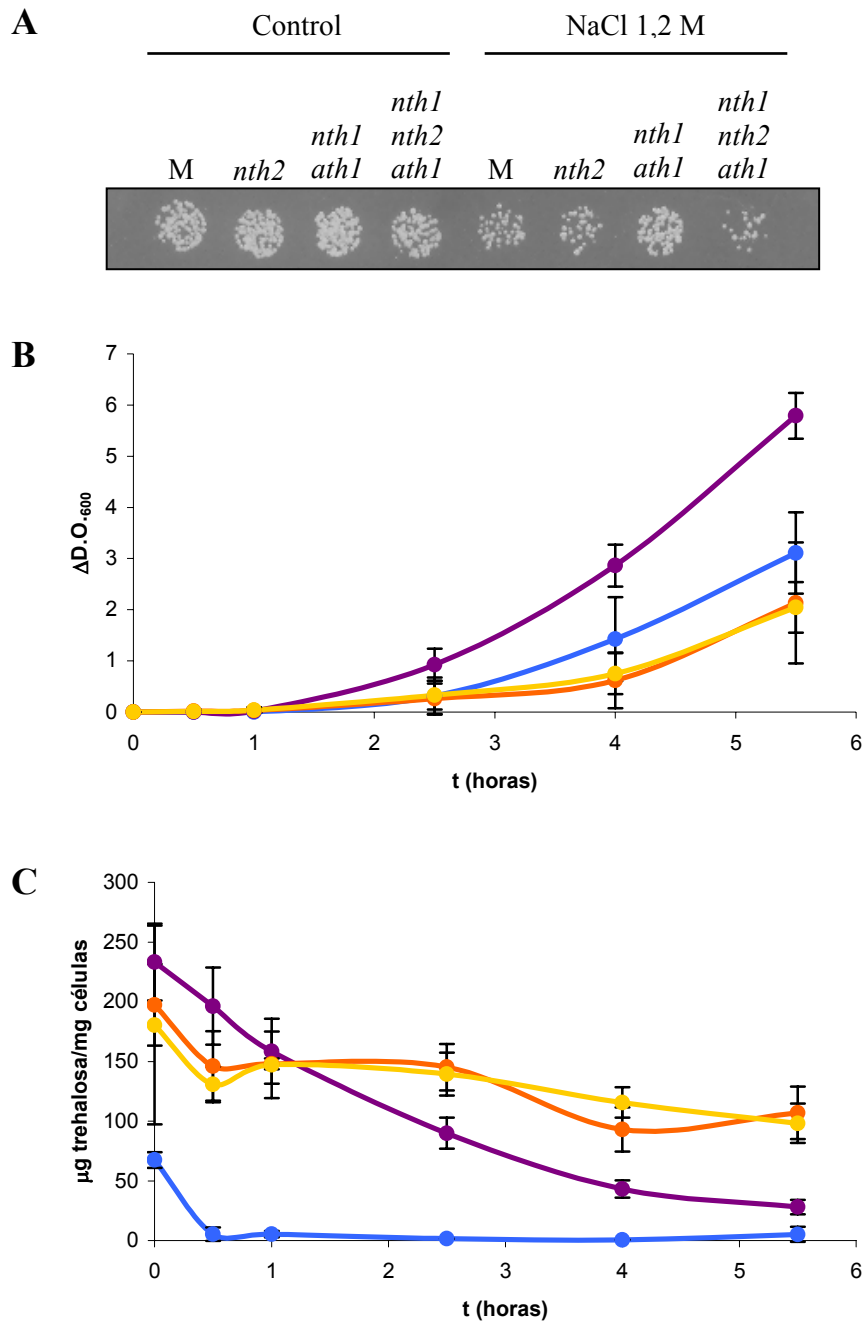


Figura 3.9. Efecto de la delección de los genes *NTH2* y *AGT1* en la cepa de laboratorio MCY1264 durante la recuperación tras estrés salino. Las células crecidas hasta D.O.₆₀₀ 6,0 fueron incubadas 3 horas en medio YPD con NaCl 1,2 M, posteriormente se recogieron y se transfirieron al medio de recuperación (YPD líquido) donde se incubaron a 30 °C con agitación orbital durante 5,5 horas. Se tomaron muestras a lo largo de la recuperación y se analizó el crecimiento como incremento de la D.O.₆₀₀ (panel B) y la movilización de la trehalosa (panel C). En el panel A se muestra el crecimiento en medio sólido YPD tras estrés salino (dilución 1×10^{-2} a partir de una dilución ajustada a D.O.₆₀₀ 1,0). Los valores mostrados corresponden a la media de 3 experimentos independientes. Cepas: MCY1264 (●), *nth1ath1* (●), *nth1nth2ath1* (●) y *nth1nth2ath1agt1* (●).

nth1ath1 (Figura 3.9, panel C, punto 0). Al inocular las células en medio YPD en ausencia de estrés se observó una disminución inicial de la concentración de trehalosa tras 30 minutos de incubación, pero durante el resto del tiempo analizado los niveles se mantuvieron prácticamente constantes mientras que, como se había observado anteriormente, el mutante *nth1ath1* movilizó gran parte del disacárido.

El bloqueo casi total de la movilización de la trehalosa en el mutante *nth1nth2ath1* pero no completo apuntaba a la existencia de más sistemas implicados en este proceso. Otro gen asociado a la movilización de este disacárido es *AGT1* que codifica para un transportador tipo simporte trehalosa-H⁺ de alta afinidad, implicado en la internalización de trehalosa extracelular (Stambuk *et al.*, 1999; Plourde-Owobi *et al.*, 1999 y 2000; Jules *et al.*, 2004). Se realizó la delección de este gen en la cepa triple mutante obteniendo el cuádruple mutante *nth1nth2ath1agt1*. Como se puede observar en la Figura 3.9 (paneles B y C), este nuevo mutante presentó un retraso en el crecimiento y una movilización de la trehalosa durante la recuperación tras estrés salino idéntica al triple mutante *nth1nth2ath1*. La similitud en los comportamientos del triple y el cuádruple mutante indica que el gen *AGT1* no está implicado en la eliminación de trehalosa intracelular, al menos en las condiciones ensayadas.

Estos resultados muestran por primera vez la participación del producto del gen *NTH2* en la movilización de la trehalosa y sugieren la existencia de otros sistemas de movilización de este metabolito aun desconocidos como podría ser un transportador de trehalosa hacia el exterior celular (Eleutherio *et al.*, 1993).

3.2. Papel de la trehalosa y de las enzimas trehalasa durante la deshidratación de T73. Modificaciones genéticas para la mejora del proceso de deshidratación industrial

El estudio de la movilización de la trehalosa en cepas de laboratorio en condiciones de estrés severo, como es el estrés salino aplicado, mostró la delección de los genes que codifican las enzimas trehalasa como una estrategia útil para aumentar el contenido en trehalosa en las células de levadura tanto en condiciones de crecimiento normal como en presencia de estrés. Además la delección del gen *ATH1* proporcionó una mayor tolerancia a estrés que se manifestó durante la recuperación del crecimiento. El siguiente objetivo fue aplicar esta estrategia en la cepa vínica T73 y estudiar su efecto en condiciones de deshidratación que, como se ha comentado a lo largo de los capítulos anteriores, es un estrés bastante severo. El efecto dañino de la deshidratación también se ilustra en la Figura 3.10 donde se puede observar la pérdida brusca de capacidad fermentativa en células con un contenido de humedad residual por debajo del 5 %.

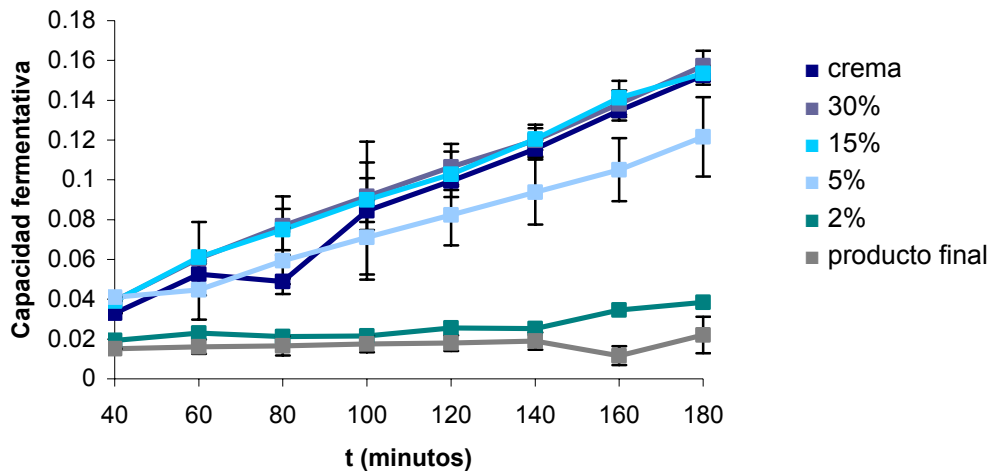


Figura 3.10. Capacidad fermentativa ((mL de CO₂ producidos/10⁷ células)/minuto) de la cepa vínica T73 durante la deshidratación en estufa de convección a 35 °C. La biomasa se obtuvo a partir de cultivos en fase estacionaria (48 horas de incubación a 30 °C con agitación) en medio YPD. Durante el secado se tomaron muestras a diferentes tiempos con diferentes contenidos en humedad residual y se analizó la producción de CO₂ al inocularlas en medio YPGF (10 % de glucosa y 10 % de fructosa). Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes.

Para la obtención de las cepas mutantes *Tath1*, *Tnth1ath1* y *Tnth1nth2ath1* en la levadura vínica T73 fue necesario realizar deleciones sucesivas mediante el sistema basado en el casete de interrupción loxP-KanMX-loxP y la recombinasa Cre (Guldener *et al.*, 1996). La cepa T73 resultó ser diploide para los genes *ATH1* y *NTH2*, mientras que en estudios previos realizados en nuestro laboratorio la deleción completa del gen *NTH1* se consiguió tras eliminar las 3 copias del gen presentes en esta cepa (Gimeno-Alcañiz, 2000). Para poder realizar esta técnica, donde el plásmido portador de la recombinasa Cre tiene como marcador de selección el gen *URA3*, se utilizó como fondo genético la cepa T73-4 (Puig, 1998) auxótrofa para el uracilo. Esta cepa tiene interrumpidas las dos copias del gen *URA3* por un fragmento de DNA de 470 pb del hongo filamentoso *Ashbya gossypii*. La presencia de auxotrofías y más concretamente la del uracilo se ha relacionado con efectos negativos sobre el crecimiento que pueden enmascarar el comportamiento real de las cepas modificadas donde se utiliza como marcador de selección (Chopra *et al.*, 1999). Para minimizar este posible efecto, una vez las interrupciones fueron completadas, se complementó la auxotrofia introduciendo por recombinación homóloga una copia intacta del gen *URA3* obtenida por restricción a partir del plásmido p*URA3* (Puig, 1998). La complementación también se llevó a cabo en la cepa T73-4 originando la cepa T73-4 *URA* que se utilizó como cepa control en todos los experimentos detallados en este apartado. Los transformantes se seleccionaron por su capacidad para crecer en medio mínimo sin uracilo. Se comprobó que las cepas portadoras de una copia funcional del gen *URA3* eran capaces de

alcanzar densidades celulares y cantidades de trehalosa similares a la cepa T73 sin ninguna modificación genética (Figura 3.11).

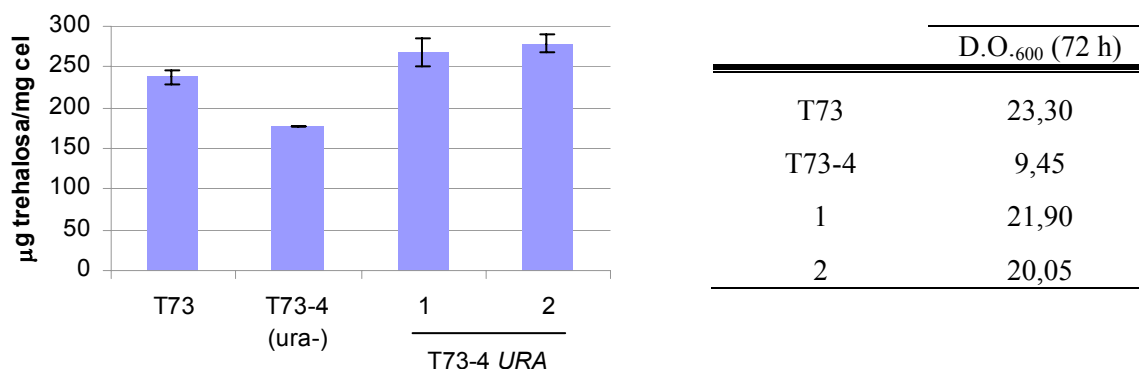


Figura 3.11. Comprobación de la complementación de la auxotrofia para el uracilo en la cepa T73-4 (*ura⁻*). Las cepas T73 (sin modificaciones genéticas), T73-4 y dos transformantes con una copia del gen *URA3* complementada (T73-4 *URA* 1 y 2) fueron crecidas en YPD a 30 °C en agitación durante 72 horas y se analizó el crecimiento alcanzado en D.O.₆₀₀ (tabla) y la acumulación de trehalosa (gráfica).

Una vez obtenidas las cepas vínicas industriales mutantes se abordó el estudio para establecer si alguna de las modificaciones genéticas relacionadas con la movilización de la trehalosa podía ser ventajosa para hacer frente a la deshidratación en la obtención de LSA. Para estos experimentos, la obtención de biomasa se realizó a partir de cultivos en YPD incubados durante 48 horas a 30 °C en agitación. Como se indica en los capítulos anteriores, la forma de cultivar las células y el medio empleado afectan notablemente al comportamiento de éstas en los procesamientos posteriores pero, debido a las complicaciones que supone aplicar las condiciones de simulación de producción industrial creímos más conveniente realizar este estudio preliminar de selección en condiciones de cultivo más sencillas, para en estudios posteriores comprobar si los fenotipos de interés se mantendrían en condiciones más similares a las industriales. Los experimentos de deshidratación a escala de laboratorio con las cepas mutantes y la cepa de referencia se realizaron de forma idéntica a la descrita en el capítulo I. Durante el secado a 35 °C en la estufa de convección se fueron extrayendo muestras con diferentes contenidos en humedad residual y se realizaron análisis de actividad trehalasa, acumulación de trehalosa, capacidad fermentativa y niveles de peroxidación de lípidos.

La Figura 3.12 muestra los datos obtenidos en la determinación de actividades trehalasa neutra y ácida en la cepa control T73-4 *URA* y los mutantes *Tnth1* y *Tath1*. En las condiciones ensayadas, a diferencia de lo observado en las cepas de laboratorio en cultivos en fase estacionaria (vease Figura 3.2, panel B; Figura 3.3, panel B, derecha), las células de la cepa vínica

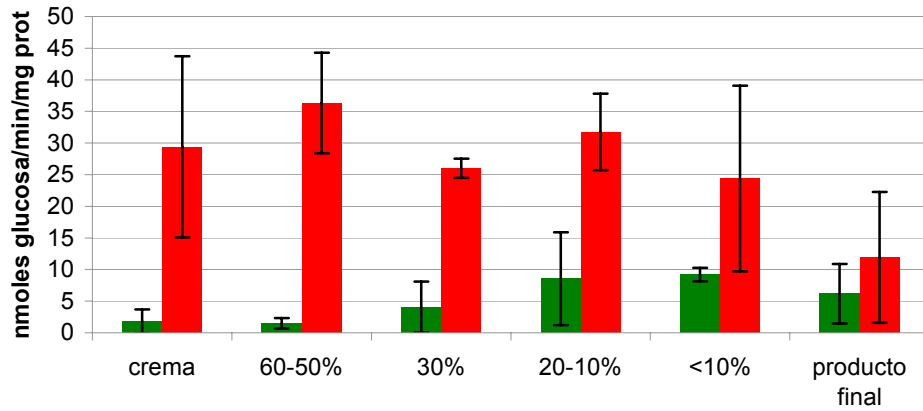
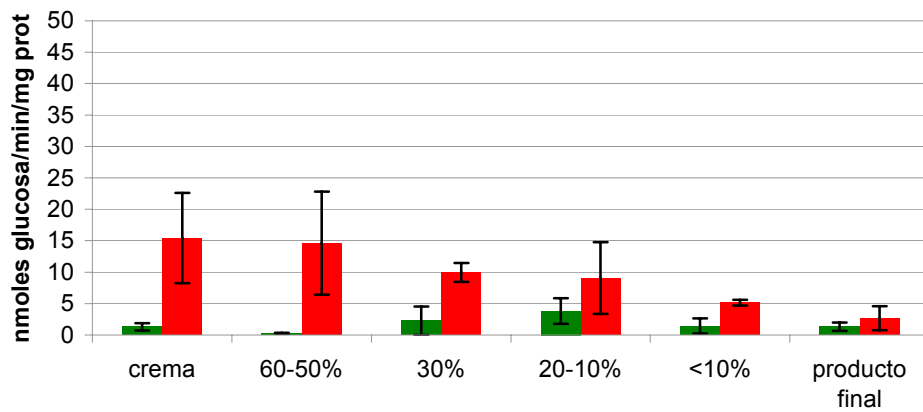
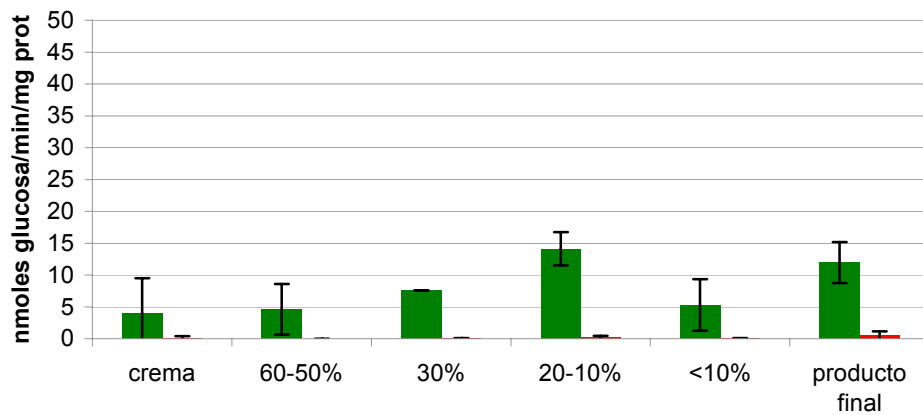
A. T73-4 URA**B. Tnth1****C. Tath1**

Figura 3.12. Valoración de las actividades trehalasa de la cepa vínica T73-4 URA (panel A) y de las cepas mutantes *Tnth1* (panel B) y *Tath1* (panel C), durante la deshidratación en estufa de convección a 35 °C. La biomasa se obtuvo a partir de cultivos en fase estacionaria (48 horas de incubación a 30 °C con agitación) en medio YPD. Durante el secado se tomaron muestras de 70 mg de células a diferentes tiempos con diferentes contenidos en humedad residual y se analizaron la actividad trehalasa neutra (■) y la actividad trehalasa ácida (■). Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes.

T73-4 *URA* presentan elevados niveles de actividad trehalasa ácida en la crema (Figura 3.12, panel A, barras rojas). Esta elevada actividad trehalasa ácida se mantiene bastante constante durante prácticamente todo el secado y solo declina cuando el contenido en humedad residual está por debajo del 10 %, coincidiendo con la caída en la capacidad fermentativa (vease Figura 3.10). La actividad trehalasa neutra (Figura 3.12, panel A, barras verdes) en la crema es aproximadamente 16 veces menor que la actividad trehalasa ácida, incrementándose ligeramente durante el secado cuando las células presentan menos del 30 % de humedad residual. La delección de uno de los genes, *NTH1* o *ATH1*, va acompañada de cambios en la actividad trehalasa dependiente del otro gen, corroborando la existencia de una interrelación entre estos genes ya puesta de manifiesto en los experimentos con cepas de laboratorio. En el mutante *Tnth1* (Figura 3.12, panel B), la actividad trehalasa ácida cuantificada en la crema es 2 veces menor que la presente en la cepa control y disminuye a lo largo del secado. Además como se puede apreciar en la figura, la delección del gen *NTH1* no eliminó por completo la actividad trehalasa neutra. Esta actividad residual también fue detectada en cepas de laboratorio (datos no mostrados). En cambio, la delección del gen *ATH1* (Figura 3.12, panel C) causa el incremento de la actividad trehalasa neutra manteniendo el patrón observado en la cepa de referencia.

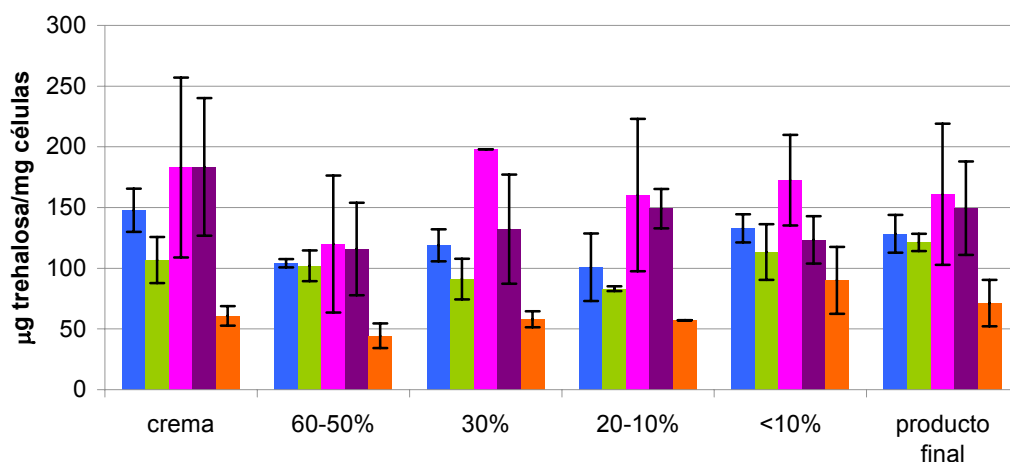


Figura 3.13. Niveles de trehalosa en la cepa vínica T73-4 *URA* y las cepas derivadas, mutantes en los genes de las trehalasas, durante la deshidratación en estufa de convección a 35 °C. La biomasa se obtuvo a partir de cultivos en fase estacionaria en medio YPD. Durante el secado se tomaron muestras de 10 mg de células a diferentes tiempos con diferentes contenidos en humedad residual y se analizó el contenido en trehalosa. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes. Cepas: T73-4 *URA* (■), *Tnth1* (■), *Tath1* (■), *Tnth1ath1* (■) y *Tnth1nth2ath1* (■).

Los datos de actividades trehalasa se complementaron con la determinación de los niveles intracelulares de trehalosa que se muestran en la Figura 3.13. La eliminación de las actividades trehalasa en la cepa vínica T73 tiene un efecto menor en la acumulación de trehalosa durante el crecimiento (Figura 3.13, crema) en comparación con las cepas de laboratorio (vease Figura 3.5) y también durante la deshidratación donde los niveles de trehalosa oscilan ligeramente pero sin un patrón definido. Como cabía esperar en función del análisis de actividades trehalasa en esta cepa, la delección del gen *NTH1* (Figura 3.13, barras verdes) no produce una mayor acumulación de trehalosa pero sí la eliminación del gen *ATH1* (Figura 3.13, barras rosas). La cepa doble mutante *Tnth1ath1* (Figura 3.13, barras moradas) presenta, en la mayoría de los casos, niveles de este disacárido similares a la cepa *Tath1*, concordando con los resultados obtenidos en los mutantes simples. El dato más destacado es la baja acumulación de trehalosa por parte del triple mutante *Tnth1nth2ath1* (Figura 3.13, barras naranjas), entre 2 y 3 veces menos disacárido que en la cepa de referencia.

Para testar el estado metabólico de estas cepas mutantes durante el secado, se analizó la capacidad de las células en diferentes estados de deshidratación para fermentar en condiciones de elevada concentración de azúcar (10 % de glucosa y 10 % de fructosa), como ocurriría al ser inoculadas en un mosto. La capacidad fermentativa mostrada en la Figura 3.14 corresponde a la media de las velocidades instantáneas de cada medida tomada cada 20 minutos durante un total de 160 minutos, entendiéndose como velocidad instantánea el incremento del volumen de CO₂ producido (en mL) por número de células y por tiempo en los 20 minutos transcurridos entre una medida y la siguiente. En las cremas (Figura 3.14, panel A), la capacidad fermentativa es similar a la presentada por la cepa control para la mayoría de los mutantes, excepto para el triple mutante *Tnth1nth2ath1* que es menor. En general, se mantiene constante sin pérdidas significativas durante la mayor parte del secado (hasta alcanzar humedades relativas entre el 20-30 %). Por debajo del 10 % de humedad residual, las células muestran una caída notable en la producción de CO₂ excepto la cepa *Tath1* que retiene un 99 % del poder fermentativo obtenido en la crema (Figura 3.14, panel B). De forma común para todas las cepas, el producto final del secado apenas es capaz de empezar a fermentar en las 3 horas que dura el ensayo.

Entre los efectos protectores de la trehalosa durante la deshidratación cada vez cobra más importancia su función antioxidante (França *et al.*, 2007). Como se ha comentado en el capítulo anterior, la oxidación de componentes celulares es un factor importante en la pérdida de viabilidad y vitalidad durante la deshidratación. En este trabajo se ha encontrado que existe una respuesta frente a este estrés durante el secado y datos previos obtenidos en nuestro laboratorio indican que la sobreexpresión de genes implicados en la defensa antioxidante permite que las células retengan mayor poder fermentativo tras la deshidratación (Pérez-Torrado, 2004). Para

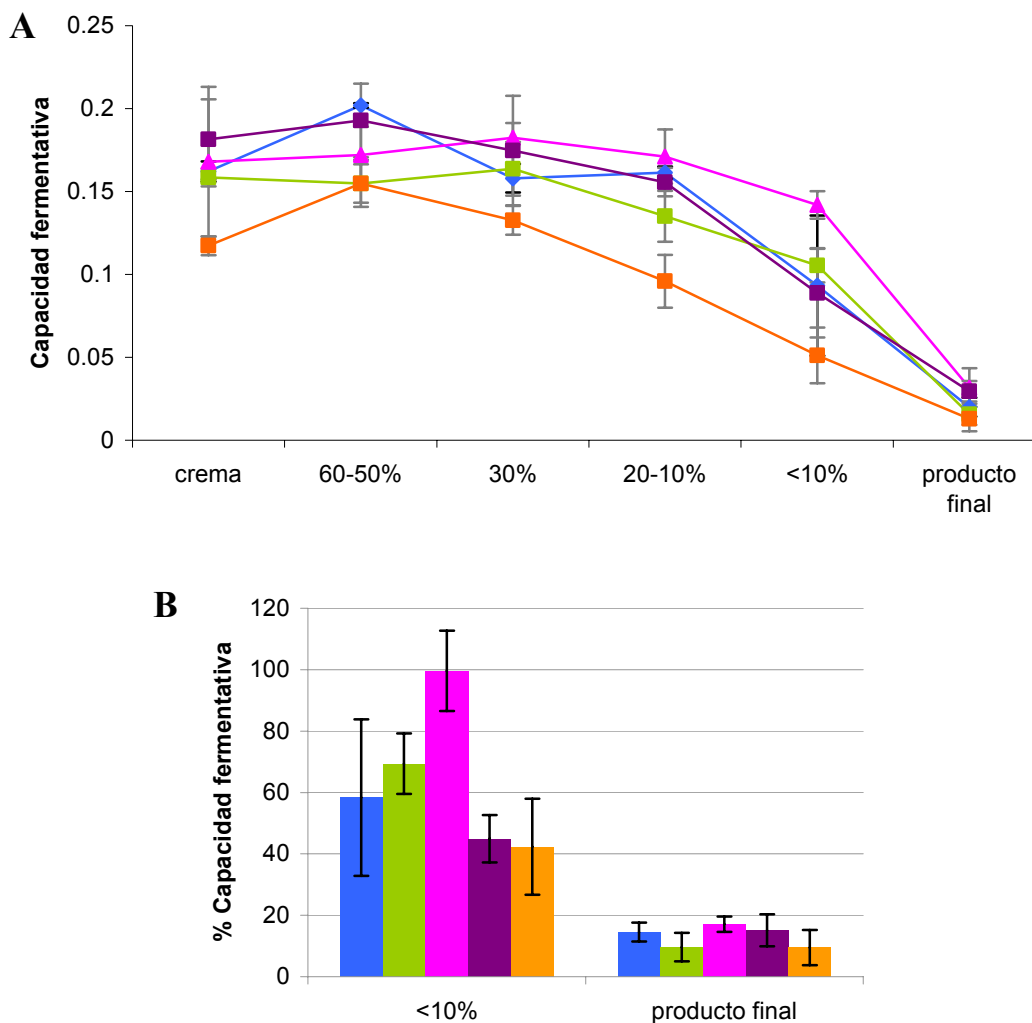
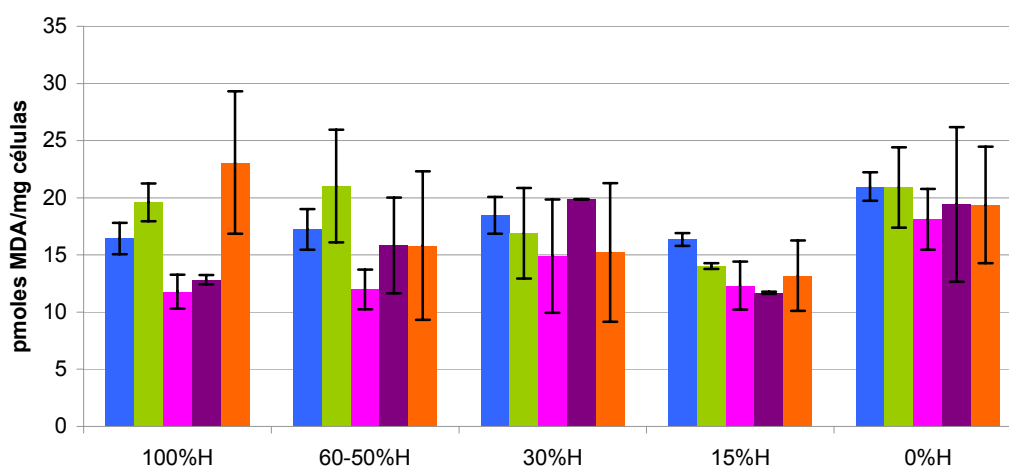


Figura 3.14. Capacidad fermentativa de las cepas mutantes en los genes de las enzimas trehalasa derivadas de la cepa vínica T73-4 *URA* durante la deshidratación en estufa de convección a 35 °C. La biomasa se obtuvo a partir de cultivos en fase estacionaria (48 horas de incubación a 30 °C con agitación) en medio YPD. Durante el secado se tomaron muestras a diferentes tiempos con diferentes contenidos en humedad residual y se analizó la producción de CO₂ al inocularlas en medio YPGF (10 % de glucosa y 10 % de fructosa). Panel A: capacidad fermentativa a los 160 minutos de ensayo ((mL de CO₂ producidos/10⁷ células)/minuto). Panel B: porcentaje de capacidad fermentativa retenida respecto de la crema. Los datos corresponden a la media de tres experimentos independientes. Cepas: T73-4 *URA* (■), *Tnth1* (■), *Tath1* (■), *Tnth1ath1* (■) y *Tnth1nth2ath1* (■).

comprobar si la mayor acumulación de trehalosa en las cepas mutantes, aunque ligera, era capaz de aportar mayor protección frente a los daños celulares producidos por la generación de ROS durante el secado, se determinó el grado de peroxidación lipídica a lo largo de este proceso. La peroxidación en las cremas obtenidas con los mutantes *Tath1* (Figura 3.15, barras rosas) y *Tnth1ath1* (Figura 3.15, barras moradas) son un 28 % y un 22 % menor que en la cepa de referencia, respectivamente, de acuerdo con una mayor acumulación de trehalosa en esas

muestras (24 % en ambas cepas). A su vez, las cepas mutantes *Tnth1* (Figura 3.15, barras verdes) y *Tnth1nth2ath1* (Figura 3.15, barras naranjas), que acumulan menos disacárido (28 % y 59 % menos, respectivamente), presentan mayor nivel de peroxidación lipídica, 19 % y 40 % respectivamente, de un orden similar a la trehalosa acumulada. Durante el secado, a diferentes humedades relativas, los niveles de MDA detectados son fluctuantes siendo difícil establecer algún patrón de comportamiento con las distintas cepas analizadas. En el producto final, todas las cepas alcanzan el mismo grado de peroxidación (entre 19-20 pmoles MDA/mg de células) independientemente de la cantidad de trehalosa presente en cada una de ellas.



	pmoles de MDA/mg de células	
	Crema	Producto final
T73-4 URA	16,44 ± 1,36	20,98 ± 1,24
T73nth1	19,60 ± 1,64	20,02 ± 3,52
T73ath1	11,79 ± 1,48	18,11 ± 2,65
T73nth1ath1	12,84 ± 0,42	19,41 ± 6,77
T73nth1nth2ath1	23,08 ± 6,23	19,37 ± 5,10

Figura 3.15. Niveles de peroxidación lipídica (pmoles de MDA/ mg de células) en la cepa vínica T73-4 URA y en los mutantes trehalasa derivados, durante la deshidratación a 35 °C en estufa de convección. La biomasa se obtuvo a partir de cultivos en fase estacionaria (48 horas) en medio YPD. Durante el secado se tomaron muestras a diferentes tiempos con diferentes contenidos en humedad residual y se cuantificaron los niveles de MDA. En la tabla se muestran los valores numéricos de la representación gráfica superior, obtenidos en la crema y en el producto final. Se muestran las medias obtenidas a partir de tres experimentos independientes para cada cepa. Cepas: T73-4 URA (■), *Tnth1* (■), *Tath1* (■), *Tnth1ath1* (■) y *Tnth1nth2ath1* (■).

3.3. Discusión

En este capítulo se ha abordado, primero, un estudio previo de la participación de las enzimas trehalasa en la respuesta a estrés en cepas y condiciones de laboratorio y su efecto sobre la movilización de la trehalosa en dichas condiciones. Segundo, la aplicación en cepas industriales de los conocimientos extraídos del primer estudio con el fin de mejorar la resistencia a la deshidratación. El uso de cepas de levadura de laboratorio conlleva una serie de ventajas que facilitan el estudio de posibles estrategias aplicables a levaduras industriales. Algunas de sus características, como su haploidía y la presencia de auxotrofías, contribuyen a la relativa sencillez para realizar modificaciones genéticas en ellas frente a las cepas industriales que son diploides o aneuploides (incluso poliploides) y además protótrofos. Por otro lado, el grueso de la investigación en levaduras está realizado con cepas y condiciones de laboratorio, de forma que el uso de sistemas similares facilita la comparación y comprensión de los resultados para posteriormente aplicarlos a cepas y condiciones industriales. Como se describe en el apartado 3.1, aunque se han analizado varias condiciones de estrés se ha hecho hincapié en el estrés por NaCl 1.2 M porque genera una secuencia de sucesos entre los que se encuentra la deshidratación celular. La elevada concentración de sales en el medio externo genera la salida masiva de agua del interior celular causando una rápida reducción del volumen, pérdida de la presión de turgor y la detención del crecimiento (Blomberg, 2000), eventos similares a los generados por la evaporación de las moléculas de agua durante el secado con aire caliente.

Por primera vez, estos experimentos desarrollados con cepas de laboratorio demuestran que no solo la expresión del gen *NTH1* y su actividad asociada se inducen en condiciones de estrés sino también la expresión del gen *ATH1* y la actividad trehalasa ácida. Además, la inducción de *ATH1* durante el estrés salino es dependiente de una vía HOG funcional reforzando la hipótesis de su implicación en la respuesta a estrés. Las diferencias en la expresión génica y en los patrones de actividades trehalasa corroboran la existencia de una regulación diferencial entre estas dos enzimas y, en el caso de Nth1p, dependiente de las condiciones de estrés. Como ha sido descrito previamente por otros autores, la inducción de la expresión génica y de la actividad enzimática de Nth1p varía en función del estrés aplicado, indicando diferentes vías de regulación transcripcional y postraducciona. De forma similar a otros estreses (Nwaka *et al.*, 1995a; Zahringer *et al.*, 1997, 1998 y 2000), la presencia de sorbitol produce una rápida inducción (durante la primera hora de estrés) de la expresión del gen *NTH1*. Esta inducción temprana es bastante común entre los genes regulados por la ruta general de respuesta a estrés (Estruch, 2000). En condiciones de ausencia de glucosa, de nuevo la expresión de *NTH1* se induce en incubaciones cortas (8 horas) en medio YP sin glucosa y tras 24 horas en medio YPD de acuerdo con la respuesta génica rápida descrita en condiciones de agotamiento de la fuente

de carbono (Parrou *et al.*, 1999; François y Parrou, 2001). En ambos casos esta inducción concuerda con la activación transcripcional mediada por los factores transcripcionales Msn2p/Msn4p y su interacción con secuencias STRE, de las cuales el gen *NTH1* posee tres en su promotor (Zahringer *et al.*, 2000). Pero en ambas condiciones, la actividad trehalasa neutra no coincide con la expresión de su gen, posiblemente debido a la regulación postraduccional por fosforilación a la que está sometida esta enzima (Jorge *et al.*, 1997; Nwaka y Holzer, 1998). Por ejemplo, la transferencia de células creciendo en YPD a un medio sin glucosa (YP) conlleva la inactivación de la PKA, responsable de la fosforilación de Nth1p, y por tanto la disminución de la actividad trehalasa neutra. En otras situaciones como el estrés salino realizado en este trabajo, el aumento en la expresión génica coincide con el aumento de actividad trehalasa neutra. Este comportamiento en el que el incremento en la actividad Nth1p es debido a la síntesis de proteínas *de novo* también ha sido descrito para otras situaciones de estrés causadas por elevadas temperaturas, la adición de H₂O₂ y la presencia de CuSO₄ o NaAsO₂ (Nwaka *et al.*, 1995b; Zahringer *et al.*, 1997). En cambio, Ath1p presenta el mismo comportamiento en todos los casos de estrés analizados. La actividad trehalasa ácida aumenta siguiendo un patrón similar a la transcripción del gen *ATH1*, es decir que la aparición de la actividad Ath1p se debe a la síntesis *de novo* de la proteína y no a una regulación postraduccional, como ya fue demostrado para el crecimiento en glucosa (San Miguel y Argüelles, 1994). A diferencia de la inducción de la expresión del gen *NTH1*, los niveles de transcrito del gen *ATH1* aumentan en situaciones prolongadas de estrés. Esta diferencia en el patrón de inducción, junto con la ausencia de secuencias STRE en el promotor de *ATH1*, refuerzan la idea de que los genes *NTH1* y *ATH1* presentan una regulación diferencial en la respuesta frente a estrés. Se ha detectado que en condiciones de estrés salino severo (1,4 M), existe una respuesta retardada en el tiempo dependiente de Hog1p y esto produce una inducción tardía y prolongada de genes controlados por esta ruta (entre las 4 y las 48 horas) (Van Wuytswinkel *et al.*, 2000), de forma similar al patrón de expresión observado para el gen *ATH1* en este trabajo. En cambio, para el gen *NTH1*, la inducción temprana en respuesta a estrés salino severo podría ser dependiente de la ruta de respuesta general a estrés, mientras que su mantenimiento durante períodos prolongados podría estar asociado a la respuesta retardada vía Hog1p coincidiendo con los cambios de expresión en el mutante *hog1* detectados en este estudio. Esta regulación de *NTH1* en respuesta a estrés salino está de acuerdo con la reducción parcial de la inducción de este gen en condiciones de estrés osmótico por sorbitol detectada en nuestro laboratorio (Pérez-Torrado, comunicación personal) y podría explicar por qué aunque se había propuesto la regulación de este gen por esta vía (Zahringer *et al.*, 2000) estos datos no habían sido confirmados por otros autores (Rep *et al.*, 2000).

Al igual que ocurre en otros estreses (Parrou *et al.*, 1997; González-Hernández *et al.*, 2005), *Saccharomyces cerevisiae* acumula trehalosa durante la respuesta a estrés salino. Esta acumulación concuerda con mayores niveles de mRNA de los genes de las subunidades formadoras del complejo trehalosa sintasa tras la exposición de las células a NaCl (Winderickx *et al.*, 1996; Posas *et al.*, 2000), así como con la acumulación de la subunidad Tps1p (Parrou *et al.*, 1997). Las cuantificaciones realizadas en este trabajo de los niveles de trehalosa durante este estrés en las diferentes cepas mutantes muestra que tanto Nth1p como Ath1p participan en la movilización de la trehalosa intracelular, corroborando que durante las condiciones de estrés se produce un importante reciclaje de este metabolito (Hottiger *et al.*, 1987b; Blomberg, 2000). Inicialmente se ha considerado la hidrólisis de la trehalosa extracelular como la función principal de la trehalasa ácida, basándose en la incapacidad del mutante *ath1* para crecer en medio con trehalosa como única fuente de carbono (Nwaka *et al.*, 1996). Los niveles de trehalosa presentados por la cepa *ath1* en las condiciones control de este trabajo correlacionan la ausencia de la actividad Ath1p con una elevada acumulación de este disacárido. Esta nueva función de Ath1p en la degradación de la trehalosa intracelular no está vinculada solamente a condiciones de estrés salino severo sino también a la fase estacionaria del crecimiento en YPD y a la recuperación una vez desaparece el estrés como indica la movilización de este metabolito en la cepa mutante *nth1*. Aunque esta posibilidad nunca había sido totalmente descartada, solo existían evidencias indirectas como el crecimiento pobre en glicerol del mutante *ath1* y su acentuación en el doble mutante (Nwaka *et al.*, 1995b) que apuntaban a la participación de esta enzima en la degradación de trehalosa intracelular como aporte de energía adicional en condiciones donde el aporte energético de la fuente de carbono es bajo.

Un resultado inesperado fue la movilización de la trehalosa por parte del doble mutante *nth1ath1*, que carece de las dos enzimas con actividad trehalasa descritas hasta la fecha, indicando la existencia de otras vías de eliminación de este metabolito. Una posibilidad era que el producto del gen *NTH2*, descrito por su elevada similitud con *NTH1*, fuera capaz de degradar la trehalosa en nuestras condiciones aunque previamente no se le hubiera asociado efecto alguno (Nwaka *et al.*, 1995b). En este estudio, la eliminación del gen *NTH2* en la cepa *nth1ath1* impidió en gran medida la movilización de la trehalosa durante la recuperación tras estrés salino, mostrando una función no descrita anteriormente para este gen. Sin embargo, la presencia de cierta movilización en los primeros minutos de recuperación en el triple mutante *nth1nth2ath1* y también en el cuádruple mutante *nth1nth2ath1agt1* indican que existen otros mecanismos implicados aun por identificar. La incapacidad para detectar la actividad trehalasa de la enzima Nth2p podría deberse al desconocimiento de sus requerimientos, lo que ha imposibilitado el diseño de un protocolo adecuado para su determinación. En algunos estudios realizados con mutantes *nth1*, así como en el presente trabajo, se detecta cierta actividad

trehalasa neutra residual que podría estar relacionada con Nth2p (Shima *et al.*, 1999; Gimeno-Alcañiz, 2000; Pedreño *et al.*, 2002). La participación de Nth2p solo ha sido evidente durante la recuperación del crecimiento tras estreses severos como temperaturas muy elevadas (50 °C-53 °C) durante incubaciones prolongadas (Nwaka *et al.*, 1995a y b) o en cepas deficientes en las actividades trehalasa principales (en este trabajo; Shima *et al.*, 1999), es decir en situaciones donde el crecimiento celular puede estar seriamente comprometido. Recientemente, se ha identificado a *NTH2* como un gen diana del factor transcripcional Crt1p, implicado en la respuesta frente a daño en el DNA. En presencia de daño Crt1p es hiperfosforilado y esta forma es incapaz de unirse al DNA, permitiendo así la transcripción de los genes regulados negativamente por él (Zaim *et al.*, 2005). La presencia del gen *NTH2* duplicado a partir de *NTH1*, podría tener como fin asegurar la existencia de una actividad trehalasa capaz de movilizar la trehalosa y permitir el reajuste del metabolismo central de la levadura en condiciones de daño en el DNA, que podría suponer que las actividades trehalasa principales no fueran funcionales o no fueran suficientes para llevar a cabo esta función.

Como se pone de manifiesto en este estudio, la delección del gen *ATH1* mejora la recuperación del crecimiento una vez se elimina el estrés salino, principalmente en incubaciones cortas. Las cepas mutantes *ath1* y *nth1ath1* crecen más rápido y alcanzan densidades celulares mayores que la cepa control y el mutante *nth1*. Comportamientos similares fueron observados por Kim y colaboradores (1996) en medio rico, donde además esta delección confirió resistencia a la deshidratación, a la congelación y a elevadas concentraciones de etanol. Estas mejoras fueron atribuidas a una mayor acumulación de trehalosa por parte de estos mutantes. En cambio, en nuestras condiciones la mejora observada no puede atribuirse solo a una mayor acumulación de disacárido ya que el mutante simple *nth1* parte de unos niveles de trehalosa similares al mutante *ath1* pero no presenta mejora en el crecimiento. Cabe puntualizar que las cepas utilizadas en este trabajo, a diferencia de las obtenidas por Kim y colaboradores (1996), se han construido mediante el sistema de delección con casete KanMX4 y su posterior eliminación (Guldener *et al.*, 1996), evitando efectos no deseados debidos a posibles diferencias en las auxotrofías entre las cepas mutantes y la cepa de referencia (Chopra *et al.*, 1999). Como indica el fenotipo de recuperación pobre tras estrés salino presentado por el triple mutante *nth1nth2ath1*, que es incapaz de movilizar la trehalosa, la degradación de este metabolito una vez desaparece el estrés es fundamental para el crecimiento. Su capacidad de interaccionar con membranas y proteínas no solo protege sino que también puede estar bloqueando actividades enzimáticas (Sebollela *et al.*, 2004) o impidiendo el acceso de las carabinas moleculares a proteínas parcialmente desnaturalizadas y/o agregadas (Singer y Lindquist, 1998a). El fenotipo del mutante *nth1nth2ath1* también puede estar asociado y de forma no excluyente, al modelo teórico de “muerte acelerada por sustrato” basado en el propio diseño de la glicólisis (Blomberg, 2000).

Las células sometidas a estrés salino, rápidamente se deshidratan y se frena su crecimiento, que es reanudado después de un período de adaptación. Esta detención del crecimiento va acompañada de una disminución en la síntesis de macromoléculas y por tanto de la demanda de ATP. Este modelo propone que el exceso de ATP facilitaría la fosforilación e incorporación rápida y masiva de glucosa estimulando las reacciones iniciales de la vía glicolítica, produciendo la acumulación de intermediarios fosforilados y el agotamiento del fosfato libre, lo que desencadenaría la muerte celular. El mantenimiento de un ciclo fútil de síntesis y degradación de trehalosa mantendría esta demanda evitando la acumulación de ATP. Posiblemente, el fenotipo causado por la delección del gen *ATH1* es un compendio de varios factores relacionados con las diversas funciones de la trehalosa y su metabolismo.

A la vista de los resultados obtenidos, el comportamiento de las cepas mutantes construidas en este trabajo podría explicarse en función de la trehalosa acumulada, su compartimentalización y otros mecanismos de movilización no descritos. La acumulación de grandes cantidades de trehalosa durante el estrés en el mutante *ath1* actuaría protegiendo a la célula y una vez recuperadas las condiciones óptimas, la elevada actividad Nth1p presente movilizaría rápidamente este metabolito permitiendo una rápida reanudación del crecimiento, ya sea por la eliminación directa del bloqueo producido por la trehalosa y/o por el aporte de glucosa en los estadios iniciales de la inoculación en medio fresco, ayudando en la adaptación metabólica a las nuevas condiciones (Novo *et al.*, 2003; Jung y Park, 2005). En el doble mutante *nth1ath1*, donde no hay actividad trehalasa neutra Nth1p capaz de movilizar esta trehalosa, gran parte del disacárido podría entrar en la vacuola para ser degradado por Ath1p pero al no estar presente esta actividad podría quedar secuestrado en su interior siendo una forma de eliminar parte de este metabolito del citoplasma mientras el resto es degradado por Nth2p. En cambio, en el mutante *nth1* aunque se acumule una elevada cantidad de trehalosa, no es movilizada eficientemente, la actividad trehalasa ácida es baja y aunque podría acumularse en la vacuola (como en el doble mutante) las diferencias en la movilización del disacárido indican que Nth2p no está actuando al menos al mismo nivel que en la cepa *nth1ath1*. Los análisis realizados por Nwaka y colaboradores (1995a) con el mutante *nth2* mostraron que en esa cepa los niveles de actividad trehalasa neutra eran similares a los de la cepa control pero la actividad trehalasa ácida aumentaba al doble. Estos resultados, junto con los comportamientos observados para las cepas mutantes en nuestro estudio, apuntan a la posible existencia de una interregulación entre Nth2p y Ath1p, de forma que la delección del gen *ATH1* podría causar la activación de Nth2p. La existencia de regulaciones cruzadas entre las enzimas trehalasa ha sido observada de forma indirecta tanto en este trabajo en cepa de laboratorio y en la cepa industrial T73, como en otros estudios (Shima *et al.*, 1999; Gimeno-Alcañiz, 2000; Pedreño *et al.*, 2002). La ausencia de diferencias entre las cepas en incubaciones prolongadas en presencia de NaCl 1,2 M y en las

otras condiciones de estrés ensayadas (presencia de sorbitol y ayuno de glucosa) indican que el comportamiento de estos mutantes está fuertemente influido por el tipo de estrés, el contenido en trehalosa, los niveles de actividades trehalasa e incluso por la presencia de otros factores relacionados con la adaptación a estrés y la fase de crecimiento (Lewis *et al.*, 1997).

Numerosos estudios relacionan la acumulación de trehalosa con una mayor resistencia a la deshidratación (Hottiger *et al.*, 1987a; Cerrutti *et al.*, 2000; Eleutherio *et al.*, 1997; Shima *et al.*, 1999) aunque no sea indispensable su presencia para adquirir cierta tolerancia en determinados estadios del crecimiento (Ratnakumar y Tunnacliffe, 2006). Además de propiciar el aumento de la concentración de trehalosa en las cepas vínicas de forma natural durante la obtención de la biomasa, que es una práctica habitual en la industria, la aplicación de modificaciones genéticas puede ser un buen sistema de obtención de cepas sobreacumuladoras de trehalosa. El aumento en la tolerancia a estrés presentado por las cepas de laboratorio deficientes en Ath1p junto con los elevados niveles de actividad trehalasa ácida en la cepa vínica T73 indicaban que la estrategia de la eliminación de las actividades trehalasa por delección de sus genes correspondientes podía ser útil como una forma de mejorar la resistencia a la deshidratación en cepas vínicas. Estrategias similares han sido aplicadas en levaduras panaderas con resultados satisfactorios (Shima *et al.*, 1999).

Los comportamientos mostrados por los mutantes generados en la cepa vínica T73 no fueron exactamente iguales a los observados en las cepas de laboratorio. La eliminación de las actividades trehalasa Nth1p y Ath1p en la cepa T73 no produjo incrementos en la acumulación de trehalosa tan llamativos. Las variaciones entre los análisis en cepas industriales y de laboratorio suelen ser frecuentes por las diferencias genéticas que existen entre ambas (Querol *et al.*, 2003; Hirasawa *et al.*, 2006). Mientras que en las cepas de laboratorio y en otros estudios publicados (Shima *et al.*, 1999; Gimeno-Alcañiz, 2000; Pedreño *et al.*, 2002) la eliminación de la actividad trehalasa Nth1p conlleva una importante acumulación de trehalosa, no es así en este estudio. Esta diversidad en los resultados concuerda con que la acumulación y degradación de trehalosa así como la predominancia de una actividad hidrolasa sobre la otra dependen de múltiples factores entre los que se encuentran el fondo genético (González-Hernández *et al.*, 2005), la etapa del crecimiento (San Miguel y Argüelles, 1994) y la disponibilidad de nutrientes (Lillie y Pringle, 1980; Novo *et al.*, 2004), haciendo a estas modificaciones dependientes de la cepa utilizada y de las condiciones de crecimiento empleadas. La cepa vínica T73 ya posee de partida una elevada concentración de trehalosa en comparación con la cepa de laboratorio MCY1264 y, teniendo en cuenta el efecto negativo sobre el crecimiento que puede ejercer una elevada cantidad de trehalosa en el citoplasma (Nwaka *et al.*, 1995a; Singer y Lindquist, 1998a y b), no es de extrañar que aunque los niveles de actividad trehalasa ácida detectados en T73 son

muy elevados, la delección del gen *ATH1* solo produzca un ligero incremento en los niveles de este disacárido. Este límite en la acumulación de trehalosa y su posible relación con un efecto nocivo se apoya también en los numerosos intentos realizados en nuestro laboratorio por incrementar los niveles de este metabolito en la cepa T73, por ejemplo mediante la sobreexpresión de los genes de síntesis con plásmidos multicopia que se pierden durante el crecimiento y solo producen incrementos de trehalosa ligeros y transitorios (Gimeno-Alcañiz, 2000).

La necesidad de un sistema funcional de degradación de trehalosa en esta cepa se pone de manifiesto de forma destacada en el triple mutante *Tnth1nth2ath1* que posee menor capacidad fermentativa en células frescas y la pierde más rápidamente durante el secado. Además, la eliminación de las actividades trehalasa no solo afecta a la degradación de la trehalosa sino que produce un desajuste en todo su metabolismo como indican los bajos niveles del disacárido acumulados por este mutante. La presencia de actividad trehalasa cobra mayor importancia en la deshidratación. Cuando las células son rehidratadas necesitan movilizar rápidamente la trehalosa y, al contrario que ocurría en las cepas de laboratorio, la presencia de *Nth2p* no es suficiente, así el doble mutante *Tnth1ath1* que alcanza una concentración de trehalosa similar al mutante *Tath1*, no presenta una mayor producción de CO₂.

La capacidad de la trehalosa para interactuar con los residuos polares de fosfolípidos y proteínas, junto con la propiedad de formar cristales estables durante la deshidratación, hace a este metabolito un buen candidato para actuar como molécula protectora frente al ataque de las ROS a los componentes celulares (Benaroudj *et al.*, 2001; França *et al.*, 2007). De acuerdo con la función protectora de la trehalosa frente a la peroxidación lipídica, propuesta por Herdeiro y colaboradores (2006), los niveles de MDA en las cremas fueron menores en los mutantes *Tath1* y *Tnth1ath1*, que son las cepas que acumulan más trehalosa. En estudios previos se ha mostrado que la adición externa de trehalosa (10 %) reduce la peroxidación de los lípidos en células deshidratadas (Pereira *et al.*, 2003). En cambio, en este trabajo las diferencias observadas en las cremas desaparecen en el producto totalmente deshidratado que presenta mayor nivel de peroxidación en todas las cepas, indicando que el incremento de trehalosa obtenido es capaz de proteger frente a la oxidación durante el crecimiento normal de las células pero no es suficiente para hacer frente a un proceso de estrés severo como es el secado.

En resumen, la deshidratación comienza a producir daños importantes en la levadura cuando su humedad residual está por debajo del 10 % y estos se ven reflejados en la reducción de la capacidad fermentativa al 60 %. La delección del gen *ATH1* en la cepa vínica T73 permite que las células con menos de un 10 % de humedad residual retengan un poder fermentativo similar al de las células frescas, coincidiendo con una mayor acumulación de trehalosa. Esta trehalosa

puede actuar protegiendo a los componentes celulares, como apuntan los niveles bajos de peroxidación lipídica presentados por el mutante *Tath1*, pero a su vez es movilizada permitiendo a las células recuperar adecuadamente su metabolismo normal. Como muy acertadamente describieron Singer y Lindquist (1998b), la trehalosa tiene un Ying y un Yang, dos caras opuestas pero inseparables, la acumulación de este metabolito es beneficioso siempre que su movilización sea posible. Los resultados obtenidos en este trabajo confirman que otra estrategia interesante para obtener cepas vínicas sobreeacumuladoras de trehalosa con propiedades tecnológicas adecuadas es la sobreexpresión de los genes de síntesis manteniendo el sistema de degradación intacto. Como se ha mencionado anteriormente, este aspecto ya ha sido abordado en nuestro laboratorio mediante plásmidos multicopia (Gimeno-Alcañiz, 2000). El ligero éxito obtenido nos ha llevado a plantearnos otras formas de realizar esta estrategia, que se están desarrollando actualmente en nuestro grupo de investigación.

CONCLUSIONES GENERALES

Las conclusiones generales que se deducen de este trabajo se detallan a continuación:

- Los protocolos de cultivo y deshidratación aplicados en la obtención de LSA tienen una incidencia importante en las propiedades tecnológicas de la levadura, afectando por tanto a los resultados de los análisis bioquímicos y fisiológicos realizados en el presente trabajo, aunque sin invalidar el uso de las aproximaciones a escala de laboratorio como herramienta inicial para abordar los puntos críticos del proceso industrial.
- A pesar de la evidente adversidad de las condiciones de deshidratación y de su efecto en la capacidad fermentativa de las levaduras vínicas, los análisis de expresión génica durante el proceso no muestran grandes respuestas a nivel transcripcional, probablemente debido al estado fisiológico en el que se encuentra la biomasa de partida, ya que el método industrial de propagación de la biomasa promueve que la célula de levadura tenga activos sus mecanismos de protección y respuesta a estrés.
- La respuesta a estrés oxidativo se perfila como la más relevante durante el proceso de deshidratación, como sugieren los parámetros bioquímicos de estado redox y daño oxidativo analizados en este estudio preliminar y en concordancia con lo observado previamente en nuestro laboratorio durante la fase de propagación de la biomasa.
- Durante la deshidratación de las levaduras vínicas, así como durante la respuesta a estrés salino severo en cepas de laboratorio, la trehalasa ácida Ath1p participa en la movilización de trehalosa intracelular. Dicha actividad, junto con la trehalasa neutra Nth1p y la trehalasa Nth2p, constituyen una maquinaria de actividades degradativas de trehalosa altamente regulada que compatibiliza el importante papel de la acumulación de este disacárido en la protección frente a estrés con su rápida eliminación para una adecuada recuperación del crecimiento.
- La elevada concentración de trehalosa y la disponibilidad de la actividad trehalasa neutra de Nth1p hacen que cepas de levadura vínica genéticamente manipuladas carentes del gen de la actividad trehalasa ácida (*ATH1*) resistan mejor las condiciones adversas del proceso de deshidratación, pudiendo obtenerse LSA con mayor capacidad fermentativa que la cepa silvestre. Estas propiedades de elevada concentración de trehalosa y capacidad de movilización podrían conseguirse también, e incluso mejorarse, mediante la sobreexpresión de los genes del complejo trehalosa sintasa.

LISTADO DE TABLAS Y FIGURAS

Introducción

Tabla I.1	Características enológicas importantes en la selección de las levaduras vínicas <i>S. cerevisiae</i> .	21
Tabla I.2	Ejemplos de modificaciones genéticas realizadas en <i>S. cerevisiae</i> y su aplicación en la producción de vino	25
Tabla I.3	Los sistemas enzimáticos más relevantes de defensa antioxidante de <i>S. cerevisiae</i> .	38
Tabla I.4	Los sistemas no enzimáticos más relevantes de defensa antioxidante de <i>S. cerevisiae</i> .	39
Figura I.1	Esquema del proceso industrial de obtención de levadura seca activa.	32
Figura I.2	Esquema de los sistemas glutatión/glutarredoxinas y tiorredoxina citosólicos y mitocondriales.	42
Figura I.3	Metabolismo de la trehalosa en la levadura <i>S. cerevisiae</i> .	51

Materiales y Métodos

Tabla M.1	Cepas de laboratorio de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	60
Tabla M.2	Cepas industriales de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	60
Tabla M.3	Plásmidos utilizados en este trabajo.	61
Tabla M.4	Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de PCR.	62
Tabla M.5	Oligonucleótidos utilizados en las reacciones de QRT-PCR.	64
Tabla M.6	Sondas utilizadas.	73
Figura M.1	Determinación colorimétrica del glutatión total mediante dos reacciones acopladas.	79

Resultados y Discusión

Tabla 2.1	Relación GSH/GSSG en las deshidrataciones realizadas a escala de laboratorio.	104
Tabla 2.2	Relación GSH/GSSG en las deshidrataciones realizadas en planta piloto.	110
Tabla 2.3	Relación GSH/GSSG y niveles de peroxidación lipídica en los lotes industriales.	113
Figura 1.1	Monitorización de los parámetros físico-químicos durante el proceso de propagación de la biomasa para la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73 a escala de planta piloto.	84

Figura 1.2	Seguimiento de algunos parámetros del proceso de propagación de la biomasa para la cepa <i>Saccharomyces cerevisiae</i> Lalvin T73 a escala de laboratorio.	87
Figura 1.3	Pérdida de humedad durante la deshidratación.	88
Figura 1.4	Niveles de trehalosa intracelular presentes en las cremas y en la levadura deshidratada.	90
Figura 1.5	Seguimiento de los niveles de trehalosa intracelular durante la deshidratación.	90
Figura 1.6	Análisis de la capacidad fermentativa de la levadura seca obtenida a escala de laboratorio y en planta piloto, y comparación con los lotes industriales.	91
Figura 2.1	Análisis mediante Northern Blot de la expresión de genes marcadores de estrés durante la deshidratación de la biomasa obtenida de cultivos en medio YPD.	98
Figura 2.2	Análisis mediante Northern Blot de la expresión de genes marcadores de estrés durante la deshidratación de la biomasa obtenida en producciones a escala de laboratorio.	99
Figura 2.3	Análisis mediante Northern Blot de la expresión de genes implicados en los sistemas de defensa antioxidante durante la deshidratación de la biomasa obtenida en producciones a escala de laboratorio.	101
Figura 2.4	Determinación del glutatión intracelular durante la deshidratación de la biomasa obtenida en producciones a escala de laboratorio.	103
Figura 2.5	Nivel de peroxidación de los lípidos durante la deshidratación de la biomasa obtenida en producciones a escala de laboratorio.	105
Figura 2.6	Análisis mediante QRT-PCR de la expresión de genes marcadores de estrés y de genes implicados en los sistemas de defensa antioxidante durante la deshidratación de la biomasa obtenida y deshidratada en planta piloto a 35 °C.	108
Figura 2.7	Análisis mediante QRT-PCR de la expresión de genes marcadores de estrés y de genes implicados en los sistemas de defensa antioxidante durante la deshidratación de la biomasa obtenida y deshidratada en planta piloto a 41 °C.	109

Figura 2.8	Determinación del glutatión intracelular durante la deshidratación de la biomasa obtenida y deshidratada en planta piloto a 35 °C y 41 °C.	110
Figura 2.9	Nivel de peroxidación de los lípidos durante la deshidratación de la biomasa obtenida y deshidratada en planta piloto a 35 °C y 41 °C.	111
Figura 2.10	Análisis mediante QRT-PCR de la expresión de genes marcadores de estrés y de genes implicados en los sistemas de defensa antioxidante en los lotes industriales.	112
Figura 3.1	Niveles de mRNA del gen <i>NTH1</i> y actividad trehalasa neutra en cepas de laboratorio durante el estrés salino.	124
Figura 3.2	Niveles de mRNA del gen <i>ATH1</i> y actividad trehalasa ácida en cepas de laboratorio durante el estrés salino.	125
Figura 3.3	Expresión de los genes <i>NTH1</i> y <i>ATH1</i> y actividades trehalasa en cepas de laboratorio durante el estrés osmótico y en condiciones de privación de glucosa.	126
Figura 3.4	Efecto de la delección del gen <i>HOG1</i> en la inducción de la expresión del gen <i>ATH1</i> durante el estrés salino en la cepa de laboratorio MCY1264.	127
Figura 3.5	Acumulación de trehalosa en cepas de laboratorio durante el estrés salino.	128
Figura 3.6	Viabilidad de la cepa de laboratorio MCY1264 y los mutantes para las enzimas trehalasa tras someterlas a estrés salino.	130
Figura 3.7	Viabilidad de la cepa de laboratorio MCY1264 y los mutantes para las enzimas trehalasa tras someterlas a estrés osmótico con sorbitol 0,9 M y en condiciones de privación de glucosa.	130
Figura 3.8	Incremento del crecimiento y movilización de la trehalosa en cepas de laboratorio durante la recuperación tras estrés salino.	132
Figura 3.9	Efecto de la delección de los genes <i>NTH2</i> y <i>AGT1</i> en la cepa de laboratorio MCY1264 durante la recuperación tras estrés salino.	133
Figura 3.10	Capacidad fermentativa de la cepa vínica T73 durante la deshidratación en estufa de convección a 35 °C.	135
Figura 3.11	Comprobación de la complementación de la auxotrofia para el uracilo en la cepa T73-4.	136

Figura 3.12	Valoración de las actividades trehalasa de la cepa vínica T73-4 <i>URA</i> y de las cepas mutantes <i>Tnth1</i> y <i>Tath1</i> , durante la deshidratación en estufa de convección a 35 °C.	137
Figura 3.13	Niveles de trehalosa en la cepa vínica T73	138
Figura 3.14	Capacidad fermentativa de las cepas mutantes para las enzimas trehalasa derivadas de la cepa vínica T73	140
Figura 3.15	Niveles de peroxidación lipídica en la cepa vínica T73	141

BIBLIOGRAFÍA

- Akhtar, N., Pahlman, A.K., Larsson, K., Corbett, A.H. y Adler, L. (2000) *SGD1* encodes an essential nuclear protein of *Saccharomyces cerevisiae* that affects expression of the *GPD1* gene for glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *FEBS Lett* **483**: 87-92.
- Alepuz, P.M., Jovanovic, A., Reiser, V. y Ammerer, G. (2001) Stress-induced map kinase Hog1 is part of transcription activation complexes. *Mol Cell* **7**: 767-777.
- Alepuz, P.M., de Nadal, E., Zapater, M., Ammerer, G. y Posas, F. (2003) Osmostress-induced transcription by Hot1 depends on a Hog1-mediated recruitment of the RNA Pol II. *EMBO J.* **22**: 2433-2442.
- Alizadeh, P. y Klionsky, D.J. (1996) Purification and biochemical characterization of the *ATH1* gene product, vacuolar acid trehalase, from *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **391**: 273-278.
- Amorós, M. y Estruch, F. (2001) Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *HSP26* and *HSP104* in a gene- and stress type-dependent manner. *Mol Microbiol* **39**: 1523-1532.
- Ansell, R., Granath, K., Hohmann, S., Thevelein, J.M. y Adler, L. (1997) The two isoenzymes for yeast NAD⁺-dependent glycerol 3-phosphate dehydrogenase encoded by *GPD1* and *GPD2* have distinct roles in osmoadaptation and redox regulation. *EMBO J* **16**: 2179-2187.
- App, H. y Holzer, H. (1989) Purification and characterization of neutral trehalase from the yeast ABYS1 mutant. *J Biol Chem* **264**: 17583-17588.
- Aranda, A., Matallana, E. y del Olmo, M. (2005) Levaduras. *Saccharomyces* I. Levaduras de primera fermentación. In *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V., Muñoz, R., y González, R. (eds). AMV Ediciones, pp. 19-56.
- Argüelles, J.C. (2000) Physiological roles of trehalose in bacteria and yeasts: a comparative analysis. *Arch Microbiol* **174**: 217-224.
- Ashrafi, K., Sinclair, D., Gordon, J.I. y Guarente, L. (1999) Passage through stationary phase advances replicative aging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**: 9100-9105.
- Attfeld, P.V. (1987) Trehalose accumulates in *Saccharomyces cerevisiae* during exposure to agents that induce heat shock response. *FEBS Lett* **225**: 259-263.
- Attfeld, P.V. (1997) Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol* **15**: 1351-1357.

- Austin, G.D., Watson, R.W.J. y Damore, T. (1994) Studies of Online Viable Yeast Biomass with A Capacitance Biomass Monitor. *Biotechnology and Bioengineering* **43**: 337-341.
- Barrio, E., González, S.S., Arias, A., Belloch, C. y Querol, A. (2006) Molecular Mechanisms Involved in the Adaptive Evolution of Industrial Yeasts. In *Yeasts in Food and Beverages*. Fleet, G.H. y Querol, A. (eds). Springer, pp. 153-173.
- Basu, A., Bhattacharyya, S., Chaudhuri, P., Sengupta, S. y Ghosh, A.K. (2006) Extracellular trehalose utilization by *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1760**: 134-140.
- Beck, T. y Hall, M.N. (1999) The TOR signalling pathway controls nuclear localization of nutrient-regulated transcription factors. *Nature* **402**: 689-692.
- Becker, J.V., Armstrong, G.O., van der Merwe, M.J., Lambrechts, M.G., Vivier, M.A. y Pretorius, I.S. (2003) Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res* **4**: 79-85.
- Bell, W., Sun, W., Hohmann, S., Wera, S., Reinders, A., De Virgilio, C., Wiemken A. y Thevelein, J.M. (1998) Composition and functional analysis of the *Saccharomyces cerevisiae* trehalose synthase complex. *J Biol Chem* **273**: 33311-33319.
- Benaroudj, N., Lee, D.H. y Goldberg, A.L. (2001) Trehalose accumulation during cellular stress protects cells and cellular proteins from damage by oxygen radicals. *J Biol Chem* **276**: 24261-24267.
- Beney, L., Marechal, P.A. y Gervais, P. (2001) Coupling effects of osmotic pressure and temperature on the viability of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 513-516.
- Blomberg, A. (2000) Metabolic surprises in *Saccharomyces cerevisiae* during adaptation to saline conditions: questions, some answers and a model. *FEMS Microbiol Lett* **182**: 1-8.
- Bonner, J.J., Chen, D., Storey, K., Tushan, M. y Lea, K. (2000) Structural analysis of yeast HSF by site-specific crosslinking. *Journal of Molecular Biology* **302**: 581-592.
- Bony, M., Bidart, F., Camarasa, C., Ansanay, V., Dulau, L., Barre, P. y Dequin, S. (1997) Metabolic analysis of *S. cerevisiae* strains engineered for malolactic fermentation. *FEBS Lett* **410**: 452-456.

- Boone, C., Sdicu, A.M., Wagner, J., Degré, R., Sánchez, C. y Bussey, H. (1990) Integration of the Yeast K1 Killer Toxin Gene into the Genome of Marked Wine Yeasts and Its Effect on Vinification. *Am J Enol Vitic* **41**: 37-42.
- Bose, S., Dutko, J.A. y Zitomer, R.S. (2005) Genetic factors that regulate the attenuation of the general stress response of yeast. *Genetics* **169**: 1215-1226.
- Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. y Kunkee, R.E. (1996) Yeast and Biochemistry of Ethanol Fermentation. In *Principles and Practices of Winemaking*. Davis: Chapman and Hall, pp. 102-192.
- Boy-Marcotte, E., Lagniel, G., Perrot, M., Bussereau, F., Boudsocq, A., Jacquet, M. y Labarre, J. (1999) The heat shock response in yeast: differential regulations and contributions of the Msn2p/Msn4p and Hsf1p regulons. *Mol Microbiol* **33**: 274-283.
- Brown, S.L., Stockdale, V.J., Pettolino, F., Pocock, K.F., de Barros, L.M., Williams, P.J., Bacic, A., Fincher, G.B., Høj, P.B. y Waters, E.J. (2007) Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *YOL155c* and *YDR055w*. *Appl Microbiol Biotechnol* **73**: 1363-1376.
- Buege, J.A. y Aust, S.D. (1978) Microsomal lipid peroxidation. *Methods Enzymol* **52**: 302-310.
- Bulman, A.L. y Nelson, H.C. (2005) Role of trehalose and heat in the structure of the C-terminal activation domain of the heat shock transcription factor. *Proteins* **58**: 826-835.
- Bustin, S.A. (2002) Quantification of mRNA using real-time reverse transcription PCR (RT-PCR): trends and problems. *Journal of Molecular Endocrinology* **29**.
- Cabiscol, E., Piulats, E., Echave, P., Herrero, E. y Ros, J. (2000) Oxidative stress promotes specific protein damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 27393-27398.
- Cardona, F., Carrasco, P., Pérez-Ortín, J.E., del Olmo, M. y Aranda, A. (2007) A novel approach for the improvement of stress resistance in wine yeasts. *Int J Food Microbiol* **114**: 83-91.
- Carrasco, P., Querol, A. y del Olmo, M. (2001) Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Arch Microbiol* **175**: 450-457.
- Causton, H.C., Ren, B., Koh, S.S., Harbison, C.T., Kanin, E., Jennings, E.G. *et al.* (2001) Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Mol Biol Cell* **12**: 323-337.

- Cerrutti, P., Segovia de, H.M., Galvagno, M., Schebor, C. y del Pilar, B.M. (2000) Commercial baker's yeast stability as affected by intracellular content of trehalose, dehydration procedure and the physical properties of external matrices. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**: 575-580.
- Chen, S.L. y Chiger, M. (1985) Production of baker's yeast. In *Comprehensive biotechnology*. Blanch, H.W., Drew, S., y Wang, D.I.C. (eds). New York: Pergamon Press, pp. 429-462.
- Chen, T.X. y Parker, C.S. (2002) Dynamic association of transcriptional activation domains and regulatory regions in *Saccharomyces cerevisiae* heat shock factor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**: 1200-1205.
- Chopra, R., Sharma, V.M. y Ganesan, K. (1999) Elevated growth of *Saccharomyces cerevisiae* *ATH1* null mutants on glucose is an artifact of nonmatching auxotrophies of mutant and reference strains. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2267-2268.
- Collinson, E.J., Wheeler, G.L., Garrido, E.O., Avery, A.M., Avery, S.V. y Grant, C.M. (2002) The yeast glutaredoxins are active as glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **277**: 16712-16717.
- Collinson, E.J. y Grant, C.M. (2003) Role of yeast glutaredoxins as glutathione S-transferases. *J Biol Chem* **278**: 22492-22497.
- Conlin, L.K. y Nelson, H.C. (2007) The natural osmolyte trehalose is a positive regulator of the heat-induced activity of yeast heat shock transcription factor. *Mol Cell Biol* **27**: 1505-1515.
- Cordente, A.G., Swiegers, J.H., Hegardt, F.G. y Pretorius, I.S. (2007) Modulating aroma compounds during wine fermentation by manipulating carnitine acetyltransferases in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **267**: 159-166.
- Craig, E.A. y Gross, C.A. (1991) Is Hsp70 the Cellular Thermometer. *Trends in Biochemical Sciences* **16**: 135-140.
- Crowe, J.H., Hoekstra, F.A. y Crowe, L.M. (1992) Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* **54**: 579-599.
- Crowe, J.H., Carpenter, J.F. y Crowe, L.M. (1998) The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol* **60**: 73-103.
- De Nadal, E., Alepuz, P.M. y Posas, F. (2002) Dealing with osmotic stress through MAP kinase activation. *EMBO Rep* **3**: 735-740.

- De Nadal, E., Casadome, L. y Posas, F. (2003) Targeting the MEF2-like transcription factor Smp1 by the stress-activated Hog1 mitogen-activated protein kinase. *Mol Cell Biol* **23**: 229-237.
- De Virgilio, C., Hottiger, T., Domínguez, J., Boller, T. y Wiemken, A. (1994) The role of trehalose synthesis for the acquisition of thermotolerance in yeast. I. Genetic evidence that trehalose is a thermoprotectant. *Eur J Biochem* **219**: 179-186.
- Degre, R. (1993) Selection and Commercial Cultivation of Wine Yeast and Bacteria. In *Wine Microbiology and Biotechnology*. Fleet, G.H. (ed). Harwood Academic Publishers, pp. 421-447.
- Delaunay, A., Isnard, A.D. y Toledano, M.B. (2000) H₂O₂ sensing through oxidation of the Yap1 transcription factor. *EMBO J* **19**: 5157-5166.
- Dequin, S. y Barre, P. (1994) Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH. *Biotechnology (N Y)* **12**: 173-177.
- Dequin, S. (2001) The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 577-588.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. y Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**: 680-686.
- Draculic, T., Dawes, I.W. y Grant, C.M. (2000) A single glutaredoxin or thioredoxin gene is essential for viability in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology* **36**: 1167-1174.
- Eglinton, J.M., Heinrich, A.J., Pollnitz, A.P., Langridge, P., Henschke, P.A. y de Barros, L.M. (2002) Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ALD6* aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast* **19**: 295-301.
- Elbein, A.D., Pan, Y.T., Pastuszak, I. y Carroll, D. (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* **13**: 17R-27R.
- Eleutherio, E.C., Araujo, P.S. y Panek, A.D. (1993) Role of the trehalose carrier in dehydration resistance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1156**: 263-266.
- Eleutherio, E.C., Maia, F.M., Pereira, M.D., Degre, R., Cameron, D. y Panek, A.D. (1997) Induction of desiccation tolerance by osmotic treatment in *Saccharomyces uvarum* var. *carlsbergensis*. *Can J Microbiol* **43**: 495-498.

- Erten, H. (2002) Relations between elevated temperatures and fermentation behaviour of *Kloeckera apiculata* and *Saccharomyces cerevisiae* associated with winemaking in mixed cultures. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **18**: 373-378.
- Escote, X., Zapater, M., Clotet, J. y Posas, F. (2004) Hog1 mediates cell-cycle arrest in G1 phase by the dual targeting of Sic1. *Nat Cell Biol* **6**: 997-1002.
- Espindola, A.S., Gomes, D.S., Panek, A.D. y Eleutherio, E.C. (2003) The role of glutathione in yeast dehydration tolerance. *Cryobiology* **47**: 236-241.
- Estruch, F. (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 469-486.
- Feinberg, A.P. y Vogelstein, B. (1983) A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal Biochem* **132**: 6-13.
- Ferreira, C., van Voorst, F., Martins, A., Neves, L., Oliveira, R., Kielland-Brandt, M.C. *et al.* (2005) A member of the sugar transporter family, Stl1p is the glycerol/H⁺ symporter in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* **16**: 2068-2076.
- Ferreira, C. y Lucas, C. (2007) Glucose repression over *Saccharomyces cerevisiae* glycerol/H⁺ symporter gene *STL1* is overcome by high temperature. *FEBS Lett* **581**: 1923-1927.
- Folch-Mallol, J.L., Garay-Arroyo, A., Lledias, F. y Covarrubias Robles, A.A. (2004) [The stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*]. *Rev Latinoam Microbiol* **46**: 24-46.
- França, M.B., Panek, A.D. y Eleutherio, E.C. (2005) The role of cytoplasmic catalase in dehydration tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress Chaperones* **10**: 167-170.
- França, M.B., Panek, A.D., y Eleutherio, E.C. (2007) Oxidative stress and its effects during dehydration. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* **146**: 621-631.
- François, J. y Parrou, J.L. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 125-145.
- Frick, O. y Wittmann, C. (2005) Characterization of the metabolic shift between oxidative and fermentative growth in *Saccharomyces cerevisiae* by comparative ¹³C flux analysis. *Microb Cell Fact* **4**: 30.
- Gan, Z.R. (1991) Yeast thioredoxin genes. *J Biol Chem* **266**: 1692-1696.

Gancedo, C. y Flores, C.L. (2004) The importance of a functional trehalose biosynthetic pathway for the life of yeasts and fungi. *FEMS Yeast Res* **4**: 351-359.

Ganguli, D., Kumar, C. y Bachhawat, A.K. (2007) The alternative pathway of glutathione degradation is mediated by a novel protein complex involving three new genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**: 1137-1151.

Garay-Arroyo, A., Colmenero-Flores, J.M., Garcarrubio, A. y Covarrubias, A.A. (2000) Highly hydrophilic proteins in prokaryotes and eukaryotes are common during conditions of water deficit. *J Biol Chem* **275**: 5668-5674.

Garay-Arroyo, A., Lledias, F., Hansberg, W. y Covarrubias, A.A. (2003) Cu,Zn-superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to hyperosmosis. *FEBS Lett* **539**: 68-72.

García, M.D., López-Coronado, J.M., López, L. y Uruburu, F. (2005) La conservación de cepas microbianas relacionadas con el vino. In *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V., Muñoz, R., y González, R. (eds). AMV Ediciones, pp. 342-360.

Garreau, H., Hasan, R.N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E. y Jacquet, M. (2000) Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **146 (Pt 9)**: 2113-2120.

Garrido, E.O. y Grant, C.M. (2002) Role of thioredoxins in the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress induced by hydroperoxides. *Mol Microbiol* **43**: 993-1003.

Gasch, A.P., Spellman, P.T., Kao, C.M., Carmel-Harel, O., Eisen, M.B., Storz, G. *et al.* (2000) Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol Biol Cell* **11**: 4241-4257.

Gasch, A.P. (2007) Comparative genomics of the environmental stress response in ascomycete fungi. *Yeast* (Published online in Wiley InterScience).

Gencer, M.A. y Mutharasan, R. (1979) Determination of Biomass Concentration by Capacitance Measurement. *Biotechnology and Bioengineering* **21**: 1097-1103.

Gervais, P., Marechal, P.A. y Molin, P. (1992) Effects of the Kinetics of Osmotic-Pressure Variation on Yeast Viability. *Biotechnology and Bioengineering* **40**: 1435-1439.

Gervais, P. y Marechal, P.A. (1994) Yeast Resistance to High-Levels of Osmotic-Pressure - Influence of Kinetics. *Journal of Food Engineering* **22**: 399-407.

Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R. y Woods, R.A. (1995) Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* **11**: 355-360.

Gil, J.V., Manzanares, P., Genovés, S., Vallés, S. y González-Candelas, L. (2005) Overproduction of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *Int J Food Microbiol* **103**: 57-68.

Gimeno-Alcañiz, J.V. Modificación de rutas metabólicas de utilización de la glucosa en cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae*: Aplicaciones bictecnológicas. (2000). Universitat de València. Tipo de referencia: Tesis.

Glover, J.R. y Lindquist, S. (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82.

Glover, J.R. y Tkach, J.M. (2001) Crowbars and ratchets: hsp100 chaperones as tools in reversing protein aggregation. *Biochem Cell Biol* **79**: 557-568.

González-Candelas, L., Cortell, A. y Ramón, D. (1995) Construction of a recombinant wine yeast strain expressing a fungal pectate lyase gene. *FEMS Microbiol Lett* **126**: 263-269.

González-Candelas, L., Gil, J.V., Lamuela-Raventos, R.M. y Ramón, D. (2000) The use of transgenic yeasts expressing a gene encoding a glycosyl-hydrolase as a tool to increase resveratrol content in wine. *Int J Food Microbiol* **59**: 179-183.

González-Hernández, J.C., Jiménez-Estrada, M. y Pena, A. (2005) Comparative analysis of trehalose production by *Debaryomyces hansenii* and *Saccharomyces cerevisiae* under saline stress. *Extremophiles* **9**: 7-16.

González, R., Muñoz, R. y Carrascosa, A.V. (2005) Producción de cultivos iniciadores para elaborar el vino. In *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V., Muñoz, R., y González, R. (eds). AMV Ediciones, pp. 318-341.

Gorner, W., Durchschlag, E., Martínez-Pastor, M.T., Estruch, F., Ammerer, G., Hamilton, B. *et al.* (1998) Nuclear localization of the C2H2 zinc finger protein Msn2p is regulated by stress and protein kinase A activity. *Genes Dev* **12**: 586-597.

Gorner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E.L., Ammerer, G., Ruis, H. y Schuller, C. (2002) Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO J* **21**: 135-144.

Gounalaki, N. y Thireos, G. (1994) Yap1p, a yeast transcriptional activator that mediates multidrug resistance, regulates the metabolic stress response. *EMBO J* **13**: 4036-4041.

Grant, C.M., MacIver, F.H. y Dawes, I.W. (1996) Glutathione is an essential metabolite required for resistance to oxidative stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **29**: 511-515.

Grant, C.M., MacIver, F.H. y Dawes, I.W. (1997) Glutathione synthetase is dispensable for growth under both normal and oxidative stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* due to an accumulation of the dipeptide gamma-glutamylcysteine. *Mol Biol Cell* **8**: 1699-1707.

Grant, C.M., Luikenhuis, S., Beckhouse, A., Soderbergh, M. y Dawes, I.W. (2000) Differential regulation of glutaredoxin gene expression in response to stress conditions in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1490**: 33-42.

Grant, C.M. (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Molecular Microbiology* **39**: 533-541.

Griffith, O.W. (1980) Determination of glutathione and glutathione disulfide using glutathione reductase and 2-vinylpyridine. *Anal Biochem* **106**: 207-212.

Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinbauer, J., y Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524.

Guyot, S., Ferret, E. y Gervais, P. (2006) Yeast survival during thermal and osmotic shocks is related to membrane phase change. *J Agric Food Chem* **54**: 8450-8455.

Halladay, J.T. y Craig, E.A. (1995) A Heat-Shock Transcription Factor with Reduced Activity Suppresses A Yeast Hsp70 Mutant. *Molecular and Cellular Biology* **15**: 4890-4897.

Hanahan, D. (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**: 557-580.

Harris, S.D. y Cotter, D.A. (1988) Transport of yeast vacuolar trehalase to the vacuole. *Can J Microbiol* **34**: 835-838.

Herdeiro, R.S., Pereira, M.D., Panek, A.D. y Eleutherio, E.C. (2006) Trehalose protects *Saccharomyces cerevisiae* from lipid peroxidation during oxidative stress. *Biochim Biophys Acta* **1760**: 340-346.

- Herrero, E. (2007) Glutarredoxinas y regulación redox de proteínas: lecciones de la levadura. Simposio Internacional: La biología de levaduras en el inicio del siglo XXI. Tipo de referencia: Comunicación personal.
- Herrero, E y de la Torre-Ruiz, MA (2007) Monothiol glutaredoxins: a common domain for multiple functions. *Cell Mol Life Sci* **64**: 1518-1530.
- Herrero, E. y Ros, J. (2002) Glutaredoxins and oxidative stress defense in yeast. *Methods Enzymol* **348**: 136-146.
- Herrero, E., Ros, J., Tamarit, J. y Bellí, G. (2006) Glutaredoxins in fungi. *Photosynth Res* **89**: 127-140.
- Hieda, K. (1982) Oxygen-Induced Genetic Changes in Dry Yeast-Cells. *Journal of Bacteriology* **150**: 963-965.
- Higgins, V.J., Rogers, P.J. y Dawes, I.W. (2003) Application of genome-wide expression analysis to identify molecular markers useful in monitoring industrial fermentations. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7535-7540.
- Hirasawa, T., Nakakura, Y., Yoshikawa, K., Ashitani, K., Nagahisa, K., Furusawa, C. *et al.* (2006) Comparative analysis of transcriptional responses to saline stress in the laboratory and brewing strains of *Saccharomyces cerevisiae* with DNA microarray. *Appl Microbiol Biotechnol* **70**: 346-357.
- Hoffman, C.S. y Winston, F. (1987) A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene* **57**: 267-272.
- Hohmann, S. (2002) Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts. *Microbiol Mol Biol Rev* **66**: 300-372.
- Hohmann, S., Krantz, M. y Nordlander, B. (2007) Yeast osmoregulation. *Methods Enzymol* **428**: 29-45.
- Hongisto, H.J. y Laakso, P. Application of the Finn-sugar-Pfeiffer and Langren desugaring process in a beet sugar factory. 20th General Meeting of the American Society of Sugar Beet Technology (1978). Tipo de referencia: Conferencia.
- Hottiger, T., Boller, T. y Wiemken, A. (1987a) Rapid changes of heat and desiccation tolerance correlated with changes of trehalose content in *Saccharomyces cerevisiae* cells subjected to temperature shifts. *FEBS Lett* **220**: 113-115.

Hottiger, T., Schmutz, P. y Wiemken, A. (1987b) Heat-induced accumulation and futile cycling of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **169**: 5518-5522.

Hounsa, C.G., Brandt, E.V., Thevelein, J., Hohmann, S. y Prior, B.A. (1998) Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress. *Microbiology* **144 (Pt 3)**: 671-680.

Huang, J., Reggiori, F. y Klionsky, D.J. (2007) The Transmembrane Domain of Acid Trehalase Mediates Ubiquitin-independent Multivesicular Body Pathway Sorting. *Mol Biol Cell*.

Ikner, A. y Shiozaki, K. (2005) Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat Res* **569**: 13-27.

Ishida, N., Saitoh, S., Tokuhiro, K., Nagamori, E., Matsuyama, T., Kitamoto, K. y Takahashi, H. (2005) Efficient production of L-Lactic acid by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae* with a genome-integrated L-lactate dehydrogenase gene. *Appl Environ Microbiol* **71**: 1964-1970.

Ivorra, C., Pérez-Ortín, J.E. y del Olmo, M. (1999) An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnol Bioeng* **64**: 698-708.

Iwahashi, H., Nwaka, S. y Obuchi, K. (2000) Evidence for contribution of neutral trehalase in barotolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 5182-5185.

Izawa, S., Maeda, K., Sugiyama, K., Mano, J., Inoue, Y. y Kimura, A. (1999) Thioredoxin deficiency causes the constitutive activation of Yap1, an AP-1-like transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 28459-28465.

Jamieson, D.J. (1998) Oxidative stress responses of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **14**: 1511-1527.

Jaspers, C.J., Gigot, D. y Penninckx, M.J. (1985) Pathways of glutathione degradation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Phytochemistry* **4**: 703-707.

Jorge, J.A., Polizeli, M.L., Thevelein, J.M. y Terenzi, H.F. (1997) Trehalases and trehalose hydrolysis in fungi. *FEMS Microbiol Lett* **154**: 165-171.

Jorgensen, H., Olsson, L., Ronnow, B. y Palmqvist, E.A. (2002) Fed-batch cultivation of baker's yeast followed by nitrogen or carbon starvation: effects on fermentative capacity and content of trehalose and glycogen. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 310-317.

- Jules, M., Guillou, V., François, J. y Parrou, J.L. (2004) Two distinct pathways for trehalose assimilation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **70**: 2771-2778.
- Jung, Y.J. y Park, H.D. (2005) Antisense-mediated inhibition of acid trehalase (*ATH1*) gene expression promotes ethanol fermentation and tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Lett* **27**: 1855-1859.
- Kaida, D., Toh-e, A. y Kikuchi, Y. (2003) Rsp5-Bul1/2 complex is necessary for the HSE-mediated gene expression in budding yeast. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **306**: 1037-1041.
- Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D. y Goldberg, A.L. (2004) Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Mol Cell* **13**: 771-781.
- Karreman, R.J., Dague, E., Gaboriaud, F., Quiles, F., Duval, J.F. y Lindsey, G.G. (2007) The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1774**: 131-137.
- Kim, I.S., Moon, H.Y., Yun, H.S. y Jin, I. (2006) Heat shock causes oxidative stress and induces a variety of cell rescue proteins in *Saccharomyces cerevisiae* KNU5377. *J Microbiol* **44**: 492-501.
- Kim, J., Alizadeh, P., Harding, T., Hefner-Gravink, A. y Klionsky, D.J. (1996) Disruption of the yeast *ATH1* gene confers better survival after dehydration, freezing, and ethanol shock: potential commercial applications. *Appl Environ Microbiol* **62**: 1563-1569.
- Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K. y Takahashi, K. (1991) Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene. *Appl Environ Microbiol* **57**: 301-306.
- Kohrer, K. y Domdey, H. (1991) Preparation of high molecular weight RNA. *Methods Enzymol* **194**: 398-405.
- Kranner, I., Beckett, R.P., Wornik, S., Zorn, M. y Pfeifhofer, H.W. (2002) Revival of a resurrection plant correlates with its antioxidant status. *Plant J* **31**: 13-24.
- Kranner, I. (2002) Glutathione status correlates with different degrees of desiccation tolerance in three lichens. *New Phytologist* 451-460.

Kranner, I., Birtic, S., Anderson, K.M. y Pritchard, H.W. (2006) Glutathione half-cell reduction potential: a universal stress marker and modulator of programmed cell death? *Free Radic Biol Med* **40**: 2155-2165.

Kuge, S., Jones, N. y Nomoto, A. (1997) Regulation of yAP-1 nuclear localization in response to oxidative stress. *EMBO J* **16**: 1710-1720.

Lallet, S., Garreau, H., Poisier, C., Boy-Marcotte, E. y Jacquet, M. (2004) Heat shock-induced degradation of Msn2p, a *Saccharomyces cerevisiae* transcription factor, occurs in the nucleus. *Mol Genet Genomics* **272**: 353-362.

Lallet, S., Garreau, H., Garmendia-Torres, C., Szeszakowska, D., Boy-Marcotte, E., Quevillon-Cheruel, S. y Jacquet, M. (2006) Role of Gal11, a component of the RNA polymerase II mediator in stress-induced hyperphosphorylation of Msn2 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **62**: 438-452.

Laroche, C. y Gervais, P. (2003) Achievement of rapid osmotic dehydration at specific temperatures could maintain high *Saccharomyces cerevisiae* viability. *Appl Microbiol Biotechnol* **60**: 743-747.

Lee, J., Godon, C., Lagniel, G., Spector, D., Garin, J., Labarre, J. y Toledano, M.B. (1999) Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J Biol Chem* **274**: 16040-16046.

Lee, J.C., Straffon, M.J., Jang, T.Y., Higgins, V.J., Grant, C.M. y Dawes, I.W. (2001) The essential and ancillary role of glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* analysed using a grande gsh1 disruptant strain. *FEMS Yeast Res* **1**: 57-65.

Leprince, O., Atherton, N.M., Deltour, R. y Hendry, G. (1994) The Involvement of Respiration in Free Radical Processes during Loss of Desiccation Tolerance in Germinating *Zea mays L.* (An Electron Paramagnetic Resonance Study). *Plant Physiol* **104**: 1333-1339.

Leslie, S.B., Teter, S.A., Crowe, L.M. y Crowe, J.H. (1994) Trehalose lowers membrane phase transitions in dry yeast cells. *Biochim Biophys Acta* **1192**: 7-13.

Lewis, J.G., Learmonth, R.P. y Watson, K. (1995) Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141 (Pt 3)**: 687-694.

- Lewis, J.G., Learmonth, R.P., Attfield, P.V. y Watson, K. (1997) Stress co-tolerance and trehalose content in baking strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol Biotechnol* **18**: 30-36.
- Li, Z.S., Lu, Y.P., Zhen, R.G., Szczypka, M., Thiele, D.J. y Rea, P.A. (1997) A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 42-47.
- Lillie, S.H. y Pringle, J.R. (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol* **143**: 1384-1394.
- Lilly, M., Lambrechts, M.G. y Pretorius, I.S. (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol* **66**: 744-753.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Styger, G., Lambrechts, M.G. y Pretorius, I.S. (2006b) The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *FEMS Yeast Res* **6**: 726-743.
- Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D. y Pretorius, I.S. (2006a) The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* **23**: 641-659.
- Lin, H., Nguyen, P. y Vancura, A. (2002) Phospholipase C interacts with Sgd1p and is required for expression of *GPD1* and osmoresistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Genet Genomics* **267**: 313-320.
- Londesborough, J. y Varimo, K. (1984) Characterization of two trehalases in baker's yeast. *Biochem J* **219**: 511-518.
- Longo, E. y Vezinhet, F. (1993) Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **59**: 322-326.
- Louw, C., La Grange, D., Pretorius, I.S. y van Resburg, P. (2006) The effect of polysaccharide-degrading wine yeast transformants on the efficiency of wine processing and wine flavour. *J Biotechnol* **125**: 447-461.
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. y Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**: 265-275.

Luikenhuis, S., Perrone, G., Dawes, I.W. y Grant, C.M. (1998) The yeast *Saccharomyces cerevisiae* contains two glutaredoxin genes that are required for protection against reactive oxygen species. *Mol Biol Cell* **9**: 1081-1091.

Luyten, K., Albertyn, J., Skibbe, W.F., Prior, B.A., Ramos, J., Thevelein, J.M. y Hohmann, S. (1995) Fps1, a yeast member of the MIP family of channel proteins, is a facilitator for glycerol uptake and efflux and is inactive under osmotic stress. *EMBO J* **14**: 1360-1371.

Madeo, F., Fröhlich, E., Ligr, M., Grey, M., Sigrist S.J., Wolf, D.H. y Fröhlich, K. (1999) Oxigen stress: A regulator of apoptosis in yeast. *The Journal of Cell Biology* **4**: 757-767.

Mager, W.H. y Siderius, M. (2002) Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Res* **2**: 251-257.

Malherbe, D.F., du, T.M., Cordero Otero, R.R., van, R.P. y Pretorius, I.S. (2003) Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**: 502-511.

Manzanares, P., Orejas, M., Gil, J.V., De Graaff, L.H., Visser, J. y Ramon, D. (2003) Construction of a genetically modified wine yeast strain expressing the *Aspergillus aculeatus* rhaA gene, encoding an alpha-L-rhamnosidase of enological interest. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7558-7562.

Martínez-Pastor, M.T., Marchler, G., Schuller, C., Marchler-Bauer, A., Ruis, H. y Estruch, F. (1996) The *Saccharomyces cerevisiae* zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE). *EMBO J* **15**: 2227-2235.

Martini, A. (1993) Origin and Domestication of the Wine Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research* **4**.

Mensonides, F.I., Brul, S., Klis, F.M., Hellingwerf, K.J. y Teixeira de Mattos, M.J. (2005) Activation of the protein kinase C1 pathway upon continuous heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is triggered by an intracellular increase in osmolarity due to trehalose accumulation. *Appl Environ Microbiol* **71**: 4531-4538.

Merico, A., Sulo, P., Piskur, J. y Compagno, C. (2007) Fermentative lifestyle in yeasts belonging to the *Saccharomyces* complex. *FEBS J* **274**: 976-989.

Michnick, S., Roustan, J.L., Remize, F., Barre, P. y Dequin, S. (1997) Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains

overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast* **13**: 783-793.

Moraitis, C. y Curran, B.P. (2004) Reactive oxygen species may influence the heat shock response and stress tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **21**: 313-323.

Moraitis, C. y Curran, B.P. (2007) Can the different heat shock response thresholds found in fermenting and respiring yeast cells be attributed to their differential redox states? *Yeast*.

Morano, K.A., Liu, P.C. y Thiele, D.J. (1998) Protein chaperones and the heat shock response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Opin Microbiol* **1**: 197-203.

Mortimer, R.K., Romano, P., Suzzi, G. y Polsinelli, M. (1994) Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast* **10**: 1543-1552.

Motshwene, P., Karreman, R., Kgari, G., Brandt, W. y Lindsey, G. (2004) LEA (late embryonic abundant)-like protein Hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **377**: 769-774.

Muller, E.G. (1991) Thioredoxin deficiency in yeast prolongs S phase and shortens the G1 interval of the cell cycle. *J Biol Chem* **266**: 9194-9202.

Muller, E.G. (1996) A glutathione reductase mutant of yeast accumulates high levels of oxidized glutathione and requires thioredoxin for growth. *Molecular Biology of the Cell* **7**: 1805-1813.

Nailis, H., Coenye, T., Van Nieuwerburgh, F., Deforce, D. y Nelis, H.J. (2006) Development and evaluation of different normalization strategies for gene expression studies in *Candida albicans* biofilms by real-time PCR. *Bmc Molecular Biology* **7**.

Naumov, G.I. (1996) Genetic identification of biological species in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Journal of Industrial Microbiology* 227-241.

Neves, L., Lages, F. y Lucas, C. (2004) New insights on glycerol transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **565**: 160-162.

Neves, M.J. y François, J. (1992) On the mechanism by which a heat shock induces trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **288 (Pt 3)**: 859-864.

Nicolet, C.M. y Craig, E.A. (1989) Isolation and characterization of *STII*, a stress-inducible gene from *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **9**: 3638-3646.

Nishida, O., Kuwazaki, S., Suzuki, C. y Shima, J. (2004) Superior molasses assimilation, stress tolerance, and trehalose accumulation of baker's yeast isolated from dried sweet potatoes (hoshi-imo). *Biosci Biotechnol Biochem* **68**: 1442-1448.

Novo, M. Biochemistry and physiology of rehydration and adaptation of active dry wine yeast for winemaking. (2006). Universitat Rovira i Virgili. Tipo de referencia: Tesis.

Novo, M., Beltran, G., Rozes, N., Guillamón, J.M., Sokol, S., Leberre, V. *et al.* (2007) Early transcriptional response of wine yeast after rehydration: osmotic shock and metabolic activation. *FEMS Yeast Res* **7**: 304-316.

Novo, M.T., Beltran, G., Torija, M.J., Poblet, M., Rozes, N., Guillamón, J.M. y Mas, A. (2003) Changes in wine yeast storage carbohydrate levels during preadaptation, rehydration and low temperature fermentations. *Int J Food Microbiol* **86**: 153-161.

Novo, M.T., Beltran, G., Rozes, N., Guillamón, J.M. y Mas, A. (2005) Effect of nitrogen limitation and surplus upon trehalose metabolism in wine yeast. *Appl Microbiol Biotechnol* **66**: 560-566.

Nwaka, S., Kopp, M., Burgert, M., Deuchler, I., Kienle, I. y Holzer, H. (1994) Is thermotolerance of yeast dependent on trehalose accumulation? *FEBS Lett* **344**: 225-228.

Nwaka, S., Kopp, M. y Holzer, H. (1995b) Expression and function of the trehalase genes *NTHI* and *YBR0106* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **270**: 10193-10198.

Nwaka, S., Mechler, B., Destruelle, M. y Holzer, H. (1995a) Phenotypic features of trehalase mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **360**: 286-290.

Nwaka, S., Mechler, B. y Holzer, H. (1996) Deletion of the *ATHI* gene in *Saccharomyces cerevisiae* prevents growth on trehalose. *FEBS Lett* **386**: 235-238.

Nwaka, S. y Holzer, H. (1998) Molecular biology of trehalose and the trehalases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* **58**: 197-237.

Ohtake, Y. y Yabuuchi, S. (1991) Molecular cloning of the gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **7**: 953-961.

- Ojeda, L., Keller, G., Muhlenhoff, U., Rutherford, J.C., Lill, R. y Winge, D.R. (2006) Role of glutaredoxin-3 and glutaredoxin-4 in the iron regulation of the Aft1 transcriptional activator in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **281**: 17661-17669.
- Oku, K., Watanabe, H., Kubota, M., Fukuda, S., Kurimoto, M., Tsujisaka, Y. *et al.* (2003) NMR and quantum chemical study on the OH...pi and CH...O interactions between trehalose and unsaturated fatty acids: implication for the mechanism of antioxidant function of trehalose. *J Am Chem Soc* **125**: 12739-12748.
- Ough, C.S. (1992) *Winemaking Basics*. The Haworth Press, Inc.
- Pahlman, A.K., Granath, K., Ansell, R., Hohmann, S. y Adler, L. (2001) The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress. *J Biol Chem* **276**: 3555-3563.
- Palhano, F.L., Orlando, M.T. y Fernandes, P.M. (2004) Induction of baroresistance by hydrogen peroxide, ethanol and cold-shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **233**: 139-145.
- Parrou, J.L. y François, J. (1997) A simplified procedure for a rapid and reliable assay of both glycogen and trehalose in whole yeast cells. *Anal Biochem* **248**: 186-188.
- Parrou, J.L., Teste, M.A. y François, J. (1997) Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in *Saccharomyces cerevisiae*: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose. *Microbiology* **143 (Pt 6)**: 1891-1900.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., González, B. y François, J. (1999) Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 191-203.
- Parrou, J.L., Jules, M., Beltran, G. y François, J. (2005) Acid trehalase in yeasts and filamentous fungi: localization, regulation and physiological function. *FEMS Yeast Res* **5**: 503-511.
- Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizueté, A., Gustafsson, J.A., Wright, A.P. y Spyrou, G. (1999) Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**: 6366-6373.

Pedrajas, J.R., Porras, P., Martínez-Galisteo, E., Padilla, C.A., Miranda-Vizueté, A. y Barcena, J.A. (2002) Two isoforms of *Saccharomyces cerevisiae* glutaredoxin 2 are expressed in vivo and localize to different subcellular compartments. *Biochem J* **364**: 617-623.

Pedreño, Y., Gimeno-Alcañiz, J.V., Matallana, E. y Argüelles, J.C. (2002) Response to oxidative stress caused by H₂O₂ in *Saccharomyces cerevisiae* mutants deficient in trehalase genes. *Arch Microbiol* **177**: 494-499.

Penninckx, M.J. (2002) An overview on glutathione in *Saccharomyces* versus non-conventional yeasts. *FEMS Yeast Res* **2**: 295-305.

Pereira, E.J., Panek, A.D. y Eleutherio, E.C. (2003) Protection against oxidation during dehydration of yeast. *Cell Stress Chaperones* **8**: 120-124.

Pereira, M.D., Eleutherio, E.C. y Panek, A.D. (2001) Acquisition of tolerance against oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Microbiol* **1**: 11.

Pérez-González, J.A., González, R., Querol, A., Sendra, J. y Ramón, D. (1993) Construction of a recombinant wine yeast strain expressing beta-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl Environ Microbiol* **59**: 2801-2806.

Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcañiz, J.V. y Matallana, E. (2002) Wine yeast strains engineered for glycogen overproduction display enhanced viability under glucose deprivation conditions. *Appl Environ Microbiol* **68**: 3339-3344.

Pérez-Torrado, R. Estudio y mejora del proceso de producción industrial de levaduras vínicas. (2004). Universitat de València. Tipo de referencia: Tesis.

Pérez-Torrado, R., Bruno-Barcena, J.M. y Matallana, E. (2005) Monitoring stress-related genes during the process of biomass propagation of *Saccharomyces cerevisiae* strains used for wine making. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6831-6837.

Piper, P. (1997) The Yeast Heat Shock Response. In *Yeast Stress Response*. Hohmann, S. y Mager, W.H. (eds). Landes Bioscience, pp. 75-100.

Plourde-Owobi, L., Durner, S., Parrou, J.L., Wiczorke, R., Goma, G. y François, J. (1999) *AGTI*, encoding an alpha-glucoside transporter involved in uptake and intracellular accumulation of trehalose in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**: 3830-3832.

- Plourde-Owobi, L., Durner, S., Goma, G. y François, J. (2000) Trehalose reserve in *Saccharomyces cerevisiae*: phenomenon of transport, accumulation and role in cell viability. *Int J Food Microbiol* **55**: 33-40.
- Pocsi, I., Prade, R.A. y Penninckx, M.J. (2004) Glutathione, altruistic metabolite in fungi. *Adv Microb Physiol* **49**: 1-76.
- Poirier, I., Marechal, P.A., Richard, S. y Gervais, P. (1999) *Saccharomyces cerevisiae* viability is strongly dependant on rehydration kinetics and the temperature of dried cells. *J Appl Microbiol* **86**: 87-92.
- Posas, F., Chambers, J.R., Heyman, J.A., Hoeffler, J.P., de Nadal, E. y Ariño, J. (2000) The transcriptional response of yeast to saline stress. *J Biol Chem* **275**: 17249-17255.
- Postma, E., Verduyn, C., Scheffers, W.A. y Vandijken, J.P. (1989) Enzymic analysis of the Crabtree effect in glucose-limited chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **55**: 468-477.
- Potts, M. (1994) Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol Rev* **58**: 755-805.
- Praekelt, U.M. y Meacock, P.A. (1990) *HSP12*, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: analysis of structure, regulation and function. *Mol Gen Genet* **223**: 97-106.
- Prestrelski, S.J., Tedeschi, N., Arakawa, T. y Carpenter, J.F. (1993) Dehydration-induced conformational transitions in proteins and their inhibition by stabilizers. *Biophys J* **65**: 661-671.
- Pretorius, I.S. (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**: 675-729.
- Proft, M., Pascual-Ahuir, A., de Nadal, E., Ariño, J., Serrano, R. y Posas, F. (2001) Regulation of the Sko1 transcriptional repressor by the Hog1 MAP kinase in response to osmotic stress. *EMBO J* **20**: 1123-1133.
- Puig, S. Estudios sobre la manipulación genética de las levaduras vínicas. (1998). Tipo de referencia: Tesis.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E. y Pérez-Ortín, J.E. (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2057-2061.

Pujol-Carrión, N., Bellí, G., Herrero, E., Nogues, A. y de la Torre-Ruiz, MA (2006) Glutaredoxins Grx3 and Grx4 regulate nuclear localisation of Aft1 and the oxidative stress response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci* **119**: 4554-4564.

Querol, A., Huerta, T., Barrio, E. y Ramón, D. (1992) Dry yeast strain for use in fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *Journal of Food Science* 183-185.

Querol, A., Fernández-Espinar, M.T., del Olmo, M. y Barrio, E. (2003) Adaptive evolution of wine yeast. *Int J Food Microbiol* **86**: 3-10.

Rachidi, N., Barre, P. y Blondin, B. (1999) Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **261**: 841-850.

Ramón, D. (2005) Mejora de levaduras vínicas mediante técnicas de ingeniería genética. In *Microbiología del vino*. Carrascosa, A.V., Muñoz, R. y González, R. (eds). AMV Ediciones, pp. 210-230.

Ratnakumar, S. y Tunnacliffe, A. (2006) Intracellular trehalose is neither necessary nor sufficient for desiccation tolerance in yeast. *FEMS Yeast Res* **6**: 902-913.

Remize, F., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M., Barre, P. y Dequin, S. (1999) Glycerol overproduction by engineered *saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in By-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl Environ Microbiol* **65**: 143-149.

Rep, M., Reiser, V., Gartner, U., Thevelein, J.M., Hohmann, S., Ammerer, G. y Ruis, H. (1999) Osmotic stress-induced gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* requires Msn1p and the novel nuclear factor Hot1p. *Mol Cell Biol* **19**: 5474-5485.

Rep, M., Krantz, M., Thevelein, J.M. y Hohmann, S. (2000) The transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to osmotic shock. Hot1p and Msn2p/Msn4p are required for the induction of subsets of high osmolarity glycerol pathway-dependent genes. *J Biol Chem* **275**: 8290-8300.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B. y Lonvaud, A. (2001) Cytology, Taxonomy and Ecology of Grape and Wine Yeast. In *The Microbiology of Wine and Vinifications*. Ribéreau-Gayon, P. (ed). Wiley, pp. 1-50.

- Rodrigues-Pousada, C.A., Nevitt, T., Menezes, R., Azevedo, D., Pereira, J. y Amaral, C. (2004) Yeast activator proteins and stress response: an overview. *FEBS Lett* **567**: 80-85.
- Rodríguez-Manzanaque, M.T., Ros, J., Cabisco, E., Sorribas, A. y Herrero, E. (1999) Grx5 glutaredoxin plays a central role in protection against protein oxidative damage in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 8180-8190.
- Rodríguez-Manzanaque, M.T., Tamarit, J., Bellí, G., Ros, J. y Herrero, E. (2002) Grx5 is a mitochondrial glutaredoxin required for the activity of iron/sulfur enzymes. *Mol Biol Cell* **13**: 1109-1121.
- Romano, P., Capece, A. y Jespersen, L. (2006) Taxonomic and Ecological Diversity of Food and Beverages Yeasts. In *Yeasts in Food and Beverages*. Fleet, G.H. and Querol, A. (eds). Springer, pp. 13-53.
- Rossignol, T., Postaire, O., Storai, J. y Blondin, B. (2006) Analysis of the genomic response of a wine yeast to rehydration and inoculation. *Appl Microbiol Biotechnol* **71**: 699-712.
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E. y Lindsey, G. (2000) The LEA-like protein *HSP12* in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta* **1463**: 267-278.
- Salmon, J.M. (1997) Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **83**: 253-260.
- Sambrook, J. y Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- San Miguel, P.F. y Argüelles, J.C. (1994) Differential changes in the activity of cytosolic and vacuolar trehalases along the growth cycle of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* **1200**: 155-160.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L. y Ramón, D. (1996) Expression in a wine yeast strain of the *Aspergillus niger* *abfB* gene. *FEMS Microbiol Lett* **145**: 189-194.
- Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L. y Ramón, D. (1998) Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin-beta-glucosidase in a Wine Yeast Strain. *J Agric Food Chem* **46**: 354-360.

Sano, F., Asakawa, N., Inoue, Y. y Sakurai, M. (1999) A dual role for intracellular trehalose in the resistance of yeast cells to water stress. *Cryobiology* **39**: 80-87.

Schebor, C., Galvagno, M., del Pilar, B.M. y Chirife, J. (2000) Glass transition temperatures and fermentative activity of heat-treated commercial active dry yeasts. *Biotechnol Prog* **16**: 163-168.

Schoeman, H., Vivier, M.A., du Toit, M., Dicks, L.M. y Pretorius, I.S. (1999) The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (pedA) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 647-656.

Schuller, D. y Casal, M. (2005) The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl Microbiol Biotechnol* **68**: 292-304.

Sebollela, A., Louzada, P.R., Sola-Penna, M., Sarone-Williams, V., Coelho-Sampaio, T. y Ferreira, S.T. (2004) Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: possible implications in yeast survival and recovery from stress. *Int J Biochem Cell Biol* **36**: 900-908.

Sharma, S.C. (1997) A possible role of trehalose in osmotolerance and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **152**: 11-15.

Sherman, F., Fink, G.R. y Hicks, J.B. (1995) *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Shima, J., Hino, A., Yamada-Iyo, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H. *et al.* (1999) Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial Baker's yeast. *Appl Environ Microbiol* **65**: 2841-2846.

Shima, J., Kuwazaki, S., Tanaka, F., Watanabe, H., Yamamoto, H., Nakajima, R. *et al.* (2005) Identification of genes whose expressions are enhanced or reduced in baker's yeast during fed-batch culture process using molasses medium by DNA microarray analysis. *Int J Food Microbiol* **102**: 63-71.

Sillje, H.H., Paalman, J.W., ter Schure, E.G., Olsthoorn, S.Q., Verkleij, A.J., Boonstra, J. y Verrips, C.T. (1999) Function of trehalose and glycogen in cell cycle progression and cell viability in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **181**: 396-400.

Simonin, H., Beney, L. y Gervais, P. (2007) Sequence of occurring damages in yeast plasma membrane during dehydration and rehydration: mechanisms of cell death. *Biochim Biophys Acta* **1768**: 1600-1610.

- Singer, M.A. y Lindquist, S. (1998a) Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Molecular Cell* **1**: 639-648.
- Singer, M.A. y Lindquist, S. (1998b) Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol* **16**: 460-468.
- Singh, J., Kumar, D., Ramakrishnan, N., Singhal, V., Jarvis, J., Garst, J.F. *et al.* (2005) Transcriptional response of *Saccharomyces cerevisiae* to desiccation and rehydration. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8752-8763.
- Skoneczna, A., Micialkiewicz, A. y Skoneczny, M. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* Hsp31p, a stress response protein conferring protection against reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* **42**: 1409-1420.
- Smit, A., Cordero Otero, R.R., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. y van, R.P. (2003) Enhancing volatile phenol concentrations in wine by expressing various phenolic acid decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Agric Food Chem* **51**: 4909-4915.
- Solanas, M., Moral, R. y Escrich, E. (2001) Unsuitability of using ribosomal RNA as loading control for Northern blot analyses related to the imbalance between messenger and ribosomal RNA content in rat mammary tumors. *Anal Biochem* **288**: 99-102.
- Spector, D., Labarre, J. y Toledano, M.B. (2001) A genetic investigation of the essential role of glutathione: mutations in the proline biosynthesis pathway are the only suppressors of glutathione auxotrophy in yeast. *J Biol Chem* **276**: 7011-7016.
- Stambuk, B.U., da Silva, M.A., Panek, A.D. y de Araujo, P.S. (1999) Active alpha-glucoside transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **170**: 105-110.
- Stephen, D.W. y Jamieson, D.J. (1996) Glutathione is an important antioxidant molecule in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **141**: 207-212.
- Sugiyama, K., Kawamura, A., Izawa, S. y Inoue, Y. (2000a) Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **352 Pt 1**: 71-78.
- Sugiyama, K., Izawa, S. y Inoue, Y. (2000b) The Yap1p-dependent induction of glutathione synthesis in heat shock response of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 15535-15540.
- Swan, T.M. y Watson, K. (1998) Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol Lett* **169**: 191-197.

Tamas, M.J., Rep, M., Thevelein, J.M. y Hohmann, S. (2000) Stimulation of the yeast high osmolarity glycerol (HOG) pathway: evidence for a signal generated by a change in turgor rather than by water stress. *FEBS Lett* **472**: 159-165.

Temple, M.D., Perrone, G.G. y Dawes, I.W. (2005) Complex cellular responses to reactive oxygen species. *Trends Cell Biol* **15**: 319-326.

Thellin, O., Zorzi, W., Lakaye, B., De Borman, B., Coumans, B., Hennen, G. *et al.* (1999) Housekeeping genes as internal standards: use and limits. *J Biotechnol* **75**: 291-295.

Thevelein, J.M. y Hohmann, S. (1995) Trehalose synthase: guard to the gate of glycolysis in yeast? *Trends Biochem Sci* **20**: 3-10.

Thevelein, J.M. y de Winde, J.H. (1999) Novel sensing mechanisms and targets for the cAMP-protein kinase A pathway in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Microbiol* **33**: 904-918.

Tietze, F. (1969) Enzymic method for quantitative determination of nanogram amounts of total and oxidized glutathione: applications to mammalian blood and other tissues. *Anal Biochem* **27**: 502-522.

Toledano, M.B., Kumar, C., Le Moan, N., Spector, D. y Tacnet, F. (2007) The system biology of thiol redox system in *Escherichia coli* and yeast: differential functions in oxidative stress, iron metabolism and DNA synthesis. *FEBS Lett* **581**: 3598-3607.

Trotter, E.W., Kao, C.M., Berenfeld, L., Botstein, D., Petsko, G.A. y Gray, J.V. (2002) Misfolded proteins are competent to mediate a subset of the responses to heat shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **277**: 44817-44825.

Trotter, E.W. y Grant, C.M. (2003) Non-reciprocal regulation of the redox state of the glutathione-glutaredoxin and thioredoxin systems. *Embo Reports* **4**: 184-188.

Trotter, E.W. y Grant, C.M. (2005) Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 392-400.

Uber, G. Modificación genética de levaduras vínicas industriales para mejorar la producción de aroma secundario. (2005). Universitat de València. Tipo de referencia: Tesis.

Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M. y Dequin, S. (2007) Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res* **7**: 317-329.

- Van Hoek, P., de Hulster, E., van Dijken, J.P. y Pronk, J.T. (2000) Fermentative capacity in high-cell-density fed-batch cultures of baker's yeast. *Biotechnol Bioeng* **68**: 517-523.
- Van Wuytswinkel, O., Reiser, V., Siderius, M., Kelders, M.C., Ammerer, G., Ruis, H. y Mager, W.H. (2000) Response of *Saccharomyces cerevisiae* to severe osmotic stress: evidence for a novel activation mechanism of the HOG MAP kinase pathway. *Mol Microbiol* **37**: 382-397.
- Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A. y Speleman, F. (2002) Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**: RESEARCH0034.
- Verstrepen, K.J., Chambers, P.J. y Pretorius, I.S. (2006) The development of superior yeast strains for the food and beverage industries: Challenges, opportunities and potential benefits. In *Yeasts in Food and Beverages*. Fleet, G.H. y Querol, A. (eds). Springer, pp. 399-443.
- Vianna, C.R., Silva, C.L., Neves, M.J. y Rosa, C.A. (2007) *Saccharomyces cerevisiae* strains from traditional fermentations of Brazilian cachaca: trehalose metabolism, heat and ethanol resistance. *Antonie Van Leeuwenhoek*.
- Walker, G.M. y Van Dijken, P. (2006) Physiological and Molecular Responses of Yeasts to the Environment. In *Yeasts in Food and Beverages*. Fleet, G.H. y Querol, A. (eds). Springer, pp. 111-152.
- Wang, X.D., Bohlscheid, J.C. y Edwards, C.G. (2003) Fermentative activity and production of volatile compounds by *Saccharomyces* grown in synthetic grape juice media deficient in assimilable nitrogen and/or pantothenic acid. *Journal of Applied Microbiology* **94**: 349-359.
- Wera, S., De Schrijver, E., Geyskens, I., Nwaka, S. y Thevelein, J.M. (1999) Opposite roles of trehalase activity in heat-shock recovery and heat-shock survival in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem J* **343 Pt 3**: 621-626.
- Westfall, P.J., Ballon, D.R. y Thorner, J. (2004) When the stress of your environment makes you go HOG wild. *Science* **306**: 1511-1512.
- Wheeler, G.L., Quinn, K.A., Perrone, G., Dawes, I.W. y Grant, C.M. (2002) Glutathione regulates the expression of gamma-glutamylcysteine synthetase via the Met4 transcription factor. *Molecular Microbiology* **46**: 545-556.
- Wheeler, G.L. y Grant, C.M. (2004) Regulation of redox homeostasis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Physiologia Plantarum* **120**: 12-20.

Wiemken, A. (1990) Trehalose in yeast, stress protectant rather than reserve carbohydrate. *Antonie Van Leeuwenhoek* **58**: 209-217.

Winderickx, J., de Winde, J.H., Crauwels, M., Hino, A., Hohmann, S., Van Dijck, P. y Thevelein, J.M. (1996) Regulation of genes encoding subunits of the trehalose synthase complex in *Saccharomyces cerevisiae*: novel variations of STRE-mediated transcription control? *Mol Gen Genet* **252**: 470-482.

Wolfe, K.H. y Lohan, A.J. (1994) Sequence around the centromere of *Saccharomyces cerevisiae* chromosome II: similarity of *CEN2* to *CEN4*. *Yeast* **10 Suppl A**: S41-S46.

Zahringer, H., Burgert, M., Holzer, H. y Nwaka, S. (1997) Neutral trehalase Nth1p of *Saccharomyces cerevisiae* encoded by the *NTH1* gene is a multiple stress responsive protein. *FEBS Lett* **412**: 615-620.

Zahringer, H., Holzer, H. y Nwaka, S. (1998) Stability of neutral trehalase during heat stress in *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on the activity of the catalytic subunits of cAMP-dependent protein kinase, Tpk1 and Tpk2. *Eur J Biochem* **255**: 544-551.

Zahringer, H., Thevelein, J.M. y Nwaka, S. (2000) Induction of neutral trehalase Nth1 by heat and osmotic stress is controlled by STRE elements and Msn2/Msn4 transcription factors: variations of PKA effect during stress and growth. *Mol Microbiol* **35**: 397-406.

Zaim, J., Speina, E. y Kierzek, A.M. (2005) Identification of new genes regulated by the Crt1 transcription factor, an effector of the DNA damage checkpoint pathway in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **280**: 28-37.

Zuzuarregui, A. y del Olmo, M. (2004a) Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**: 271-280.

Zuzuarregui, A. y del Olmo, M. (2004b) Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behavior. *FEMS Yeast Res* **4**: 699-710.

Zuzuarregui, A., Carrasco, P., Palacios, A., Julien, A. y del Olmo, M. (2005) Analysis of the expression of some stress induced genes in several commercial wine yeast strains at the beginning of vinification. *J Appl Microbiol* **98**: 299-307.