

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Caracterización y mejora de levaduras panaderas

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Biología por el licenciado

Rafael Dueñas Sánchez

Sevilla, julio de 2010

Directora:

Dra. Tahía Benítez Fernández

Catedrática de Genética

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

Co-Director

Dr. Antonio Carballo Codón

Profesor Titular de Genética

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

Directora

co-Director

Doctorando

Dra. Tahía Benítez Fernández

Dr. Antonio Carballo Codón

Rafael Dueñas Sánchez

A María del Carmen, Ana, Ana María y Mari Carmen , mi familia
Y en especial a la memoria de Rafael, mi padre.

“Pero no existen las bacterias en Marte, y no bien llegaron los invasores, no bien bebieron y se alimentaron, nuestros aliados microscópicos iniciaron su obra destructora. Ya cuando los observé, estaban irrevocablemente condenados, muriendo y pudriéndose mientras andaban de un lado para otro. Era inevitable. Con un billón de muertes ha adquirido el hombre su derecho a vivir en la Tierra y nadie puede disputárselo; no lo habría perdido aunque los marcianos hubieran sido diez veces más poderosos de lo que eran, pues no en vano viven y mueren los hombres”.

La guerra de los mundos. HG Wells, 1898.

Agradecimientos

En primer lugar quiero agradecer a la Dra. Tahía Benítez Fernández, la posibilidad de realizar esta tesis doctoral en su grupo de investigación. Además quisiera agradecerle su disposición absoluta a comentar cualquier aspecto de la misma y en cualquier momento.

En segundo lugar quiero agradecer al Dr. Antonio Carballo Codón su carácter pragmático, que sin duda me ha librado de más de un embrollo.

También tengo que agradecer a la Dra. Ana M^a Rincón Romero por iniciarme en esto sin darme una sola mala contestación, fuese cual fuese la burrada. Además gracias por escucharme y aconsejarme cuando las cosas no han sido fáciles.

Al Dr. Miguel Ángel Moreno Mateos por ser la mejor sombra que uno pudiera querer. Por todas las enseñanzas y por ser como eres.

A los miembros actuales del grupo de Hongos con interés aplicado: Jesús Fierro Risco por ser el mejor compañero que se ha podido tener en este camino y sobretodo por los incontables buenos momentos que me has proporcionado. A Felipe Guevara Pezoa también le quisiera agradecer su aguante y toda la información que me ha proporcionado de un país llamado Chile, ya veremos para que la utilizo!. A M^a Jesús Rodríguez Palero alias “Machupi” por todas las innumerables aportaciones en nuestros seminarios de grupo. A Antonio Alejandro López García alias “Lean” por descargarme de trabajo para que pudiera empezar a escribir esta tesis. Por último y aunque ya no esté en el grupo quisiera recordar a la Dra Cristina Albarrán cuya agilidad para la rima roza lo sobrehumano y aunque no lo consiguieras me obligaste a tener un cuidado especial en todo aquello que dijera.

También me siento en la obligación moral de agradecer a todos los miembros del Departamento de Genética tanto pasados como presentes por hacer de estos años aquí vividos una experiencia única. Especialmente me gustaría mencionar a Fernando Gómez Herrero, Meritxell García Quintanilla, Roberto Balbontín Soría, Reyes Babiano, Mari Carmen Ruger y a los doctores Julio Rodríguez Romero, Alfonso Rodríguez Gil, Iván Valle Rosado, Alejandro Fernández Estrada y Jesús de la Cruz Díaz por los ánimos, ayudas y consejos que durante toda esta tesis me habeis dado.

Al Dr. Gabriel Gutiérrez Pozo, por realizar y enseñarme a analizar los datos de macroarrays.

A la Dra. Mercedes Tamame, por la cesión de cepas y plásmidos que han sido de mucha utilidad.

A la Dra. Ana Gracia Pérez, por contribuir al desarrollo de esta tesis con los análisis de GC.

A la empresa AB Mauri también quiero agradecerles la cesión de cepas, melazas y harinas.

A las secretarías Ana Moreno y Ana Parejo por todo el papeleo solucionado, y a Luis Romanco, Pepe Córdoba e Isabel por su apoyo técnico y especialmente por el buen humor mañanero que han compartido conmigo.

Además quisiera agradecer a Rafael Dueñas Silveti y María del Carmen Sánchez Álvarez, mis padres, por la magnífica educación en todos los aspectos de la vida que me han proporcionado, ya que son los únicos responsables de que hoy en día éste escribiendo estas palabras. A mi hermana Ana por ser más que eso, y a M^a Carmen Guillén López que me acompaña desde mucho antes de que comenzara esta historia y sobretodo por querer continuarla.

A los distintos ministerios, la Junta de Andalucía y al Instituto Danone por financiar las investigaciones aquí desarrolladas y por contribuir a mi mecenazgo a lo largo de estos años.

Índice

ABREVIATURAS Y ANGLICISMOS.....	1
INTRODUCCIÓN GENERAL.....	5
1- LA LEVADURA DE PANADERÍA.....	7
2- ELABORACIÓN DEL PAN.....	9
3- CARACTERÍSTICAS DE LA LEVADURA DE PANADERÍA Y MEJORA GENÉTICA.....	10
OBJETIVOS.....	13
MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
1- ORGANISMOS EMPLEADOS.....	19
1.1- SACCHAROMYCES CEREVISIAE.....	19
1.2- BACTERIAS.....	20
2- VECTORES.....	20
3- CEBADORES.....	21
4- EQUIPAMIENTO HABITUAL UTILIZADO.....	22
4.1- CENTRIFUGADORAS.....	22
4.2- BAÑOS Y TERMOBLOQUES.....	23
4.3- EQUIPOS ESPECTROFOTOMÉTRICOS.....	23
5- CONDICIONES DE ESTERILIZACIÓN.....	23
6- MEDIOS HABITUALES PARA EL CULTIVO DE MICROORGANISMOS.....	23
6.1- MEDIO RICO PARA LEVADURAS.....	23
6.2- MEDIO MÍNIMO PARA LEVADURAS.....	23
6.3- MEDIO INDUSTRIAL PARA LEVADURAS.....	24
6.4- MEDIO DE PREESPORULACIÓN (PRE-SPO) Y ESPORULACIÓN (SPO) PARA LEVADURAS.....	24
6.5- MEDIOS HABITUALES PARA EL CULTIVO DE ESCHERICHIA COLI.....	24
6.6- MEDIOS SÓLIDOS.....	24
7- CONDICIONES DE MANTENIMIENTO Y DE CULTIVO GENERALES.....	25
7.1- OBTENCIÓN DE PRECULTIVOS DE LEVADURAS.....	25
7.2- CULTIVO DE LEVADURA.....	25
7.3- TASAS DE CRECIMIENTO.....	25
7.4- CÁLCULO DEL RENDIMIENTO Y LA PRODUCCIÓN.....	25
7.5- ESPORULACIÓN Y DISECCIÓN DE ASCAS.....	26
7.6- MANTENIMIENTO Y CULTIVO DE BACTERIAS.....	26
8- TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	26
8.1- TRANSFORMACIÓN DE E. COLI COMPETENTES POR EL MÉTODO DEL $CaCl_2$	26
8.2- TRANSFORMACIÓN DE S. CEREVISIAE POR EL MÉTODO DEL ACETATO DE LITIO (GIETZ AND WOODS, 2002).....	28
9- EXTRACCIÓN DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.....	29
9.1- EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE E. COLI A PEQUEÑA ESCALA.....	29
9.2- EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE E. COLI A GRAN ESCALA.....	30
9.3- EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE S. CEREVISIAE.....	30

9.4-	EXTRACCIÓN DE ADN GENÓMICO DE <i>S. CEREVISIAE</i>	31
9.5-	EXTRACCIÓN DE ADN PLASMÍDICO DE <i>S. CEREVISIAE</i>	31
9.6-	EXTRACCIÓN DE ARN DE <i>S. CEREVISIAE</i>	32
10-	MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	32
10.1-	PRECIPITACIÓN DE ADN.	32
10.2-	DIGESTIÓN DE ADN CON ENZIMAS.	33
10.3-	GENERACIÓN DE EXTREMOS ROMOS.	33
10.4-	DESFOSFORILACIÓN DE PLÁSMIDOS.	33
10.5-	LIGACIÓN.....	33
10.6-	REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR).....	34
	10.6.1- <i>Reacción convencional</i>	34
	10.6.2- <i>Reacción con enzimas de alta fidelidad</i>	34
	10.6.3- <i>Reacción de rt-qPCR</i>	34
	10.6.4- <i>Reacción de qPCR</i>	35
10.7-	OBTENCIÓN DE ADN PARA CARIOTIPOS.	35
10.8-	SEPARACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.	36
	10.8.1- <i>Electroforesis de ADN en geles de agarosa</i>	36
	10.8.2- <i>Electroforesis de ADN en campo pulsante</i>	36
10.9-	PURIFICACIÓN DE ADN A PARTIR DE GELES DE AGAROSA.	37
10.10-	FILOGENIAS.....	37
11-	HIBRIDACIÓN DE SONDAS MARCADAS A ADN FIJADO EN MEMBRANA	37
11.1-	TRANSFERENCIA DE ADN A MEMBRANAS.	37
	11.1.1- <i>Transferencia de fragmentos de ADN</i>	37
	11.1.2- <i>Transferencia de cromosomas de <i>S. cerevisiae</i></i>	38
11.2-	MARCAJE Y CUANTIFICACIÓN DE SONDAS RADIATIVAS.	38
11.3-	HIBRIDACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS.....	39
11.4-	DESHIBRIDACIÓN DE MEMBRANAS.	39
12-	MACROARRAYS	40
13-	CITOMETRÍA DE FLUJO	40
13.1-	CONTENIDO EN ADN.....	40
13.2-	VIABILIDAD.....	41
14-	DETERMINACIÓN DE HIDRATOS DE CARBONO	41
14.1-	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES REDUCTORES	41
14.2-	DETERMINACIÓN DE AZÚCARES TOTALES.	42
14.3-	DETERMINACIÓN DE SACAROSA.	42
14.4-	DETERMINACIÓN DE GLUCOSA.	43
14.5-	DETERMINACIÓN DE GLUCÓGENO Y TREHALOSA.	43
15-	DETERMINACIÓN DE ETANOL	44
16-	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS	44
16.1-	OBTENCIÓN DE MUESTRAS.	44
16.2-	CONCENTRACIÓN EXTRACELULAR.	44
16.3-	CONCENTRACIÓN INTERNA.....	44
16.4-	DERIVATIZACIÓN DE LAS MUESTRAS.	45
16.5-	CONDICIONES DE CROMATOGRAFÍA.....	45
17-	DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO CELULAR EN COMPUESTOS VOLÁTILES	45
18-	PERMEABILIZACIÓN DE CÉLULAS	46
19-	CUANTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS TOTALES	47

19.1-. EN EXTRACTOS.....	47
19.2-. EN CÉLULAS PERMEABILIZADAS.	47
20-. ENSAYO DE ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	47
20.1-. ENSAYO DE ACTIVIDAD INVERTASA.....	47
20.2-. ENSAYO DE ACTIVIDAD MALTASA.....	48
21-. CAPACIDAD FERMENTATIVA.	48
21.1-. MASA SECA.	48
21.2-. MASA DULCE	48
22-. PANIFICACIÓN.....	49
22.1-. PANIFICACIÓN DE MASA SECA.....	49
22.2-. PANIFICACIÓN DE MASA DULCE.....	49
23-. VIABILIDAD EN DIVERSAS CONDICIONES.	50
23.1-. VIABILIDAD EN CICLOS DE CONGELACIÓN Y DESCONGELACIÓN.....	50
23.2-. VIABILIDAD DURANTE EL MANTENIMIENTO A -20° C.....	50
23.3-. VIABILIDAD DURANTE EL ALMACENAMIENTO A 30° C.	51
 CAPÍTULO I: CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS EMPLEADAS EN LA INDUSTRIA PANADERA.....	 53
 INTRODUCCIÓN.....	 55
1-. ESTRUCTURA DEL GENOMIO EN CEPAS DE LABORATORIO.....	57
2-. HETEROGENEIDAD EN LEVADURAS INDUSTRIALES.....	58
2.1-. ESTRUCTURA DEL GENOMIO EN CEPAS CERVECERAS Y VÍNICAS.....	59
2.2-. ESTRUCTURA DEL GENOMIO DE LAS LEVADURAS PANADERAS.	59
2.3-. INESTABILIDAD GENÓMICA EN LEVADURAS INDUSTRIALES.	61
3-. RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE CEPAS INDUSTRIALES.	62
 RESULTADOS.....	 65
1-. CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE CEPAS DE S. CEREVISIAE UTILIZADAS EN LA INDUSTRIA PANADERA.	67
1.1-. ORIGEN DE LAS CEPAS UTILIZADAS.	67
1.2-. CARIOTIPO ELECTROFORÉTICO.	67
1.3-. ESTABLECIMIENTO DE RELACIONES ENTRE CEPAS PANADERAS MEDIANTE ANÁLISIS DE REGIONES ALTAMENTE REPETITIVAS.	69
1.4-. POLIMORFISMOS DE RESTRICCIÓN Y RELACIONES FILOGENÉTICAS ENTRE LAS CEPAS.....	72
1.4.2-. Restricción e hibridación con el gen SUC2.....	74
1.4.3-. Árbol filogenético utilizando las matrices conjuntas de LEU2 y SUC2.....	76
1.5-. CONTENIDO DE ADN.....	77
2-. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CROMOSOMAS Y DE GENES POR QPCR.	78
2.1-. OBTENCIÓN DE CEPAS PANADERAS CON COPIA ÚNICA DEL GEN KANMX4.....	78
2.2-. DETERMINACIÓN DEL NÚMERO DE CROMOSOMAS.	80
2.3-. DETERMINACIÓN -DEL NÚMERO DE COPIAS DE ALGUNOS GENES EN CEPAS PANADERAS.	81

DISCUSIÓN	83
1- RELACIONES FILOGENÉTICAS	85
2- QPCR PARA DETERMINAR ANEUPLOIDIAS Y NÚMERO DE COPIAS DE UN GEN	87
CAPÍTULO II: CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA DE LAS CEPAS V1 Y V3	89
INTRODUCCIÓN	91
1- PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE LEVADURA DE PANADERÍA	93
2- LEVADURA DE PANADERÍA Y ESTRÉS	95
3- ACUMULACIÓN DE TREHALOSA Y GLUCÓGENO EN LEVADURAS	97
RESULTADOS	101
1- COMPORTAMIENTO EN CONDICIONES DE LABORATORIO DE CEPAS UTILIZADAS EN LA INDUSTRIA PANADERA	103
1.1- EL ORIGEN DE LAS MELAZAS AFECTA AL COMPORTAMIENTO DE LAS LEVADURAS.....	103
1.2- COMPORTAMIENTO EN MELAZAS DE DIFERENTES CEPAS DE LEVADURAS.....	104
1.3- CONTENIDO EN AMINOÁCIDOS DE LAS MELAZAS INDUSTRIALES A LO LARGO DEL CULTIVO....	107
1.4- CONTENIDO INTERNO DE AMINOÁCIDOS LIBRES EN LEVADURAS CULTIVADAS EN MEDIO MAB.....	109
2- COMPORTAMIENTO DE LAS CEPAS V1 Y V3 EN CONDICIONES INDUSTRIALES	114
2.1- LEVADURA CON ALTA ACTIVIDAD FERMENTATIVA.....	114
2.2- LEVADURA CON ACTIVIDAD CLÁSICA.....	116
2.3- LEVADURA PARA MASA AZUCARADA.....	118
DISCUSIÓN	121
1- COMPORTAMIENTO DE LAS LEVADURAS CULTIVADAS EN EL LABORATORIO EN MEDIO MAB	123
2- METABOLISMO DE AMINOÁCIDOS EN MEDIO MAB	124
3- CULTIVO DE CEPAS PANADERAS EN CONDICIONES INDUSTRIALES	125
CAPÍTULO III: INCREMENTO DE LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS DE PRODUCTOS PANARIOS MEDIANTE EL USO DE LEVADURAS RESISTENTES A P-FLUORO-DL-FENILALANINA	129
INTRODUCCIÓN	131
1- BIOSÍNTESIS DE AMINOÁCIDOS EN LEVADURAS	133
2- BIOSÍNTESIS Y CONTROL DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS	135
3- SÍNTESIS DE ALCOHOLES DE FUSEL	138
4- CONTROL TRANSCRIPCIONAL DE LA BIOSÍNTESIS Y EL CATABOLISMO DE LOS AMINOÁCIDOS AROMÁTICOS	139

5- USO DE ANÁLOGOS TÓXICOS PARA LA OBTENCIÓN DE SUPERPRODUCTORES DE AMINOÁCIDOS.....	141
RESULTADOS.....	143
1- OBTENCIÓN DE MUTANTES RESISTENTES A PFP MEDIANTE CULTIVO DISCONTINUO.....	145
2- DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO INTERNO EN AMINOÁCIDOS.....	145
3- RESISTENCIA A CONGELACIÓN.....	147
4- BÚSQUEDA DE LA MUTACIÓN QUE CONFIERE RESISTENCIA A P-FLUORO-DL-FENILALANINA.	148
5- CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA EN CONDICIONES SEMI-INDUSTRIALES.....	149
5.1- CRECIMIENTO.	149
5.2- CONSUMO DE HIDRATOS DE CARBONO.....	150
5.3- PRODUCCIÓN FINAL DE LEVADURA.	150
5.4- CAPACIDAD FERMENTATIVA EN CONDICIONES DE LABORATORIO.....	150
5.5- CONCENTRACIÓN INTERNA DE AMINOÁCIDOS EN MAB.	151
5.6- PRODUCCIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS.....	152
6- VALORACIÓN DE PAN Y DULCES.	153
6.1- ELABORACIÓN Y VALORACIÓN DE PAN.....	154
6.2- ELABORACIÓN Y VALORACIÓN DE MASAS DULCES.....	154
DISCUSIÓN.....	157
1- CARACTERIZACIÓN EN MEDIOS DE LABORATORIO.....	159
2- USO EN CONDICIONES SEMI-INDUSTRIALES.	161
CAPÍTULO IV: REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL EN LEVADURAS PANADERAS Y APLICACIONES INDUSTRIALES.....	165
INTRODUCCIÓN.....	167
1- METABOLISMO DE HIDRATOS DE CARBONO EN LEVADURAS.....	169
2- SEÑALIZACIÓN DE PRESENCIA O AUSENCIA DE GLUCOSA EN EL MEDIO.....	178
3- PRINCIPALES FACTORES TRANSCRIPCIONALES QUE CONTROLAN EL METABOLISMO RESPIRO-FERMENTATIVO.	180
3.1- EL REPRESOR TRANSCRIPCIONAL MIG1P.	180
3.2- EL ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL CAT8P.	181
3.3- EL ACTIVADOR TRANSCRIPCIONAL HAP.	181
RESULTADOS.....	185
1- PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN CEPAS PANADERAS.....	187
1.1- PATRONES DE EXPRESIÓN GÉNICA EN LA CEPA V1 (YPD/YPG).....	187
1.2- PATRONES DE EXPRESIÓN EN LA CEPA DOG21 (YPD/YPG).	188
1.3- COMPARATIVA DE LOS PATRONES DE EXPRESIÓN RESPIRO-FERMENTATIVO DE LAS CEPAS V1 Y DOG21	188
1.4- DIFERENCIAS DE EXPRESIÓN ENTRE LA CEPA V1 Y DOG21 CULTIVADAS EN YPD O YPG.	191

2- CARACTERIZACIÓN DEL GEN HAP4 EN LA CEPA VI.....	192
3- ESTRATEGIA PARA LA INTEGRACIÓN DEL GEN HAP4 EN CEPAS PANADERAS.....	199
4- COMPROBACIÓN DE LA ESTABILIDAD GENÓMICA Y DEL NÚMERO DE INSERCIONES DE LA CONSTRUCCIÓN EN LOS DISTINTOS TRANSFORMANTES.....	200
5- NIVELES DE EXPRESIÓN DE HAP4 Y OTROS GENES DE INTERÉS EN LAS CEPAS TRANSFORMADAS.....	202
6- CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA.....	204
6.1- CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA EN MEDIO DE LABORATORIO YPD.....	204
6.1.1- Crecimiento y consumos de glucosa.....	204
6.1.2- Producción y consumo de etanol en medio YPD.....	205
6.1.3- Rendimientos en biomasa en medio YPD.....	207
6.2- CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA EN MEDIO INDUSTRIAL MAB.....	209
6.2.1- Crecimiento y consumo de hidratos de carbono.....	209
6.2.2- Producción de etanol en medio MAB.....	212
6.2.3- Rendimiento en biomasa en medio MAB.....	213
6.3- ACTIVIDAD INVERTASA Y MALTASA.....	214
7- CAPACIDAD FERMENTATIVA EN MASAS PANARIAS.....	215
7.1- CAPACIDAD FERMENTATIVA EN MASAS PANARIAS SECA.....	215
7.2- CAPACIDAD FERMENTATIVA EN MASAS DULCES.....	216
 DISCUSIÓN.....	 217
1- PATRONES DE EXPRESIÓN DE GENES.....	219
2- INCREMENTO EN EL RENDIMIENTO EN LEVADURAS INDUSTRIALES.....	223
 CONCLUSIONES.....	 227
APÉNDICE I.....	231
APÉNDICE II.....	245
APÉNDICE III.....	253
APÉNDICE IV.....	261
APÉNDICE V.....	267
APÉNDICE VI.....	275
APÉNDICE VII.....	281
APÉNDICE VIII.....	287
 BIBLIOGRAFÍA.....	 291

Abreviaturas y anglicismos

' ó min	minuto(s)	HPLC	<i>High pressure liquid chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta presión)
"	segundo(s).	J	Julio
°C	grado celsius	Kb	Kilobase
%	tanto por ciento	L	Litro
A	amperio	LB	Medio Luria-Bertani
ADN	Acido desoxirribonucleico	LOG_n	Logaritmo en base n
ADNc	ADN complementario	LTR	Long terminal repeats (Repeticiones terminales largas)
ADNr	ADN ribosómico	M	Molar
ARN	Ácido ribonucleico	NAD(H)	dinucleótido de nicotinamida adenina
ARNasa	Ribonucleasa	NADP(H)	nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ARNm	ARN mensajero	ORF	Open reading frame (Marco abierto de lectura)
ARNr	ARN ribosómico	p/v	Peso/volumen
ARNt	ARN transferente.	pb	pares de base
ATP	trifosfato de adenosina	PCR	Polimerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
AMPc	Adenosin monofosfato cíclico	qPCR	PCR cuantitativa
BSA	Seroalbumina bovina	rt-qPCR	PCR en transcripción reversa cuantitativa
CHEF	contour-clamped homogeneous electric field	PEG	polietilenglicol
Clustering	Agrupamiento	Pellet	Precipitado
dATP	2'-desoxiadenin-5'-trifosfato	PFP	p-Fluoro-DL-fenilalanina
dTTP	2'-desoxitimidin-5'-trifosfato	rpm	Revoluciones por minuto
dCTP	2'-desoxicitidin-5'-trifosfato	SDS	dodecil sulfato sódico
dGTP	2'-desoxiguanidin-5'-trifosfato	SGD	<i>Saccharomyces</i> genome database
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfatos	Tris	Tri-(hidroximetil)-aminometano
ddH₂O	Agua bidestilada	TR	Tiempo de retención
DNasa	Desoxirribonucleasa	U	unidad de actividad enzimática
DMSO	dimetil sulfóxido	UFC	Unidad formadora de colonia
DO	Densidad óptica	UV	Ultravioleta
DTT	ditiotreititol	V	voltio
EDTA	ácido etilendiaminotetraacético	v/v	Volumen/volumen
EtBr	Bromuro de etidio	W	vatio
EtOH	Etanol	X	Número de veces de concentración
g	aceleración de la gravedad	YNB	Yeast nitrogen base
g	gramo		
G418	Geneticina		
GC	<i>Gas chromatography</i> (cromatografía gaseosa)		
Glc	Glucosa		
GO	Gen ontology (Ontología génica)		
h	hora		

Aminoácidos (todos son L-aminoácidos)

A, Ala	Alanina
C, Cys	Cisteina
D, Asp	Ácido Aspártico
E, Glu	Ácido Glutámico
F, Phe	Fenilalanina
G, Gly	Glicocola ó glicina
H, His	Histidina
I, Ile	Isoleucina
K, Lys	Lisina
L, Leu	Leucina
M, Met	Metionina
N, Asn	Asparragina
P, Pro	Prolina
Q, Gln	Glutamina
R, Arg	Arginina
S, Ser	Serina
T, Thr	Treonina
V, Val	Valina
W, Trp	Triptófano
Y, Tyr	Tirosina

Bases Nitrogenadas

A	adenina
C	citosina
G	guanina
T	timina

Introducción General

1- La levadura de panadería.

Existen evidencias del uso de cereal machacado mezclado con agua como base de la alimentación humana desde el Neolítico. Sin embargo, la costumbre de dejar reposar la mezcla durante varias horas parece originaria de Egipto, y se remontaría alrededor del año 3000 a.C. Este hecho se cree que fue fortuito y su posterior implantación se debe a una percepción favorable tanto en la textura como en la palatabilidad del producto una vez cocido (Evans, 1990; Tamame et al., 2003; Hansen and Schieberle, 2005). Ya en esta civilización se extiende el uso de una masa madre o ácida, que se corresponde con una porción de masa fermentada en una ocasión anterior y que se utiliza con dos propósitos. Por un lado reduce el tiempo de fermentación y por el otro permite la acidificación de la nueva masa. Estas masas madres son verdaderos cultivos microbiológicos en donde se reproducen tanto levaduras como bacterias lácticas, especialmente del género *Lactobacillus*. Estas bacterias producen tanto ácido acético como láctico y mientras la relación entre los dos ácidos se mantengan en 4.0:1.5, respectivamente, aportan una sensación agradable al pan (Rehm et al., 1995).

Hasta el siglo XIX, en Centroeuropa la levadura para panadería era proporcionada por las numerosas cerveceras que utilizan levadura de fermentación alta para producir cerveza de tipo Ale (Reed and Nagodawithana, 1991). No obstante, el uso extensivo a partir del siglo XIX de levadura de fermentación baja utilizada para producir cerveza de tipo Lager y que no es apta para su uso en panadería, permitió el desarrollo de industrias para la elaboración de levadura panadera (Reed and Nagodawithana, 1991). En general, se acepta ampliamente que las levaduras utilizadas en panadería pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae* y que tienen cierto grado de relación con levaduras cerveceras de tipo Ale. No obstante, otras levaduras no-*Saccharomyces*, entre las que destacan especies como *Issatchenkia orientalis*, *Pichia membranifaciens* y *Torulasporea delbrueckii*, se utilizan en fermentaciones de masas de maíz o centeno (Rández-Gil et al., 2003). La destrucción de la levadura tras la cocción de la masa, la necesidad de reducir aun más los tiempos de fermentación y, sobretodo, de controlar que el producto final mantenga siempre las mismas propiedades ha hecho posible que la producción a gran escala de levadura panadera sea un negocio rentable económicamente (Reed and Nagodawithana, 1991).

Inicialmente en la industria, la levadura se cultivaba en medios basados en cereales molidos, y no se aplicaba aireación. Esto produce una reducción en el rendimiento

biomasa/sustrato debido a la presencia de altas concentraciones de azúcares y por tanto a la producción de etanol en vez de biomasa. En Gran Bretaña sobre el año 1886 se empezó a utilizar la aireación continua del medio, lo que produjo un incremento en los rendimientos obtenidos. No obstante y debido a la compleja regulación transcripcional existente en *S. cerevisiae*, la respiración no se produce plenamente a pesar de la aireación del cultivo. De hecho ésta sólo se produce cuando la concentración de glucosa en el medio no supera los 2 g·L⁻¹, aproximadamente. Entre 1910 y 1920, se constató que la adición del medio de forma gradual permitía producir unos 54 Kg de levadura por cada 100 Kg de sustrato consumido en vez de los 7.5 Kg que se obtenían hasta entonces. Durante la I Guerra Mundial (1914-1918), la escasez de cereales produjo un cambio en el medio de cultivo empleado. La sustitución se realizó con melazas de remolacha y/o caña de azúcar sobrantes de la producción de azúcar de mesa que acaba imponiéndose al cultivo anterior en la década de 1920. Las melazas de remolacha y/o caña presentan grandes ventajas frente al uso de cereales; por una parte facilita su almacenamiento, transporte y uso, además son significativamente más baratas que el cereal (Reed and Nagodawithana, 1991).

Desde entonces el proceso industrial ha sufrido cambios que van dirigidos a la automatización del mismo, el incremento en los controles de calidad, etc. Otra de las mejoras introducidas está relacionada con la capacidad de vender el producto en distintos formatos y que por tanto requieren de sistemas de recolectado diferentes. La levadura tradicionalmente ha sido vendida como biomasa prensada (70% de humedad), aunque otros formatos como la levadura seca activa, la levadura seca instantánea y la crema de levadura han ido abriendo mercado. La levadura seca activa comenzó a elaborarse a partir de 1930 pero no es hasta la década de 1940 cuando comienza a penetrar en el mercado. La principal ventaja que posee este formato es la posibilidad de almacenaje a temperatura ambiente. No obstante, presenta algunas desventajas asociadas al proceso de deshidratación al que son sometidas; por un lado es necesaria la rehidratación de la biomasa (posee un 6 - 7% de humedad) y por otro muestra una menor actividad en comparación con la levadura prensada. A principios de la década de 1970, comenzó la comercialización del formato levadura seca instantánea que permite el uso directo de la misma sin necesidad de rehidratación, aunque es más perecedero que la levadura seca activa. El formato de crema de levadura se utiliza desde finales de los años 70, y junto a la levadura prensada constituyen uno de los más comercializados. La crema de levadura procede de la

concentración y lavado del mosto (medio y levaduras) por centrifugación. El principal inconveniente es que necesita refrigeración, pese a lo cual las grandes industrias panificadoras prefieren este formato de levadura ya que se mezcla rápidamente con la harina y presenta ventajas tanto en el transporte como en el almacenaje (Reed and Nagodawithana, 1991; Spencer and Spencer, 1997).

2-. Elaboración del pan.

La elaboración del pan se lleva a cabo en dos pasos, por un lado la fermentación de masa panaria y por el otro la cocción por encima de los 150° C. La fermentación de la masa panaria se realiza con levadura mezclada con harina sobre todo de trigo o centeno. El ambiente presente en estas masas es principalmente anaerobio, por lo que el metabolismo de la levadura se corresponde con la fermentación alcohólica. El uso de trigo o centeno es esencial debido a la cantidad de gluten que contienen y que permite el levantamiento de la masa ya que es capaz de retener el CO₂ producido durante la fermentación de los azúcares que contiene la harina. Tras el consumo de los azúcares fácilmente asimilables, especialmente glucosa y fructosa, comienza la utilización de la maltosa, previa internalización mediante transporte activo. La maltosa se hidroliza internamente, lo que produce más glucosa. Además de hidratos de carbono, la levadura es capaz de utilizar otros compuestos presentes en la harina como por ejemplo aminoácidos (Rehm et al., 1995; Tamame et al., 2003). Tras la fermentación se produce la cocción de la masa que permite el desarrollo de aromas, sabores y texturas característicos del pan. Estas propiedades se deben tanto a los metabolitos producidos por la levadura y a las sustancias presentes en la harina y que no han sido metabolizadas, como a las reacciones químicas y cambios físicos que se producen durante la cocción.

Durante la fermentación se generan ácidos orgánicos, aminoácidos, y alcoholes de diversos pesos moleculares, pero sólo permanecerán en el pan aquellos compuestos químicos con menor volatilidad (en general, aquellos de mayor peso molecular y de carácter ácido sobre su aldehído y éstos sobre su alcohol). Cuanto mayor es el tiempo de fermentación, mayor es el espectro de compuestos formados y por tanto más complejidad organoléptica. En la cocción de la masa se producen principalmente las reacciones de Maillard, que proporcionan color, dado que se forman melanoidinas. Sin embargo, se ha descrito que estos compuestos influyen tanto en el sabor como en el aroma (Zhang et al., 2009). Este conjunto de reacciones comienza con la condensación de azúcares reductores y

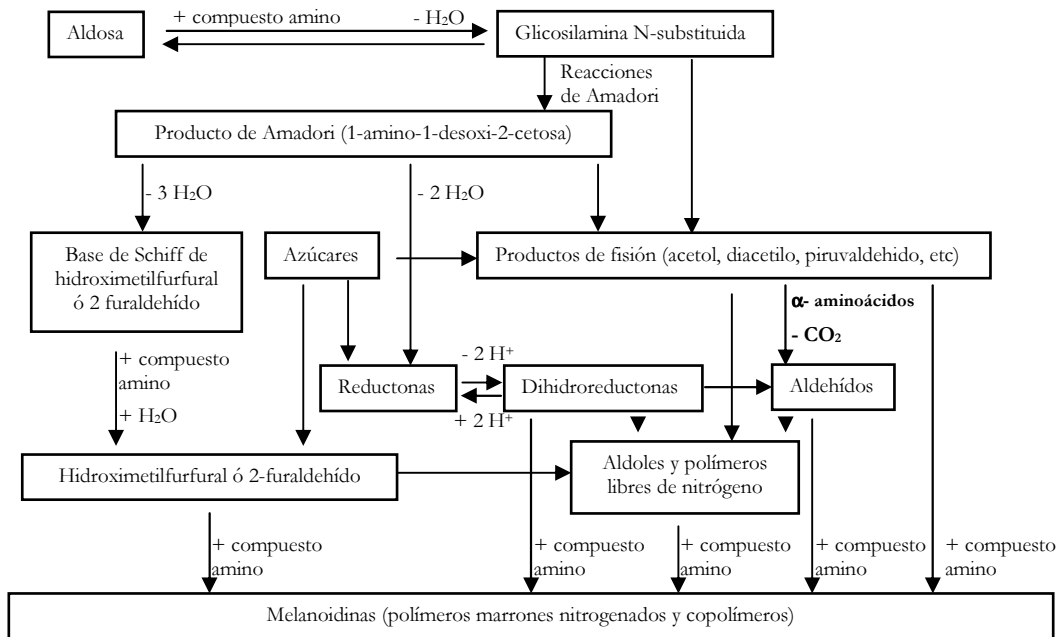


Figura 1. Reacciones de Maillard adaptado de Zhang et al, 2009. En negrita se destaca la reacción de Strecker.

aminoácidos tanto libres como polimerizados en proteínas. En general una amina primaria reacciona con un grupo carbonilo, lo que forma un compuesto inestable (Base de Schiff) que posteriormente genera un producto de Amadori (1-amino-1-desoxi-2-cetosa). Estos compuestos pueden seguir reaccionando formando compuestos de mayor complejidad, pero también se degradan formando azúcares anhidros, furfurales y reductonas (Rehm et al., 1995; Zhang et al., 2009). Además de estas reacciones se producen las reacciones de Strecker, que consisten en la desaminación oxidativa y descarboxilación de aminoácidos para formar aldehídos o cetonas de fusel (Rehm et al., 1995). Es decir, compuestos que contribuyen al aroma como 2-feniletanal, 3-metilbutanal, etc, que además pueden continuar modificándose según las reacciones de Maillard. Los compuestos formados en las reacciones de Strecker originan, de forma química, intermediarios sintetizados por la ruta enzimática Ehrlich (genera alcoholes y ácidos de fusel), (Capítulo III; Hansen and Schieberle, 2005).

3-. Características de la levadura de panadería y mejora genética.

Evans en 1990 estableció una serie de propiedades que una cepa panadera debería de poseer:

1. Capacidad de crecer rápidamente y producir buenos rendimientos utilizando medios ricos en sacarosa como fuente de carbono.
2. Capacidad de crecer en otras fuentes de carbono.
3. Resistencia al secado, especialmente para su comercialización en el formato de levadura seca activa e instantánea.
4. Resistencia a la congelación.
5. Buena consistencia y color.
6. Estabilidad y capacidad de mantener la calidad de los productos.
7. Ser capaces de tener una alta actividad fermentativa, especialmente en presencia de maltosa.
8. Tolerar la presencia de elevadas presiones osmóticas y ácidos, como las sales del ácido propiónico que son añadidas a las masas para evitar el crecimiento posterior de mohos en el pan.
9. Tolerar la rehidratación.
10. No formar agregados insolubles durante la rehidratación.
11. Buen sabor y aportar aroma al producto panario.

No todas éstas propiedades están presentes en las cepas panaderas pero gran parte de ellas son susceptibles de mejora genética. De forma muy general, la mejora se realiza bien por genética clásica, es decir mediante selección de cierto carácter presente en una población de organismos o bien mediante ingeniería genética, es decir mediante la manipulación del ADN de un organismo. Con respecto a la mejora por genética clásica se han obtenido cepas que presentan incrementos significativos en la concentración interna de lisina, que es un aminoácido esencial pobremente representado en la harina de trigo (Gasent-Ramírez and Benítez, 1997) o el aislamiento de cepas resistentes a 2-desoxi-D-glucosa (análogo tóxico de glucosa) que presentan una represión catabólica parcial mediada por glucosa y que tienen mejor comportamiento con respecto a la cepa parental tanto en capacidad fermentativa de masas dulces como en resistencia a ciclos de congelación-descongelación (Rincón et al., 2001; Codón et al., 2003). En cuanto a la mejora por ingeniería genética se han intentado diversas estrategias entre las que se encuentran la sobreexpresión, la delección y el uso de alelos que están exentos de regulación postraduccional. La sobreexpresión de genes como *MEL1* (codifica para la Melibiasa) permite obtener incrementos de rendimientos de biomasa debido a una mejor utilización

de los hidratos de carbono disponibles en las melazas (rafinosa y melibiosa)(Gasent-Ramírez et al., 1995); la de *CRZ1* (codifica para un activador transcripcional de genes implicados en diversos tipos de estrés) permite la obtención de cepas tolerantes tanto a salinidad como a congelación y mejora la habilidad de levantar masas azucaradas (Panadero et al., 2007); la de genes del locus *MAL* permite una utilización rápida de la maltosa presente en la masa y por tanto las cepas presentan mayores incrementos en la capacidad fermentativa (Tamame et al., 2003). La delección de genes también ha permitido la obtención de cepas con propiedades mejoradas, por ejemplo la delección de *CAR1* (Arginasa, responsable de la degradación de arginina) provoca una acumulación de prolina lo que permite un incremento en la resistencia a congelación (Shima et al., 2003); incluso la delección de los genes implicados en la degradación de la trehalosa *ATH1* (trehalasa ácida) y/o *NTH1* (trehalasa neutra) hace que la cepa produzca mayor cantidad de CO₂ durante la fermentación de la masa así como mayor resistencia a desecado por acumulación de trehalosa (Shima et al., 1999). Pero las modificaciones no solo se han orientado a la delección de un gen sino también a la expresión de variedades alélicas con modificaciones puntuales en las proteínas. Ejemplo de esto último son las delecciones del gen *PUT1* (Prolina oxidasa, implicada en la utilización de prolina como fuente de nitrógeno) junto a la modificación de *PRO1* (γ -glutamil quinasa, primera enzima de la ruta de síntesis de prolina) para que el gen codifique una proteína que no presente retroinhibición por prolina, lo que conlleva a la cepa a acumular grandes cantidades de este aminoácido, presentando altos niveles de actividad fermentativa en masas congeladas (Kaino et al., 2008).

La alta frecuencia de cepas poliploides o aneuploides, el homotalismo y la heterocigoidad entre cromosomas homólogos confieren a estos organismos una alta estabilidad genómica, que dificulta tanto recombinación como meiosis así como la posibilidad de seleccionar mutaciones espontáneas. Todo ello sumado al interés industrial y por tanto económico, hace interesante la caracterización fisiológica y molecular de cepas panaderas, así como la búsqueda de nuevas variedades que otorguen matices diferentes a los productos finales (y del gusto del consumidor) y que permitan su producción a menor costo.

Objetivos

Los objetivos de éste trabajo han sido:

1. La caracterización tanto a nivel molecular como fisiológico en medio industrial de cepas empleadas en la industria panadera.
2. Cambios en las propiedades organolépticas del pan mediante la obtención de mutantes superproductores de L-fenilalanina.
3. La caracterización a nivel transcripcional de la cepa panadera V1 y un mutante resistente a 2-desoxi-D-glucosa en condiciones fermentativas y respiratorias.
4. El aumento del rendimiento en medios industriales mediante sobreexpresión del factor transcripcional *HAP4*.

Materiales y Métodos

1. Organismos empleados.

1.1. *Saccharomyces cerevisiae*.

Las cepas de levaduras utilizadas en este trabajo pertenecen a la especie *Saccharomyces cerevisiae*. La nomenclatura genética utilizada corresponde con la propuesta de la “Genetic Nomenclature Guide (1998) publicado en “Trends in Genetics” y que puede ser consultado en la base de datos SGD ([www.yeastgenome.org/sgdpub/Saccharomyces cerevisiae.pdf](http://www.yeastgenome.org/sgdpub/Saccharomyces_cerevisiae.pdf).)

Cepa	Genotipo/Característica relevante	Origen
S288C	<i>MATα, SUC2 mal gal2 CUP1 hap1Δ</i> (L)	YGSC ¹
S+	<i>MATα, SUC2 mal gal2 CUP1 hap1Δ leu2Δ::KMX4</i> (L)	Este trabajo
STH	Derivado de S288C con una integración <i>ura3Δ::P_{TEF2}:ckHAP4:T_{CYC1}</i> (L)	Este trabajo
SGH	Derivado de S288C con una integración <i>ura3Δ::P_{TDH3}:ckHAP4:T_{CYC1}</i> (L)	Este trabajo
DS81	<i>MATα/MATα, SUC2/SUC2 mal/mal gal2/gal2 CUP1/CUP1</i> (L)	Codón et al., 1995
DS7	<i>MATα/MATα, SUC2/SUC2 mal/mal gal2/gal2 CUP1/CUP1 LEU2/leu2Δ::KMX4</i> (L)	Este trabajo
DS10	<i>MATα/MATα, SUC2/SUC2 mal/mal gal2/gal2 CUP1/CUP1 leu2Δ::KMX4 /leu2Δ::KMX4</i> (L)	Este trabajo
Cenpk.113-7D	<i>MATα MAL2-8^c SUC2</i> (L)	Kötter, P ²
BY4741	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> (L)	Euroscarf ³
BYhap4 Δ	Derivado de BY4741 con <i>hap4Δ::KMX4</i> (L)	Euroscarf ³
V1	Desconocido (P)	CGL ⁴ (Valladolid)
Vt1	Derivado de V1, con al menos un alelo <i>leu2Δ::KMX4</i> (P)	Este trabajo
V8.2	Derivado de V1/resistente a p-fluoro-DL-fenilalanina (P)	Este trabajo
V10.5	Derivado de V1/resistente a p-fluoro-DL-fenilalanina (P)	Este trabajo
V10.12	Derivado de V1/resistente a p-fluoro-DL-fenilalanina (P)	Este trabajo
V900	Derivado de V1/ resistente a p-fluoro-DL-fenilalanina (P)	Este trabajo
VTH	Derivado de V1, con al menos una integración en <i>ura3Δ::P_{TEF2}:ckHAP4:T_{CYC1}</i> (P)	Este trabajo
DOG21	Desconocido/Resistente a 2 desoxiglucosa (P)	Rincón et al., 2001
Dt1	Derivado de DOG21, con al menos un alelo <i>leu2Δ::KMX4</i> (P)	Este trabajo
DTH	Derivado de DOG21, con al menos una integración en <i>ura3Δ::P_{TEF2}:ckHAP4:T_{CYC1}</i> (P)	Este trabajo
V3	Desconocido (P)	Tamame M ⁵
3TH	Derivado de V3 con al menos una integración <i>ura3Δ::P_{TEF2}:ckHAP4:T_{CYC1}</i> (P)	Este trabajo
3GH	Derivado de V3 con al menos una integración <i>ura3Δ::P_{TDH3}:ckHAP4:T_{CYC1}</i> (P)	Este trabajo
ABO	Desconocido (P)	AB Mauri Food (Córdoba)
AB1	Desconocido (P)	AB Mauri Food (Córdoba)
AB2	Desconocido (P)	AB Mauri Food (Córdoba)
AB3	Desconocido (P)	AB Mauri Food (Córdoba)
Dadi	Desconocido (P)	Cruzcampo (Sevilla)
ALKO554	Desconocido (P)	Alko Ltd. Helsinki (Finlandia)
ALKO743	Desconocido (P)	Alko Ltd. Helsinki (Finlandia)
ALKO1611	Desconocido (P)	Alko Ltd. Helsinki (Finlandia)
CT	Desconocido (P)	Cruzcampo (Sevilla)
SB2	Desconocido (P)	HSB ⁶ (Sevilla)

V2	Desconocido (P)	CGL (Valladolid)
VS	Desconocido (P)	Cruzcampo (Sevilla)
TS146	Desconocido/aislado de fermentación espontánea de masa de centeno (P)	Alko Ltd. Helsinki (Finlandia)
PDC	Desconocido/Pic de cuba (V)	Domecq (Jerez de la Frontera)

¹ Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, California (EEUU)

² Johann Wolfgang Goethe-Universität, Institut für Molekulare Biowissenschaften (Germany).

³ European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis

⁴ Compañía General de Levaduras, Valladolid (España)

⁵ Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC, Salamanca (España).

⁶ Panadería Horno de San Buenaventura (Sevilla)

(L), (P)ó (V) Cepa de laboratorio, panadera ó vínica respectivamente.

1.2-. Bacterias

La bacteria que se ha utilizado como propagadora de los distintos vectores ha sido *Escherichia coli* DH5 α , comercializada por *Amersham-Pharmacia Biotech*.

2-. Vectores.

Plásmido	Características relevantes	Referencia
pGEMt-easy vector	Comercial	Promega
p29	La restricción con EcoRI-SalI libera un fragmento de 1.6 Kb que corresponde a <i>Ty1</i> .	Dept. Genética
B205	La restricción con ClaI libera un fragmento de 1.7 Kb que corresponde a <i>Ty2</i> .	Dept. Genética
pUG6	Contiene el casete <i>KanMX4</i> flanqueado por repeticiones directas <i>LαxP</i>	(Guldener et al., 1996)
YEp351-cre-cyh	Contiene la recombinasa cre bajo control del <i>P_{GAL1}</i> . y como marcador de selección el gen <i>LEU2</i> y el gen de resistencia a cicloheximida. Multicopia	(Delneri et al., 2000)
pGDF1	Derivado del YEp351-cre-cyh, presenta la escisión del <i>LEU2</i> por digestión HpaI y la diana HindIII más próxima al marcador. Multicopia	Guevara FA, tesis doctoral, Dept. Genética
pRS416	Plásmido con secuencias para clonación múltiple (MCS) y marcador de selección el gen <i>URA3</i> . Centromérico	(Mumberg et al., 1995)
p416adh	Derivado de pRS416 que presenta el <i>P_{ADH1}</i> entre las dianas SacI y XbaI, y el <i>T_{CYC1}</i> entre las dianas XhoI y KpnI	(Mumberg et al., 1995)
p416tef	Derivado de pRS416 que presenta el <i>P_{TEF2}</i> entre las dianas SacI y XbaI, y el <i>T_{CYC1}</i> entre las dianas XhoI y KpnI	(Mumberg et al., 1995)
p416gpd	Derivado de pRS416 que presenta el <i>P_{TDH3}</i> entre las dianas SacI y XbaI, y el <i>T_{CYC1}</i> entre las dianas XhoI y KpnI	(Mumberg et al., 1995)
pRD2F	Derivado de p416adh que presenta el casete <i>KanMX4</i> flanqueado por repeticiones directas <i>LαxP</i> clonado en la diana KpnI. Las direcciones de expresión tanto del <i>KanMX4</i> como del promotor está en fase	Este trabajo
pRD2R	Derivado de p416adh que presenta el casete <i>KanMX4</i> flanqueado por repeticiones directas <i>LαxP</i> clonado en la diana KpnI. Las direcciones de expresión tanto del <i>KanMX4</i> como del promotor son convergentes	Este trabajo
pRD3F	Derivado de p416tef que presenta el casete <i>KanMX4</i> flanqueado por repeticiones directas <i>LαxP</i> clonado en la diana KpnI. Las direcciones de expresión tanto del <i>KanMX4</i> como del promotor están en fase	Este trabajo

pRD3R	Derivado de p416tef que presenta el casete <i>KanMX4</i> flanqueado por repeticiones directas <i>LoxP</i> clonado en la diana KpnI. Las direcciones de expresión tanto del <i>KanMX4</i> como del promotor son convergentes	Este trabajo
pRD4F	Derivado de p416gpd que presenta el casete <i>KanMX4</i> flanqueado por repeticiones directas <i>LoxP</i> clonado en la diana KpnI. Las direcciones de expresión tanto del <i>KanMX4</i> como del promotor están en fase	Este trabajo
pRD4R	Derivado de p416gpd que presenta el casete <i>KanMX4</i> flanqueado por repeticiones directas <i>LoxP</i> clonado en la diana KpnI. Las direcciones de expresión tanto del <i>KanMX4</i> como del promotor son convergentes	Este trabajo
pGEMt::V1 <i>bap4</i>	pGEMt easy vector con V1 <i>bap4</i> clonado a partir de ADN genómico de V1 con los cebadores Hap4speI.u y Hap4bamHI.l. El gen puede ser escindido con una digestión con SpeI y BamHI	Este trabajo
pGEMt::V1 <i>HAP4</i>	pGEMt easy vector con V1 <i>HAP4</i> clonado a partir de ADN genómico de V1 con los cebadores Hap4speI.u y Hap4bamHI.l. El gen puede ser escindido con una digestión con SpeI y BamHI.	Este trabajo
pGEMt::ck <i>HAP4</i>	pGEMt easy vector con ck <i>HAP4</i> clonado a partir de ADN genómico de la cepa cenpk113-7D con los cebadores Hap4speI.u y Hap4bamHI.l. El gen puede ser escindido con una digestión con SpeI y BamHI	Este trabajo
pRD3F::V1 <i>bap4</i>	pRD3F con V1 <i>bap4</i> clonado entre los sitios SpeI y BamHI	Este trabajo
pRD3F::ck <i>HAP4</i>	pRD3F con ck <i>HAP4</i> clonado entre los sitios SpeI y BamHI	Este trabajo
pRD4F::ck <i>HAP4</i>	pRD4F con ck <i>HAP4</i> clonado entre los sitios SpeI y BamHI	Este trabajo

3-. Cebadores

A continuación se muestra una relación de cebadores empleados en el transcurso de este trabajo. En todos los casos las terminaciones en “u” o “l” indican que son cebadores utilizados en PCR convencional (directo e inverso respectivamente). Las terminaciones en “F” o “R” indican que son cebadores utilizados para rt-qPCR (directo e inverso respectivamente) y la secuencia subrayada indica la presencia de una diana de restricción.

Cebador	Secuencia 5' → 3'
Act1F	TGG ATT CCG GTG ATG GTG TT
Act1R	TCA AAA TGG CGT GAG GTA GAG A
Aro3.l_in	CGG GCT GCA GGA ATT CAT TTG CAT TTT TCC CTC ATT TAC AG
Aro3.u_in	GCT TGA TAT CGA ATT CTA CAA GAA CAC TTT ATA GCA TTA TG
Aro4.l_n	CGG GCT GCA GGA ATT CGC TTA CAT ATA TCA TTA AAA AAA CAT C
Aro4.u_in	GCT TGA TAT CGA ATT CGT AAA CAA AAG CTA TCA GAA ATG
Cen3F	CCC TTC CCC TTC CGC TTA TA
Cen3R	CTG TGG ATT TTC CAT ATT GTT TGG
Cen5F	GGG AAC GCT TGC CTA CCA
Cen5R	TTT TGC TTG GCC CTT TGT TT
Cen8F	CAT AGC AAC CTG AGG GTG TAT CAC
Cen8R	CGC GCC AAC TAC CAT TCG
Cen9F	TGT ATA ATT CCG CAT TCA ATA ACC TT
Cen9R	GCA GCA GTC ATT GGC AAT ATT C
CIT1.l	TTA GTT CTT ACT TTC GAT TTT CTT TAC C
CIT1.u	ATG TCA GCG ATA TTA TCA ACA ACT AG
Hap4speI.u	AAA <u>ACT AGT</u> AAG AAT CAT GAC CGC AAA GAC T
Hap4bamHI.l	AAA <u>GGA TCC</u> TTT CAA AAT ACT TGT ACC TTT A
Hap4pro.u	GGG TTG CTG ATT TGT TTT ACC TAC

Hap4ter.l	GGC GAA GAA TAC TAT CAT TAC CC
Hap4F	TCG AAC GCT AAC CTT TAT GAC TTA AA
Hap44R	AGG TCG TCG ATG AAA CTG CTT T
KMX4F	GTA TAA ATG GGC TCG CGA TAA TG
KMX4R	CAT CGG GCT TCC CAT ACA AT
Kan.u	TTA GCT TGC CTC GTC CCC GC
Kan.l	TGC ACA CTG GAT GGC GGC GT
KpnI-LoxP.l	AAA <u>GGT ACC</u> ACT AGT GGA TCT GAT ATC ACC TA
KpnI-LoxP.u	AAA <u>GGT ACC</u> ATA ACT TCG TAT AAT GTA TGC TAT AC
Leu2.l2	ACT GTT GGA ACC ACC TAA ATC ACC
Leu2.u2	CGC TAT CGC ACA GAA TCA AAT TCG
Leu2F	GCC CCT AAG AAG ATC GTC GTT
Leu2R	ATG GCT TCG GCT GTG ATT TC
LK.l	AGC AAG GAT TTT CTT AAC TTC TTC GGC GAC AGC ATC ACC GTC GAC ACT GGA TGG CGG
LK.u	CCT CTA AGA AGA TCG TCG TTT TGC CAG GTG ACC ACG TTG GTT AGC TTG CCT CGT CCC
MAL12F	ACC TCG CCA TTT TTC CGT TA
MAL12R	CGA TGC AAT GGC TTC TTT CC
MAL23.l	TTA AGG AAT TAT GCT GTC TTC ATC TTT
MAL23.u	ATG GGT ATT GCG AAA CAG TCT TGC
QCR7F	GGG CTC ATC AAA CCG AGT TG
QCR7R	AAC ATC CTC TTG GGC TTT GAT C
QCR8F	GGT CCA AAG CAA AAA GGT ATA ACC
QCR8R	ACA GCG TTA TGG AAA ATA CCT TGT AA
SUC2.l	CTA TTT TAC TTC CCT TAC TTG GAA CT
SUC2.u	ATG CTT TTG CAA GCT TTC CTT TTC C
SUC2F	CTA TGC CTT GCA AAC TTT CTT CAA
SUC2R	TTG AAG CCC AGG CAA TAC CT
URA3.F	CAT GGG TGG AAG AGA TGA AGG
URA3.R	GCG TCT CCC TTG TCA TCT AAA CC
URA3.ci.u	GAG CAG AAG GAA GAA CGA AGG AA
URA3.S2.u	TAA GCC GCT AAA GGC ATT ATC C
URA3.ci.l	AAT ACT GTT ACT TGG TTC TGG CG
Ura3T3.u	TGC TAC TCA TCC TAG TCC TGT TGC TGC CAA GCT ATT TAA TAT ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
Ura3lox.l2	AGT CCT CTT CCA ACA ATA ATA ATG TCA GAT CCT GTA GAG ACC CTT AGT GCA TCT GAT ATC ACC TA

4-. Equipamiento habitual utilizado.

4.1-. Centrifugadoras.

Los modelos de centrifugas utilizados dependen del volumen de muestra y la aplicación de fuerza. En todos los casos se cumple:

1. Volúmenes inferiores a 2 mL se utilizó el modelo *Heraeus Biofuge Pico (Sorvall)*
2. Volúmenes inferiores a 2 mL y que requieren refrigeración *Eppendorf 5415R*.
3. Volúmenes comprendidos entre 2 mL y 10 mL, y con una velocidad inferior a 600g (3500rpm) se utilizó el modelo *Heraeus Labofuge 400 (Sorvall)*.

4. Volúmenes comprendidos entre 10 mL -50 mL ó muestras que necesitan ser centrifugadas a más velocidad y pueden requerir refrigeración se utilizó el modelo *Beckman-Coulter Allegra X22R centrifuge*, con rotores S2096 (placas multipocillo), S4250 (Rotor basculante).
5. Volúmenes superiores a 50 mL se utilizó el modelo *Beckman J2-21M* con rotores Ja-10, Ja-14 ó Ja-20, dependiendo del volumen.

4.2-. Baños y termobloques.

Las muestras que han requerido incubaciones se realizaron en baños de agua *Precistern* (Selecta) o preferentemente en termobloques *Accublock* (Labnet). Si las incubaciones necesitaron agitación se utilizó un agitador de tubos de tipo eppendorf/placa multipocillo *Vortemp56* (Labnet).

4.3-. Equipos espectrofotométricos.

Las medidas de Absorbancia (DO) se tomaron con un espectrofotómetro *Beckman DU 640*.

Las medidas de ácidos nucleicos se realizaron con un equipo *Nanodrop 1000* realizándose las conversiones de forma automática con el software que incluye.

5-. Condiciones de esterilización.

Los medios de cultivo se esterilizaron mediante autoclavado durante 20' a una temperatura de 115 a 120° C.

Los suplementos se filtraron a través de membranas *Millipore* con un diámetro de poro inferior a 0.45 µm (salvo que se indique lo contrario) y se agregan a los medios tras su esterilización.

6-. Medios habituales para el cultivo de microorganismos.

6.1-. Medio rico para levaduras.

YPD: contiene 10 g· L⁻¹ de extracto de levadura, 20 g· L⁻¹ de Bactopeptona y 20 g· L⁻¹ de glucosa. Suplementar si fuese necesario tras esterilizar.

Suplementos: G418 (Sigma A1720) a 0.2 g· L⁻¹. Cicloheximida (Sigma C7698) a concentraciones que varían desde 0.2 µg· mL⁻¹ hasta 0.8 µg· mL⁻¹ (dependiente de cepa).

YPG: contiene 10 g· L⁻¹ de extracto de levadura, 20 g· L⁻¹ de Bactopeptona y 26.1 g· L⁻¹ de glicerol.

YPGal: contiene 10 g· L⁻¹ de extracto de levadura, 20 g· L⁻¹ de Bactopeptona y 20 g· L⁻¹ de galactosa.

6.2-. Medio mínimo para levaduras.

SD: contiene 1.7 g· L⁻¹ de YNB sin sulfato amónico y sin aminoácidos, 5 g· L⁻¹ de sulfato amónico y 20 g· L⁻¹ de glucosa. Suplementar si fuese necesario tras esterilizar.

Suplementos: aminoácidos o bases nitrogenadas a las concentraciones previamente descritas (Sherman et al., 1986).

SDP: contiene $1.7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de YNB sin sulfato amónico y sin aminoácidos, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de L-prolina y $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucosa. Suplementar tras esterilizar.

Suplemento: p-Fluoro-DL-fenilalanina (Sigma F5251) en concentraciones variables.

6.3-. Medio industrial para levaduras.

MAB: se obtiene por la dilución de melazas brutas industriales que contienen concentraciones de sacarosa que depende de la azucarera que las produzca. Además, pueden presentar diferentes composiciones dependiendo de la temporada de recogida de la remolacha. En todas las ocasiones, se procedió a la dilución de las melazas, filtrado a través de *Millipore* con diámetro de poro de $0.45 \mu\text{m}$ y reajustado el volumen hasta que la concentración de sacarosa es de $36 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Suplementar tras esterilizar.

Suplementos: Biotina a $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (a partir de una solución previa a $0.2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y esterilizada mediante autoclavado) y fosfato diamónico a $0.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (a partir de una solución previa a $250 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y esterilizada mediante autoclavado).

6.4-. Medio de preesporulación (pre-spo) y esporulación (spo) para levaduras.

Pre-spo: contiene $8 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de extracto de levaduras, $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de bactopectona y $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucosa (Benítez and Codón, 1995).

Spo: contiene $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de acetato potásico (Benítez and Codón, 1995).

6.5-. Medios habituales para el cultivo de Escherichia coli.

Medio Luria-Bertoni (LB): contiene $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de triptona, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de extracto de levadura, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl, ajustando el pH a 7.5. Para la obtención de medio sólido se adiciona $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de agar. Suplementar si es necesario tras esterilizar y con una temperatura del medio cercana a los 50°C .

Suplementos: Ampicilina sódica $0.1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ (a partir de una solución a $100 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ en agua destilada almacenada a -20°C). X-Gal $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (a partir de una solución a $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ en dimetilformamida, mantenida a -20°C en oscuridad) (Sambrook and Russell, 2001).

6.6-. Medios sólidos.

Todos los medios anteriores se solidifican mediante la adición de $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de agar.

7-. Condiciones de mantenimiento y de cultivo generales.

Todas las levaduras se cultivaron en medios sólidos a una temperatura de 30° C por un tiempo que oscila entre los tres y los cuatro días. Una vez aisladas las colonias se mantienen en una cámara a 4° C por un tiempo que no supera el mes. Los refrescos de las cepas se realizan periódicamente desde placas anteriores o bien sacándolas de la colección mantenida a -80° C. Dicha colección se realiza con cultivos en fase estacionaria a los cuales se les añade glicerol hasta una concentración final de 20%(v/v).

7.1-. Obtención de precultivos de levaduras.

Una colonia aislada se inoculó en un tubo de 20 mL conteniendo 5 mL de YPD a 30° C y se incubó en un agitador orbital abierto *New Brunswick Scientific C10 Platform shaker* a 200rpm, hasta alcanzar la fase estacionaria temprana (12 h). En el caso de que el cultivo a inocular fuese medio mínimo, el precultivo se realizaba con el mismo tipo de medio.

7.2-. Cultivo de levadura.

Se toma el volumen adecuado del precultivo anterior para obtener en el nuevo medio una DO^{660nm} (690nm en caso de medio industrial) de 0.1 el cual se inocula en matraces de 250 mL que contienen 50 mL de cultivo (salvo que se indique lo contrario). La agitación se mantiene constante a 200 rpm en un agitador orbital cerrado *Optic wymen system* a 30° C. Si la cantidad de levadura a recoger supera los 20 g se inoculan matraces de 5 L con 1.5 L de medio manteniéndose las mismas condiciones salvo que la agitación se realiza en un orbital abierto *New Brunswick Scientific C10 Platform shaker*

7.3-. Tasas de crecimiento.

Todas se realizaron bajo las condiciones de cultivo anteriores. Las DO durante la fase de latencia y fase de crecimiento exponencial se representan gráficamente frente al tiempo en horas. La tasa de crecimiento del cultivo (h⁻¹) se indica como el coeficiente b, de la formula de un ajuste de mínimos cuadrados a una función exponencial.

$$y = ae^{bx}$$

7.4-. Cálculo del rendimiento y la producción.

Se pesa un filtro *Millipore* de 0.45 µm de diámetro de poro junto a un sobre de papel de aluminio. Un volumen controlado de cultivo se recoge mediante filtración utilizando el filtro y aplicando vacío con una bomba (*Millipore WP6122050*). Se procede al lavado con el mismo volumen de muestra con una solución de MgCl₂ a 20 g ·L⁻¹. Se lava dos veces más con agua destilada. Se

congela la muestra en N₂ líquido y se procede a liofilizarla durante 24 h. Se vuelve a pesar, siendo la biomasa final obtenida la diferencia entre los pesos.

El rendimiento $Y_{x/s}$ se obtiene por el cociente entre la biomasa (x) y la cantidad de sustrato consumido (s). La producción se refiere a la biomasa obtenida por litro de cultivo utilizado.

7.5-. Esporulación y disección de ascas.

Un preinóculo de la levadura a esporular se incuba en un tubo de 20 mL con 5 mL de medio pre-spo a una DO^{600nm} de 0.1. El cultivo se lleva hasta fase exponencial, tras lo cual las células se lavan en agua destilada estéril un par de veces. Tras el último lavado se resuspenden en un tubo de 20 mL con 5 mL de medio spo y se mantienen en agitación constante a 200 rpm y 22° C. Pasados 4-5 días se comprueba la presencia de ascas, y si hubiese una proporción suficiente de éstas, se procede a recoger una alícuota de 250 μ L que se centrifuga a 6000 rpm durante 4'. Se resuspende en 50 μ L de zimoliasa 2 g · L⁻¹ y se mantiene el tiempo necesario a temperatura ambiente. La reacción se para mediante la adición de 500 μ L de agua destilada y se mantiene en hielo.

Se micromanipulan en un micromanipulador Singer las ascas en cajas de Petri con YPD sólido y en donde el medio esté lo menos húmedo posible.

7.6-. Mantenimiento y cultivo de Bacterias.

Se cultivan en medio sólido a una temperatura de 37 ° C por un tiempo menor a las 16 h. Una vez crecidas en colonias aisladas se mantienen en una cámara a 4° C por un periodo de tiempo inferior a 1 semana. La colección de bacterias se mantiene a una temperatura de -80 ° C. Dicha colección está realizada con cultivos en fase estacionaria a los cuales se les adiciona glicerol a una concentración final del 20% (v/v).

Para realizar cultivos una única colonia se inocula en tubos de 20 mL con 5 mL de medio LB, en un agitador orbital a 200 rpm y a temperatura constante de 37° C (salvo que se indique lo contrario).

8-. Transformación de microorganismos.

8.1-. Transformación de *E. coli* competentes por el método del $CaCl_2$

Preparación de células competentes:

1. Inocular una colonia de *E. coli* en 3 mL de LB e incubar durante 9-10 h a 37° C.
2. Añadir 500 μ L del inóculo a 200 mL de medio SOB. Incubar a 22° C hasta que alcance una $DO^{600nm} = 0.42-0.7$ (20 h).

3. Enfriar las células en hielo durante 30' en tubos de centrifuga de 250 mL (esterilizar los tubos).
4. Centrifugar a 4000 rpm durante 10' a 4° C en un rotor JA-14 previamente enfriado a 4° C.
5. Descartar el sobrenadante e intentar secar el pellet lo mejor posible.
6. Resuspender el pellet agitando suavemente en 100 mL de TB, previamente enfriado en hielo. Incubar la mezcla durante 10' en hielo.
7. Centrifugar a 4000 rpm durante 10' a 4° C en un rotor JA-14 previamente enfriado a 4° C.
8. Descartar el sobrenadante e intentar secar el pellet lo mejor posible.
9. Resuspender el pellet agitando suavemente en 15 mL de TB previamente enfriado en hielo. Añadir 560 µL de DMSO y mezclarlo suavemente. Incubar 15' en hielo.
10. Añadir otros 560 µL de DMSO, mezclar agitando suavemente. Incubar en hielo.
11. Repartir alícuotas de 200 µL en eppendorf previamente enfriados en hielo.
12. Congelar los eppendorf con las células en N₂ líquido. Guardar a -80° C.

Transformación de baja eficiencia.

1. Preincubar al menos 30' cajas de Petri con LB sólido y suplementado para seleccionar los transformantes a 37° C.
2. Descongelar *E. coli* en hielo.
3. Mezclar el ADN, cuyo volumen no puede superar el 10% del volumen de células. Mantener en hielo durante 5'.
4. Sembrar rápidamente (y con la caja aun caliente) una dilución 1/10 en una caja y el resto del volumen de transformantes en otra.

Nota: Este procedimiento sólo se recomienda para la propagación de vectores.

Transformación de alta eficiencia.

1. Añadir a 100 µL de células competentes de 25 a 50 µL de la mezcla de ligación.
2. Incubar de 15 a 30' en hielo.
3. Incubar a 42 ° C durante 1'.
4. Incubar en hielo durante 1'.
5. Añadir 500 µL de LB.
6. Incubar a 37 ° C de 20' a 40'.
7. Sembrar en cajas de Petri con LB sólido y suplementado precalentadas a 37 ° C.

Nota: Este procedimiento se usa para transformar con ligaciones.

Medio SOB: 20 g· L⁻¹ de triptona, 5 g· L⁻¹ de extracto de levadura, 0.5 g· L⁻¹ de NaCl, 10 mL· L⁻¹ de una solución 0.25 M de KCl pH 7. Una vez autoclavado añadir 5 mL· L⁻¹ de una solución 2 M de MgCl₂· 6H₂O. Usar ddH₂O para la preparación de todos los medios y soluciones.

Solución TB: 3.02 g· L⁻¹ de Pipes (ácida), 2.2 g· L⁻¹ de CaCl₂· H₂O, 18.6 g· L⁻¹ de KCl. Ajustar el pH a 6.7 con el volumen necesario de una solución de KOH 2 N. Añadir 10.88 g· L⁻¹ de MnCl₂· 4H₂O. Esterilizar con filtros Millipore de un diámetro de poro igual a 0.45 µm. Usar ddH₂O para la preparación de todos los medios y soluciones.

8.2-. Transformación de *S. cerevisiae* por el método del acetato de litio (Gietz and Woods, 2002).

1. Precultivar la cepa a transformar.
2. Inocular 15 ml de YPD.
3. Incubar hasta que el cultivo alcance una DO^{660nm} entre 0.4 – 0.6.
4. Pasar el cultivo a tubos de 10 mL y centrifugar a 3500 rpm, durante 5'. Eliminar el sobrenadante mediante volcado y resuspender el pellet en 10 mL de agua estéril.
5. Hervir 150 µL de esperma de salmón durante 5', tras lo cual se introduce en hielo hasta su utilización.
6. Centrifugar las células del punto 4 a 3500 rpm durante 5'. Resuspender en 1 mL de agua y pasar a un eppendorf limpio.
7. Centrifugar a 13000 rpm durante 30". Retirar el sobrenadante.
8. Resuspender el pellet en 200 µL de agua estéril.
9. Pasar 100 µL de la suspensión celular a 2 nuevos tubos eppendorf.
10. Centrifugar a 13000 rpm durante 30", y retirar el sobrenadante
11. Añadir 360 µL de la mezcla de transformación al pellet de células del paso 10.
12. Resuspender las células mezclando bien con vortex.
13. Incubar a 42° C en un baño durante 40'. Incubar en hielo 2'.
14. Centrifugar a 10000 rpm durante 30". Retirar el sobrenadante.
15. Resuspender con cuidado en 1 mL de agua estéril.
16. Centrifugar a 10000 rpm durante 30". Retirar el sobrenadante.
17. Resuspender en 1 mL de YPD.
18. Incubar a 30° C durante 3-4 h. (Sólo si se usa un antibiótico como marcador de selección)
19. Sembrar en placas con medio sólido selectivo.
20. Incubar las placas a 30° C durante al menos 3 días.

Mezcla de transformación: 240 μL de una solución de polietilenglicol (PEG) 3500 al 50% (p/v), 36 μL de una solución de acetato de litio 1 M, 50 μL de una solución de ADN de esperma de salmón y 34 μL de ADN ó 34 μL de agua estéril (para el control negativo).

Solución de ADN esperma de salmón: Disolver 20 mg de ADN de alto peso molecular (Deoxyribonucleic acid Sodium Salt Type III from Salmon Testes, Sigma D1626) en 10 mL de TE (10 mM Tris-HCl pH 8, 1 mM EDTA). Agitar con una mosca magnética durante 2-3 h hasta que se disuelva. También se puede dejar agitando toda la noche a 4° C. Distribuir en alícuotas de 200 μL y mantener a -20° C.

9-. Extracción de ácidos nucleicos.

*9.1-. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala.*

1. Centrifugar 1.5 ml de bacterias (que han crecido hasta fase estacionaria en medio selectivo) a 13000 rpm durante 2'. Tirar el sobrenadante y conservar el pellet.
2. Añadir al pellet 100 μL de la solución 1 fría y resuspender el pellet mediante agitación vigorosa.
3. Añadir 200 μL de solución 2 y mezcla mediante inversión.
4. Añadir 150 μL de solución 3 fría y agitar vigorosamente, mantener en hielo de 3 a 5'.
5. Centrifugar a 13000 rpm durante 5'. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
6. Repetir el paso 5.
7. Añadir 2 volúmenes de etanol 96% a -20° C y 1/10 del volumen del paso 6 de NaCl 2.5 M.
8. Centrifugar durante 10' a 13000 rpm.
9. Retirar sobrenadante.
10. Lavar el precipitado con 500 μL de etanol 70%.
11. Centrifugar a 13000 rpm durante 5', descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
12. Resuspender con 25-30 μL de TE 1X. Añadir 1 μl de ARNasa 10 e incubar 30' a 37° C.

Solución 1: 25 mM de sacarosa, 10 mM de EDTA en tampón Tris-HCl 25 mM a pH 8, 0.1 g \cdot L⁻¹ de ARNasa

Solución 2: NaOH 0.2 M y SDS 1 %. Preparar justo antes de usar.

Solución 3: Acetato potásico 3 M y ácido acético glacial 11.5 % (v/v).

Tampón TE 1X: 1mM de EDTA en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7.5.

ARNasa 10: Stock de ARNasa 10 g \cdot L⁻¹.

9.2-. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* a gran escala.

1. Cultivar *E. coli* con el plásmido de interés en 50 mL de LB con el antibiótico usado para la selección. Dejar al menos toda la noche en agitación a 37° C.
2. Centrifugar a 4000 rpm durante 5'. Desechar el sobrenadante y conservar el pellet.
3. Añadir 1.6 mL de la solución 1.
4. Resuspender el pellet mediante agitación vigorosa y dejar en hielo 5'.
5. Añadir 3.2 mL de la solución 2, resuspender mediante inversión. Incubar en hielo durante 5'.
6. Añadir 2.4 mL de solución 3, resuspender mediante agitación vigorosa y mantener en hielo durante 5'.
7. Centrifugar a 4500 rpm durante 5'.
8. Recuperar el sobrenadante y filtrarlo a través de papel de filtro.
9. Añadir 3.2 mL de fenol equilibrado (USB) y agitar vigorosamente durante 5'.
10. Añadir 3.2 mL de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, agitar vigorosamente durante 5'.
11. Centrifugar a 4500 rpm durante 5'.
12. Pasar la fase hidrofílica, a un tubo nuevo.
13. Añadir 2.5 volúmenes de etanol absoluto y 1/10 del volumen del paso 11 de acetato sódico 3 M. Dejar al menos durante 15' a -20° C.
14. Centrifugar a 4500 rpm durante 10'.
15. Lavar con 10 mL de etanol 70%. Centrifugar durante 10' a 3500 rpm.
16. Descartar el sobrenadante, dejar secar el pellet y resuspender en TE 1X entre 100 y 200 µL.

Solución 1: 25 mM de sacarosa, 10 mM de EDTA en tampón Tris-HCl 25 mM a pH 8, 10 g· L⁻¹ de ARNasa

Solución 2: NaOH 0.2 M y SDS 1 %. Prepara justo antes de usar.

Solución 3: acetato potásico 1.32 M, ajustar el pH a 4.8 con HCl.

Tampón TE 1X: 1mM de EDTA en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7.5.

9.3-. Extracción de ADN genómico de *S. cerevisiae*.

1. Preinocular levaduras en 5 mL de YPD e incubar durante toda la noche.
2. Recoger las células y resuspender en 1mL de agua destilada.
3. Pasar a un eppendorf limpio y volver a centrifugar las células.
4. Resuspender las células en 320 µL de solución 1.
5. Añadir 3.2 µL de β-mercaptoetanol (10%)
6. Añadir 10 µL de zimoliasa 20T (USB) (15 g· L⁻¹). Incubar durante 1 h a 37° C.
7. Centrifugar 20'' y tirar el sobrenadante.

8. Resuspender el pellet en 370 μ L de solución 2. Mezclar suavemente.
9. Añadir 16 μ L de SDS 10%. Agitar suavemente e incubar 30' a 65° C.
10. Añadir 85 μ L de acetato potásico 5M.
11. Incubar durante 1 h en hielo.
12. Centrifugar 15'.
13. Pasar el sobrenadante a un eppendorf limpio.
14. Añadir 1.2 mL de etanol 96% y dejar durante 30' a -20° C.
15. Centrifugar a 13000 rpm durante 10'. Descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
16. Resuspender en 300 μ L de TE 1X.
17. Añadir 15 μ L de ARNasa 1 g· L⁻¹. Incubar durante 30' a 37° C.
18. Añadir un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico en proporciones 25:24:1 y agitar vigorosamente.
19. Centrifugar durante 5' a 13000 rpm.
20. Sí la interfase tiene mucha suciedad, volver a añadir un volumen de fenol-cloroformo-alcohol isoamílico a la parte hidrofílica.
21. Precipitar en 2.5 volúmenes de etanol 96% y 1/10 del volumen inicial de acetato sódico 3M.
22. Centrifugar durante 10' a 13000 rpm
23. Lavar con 500 μ L de etanol 70%,
24. Centrifugar 10' a 13000 rpm.
25. Retirar el etanol 70% y dejar secar. Una vez el ADN este seco, resuspender en 50 μ L de TE1X y cuantificar.

Solución 1: sorbitol 0.9 M, EDTA 0.1 M, a pH 8.

Solución 2: 50 mM Tris-HCl pH8, 20 mM EDTA a pH 8.

9.4-. Extracción de ADN genómico de *S. cerevisiae*.

También se han realizado extracciones de ADN genómico a partir de un cultivo en 5 mL de YPD con Master Pure yeast ADN purification kit (Epicenter® Biotechnology madison WI, USA), según las instrucciones del fabricante. La reducción de todos los volúmenes en 5 veces tanto de cultivos como de soluciones permite la obtención de ADN para realizar PCR convencional.

9.5-. Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*.

1. Preinocular en 10 mL de medio selectivo e incubar durante toda la noche.
2. Centrifugar durante 5' a 3500 rpm.
3. Lavar con 10 mL de agua destilada.

4. Centrifugar durante 5' a 3500 rpm.
5. Resuspender en 0.64 mL de solución A.
6. Añadir 6.4 μL de β -mercaptoetanol (10%) previamente diluido 10 veces y 10 μL de zimoliasa 20T ($15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$)
7. Incubar durante 1 h a 37°C .
8. Centrifugar durante 1' a 13000 rpm.
9. Añadir al pellet 100 μL de la solución 1 fría y resuspender el pellet mediante agitación vigorosa.
10. Añadir 200 μL de solución 2 y mezcla mediante inversión.
11. Añadir 150 μL de solución 3 fría y agitar vigorosamente, mantener en hielo de 3 a 5'.
12. Centrifugar a 13000 rpm durante 5'. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
13. Repetir el paso 5.
14. Añadir 2 volúmenes de etanol 96% a -20°C y 1/10 del volumen del paso 6 de NaCl 2.5 M.
15. Centrifugar durante 10' a 13000 rpm.
16. Retirar sobrenadante.
17. Lavar el precipitado con 500 μL de etanol 70%.
18. Centrifugar a 13000 rpm durante 5', descartar el sobrenadante y dejar secar el pellet.
19. Resuspender con 20 μL de TE 1X. Usar 10 μL para transformar *E. coli*, según protocolos anteriores.

Solución A: 0.9M Sorbitol y 0.1M EDTA pH 8.

Solución 1: 25 mM de sacarosa, 10 mM de EDTA en tampón Tris-HCl 25 mM a pH 8, $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ARNasa.

Solución 2: NaOH 0.2 M y SDS 1 %. Preparar justo antes de usar.

Solución 3: Acetato potásico 3 M y ácido acético glacial 11.5 % (v/v).

Tampón TE 1X: 1 mM de EDTA en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7.5.

9.6-. Extracción de ARN de *S. cerevisiae*.

Se han realizado extracciones de ARN a partir de 1 mL de cultivo en fase exponencial con *Master Pure yeast ARN purification kit* (*Epicenter Biotechnology Madison WI, USA*), según las instrucciones del fabricante.

10-. Manipulación de ácidos nucleicos.

10.1-. Precipitación de ADN.

El ADN precipita mediante la adición a la solución que lo contenga 1/10 del volumen de muestra con NaCl 2.5 M y 2 volúmenes de etanol 96% a -20°C . Una vez mezclado se mantiene

durante 30' a -20° C. Se centrifuga a 13000 rpm durante 10'. Se añade 1 mL de etanol 70% y se agita vigorosamente. Nuevamente se centrifuga a 13000 rpm durante 3' y se retira el etanol. Se deja secar el precipitado y se resuspende en el volumen deseado de agua o TE.

Si el fragmento de ADN que se desea precipitar es de un tamaño inferior a 500 pb, el protocolo a seguir es igual salvo que se añade al ADN ½ del volumen con acetato amónico 7.5 M y se mantiene a -20° C durante un mínimo de 8 h.

10.2-. Digestión de ADN con enzimas.

Las digestiones se llevan a cabo en el tampón indicado por el fabricante y con 1 U de enzima, para la digestión de plásmidos. Para las digestiones de ADN genómico se incrementa la cantidad de enzima a 5 U.

10.3-. Generación de extremos romos.

El rellenado de extremos 5' prominentes y la degradación de extremos 3' prominentes provocados por cortes de enzimas de restricción se realizan usando la *polimerasa de Klenow (Roche)*. Se añade al ADN en una concentración de 2 U por cada 50 µL y 1 µL de dNTPs 0.5 mM. Se incuba la reacción a 30° C durante 30'. Posteriormente se inactiva calentando la muestra a 75° C durante 10'.

10.4-. Desfosforilación de plásmidos.

Se añade 1 U de *fosfatasa alcalina (Calf intestine phosphatase, Roche)* a 30 µl de solución con ADN. Además se añade 3 µl de tampón 10X, proporcionado por el fabricante. Se incuba a 37° C durante 1 h. La reacción se detiene calentando a 75° C durante 10'.

10.5-. Ligación.

Para las ligaciones se utiliza la enzima ligasa del fago T4 (*Roche*), añadiendo 1 U de enzima y utilizando el tampón proporcionado por el fabricante. La reacción se lleva a cabo en un volumen de 10 µL, intentando mantener una relación entre inserto y vector de 10:1. Se incuba al menos 12 h a una temperatura de 12-14° C. A las ligaciones con extremos romos se les añade 2 µL de PEG 8000 al 20% (p/v).

En el caso de realizar ligaciones de fragmentos de ADN con el vector pGEMt easy vector (*Promega*) se siguieron las instrucciones del fabricante.

10.6.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

10.6.1.- Reacción convencional.

Se mezclaron 1 μL de cebadores 5-10 μM , 1 μL de dNTPS 10 mM, 5 μL de tampón 10X, ADN molde, 1 U de *EcoTaq*® y ddH₂O hasta un volumen final de 50 μL . La concentración de MgCl₂ varió dependiendo del origen de la muestra de ADN. Si es ADN genómico de levaduras la concentración final fue de 3 mM, mientras que si se trata de un plásmido la concentración final es de 1.5 mM.

La reacción se realizó en un termociclador de gradiente térmico *TC-512 (techne)* o bien en un termociclador *Progene (Techne)*. Por norma general se realiza un primer ciclo a 94° C durante 2' y posteriormente se realizan 35 ciclos que cada uno contiene tres segmentos. El primero de los segmentos consiste en mantener la temperatura a 94° C durante 30", seguido de otro de 30" a una temperatura establecida empíricamente para cada pareja de cebadores, y, finalmente, otro de aproximadamente 1' por cada kilobase a amplificar a 72° C. Al final de estos 35 ciclos, se realiza un único ciclo de 7' a 72° C.

10.6.2.- Reacción con enzimas de alta fidelidad.

Se utilizó la enzima *Expand High Fidelity (Roche)*. Las condiciones de la PCR se ajustaron a las indicaciones del fabricante.

10.6.3.- Reacción de rt-qPCR.

Para este tipo de reacciones se utiliza el método de un solo paso que consiste en la realización de la retrotranscripción del ARN a ADN copia y la PCR de forma consecutiva en un mismo pocillo de microplaca. Para ello el ARN purificado y diluido a una concentración de 100 ng \cdot μL^{-1} se trata con *ADNasa (USB)*, según las indicaciones del fabricante. Una vez inactivada la ADNasa, se procede a mezclar 100 ng de ARN, 1X *Brilliant® II SYBR® Green qPCR master mix (Stratagene)*, 6.25 U de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase (Applied Biosystems)*, 1.25 U de *inhibidor de ARNasa (Applied Biosystems)* y 0.2 μM de cada uno de los cebadores diseñados con el programa *Primer Express™ software v2.0.0 (Applied Biosystems)* en un volumen final de 20 μL de reacción. Las muestras se incubaron durante 30' a 48° C y a continuación se llevaron a cabo 40 ciclos de 15" a 95° C y 1' a 60° C para realizar las amplificaciones en un termociclador *AB 7500 system (Applied Biosystems)*. Los datos se analizaron mediante el programa *Sequence Detection software v1.2.2 (Applied Biosystems)*. Cada señal de fluorescencia se normaliza con su correspondiente señal para el gen *ACT1* para eliminar posibles errores de carga.

10.6.4-. Reacción de qPCR.

Para realizar las cuantificaciones del número de copias de genes o centrómeros se utilizaron 100 ng de ADN, 1X *Brilliant® II SYBR® Green qPCR master mix* (Stratagene), y 0.2 μ M de cada uno de los cebadores diseñados con el programa *Primer Express™ software v2.0.0* (Applied Biosystems). Las muestras se incubaron durante 40 ciclos de 15" a 95° C y 1' a 60° C para realizar las amplificaciones en un termociclador *AB 7500 system* (Applied Biosystems). Los datos se analizaron mediante el programa *Sequence Detection software v1.2.2* (Applied Biosystems). Cada señal de fluorescencia se normaliza con la correspondiente señal para el gen *KanMX4* y fueron calibradas al valor obtenido por la cepa S+.

10.7-. Obtención de ADN para cariotipos.

1. Inocular una colonia en 20 mL de YPD e incubar a 30° C durante toda la noche.
2. Centrifugar a 3500 rpm durante 5'. Retirar el sobrenadante y lavar con 5 mL de EDTA 50 mM a pH 8.
3. Resuspender en 0.6 mL de tampón CPES. Añadir 1 mL de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 2% en tampón CPE mantenida a 55° C.
4. Esta solución caliente se introduce en el molde de los tacos de agarosa y se deja solidificar en hielo durante aproximadamente 5'. Una vez gelifican se pasan a cajas de Petri estériles.
5. Cubrir con 5 mL de tampón CPE e incubar a 30° C durante 4 h.
6. Retirar el tampón y añadir 5 mL de tampón TESP.
7. Incubar a 50° C durante toda la noche.
8. Lavar tres veces a 50° C con 10 mL de tampón TE. Cada lavado es de 30'.
9. Lavar dos veces a temperatura ambiente con 10 mL de TE. (No son necesarios lavados tan largos como los del punto anterior.)
10. Cubrir los tacos de agarosa con 10 mL de EDTA 50 mM pH 8 y conservar a 4° C hasta su utilización. (Pueden estar meses).

Solución CPE: ácido cítrico 40 mM, fosfato sódico 120 mM y EDTA-Na 20 mM. Realizar la solución a partir de soluciones concentradas de ácido cítrico 0.5 M a pH 6, tampón fosfato 1 M a pH 6 y EDTA-Na 0.5 M pH 8.

Solución CPES: ácido cítrico 40 mM, fosfato sódico 120 mM, EDTA-Na 20 mM, D-sorbitol 1.2 M, DTT 5 mM y zimoliasa 20T a 1 g· L⁻¹. Realizar la solución a partir del anterior pero diluyendo las reservas concentradas con D-sorbitol 2 M y agua. La zimoliasa se agrega justo antes de usar la solución.

Solución TESP: Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na 450 mM, SDS 1% (p/v) y proteinasa K a 1 g· L⁻¹. Realizar la solución a partir de soluciones concentradas de Tris-HCl 1 M a pH 8, EDTA-Na 0.5 M

a pH 8 y SDS 10% (p/v). La proteinasa K se añade después de calentar la solución a 50° C y justo antes de usarla.

10.8-. Separación de ácidos nucleicos.

10.8.1-. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN se separan según su tamaño mediante electroforesis de agarosa a una concentración del 0.8% (p/v). La agarosa se añade al volumen necesario de tampón TAE 1X, calentándose hasta que se disuelva en un microondas. Para poder visualizar el ADN, se añade bromuro de etidio hasta una concentración final de 0.2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ antes de que se produzca la gelificación de la solución. A las muestras se les añade el volumen requerido de tampón de carga 6X. El gel con las muestras cargadas se somete a un campo eléctrico de 5-12 V $\cdot \text{cm}^{-1}$ (unos 100 V en fuentes de alimentación *Power Pac 300 (BioRad)* o *Pharmacia LKB GPS 200/400*). El tiempo depende del grado de separación que se desee.

TAE 50X: 50 mM de EDTA en 2 M de Tris-acetato a pH 8.

Tampón de carga 6X: 0.25% (p/v) de Azul de bromofenol, 0.25% (p/v) xileno cianol FF y 15% Ficoll (PM = 400). El almacenamiento se realiza a temperatura ambiente.

10.8.2-. Electroforesis de ADN en campo pulsante.

Los bloques de agarosa obtenidos en el punto 10.8 se cargan en geles de agarosa al 0.9% (p/v), en tampón TBE 0.5X. La electroforesis se lleva a cabo en una cubeta electroforética *CHEF-II (Bio-Rad)*, en la cual el tampón está circulando a través del sistema a una temperatura de 12° C. Las condiciones de voltaje son de 200 V (6V $\cdot \text{cm}^{-1}$) y las del tiempo de orientación del campo electromagnético depende del grado de separación que se desee. Habitualmente se ha utilizado las siguientes programaciones: (I) un ciclo de 16 h con pulsos cada 70" seguido de otro ciclo de 12 h con cambios en el campo electromagnético cada 120" ó (II) un único ciclo de 28 h con un incremento gradual de los tiempos de cambio de campo que van desde los 70" hasta los 120". Sí se necesita separar adecuadamente los cromosomas de alto peso molecular la programación se realiza en dos ciclos, el primero es de 18 h con tiempos de cambio del campo eléctrico que van desde 240" hasta los 160", seguido de un nuevo ciclo de 22 h con cambios que van desde los 90" hasta los 60". En este último caso no es necesario reemplazar el tampón de electroforesis.

Una vez concluida la electroforesis se procede a la tinción de los geles en baños de agua destilada con bromuro de etidio. La tinción se realiza durante 30', y posteriormente se realizan lavados con agua destilada.

TBE0.5X: Se realiza mediante dilución de una solución TBE 5X que contiene: 10 mM de EDTA-Na en 0.45 M de Tris-borato. Ajustar el pH a 8.

10.9-. Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

Se han utilizado distintos kits comerciales, realizándose según las instrucciones del fabricante: *GenElute® gel extraction kit (Sigma)*, *Axyprep DNA gel extraction kit (Axygen)* y *GFX™ (Amersham biosciences)*.

10.10-. Filogenias.

Se realizaron matrices de presencia o ausencia de bandas de los Southern-blot realizados con las distintas levaduras industriales. Dicha matriz se introdujo en el software libre FreeTree para generar un árbol UPGMA con coeficiente Dice representándose el dendograma con el software libre TreeView.

11-. Hibridación de sondas marcadas a ADN fijado en membrana.

11.1-. Transferencia de ADN a membranas.

11.1.1-. Transferencia de fragmentos de ADN.

Una vez se posee una fotografía del gel transiluminado con luz UV (*UVP*) y con las debidas referencias:

1. Sumergir el gel en solución de despurinización durante 15' en agitación suave (*k5250 basic, IKA labortechnik*). Retirar la solución transcurrido el tiempo.
2. Sumergirlo en solución de desnaturalización durante 30' en agitación suave. Retirar la solución transcurrido el tiempo.
3. Sumergir el gel en solución de neutralización durante 30' en agitación suave. Retirar la solución transcurrido el tiempo y lavar brevemente con agua destilada.

La transferencia se realiza mediante microcapilaridad. Sobre un soporte de metacrilato o cristal se colocan dos tiras de papel *Whatman® 3MM* empapados en solución SSC 20X, quedando ambos extremos sumergidos en la misma solución. Sobre estas tiras se deposita el gel tratado y sobre éste se coloca una membrana *Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech)*, previamente humedecida con SSC 20X, y teniendo cuidado de no dejar burbujas. Sobre la membrana se colocan tres recortes de papel *Whatman® 3MM* humedecidos con SSC 20X del mismo tamaño que el gel. Sobre estos recortes, se coloca una pila de papel de filtro convencional, recortado del mismo tamaño del gel. Sobre esta pila de papeles se coloca un peso aproximado de 500 g. La transferencia se mantiene por más de 12 h, añadiendo un volumen de SSC 20X que evite la evaporación total de los reservorios. Si esto ocurre se añade nuevamente SSC 20X y se espera a que se reactive la capilaridad. Tras finalizar la transferencia se desmonta la pirámide y se señala la posición de los picillos en la membrana Hybond con un lápiz. Lavar la membrana con cierto volumen de solución SSC 2X y dejar secar. Irradiar con luz ultravioleta ($70000 \mu\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ *CrossLinker CL 1000, UVP*) la

membrana lo que provoca la fijación del ADN de forma covalente. La membrana así tratada puede conservarse durante meses antes de su utilización.

Solución de despurinización: HCl 0.25 M (20.88 mL de HCl 37%, enrasar a un litro con agua destilada). Conservar a temperatura ambiente no más de 1 mes.

Solución de desnaturalización: NaOH 0.5 M y NaCl 1.5 M. Conservar a temperatura ambiente hasta 3 meses.

Solución de neutralización: Tris-HCl 1 M y NaCl 1.5M. Ajustar el pH a 7.5. Conservar a temperatura ambiente hasta 3 meses.

SSC20X: Citrato trisódico 0.3M y NaCl 3 M, comprobar que el pH se mantiene entre 7 y 8.

11.1.2-. Transferencia de cromosomas de *S. cerevisiae*.

Tratar el gel con las mismas soluciones que en el apartado anterior salvo la solución de neutralización. El tratamiento con solución de despurinización dura 30', mientras que con las soluciones de desnaturalización y neutralización se prolonga durante 60'.

Solución de neutralización: 0.5 M de Tris-HCl y NaCl 3 M ajustando el pH final de la solución a 7.5.

11.2-. Marcaje y cuantificación de sondas radiactivas.

1. Desnaturalizar el ADN a utilizar como sonda (25-50 ng en 13 μ L) a 100° C durante 5'. Enfriar inmediatamente en hielo manteniéndolo durante 2'.
2. Añadir 2 μ L de una mezcla de dATP, dGTP y dTTP a 0.5 mM de cada uno de ellos.
3. Añadir 2 μ L de un concertado 10x de hexanucleótidos comerciales (*Roche*).
4. Añadir 2 U de polimerasa de Klenow (*Roche*).
5. Añadir 2 μ L de [α_{32}] dCTP (3000 Ci · mmol⁻¹).
6. Incubar un mínimo de 1 h a 37° C.
7. Eliminar los nucleótidos no incorporados haciendo pasar la muestra a través de una columna de *Sephadex G-50* (*Amersham*). Recoger la solución eluida.
8. Tomar 1 μ L del eluido, depositarlo sobre una membrana Millipore depositada en el fondo de un tubo de centelleo. Añadir 5 mL de solución de centelleo. Cuantificar la sonda en un contador de centelleos (*Wallac 1409*).
9. Desnaturalizar la sonda calentándola a 100° C durante 5' y enfriar inmediatamente en hielo dejándola durante 2'. Si la sonda no se va a utilizar en ese momento se puede conservar a -20° C, pero teniendo en cuenta que la señal comenzará a decaer.

Columnas de Sephadex® G-50: El Sephadex® G50 se prepara hirviendo o autoclavando 5 gramos en 75 mL de tampón TE. Las columnas se construyen con dos tubos de 1.5 mL, uno sobre el otro,

teniendo el superior un pequeño orificio, realizado con una aguja hipodérmica. El orificio se cubre con lana de vidrio siliconizada o con filtros de cigarrillos (*OCB SLIM Filtres*, siendo ésta la opción más adecuada). Los tubos se sitúan dentro de un tubo de plástico de 10 mL. Al tubo de 1.5 mL que está en la parte superior del conjunto se le añade 1 mL de Sephadex G-50 y se centrifuga en un rotor basculante a 3000 rpm durante 3'. Se descarta el tampón que ha eluido y que se encuentra en el tubo inferior. Se adiciona la sonda marcada (habiendo completado su volumen hasta 100 μ L) sobre la columna ya empaquetada y se centrifuga nuevamente a 3000 rpm durante 3', recogándose la sonda, ya limpia de nucleótidos, en un nuevo tubo inferior.

Nota: Para marcar genómico del fago lambda utilizar 1 μ L con el [α_{32}] dCTP más antiguo posible y proceder de la misma forma.

11.3-. Hibridación de ácidos nucleicos.

Las membranas con el ADN fijado se sumergen en 5 mL de solución de hibridación, manteniéndose con agitación a 65° C en hornos de hibridación al menos durante 30'. Seguidamente se añade sonda hasta una cantidad mínima de radiactividad total de 10^6 cpm \cdot mL⁻¹ de solución de hibridación. La hibridación se realiza en agitación rotacional durante un mínimo de 12 h. A continuación se retira la solución de hibridación y se realizan los siguientes lavados: 2 lavados a temperatura ambiente de 5' con unos 50 mL de solución de lavado, posteriormente se realiza un lavado de al menos 1 h con solución de lavado nueva a 65° C y en agitación rotacional. La membrana se envuelve en plástico transparente para evitar que se seque. A continuación se expone en una película *Kodak Biomax MR* a -80° C en casetes de exposición evitando cualquier fuente de luz que no sea puramente roja.

Solución de hibridación: Tampón fosfato sódico 0.5 M a pH 7.5 y 7% de SDS.

Solución de lavado: SSPE 0.1%, EDTA-Na 5 mM y SDS 0.5%.

Solución SSPE20X: NaCl 3 M, NaH₂PO₄ 0.2 M y EDTA 20 mM. Se mezclan los productos y se ajusta el pH a 7.4 con NaOH 10 M. A medida que se acerca el pH a 7.4 se produce la disolución de los componentes, bajando el pH de nuevo, por lo que el proceso de ajuste del pH exige especial atención.

11.4-. Deshibridación de membranas.

Aunque se desaconseja la realización del mismo, en casos muy puntuales se procedió a la eliminación de la radiactividad fijada. Para ello se hierve el filtro en SDS 0.1% y SSPE 1X durante 10'. Si persiste la marca, se repite el proceso todas las veces necesarias, tendiendo mucho cuidado de que la membrana no se seque ya que si esto sucede la radiactividad no podrá ser eliminada totalmente.

12-. Macroarrays.

Se procedió al cultivo de las distintas cepas en medio YPD e YPG, cuando los cultivos se encontraban en crecimiento exponencial (DO^{690nm} 0.7) se recogieron y se procedió a la purificación de ARN total. 100 μ g de ARN se enviaron a la sección de Chips de DNA-S.C.S.I.E (Universidad de Valencia) donde fueron tratados para realizar su hibridación comparada con una matriz con 6144 genes de *S. cerevisiae*. Los ARN de las cepas V1 y DOG21 cultivadas en YPD e YPG fueron comparados dos a dos, de tal forma que se generaron 4 archivos de datos con resultados significativos:

- a) La cepa V1 cultivada en YPD comparada con la cepa V1 cultivada en YPG.
- b) La cepa DOG21 cultivada en YPD comparada con la cepa DOG21 cultivada en YPG.
- c) La cepa V1 cultivada en YPD comparada con la cepa DOG21 cultivada en YPD
- d) La cepa V1 cultivada en YPG comparada con la cepa DOG21 cultivada en YPG.

Todos los resultados con significancia estadística y con un cociente de expresión superior a 2.5 veces en una u otra condición, se les aplico el Log_2 lo que origina valores positivos sí el cociente de la expresión es mayor a 1 (por lo que la expresión en la primera de las condiciones es mayor que la expresión en la segunda) y valores negativos sí el cociente de la expresión es menor a 1 (por lo que la expresión en la primera de las condiciones es menor que la expresión en la segunda). De esta forma se procedió a la elaboración de listados con el nombre de los genes con valor positivo independientes de los listados de los genes con valor negativo, para cada uno de las comparaciones dos a dos. En estas listas de genes se procedió a la búsqueda de ontologías génicas mediante software libre alojado en el portal SGD. Las comparaciones entre dos listas se ha realizado con el software libre alojado en el portal Babelomics (Al-Shahrour et al., 2008) y que permite la obtención de resultados con significancia estadística realizada con un test de Fisher exacto y teniendo en cuenta solo valores $p < 0.01$ (Cuanto menor sea el valor mayor fortaleza del dato).

13-. Citometría de flujo.

El citómetro de flujo corresponde con un *Becton-Dickinson FACScalibur* (BD and Company) que se controla a través del software *CellQuestPro*.

13.1-. Contenido en ADN.

1. Recoger las células en la fase de crecimiento adecuada.
2. Tomar el volumen necesario de cultivo para tener 1 mL de una suspensión celular entre 10^7 - 10^8 cel \cdot mL⁻¹
3. Centrifugar a 13000 rpm 1' y lavar un par de veces con solución citrato.
4. Resuspender en 1 mL de etanol 70%.

5. Mantener durante toda la noche a -20°C (las células fijadas se pueden almacenar a -20°C hasta seis meses).
6. Tomar $100\ \mu\text{L}$ de la suspensión de células fijadas para obtener una suspensión celular entre 10^6 - $10^7\ \text{cel} \cdot \text{mL}^{-1}$
7. Centrifugar y lavar con $1\ \text{mL}$ con solución citrato.
8. Resuspender en $500\ \mu\text{L}$ de la misma solución.
9. Añadir $5\ \mu\text{L}$ de una solución de ARNasa 10.
10. Incubar durante toda la noche a 37°C sin agitación.
11. Añadir $25\ \mu\text{L}$ de una solución de proteinasa K.
12. Incubar durante $1\ \text{h}$ a 50°C .
13. Añadir $0.1\ \mu\text{L}$ de *SYBR Green* (*SYBR Green I nucleic acid gel stain 10000x*, *Invitrogen S7585*).
14. Añadir $500\ \mu\text{L}$ de la solución. Incubar toda la noche en oscuridad a 4°C .
15. Antes de introducir en el citómetro de flujo se da un pulso corto de sonicado.

Solución citrato: $50\ \text{mM}$ Na-citrato pH 7.8.

Solución ARNasa10: ARNasa a $10\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Solución proteinasa K: proteinasa K a $1\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

13.2-. Viabilidad

1. Lavar dos veces una suspensión celular ($10^6 - 10^7\ \text{cel} \cdot \text{mL}^{-1}$) con agua destilada.
2. Resuspender en $1\ \text{mL}$ de agua destilada.
3. Añadir $3\ \mu\text{L}$ de solución de Oxonol.
4. Incubar durante $20'$ en oscuridad a temperatura ambiente.
5. Operar en el citómetro de flujo ajustándose a los parámetros preestablecidos en la plantilla.

Solución de Oxonol: Oxonol (*Invitrogen B438*) a $0.5\ \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ diluido en DMSO al 99.9% y salvaguardado de la luz. Conservar a -20°C .

14-. Determinación de hidratos de carbono.

14.1-. Determinación de azúcares reductores

El protocolo utilizado corresponde con el descrito previamente (Somogyi, 1952; Nelson, 1957), con leves modificaciones.

1. A $150\ \mu\text{L}$ de muestra (diluida o no) añadir $150\ \mu\text{L}$ de Reactivo de Somogyi. Agitar suavemente.
2. Calentar a 95°C durante $10'$. Enfriar en hielo.

3. Añadir 150 μL de Reactivo de Nelson. Agitar vigorosamente hasta eliminar todo el gas que se produce en la reacción.
4. Añadir 1.5 mL de agua destilada. Incubar 15' a temperatura ambiente.
5. Medir absorbancia a 520 nm.

La cantidad de azúcares reductores se extrapola a partir de una recta realizada con cantidades crecientes de glucosa (entre 0 a 350 μg) en agua destilada.

Solución Somogyi I: Se disuelven 15 g de $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ y 30 g de Na_2CO_3 en 300 mL de agua destilada. Se añaden 20 g de NaHCO_3 y se disuelven. Se añaden 500 mL de Na_2SO_4 al 36% (p/v) desgasificado. Se ajusta el volumen con agua hasta 1 L.

Solución Somogyi II: Se mezclan 5 g de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ y 45 g Na_2SO_4 en 250 mL de agua destilada.

Reactivo Somogyi: Se mezclan 4 partes de solución Somogyi I por una parte de solución Somogyi II justo antes de usar.

Reactivo de Nelson: Se disuelven 12.5 g de $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ en 225 mL de agua destilada. Se añaden 10.5 mL de H_2SO_4 concentrado mientras el resto se agita. Se añaden 12.5 mL de agua destilada con 1.5 g de $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, en agitación. Se mantiene durante 48 h a 37° C. Este reactivo se almacena a temperatura ambiente, en recipientes protegidos de la luz. Debe manejarse con guantes debido a su toxicidad.

14.2.- Determinación de azúcares totales.

Se determinaron por el método de la antrona (Chung and Nickerson, 1954)

1. Añadir a 200 mL de muestra a 800 mL de reactivo, tras lo cual se agita vigorosamente.
2. Hervir durante 10'.
3. Enfriar en hielo.
4. Medir la absorbancia a 540nm.

Reactivo: 25 mL de agua destilada se mezclan cuidadosamente con 75 mL de ácido sulfúrico, tras lo cual se enfría introduciendo el recipiente en hielo. Una vez que se temple al solución anterior se añaden 0.2 g de antrona (Merck 801461) y se agita hasta que se disuelva. El reactivo dura 1 día a temperatura ambiente y de 3 a 4 días a 4° C.

14.3.- Determinación de sacarosa.

Se trata de una modificación del punto 14.1. A 500 μL de muestra (diluida o no) en dónde se sospecha la presencia de sacarosa se añaden 10 μL de una solución de invertasa (*Sigma I4504*) a una concentración de 500 $\text{U} \cdot \text{mL}^{-1}$. Incubar durante 1 h a 30° C. A la muestra con y sin tratamiento se le determina la concentración de azúcares reductores utilizando una recta de sacarosa tratada de la misma forma. Rectificar el resultado si la muestra sin tratar presenta azúcares reductores.

14.4-. Determinación de glucosa.

Se basa en la determinación de glucosa mediante un método enzimático descrito previamente (Keston, 1956).

1. Añadir a 150 μL de muestra, 150 μL de solución enzimática y 50 μL de solución o-tolidina.
2. Incubar durante 30' a 37° C.
3. Añadir a la reacción 1.5 mL de agua destilada.
4. Medir a 420nm inmediatamente.

Solución enzimática: Contiene glucosa oxidasa (*Sigma G-6125*) a una concentración de $0.66 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ y peroxidasa (*Sigma P8125*) a $0.25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ en tampón fosfato potásico 0.5 M a pH 6.

Solución o-toluidina: O-tolidina (*Sigma T3501*) a $2.33 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ en metanol.

14.5-. Determinación de glucógeno y trehalosa.

Se basa en el protocolo descrito previamente (Parrou and Francois, 1997), con ligeras modificaciones.

1. Resuspender de 10 a 20 mg de levadura liofilizada en 0.25 mL de Na_2CO_3 0.25 M. Incubar durante 4 h a 95-98° C (97° C).
2. Añadir 0.15 mL de ácido acético 1 M.
3. Añadir 0.6 mL de acetato-Na 0.2 M (añadir suavemente ya que de lo contrario se produce CO_2 de forma violenta).
4. Tomar 0.4 mL de la solución 3 y añadir 9 μL de una solución de amiloglucosidasa. (concentración final a $2 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$). Mantener en agitación constante a 50 rpm (*Vortex*) y a una temperatura de 57° C.
5. Tomar 0.4 mL de la solución 3 y añadir 7 μL de una solución de trehalasa (concentración final a $0.05 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$). Incubar sin agitación a 37° C durante toda la noche.
6. Centrifugar 5' a 13000 rpm, las veces necesarias para eliminar el pellet.
7. Realizar la determinación mediante glucosa oxidasa. Si las células se recogen en fase exponencial temprana, utilizar todo el volumen indicado de muestra para determinar trehalosa y glucógeno. En el caso de fase estacionaria temprana - tardía, diluir entre 10 y 20 veces (levaduras panaderas). Utilizar un patrón de glucosa y referir el valor tanto de glucógeno como de trehalosa como equivalentes de glucosa de las muestras.

Solución de amiloglucosidasa: amiloglucosidasa (*Sigma A7255*) a $1180 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$ en agua.

Solución de trehalasa: trehalasa (*Sigma T8778*) a $3.7 \text{ U} \cdot \text{mL}^{-1}$.

15-. Determinación de etanol.

Se procedió a su determinación mediante el kit comercial Ethanol assay (*Boehringer Mannheim-R.biopharm.Roche*). Se siguieron las instrucciones del fabricante salvo que se escalaron los volúmenes a la mitad.

16-. Determinación del contenido en aminoácidos.

16.1-. Obtención de muestras.

1. Precultivar las células.
2. Cultivar un volumen de células adecuado y recoger las células a una DO deseada.
3. Centrifugar a 4400 rpm durante 10'.
4. El sobrenadante y el precipitado resultantes se utilizaron para la determinación de la concentración extracelular e intracelular de aminoácidos.

16.2-. Concentración extracelular.

El sobrenadante del punto anterior se mantiene durante 15' a una temperatura de 100° C. Tras lo cual se filtra a través de un filtro *Millipore* de un diámetro de poro de 0.45 µm. El filtrado se puede mantener a -20° C.

16.3-. Concentración interna.

1. El precipitado del punto 16.1 se lava tres veces en ddH₂O con el mismo volumen de muestra que se haya recogido, aplicando una centrifugación de 4400 rpm durante 5'.
2. Resuspender las células en 1 mL de ddH₂O y si no se dispusiera de tiempo suficiente las muestras pueden ser congeladas a - 20° C.
3. Calentar durante 15' a 100° C.
4. Centrifugar a 13000 rpm durante 15'.
5. En el sobrenadante obtenido determinar inmediatamente la concentración de proteínas mediante Bradford (punto 18.1). Tras esto el sobrenadante puede ser conservado a -20° C.

Nota: Al inicio de esta tesis se referían las concentraciones de aminoácidos a la concentración de peso seco, mediante la extrapolación de una gráfica DO-peso seco. Dada la alta variabilidad de los resultados se procedió a la estimación del contenido en proteínas de cada uno de los tubos, evitando de esta forma variabilidad o errores en la determinación de la DO por saturación. Existe relación lineal entre el contenido de proteínas y la cantidad de levaduras recogidas en las mismas condiciones fisiológicas.

16.4-. Derivatización de las muestras.

El derivatizante utilizado es AQC (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimildil carbamato), utilizado según las indicaciones del fabricante *Waters AccQ-Tag Chemistry Package Instruction Manual (Millipore)*.

16.5-. Condiciones de cromatografía.

La separación de los aminoácidos se realizó en un HPLC *Waters Alliance 2695*. Las muestras se inyectaron de forma automática y fueron separadas a través de una precolumna (*WAT044380*) y un columna de fase reversa *AccQ-Tag column 3.9 x 150 mm (WAT052885)*. Precolumna y columna se mantienen a 37° C, y el gradiente de solventes empleados (Tabla M.1) permite la separación de los distintos aminoácidos. La detección se realiza mediante un detector de fluorescencia *Waters 474*. Para el control del sistema y el análisis de los resultados se utiliza el software *Millenium 32 v3.2* para PC.

Como patrones se utilizaron 5 diluciones de una solución equimolar de aminoácidos en HCl (*Amino Acid Standard H, Pierce*).

Tabla M.1-. Gradiente aplicado para la separación de aminoácidos. El registro de cada cromatograma dura 47 minutos, el gradiente del minuto 47.01 al 100 sólo se aplica en el último cromatograma y sirve para mantener el equipo a la espera.

Tiempo (min)	Flujo (mL · min ⁻¹)	% Solvente A ¹	% Solvente B ²	% Solvente C ³
0	1	100	0	0
0.5	1	99	1	0
18	1	95	5	0
19	1	91	9	0
29.5	1	83	17	0
35.00	1	0	60	40
38	1	100	0	0
60	1	0	60	40
100	1	0	60	40

¹ Eluyente A diluido 10 veces (*AccQ-Tag Wat052890*).

² Acetonitrilo puro y con grado HPLC (*Scharlau, AC03332500*).

³ ddH₂O.

17-. Determinación del contenido celular en compuestos volátiles.

1 g de levadura se resuspende en un 1 mL de una solución acuosa saturada de CaCl₂. Los viales fueron calentados a 40° C. Tras los primeros 10', los compuestos volátiles se absorbieron del encabezado del vial en *SPME fibre DVB/Carboxen/PDMS 50/30 μm (Supelco Co., Bellefonte, PA, USA)*, siendo la incubación total de 50' a 40° C. La desorción de estos compuestos atrapados en la fibra SPME (siglas en inglés de Microextracción en fase sólida) se realizó directamente dentro de un inyector de cromatografía gaseosa (GC). Los volátiles se analizaron por duplicado utilizando un equipo de cromatografía gaseosa *HP6890* equipado con una columna capilar *DB-Wax (60 m x 0.25*

mm i.d., film thickness 0.25 μm; J&W, Scientific, Folsom, CA, USA). Para la cromatografía se empleó como transportador N₂, el inyector del gas y el detector presentan una temperatura de 250° C, la columna fue mantenida durante 6' a 35° C y luego se programó para que alcanzara los 170° C con una velocidad de 2° C · min⁻¹.

La cuantificación se realiza mediante curvas de calibración de cada uno de los compuestos identificados por la adición de cantidades conocidas de los diferentes compuestos en soluciones acuosas. La identificación de compuestos se realizó con un sistema *HRGC-MS Fisons series 8000* equipado con una columna de fase estacionaria con dos longitudes diferentes, 30 y 60 metros, comparando la biblioteca *Wiley/NBS* y los tiempos de retención GC de los distintos estándares.

18-. Permeabilización de células.

1. Recoger 20 mL de cultivo en fase exponencial (0.7-0.8).
2. Sí procede, mantener las células en hielo hasta continuar con 3.
3. Centrifugar a 4400 rpm en centrifuga con rotor basculante durante 4' a 4° C.
4. Lavar con 20 mL de solución de MgCl₂.
5. Centrifugar nuevamente a 4400 rpm durante 4' a 4° C.
6. Repetir los pasos 4 y 5 otra vez más.
7. Lavar con 45 mL de H₂O y centrifugar a 4400 rpm a 4° C.
8. Repetir el paso 7 dos veces más.
9. Resuspender en 2 mL de tampón fosfato potásico.
10. Añadir 2 mL de solución tolueno-etanol y agitar vigorosamente durante 5' a temperatura ambiente, en tubos de cristal. Sí el número de muestras es elevado hacer los pasos 10, 11 y 12 seguidos dejando el resto de las muestras en hielo sin adicionar la solución tolueno-etanol.
11. Centrifugar a 6000 rpm durante 4' a 4° C (*Wifug lab centrifugues modelo studie*).
12. Resuspender en 1 mL de tampón fosfato potásico y conservar a 4° C por un tiempo no superior a 24 h.

Solución de MgCl₂: 20 g · L⁻¹ de MgCl₂ · 4H₂O.

Tampón fosfato potásico: fosfato potásico 0.5 M a pH 4.5.

Solución tolueno-etanol: mezcla de tolueno y etanol puros en las mismas proporciones en tubos de cristal.

19-. Cuantificación de proteínas totales.

19.1-. En extractos.

Para la medida de la concentración de proteínas obtenidas en extractos celulares se han seguido las instrucciones indicadas por el fabricante (*BioRad Protein Assay, BioRad*) (Bradford, 1976).

1. A 100 μL de las muestras se añaden 700 μL de agua destilada y 200 μL de reactivo de Bradford.
2. Después de 10' se mide la $\text{DO}^{595\text{nm}}$.
3. Determinar la concentración infiriéndola de una recta de regresión obtenida de un patrón realizado con seroalbúmina bovina, que va desde 0 hasta 20 μg .

19.2-. En células permeabilizadas.

La cantidad de proteína total se determinó según Lowry et al (1951):

1. Diluir 50 veces el total de células obtenidas en el apartado 18 con tampón acetato sódico.
2. A 500 μL de muestra del punto anterior se le añaden 150 μL de agua destilada, 200 μL de NaOH 1M y 1.5 mL de solución de Lowry.
3. Incubar durante 15' a 30° C.
4. Añadir 150 μL de solución Folin- Ciocalteu.
5. Incubar durante 30' a 30° C.
6. Medir la $\text{DO}^{750\text{nm}}$.

La curva patrón se realiza con diluciones seriadas de seroalbúmina bovina en concentraciones que van desde 0 a 100 μg .

Tampón acetato sódico: 0.2 M de acetato sódico ajustando el pH a 4.9, con ácido acético.

Lowry A: 1.5g de Na_2CO_3 , 0.1875g de tartrato de sodio y potasio tetrahidratado, en 250 mL de H_2O .

Lowry B: 32.2 mg de $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ en 50 mL de H_2O .

Solución de Lowry: Mezcla de 9 partes de Lowry A con 1 parte de Lowry B.

Solución Folin-Ciocalteu: Dilución 1:1 de reactivo fenol de Folin-Ciocalteu 2N (*Sigma 9252*) con H_2O .

20-. Ensayo de actividad enzimática.

20.1-. Ensayo de actividad invertasa.

1. A 250 μL de células permeabilizadas añadir 250 μL de solución de sacarosa.
2. Incubar durante 15' a 30° C.
3. Recuperar sobrenadante, siempre en frío (congelar sí procede).

4. Hacer ensayo de glucosa oxidasa, previa dilución. Esta dilución dependerá del medio en el que se cultivaron las células.

Solución de sacarosa: sacarosa al 5% (p/v) en tampón fosfato potásico 0.1 M a pH 6.5.

20.2-. Ensayo de actividad maltasa.

1. A 250 μ L de células permeabilizadas añadir 250 μ l de solución de maltosa.
2. Incubar durante 15' a 30° C.
3. Recuperar sobrenadante, siempre en frío (congelar sí procede).
4. Hacer ensayo de glucosa oxidasa, previa dilución. Esta dilución dependerá del medio en el que se cultivaron las células.

Solución de maltosa: maltosa al 5% (p/v) en tampón fosfato potásico 0.1 M a pH 6.5.

21-. Capacidad fermentativa.

21.1-. Masa seca.

1. Cultivar levadura en 50 mL de medio MAB durante 48 h.
2. Recoger la levadura mediante centrifugación en rotor basculante a 3000 rpm.
3. Lavar 2 veces con 50 mL de agua destilada estéril.
4. Resuspender con 50 mL de agua y filtrar a través de filtro *Millipore* 0.45 μ m con una bomba de vacío.
5. Pesar y resuspender el pellet de células con el volumen necesario de agua para que queden a una concentración de 14.29 g \cdot L⁻¹.
6. Mezclar vigorosamente 4 g de harina de flor con 7 mL de la suspensión de células en tubos de cristal de 20 mL.
7. Incubar a una temperatura de 30° C y medir el incremento en altura cada cierto tiempo (considerar 0 la altura de la masa inicial). El volumen se obtiene aplicando la fórmula del cilindro ($V = \pi \cdot r^2 \cdot h$).

21.2-. Masa dulce

1. Cultivar, lavar y pesar de la misma forma que en el punto anterior.
2. Resuspender con el volumen necesario de una solución de sacarosa 250 g \cdot L⁻¹ estéril para que la levadura quede a una concentración de 28.58 g \cdot L⁻¹.
3. Mezclar vigorosamente 4 g de harina de fuerza con 7 mL de la suspensión celular en tubos de inóculo de 20 mL.

4. Medir el incremento en altura cada cierto tiempo (considerar 0 la altura de la masa inicial) y mediante la fórmula del cilindro ($V = \pi \cdot r^2 \cdot h$) calcular el incremento del volumen de la masa.

22-. Panificación

22.1-. Panificación de Masa seca.

1. Precultivar las levaduras en matraz de 50 mL con 20 mL de medio YPD por un periodo superior a las 24 h.
2. Inocular a una DO^{690nm} de 0.1 un matraz de 5 L con 2.5 L de medio MAB.
3. Tras 24 h de cultivo, Recoger las células mediante lotes de 500 mL de cultivo a 3000 rpm durante 5'.
4. Recoger la biomasa obtenida con una cuchara y depositar en un papel de filtro para poder secar lo mejor posible la biomasa. Pesar.
5. Conservar a 4° C hasta su uso.
6. Por cada kilogramo de harina añadir 20 g de NaCl, 500 mL de agua a 5° C, 4 g de acidulante (masa madre industrial, *Baslight*) y 4 g de gasificante. Se amasa automáticamente durante 10'. Tras lo cual se añaden 30 g de levadura y se vuelve a amasar automáticamente durante 3- 4'.
7. Tras dar forma a esta masa se introduce en la cámara de fermentación, cuya temperatura es de 37° C. El panadero puede regular la humedad de la cámara, por lo que la va variando según convenga. Por norma general suele tardar aproximadamente 1.5 h en fermentar la masa, pero el panadero mediante manipulación de la masa puede alargar o acortar el tiempo de fermentación. En el caso de la masa seca, el volumen de la masa siempre es inferior al volumen máximo que podría alcanzar.
8. Una vez la masa ha fermentado se procede a la realización de los cortes que darán el aspecto final de la pieza de pan.
9. Se introduce la pieza en un horno a una temperatura de 230° C durante 10'.

22.2-. Panificación de masa dulce.

1. El cultivo y recogida de la levadura se realiza de la misma forma que en el punto anterior.
2. Por cada 1.5 Kg de harina añadir 4 huevos, 100 mL de aceite de oliva, 900 mL de agua, y 30 g de azúcar de masa. La harina empleada en la elaboración de los bollos de leche es una mezcla comercial que se denomina: "Mix brioche", que contiene los siguientes componentes: harina de trigo y soja, azúcar, componentes lácteos (leche en polvo), gluten, aceite y grasa vegetal, emulsionantes E482 y E471, almidón, amilasa, antioxidante E-300,

sal y aroma. Se amasa de forma automática durante 20' tras lo cual se añaden 75 g de levadura y se sigue amasando durante al menos 5' más.

3. Se procede a dar la forma adecuada a la masa y se embadurna con un pincel de huevo batido.
4. Introducir en la cámara de fermentación a una temperatura que oscila entre los 30° C y los 37° C. Se considera que la fermentación finaliza cuando la masa alcanza el volumen máximo.
5. Realizar los cortes necesarios y espolvorear con azúcar.
6. Hornear a una temperatura de 220° C durante 10'.

23-. Viabilidad en diversas condiciones.

23.1-. Viabilidad en ciclos de congelación y descongelación.

Las levaduras cultivadas hasta fase exponencial (DO^{660nm} 0.7) ó fase estacionaria (48 h) en medio SD se recogen y lavan con agua destilada estéril tres veces. A continuación se procede a preparar 10 mL de agua destilada con levadura hasta DO^{660nm} 0.1. Se realizan las diluciones necesarias de este reservorio y se sembraron 3 placas de Petri con medio YPD sólido. El reservorio de agua y células se congela a -20° C. Transcurridas 24 h, se procede a descongelarlo en un baño de agua a 30° C y se toma una muestra aplicándose diluciones seriadas de la misma (sí fuese necesario) y sembrando alícuotas en placas de Petri con medio YPD sólido. El reservorio se congela nuevamente y los ciclos de congelación y descongelación se repiten cuatro veces más. Las unidades formadoras de colonias se cuentan y se les aplica el factor de dilución utilizado ($UFC \cdot mL^{-1}$). La viabilidad se expresa como el Log_{10} de cociente de UFC a un tiempo determinado dividido por las UFC de muestra sin congelar.

23.2-. Viabilidad durante el mantenimiento a -20° C.

De la misma forma que en el apartado anterior se obtuvieron reservorios de células en agua destilada estéril. Tras lo cual se procedió a repartir las células en volúmenes de 500 μ L. Una de ellas se sembró por triplicado en medio YPD sólido. El resto se congeló a -20° C y se descongela una alícuota a tiempos previamente fijados. Tras descongelar en un baño a 30° C se procede a sembrar (diluida o no) un volumen de 100 μ L en tres placas con medio YPD sólido.

Las unidades formadoras de colonias se cuentan y se les aplica el factor de dilución utilizado ($UFC \cdot mL^{-1}$). La viabilidad se expresa como el Log_{10} de cociente de $UFC \cdot mL^{-1}$ a un tiempo determinado dividido por las $UFC \cdot mL^{-1}$ de muestra sin congelar.

23.3- Viabilidad durante el almacenamiento a 30° C.

A levaduras cultivadas a distintos tiempos, lavadas y con la menor humedad posible, se les determinó la viabilidad mediante el procedimiento descrito en el punto 13.2. Posteriormente se almacenaron varios días a 4° C y luego se introdujeron en una cámara de 30° C. Cada cierto tiempo, a una picadura de la biomasa se le determinó la viabilidad mediante el mismo protocolo.

Capítulo I:

Caracterización molecular de cepas empleadas en la industria panadera

Introducción

1-. Estructura del genomio en cepas de laboratorio.

Gran parte de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en los laboratorios de biología molecular son derivadas de la cepa S288C (Sherman, 2002). No obstante popularmente se las asocia con el nombre de “levadura panadera”, lo cual es un error. S288C presenta al menos un 85% del genomio de la cepa EM93, aislada en 1935 por E. Mrak de higos en descomposición (Mortimer and Johnston, 1986).

Desde hace unos 50 años se han ido elaborando los mapas genéticos y físicos de S288C y cepas derivadas (Cherry et al., 1997) hasta que en 1996 se presentó el primer borrador del proyecto de secuenciación (Goffeau et al., 1996). S288C tiene un total de 16 cromosomas con unos tamaños comprendidos entre los 200 y los 2200 Kb (Sherman, 2002) y un total de 6183 ORFs de las cuales entre 5773 y 5726 codifican para proteínas. También cabe destacar la presencia de secuencias de ADN repetido entre las que destacan:

- **ADN codificante para ARNr.** Constituyen hasta el 7% del genomio total de S288C y por tanto son las repeticiones más abundantes. Su localización está en el cromosoma XII y se encuentran en tándem.
- **Elementos Ty.** Constituyen el 3% del total del genomio (Mieczkowski et al., 2006). Existen 5 tipos de elementos Ty con un mayor o menor grado de repetición: Ty1 (32), Ty2 (13), Ty3 (2), Ty4 (3) y Ty5 (1). Todos los tipos tienen en común una región de unas 5 kb flanqueada por LTRs (acrónimo de Long Terminal Repeats) definidas según el tipo de Ty y que se conocen como secuencias δ (Ty1 y 2), σ (Ty3), τ (Ty4) y ω (Ty5). Es muy común la presencia de este tipos de secuencias no asociadas a la región de 5kb y que son vestigios de antiguos elementos que han “saltado” (son unos 331 en total para la cepa S288c) (Mieczkowski et al., 2006). Los LTR corresponden con las zonas reguladoras mientras que la región entre éstas contiene dos marcos de lectura abierta conocidos como TYA y TYB que son análogos a genes retrovirales gag y pol (Lewin, 2000).
- **ADN codificante para ARNt.** Existen unas 300 copias de estas secuencias que se encuentran distribuidos a lo largo de varios cromosomas.
- **ADN telomérico y subtelomérico.** Los telómeros son estructuras especializadas en los extremos de los cromosomas que los protege de la fusión o la reducción en el tamaño. Los telómeros están constituidos por múltiples repeticiones (100-200) de una corta secuencia rica en G; para *Saccharomyces* se acepta la secuencia consenso

TG₂₋₃(TG)₁₋₆ (Lewin, 2000; Lue, 2010). Con respecto a las regiones subteloméricas existen dos elementos repetitivos conocidos como X e Y', que no siempre están asociadas a las repeticiones teloméricas. El elemento Y' (6 Kb) se encuentra cerca de las repeticiones teloméricas pero no en todos los telómeros, y cuando se encuentra, existen de 1 a 4 copias en tándem. El elemento X es más variable que el anterior con una longitud que va desde las 0.3 Kb hasta las 3 Kb y se encuentra asociado a casi todos los telómeros (Zhu and Gustafsson, 2009).

- **Otros genes con varias repeticiones y con menor homología.** En este caso se englobarían familias de genes como los de las histonas, proteínas ribosómicas, *PAU* (24 localizaciones mayoritariamente subteloméricas), *TDH* (gliceraldehído fosfato deshidrogenasa), *PDC* (piruvato descarboxilasa), *CYC* (citocromo c oxidasa), *SAM* (AdoMet sintetasa), *ADH* (alcohol deshidrogenasa), *ALD* (acetaldehído deshidrogenasa), etc. (SGD y Gasent-Ramírez 1997, tesis doctoral).

2-. Heterogeneidad en levaduras industriales.

El complejo “sensu stricto” de *Saccharomyces* está constituido por 7 especies entre las que destacan *S. cerevisiae*, *S. bayanus*, *S. pastorianus* y *S. paradoxus* (Querol and Bond, 2009), que presentan un alto interés industrial puesto que están relacionadas con procesos biotecnológicos importantes. Por este motivo es difícil hablar de una estructura global del genomio de las levaduras industriales, aunque por mucho tiempo se las consideraban derivadas de *S. cerevisiae*. Este concepto erróneo se debe al empleo de diversas técnicas de identificación en base a su morfología y fisiología que se utilizaron a lo largo de décadas (Codón et al., 1998). Las técnicas moleculares se basan en la separación ya sean de proteínas como por ejemplo zimogramas o 2D-PAGE asociado a espectrometría de masa, o de ácidos nucleicos como los cariotipos electroforéticos en campo pulsado, los polimorfismos de fragmentos de restricción (RFLP) de ADN mitocondrial o nuclear, PCR-RFLP de ADN_r, RAPD (amplificación aleatoria de ADN polimórfico), o AFLP (polimorfismos de fragmentos amplificados) (Azumi and Goto-Yamamoto, 2001; Bond and Blomberg, 2005; Fernández-Espinar et al., 2005). Más recientemente una técnica basada en macroarrays (Hibridación genómica competitiva, CCGH) ha permitido la caracterización a gran escala del número de copias de cromosomas individuales y la heterogeneidad entre los cromosomas de distintas cepas de levadura (Infante et al., 2003; Bond and Blomberg, 2005; Querol and Bond, 2009). No obstante, la utilización de estas

técnicas entre los distintos grupos industriales no ha sido homogénea. De esta forma, las levaduras cerveceras y vínicas presentan cuantitativamente mayor número de trabajos que las levaduras panaderas.

2.1.- Estructura del genomio en cepas cerveceras y vínicas.

Las levaduras cerveceras presentan una estructura genómica compleja. Las tipo Lager son poliploides debido a la hibridaciones entre diferentes especies de levaduras del genero *Saccharomyces*, tras lo cual se originó una duplicación de todo el genomio, lo que ha generado cepas alotetraploides. Esto, sumado a un mal reparto mitótico ha dado lugar a la aparición de aneuploidías (Querol and Bond, 2009). En este tipo de cepas es común observar la existencia de cromosomas quiméricos resultantes de la recombinación entre cromosomas homeólogos (homólogos de distintas especies). El primer genomio de levadura industrial disponible se corresponde con *S. pastorianus* Weihenstephan 34/75, que es de tipo Lager híbrido entre *S. cerevisiae* x *S. bayanus* (Nakao et al., 2009). Las levaduras cerveceras de tipo Ale pertenecen a cepas relacionadas con *S. cerevisiae*, pero también existen híbridos, aunque tradicionalmente son un grupo de levaduras poco estudiado.

Las levaduras vínicas son frecuentemente diploides, fruto de híbridos entre *S. cerevisiae* x *S. bayanus*, *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii*, o alotriploides de *S. cerevisiae* x *S. kudriavzevii* x *S. bayanus* var. *uvarum* (Legras et al., 2007; Querol and Bond, 2009), con aneuploidías por pérdida de cromosomas. Como en el caso de otro tipos de híbridos, en este grupo también se detecta la existencia de cromosomas quiméricos formados por recombinación (Querol and Bond, 2009).

2.2.- Estructura del genomio de las levaduras panaderas.

La información correspondiente a levaduras panaderas al contrario que los casos anteriores es escasa. En general se acepta la pertenencia a *S. cerevisiae* (Rández-Gil et al., 2003) sin la aparición de híbridos aunque este hecho no se ha comprobado. Gran parte de la información de este tipo de levaduras proceden de los trabajos que intentaban utilizar distintos tipos de técnicas moleculares para “etiquetarlas” (Codón and Benítez, 1995; Codón et al., 1998). Entre las técnicas más habituales destaca el cariotipado electroforético en campo pulsante y posterior hibridación con distintas sondas. En la actualidad no existen trabajos que empleen la técnica CCGH en cepas panaderas por lo que no se conoce ni el número de cromosomas ni las posibles reorganizaciones cromosómicas. Datos previos

indican que las levaduras panaderas presentan en muchos casos un grado de ploidía superior a dos, con una fuerte tendencia a la presencia de aneuploidías (Codón and Benítez, 1995; Codón et al., 2003). El polimorfismo cromosómico es sorprendentemente variable, siendo esto suficiente para distinguir cepas entre sí, lo que es común para otros grupos de levaduras industriales (Naumov et al., 1992). Las hibridaciones con distintas sondas permitió establecer la localización de diversos genes en una amplio grupo de levaduras panaderas (Codón et al., 1998). En general, se observan varios tipos de distribuciones: por un lado genes como *LEU2*, *URA3* y *CUP1* están localizados en un único cromosoma en la mayoría de las cepas panaderas, mientras que genes como *MAL61*, *TRP1*, *GALA* y *SUC2* tienen varias localizaciones en distintos cromosomas (Codón and Benítez, 1995; Codón et al., 1998; Gasent-Ramírez et al., 1999). El promotor del gen *ADH1* (alcohol deshidrogenasa permite la diferenciación entre *S. cerevisiae* de *S. bayanus* y de *S. paradoxus*, ya que en éstas dos últimas especies ésta sonda no hibrida (Naumov et al., 1992). Así se constató que todas las cepas panaderas empleadas en el estudio tienen al menos una copia del genoma de *S. cerevisiae* (Codón et al., 1998). ADN repetitivo como los elementos *Ty1*, *Ty2*, y el elemento *Y'* se localizan en muchas cromosomas. Los elementos *Ty1* y *Ty2* están muy distribuidos en las cepas panaderas en comparación con otros grupos industriales; además el elemento *Ty1* está más representado que el *Ty2* (Codón et al., 1998). El elemento *Y'* tiene un mayor grado de hibridación en cepas panaderas que en otras levaduras industriales. Además se observa un gran número de localizaciones repartidas por prácticamente todos los cromosomas (Codón et al., 1998).

Técnicas para establecer relaciones entre las cepas como el RFLP de ADN mitocondrial no son aplicables en este tipo de cepas ya que no presenta suficiente variabilidad, lo que sí ocurre en otros grupos industriales (Codón and Benítez, 1995). Esta poca variabilidad en el RFLP del ADN mitocondrial puede deberse a múltiples factores entre los que destacan: (I) el tipo de cultivo al que son sometidas, es decir, ambientes donde se favorece la respiración y por tanto la no producción ni de etanol ni de acetaldehído que actúan como agentes mutagénicos de estos genomas (Jiménez and Benítez, 1988; Castrejón et al., 2002); (II) una menor divergencia entre las cepas panaderas que en el resto de levaduras industriales; (III) una fuerte presión selectiva que ha provocado fenómenos de convergencia en la secuencia del ADN mitocondrial. No obstante, existen divergencias entre estos RFLP y los de levaduras pertenecientes a otros grupos industriales (Codón et

al., 1998; Gasent-Ramírez et al., 1999). En los últimos años por el contrario se han comenzado estudios que mediante AFLP permiten el establecimiento de relaciones de parentesco entre las cepas panaderas así como su relación con otras levaduras industriales (Pulvirenti et al., 2001; Legras et al., 2005; Legras et al., 2007; Vrancken et al., 2010).

2.3-. Inestabilidad genómica en levaduras industriales.

La divergencia entre las distintas cepas industriales se produce por mecanismos asociados a recombinación tanto durante la mitosis como durante la meiosis (Aguilera and Klein, 1993). Otros fenómenos que actúan en trans, como la replicación, la reparación o factores de control de la fase S, o aquellos que actúan en cis como puntos cromosómicos frágiles o secuencias de ADN altamente transcritas también están relacionados con la inestabilidad genómica (Aguilera and Gómez-González, 2008). Entre los mecanismos asociados a recombinación destacan los que ocurren entre secuencias directas que resultan en la delección de la región intermedia; intercambios asimétricos entre repeticiones en tándem de cromátidas hermanas o bien entre cromosomas homólogos, que producen el acortamiento o el alargamiento de éstos; roturas cromosómicas y posteriores reparaciones que acaban en acortamiento por pérdida de material o en translocaciones; recombinaciones ectópicas entre secuencias homólogas en cromosomas heterólogos que dan lugar a translocación recíproca; recombinaciones entre regiones teloméricas o subteloméricas que producen variabilidad en los extremos cromosómicos; recombinaciones entre cromosomas homólogos con dos o más polimorfismos de tamaño que generan otros con tamaños nuevos; y disyunciones de cromosomas homólogos de distintos tamaños que dan lugar a aneuploidías y reparto desigual de bandas cromosómicas (Aguilera and Klein, 1993).

Dada la abundancia de secuencias repetidas en levaduras panaderas los mecanismos de recombinación están favorecidos frente a otros tipos de levaduras, produciéndose reestructuraciones del material genético de estas cepas que se ven especialmente asociadas a la meiosis (Codón et al., 1997) aunque también se producen durante la mitosis (Gasent-Ramírez et al., 1999).

La presencia de aneuploidías y poliploidías está asociada a fenómenos de inestabilidad en levaduras de laboratorio. Las condiciones ambientales que soportan las levaduras industriales favorecen la selección de genomas estables mitóticamente (Querol and Bond, 2009). No obstante, se ha observado que levaduras cerveceras creciendo a temperaturas altas y posteriormente en medios con altas concentraciones de maltosa

(condiciones no habituales) presentan reorganizaciones cromosómicas, pequeñas deleciones e incluso amplificaciones (James et al., 2008). Los genomios de las levaduras panaderas están sometidos a condiciones selectivas específicas (Attfield, 1997), que han fijado una serie de características particulares en estas cepas, como son una alta tasa de crecimiento y un alto rendimiento en melazas de remolacha y caña de azúcar. Esto no sólo implica que las levaduras panaderas deben resistir cualquiera de las sustancias tóxicas presentes en éstas, sino que también deben poseer altos niveles de actividad invertasa. Otra de las presiones a las que están sometidas este tipo de levaduras es la relacionada con la capacidad de fermentar masas de harina en ocasiones en condiciones adversas, como por ejemplo alta concentración de osmolitos. Así se han seleccionado cepas que tienen translocaciones de las regiones teloméricas y subteloméricas (amplificación de genes *SUC* y *MAL*) y posiblemente cromosomas quiméricos motivados por recombinación entre elementos *Ty* (Carlson et al., 1985; Mieczkowski et al., 2006).

3-. Relaciones filogenéticas entre cepas industriales.

Los estudios de relaciones filogenéticas se han realizado principalmente en levaduras vínicas y cerveceras. Las cepas panaderas sobre las cuales se aplican procesos industriales de escalado se han relacionado con cepas cerveceras de tipo Ale e incluso de cruces de cepas Ale con cepas vínicas (Reed and Nagodawithana, 1991; Azumi and Goto-Yamamoto, 2001). Azumi *et al* mediante técnicas de AFLP indicaron que cepas vínicas iniciadoras de la fermentación presentaban relaciones de similitud más estrechas con las cepas panaderas que con las cerveceras Ale. Además de este grupo de cepas panaderas industriales, existe un segundo grupo asociado a fermentación de harinas mediante el uso de masas madres (Introducción general). Estas levaduras obtenidas de fermentaciones “espontáneas” presentan características fisiológicas propias, y estudios filogenéticos indican un origen distinto al del grupo industrial (Pulvirenti et al., 2001; Legras et al., 2007; Vrancken et al., 2010).

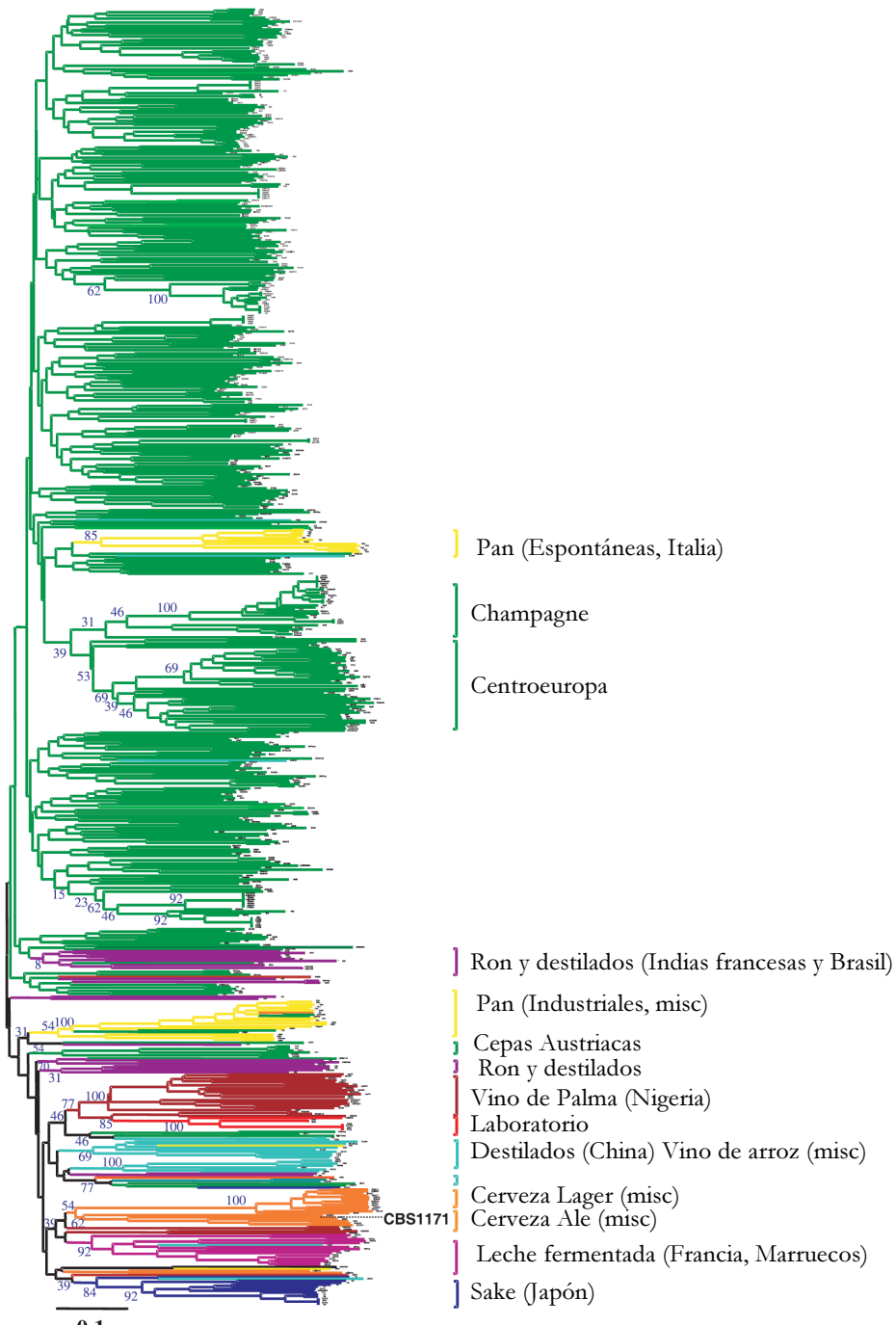


Figura I.1-. Árbol Neighbour-joining de cepas de levaduras aisladas en distintos lugares. Código de color: vónicas (verde oscuro), sidra (verde claro), panaderas (amarillo), cerveceras (naranja), leche fermentada (rosa), sake (azul oscuro), vino de arroz chino, destilados vietnamitas y tailandeses (azul claro), vino de palma o cerveza de sorgo africano (marrón), vino sudamericano y ron de las indias francesas (violeta), cepas de laboratorio (rojo). misc, grupo heterogéneo en procedencia. Adaptado de Legras et al 2007.

De esta forma se constituyen dos subgrupos: en el primero, las levaduras aisladas de fermentación espontánea presentan relaciones de parentesco cercano a levaduras vínicas aisladas de diferentes lugares; en el segundo, las levaduras panaderas industriales están relacionadas con otros tipos de levaduras industriales con relativa cercanía a las levaduras cerveceras tanto de tipo Lager como Ale (Figura I.1). No obstante, estos mismos autores indican que la utilización de otros métodos para la construcción de árboles manifiesta que el grupo de levaduras panaderas industriales mantiene relaciones estrechas con las levaduras de tipo Ale.

Para caracterizar cepas de levaduras panaderas en el siguiente capítulo se han buscado posibles candidatos para realizar estudios filogenéticos con diversos genes que presentan múltiples localizaciones en distintos cromosomas, y se han llevado a cabo análisis de la heterocigocidad de los genes *LEU2* y *SUC2* en estas levaduras, tomando como referencia cepas aisladas de la fermentación de uva, de harina de centeno y una cepa de laboratorio. Además se ha desarrollado una metodología que permite la determinación del número de copias de cada cromosoma y el número de copias de genes de interés de una cepa mediante qPCR.

Resultados

1-. Caracterización molecular de cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en la industria panadera.

1.1-. Origen de las cepas utilizadas.

La clasificación de las cepas empleadas en el presente capítulo se realiza según su utilización en la industria. Las cepas S288C (n) y DS81 (2n) se consideran cepas de laboratorio; el diploide se obtuvo por cruce entre las cepas isogénicas S288C y X2180-1a (Codón et al., 1995). PDC es una cepa empleada por la industria enológica para fermentar mosto (depositada en el instituto de fermentaciones industriales como IFI1693). Dentro de las cepas panaderas se distingue una cepa aislada de fermentación espontánea de harina de centeno (TS146) y el resto de cepas que son o han sido comerciales. Dentro de éstas últimas se distingue entre cepas utilizadas para la elaboración de productos con altas concentraciones de azúcar (masas dulces) (V3 y ABO), y aquellas que se utilizan en la elaboración de pan (V1, V2, VS, cepas ALKO, dadi, CT y SB2). También se incluye la cepa DOG21, que es un mutante espontáneo de V1 resistente al análogo tóxico de la glucosa, 2-desoxi-D-glucosa (Rincón et al., 2001) y que se utiliza como control interno.

1.2-. Cariotipo electroforético.

Las cepas industriales tienen un alto grado de polimorfismo en cuanto al número y al tamaño de los cromosomas (Figura I.2). El patrón de distribución cromosómica es variado entre las cepas aunque se observan patrones constantes. Todas las cepas presentan bandas a la altura de los cromosomas IV-XII, VII-XV, XVI-XIII, V-VIII y IX, tomando como referencia los de la cepa S288C. La mayor diversidad de tamaños se presenta en las regiones comprendidas entre los cromosomas II-IX y III-I (Figura I.2).

Para la separación de cromosomas de mayor tamaño (IV, VII, XII y XV) se utilizan protocolos específicos (Materiales y Métodos). De esta forma se diferencian el cromosoma XII del IV así como de algún otro de peso molecular intermedio (Figura I.3-A).

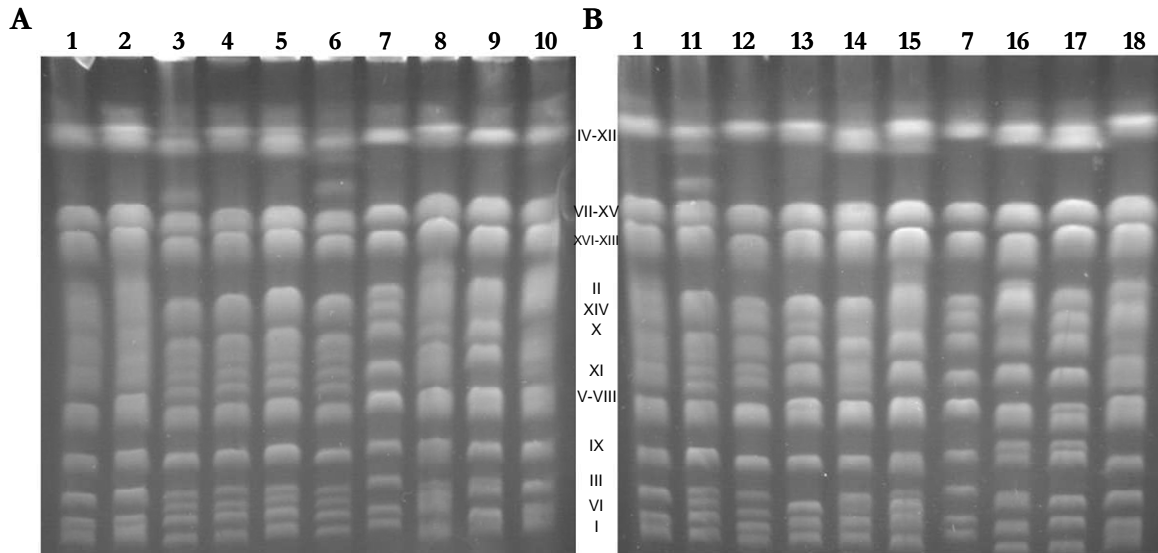


Figura I.2-. Cariotipo electroforético de cepas industriales y de laboratorio. V1 (1), DOG21 (2), AB0 (3), AB1 (4), AB2 (5), AB3 (6), S288C (7), V2 (8), VS (9), SB2 (10), V3 (11), dadi (12), ALKO 543 (13), ALKO 743 (14), ALKO 1611 (15), PDC (16), TS146 (17) y CT (18). En números romanos se indican los cromosomas de la cepa S288C.

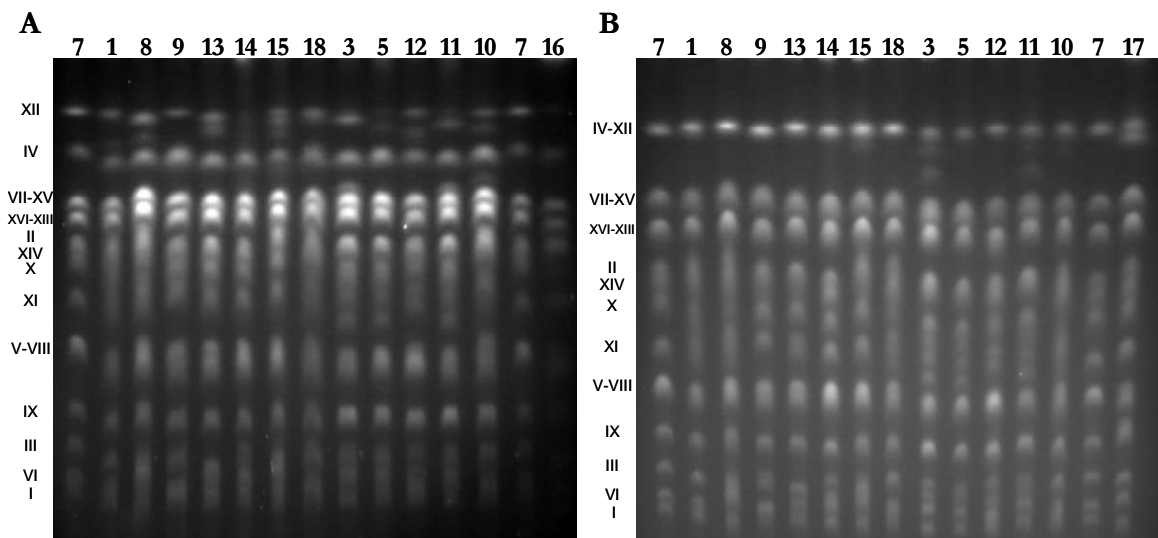


Figura I.3-. Cariotipo electroforético de cepas industriales y de laboratorio. Protocolo para definir cromosomas de alto peso molecular (A), condiciones de separación habituales (B). V1 (1), DOG21 (2), AB0 (3), AB1 (4), AB2 (5), AB3 (6), S288C (7), V2 (8), VS (9), SB2 (10), V3 (11), dadi (12), ALKO 543 (13), ALKO 743 (14), ALKO 1611 (15), PDC (16), TS146 (17) y CT (18). En números romanos se indican los cromosomas de la cepa S288C.

Las cepas AB0, AB1, AB2, AB3, V3 y dadi, presentan cariotipos muy similares salvo por la presencia de bandas tenues pero bien definidas en la región comprendida entre los cromosomas IV-XII y VII-XV. Los cariotipos de las cepas V1 y DOG21 son similares entre sí dado que la segunda deriva de la primera, aunque regiones como II y V-VIII presentan menor movilidad en la cepa DOG21 que en V1.

1.3-. Establecimiento de relaciones entre cepas panaderas mediante análisis de regiones altamente repetitivas.

Como estudio preliminar se procedió a la localización cromosómica de genes con variabilidad suficiente para establecer relaciones filogenéticas entre cepas. Estudios anteriores indican que los elementos *Ty* y genes implicados en el uso de fuentes de carbono alternativas a la glucosa presentan más de una localización cromosómica en cepas panaderas (Codón et al., 1998; Gasent-Ramírez et al., 1999).

El elemento *Ty1* presenta múltiples localizaciones (Figura I.4), por ejemplo en la cepa S288C todos los cromosomas a excepción del VI presentan al menos uno de estos elementos transponibles. La mayoría de las cepas analizadas contienen el elemento *Ty1* en los cromosomas VII-XV, XVI-XIII y V-VIII. Sin embargo existen excepciones como TS146, que no presenta copias en los cromosomas VII-XV y XVI-XIII o ALKO543 y PDC que no tienen la copia en la pareja V-VIII. Todas las cepas a excepción de las cepas AB y V3 presentan copias de *Ty1* a la altura de los cromosomas IV-XII. El elemento *Ty1* permite distinguir cepas con cariotipos muy similares, por ejemplo las cepas AB0 y AB1, pero su alta frecuencia impide el establecimiento de relaciones entre las cepas.

El gen *SUC2* presenta menor número de localizaciones diferentes, además mantiene patrones constantes como la presencia de al menos una copia en el cromosoma IX (Figura I.5). Otras localizaciones habituales de *SUC2* son la de las parejas de cromosomas V-VIII, VII-XV, XVI-XIII y IV-XIII (de mayor a menor frecuencia). Se pueden establecer tres grupos según el número de localizaciones: (I) por un lado aquellas con un alto número de hibridaciones, de 8 a 9 (V1, V2, CT, SB2 y DOG21); (II) las que presentan un número intermedio, 5-6 (ALKO 554, ALKO 1611, dadi y VS) y (III) las que

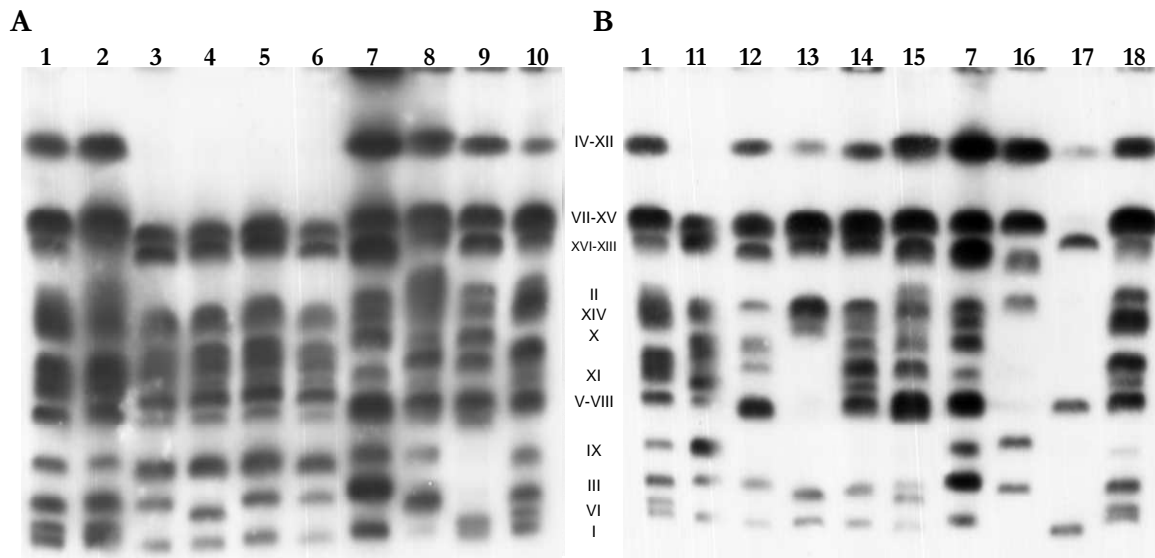


Figura I.4-. Distribución de elementos *Ty1* en cepas industriales y de laboratorio. V1 (1), DOG21 (2), AB0 (3), AB1 (4), AB2 (5), AB3 (6), S288C (7), V2 (8), VS (9), SB2 (10), V3 (11), dadi (12), ALKO 543 (13), ALKO 743 (14), ALKO 1611 (15), PDC (16), TS146 (17) y CT (18). En números romanos se indican los cromosomas de la cepa S288C. La sonda del elemento *Ty1* se obtuvo de la digestión del plásmido p29.

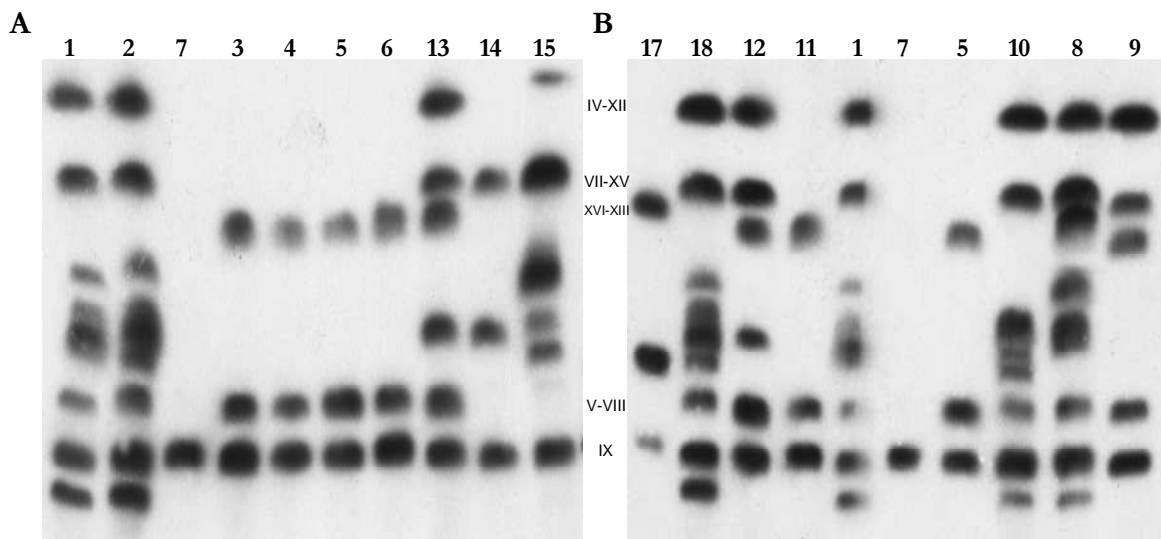


Figura I.5-. Distribución de *SUC2* en cepas industriales y de laboratorio. V1 (1), DOG21 (2), AB0 (3), AB1 (4), AB2 (5), AB3 (6), S288C (7), V2 (8), VS (9), SB2 (10), V3 (11), dadi (12), ALKO 543 (13), ALKO 743 (14), ALKO 1611 (15), PDC (16), TS146 (17) y CT (18). En números romanos se indican alguno de los cromosomas de la cepa S288C. La sonda se obtuvo de la amplificación por PCR del gen *SUC2* con los cebadores SUC2.u y SUC2.l desde ADN genómico de la cepa S288C.

tienen un número bajo, con 3 localizaciones o menos (cepas AB, V3, ALKO 743, TS146 y S288C). El gen *SUC2* permite el agrupamiento de las cepas por lo que es un buen candidato para establecer relaciones filogenéticas entre éstas.

El elemento *Ty2* y el gen *MAL23* (Figura I.6) presentan patrones con poca variabilidad entre las cepas analizadas. En el caso de *Ty2*, las mayores diferencias se observan en la región que comprende los cromosomas XII y IV. La región de cromosomas de tamaño intermedio (entre las parejas XVI-XIII y V-VIII) no presenta diferencias entre las cepas salvo en las cepas AB y V3. Los cromosomas de bajo peso molecular presentan hibridaciones con cierta pauta, pero debido a la diversidad de tamaños en esa región no se pueden identificar la correspondencia de las bandas con cromosomas específicos. En el caso de *MAL23* el patrón de hibridaciones es muy similar entre las cepas, sólo se presentan dos grupos: los que tienen una de las hibridaciones en un cromosoma de bajo peso molecular (V1-V2-ALKO743-ALKO1611-CT) y las que no la muestran (el resto). Todas las cepas presentan hibridaciones tenues que se observan en la cepa S288C, junto con las hibridaciones en la pareja de cromosomas VII-XV y en el cromosoma XI.

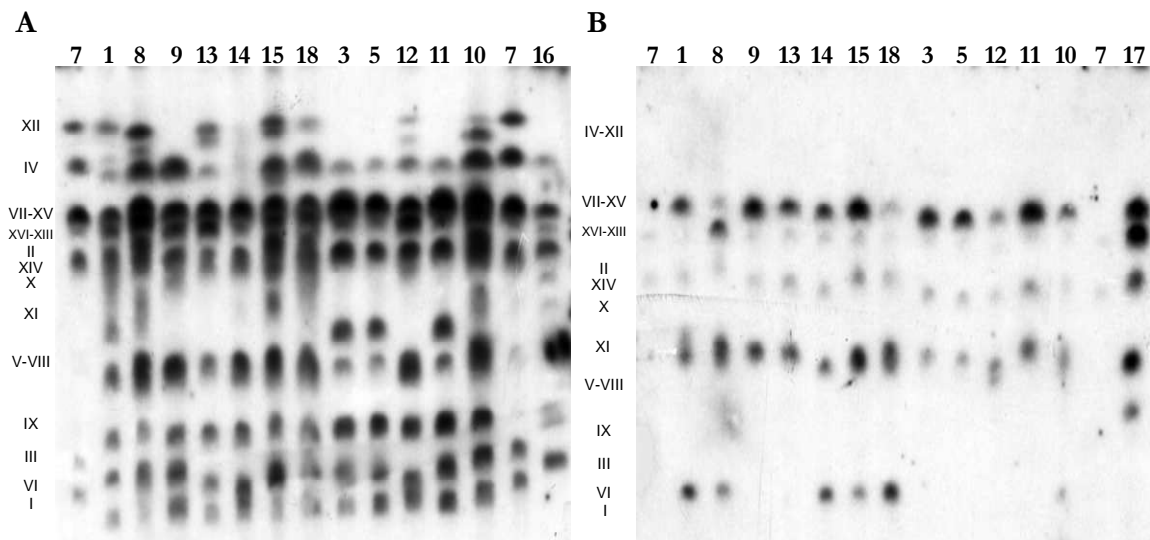


Figura I.5-. Localización de *Ty2* (A) y *MAL23* (B) en cepas industriales y de laboratorio. V1 (1), DOG21 (2), AB0 (3), AB1 (4), AB2 (5), AB3 (6), S288C (7), V2 (8), VS (9), SB2 (10), V3 (11), dadi (12), ALKO 543 (13), ALKO 743 (14), ALKO 1611 (15), PDC (16), TS146 (17) y CT (18). En números romanos se indican los cromosomas de la cepa S288C. La sonda de *TY2* se obtuvo tras la digestión del piasmido B205., mientras que la de *MAL23* se obtuvo de amplificar por PCR el gen con los cebadores MAL23.u y MAL23.l.

1.4-. Polimorfismos de restricción y relaciones filogenéticas entre las cepas.

Se procedió a realizar digestiones totales del ADN genómico con enzimas de restricción y posteriormente a hibridar con genes que podían presentar un alto grado de polimorfismo. Los genes analizados son *SUC2* y *LEU2*; el primero se eligió debido al alto número de copias del gen localizadas en diferentes cromosomas mientras que la selección del segundo se produjo por la observación fortuita de un alto grado de polimorfismos de restricción en los loci al comprobar una serie de integraciones del gen *KanMX4* en el locus *LEU2* en las cepas V1 y DOG21 (Figura I.7).

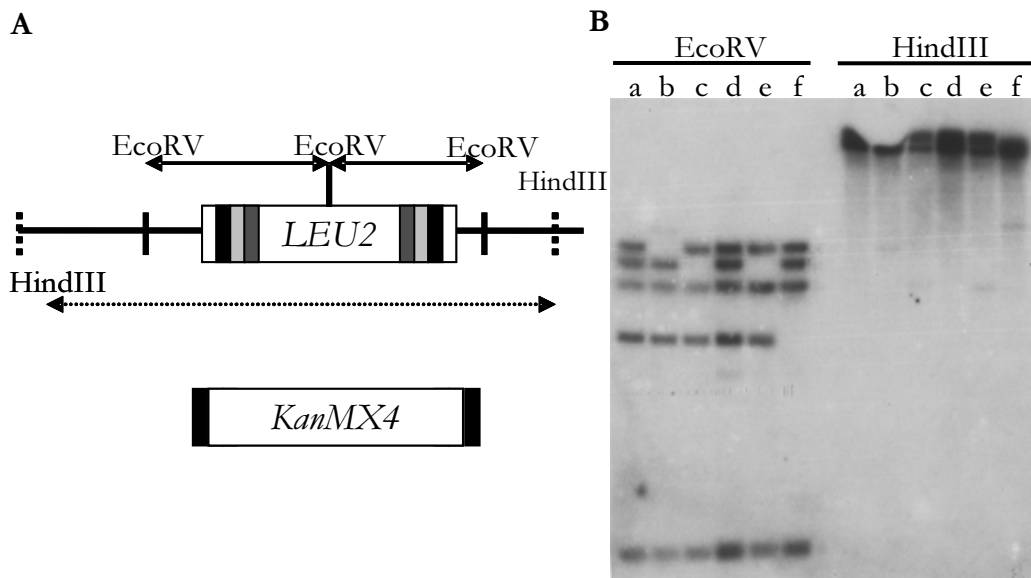


Figura I.7. Esquema ilustrativo de las digestiones de las enzimas de restricción *EcoRV* y *HindIII* dentro de la ORF del gen *LEU2* y el casete de integración con el gen de resistencia a G418 con regiones de 40 pb de homología con la diana (A); transformantes de V1 y DOG21 con una única integración (B). En B, V1 (a), dos transformantes de esta (b y c), DOG21 (d), y dos transformantes (e y f). La sonda empleada se obtiene de la amplificación por PCR del gen *LEU2* de la cepa S288C con los cebadores *Leu2.u2* y *leu2.l2*

1.4.1-. Restricción e hibridación con el gen *LEU2*.

Las restricciones del ADN genómico se realizaron con las enzimas *EcoRV* y *SallI*. Se desestimó el empleo de *HindIII* dado que generaba fragmentos de restricción de alto peso molecular (más de 20 Kb) que dificultan su resolución. Ambas enzimas cortan dentro de la región donde se encuentra el retrotransposón *Ty1*, aguas arriba (5') del ATG del gen *LEU2* y en el extremo 3' ambas cortan en el gen *NFS1* que es un gen esencial. La única diferencia entre las enzimas es que *EcoRV* corta dentro de la ORF de *LEU2* mientras que

SalI no lo hace. La digestión del ADN genómico y posterior hibridación con una sonda del gen *LEU2* permite la distinción de bandas de distinto tamaño (Figura I.8-A y B) y la generación de matrices individuales de presencia-ausencia de banda que permite el establecimiento de árboles de máxima similitud (UPGMA, Figura I.8-C y D)

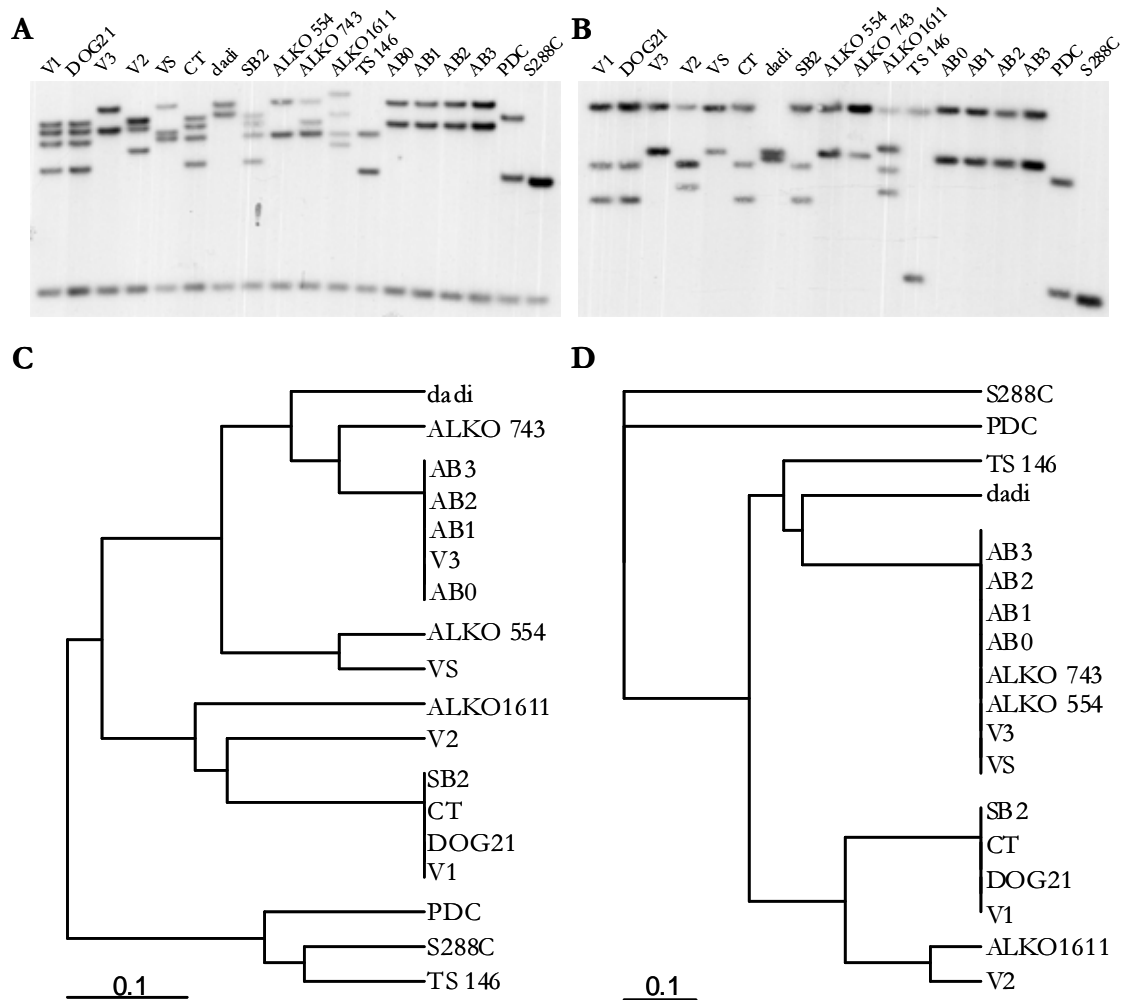


Figura I.8. Hibridación con el gen *LEU2* de digestiones de ADN genómico de diferentes cepas con EcoRV (A) y SalI (B), y sus respectivos árboles UPGMA con coeficiente Dice, obtenidos a partir de una matriz de ausencia o presencia de banda (C) y (D).

La construcción de una matriz que contiene a las anteriores permite la obtención de un nuevo árbol UPGMA con coeficiente Dice (Figura I.9). Las cepas panaderas agrupan en un subconjunto diferente al de cepas aisladas de fermentaciones espontáneas, ya sean de uva (PDC) o centeno (TS146) y de la cepa de laboratorio (S288C). No se han observado diferencias significativas entre las cepas SB2, CT y DOG21-V1 así como entre las cepas AB

y V3, lo que sugieren o bien que son la misma cepa comercializada por varias compañías de levadura o que han divergido hace relativamente poco tiempo.

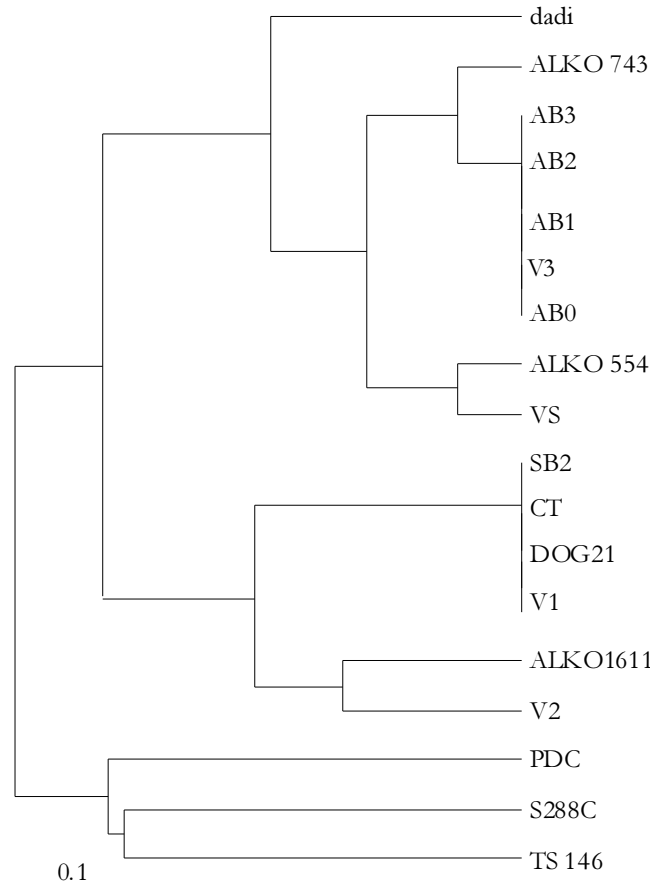


Figura I.9. Relaciones filogenéticas entre cepas industriales y de laboratorio teniendo en cuenta las matrices de similitud para los polimorfismos de restricción del gen *LEU2*.

1.4.2.- Restricción e hibridación con el gen *SUC2*.

La digestión de ADN genómico se realizó con las enzimas de restricción BamHI y EcoRI. La primera corta el gen *SUC2*, además de cortar en una región intergénica secuencia arriba del gen y en la región 3' de la ORF del gen *BNR1*. EcoRI por el contrario no corta *SUC2*, la diana en la región 5' se encuentra en una región intergénica diferente a la de la enzima anterior y la del 3' corta en la ORF del gen *POT1*. La hibridación de las digestiones de ADN genómico permite la visualización de polimorfismos de restricción (Figura I.10 A-B) así como la generación de nuevas matrices que permiten establecer relaciones filogenéticas entre las distintas cepas panaderas (Figura I.10 C-D).

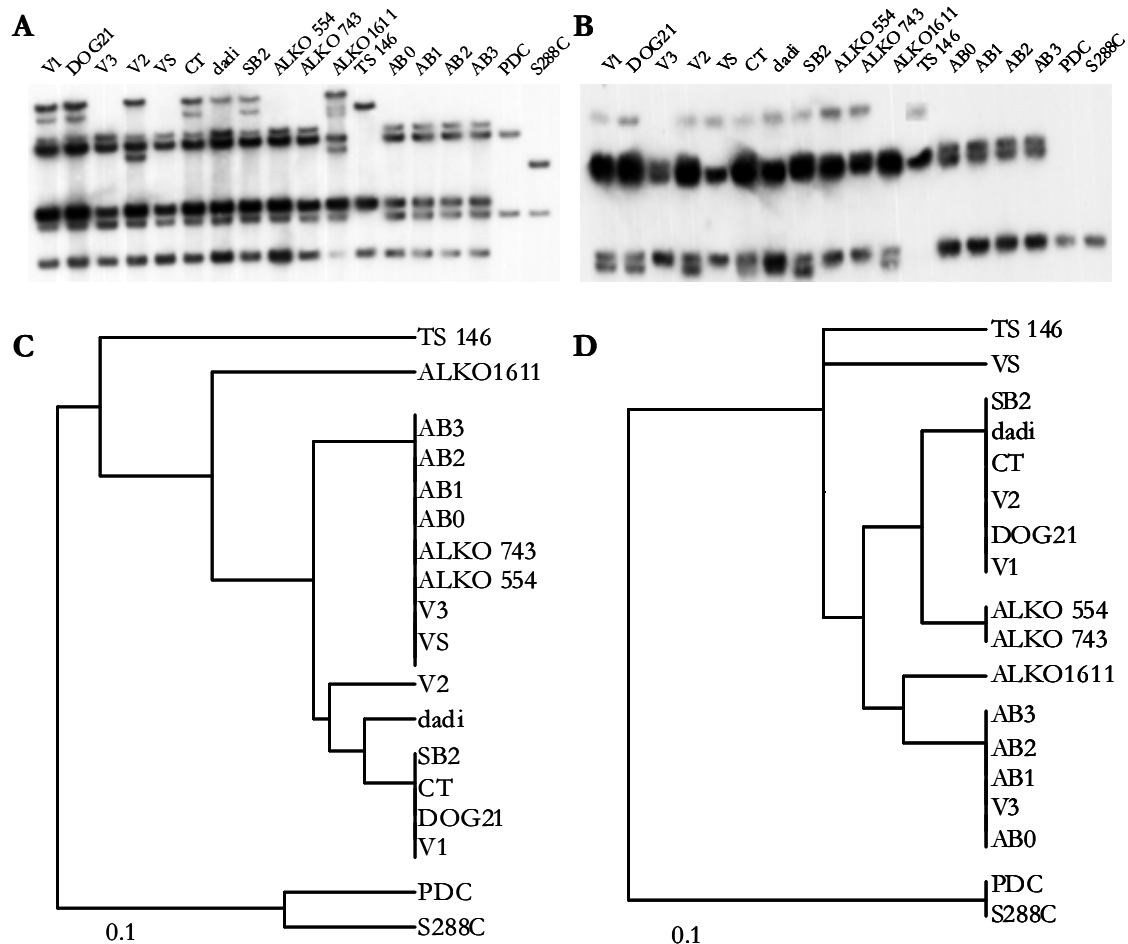


Figura I.10. Hibridación con el gen *SUC2* de digestiones de ADN genómico de diferentes cepas con BamHI (A) y EcoRI (B), y sus respectivos árboles UPGMA con coeficiente Dice obtenidos a partir de una matriz de ausencia o presencia de banda (C) y (D).

En este caso las cepas panaderas agrupan en un subconjunto mientras que cepas no relacionadas lo hacen en otro diferente (PDC y S288C, Figura I.11). Dentro del grupo de las cepas panaderas la cepa TS146, aislada de la fermentación espontánea de harina de centeno, se encuentra desmarcada del grupo al que pertenecen las cepas que se utilizan a escala industrial. Dentro de este “subgrupo industrial” se observa la formación de dos nuevos subconjuntos. Los polimorfismos de restricción para este gen no permiten distinguir entre sí las cepas ALKO 554 y ALKO 743, las cepas AB y V3, y las cepas V1-DOG21, CT y SB2.

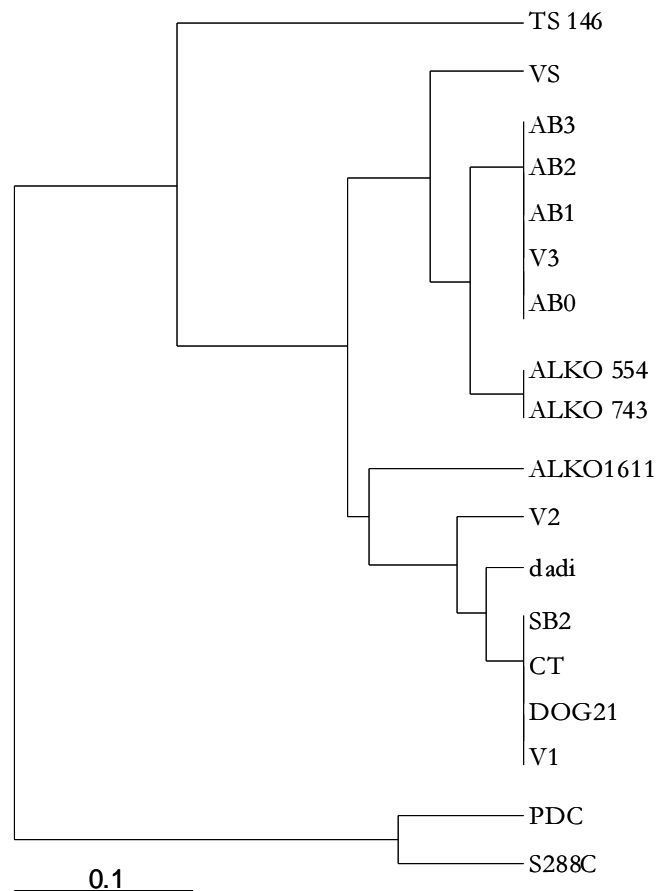


Figura I.11. Árbol UPGMA con cociente Dice teniendo en cuenta los polimorfismos de restricción encontrados para el gen *SUC2* con las enzimas EcoRI y BamHI.

1.4.3.- Árbol filogenético utilizando las matrices conjuntas de *LEU2* y *SUC2*.

Las cuatro matrices de presencia o ausencia de bandas del mismo tamaño permite la obtención de relaciones de similitud entre las cepas panaderas con una mayor significancia estadística (Figura I.12).

Las cepas panaderas agrupan en un subconjunto, diferenciado de otras cepas de *S. cerevisiae* de “laboratorio” o “vínicas”. A su vez en el subconjunto de las cepas panaderas se puede diferenciar la obtenida de la fermentación espontánea de harina de centeno de aquellas que han sido sometidas a selección por parte de la industria panadera. En este último subgrupo se organizan dos nuevos subconjuntos, por un lado se encuentran las cepas con número bajo-intermedio de localizaciones cariotípicas de *SUC2* y por el otro las cepas con un alto número de localizaciones (a excepción de ALKO 1611, que es

intermedio). Con ninguna de las matrices realizadas se pueden distinguir las cepas AB y V3 ni las cepas V1-DOG21, CT y SB2.

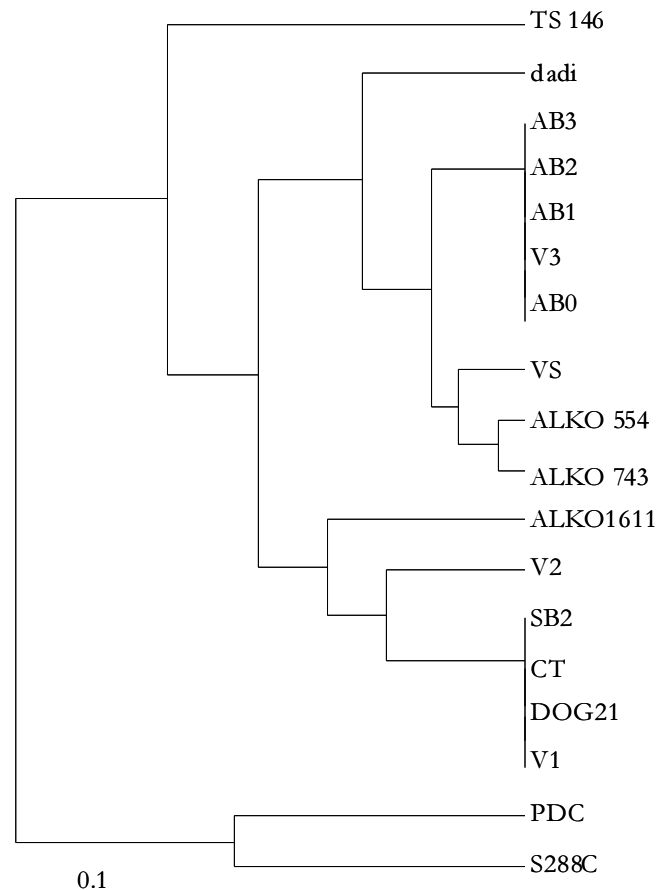


Figura I.12. Árbol UPGMA obtenido de las cuatro matrices obtenidas con las hibridaciones de los genes *LEU2* y *SUC2*.

1.5-. Contenido de ADN.

Las cepas panaderas tienen en general mayor cantidad de ADN que las cepas de laboratorio S288C y DS81 (Tabla I.1). También en términos generales, las cepas panaderas presentan un grado de ploidía cercano a múltiplos de dos, aunque existen excepciones como la cepa VS (3n).

Tabla I.1-. Contenido en ADN de varias cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en laboratorio (L), vnicas (V) y en la elaboración de productos panarios, pan (Ps) y dulces (Pd). Se representan valores medios relativizados al contenido en ADN de la cepa S288C de dos experimentos independientes y con desviación estándar menor al 10 %.

Cepa	Ploidía	Cepa	Ploidía
S288C (L)	1	ALKO 743 (Ps)	4.3
DS81 (L)	2	ALKO 1611 (Ps)	4.1
PDC (V)	2.1	V3 (Pd)	2.2
TS 146 (Ps)	2	CT (Ps)	4.1
V1 (Ps)	4.2	ABO (Pd)	2.1
DOG21	4.1	AB1 (Ps)	2.1
V2 (Ps)	4.1	AB2 (Ps)	2.1
VS (Ps)	3.1	AB3 (Ps)	2.2
dadi (Ps)	2.2	SB2 (Ps)	4.2
ALKO 554 (Ps)	1.8		

2-. Determinación del número de cromosomas y de genes por qPCR.

La determinación del contenido de ADN de una cepa industrial o la hibridación de un gen tanto en un cariotipo como en digestiones no permiten discernir el número de copias de cada cromosoma presentes en una cepa. Además las aneuploidías en muchas ocasiones dificultan los estudios de segregación cromosómica debido a la falta de viabilidad de los productos meióticos. Sin embargo, el desarrollo de técnicas con mayor precisión como la PCR cuantitativa (qPCR) sí permite determinaciones algo más exactas que las anteriores. La cuantificación de los centrómeros de cada cromosoma permitiría establecer el número de copias de éstos. No obstante, ésta técnica requiere de la obtención de organismos que posean en copia única un gen de referencia. Dado el desconocimiento en cepas panaderas del número de copias de los genes, se ha procedido a la transformación de las cepas con un gen exógeno como *KanMX4*.

2.1-. Obtención de cepas panaderas con copia única del gen *KanMX4*.

Como controles se utilizaron las cepas S288C (haploide), DS81 (diploide) así como las cepas V1 (aneuploide) y DOG21 (derivado del anterior). Para la obtención del transformante en copia única se amplificó el gen de resistencia a G418 flanqueado por 40 pb homólogas a *LEU2* (cebadores LK.u y LK.l, Materiales y Métodos). Tras la transformación y un primer muestreo, se descartaron transformantes que no presentaran al menos una copia del gen *LEU2* interrumpida por el casete de *KanMX4* (Leu2.u2 y Kan.l, Materiales y Métodos) seleccionándose S+(transformantes de S288C), DS7 y DS10 (transformantes de DS81), Vt1 y Vt2 (transformantes de V1) y Dt1, Dt2 y Dt3 (transformantes de DOG21). Con los transformantes se realizó una hibridación de ADN

genómico digerido con las enzimas EcoRV e HindIII con una sonda del gen *LEU2* (Figura I.13-A y B, respectivamente).

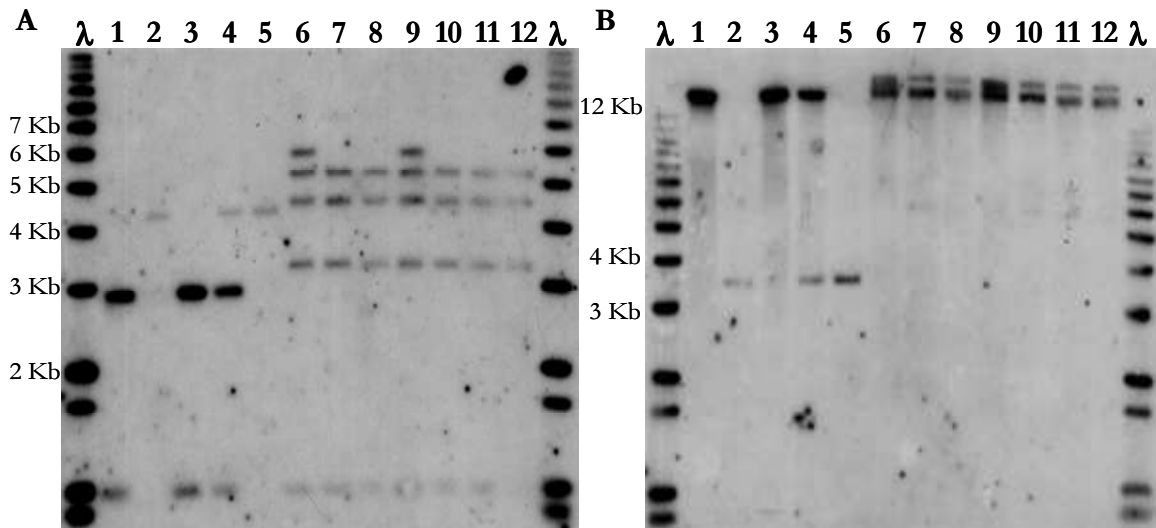


Figura I.13. Hibridación con *LEU2* de ADN genómico digerido con las enzimas de restricción EcoRV (A) e HindIII (B). Se muestran las hibridaciones de S288C (1); S+ (2); DS81 (3); DS7 (4); DS10 (5); V1 (6); Vt1 (7); Vt2 (8); DOG21 (9); Dt1 (10); Dt2 (11), Dt3 (12). Con λ se indica la hibridación del marcador de peso molecular 1 Kb Ladder (Invitrogen®) con ADN marcado del fago λ.

En el caso de las cepas panaderas la construcción se integró en el mismo locus *LEU2*; además las cepas S+ y DS10 presentan auxotrofia para leucina mientras que el resto de cepas no (datos no mostrados). Los datos previos indican que la digestión de ADN genómico con EcoRV permite distinguir las distintas copias del gen *LEU2* a pesar de que corta en la ORF (la banda de menor tamaño molecular corresponde con la distancia esperada con el gen *NFS1*). La sustitución del gen *LEU2* por *KanMX4* da lugar a la aparición de una diana HindIII, que permite identificar una banda de unos 3.5 Kb en las cepas de laboratorio y de 6 Kb en las cepas panaderas (Figura I.13-B). No obstante, en estas últimas la resolución de la banda es pobre, tal vez debido a poca homología entre las regiones promotoras del gen *LEU2* de la cepa S288C y las cepas panaderas (la sonda se obtiene por amplificación con los cebadores Leu2.u2 y Leu2.l2 desde ADN genómico de S288C, que aparecen en las posiciones -315 y +1040, respectivamente).

En el caso de la hibridación con *KanMX4* sólo se analizaron los mutantes S+, DS7, Vt1 y Dt1 (el uso del resto de transformantes genera información redundante)(Figura I.14). El tamaño de la banda se corresponde con la integración en el locus *LEU2*.

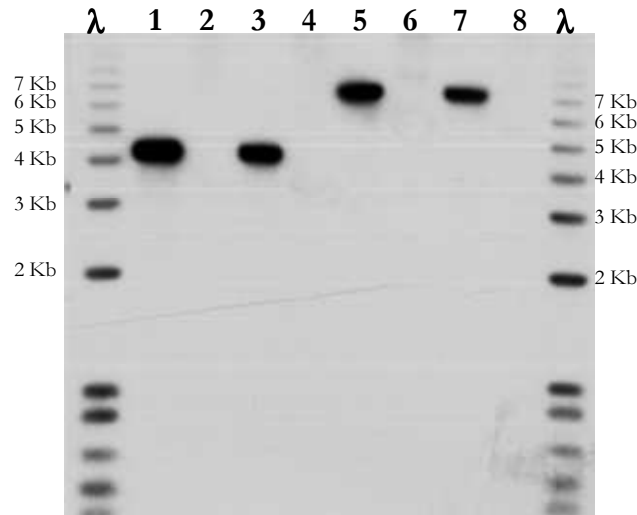


Figura I.14-. Southern blot sobre ADN genómico cortado con la enzima de restricción EcoRV utilizando como sonda el gen *KanMX4*. S+ (1), S288C (2), DS7 (3), DS81 (4), Vt1 (5), V1 (6), Dt1 (7) y DOG21 (8). Con λ se indica la hibridación del marcador de peso molecular 1 Kb Ladder (Invitrogen®) con ADN marcado del fago λ .

Todos estos resultados indican la presencia de una única copia del gen *KanMX4*, en los fondos analizados aunque no excluyen una doble integración en cromosomas homólogos con el mismo patrón de restricción. Por ello se procedió a esporular los transformantes de V1 y DOG21. De Vt1 se obtuvieron dos tétradas con viabilidad de todos sus productos meióticos. El análisis de segregación de la resistencia a G148 (tanto de las tétradas (2:2) como del resto de esporas viables (50%:50%)) permitió establecer al menos en Vt1 la presencia de una única copia del gen *KanMX4*. De ninguno de los transformantes de DOG21 se obtuvieron productos meióticos viables. En condiciones de alta frecuencia de transformación y recombinación homóloga (cepa DS81), una doble recombinación homóloga sólo se detectó en el 1% de los transformantes (DS10), por lo que cabe descartar esta posibilidad en cepas industriales donde la frecuencia de recombinación es excesivamente baja.

2.2-. Determinación del número de cromosomas.

La secuencia de nucleótidos de las regiones centroméricas impide el diseño de cebadores para la realización de qPCR. Por ello se utilizaron regiones próximas a los centrómeros de los cromosomas III, V, VIII y IX (*CEN3*, *CEN5*, *CEN8* y *CEN9*, respectivamente). El diseño experimental consistió en la obtención de los contextos de

300pb depositados en la base de datos SGD a izquierda y derecha de la secuencia consenso de los centrómeros a analizar. De esta forma las secuencias de 715 pb fueron introducidas en el software Primer Express 2.0 y los cebadores generados por éste fueron utilizados para realizar la cuantificación relativa de los distintos centrómeros (Figura I.15-A)(Materiales y Métodos).

El algoritmo empleado utiliza los valores de cada uno de los centrómeros y los calibra con el valor obtenido para el gen *KanMX4*, tras lo cual se realiza una normalización de los datos con respecto a la cepa S+ (Livak and Schmittgen, 2001). Como cabría esperar, todas las regiones centroméricas analizadas presentan una copia en la cepa S+ y dos copias en la cepa DS7 (Figura I.14-B). Las cepas panaderas Vt1 y Dt1 presentan 4 copias tanto del cromosoma III; entre 3-4 copias del cromosoma VIII y 3 copias del cromosoma IX. La única diferencia detectada entre Vt1 y Dt1 radica en el cromosoma V donde DT1 parece poseer una copia más que Vt1 (Figura I.14-B).

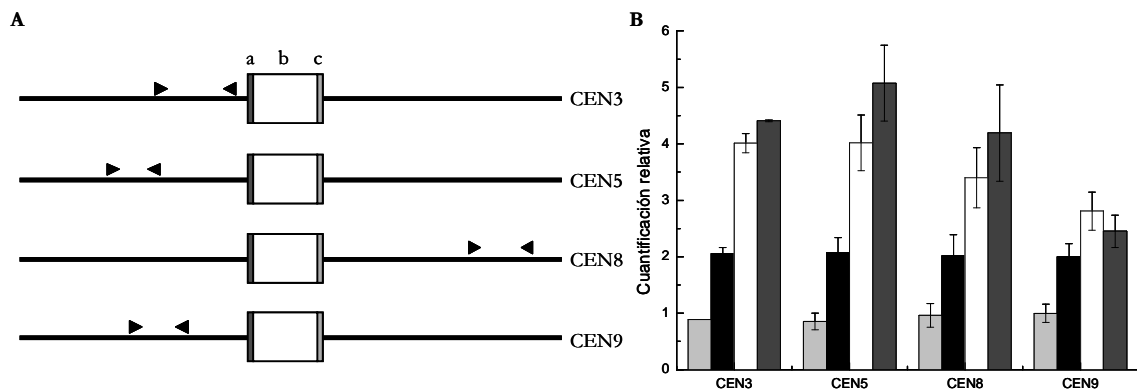


Figura I.14. Representación a escala de las regiones centroméricas (A) y resultado de la cuantificación (B). En A, se indican con puntas de flecha los cebadores utilizados; y en letras minúsculas se representan las regiones conservadas CDEI (a), CDEII (b) y CDEIII (c) de las regiones centroméricas. En B, S+ (1ª columna), DS7 (2ª columna), Vt1 (3ª columna) y Dt1 (4ª columna). Se representan cuantificaciones de tres experimentos independientes con desviación estándar.

2.3-. Determinación del número de copias de algunos genes en cepas panaderas.

Bajo los principios del apartado anterior, también se ha procedido a determinar el número de copias de genes como *URA3* y *LEU2* dado el interés en buscar cepas auxótrofas por interrupción de estos genes (Figura I.15).

La cepa Vt1 y Dt1 no presentan diferencias significativas en cuanto al número de copias de los genes *URA3* y *LEU2*. El primero presenta de 4 a 6 copias mientras que del

segundo el valor es cercano a las 4 copias (la integración del gen *KanMX4* se realizó en una copia del gen *LEU2*).

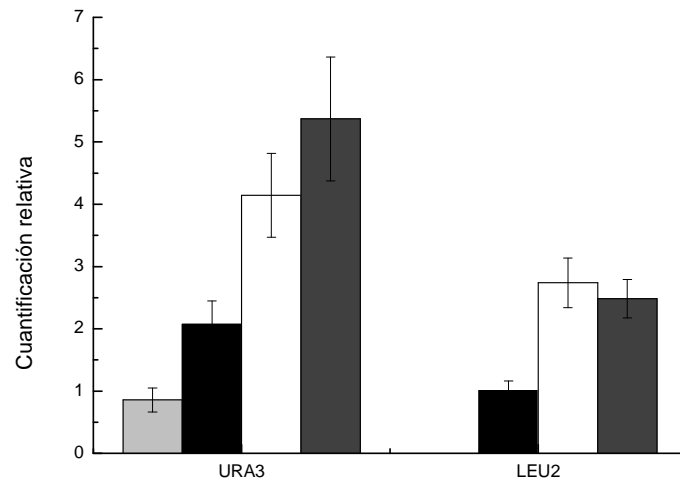


Figura I.15-. Cuantificación relativa del número de genes *URA3* y *LEU2* en las cepas S+ (gris claro), DS7 (negro), Vt1 (blanco) y DOG21 (gris oscuro). Se representan valores medios y desviación estándar de al menos cuatro experimentos independientes.

Discusión

1- Relaciones filogenéticas.

Las cepas panaderas presentan un alto grado de polimorfismo en el cariotipo electroforético. Estas diferencias permiten la distinción entre cepas pero no el establecimiento de relaciones de parentesco entre ellas. Como primera aproximación se estudiaron las distribuciones de varios genes con un alto número de localizaciones cromosómicas en un total de 18 cepas, de las que 15 eran levaduras empleadas por la industria panadera y 1 fue aislada de una fermentación espontánea de harina de centeno.

Los genes analizados fueron los de los elementos *Ty1-Ty2*, así como *SUC2* y *MAL23*, todos ellos presentan varias localizaciones en el genoma que se han originado por mecanismos diferentes. Los elementos *Ty1* y *Ty2* son retrotransposones que pueden “saltar” con una maquinaria de recombinación específica mediante un mecanismo conservativo, es decir la secuencia se transcribe, posteriormente a partir de éste ARN se sintetiza una secuencia de ADN de doble cadena que determinadas proteínas integran en cualquier región del ADN del huésped. No obstante, este tipo de elementos presentan repeticiones directas en los LTR que flanquean a los dos genes estructurales *TYA* y *TYB*, por lo que es posible que en ciertas ocasiones se de la recombinación homóloga entre estas secuencias y por tanto se produce la escisión del elemento. *SUC2* y *MAL23* se encuentran en regiones subteloméricas por lo que existe la tendencia a la recombinación debido a la presencia de ADN repetitivo en estas regiones. La familia *SUC* está constituida por un total de 6 loci (*SUC1-5* y *7*), que codifican para diferentes invertasas pero las secuencias son muy parecidas. Se postula que el gen que origina la diáspora es *SUC2*, no obstante las regiones no codificantes que flanquean al gen difieren de los demás loci *SUC*. Por el contrario *SUC3*, *SUC5* y *SUC4* presentan regiones adyacentes a la ORF con mucha similitud. El locus *MAL* está constituido por tres genes: El gen transportador (*MALx1*), la maltasa (*MALx2*) y el gen regulador (*MALx3*), además se han descrito hasta 6 (x, del 1 al 6) loci diferentes repartidos por varios cromosomas.

Para la realización de filogenias es necesario la utilización de genes que no tengan capacidad de duplicarse por si mismos, ya que estos provocarían demasiada divergencia entre las cepas analizadas. Los elementos *Ty* en las cepas panaderas tienen muchas localizaciones sin patrones claramente definidos. No obstante han podido ser los responsables de la alta divergencia entre los cromosomas de peso molecular intermedio debido al intercambio entre cromosomas heterólogos por recombinación mitótica,

provocando la aparición de cromosomas de distinto tamaño. Por ello los mejores candidatos para realizar filogenias pueden ser el gen *SUC2* y el gen *MAL23*. La utilización de sondas de la ORF de ambos genes no permite determinar si las diferentes hibridaciones corresponden con genes de la familia *SUC* o *MAL*, respectivamente. Las hibridaciones realizadas con la sonda *SUC2* permitieron observar patrones específicos en las distintas cepas analizadas mientras que la sonda *MAL23* dio lugar a un patrón similar en todas las cepas panaderas.

Dada la gran diversidad de tamaño en los cromosomas se procedió a realizar análisis de RFLP de diversos genes. Como objetos de estudio se analizaron: *LEU2* como gen próximo a un elemento *Ty* pero que no presenta muchas localizaciones a lo largo del cariotipo (datos no mostrados, cromosoma III en S288C) y *SUC2* que al estar localizado en regiones subteloméricas puede haber sufrido duplicaciones por intercambio entre estas (cromosoma IX, S288C). Otro de los genes analizados fue *URA3* pero los resultados no se han mostrado debido a que no se encontraron polimorfismos con las dianas utilizadas (*Hind* III y *Not*I, datos no mostrados). El contexto tan particular que rodea al gen *LEU2* permite visualizar la presencia de varias copias del gen tanto sí la enzima de restricción corta o no el gen. El mínimo de copias de *LEU2* en cepas panaderas es de 2, aunque muchas presentan hasta tres y cuatro copias (Figura I.8-B). No obstante, en muchas de estas cepas se observa mayor intensidad de algunas de las bandas, lo que indica la presencia de loci con la misma distribución de dianas *Sal*I. La utilización de *Eco*RV permite diferenciar alguna banda más, que al menos en V1, corresponden con bandas en copia única (por desaparición de bandas tras la integración de casetes *KanMX4*, Figura I.7-B). El diseño de cebadores para levaduras panaderas se realiza a partir de las secuencias depositadas en SGD, que se corresponden con la secuenciación de la cepa S288C. Por ello no es de extrañar que las secuencias dentro de las ORFs en las cepas panaderas estén conservadas. De ahí que en el caso de la digestión de *LEU2* con *Eco*RV la banda de menor tamaño corresponde con la distancia entre el corte interno de esta enzima en *LEU2* y el corte en el gen *NFS1* en todos los cromosomas mientras que las bandas de mayor tamaño equivalen al número de copias del gen. *SUC2* presenta un comportamiento similar, sin embargo el patrón es más constante y por tanto las relaciones de parentesco son más cercanas, lo que puede ser reflejo de que en todas las cepas analizadas la gran mayoría de las

amplificaciones de este gen se realizaron antes de la divergencia de las distintas cepas (Figura I.8).

Todos los árboles realizados indican que las levaduras panaderas industriales agrupan en dos subconjuntos separados de la cepa aislada de fermentaciones de harina de centeno y a su vez de otros tipos de levaduras como vínicas y de laboratorio (Figura I.11). A pesar de esto la generación de matrices de presencia o ausencia de banda no son suficientes para diferenciar las cepas AB y V3 ni V1-DOG21 de CT y SB2 lo que sí se podría hacer con las hibridaciones de cariotipos. En este sentido con *Ty1* se diferencian AB0-AB3 de AB1 y AB2; así como V1 de CT-SB2; mientras que con *Ty2* se diferencia V1-SB2 de CT.

2-. qPCR para determinar aneuploidías y número de copias de un gen.

Se ha desarrollado un procedimiento que permite la determinación del número de copias de cada cromosoma en una cepa panadera utilizando como control interno la presencia de un gen en copia única. No obstante, la integración en cualquiera de los loci *LEU2* permite la determinación del número de interrupciones producidas, lo que evitaría el análisis de resistencia por segregación.

Para el análisis de las aneuploidías de los distintos centrómeros, equivalentes a cromosomas, se han utilizado regiones próximas a éstos. No se han podido diseñar cebadores en las regiones conservadas (CDE) de cada uno de los centrómeros debido al alto contenido en AT que existe en estas secuencias y a que posiblemente estos cebadores pudieran amplificar otros centrómeros. La baja frecuencia de recombinación en este tipo de secuencias hace poco probable su translocación a otros cromosomas, lo que permite identificar correctamente cada uno de ellos. La determinación del número de centrómeros en la cepa V1 se ha realizado con desviaciones menores al 15% (salvo en *CEN8*), que pueden deberse a ligeras divergencias entre las secuencias de S288C y las de V1-DOG21, que provocan menos eficiencia en la amplificación de alguno de los centrómeros.

Los datos obtenidos en el presente capítulo confirman los análisis de segregación de cromosomas obtenidos por Codón et al (1997). El gen *LEU2* sólo presenta una localización en el cariotipo de la cepa V1, pero el análisis de segregación de los productos meióticos parecía indicar la presencia de algunas esporas con mayor intensidad en las hibridaciones. Además la segregación observada para los loci MAT, también localizados en el cromosoma III, indicaban que de este cromosoma debían existir al menos cuatro copias

(tetrasomía). El gen *URA3* presenta tres localizaciones en el trabajo de Codón et al (1997) (XII-IV, XI y V-VIII), sin embargo, en esta tesis la cepa V1 sólo presenta dos localizaciones (Capítulo IV, XI y V-VIII). Este hecho puede deberse a alguna reestructuración del genoma que haya ocurrido a lo largo de los 16 años que distan entre ambos trabajos. La doble banda a la altura de la pareja de cromosomas V-VIII en el trabajo de Codón et al (1997) parecen indicar la presencia de una tetrasomía. Los datos obtenidos en este trabajo indican tetrasomía tanto del cromosoma V como del VIII. Con respecto al cromosoma VIII, el análisis de segregación indicaba la presencia de al menos dos copias del gen *CUP1* con una alta posibilidad de al menos tres (dos esporas presentaban mayor intensidad de la banda observada)(Codón et al, 1997). El cromosoma IX en aquel trabajo indicaba la presencia de al menos dos copias.

Por ello la técnica desarrollada en el presente capítulo se ajusta a las observaciones previamente realizadas y en algunos casos complementa la información obtenida mediante el uso de otros procedimientos.

Capítulo II:

Caracterización fisiológica de las cepas V1 y V3

Introducción

1-. Producción industrial de levadura de panadería

Las levaduras de panadería se producen a nivel industrial mediante un proceso que consta de varias fases. Inicialmente se utiliza un inóculo puro y estéril, de unos pocos millones de células para generar unos 100 g de células tras varios días de sucesivos cultivos discontinuos en el laboratorio (Reed and Nagodawithana, 1991). Ya en la fábrica, con esos 100 g se inoculan varios fermentadores de tamaños crecientes, con los que, todavía en cultivo discontinuo estéril se obtiene suficiente levadura (aprox. 400 Kg) para inocular un fermentador de entre 100 y 150 m³. Los siguientes cultivos no se realizan en condiciones de esterilidad ni son discontinuos, sino que el sustrato se va agregando de forma gradual y controlada, y los sistemas de aireación utilizados son más sofisticados. Esto permite la obtención de unos 5000 Kg de levaduras (*semilla*) que son nuevamente inoculados en un número variable de fermentadores, que según el tamaño de la fábrica pueden ser de 1 a 10 (*comercial/-es*)(Evans, 1990).

El principal sustrato empleado para cultivar las levaduras son las melazas de remolacha y/o de caña de azúcar. Durante la fase de producción se emplea una mezcla de ambas en porcentajes que dependen tanto de la disponibilidad como del precio. Las melazas son tratadas antes de ser utilizadas. Por norma general se diluyen, se acidifican, se esterilizan por calor, se centrifugan (para la eliminación de sólidos insolubles), se enfrían y se almacenan hasta su uso. Durante el proceso de producción de “comercial”, la melaza así como otras sustancias necesarias para el crecimiento se añaden gradualmente a lo largo del cultivo hasta los niveles deseados en la industria. Las melazas han de ser suplementadas con fuentes de nitrógeno, azufre, fósforo, microelementos y vitaminas. Las principales fuentes de nitrógeno inorgánico son tanto el sulfato de amonio como el agua amoniacal. Esta adición se realiza a pesar de que las melazas presentan gran cantidad de compuestos nitrogenados orgánicos (aminoácidos y betaína). La adición de las fuentes de nitrógeno inorgánico enriquece el medio y además permiten el control del pH durante el cultivo. Como principal fuente de fósforo se utiliza el ácido fosfórico que además de ser un nutriente permite la acidificación del cultivo si fuese necesario. Los microelementos con los que se suele suplementar son sales de magnesio, cinc o cobre. Dependiendo de las proporciones de melazas de caña o de remolacha empleadas se hace necesaria la adición en mayor o menor medida de ciertas vitaminas al inicio del proceso. Sí la proporción de melaza de remolacha es mayoritaria se adicionan biotina, ácido pantoténico, inositol,

tiamina y niacina (Evans, 1990). La adición de todos estos suplementos se realiza de la siguiente forma: nitrógeno, melaza y oxígeno mantienen perfiles de adición progresiva, mantenimiento y posterior retirada; el fósforo se suplementa desde el inicio y durante las primeras horas de cultivo siendo el primer elemento retirado en el proceso; los microelementos y vitaminas se adicionan al iniciar el cultivo o bien en momentos puntuales del mismo.

La fase final de la elaboración de “comercial” es la más crítica para la calidad de la levadura, y en ella hay que controlar cuidadosamente el pH, la temperatura, la aireación, la producción de etanol y la disminución gradual de los nutrientes. Además, suele ser muy conveniente mantener la aireación hasta 1 hora después de cortar la entrada de sustratos al fermentador. Es lo que se conoce como *fase de maduración*, y en ella se asimilan los nutrientes que aún no se han utilizado. Las células tienden a entrar en la fase G_0 del ciclo celular y la capacidad para levantar la masa panaria mejora notablemente (Reed and Nagodawithana, 1991).

Finalmente, el medio de cultivo, que contiene entre 40 y 80 g de peso seco de levadura $\cdot L^{-1}$, se concentra por centrifugación hasta unos $200 g \cdot L^{-1}$. Esta crema se enfría y se bombea a unos contenedores adecuados para un almacenamiento refrigerado y

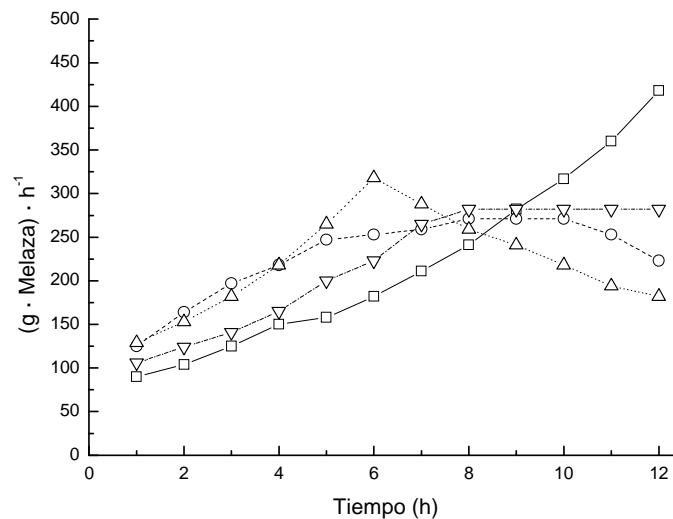


Figura II.1-. Patrones de alimentación empleados en la manufactura de levaduras, (adaptado de Burrows, 1979). Curva de tipo a (□), curva de tipo b (○), curva de tipo c (△) y curva de tipo d (▽).

temporal, hasta que se decide su forma de empaquetamiento (Introducción general; Reed and Nagodawithana, 1991; Rehm et al., 1995).

Con variaciones en el suministro de las melazas y otros elementos se puede conseguir cierto grado de condicionamiento fisiológico, es decir que una misma cepa puede presentar distinto tipo de actividad fermentable en masa panaria dependiendo de la forma en que se cultive (Burrows, 1979). Una adición exponencial que permite mantener constante la tasa de crecimiento hace que las células tengan una alta actividad, pero las levaduras tienen un elevado índice mitótico y poca estabilidad (Figura II.1, curva a). Por el contrario si la adición de melazas es exponencial y posteriormente se reduce el suministro se obtienen levaduras con menor índice mitótico y mayor estabilidad, así como una mayor producción (Figura II.1. curvas b y c). Otra receta posible es una intermedia a las anteriores, es decir, un suministro exponencial durante gran parte del proceso y una reducción posterior de la tasa de crecimiento, manteniendo constante la entrada de melaza (figura II.1, curva d). Bajo estas condiciones se obtienen levaduras con una menor capacidad fermentativa, y un estabilidad intermedia entre las obtenidas con curvas de alimentación de tipo a y b-c (Burrows, 1979). Otros factores como las relaciones carbono-nitrógeno (C/N) del medio y nitrógeno-nitrógeno así como la adición puntual de NaCl, también influyen a la hora de obtener levaduras que tengan una actividad alta o normal (*clásica*), es decir que levanten la masa de una forma más o menos rápida, o que puedan fermentar masas con altas concentraciones de azúcar.

2-. Levadura de panadería y estrés.

Durante la fase de obtención de biomasa, la levadura se cultiva en sustratos que además de azúcares poseen compuestos que actúan como inhibidores del crecimiento. Entre ellos, ácidos orgánicos, ésteres aromáticos y alifáticos, aldehídos, cetonas, furanos, furfurales, fenoles y sulfito, que pueden no ser metabolizados, acumulándose a lo largo del proceso. Además, el propio metabolismo de la levadura que produce compuestos dañinos, el crecimiento que se lleva a cabo por encima de la temperatura óptima, y en ocasiones la adición de sal a lo largo del proceso (levadura para masas azucaradas) hacen que las levaduras estén expuestas a distintos tipos de estrés simultáneos y/o secuenciales durante el crecimiento (Attfield, 1997). Los principales tipos de estrés son oxidativo (sustancias oxidantes y aireación), hiperosmótico (adición de sal), iónico (sales en melazas), térmico, sustancias tóxicas y limitación de nutrientes. Una vez terminada la fase de maduración las

levaduras se preparan para su comercialización (Introducción general). Todos los formatos en los que se comercializan la levadura requieren deshidratación. En la crema de levadura o en la levadura prensada se reduce el agua externa mediante procesos de centrifugado o filtrado. La levadura seca sufre mayor deshidratación al reducirse al máximo tanto el agua extracelular como intracelular gracias al uso de sales durante el filtrado y al secado con aire caliente. Durante esta fase los principales tipos de estrés son hídrico por la deshidratación, térmico por las temperaturas tanto elevadas como bajas (secado y almacenamiento, respectivamente), hipo- e hiperosmolaridad, oxidación y los elevados periodos de ausencia de alimentos (hasta 10 días para la crema, 28 días para la levadura prensada y meses-año para la levadura seca)(Attfield, 1997). Además de la producción y empaquetado, se somete a estrés a la célula durante la panificación. Dependiendo de las masas empleadas, se originan ambientes hiperosmóticos (sal y azúcar añadido), ácidos (masas secas), salinos (por adición de NaCl), etc.

La supervivencia y la mejor adaptación a estos tipos de estrés (Tabla II.1) han permitido la selección de cepas que presentan una alta tolerancia a estos fenómenos. Además de esta robustez intrínseca a las condiciones fisiológicas adversas el propio proceso de producción de biomasa favorece a este tipo de levaduras. A este condicionamiento fisiológico contribuyen tanto la entrada en fase estacionaria como la acumulación de metabolitos como la trehalosa y/o el glucógeno.

Ambos compuestos, especialmente la trehalosa, están relacionados con la resistencia de las levaduras a calor, a la congelación, a la osmotolerancia y a la estabilidad durante el almacenamiento (Jorgensen et al., 2002). Sin embargo el papel de la trehalosa no está exento de cierta controversia especialmente por su no implicación en la resistencia a otros tipos de estrés, por ejemplo a desecación (Ratnakumar and Tunnacliffe, 2006). Los fundamentos moleculares de este incremento de resistencia a condiciones adversas, no se conocen en profundidad (Cerrutti et al., 2000). No obstante, la trehalosa juega un papel en preservar la integridad de la membrana plasmática por sustitución del agua y unión a las regiones polares de los fosfolípidos (Crowe et al., 1984). También se asocia a una función tipo chaperona que estabiliza la estructura nativa de las proteínas y previene el agregado de proteínas desnaturalizadas (Singer and Lindquist, 1998) y es una fuente de energía (Francois and Parrou, 2001). Por su lado, el glucógeno se relaciona con la acumulación de glucosa y

por tanto su movilización permite la obtención rápida de energía (Francois and Parrou, 2001).

Tabla II.1. Principales tipos de estrés y efectos en las células relacionados con la producción de levadura de panadería (Adaptado de Attfield, 1997).

Tipo de estrés	Ocurre	Consecuencia del daño
Temperaturas supraóptimas	<ul style="list-style-type: none"> • Durante la producción de biomasa. • Durante el secado. • Durante los estadios iniciales de la panificación. 	<ul style="list-style-type: none"> • Debilidad de membranas. • Pérdida de solutos internos. • Alteración de la homeostasis iónica. • Acidificación interna. • Generación de radicales libres. • Pérdida de funcionalidad mitocondrial. • Daño en proteínas y actividad enzimática.
Oxidación	<ul style="list-style-type: none"> • Durante la producción de biomasa. • Durante el secado de la levadura. 	<ul style="list-style-type: none"> • Formación de radicales libres. • Daño en proteínas, lípidos y ácidos nucleicos. • Daño en las mitocondrias. • Debilidad de las membranas.
Hiperosmolaridad	<ul style="list-style-type: none"> • Durante la producción de biomasa. • Durante la inoculación en masa panaria. • Durante la congelación-descongelación de levaduras o masas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Reducción del volumen y pérdida de turgencia. • Inhibición del crecimiento. • Alteración de las concentraciones internas de metabolitos. • Reducción de la actividad fermentativa.
Desecación-rehidratación	<ul style="list-style-type: none"> • Durante el prensado, filtración o secado de la levadura. • Durante la congelación-descongelación de levaduras o masas. 	<ul style="list-style-type: none"> • Similar a la hiperosmosis pero con concentración extrema de solutos internos. • Trastornos en estructuras macromoleculares. • Pérdida de solutos internos. • Rotura de vacuolas y liberación de enzimas degradativas.
Congelación-descongelación	<ul style="list-style-type: none"> • Durante el almacenamiento. • Durante la congelación de la masa. 	<ul style="list-style-type: none"> • Bajada del pH interno. • Pérdida de homeostasis de metabolitos. • Deshidratación. • Toxicidad iónica. • Daño en membranas.

3-. Acumulación de trehalosa y glucógeno en levaduras.

La trehalosa es un disacárido constituido por monómeros de glucosa unidos mediante enlace $\alpha 1 \rightarrow 1$, mientras que el glucógeno es un polisacárido de monómeros de glucosa unidos mediante enlaces $\alpha 1 \rightarrow 4$, que presenta ramificaciones de estas cadenas unidas entre sí por enlaces $\alpha 1 \rightarrow 6$ (Lehninger et al., 1993).

La acumulación tanto de trehalosa como de glucógeno ocurre en momentos definidos. En cultivos de levaduras de laboratorio con glucosa como sustrato limitante, la

acumulación de glucógeno comienza en la fase exponencial tardía, estando asociado con una ralentización del ciclo celular. Sin embargo, la acumulación de trehalosa se inicia tras el cambio diáuxico (Lillie and Pringle, 1980; Parrou et al., 1999). Tras la entrada en fase estacionaria, se reduce la concentración de glucógeno, lo que sugiere que las células lo utilizan como fuente de energía para la adaptación al metabolismo respiratorio, mientras que se mantiene la tendencia a la acumulación de trehalosa (Lillie and Pringle, 1980; Francois et al., 1987; Parrou et al., 1999).

Las cinéticas de acumulación de ambos compuestos no sólo se ven afectadas por una limitación del carbono. En medios de cultivo con glucosa pero con limitación de nitrógeno, azufre o fósforo se produce un aumento en las concentraciones de trehalosa y glucógeno internas (Lillie and Pringle, 1980; Parrou et al., 1999), por lo que se les ha relacionado con una respuesta general al empobrecimiento de nutrientes en el medio de cultivo. No obstante, trabajos posteriores han puesto de manifiesto que la acumulación debido a limitación por azufre o fósforo (no así de nitrógeno) se debe a un artefacto experimental del cultivo discontinuo y se produce por una reducción en la tasa de crecimiento (Hazelwood et al., 2009). Otros factores que parecen disparar la acumulación tanto de trehalosa como de glucógeno son el pH, la fuente de carbono empleada (Parrou et al., 1999) y al aumento de la temperatura (sólo trehalosa) (Mahmud et al., 2010). El caso del pH es muy llamativo puesto que si el cultivo presenta pH constante y cercano a 5, las concentraciones internas de ambos compuestos son prácticamente el doble que en un cultivo sin control del pH (Parrou et al., 1999). Además la acumulación de glucógeno se produce de forma más rápida y temprana, durante la fase exponencial media y la de trehalosa justo al iniciarse la fase estacionaria. En el caso de la temperatura la trehalosa presenta un incremento tanto mayor cuanto mayor es ésta. Sin embargo, ambos trabajos no tienen en cuenta la tasa de crecimiento y por lo tanto el efecto se podría deber a una reducción en la velocidad de crecimiento.

En la actualidad se conocen las rutas de biosíntesis de ambos compuestos y se han realizado avances en la comprensión de la regulación de la ruta. La biosíntesis tanto de trehalosa como de glucógeno comparte intermediarios metabólicos comunes (Figura II.2). La regulación de la síntesis y degradación se realiza tanto a nivel transcripcional como postraduccional (Francois and Parrou, 2001; Hazelwood et al., 2009). La regulación transcripcional en el caso del glucógeno se centra en el gen *GSY2* (glucógeno sintasa). La

expresión se induce tanto vía Snf1p (inhibidor de la represión catabólica mediada por glucosa) como por Msn2p/Msn4p (activadores de la respuesta a estrés general), y se reprime por mediación de Pho85p (relacionado con la regulación a la respuesta a niveles de nutrientes, condiciones ambientales y progresión a través del ciclo celular) y la señalización por la quinasa de proteínas A (PKA) (Capítulo IV). También existe regulación postraduccional de las enzimas implicadas tanto en la síntesis (Gsy1/2p) como en la degradación (Gph1p; glucógeno fosforilasa) del glucógeno por fosforilación-desfosforilación, lo que permite una respuesta rápida a cambios ambientales. La regulación transcripcional de la síntesis de trehalosa se centra en *TPS1* (trehalosa-6-fosfato sintasa) inducida por Msn2p/Msn4p y reprimida por Mig1p y Mig2p (Capítulo IV). No obstante y al igual que ocurre con el glucógeno, la regulación principal se da a nivel postraduccional con una aumento rápido de las actividades trehalasa mediada por fosforilación-desfosforilación en la que está involucrada PKA (Capítulo IV; Francois and Parrou, 2001; Zaman et al., 2008; Hazelwood et al., 2009).

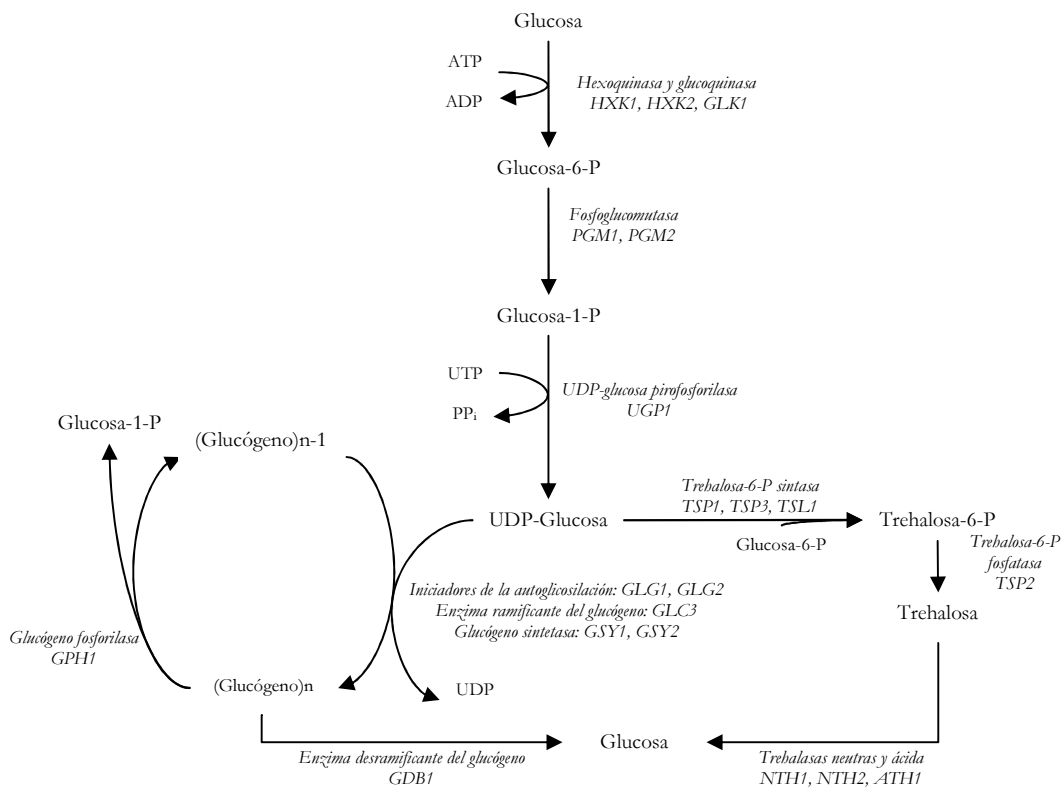


Figura II.2. Metabolismo del glucógeno y la trehalosa en *S. cerevisiae*. Adaptado de Hazelwood et al 2009.

Es objetivo del siguiente capítulo tratar de establecer la respuesta fisiológica que el agotamiento de los diversos nutrientes y otros cambios ambientales pueden provocar en cepas de levadura utilizadas en la industria panadera.

Resultados

1-. Comportamiento en condiciones de laboratorio de cepas utilizadas en la industria panadera.

Para interpretar el comportamiento de las cepas panaderas cuando se cultivan en la industria se procedió en el laboratorio a la caracterización de diversos parámetros fisiológicos utilizando condiciones de cultivo discontinuo y como medio MAB (Materiales y Métodos).

1.1-. El origen de las melazas afecta al comportamiento de las levaduras.

La cepa V1 se cultivó en melazas designadas como F y T procedentes de una fábrica de levaduras y adquiridas de distintos lugares. La melaza bruta F presenta una

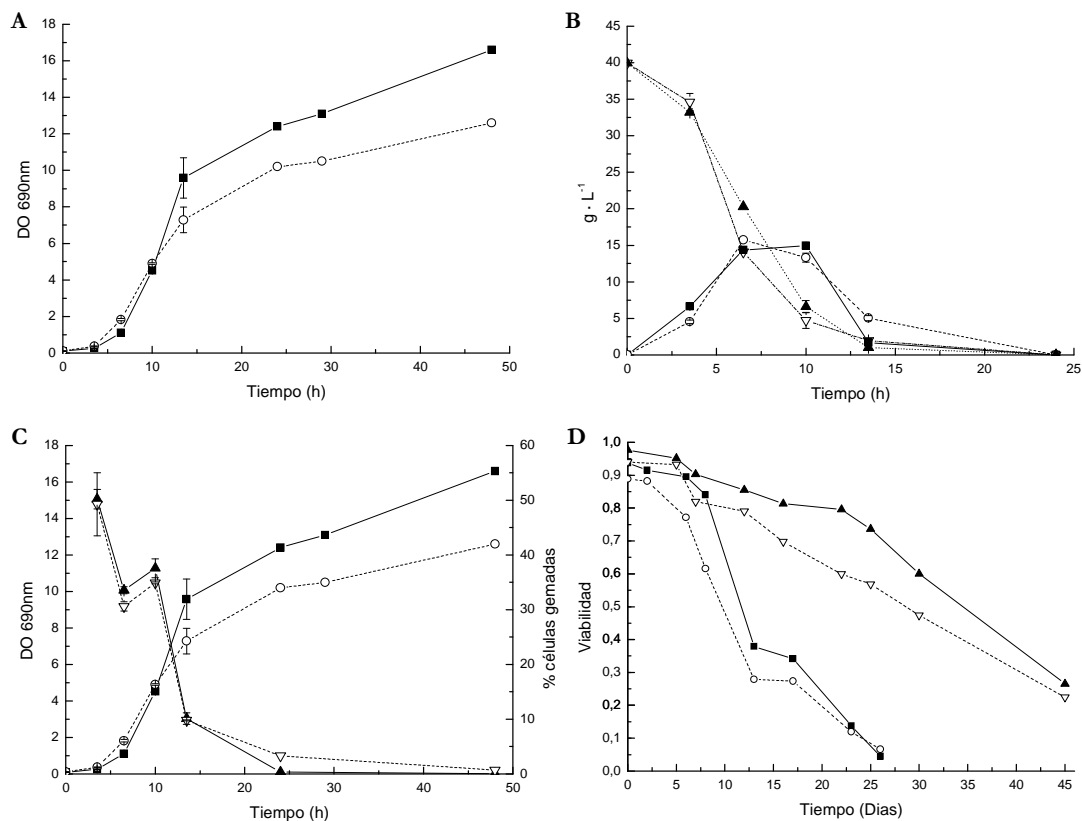


Figura II.3. Parámetros fisiológicos en melazas de distinta procedencia. Crecimiento (DO) (A); Consumo de azúcares: azúcares reductores (■ y ○), sacarosa (▲ y ▽) (B); DO 690nm (■ y ○); índice mitótico (▲ y ▽) (C) y viabilidad de células recogidas en fase de diauxia (■ y ○); y en fase estacionaria (▲ y ▽). (D). En todos los casos los símbolos rellenos y vacíos indican parámetros medidos con melaza F o T, respectivamente. representativo con replica.

concentración de sacarosa de $781.45 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \pm 0.8$ y la de tipo T $638.69 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1} \pm 8.22$. No se detectan azúcares reductores en el rango de diluciones utilizados.

Para el cultivo de la cepa V1 se procedió a diluir y suplementar estas melazas brutas (Materiales y Métodos). En F se observa una tasa de crecimiento (μ) de 0.425 h^{-1} y en T de 0.385 h^{-1} , es decir, 10% menor. A partir de las 10 h de cultivo, la DO en F es superior a las obtenidas en T (Figura II.3-A). La cepa V1 no presenta diferencias significativas ni en la hidrólisis de sacarosa ni en el consumo de glucosa y/o fructosa en ambos tipos de melazas (Figura II.3-B). El índice mitótico (porcentaje de células en gemación) tampoco presenta diferencias significativas (Figura II.3-C). Una fracción de los cultivos se utilizó para determinar la viabilidad (Figura II.3-D). Se recogieron células en fase de diauxia (a las 13.5 h de cultivo) y en fase estacionaria (a las 48 h de cultivo). La supervivencia de las levaduras cuando se almacenan a 30° C es menor cuando son recogidas en fase de diauxia que cuando se recogen en fase estacionaria. Además la viabilidad de células cultivadas en melazas F fue mayor que las cultivadas en melazas T.

1.2. Comportamiento en melazas de diferentes cepas de levaduras.

Las cepas V1 y V3 (Materiales y Métodos) se utilizan en la elaboración de pan y de masas dulces, respectivamente. Cuando se cultivan en melazas ambas cepas crecen de forma similar durante la fase exponencial, pero al final del cultivo la cepa V3 presenta un 10% más de biomasa que la cepa V1 (Figura II.4-A). El porcentaje de células en fase G2 se mantiene elevado en ambas cepas hasta, aproximadamente, las 10 h de cultivo. A partir de entonces, se observa una disminución de células en fase S en la cepa V3, y 2 h después en V1. El porcentaje de células en fase G1 se estabiliza a partir de las 14 h, y es máximo al final del cultivo. El porcentaje final de células en fase G1 es superior en la cepa V3 que en la cepa V1 (Figura II.4-B). La entrada en diauxia de ambas cepas parece que se debe al consumo total del amonio (fuente de nitrógeno) que se produce a las 8 h (datos no mostrados) y no al agotamiento de la fuente de carbono (Figura II.4-C y D).

La sacarosa se hidroliza completamente en ambas cepas a las 12 h (Figura II.4-C) mientras que los productos de hidrólisis se agotan en V1 a las 16 h y en la cepa V3 a las 14-15 h (Figura II.4-D).

El etanol se acumula durante las primeras 10 h y posteriormente se estabiliza (Figura II.4-F). No se detectó en ninguna de las cepas consumo del etanol (Figura II.4-F).

Esto podría deberse a la presencia de otras fuentes de carbono (derivados de pectina, celulosa, etc) que serían consumidas tras el agotamiento de la glucosa y la fructosa. Se determinaron otros hidratos de carbono y se comprobó que el medio contiene aproximadamente $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de otros azúcares que se asimilan a partir de las 10 h de cultivo. No se registra más consumo a partir de las 14-16 h, siendo la concentración residual de 2.5

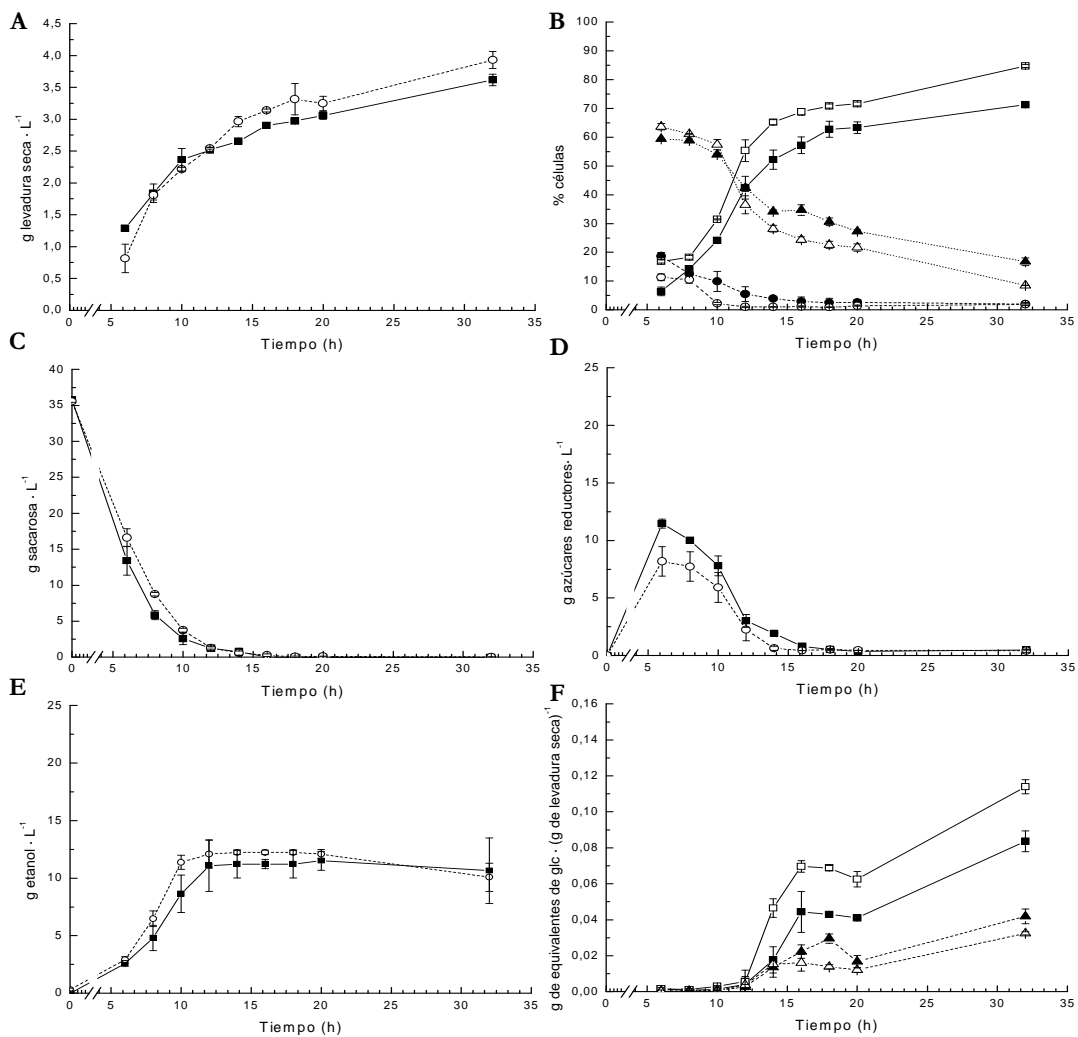


Figura II.4. Parámetros fisiológicos de distintas cepas en medio MAB. Producción de biomasa (A); porcentaje de células en cada una de las fases del ciclo celular (G1 (■, □), S (●, ○) y G2 (▲, △))(B), concentración de sacarosa en el medio (C); concentración de azúcares reductores en el medio (D); producción de etanol (E) y concentración interna de glucógeno (▲, △) y trehalosa (■, □) (F). Los símbolos rellenos representan a la cepa V1 y los vacíos a la cepa V3. Se muestran los resultados medios con desviación estándar de dos experimentos independientes de cada una de las cepas.

$\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$. Por tanto, las melazas presentan un 78.2% de sacarosa, 16.3% de otro/s azúcar/es asimilables y un 5.5% de uno o varios hidrato/s de carbono que no son asimilables por la levadura. El etanol no se consume probablemente por la presencia de otras fuentes de carbono o por la falta de aireación en el cultivo.

La acumulación de glucógeno fue similar en V1 y V3 (Figura II.4-F). La acumulación comienza tras el agotamiento de las fuentes de carbono y la máxima concentración, equivalente al 3-4% del peso total de la levadura en peso seco, se produce al final del cultivo. La acumulación de trehalosa se inicia al agotarse la fuente de carbono fermentable en ambas cepas. En V1 la cantidad máxima de trehalosa es un 8% del peso seco mientras que en V3 alcanza el 11% (Figura II.4-F).

La supervivencia durante el almacenamiento a 30° C depende de la fase de crecimiento en el que se recogieron las células (figura II.5). Las que proceden de fase exponencial (6 h de cultivo) no toleran el almacenamiento a 4° C al cual se someten previamente las células (Materiales y Métodos). Las recogidas en fase exponencial tardía-cambio diauxico (12 h) sobreviven al almacenamiento previo a 4° C pero presentan tasas de mortandad extremadamente altas durante el almacenamiento a 30° C. En fase estacionaria temprana y tardía (18 y 32 h), se observa una resistencia prolongada con viabilidad del 80%; por debajo de este valor las células experimentan una tasa de muerte, variable en V1 y más repetitiva en V3.

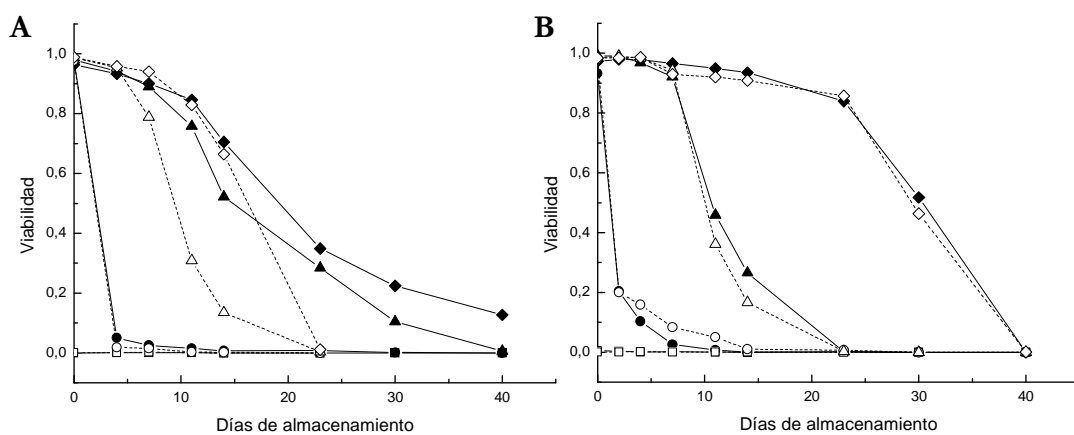


Figura II.5-. Viabilidad durante el almacenamiento de células de la cepa V1 (A) y de la cepa V3 (B), recogidas a 6 h (■, □); 12 h (●, ○); 18 h (▲, △) y 32 h (◆, ◇) de cultivo. Los símbolos rellenos o vacíos corresponden a dos experimentos distintos. La viabilidad ha sido calculada como el cociente entre células vivas a un tiempo de almacenamiento entre las células vivas antes del mismo.

1.3-. Contenido en aminoácidos de las melazas industriales a lo largo del cultivo.

Las melazas presentan elevadas concentraciones de muchos de los aminoácidos constituyentes de proteínas (Figura II.6-B y Tabla II.2), aunque no se detectan ni aminoácidos cargados positivamente (histidina, lisina y arginina) ni gran parte de los polares sin carga (metionina, cisteína, glutamina y treonina). La prolina no puede determinarse ya que coeluye con el ácido γ -aminobutírico (GABA).

Durante el cultivo de V1 y V3 se observa tanto consumo como producción de aminoácidos y otras sustancias (Figuras II.4 y II.5).

Tabla II.2-. Composición aminoacídica del medio MAB a lo largo del crecimiento de la cepa V1. Se indican valores medios en mM de dos experimentos independientes y desviación estándar. ND no determinado.

V1	0h	6 h	8h	10 h	12h	14h
Aspártico	0.79±0.02	0.41±0.18	0.05±0.01	0.05±0.02	0.04±0.01	0.04±0.01
Serina	0.59±0.1	0.49±0.04	0.13±0.00	0.10±0.03	0.09±0.01	0.08±0.01
Glutámico	0.57±0.01	0.25±0.14	0.04±0.01	0.03±0.02	0.03±0.01	0.03±0.01
Glicina	0.36±0.00	0.48±0.18	0.21±0.03	0.13±0.04	0.05±0.04	0.04±0.02
Alanina	0.66±0.00	1.09±0.02	0.38±0.15	0.21±0.02	0.16±0.02	0.16±0.07
Tirosina	0.53±0.00	0.69±0.19	0.38±0.06	0.27±0.10	0.18±0.02	0.12±0.06
Valina	0.37±0.00	0.62±0.08	0.33±0.04	0.16±0.04	0.08±0.00	0.06±0.04
Isoleucina	0.47±0.00	0.31±0.05	0.11±0.01	0.03±0.01	ND	ND
Leucina	0.42±0.00	0.30±0.05	0.09±0.00	0.02±0.01	ND	ND
Fenilalanina	0.19±0.00	0.15±0.01	0.09±0.02	0.04±0.02	0.02±0.00	ND

Tabla II.3-. Composición aminoacídica del medio MAB a lo largo del crecimiento de la cepa V3. Se indican valores medios en mM de dos experimentos independientes con desviación estándar

V3	0h	6 h	8h	10 h	12h	14h
Aspártico	0.79±0.02	0.40±0.04	0.04±0.01	0.03±0.00	0.04±0.01	0.05±0.02
Serina	0.59±0.01	0.31±0.00	0.16±0.02	0.09±0.00	0.11±0.01	0.12±0.04
Glutámico	0.57±0.01	0.31±0.05	0.04±0.01	0.02±0.01	0.03±0.00	0.04±0.02
Glicina	0.36±0.00	0.33±0.05	0.31±0.01	0.17±0.01	0.08±0.05	0.04±0.00
Alanina	0.66±0.00	1.2±0.4	0.67±0.11	0.23±0.04	0.20±0.02	0.22±0.19
Tirosina	0.53±0.00	0.43±0.01	0.46±0.06	0.32±0.00	0.28±0.03	0.26±0.09
Valina	0.37±0.00	0.54±0.01	0.49±0.06	0.22±0.01	0.10±0.04	0.13±0.09
Isoleucina	0.47±0.00	0.27±0.01	0.16±0.03	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.00
Leucina	0.42±0.00	0.29±0.01	0.16±0.03	0.02±0.00	0.01±0.00	0.01±0.01
Fenilalanina	0.19±0.00	0.09±0.01	0.10±0.02	0.04±0.00	0.02±0.00	0.02±0.01

Alanina y valina aumentan su concentración una vez y media aproximadamente al inicio de la fase exponencial, en ambos cultivos, tras lo cual se produce el consumo. El resto de aminoácidos se asimilan desde el inicio del cultivo en V1 y en V3 (Tabla II.3). A partir de las 16-18 h, los cromatogramas se vuelven muy fluctuantes debido a la baja concentración de los compuestos y a una elevada oscilación de la línea base.

Además de los perfiles de aminoácidos se detectan compuestos no identificados que pueden ser tanto aminas primarias como secundarias.

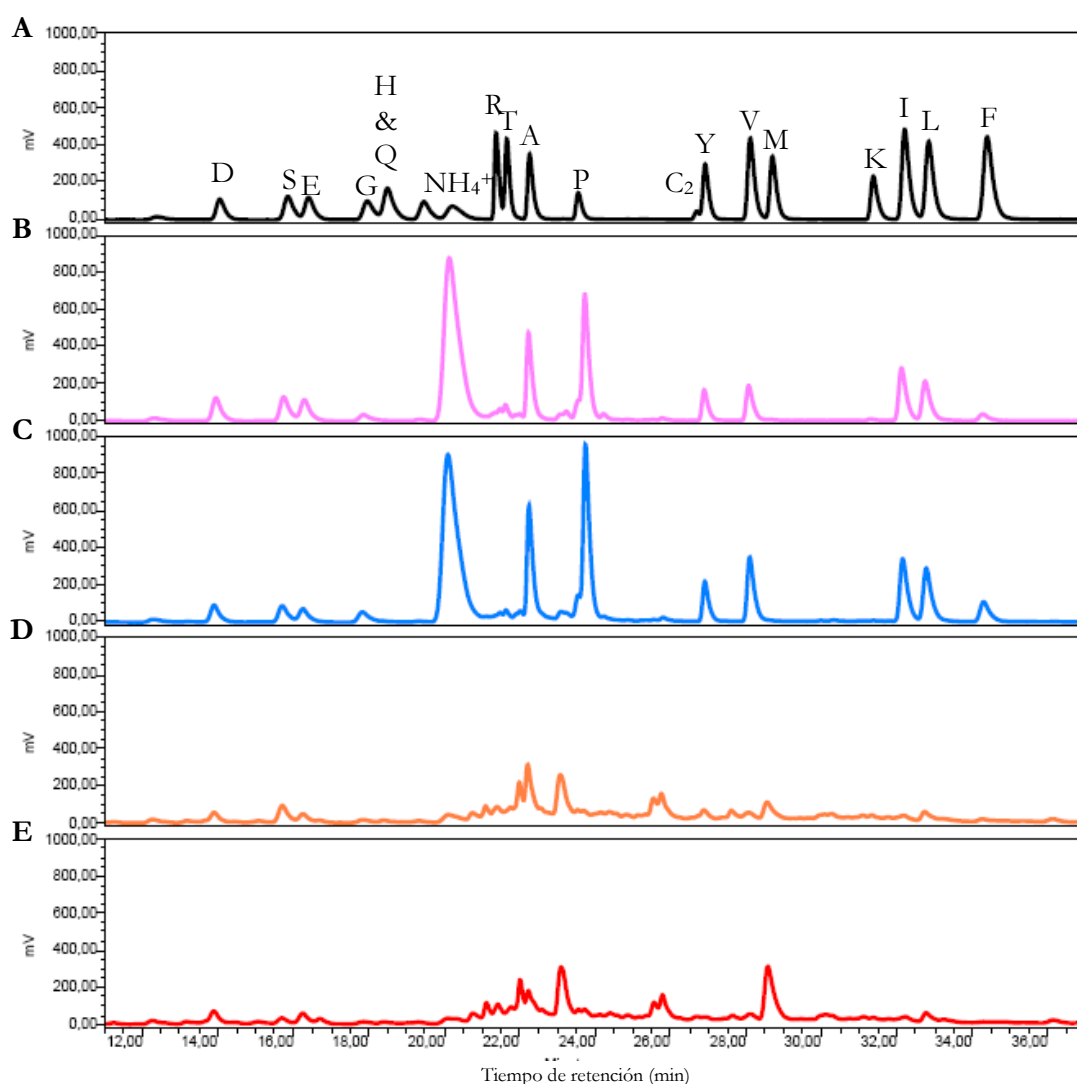


Figura II.6. Composición aminoácida del medio MAB y su evolución a lo largo del cultivo de V1. Cromatografía de una mezcla de aminoácidos a una concentración equimolar de 62.5 μM (A), y los tiempos de cultivo 0 horas (B); 6h (C); 16h (D) y 32 h (E). En A, se indican mediante el código Dayhoff los distintos aminoácidos; C2 representa a la cistinina (que se forma al derivatizar la cisteína) y que son detectables mediante fluorescencia. En A, la dilución empleada es 1/10, en B es 1/6, y en el resto no se diluyen.

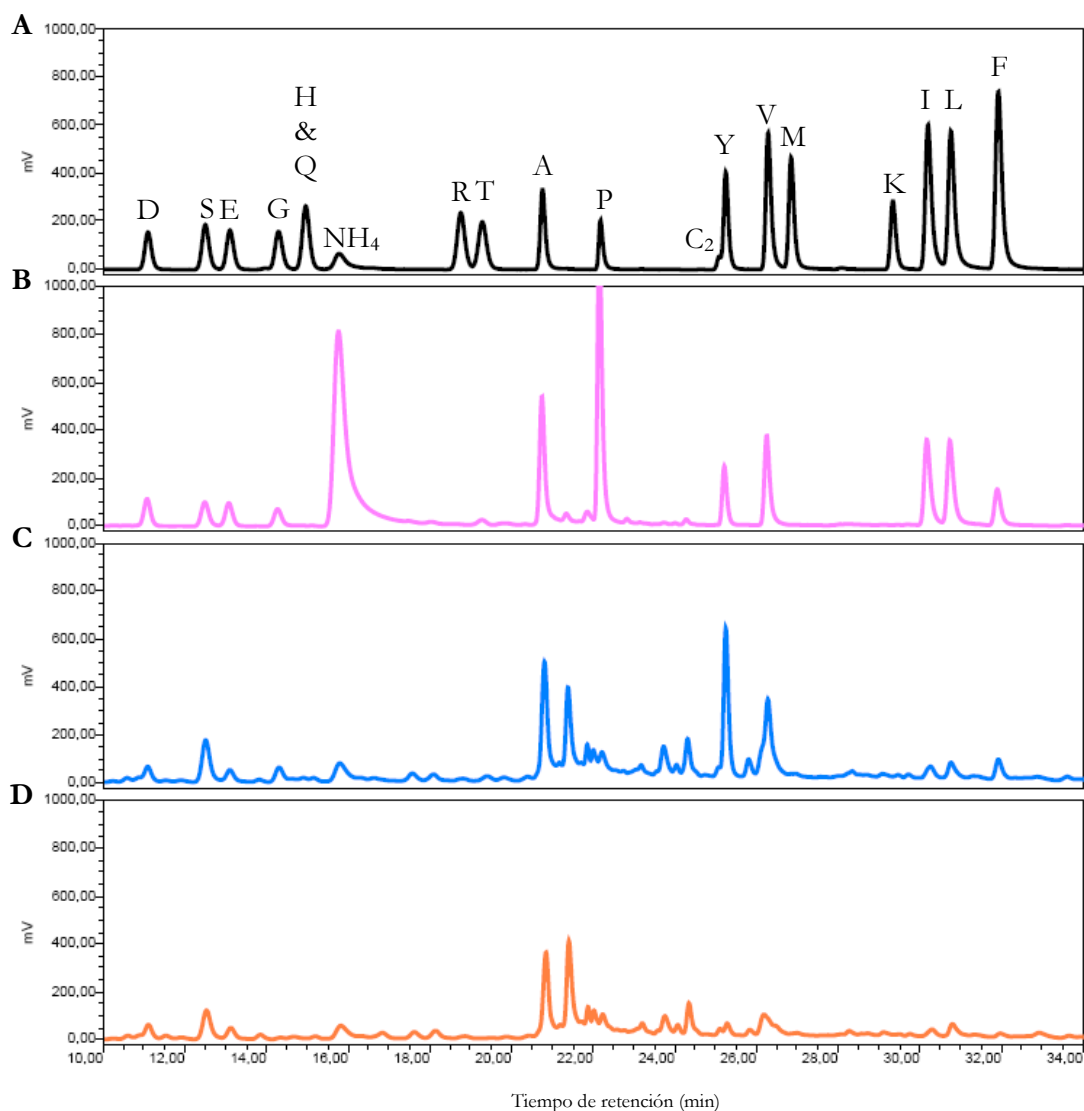


Figura II.7. Composición aminoácídica del medio MAB a lo largo del cultivo de V3. Cromatografía de una mezcla de aminoácidos a una concentración equimolar de $62.5 \mu\text{M}$ (A), y los tiempos de cultivo 6 horas (B); 16h (C) y 32h (D). En A se indican mediante el código Dayhoff los distintos aminoácidos y que son detectables mediante fluorescencia. En B la dilución empleada es 1/6, mientras que en el resto no se diluyen.

1.4.- Contenido interno de aminoácidos libres en levaduras cultivadas en medio MAB.

La cepa V1 sintetiza aminoácidos no presentes en el medio MAB, de modo que se detectan arginina, treonina, lisina, histidina y/o glutamina (Figura II.8-B), además de homoserina (TR 17') y ornitina (TR 29'), intermediarios de la biosíntesis de treonina y arginina, respectivamente.

La cepa V3 presenta un patrón similar al de V1 (Figura II.9), aunque no se detecta un área que corresponda con la homoserina. No se ha medido histidina, glutamina, prolina,

cisteína y metionina bien por coelución, o por dificultad en la separación, o por que produce poca señal.

En general, las cepas tienden a acumular los aminoácidos libres durante la fase de crecimiento exponencial, y a consumirlos tras el cambio diáuxico (Tabla II.4 y II.5).

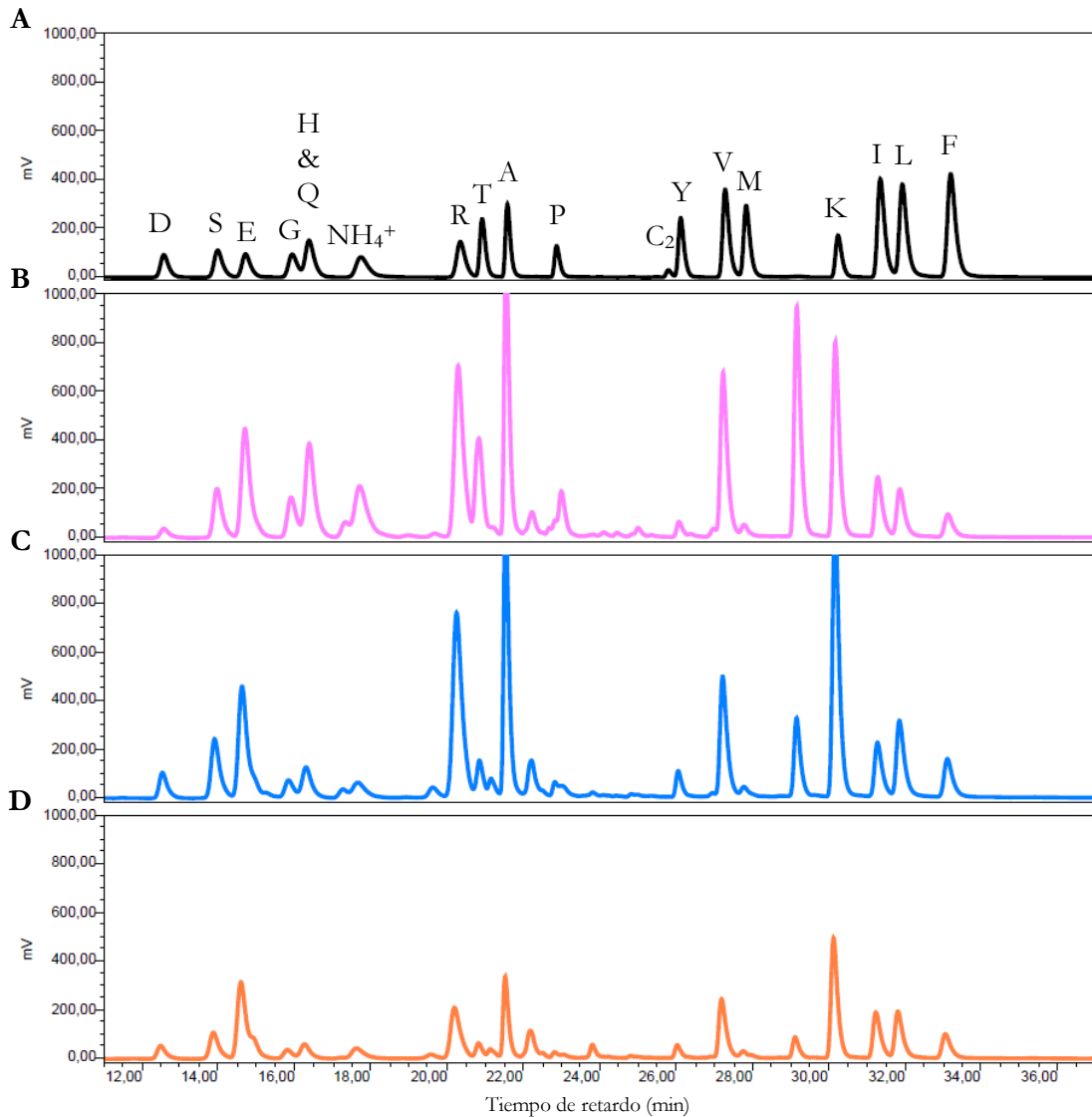


Figura II.8. Concentración interna de aminoácidos libres en V1 cultivada en MAB. Cromatografía de una mezcla de aminoácidos a una concentración equimolar de 62.5 μ M (A), y los tiempos de cultivo 8 horas (B); 16h (C) y 32h (D). En A se indican mediante el código Dayhoff los distintos aminoácidos y que son detectables mediante fluorescencia.

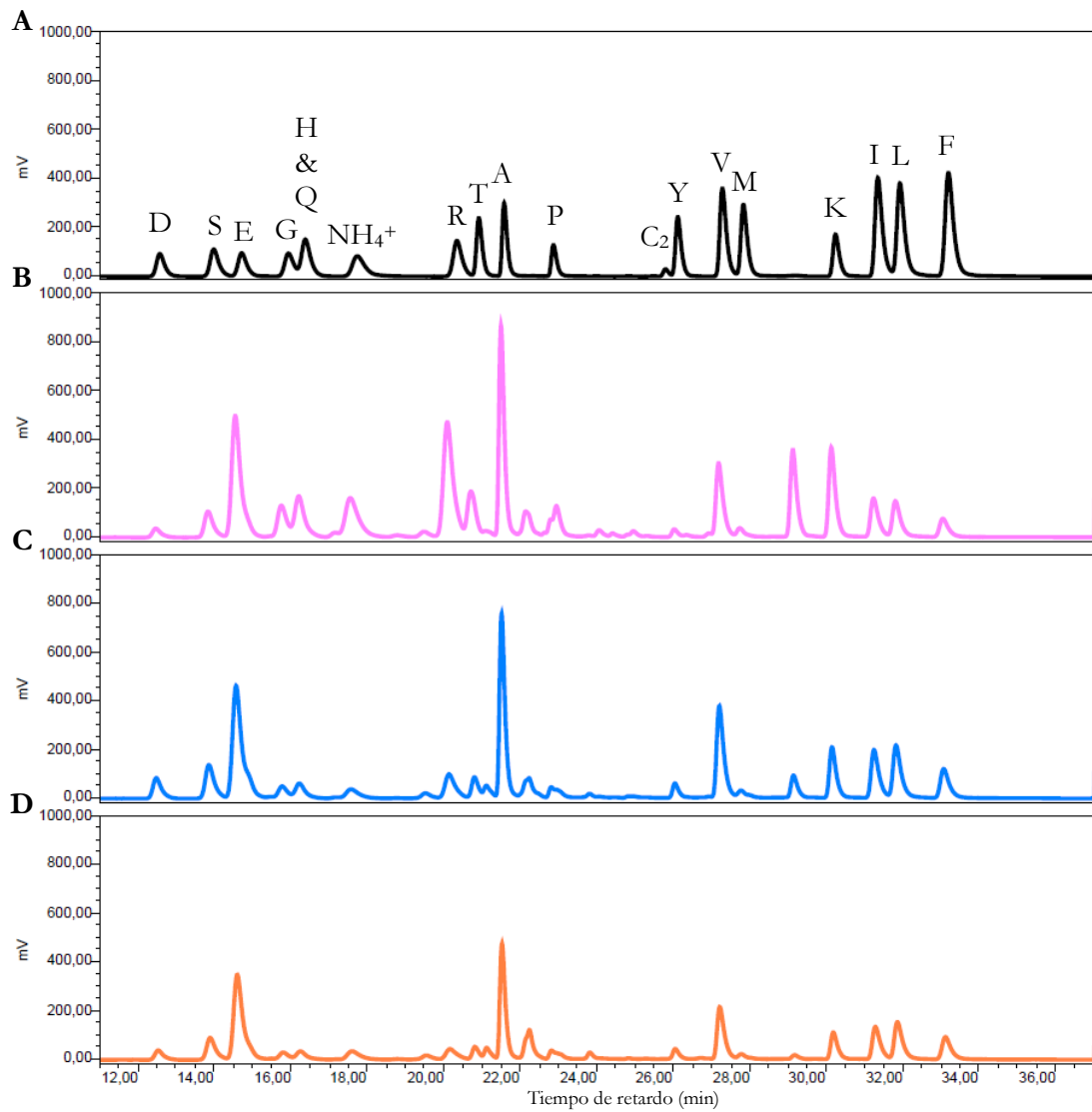


Figura II.9. Concentración interna de aminoácidos libres en levaduras de la cepa V3 cultivadas en medio MAB. Cromatografía de una mezcla de aminoácidos a una concentración equimolar de 62.5 μM (A), y los tiempos de cultivo 8 horas (B); 16h (C) y 32h (D). En A se indican mediante el código Dayhoff los distintos aminoácidos y que son detectables mediante fluorescencia.

Capítulo II: Resultados

Tabla II.4-. Concentración interna de aminoácidos a lo largo del crecimiento de la cepa V1 en medio MAB. Se representan valores medios de dos experimentos independientes con desviación estándar. Los valores se indican como nmol del aminoácido · (mg de levadura seca)⁻¹.

	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	32 h
Asp	8.5±3.3	10.48±2.72	19.75±0.01	19.30±0.15	16.40±0.03	13.35±1.55	16.22±4.03	7.28±3.34
Ser	35.6±16.7	26.60±3.58	29.69±4.40	30.47±1.79	31.35±0.39	28.84±2.50	28.41±1.03	11.58±7.79
Glu	79.3±23.7	93.28±11.45	84.25±6.36	65.67±5.22	73.42±4.38	78.53±11.12	80.63±16.30	38.45±33.70
Gly	31.1±10.9	17.97±1.32	16.23±0.98	12.84±0.78	11.70±0.22	11.20±3.31	8.19±0.01	4.59±3.10
Arg	71.34±1.83	120.54±0.72	121.42±6.10	98.88±5.69	91.76±1.08	69.42±10.06	62.90±6.61	30.98±3.28
Thr	34.30±5.57	19.58±2.14	13.67±2.11	11.73±0.8	11.46±0.17	9.39±2.05	9.22±1.53	5.78±0.35
Ala	58.80±23.39	32.30±7.31	46.77±2.80	48.54±1.50	53.07±2.00	50.70±11.25	40.51±1.29	14.47±4.93
Tyr	5.98±3.77	7.01±3.30	9.55±3.98	7.14±2.13	6.66±0.73	5.95±0.57	5.98±1.04	3.13±1.01
Val	43.37±13.02	21.98±2.27	21.25±1.38	21.49±3.22	24.79±5.83	26.34±2.41	25.57±6.41	ND
Lys	67.24±7.93	120.59±4.13	120.89±0.31	106.60±6.43	101.34±4.21	82.22±1.71	80.50±6.08	35.23±21.28
Ile	11.94±7.40	6.87±1.67	7.83±2.27	6.78±2.43	7.40±1.93	7.12±0.48	8.35±0.17	5.50±1.98
Leu	9.39±5.15	8.04±2.55	10.74±2.95	10.32±2.96	10.99±1.94	9.57±0.50	10.60±0.05	6.25±1.86
Phe	4.67±2.56	4.14±1.45	5.83±1.47	5.19±1.58	5.56±1.18	5.08±0.26	5.68±0.05	3.06±1.49

Tabla II.5-. Concentración interna de aminoácidos a lo largo del crecimiento de la cepa V3 en medio MAB. Se representan valores medios de dos experimentos independientes con desviación estándar. Los valores se indican como nmol del aminoácido · (mg de levadura seca)⁻¹.

	8 h	10 h	12 h	14 h	16 h	18 h	20 h	32 h
Asp	6.61±0.20	26.00±3.03	32.40±1.56	23.03±3.78	22.12±2.39	19.19±1.06	16.00±1.35	9.63±2.59
Ser	16.31±0.09	20.37±0.02	29.31±0.08	35.31±3.63	29.13±2.06	27.57±1.05	25.15±1.53	14.93±1.85
Glu	86.05±7.09	113.88±17	117.38±6.2	137.83±29	115.63±19	115.90±5.8	106.15±0.20	78.47±5.28
Gly	24.77±4.91	14.55±0.73	19.58±1.63	17.69±3.69	12.32±2.57	12.02±2.67	13.23±3.29	6.08±0.35
Arg	66.94±10.3	63.81±1.10	33.33±1.06	24.34±6.72	19.39±4.93	17.55±3.04	14.30±2.51	8.01±1.23
Thr	24.11±6.17	7.66±0.18	9.97±0.58	10.72±1.69	9.04±1.03	9.45±0.17	8.78±0.32	4.24±0.89
Ala	45.80±1.51	49.22±11.8	69.96±3.23	79.42±11.4	58.27±8.52	58.55±13.2	49.47±9.13	27.28±1.20
Tyr	1.44±0.49	2.82±0.04	5.68±0.05	6.04±0.62	5.02±0.46	5.00±1.27	4.53±0.54	3.55±0.36
Val	13.12±6.53	15.88±0.38	25.57±1.93	34.48±5.13	31.81±4.49	32.10±0.23	28.44±0.53	13.88±3.35
Lys	37.80±7.78	53.38±12.8	37.16±6.37	30.44±1.17	24.90±2.16	25.16±1.00	24.09±0.74	14.24±3.41
Ile	3.87±0.79	3.29±0.40	6.05±0.43	7.98±1.06	7.87±0.98	8.25±0.42	7.70±0.44	4.89±0.13
Leu	4.08±0.54	4.83±0.23	8.75±0.39	10.61±0.91	9.10±0.56	8.74±0.68	7.50±0.76	5.16±1.37
Phe	1.73±0.46	2.11±0.33	4.57±0.49	5.72±0.32	4.75±0.00	4.49±0.58	3.95±0.57	2.86±1.14

La composición interna relativa de los distintos aminoácidos libres presenta variación a lo largo del cultivo y depende de la cepa analizada (Figura II.10). Durante la fase exponencial el 60% del total de aminoácidos en V1 y 71% en V3 corresponde a glutamato, lisina, arginina y alanina (figuras II.10-A y B). A las 12 h en V1 los cuatro aminoácidos anteriores constituyen el 74.2% del total, pero las concentraciones relativas de arginina y

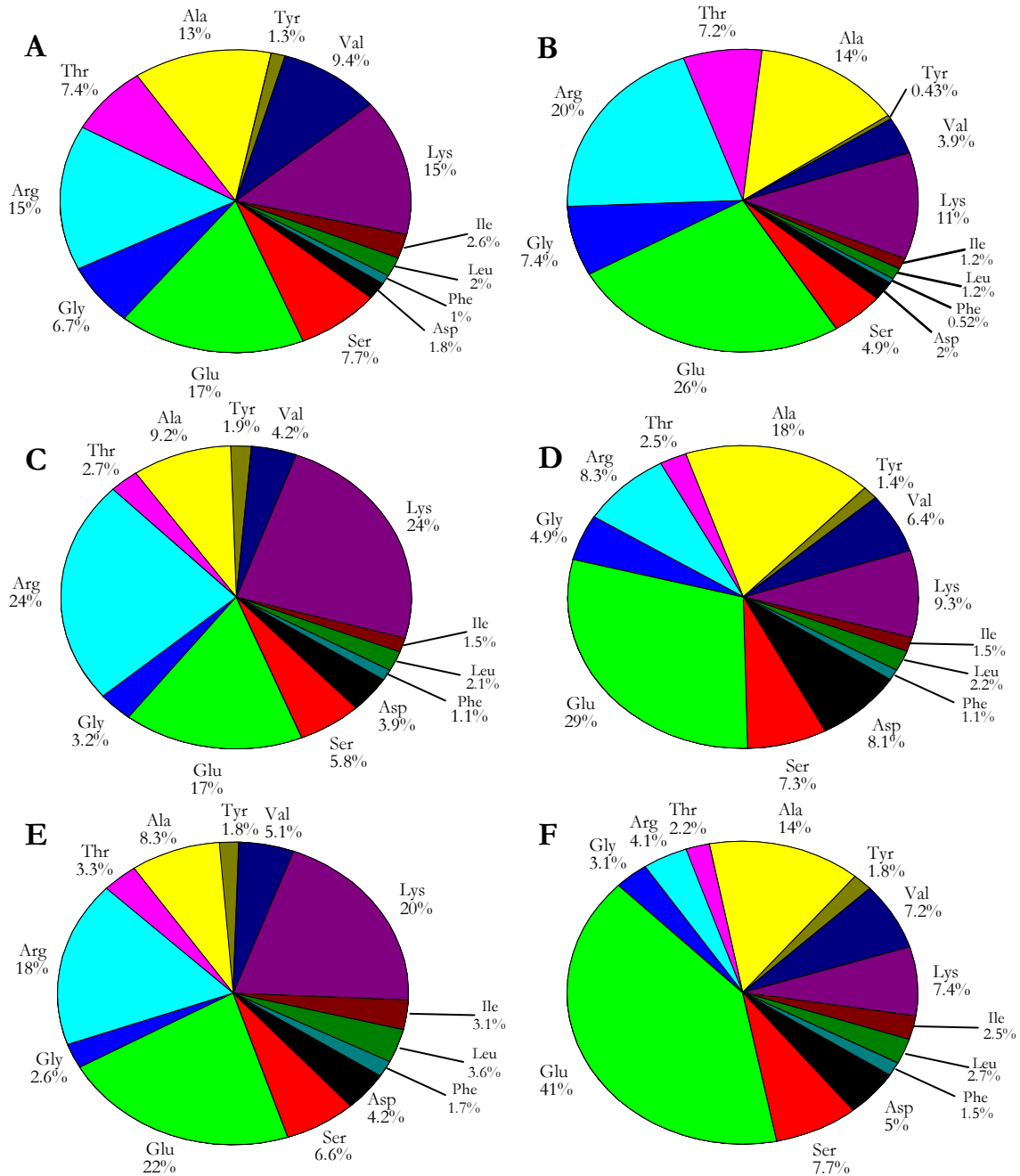


Figura II.10. Composición de aminoácidos a lo largo del crecimiento en medio MAB. A tiempo 8 horas (A-B), 12 h (C-D) y 32h (E-F). En las cepas V1 (A, C y E) y V3 (B, D y F). Se representan el porcentaje de los valores medios de dos experimentos independientes.

lisina aumentan, mientras que la de alanina se reduce levemente y la de glutamato no varía (Figura II.10-C). La concentración de los cuatro aminoácidos suponen el 64.6% del total en la cepa V3, que experimenta una reducción de arginina mientras que glutamato, lisina y alanina no varían (Figura II.10-D). Durante la fase estacionaria tardía (32 h), V1 no presenta cambios en los contenidos de los cuatro aminoácidos más abundantes respecto a las 12 h (Figura II.10-E); en la cepa V3, el glutámico es el aminoácido más abundante seguido de la alanina (Figura II.10-F), mientras que arginina y lisina se reducen.

2-. Comportamiento de las cepas V1 y V3 en condiciones industriales.

En la producción industrial, las levaduras se cultivan para su empleo en masas secas o dulces. A su vez, las de masa seca se pueden comercializar en dos formatos: alta actividad o actividad normal o clásica, es decir, con capacidades fermentativas que permiten el aumento del volumen de masa seca con mayor o menor rapidez (Evan, 1990; Rehm and Reed, 1995). El producto final, ya sea en forma de levadura prensada o en forma de crema, puede presentar cambios en sus propiedades, de manera que no responda posteriormente a los criterios de calidad exigidos (Introducción General y la Introducción de este Capítulo). De los tres métodos de producción descritos, los relacionados con levaduras de alta actividad son los que pueden presentar mayor conflictividad, seguidos de los de levadura para masas dulces y en menor grado, las levaduras de actividad clásica. Es de especial interés la identificación de parámetros que puedan advertir durante el cultivo en condiciones industriales de si las levaduras pueden o no responder posteriormente a estos criterios de calidad. En este estudio se analizaron muestras tomadas de forma rutinaria de distintas producciones. Se determinaron parámetros como la distribución en porcentajes de células que estaban en las distintas fases del ciclo celular, el contenido en glucógeno, el contenido en trehalosa y la cinética de acumulación de estos carbohidratos de reserva. Finalmente se intentó relacionar estos parámetros celulares con parámetros externos y con el comportamiento posterior de la levadura, bajo el punto de vista de su interés comercial.

2.1-. Levadura con alta actividad fermentativa.

Se analizaron diez fermentaciones industriales de la cepa V1 cultivada para alta actividad. En seis de ellas (cultivos “N”) el producto final respondió adecuadamente a los criterios de calidad mientras que las cuatro restantes (cultivos “F”) presentaron alguna alteración de los mismos. Para determinar si las propiedades del producto final están

asociadas a cambios en algunos parámetros intra o extracelulares durante la fermentación, se compararon los datos de los cultivos “N” y los cultivos “F”.

Por ejemplo, la temperatura es uno de los parámetros más estables en los cultivos “N”, los valores de temperatura no se desvían en más de 0.5. No obstante, los cultivos “F” han sufrido oscilaciones ocasionales; el grado Brix, que constituye una medida de la concentración de biomasa, presenta una evolución repetitiva a lo largo de los cultivos “N” mientras que el resto de cultivos manifiesta valores menores a los 11° Brix; En los cultivos “F” el pH muestra un desarrollo desigual, diferenciándose del de los cultivos “N” a veces al final del proceso o al principio del mismo, y estabilizándose al final con valores similares a los de los cultivos “N”; el etanol presenta una evolución variable en los cultivos “N”, mientras que los cultivos “F” mantienen o mayores o menores concentraciones de etanol que los cultivos “N” durante la fase inicial-central del proceso, alcanzándose valores menores o similares al final del cultivo. Además excepto en un caso, todas las producciones “F” presentan diferencias en el suministro de carbono, de nitrógeno total, y en sus cocientes. Esto hace que no se mantengan la misma relación carbono-nitrógeno (C/N) de los cultivos “N”, y que la relación entre el nitrógeno en forma de sulfato de amonio y agua amoniacal también sea distinta (Datos propiedad de las Empresas, Tabla II.6 página 120)

La distribución poblacional de las fases del ciclo celular, y la acumulación de hidratos de carbono de reserva en todo el proceso, se analizaron en cuatro de los cultivos. Tres de ellos corresponden a cultivos “N” representándose como valores medios y el cuarto corresponde a un cultivo “F”. De los cuatro cultivos se tomaron muestras al final de la fermentación (14-15 h), del periodo de “maduración” de aproximadamente 1 h (15 - 16 h), del periodo de separación (16 - 18:30 h), y una última muestra que se corresponde con crema de levadura que se encuentra en el tanque de almacenamiento a 4° C (19 h) lista para su comercialización.

En “F”, al inicio del cultivo, las células están en G0/G1 pero durante las dos primeras horas se alcanzó el mínimo de células en esta fase (Figura II.11-A); este valor comienza a aumentar y el porcentaje de células en G1 es elevado a partir de las 14 h de cultivo, especialmente en las tres producciones “N”. Los valores alcanzados se mantienen durante la maduración, la separación y en la crema (Figura II.11-A).

La concentración de glucógeno disminuye durante las primeras 8 h de cultivo, tras lo cual las células lo acumulan hasta un máximo del 5% del peso a las 12 h en los cultivos

“F” y 2 h más tarde en los “N”. Al final de la fermentación la concentración de glucógeno es la misma en ambos cultivos. (Figura II.11-B).

La trehalosa es el principal hidrato de carbono acumulado (Figura II.11-B). La trehalosa acumulada en las células del inóculo se consume en las dos primeras horas del cultivo para empezar de nuevo a acumularse a partir de las 8 h. En todos los cultivos el último suministro de fuente de carbono se realiza en la fracción horaria 14 - 15 h, y es a partir de este punto cuando comienza a acumularse la trehalosa. Los valores máximos se alcanzan aproximadamente a las 18 h en ambos cultivos, pero la concentración fue alrededor de 1.7 veces superior en los cultivos “F”. La concentración de trehalosa se mantiene en las levaduras que esperan la separación y en la crema final (Figura II.11-B).

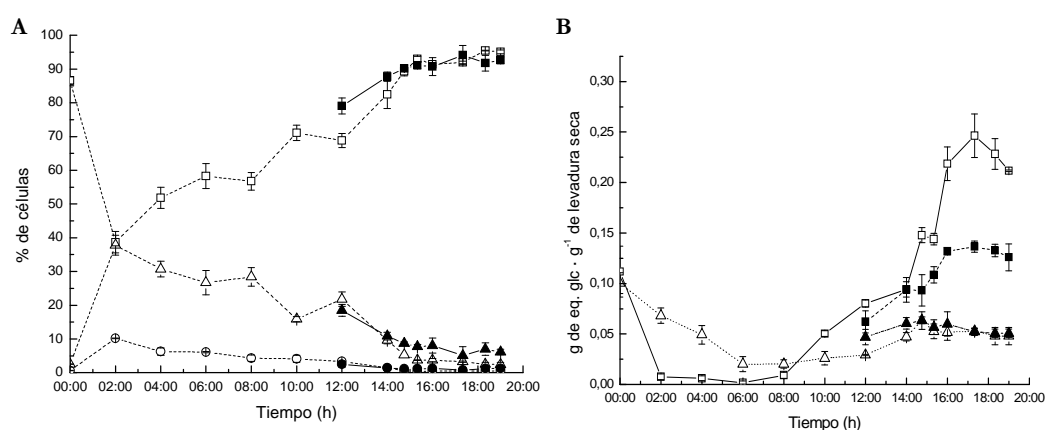


Figura II.11. Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular: G1 (□ y ■), G2 (△ y ▲) y S (○ y ●) (A) y acumulación de hidratos de carbono de reserva: glucógeno (△ y ▲) y trehalosa (□ y ■) (B). En todos se representan como símbolos sólidos la media y desviación de tres fermentaciones normales y como símbolos vacíos dos replicas de la fermentación F1.

2.2-. Levadura con actividad clásica.

Para la producción de levaduras con actividad clásica se utilizan protocolos diferentes a los del punto anterior. Las diferencias más importantes se refieren a cambios en el suministro de nutrientes. Por otra parte y de forma general, las levaduras de actividad clásica no suelen mostrar alteraciones en los criterios de calidad del producto final. Se analizaron muestras de tres producciones independientes todas ellas con un producto final sin alteraciones en los criterios de calidad. De una de ellas se analizaron las muestras obtenidas desde el inicio de la fermentación (cultivo C1), mientras que las otras dos (C2 y C3) sólo se analizaron muestras a partir de las 12 h tras su inoculación.

La temperatura de los fermentadores muestra diferencias significativas, en C1 el incremento de temperatura se ha realizado de forma escalonada mientras que en los otros dos cultivos se realizó de forma progresiva. La temperatura se mantiene constante a 35° C sin registrarse oscilaciones a partir de las 8 h; sin embargo el grado Brix en los tres cultivos aumentó de forma similar, alcanzando el valor máximo de unos 11° al final de la producción; C1 presenta una evolución del pH diferente a la observada en las otras dos producciones especialmente al inicio, aunque al final del cultivo la basificación del medio es más rápida en C1 que en C2 y C3; además en C1 se detecta un incremento en la concentración de etanol muy por encima de los valores detectados tanto en C2 como en C3, que se rectifica reduciéndose el suministro de melazas, que se recuperará en horas posteriores; el suministro de nitrógeno total no presenta diferencias significativas entre las tres producciones pero debido a las rectificaciones en el aporte de las melazas, el coeficiente entre melaza y nitrógeno total se ve afectado. En la relación entre las distintas fuentes de nitrógeno se observan diferencias al inicio del cultivo pero se corrigen posteriormente (datos propiedad de las Empresas, Tabla II.6 página 120).

La inoculación de los fermentadores se realiza con una población de levadura de la que más de un 90% se encuentra en fase G0/G1 (Figura II.12-A). El mínimo de células en fase G0/G1 se detecta a las 2 h desde el inicio del cultivo, y va aumentando a lo largo del tiempo. El valor máximo de células en fase G0/G1 se produce en torno a las 12 h (en los cultivos C2 y C3) y las 14 h (cultivo C1). Tanto en C2 como en C3 este valor no coincide con el final del suministro de nitrógeno, contrariamente a lo que ocurre con el cultivo C1. Durante el resto del proceso los valores se mantienen por encima del 90% de células en fase G0/G1, tanto durante la maduración que se inicia sobre las 15 h como en las células que aguardan a ser separadas (Figura II.12-A).

La concentración de glucógeno se mantiene estable a lo largo de todo el cultivo, y durante el periodo de maduración-separación y en la levadura en forma de crema (19h). La trehalosa experimenta un rápido consumo con valores mínimos a las 2 h de cultivo. La acumulación de trehalosa se inicia a las 8 h con un aumento progresivo durante el resto del cultivo. Las diferencias entre C1 y C2-C3 se producen tras finalizar el suministro de melazas. En el caso de C1 se da un súbito incremento en la concentración de trehalosa en mitad de la fase de maduración que provoca que la diferencia en la concentración final sea 1.5 veces superior a las obtenidas tanto en C2 ni en C3 (Figura II.12-B).

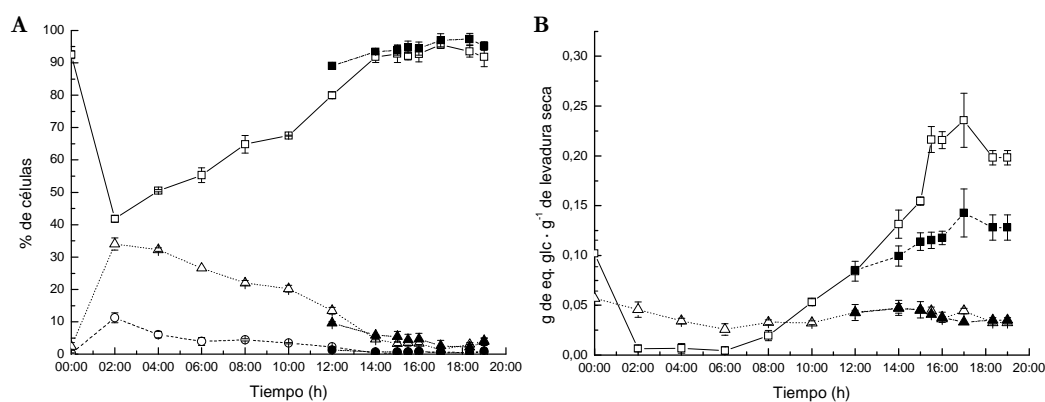


Figura II.12. Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular: G1 (□ y ■), G2 (△ y ▲) y S (○ y ●) (A) y acumulación de hidratos de carbono de reserva: glucógeno (△ y ▲) y trehalosa (□ y ■) (B). En todos se representan como símbolos vacíos el cultivo C1 y como símbolos sólidos la media y desviación de C2 y C3.

2.3-. *Levadura para masa azucarada.*

El proceso de obtención de biomasa de levadura para fermentar masas con altas concentraciones de sacarosa es diferente a los descritos anteriormente. Como en los casos anteriores, con posterioridad al cultivo se requiere que la levadura cumpla con parámetros de calidad previamente descritos (ver Introducción). En este caso la levadura utilizada es la cepa V3 para lo cual se han analizado tres producciones cuyo producto final cumplía con los criterios posteriores de calidad (A1) y otras dos cuyo producto final presentaba ligeras alteraciones en alguno de los criterios analizados (A2 y A3).

En el caso de la temperatura se detectan variaciones entre los distintos tipos de cultivo que se producen en puntos concretos tanto al inicio como al final del proceso; el grado Brix no muestra apenas diferencias, aunque en A2 y A3 se detectan valores más bajos a lo largo del cultivo que en A1. El valor máximo alcanzado en todos los casos es de unos 12° Brix; el pH presenta oscilaciones al inicio de las producciones A2 y A3, pero a lo largo del proceso se normaliza con respecto a A1; de todos los parámetros analizados el que muestra mayor variación es el alcohol. Tanto en A2 como en A3 se producen altas concentraciones de etanol en los primeros estadios del cultivo. Posteriormente la producción de etanol se reduce drásticamente, y se mantiene en ambos casos, al menos hasta las 9 h, por debajo del valor medio de los cultivos A1; en la alimentación con melazas se observa una reducción en la adición en las fases iniciales, normalizándose el suministro en la parte central del cultivo. En el caso de A2 se prolonga la incubación una hora más; en

la adición de nitrógeno también se observan cambios, especialmente entre las 3 y las 5 h en el cultivo A3. No obstante, A3 presenta una relación adecuada entre el carbono y el nitrógeno, hecho que no ocurre en A2 ni a las 3 ni a las 10 h. El perfil de las relaciones entre las dos fuentes de nitrógeno empleadas no muestra diferencias significativas entre los cultivos (datos propiedad de las Empresas, Tabla II.6 página 120 de este documento).

Dos de las tres producciones A1 se analizaron desde el inicio. Además se analizaron tres puntos de la maduración (inicial, media y final), dos de las muestras que aguardan a ser separadas del medio de cultivo (medio y final) y otra de levadura separada y almacenada.

Al inicio del cultivo el inóculo procedente de la semilla tenía un porcentaje de células en fase G0/G1 superior al 90% de la población. El valor mínimo de células en fase G0/G1 se alcanza a las 2 h de cultivo, aumentando progresivamente conforme transcurre el proceso. A partir de las 12 h el aumento en la proporción de células en fase G0/G1 se ralentiza y finalmente se mantiene en valores superiores al 90% (Figura II.13-A).

El glucógeno no muestra variaciones significativas durante el cultivo (Figura II.13-B) con valores en torno al 6% del peso seco de la levadura. Tras iniciarse la maduración este valor se incrementa hasta el 10% (Figura II.13-B). La trehalosa presenta mayores oscilaciones a lo largo del proceso. Durante la última hora de alimentación se produce un aumento de la concentración de trehalosa, que prosigue durante la maduración. La concentración no aumenta en las células que esperan su separación, y alcanza un valor en torno al 15% del peso seco de la levadura (Figura II.13-B).

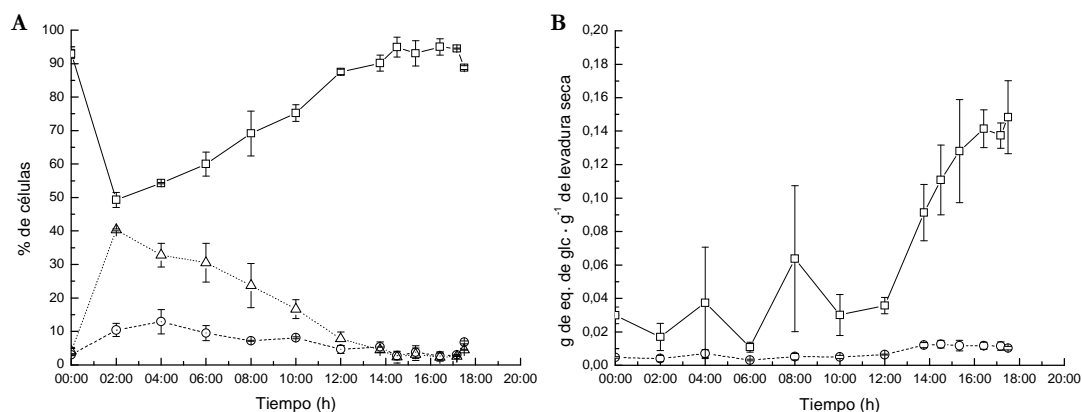


Figura II.13. Porcentajes de células en las distintas fases del ciclo celular: glucógeno (Δ y \blacktriangle) y trehalosa (\square y \blacksquare) (A) y acumulación de hidratos de carbono de reserva: trehalosa (\square) y glucógeno (\circ) (B). En todos los casos se representan la media y desviación estándar de fermentaciones normales.

Tabla II.6-. Cambios detectados en las producciones industriales de levaduras panaderas.

Tipos de producción	Cambios puntuales durante el cultivo	Cambios durante la maduración	Efectos
Masa seca, Alta actividad	<ul style="list-style-type: none"> • Aumento Temperatura (2° C) • Disminución Brix (1.5°) • Oscilación pH (1 unidad) • Producción etanol (0.1%) • Cambios cociente C/N (15%) 	Aumento del contenido en trehalosa 1.7 veces (14 a 24 % del peso seco)	Cambios en los parámetros de calidad de las levaduras
Masa seca, Actividad clásica	<ul style="list-style-type: none"> • Disminución Temperatura (1.5° C). • Aumento pH (1 unidad) • Producción etanol (0.25%) • Cambios cociente C/N (10%) 	Aumento del contenido en trehalosa 1.4 veces (16 a 23% del peso seco)	Sin cambios
Masa dulce	<ul style="list-style-type: none"> • Oscilación Temperatura (1°). • Oscilación pH (1 unidad) • Producción etanol (0.2%) 	15 % contenido en trehalosa de cultivos de referencia	Cambios en los parámetros de calidad

Discusión

1-. Comportamiento de las levaduras cultivadas en el laboratorio en medio MAB.

La escasez de trabajos relacionados con la fisiología de las levaduras en condiciones y/o medios industriales hace interesante su estudio. La composición química de las melazas es variable, representando el factor que mayor efecto tiene en la regularidad y calidad de la producción de biomasa. Las diferencias en la composición dependen fundamentalmente de las variedades de remolacha o caña de azúcar empleadas, la región donde fueron cultivadas y del método de extracción del azúcar de mesa empleado por la azucarera, lo que repercute en la calidad de la melaza como subproducto industrial (Burrows, 1979). La variabilidad en la composición de las melazas se han investigado principalmente en cuanto a hidratos de carbono (Hudson, 1910), aminoácidos (este capítulo; Kowkabany et al., 1953; Martínez-Force and Benítez, 1995) y la presencia de otras sustancias que pueden afectar al crecimiento de las levaduras (Trivedi et al., 1986; Evans, 1990; Attfield, 1997). De esta forma, cabe esperar que el comportamiento de una misma cepa pueda variar dependiendo de la melaza empleada como se ha comprobado en el presente capítulo (Figura II.1).

La selección ha permitido la obtención de cepas de levadura que presentan crecimientos rápidos en este tipo de medios en comparación con levaduras vínicas o cepas de laboratorio protótrofas (Jiménez and Benítez, 1986; Codón and Benítez, 1995). El mayor crecimiento de las levaduras de panadería en melazas se relaciona con una mayor actividad invertasa en diversas condiciones (represoras o no), lo que conlleva una hidrólisis rápida de la sacarosa. Sin embargo, la utilización tanto de glucosa como de fructosa se realiza de forma más lenta que la hidrólisis, lo que permite la acumulación de ambos azúcares en los cultivos tanto de V1 como de la cepa V3 (Figura II.3). A partir de las 15 h la concentración de hidratos de carbono en el medio es inferior al valor umbral descrito para la represión mediada por glucosa ($2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), por lo que se iniciarían tanto la respiración como la síntesis de trehalosa y glucógeno. No se detecta consumo de etanol, lo que podría indicar que el medio presenta un nutriente limitante para el crecimiento en condiciones respiratorias diferente a la fuente de carbono (ya sea oxígeno o una fuente de nitrógeno). En este sentido, se procedió a determinar las concentraciones de nitrógeno inorgánico y orgánico de fácil asimilación (aminoácidos). El amonio se agota antes de las 8 h en ambos medios, mientras que la concentración de los aminoácidos (incluidos los de peor asimilación) no presenta variaciones detectables a partir de las 14 h. Por tanto, todo parece

indicar que el nitrógeno puede actuar como uno de los factores limitantes en condiciones respiratorias. Sin embargo, una parada del metabolismo no podría explicar ni la reducción de las concentraciones internas de los aminoácidos que se ha detectado (Tablas II.4 y II. 5) ni la síntesis de los hidratos de carbono de reserva, por lo que parece más pausable que la respiración del etanol no se lleve a cabo por una defectuosa aireación del cultivo. En cuanto a la acumulación de trehalosa y glucógeno se produce de forma simultánea a partir de las 12 h, cuando el crecimiento celular comienza a ralentizarse y las principales fuentes de nitrógeno ya se han agotado. Sin embargo, la cinética de acumulación tanto de trehalosa como de glucógeno en cepas panaderas presenta diferencias con respecto a levaduras de laboratorio. Lo descrito en estas últimas es que la acumulación de glucógeno se inicia durante la fase exponencial tardía presentando la máxima concentración tras el cambio diaúxico. Durante toda esta fase y parte de la estacionaria la concentración de glucógeno es mayor que la de trehalosa. La inversión de ésta relación se produce por hidrólisis del glucógeno y acumulación constante de trehalosa durante el resto de la fase estacionaria (Lillie and Pringle, 1980; Francois et al., 1987; Parrou et al., 1999; Hazelwood et al., 2009). En el caso de las cepas panaderas la acumulación de trehalosa y glucógeno se inicia a la vez y la concentración de trehalosa siempre es mayor que la concentración de glucógeno. También existen diferencias significativas entre ambas cepas, especialmente en los perfiles de acumulación de trehalosa. La cepa V3 como ya se ha indicado se utiliza en la elaboración de masas dulces así que independientemente del condicionamiento fisiológico al que pueden someter a esta cepa en condiciones industriales, V3 debe de poseer como propiedad intrínseca la capacidad de resistir ambientes con mayor osmosis que la cepa V1, lo que se traduce en una mayor concentración de trehalosa cuando se cultivan en las mismas condiciones.

2-. Metabolismo de aminoácidos en medio MAB.

Como ya se indicó anteriormente distintos lotes de melaza de remolacha presentan diferencias en la composición de aminoácidos. Trabajos anteriores indicaban la ausencia de ciertos aminoácidos (histidina, metionina y fenilalanina), y niveles muy bajos de treonina y lisina en un lote de este tipo de melazas (Martínez-Force and Benítez, 1995). El resto de aminoácidos presentaban valores comparables, tanto la concentración de cada aminoácido como la concentración total ($2.1 \text{ g de aminoácidos} \cdot \text{L}^{-1}$), a las del medio YPD ($2.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Las melazas utilizadas en este trabajo presentan características comunes a las empleadas por

Martínez-Force y Benítez (1995); no se ha detectado la presencia de histidina, metionina, lisina, arginina, cisteína, glutamina y treonina (Tabla II.1). A pesar de las similitudes encontradas, las melazas utilizadas en este trabajo no presentan concentraciones específicas de aminoácidos ni concentraciones totales con valores cercanos a las melazas empleadas por Martínez-Force y Benítez (1995). La concentración total de aminoácidos en las melazas de este estudio se aproximan a un valor neto de $0.6 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, lo que supone una reducción de unas 3.3 veces. En este trabajo a lo largo del crecimiento de ambas cepas durante la fase exponencial, se detecta un aumento en las concentraciones externas tanto de alanina como de valina tras lo cual estos se incorporan al igual que el resto de los aminoácidos.

La composición relativa de los aminoácidos presenta variaciones a lo largo de las distintas fases de cultivo pero con una clara tendencia a la reducción de las concentraciones internas en términos absolutos (Figura II.8). Los principales aminoácidos tras 32 h de cultivo en medio MAB son glutámico (22%), lisina (20%), arginina (18%) y alanina (8.3%) para la cepa V1 y glutámico (41%) y alanina (14%) para la cepa V3. Cepas vínicas cultivadas en medio MAB hasta fase estacionaria tienen composiciones relativas similares (glutámico, 56% y alanina 7.7%) a la cepa V3. Aunque debido a la gran cantidad de factores ambientales que repercuten en la concentración interna de aminoácidos estas comparaciones han de realizarse con extrema cautela (Martínez-Force and Benítez, 1995).

3-. Cultivo de cepas panaderas en condiciones industriales.

En este estudio, las cinéticas de cultivo empleadas en las producciones de levadura analizadas en fábrica son de tipo b-c (Figura II.1), lo que permite una buena producción de biomasa. No obstante, las diferencias en la actividad fermentativa (clásica o alta) se consiguen mediante la velocidad de incorporación de los distintos nutrientes y por tanto con la variación en las relaciones entre ellos. En el caso de las levaduras de alta actividad la relación carbono-nitrógeno (C/N) aumenta de forma exponencial a lo largo del cultivo. Las levaduras de actividad clásica por el contrario mantienen la relación C/N constante a lo largo de la mayor parte del cultivo, produciéndose el aumento de esta relación al final del proceso. Otro de los factores que afectan a la actividad es la relación entre las dos fuentes de nitrógeno utilizadas, puesto que mantienen perfiles distintos y afectan a otros equilibrios como por ejemplo el de carbono-azufre. En general las levaduras de alta actividad son las que están en presencia de mayor cantidad de nutrientes, con diferencias de hasta un 10% en

células en G1 (la mayor proporción se da en actividad clásica). Esto puede explicar por qué las fermentaciones de alta actividad puedan presentar mayor grado de incidencias.

Levaduras para masa azucarada se producen a partir de una cepa distinta (V3) y se emplean condiciones de cultivo diferentes. El perfil C/N es similar al de una producción de actividad clásica, así como las relaciones entre las dos fuentes de nitrógeno utilizadas, aunque lo verdaderamente especial en este tipo de cultivo es la adición de grandes cantidades de sal a los fermentadores en determinados momentos de la fermentación.

Las concentraciones de trehalosa son similares en los tres tipos de producción. Estos valores oscilan entre un 12 y un 15% del peso seco cuando se trata de fermentaciones cuyo producto final cumplía con los criterios de calidad y un 22% en fermentaciones con un producto final con alteraciones. No se ha puesto de manifiesto en las levaduras para masa azucarada que la adición de sal provoque un aumento en la concentración de trehalosa, aunque se registró una alta variabilidad en los resultados. No obstante, medios con NaCl en concentraciones crecientes permiten la obtención de levaduras con mayor capacidad fermentativa en masa (Oda and Tonomura, 1993). El glucógeno incrementa su concentración al final del cultivo alcanzando valores cercanos al 5% o inferiores al 1% del peso seco de la levadura, dependiendo del tipo de cultivo. En todos los casos el almacenamiento de las reservas de carbono se produce al reducirse el suministro de melaza.

Desde su recogida tras el cultivo hasta su adición a las masas panarias secas o dulces, la levadura está sometida a distintas condiciones de estrés que pueden alterar su comportamiento posterior, alterando la actividad fermentativa en la masa, bien porque estas condiciones sean extremas o porque el estado metabólico final de la levadura no sea exactamente el mismo (Atkfield, 1997). Una caída en capacidad fermentativa puede responder, por ejemplo, a una disminución de la viabilidad de las células debida a procesos como la autólisis entre otros. La autólisis permite la degradación parcial de componentes de la célula y la obtención de energía. En los estadios iniciales se produce la hidrólisis de las principales reservas de carbono, posteriormente se inicia la degradación de ácidos nucleicos, aminoácidos y proteínas no necesarias, así como la autofagia de orgánulos, tras lo cual se produce la muerte celular (He and Klionsky, 2009; Nakatogawa et al., 2009). La autólisis se desencadena principalmente por hambre de nutrientes, pero factores como el pH o la temperatura pueden modular el grado de respuesta (Vosti and Joslyn, 1954).

También se ha descrito que la producción de especies reactivas del oxígeno o la acumulación de proteínas sin plegar pueden desencadenar la autofagia específica de orgánulos como la mitocondria o el retículo endoplasmático, respectivamente (He and Klionsky, 2009; Nakatogawa et al., 2009). Mientras que la autólisis controlada no es un proceso perjudicial, más bien es esencial para que las levaduras mantengan la viabilidad durante largos periodos de tiempo, en condiciones industriales habría que profundizar en que factores pueden potenciar o no éste y otro tipo de respuestas.

En este trabajo, se han analizado las variaciones de parámetros externos durante el cultivo de levaduras, partiendo de muestras de cultivos que posteriormente cumplieron los criterios de calidad exigidos y comparándolos con muestras de cultivos con alteraciones en estos requisitos. En el segundo caso, parece que alteraciones en algún parámetro durante el cultivo, por lo tanto anteriores a la refrigeración y al prensado, como el pH cambios en el cociente C/N o variaciones en la temperatura, “predisponen” a las levaduras a establecerse en un estado metabólico diferente al considerado idóneo, con alteraciones posteriores en características diversas. Estas alteraciones podrían provocarlas el hecho de que las células no hayan madurado lo suficiente y no hayan alcanzado la concentración óptima de trehalosa de alrededor del 12-15%. Concentraciones de 20-22% de trehalosa se observan en fermentaciones con cambios en algún parámetro y que dieron lugar a productos finales con alteraciones en los criterios de calidad exigidos. Por tanto, un seguimiento de la concentración de trehalosa al finalizar la fermentación puede ser un buen indicador del estado metabólico de la levadura, de manera que valores de alrededor del 15% garantizan la calidad del producto final mientras que valores que se alejen de este óptimo son indicativos de variaciones en el estado metabólico de las células que se reflejan luego en cambios en su comportamiento durante el almacenamiento o la fermentación de masa panaria.

Capítulo III:

**Incremento de las propiedades organolépticas de productos panarios
mediante el uso de levaduras resistentes a p-Fluoro-DL-fenilalanina**

Introducción

1- Biosíntesis de aminoácidos en levaduras.

Las levaduras son capaces de sintetizar los 20 aminoácidos constituyentes de proteínas a partir de amonio como fuente de nitrógeno inorgánico. Además del amonio las levaduras presentan preferencia por fuentes de nitrógeno de origen orgánico como la glutamina. Dependiendo del fondo genético, las cepas pueden presentar mayor afinidad por una u otra fuente, así como por ambas (Zaman et al., 2008). La biosíntesis de aminoácidos se realiza únicamente cuando éstos no están presentes en el medio de cultivo. Además se requiere que las principales rutas catabólicas de hidratos de carbono sean funcionales, ya que la biosíntesis de aminoácidos se nutre de intermediarios metabólicos de estas rutas. La biosíntesis requiere por tanto de dos procesos diferentes, por un lado que las levaduras asimilen amonio y por otro que lo incorporen a esqueletos carbonados procedentes de la

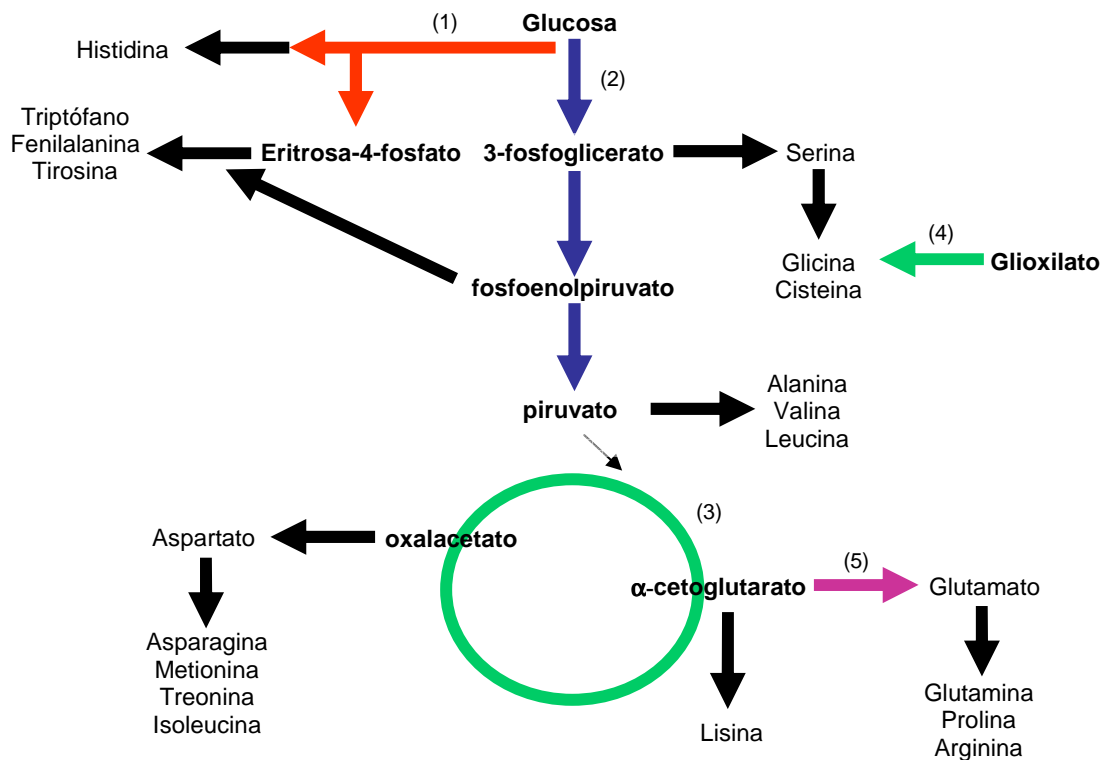


Figura III.1. Biosíntesis de aminoácidos en levaduras. En trazado rojo se muestran reacciones que implican la vía de las pentosas fosfatos (1), en azul reacciones de la glucólisis (2) y en verde rutas del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (3) o del ciclo del glioxilato (4). En morado se muestra la única entrada de amonio a esqueleto carbonado (5), en el resto de reacciones de transaminación se utilizan grupos amino de otros aminoácidos. Adaptado de Lehninger et al., 1993.

glucólisis, del ciclo de las pentosas fosfato, del ciclo de Krebs o del ciclo del glioxilato, mediante diferentes enzimas transaminasas. Esto permite una clasificación de los aminoácidos según sus precursores (Figura III.1; Lehninger et al., 1993). En levaduras la lisina tiene como particularidad que se sintetiza a partir de α -cetoglutarato en vez de oxalacetato (Bhattacharjee, 1983; Gasent-Ramírez and Benítez, 1997).

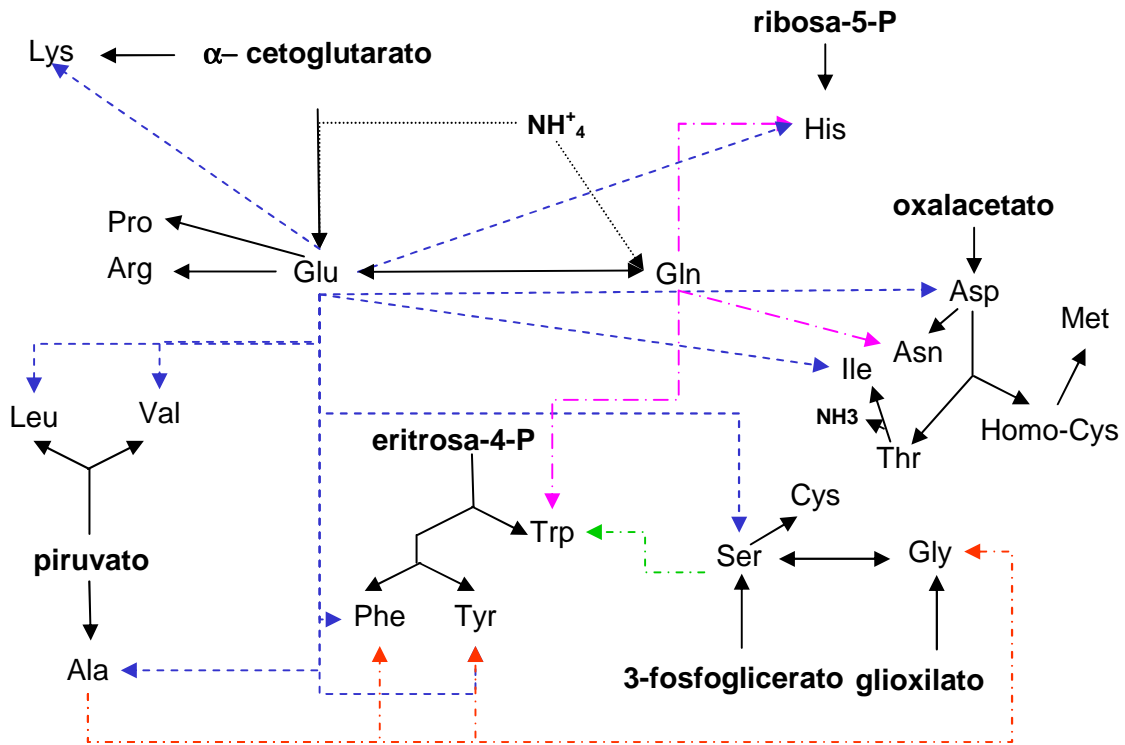


Figura III.2. Transferencia de grupos aminos entre las distintas rutas de biosíntesis de aminoácidos. Las líneas azules indican transaminación a partir de glutamato, las moradas a partir de glutamina, las rojas a partir de alanina y la verde a partir de serina. Los aminoácidos han sido agrupados según las familias biosintéticas, y las flechas que interconectan los precursores con los distintos aminoácidos son representaciones simplificadas de las distintas reacciones.

La incorporación del nitrógeno inorgánico en forma de amoníaco/amonio se realiza a dos niveles: por un lado las enzimas Gdh1p y Gdh2p (glutamato deshidrogenasa I y II, respectivamente), incorporan amonio al α -cetoglutarato lo que genera glutamato; por otro, Gln1p (glutamina sintetasa) añade otro amonio al glutamato para generar glutamina. La transferencia de los grupos aminos a otros esqueletos carbonados genera el resto de los aminoácidos que la levadura sintetiza. El principal donador de grupos aminos es el glutámico aunque la glutamina, la alanina y la serina son necesarios para la síntesis de ciertos aminoácidos, lo que permite que las rutas de síntesis estén interconectadas unas con otras (Figura III.2).

2-. Biosíntesis y control de los aminoácidos aromáticos

La ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos es de las más complejas, no sólo por la gran cantidad de pasos (Figura III.3) y niveles de regulación que presenta, sino que además es una de las rutas de síntesis de aminoácidos con mayor gasto energético. Por ejemplo, para la síntesis de 1 mol de triptófano se necesitan 78 moles de ATP, mientras que para la síntesis de 1 mol de fenilalanina o tirosina son necesarios 65 y 62 moles de ATP respectivamente. El resto de aminoácidos presenta un gasto medio de unos 30 moles de ATP por mol de aminoácido sintetizado (Braus, 1991).

La ruta de biosíntesis de aminoácidos aromáticos (Figura III.3) tiene como

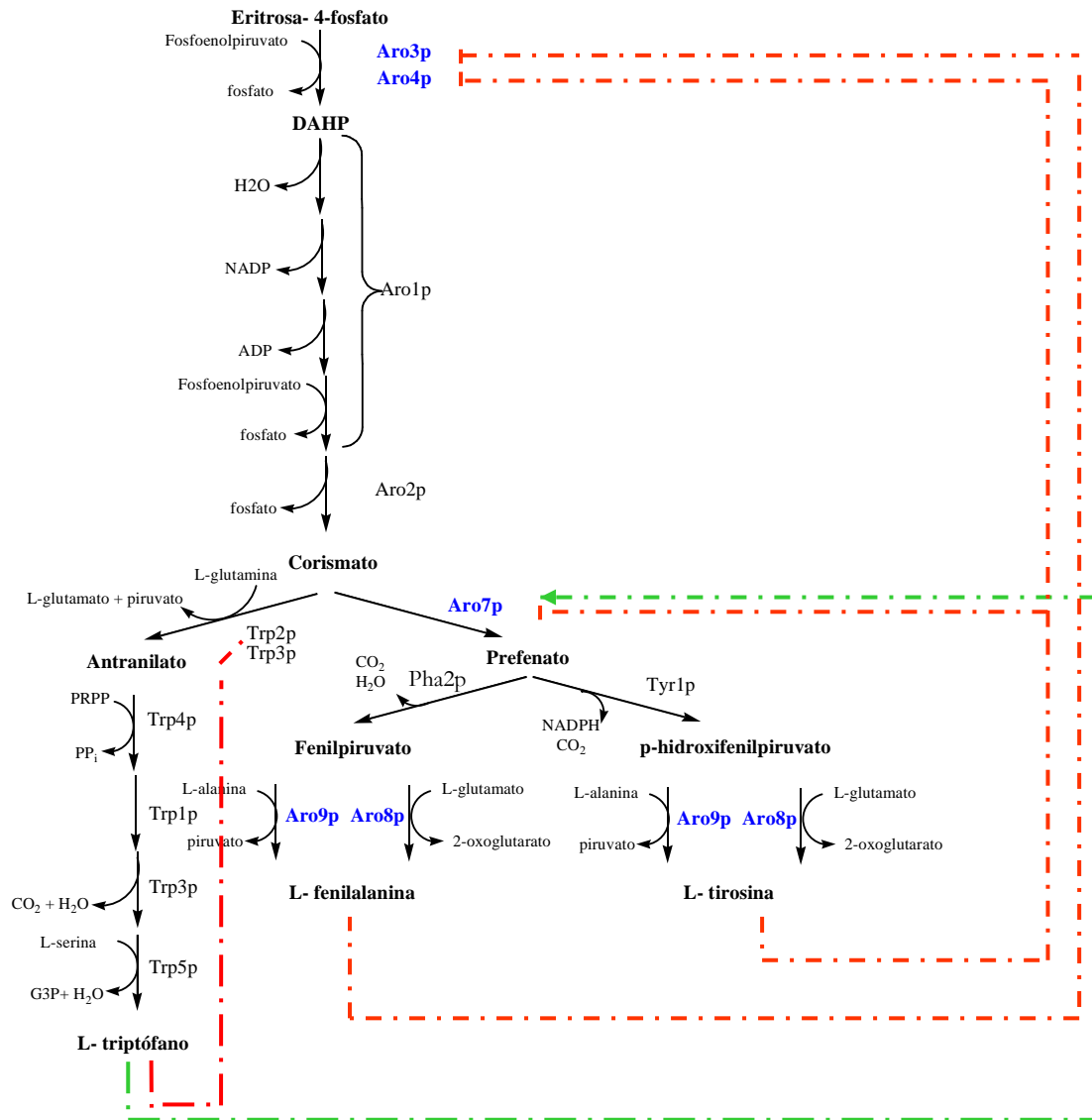


Figura III.3. Ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos. Se indica con línea roja inhibición por producto final, mientras que en verde se indica activación.

precursores la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato. El primero es un carbohidrato de cuatro átomos de carbono, intermediario de la ruta de las pentosas fosfato, mientras que el fosfoenolpiruvato es un intermediario de la glucólisis. La primera reacción se lleva a cabo por dos isoenzimas, Aro3p y Aro4p, que catalizan la síntesis de 3-desoxi-D-arabinoheptusonato-7-fosfato (DAHP). Esta es una de las reacciones claves, ya que ambas enzimas presentan retroinhibición por producto final. Aro3p se inhibe por altas concentraciones de fenilalanina, mientras que Aro4p lo hace con tirosina. En otros organismos como *Escherichia coli* o *Neurospora crassa*, existe una tercera isoenzima que presenta inhibición por triptófano, pero en levaduras no se ha descrito (Braus, 1991). En cepas de laboratorio, la enzima Aro3p purificada presenta inhibición tanto por tirosina como por triptófano, aunque las concentraciones necesarias son mucho más altas que las de fenilalanina (mientras que una concentración de 0.1 mM de fenilalanina es suficiente para reducir a cero la actividad de Aro3p, se necesitan concentraciones de 1 mM de tirosina ó 0.5 mM de triptófano para reducir la actividad a la mitad; ó 1 mM de triptófano para reducirla 4 veces). Aro4p también presenta este fenómeno de inhibición cruzada; con 0.1 mM de tirosina se produce la inhibición total de la actividad, mientras que la presencia de 0.5 mM de fenilalanina ó 0.1 mM de triptófano la reducen a la mitad y la adición de 1mM de triptófano genera una reducción de unas 6 veces (Helmstaedt et al., 2005). A continuación el DAHP se modifica hasta sintetizar corismato, que es el último intermediario común a todos los aminoácidos aromáticos. Las reacciones las llevan a cabo dos enzimas, Aro1p y Aro2p. Aro1p es una enzima que posee cinco actividades diferentes en la misma cadena polipeptídica. Las distintas actividades se localizan en módulos conectados por pequeñas secuencias de aminoácidos (Braus, 1991). Esta enzima provoca el ciclado del DHAP, su deshidratación, reducción y fosforilación sintetizando shikimato-3-fosfato, lo que conlleva un gasto de energía y poder reductor. La quinta actividad realizada por Aro1p es la de condensar una molécula de fosfoenolpiruvato y una de shikimato-3-fosfato, lo que genera 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato. Todas estas reacciones dan lugar a un heterociclo en la molécula que llegará a formar en reacciones posteriores el anillo aromático característico de estos aminoácidos. Aro2p se encarga de la eliminación de un grupo fosfato y de la introducción del segundo doble enlace en el anillo. El producto formado se conoce con el nombre común de corismato que se metabolizará por alguna de

las dos ramas que se bifurcan en este punto. Una de las ramas deriva hacia la biosíntesis de triptófano mientras que la otra forma fenilalanina ó tirosina (Braus, 1991).

En la ruta de síntesis de triptófano, se produce la primera transaminación a esqueleto carbonado. Para ello se utiliza glutamina como donador de grupos aminos y se produce la eliminación del radical enolpiruvil del corismato, catalizado por las enzimas Trp2p, que presenta inhibición por triptófano, y Trp3p. Como consecuencia de estas reacciones se forma el anillo aromático típico de este tipo de aminoácidos. No obstante, el triptófano presenta un heterociclo, para lo cual se realizan cuatro reacciones a partir de antranilato. En el último paso se produce la condensación de serina con el compuesto formado a partir de las cuatro reacciones anteriores, dando lugar al triptófano (Braus, 1991; Krappmann et al., 2000).

En el caso de la síntesis de fenilalanina y tirosina, el corismato se metaboliza a preferato. Esta reacción, consistente en la redistribución del radical enolpiruvil en otro carbono, sólo se da en microorganismos y plantas, no habiéndose descrito en animales (Braus, 1991) y se realiza mediante la acción de Aro7p, que tiene actividad mutasa. Esta enzima presenta inhibición por tirosina, y una fuerte activación por triptófano (Krappmann et al., 2000), lo que permite redirigir la ruta en caso de exceso del mismo. A continuación la ruta vuelve a bifurcarse. Sí el preferato se metaboliza a través de Tyr1p, se producirá su descarboxilación y deshidrogenación generando p-hidroxifenilpiruvato, mientras que sí se metaboliza por Pha2p se producirá su descarboxilación y deshidratación, lo que genera fenilpiruvato (Braus, 1991). La principal transaminasa de ambos compuestos es Aro8p, que utiliza principalmente el glutámico como donador de grupo amino. Existe una segunda transaminasa, Aro9p, que presenta regulación transcripcional (Iraqi et al., 1998). Su expresión se induce por la presencia de aminoácidos aromáticos en el medio y se reprime por la presencia de amonio, lo que se interpreta como que esta enzima juega un papel en la degradación más que en la síntesis de dichos aminoácidos aromáticos. Ambas transaminasas pueden utilizar distintos donadores y aceptores del grupo amino, presentando además distinto grado de afinidad. In vitro, Aro8p utiliza como donadores aminoácidos aromáticos, α -aminoadipato, metionina y leucina; siendo los aceptores hidroxifenilpiruvato, 2-oxoglutarato y piruvato; Aro9p puede transferir el grupo amino desde aminoácidos aromáticos, metionina, leucina, y glutamina hasta sus correspondientes

oxoácidos habiéndose descrito también la transferencia a piruvato (Kradolfer et al., 1982; Iraqui et al., 1998; Urrestarazu et al., 1998).

3-. Síntesis de alcoholes de fusel.

Los aminoácidos pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno, lo que genera una serie de compuestos conocidos como aceites o alcoholes de fusel, que a bajas concentraciones contribuyen a generar productos fermentados de alta calidad sensorial. Por otra parte, un incremento excesivo en las concentraciones de los mismos genera sabores (retrogustos) y aromas poco deseados. La producción de estos alcoholes se realiza mediante la ruta Ehrlich. Los principales aminoácidos metabolizados son leucina, valina, isoleucina, metionina y los aminoácidos aromáticos, lo que genera alcoholes secundarios como alcohol isoamílico (3-metilbutanol), isobutanol (2-metilpropanol), 2-metilbutanol, metionol, 2-feniletanol, tirosol y triptofol, respectivamente (Dickinson et al., 1997; Dickinson et al., 1998; Dickinson et al., 2003; Hazelwood et al., 2008).

La ruta Ehrlich consiste en la transaminación del aminoácido, formando un α -cetoácido, que posteriormente se descarboxila. El aldehído formado se oxida o reduce dependiendo de las condiciones de cultivo, formándose el ácido o el alcohol superior correspondiente. Una característica de la ruta es la presencia de una gran cantidad de isoenzimas capaces de catalizar cada uno de los pasos de la ruta. En total se han descrito 4 transaminasas, 4 descarboxilasas, 16 oxidasas y 6 reductasas (Figura III.4-A). El catabolismo de la fenilalanina se ajusta a la ruta Ehrlich (Figura III.4-B). La desaminación la realizan Aro8p ó Aro9p, siendo los principales aceptores del nitrógeno el α -cetoglutarato o el piruvato, respectivamente (Kradolfer et al., 1982), lo que genera 3-fenilpirúvico, que posteriormente se descarboxila formando 2-fenilacetaldehído. Esta reacción la lleva a cabo principalmente Aro10p, aunque también pueden estar implicadas Pdc1p, Pdc5p y Pdc6p. Un mutante con estas cuatro descarboxilasas interrumpidas pierde la capacidad de sintetizar 2-feniletanol (Vuralhan et al., 2003). Por reducción del grupo cetónico, parte del 3-fenilpiruvato puede formar 3-fenil-lactato, aunque no se ha determinado cuál es la enzima responsable (Dickinson et al., 2003). Dependiendo del estado redox, y por tanto del grado de aireación del cultivo, se produce o bien la oxidación del aldehído lo que genera 2-fenilacetato o bien su reducción lo que forma 2-feniletanol. Como responsables de esta actividad se han identificado las enzimas aldehído deshidrogenasas o las alcohol deshidrogenasas, respectivamente (Vuralhan et al., 2003).

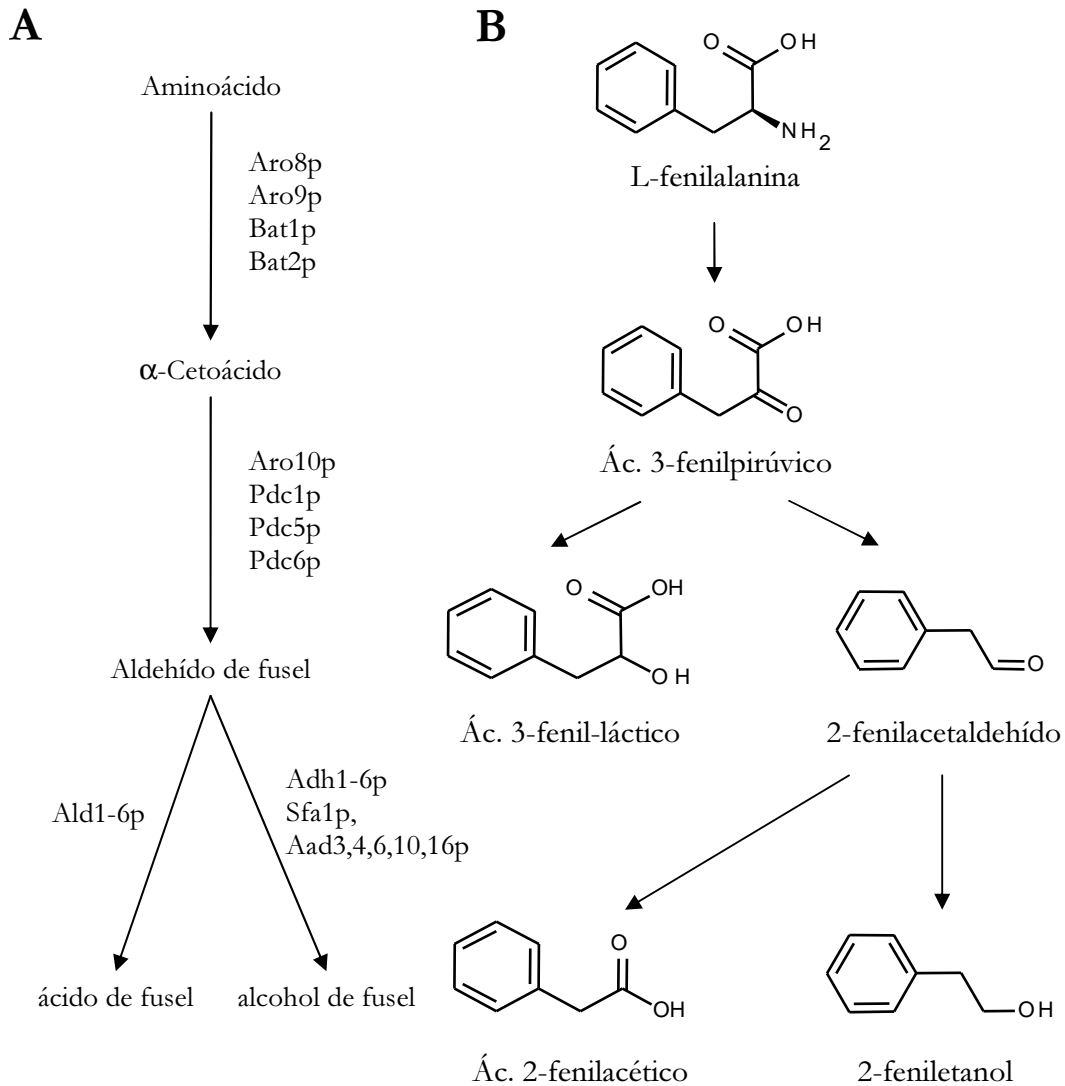


Figura III.4. Esquema general de la síntesis de alcoholes de fusel (A) y ruta de síntesis de 2-feniletanol en levaduras (B).

4-. Control transcripcional de la biosíntesis y el catabolismo de los aminoácidos aromáticos.

El control de la biosíntesis tiene lugar mediante dos mecanismos. Por un lado una regulación postraduccional de las diferentes actividades enzimáticas, como se indicó en puntos anteriores; por el otro, una regulación a nivel transcripcional de los genes que codifican tanto los transportadores como las enzimas implicadas en los diferentes pasos de las rutas.

En ausencia de aminoácidos en el medio, se produce la activación del control general de la biosíntesis, a través del activador transcripcional Gcn4p. El control sobre

GCN4 va desde la regulación transcripcional hasta la traduccional. Se desconoce cómo tiene lugar el control de la activación transcripcional pero en condiciones prolongadas de hambre de aminoácidos su expresión se incrementa hasta 2 veces. La regulación traduccional se realiza mediante 4 uORFs, que están presentes en el 5' UTR del transcrito de *GCN4*. Estas tienen un carácter inhibitorio de la traducción, especialmente las uORFs 3 y 4 (las más próximas al inicio real de traducción de *GCN4*), mientras que la uORF1 está implicada como un elemento regulador positivo de la traducción. La concentración de aminoácidos se controla desde el interior de la célula, siendo los ARNt vacíos los que disparan la señal.

La iniciación de la traducción requiere la unión de eIF2-GTP (factor de iniciación de la traducción) al ARNt^{Met}. Este complejo ternario (las subunidades α , β , γ de eIF2 y el ARNt) recluta a la subunidad 40S del ribosoma, lo que genera la subunidad 43S. Esta subunidad se encarga de unirse a la caperuza del ARNm (subunidad 48S) tras lo cual se produce la búsqueda del codón AUG. Cuando el ARNt^{Met} interacciona con el codón de iniciación, se produce la hidrólisis del GTP a GDP, liberándose del complejo y permitiendo el acople de la subunidad 60S del ribosoma, lo que da lugar a la formación del complejo 80S capaz de iniciar la síntesis de proteínas. Para que se vuelva a iniciar la traducción, es necesario que se recicle el GDP de eIF2, lo que realiza eIF2B. Si se presenta un déficit en cualquier ARNt cargado, se dispara una señal mediada por la quinasa Gcn2p que fosforila la subunidad α de eIF2. Esto provoca la inhibición de eIF2B y por tanto imposibilita la formación del complejo ternario de iniciación de la traducción, lo que da lugar a un incremento en la traducción del transcrito de *GCN4* (Hinnebusch, 2005; Zaman et al., 2008).

Gcn4p controla la expresión de los genes *ARO1*, *ARO2*, *ARO3*, *ARO4*, *ARO8*, *TRP2*, *TRP3*, *TRP4* y *TRP5*, mientras que *ARO7*, *TRP1*, *TYR1* y *PHA2* no se regulan. Genes implicados en la degradación de los aminoácidos aromáticos como *ARO9* y *ARO10*, presentan una fuerte inducción en mutantes *gcn4Δ* (Braus, 1991; Natarajan et al., 2001). No obstante, *ARO9* y *ARO10* se inducen además en presencia de cualquiera de los tres aminoácidos, por un activador transcripcional específico y esencial, Aro80p (Iraqi et al., 1998).

5-. Uso de análogos tóxicos para la obtención de superproductores de aminoácidos.

Se han utilizado análogos no funcionales de aminoácidos para la obtención de mutantes espontáneos o inducidos capaces de acumular altas cantidades del aminoácido fisiológico (Fukuda et al., 1991a; Fukuda et al., 1991b; Martínez-Force and Benítez, 1992; Ramos and Calderón, 1992; Gasent-Ramírez and Benítez, 1997).

La toxicidad de estos análogos viene dada por su incorporación a las cadenas polipeptídicas, lo que provoca la falta de funcionalidad de la proteína. La resistencia a este tipo de drogas se puede adquirir mediante tres mecanismos: mutantes en permeasas de aminoácidos por lo que no son capaces de incorporarlas, mutantes capaces de detoxificar el análogo desviándolos a compuestos que no son incorporados a proteínas y mutantes superproductores que diluyen la concentración del tóxico por aumento de la concentración del aminoácido mimetizado.

Para la búsqueda de superproductores de L-fenilalanina se pueden utilizar dos análogos, o-fluoro-DL-fenilalanina (OFP) ó p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP). Con el primero se han aislado mutantes capaces de incrementar la concentración de tirosina, aunque la concentración de fenilalanina también aumenta. El uso del segundo, por el contrario, parece seleccionar mutantes que presentan incrementos en la concentración tanto de triptófano como de fenilalanina. Ambos tipos de mutantes presentan además una alta producción de 2-feniletanol (Fukuda et al., 1991a; Fukuda et al., 1991b). En ambos tipos de mutantes se han identificado los genes responsables de la resistencia; en el caso del OFP, la mutación fue localizada en *ARO4*, dando lugar a la insensibilidad a la retroalimentación negativa de la tirosina que se produce en *Aro4p*. Por el contrario, el gen responsable de la resistencia a PFP resultó ser *TYR1*, observándose en los mutantes un descenso en la actividad de *Tyr1p* y un incremento en las actividad DHAP sintasa (*Aro3p* ó *Aro4p*), lo que sugiere un pérdida de la regulación por producto final (Fukuda et al., 1991a; Fukuda et al., 1991b). Trabajos posteriores han permitido el uso del alelo *ARO4*-OFP como gen de selección por resistencia a PFP, de fenotipo dominante (Cebollero and González, 2004).

Dada la regulación compleja que presenta la ruta de síntesis de aminoácidos aromáticos en este trabajo se ha procedido a la selección de mutantes espontáneos que presenten resistencia a PFP. El objetivo es la obtención de variantes que puedan incrementar las propiedades organolépticas y/o nutritivas de productos de panadería. Al tratarse de mutantes espontáneos y no de organismos modificados genéticamente, presentan aplicabilidad industrial inmediata.

Resultados

1.- Obtención de mutantes resistentes a PFP mediante cultivo discontinuo.

La cepa V1 se sometió a un proceso de selección de mutantes superproductores de aminoácidos aromáticos mediante el aislamiento de clones capaces de crecer en presencia de p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP), análogo tóxico de la L-fenilalanina (Fukuda et al., 1991a). El proceso de selección se realizó en medio SDP suplementado con dicho análogo. Cuando el cultivo entraba en fase estacionaria, se procedía a la reinoculación de parte del mismo en medio fresco al cual se le añadía el análogo tóxico a una concentración mayor a la anterior. Tras cada incremento en la concentración del análogo tóxico, se sembraba una alícuota del cultivo en cajas de SDP agar con la misma cantidad de PFP que el cultivo del que procedía. La concentración mínima a la que la cepa V1 es capaz de crecer es de 5 μM , mientras que la concentración máxima alcanzada durante el crecimiento de los mutantes fue de 900 μM . De esta forma se aislaron un total de 8 mutantes resistentes.

2.- Determinación del contenido interno en aminoácidos.

A los mutantes resistentes y a la cepa parental creciendo hasta fase exponencial en medio SD, se les determinó el contenido interno de aminoácidos, mediante HPLC.

No todos los derivados de V1 seleccionados presentaron incrementos significativos en el contenido interno de L-fenilalanina (Tabla III.1). Los derivados V500, V900, V8.2, V10.5 y V10.12 presentaron aumentos de entre 2 y 6.5 veces respecto a la cepa parental. Además se observaron variaciones en la concentración de otros aminoácidos. En el derivado V500, la concentración de lisina se redujo en 1.5 veces mientras que aumentó la de arginina, 1.9, y la de alanina, 1.6. En V900, también se observó una disminución de 1.5 veces en la concentración de lisina y un aumento de 2 veces las concentraciones de arginina, alanina, y tirosina. En V8.2 y V10.5, se redujo la concentración de serina mientras que se observó un incremento de 2.5 veces en la concentración de arginina. En V10.12, también se observó una reducción en serina, 1.9, además de glutámico, 1.65 y de alanina 1.5, mientras que se detectó un incremento de hasta 2 veces en la concentración de arginina.

Tabla III.1-. Concentración interna de aminoácidos de la cepa V1 y de los distintos derivados obtenidos tras el proceso de selección. La concentración se indica en nanomoles del aminoácido por microgramos de proteínas. Se representan valores medios de tres experimentos independientes con desviación estándar.

Aminoácido	V1	V20	V100	V200	V500	V900	V8.2	V10.5	V10.12
Aspártico	2.02±0.99	2.05±0.19	1.44±0.46	2.31±0.39	2.62±0.18	2.82±1.17	2.28±0.16	2.34±0.81	1.83±0.82
Serina	5.72±0.88	5.37±0.94	4.21±2.40	7.16±0.04	5.23±0.31	4.22±0.07	3.38±0.01	3.91±0.70	3.00±0.85
Glutámico	39.05±4.72	40.94±10.7	31.69±4.19	48.45±4.20	31.76±5.62	32.88±1.1	31.70±5.17	33.02±4.89	23.69±4.01
Glicina	6.35±2.43	5.82±0.21	4.46±2.16	6.44±0.80	4.72±0.29	5.00±0.72	3.60±0.30	4.19±0.32	3.64±1.20
Arginina	20.64±4.63	18.59±1.59	15.86±12.9	21.15±2.01	35.67±3.02	47.57±3.94	51.26±2.83	57.09±9.23	39.90±5.99
Treonina	24.83±7.68	24.74±13.3	15.24±4.05	21.04±6.96	16.72±10.6	13.85±7.16	12.73±7.17	13.57±6.18	16.43±5.35
Alanina	14.71±2.84	15.39±4.73	13.82±4.93	20.79±0.92	24.03±2.69	28.79±0.45	13.98±1.82	15.14±1.52	9.75±0.24
Prolina	2.62±2.46	1.93±1.05	1.85±1.70	2.64±1.69	2.01±1.24	1.15±0.43	1.42±0.5	1.32±0.87	0.59±0.14
Tirosina	0.21±0.06	0.21±0.16	0.14±0.04	0.27±0.17	0.35±0.25	0.54±0.21	0.14±0.10	0.20±0.09	0.20±0.03
Valina	5.00±2.21	4.86±0.19	3.84±3.19	7.24±1.35	6.57±0.51	7.74±0.73	3.59±0.77	4.23±1.32	2.79±0.66
Metionina	1.67±0.64	1.60±0.10	1.29±0.92	2.00±0.43	1.51±0.05	1.35±0.16	0.86±0.02	1.08±0.31	0.75±0.19
Lisina	3.55±0.77	3.84±0.65	3.06±1.70	5.46±0.00	2.20±0.17	2.36±0.20	4.57±0.12	5.33±0.68	4.19±1.09
Isoleucina	1.34±0.28	1.32±0.24	0.99±0.58	1.81±0.13	1.55±0.20	1.64±0.01	0.96±0.01	1.15±0.18	0.86±0.20
Leucina	1.19±0.30	1.21±0.23	0.88±0.46	1.53±0.06	1.63±0.19	1.75±0.06	1.09±0.03	1.34±0.20	0.97±0.18
Fenilalanina	0.56±0.11	0.51±0.12	0.44±0.18	0.71±0.07	0.95±0.14	3.55±0.19	2.11±0.21	2.56±0.45	2.27±0.97

3-. Resistencia a congelación

Se ha descrito que un aumento en la concentración de aminoácidos cargados, como la arginina, provocan un incremento en la resistencia a congelación-descongelación en levaduras panaderas (Shima et al., 2003). Dados los incrementos en la concentración interna de arginina observados en los mutantes resistentes a PFP se procedió a determinar, si V8.2, V10.5, V10.12 y V900 presentaban un incremento en la resistencia a congelación-descongelación y a periodos prolongados de congelación (Materiales y Métodos)

Todas las cepas fueron cultivadas en SD, recogiéndose las células tanto en fase exponencial como en fase estacionaria. Tras determinar la viabilidad (número de células formadoras de colonias), se procedió a congelar las células en agua destilada. Cada 24 h se descongelaron, y se sembraron alícuotas en YPD sólido, tras lo cual se volvían a congelar (Figura III.5 A y B). V8.2 y V900 presentan diferencias significativas con respecto a la cepa parental, tanto en las células recogidas en fase exponencial, (Figura III.5-A) como en fase

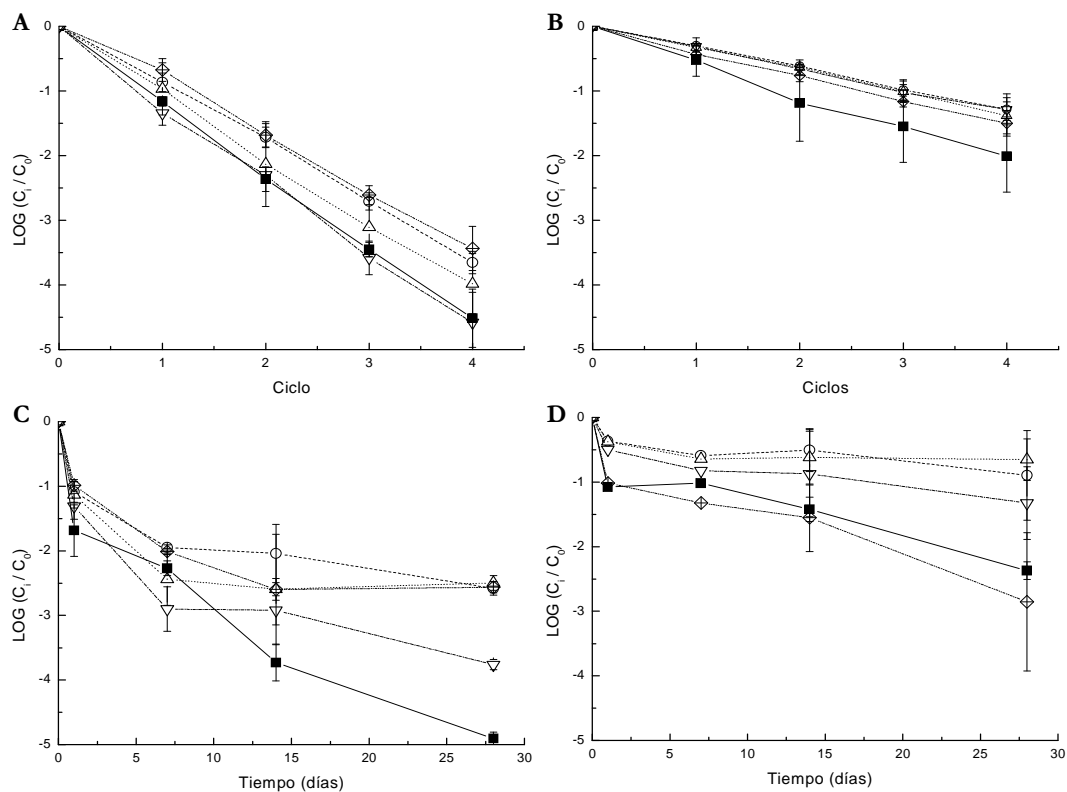


Figura III.5 -. Resistencia a congelación y descongelación en fase exponencial (A); y en fase estacionaria (B), así como resistencia a periodos de congelación en fase exponencial (C) y fase estacionaria (D). Se representa el logaritmo decimal del cociente entre las unidades formadoras de colonias tras la congelación a distintos tiempos (C_i) y las unidades formadoras de colonias antes de congelar las células (C_0). V1 (■); V8.2 (○); V10.5 (△); V10.12 (▽) y V900 (◇). Se representan resultados medios de dos experimentos independientes con desviación estándar.

estacionaria (Figura III.5-B), aunque las diferencias son mayores en fase exponencial.

Además de someterlas a ciclos de congelación y descongelación, alicuotas de células se mantuvieron durante largos periodos de congelación (Figura III.5 C y D). En general se observa un incremento en la supervivencia de todos los mutantes recogidos en fase exponencial y mantenidos un máximo de 28 días a -20° C. Las diferencias entre los mutantes y el silvestre recogidos en fase estacionaria no son tan marcadas.

4-. Búsqueda de la mutación que confiere resistencia a p-fluoro-DL-fenilalanina.

Se llevó a cabo la amplificación y secuenciación de los genes *ARO3* y *ARO4* a partir de ADN genómico, de la cepa parental y de los mutantes V8.2 y V900 amplificando la ORF con los cebadores *aro3u.in*, *aro3l.in*, *aro4u.in* y *aro4l.in* (Materiales y Métodos). No se constató ninguna indeterminación en las secuencias de ambas cadenas que sugiriera la aparición de mutaciones en alguno de estos dos genes y que explicara la resistencia al análogo tóxico (secuencias no mostradas).

Se procedió entonces al cultivo de los mutantes y la cepa parental en SDP con la adición de concentraciones crecientes del análogo tóxico más una concentración fija (1 mM) de distintos aminoácidos aromáticos (Figura III.6). La resistencia al tóxico de los mutantes se ve incrementada hasta en 3 órdenes de magnitud, de forma general. La adición de cualquier aminoácido aromático permite a la cepa parental aumentar su resistencia al análogo, siendo la adición de fenilalanina la que presenta un mayor efecto. En los mutantes

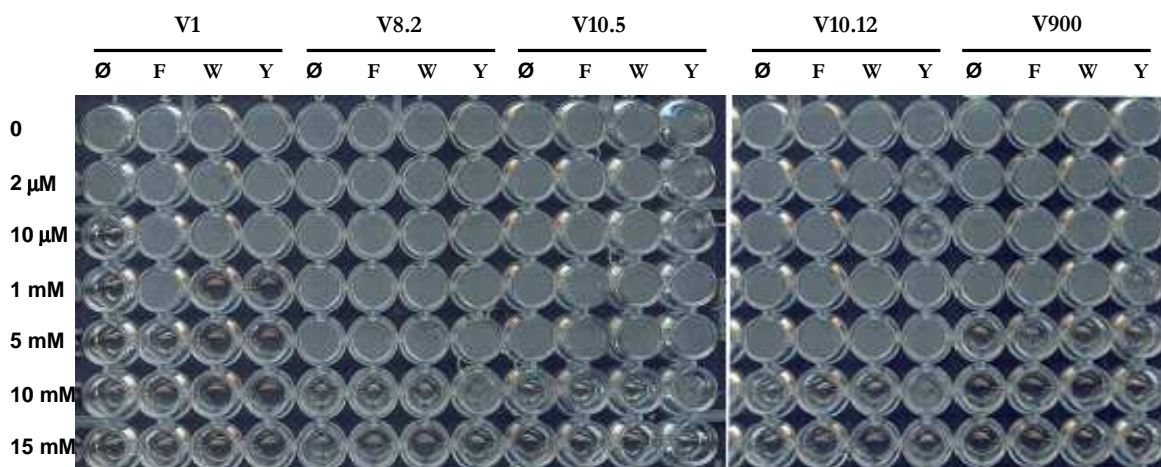


Figura III.6. Resistencia de las cepas a distintas concentraciones de PFP (0 -10 mM) en ausencia, Ø ó presencia de 1 mM de L-fenilalanina, F; L-triptófano, W; y L-tirosina, Y. Resultado representativo de dos experimentos independientes.

V8.2, V10.5 y V10.12, sólo la adición de tirosina tiene un efecto en la resistencia al tóxico. El mutante V900, no presenta un incremento de la resistencia en presencia de ninguno de los aminoácidos ensayados.

5-. Caracterización fisiológica en condiciones semi-industriales.

5.1-. Crecimiento.

Se procedió al cultivo en medio MAB de los cuatro mutantes que presentaban mayor concentración de fenilalanina en medio SD (Figura III.7-A).

Los mutantes superproductores de L-fenilalanina presentan como valor medio un descenso en la tasa de crecimiento en MAB de un 8%. Las diferencias se estabilizan al entrar en fase de diauxia-estacionaria. V8.2, V10.5 y V10.12 mantienen una reducción de entre un 20-25%, mientras que en V900 esta reducción oscila entre el 10% y el 15% de los valores de DO alcanzados por la cepa parental.

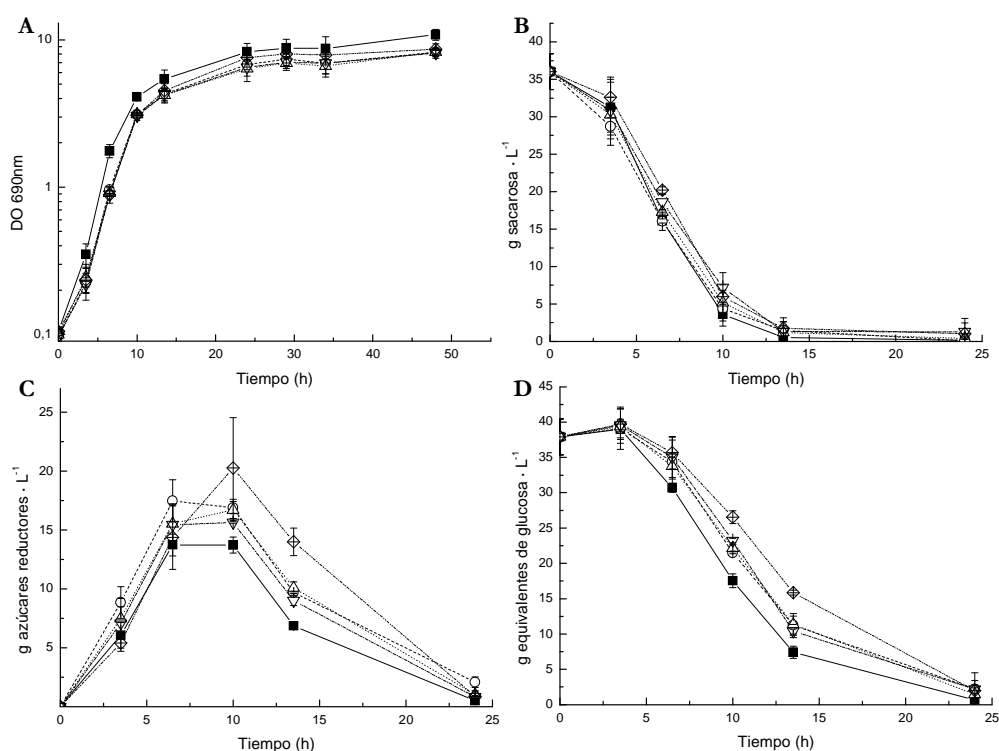


Figura III.7. Curva de crecimiento en medio MAB (A); consumo de sacarosa (B); producción y consumo de azúcares reductores (C); y consumo total de carbohidratos en gramos equivalentes de glucosa (D); de V1 (■) y los superproductores de L-fenilalanina: V8.2 (○), V10.5 (△), V10.12 (▽) y V900 (◇). Se representan resultados medios de dos experimentos independientes con desviación estándar. En las graficas B, C y D sólo se muestran los datos de las primeras 24 h de cultivo.

5.2-. Consumo de hidratos de carbono.

El consumo de sacarosa no presentó diferencias significativas en ninguna de las cepas (Figura III.7-B), aunque sí existen diferencias en la acumulación de azúcares reductores derivados de su hidrólisis y en el posterior consumo de los mismos (Figura III.7-C). Los mutantes acumulan mayor concentración de azúcares reductores durante la fase exponencial de crecimiento mientras existe sacarosa en el medio. Tras la hidrólisis de toda la sacarosa disponible, comienza el consumo de azúcares reductores en todas las cepas. En los mutantes el consumo se realiza de forma más lenta que en la cepa parental, debido probablemente, a las diferencias en las tasas de crecimiento (Figura III.7-D). Tras 48 h de cultivo no se detectan en ningún caso carbohidratos residuales en el medio.

5.3-. Producción final de levadura.

La producción final de biomasa tras 48 h de cultivo en medio MAB fue siempre inferior en los mutantes que en la cepa parental. Cuando la producción se calcula en peso húmedo, recogiendo las células por filtración, el mutante V900 presenta una disminución del 16%, ésta disminución en el rendimiento llega hasta el 20% en los mutantes V8.2, V10.5 y V10. La disminución del rendimiento calculado en peso seco varió entre un 27% y un 35%, dependiendo del mutante.

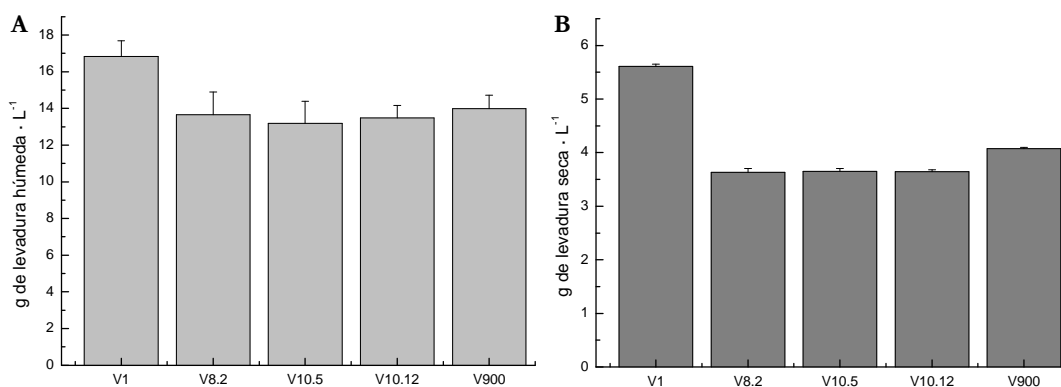


Figura III.8. Producción final de biomasa en medio MAB, expresada como gramos de peso húmedo (A) y seco (B), por litro de medio a las 48 h de cultivo. Se representan valores medios de tres experimentos independientes con desviación estándar.

5.4-. Capacidad fermentativa en condiciones de laboratorio.

La capacidad fermentativa de los mutantes se ha analizado en masa seca tras 48 h de cultivo en medio MAB (Figura III.9). En la fase de aumento lineal del volumen de la masa, todos los mutantes presentan una reducción del 28% en la velocidad de producción

de CO_2 , en valor medio (Figura III.9-A). Por otro lado, todos los mutantes presentan un retraso de aproximadamente 30' en el inicio de la fermentación. Este hecho, junto con la menor tasa de producción de CO_2 , provocan un retraso de 60' para alcanzar el volumen máximo en los mutantes V10.15 y V900 respecto a V1. Por su parte, los mutantes V8.2 y V10.12, reducen en un 35% el volumen máximo alcanzado por la masa fermentada, comparado con la cepa parental.

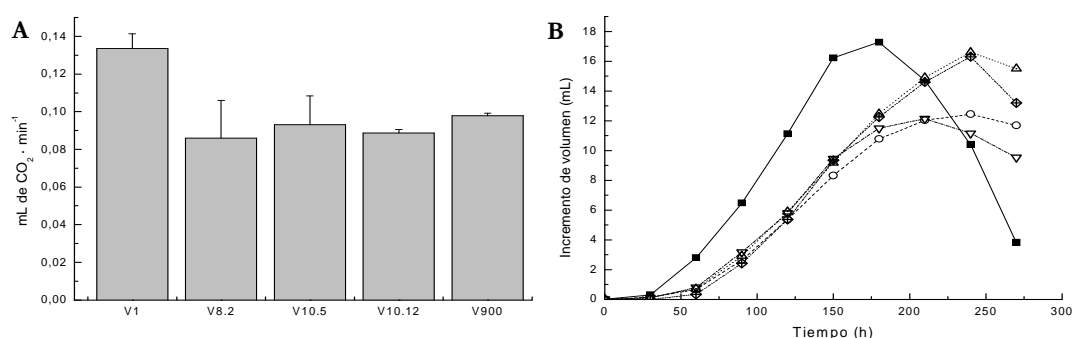


Figura III.9-. Velocidad de producción de gas en la fase lineal de aumento del volumen de la masa (A), e incremento de volumen a lo largo del tiempo de fermentación de la masa (B). En B, se representan a V1 (■), V8.2 (○), V10.5 (△), V10.12 (▽) y V900 (◇). Se muestran valores medios de tres experimentos independientes con desviación estándar en A y un experimento representativo en el caso de B.

5.5-. Concentración interna de aminoácidos en MAB.

Se determinó la concentración interna de aminoácidos en cultivos en MAB en fase estacionaria. No se detectaron incrementos significativos en el contenido interno de fenilalanina con respecto a la cepa parental, aunque sí se observaron variaciones en las concentraciones de otros aminoácidos. Los mutantes V8.2, V10.5 y V10.12 no presentan diferencias significativas entre ellos, mientras que sí se diferencian de V900 (Tabla III.2).

En V8.2, V10.5 y V10.12, las concentraciones internas de alanina y lisina se ven incrementadas en más de 2 veces; se dan también aumentos superiores a 1.5 veces en glutámico. V900 presenta incrementos muy cercanos o superiores a 2 veces en las concentraciones de glutámico, glicina, alanina, valina e isoleucina. También se detectan incrementos superiores a 1.5 veces en aspártico, serina y treonina. En ningún caso se observan disminuciones significativas en las concentraciones de otros aminoácidos.

Tabla III.2. Concentración interna de aminoácidos en levaduras cultivadas en MAB en fase estacionaria. Los valores se expresan en nmol del aminoácido por μg de proteínas. Se indican valores medios de tres experimentos independientes con desviación estándar.

	V1	V8.2	V10.5	V10.12	V900
Aspártico	1.06 \pm 0.06	1.64 \pm 0.31	1.67 \pm 0.22	1.47 \pm 0.06	2.04\pm0.47
Serina	3.74 \pm 0.26	4.00 \pm 0.4	4.34 \pm 0.4	3.97 \pm 0.45	6.00\pm0.34
Glutámico	9.04 \pm 0.48	17.17 \pm 1.82	15.16 \pm 1.00	15.77 \pm 0.17	27.15\pm0.9
Glicina	1.87 \pm 0.19	1.88 \pm 0.13	2.08 \pm 0.17	1.82 \pm 0.29	3.55\pm0.23
Arginina	2.09 \pm 0.22	3.25 \pm 0.3	2.68 \pm 0.29	2.90 \pm 0.04	2.80 \pm 0.37
Treonina	1.25 \pm 0.13	1.65 \pm 0.17	1.79 \pm 0.11	1.60 \pm 0.22	1.95 \pm 0.1
Alanina	5.66 \pm 0.65	12.08\pm0.36	12.16\pm0.72	11.92\pm1.43	16.11\pm1.38
Tirosina	0.84 \pm 0.08	0.71 \pm 0.13	0.75 \pm 0.04	0.65 \pm 0.11	1.22 \pm 0.06
Valina	2.77 \pm 0.2	4.20 \pm 0.39	4.21 \pm 0.29	3.93 \pm 0.32	8.14\pm0.26
Metionina	0.68 \pm 0.03	0.66 \pm 0.13	0.69 \pm 0.02	0.71 \pm 0.1	0.65 \pm 0.04
Lisina	6.51 \pm 0.55	14.11\pm1.58	13.75\pm1.81	15.26\pm0.57	6.38 \pm 0.45
Isoleucina	1.36 \pm 0.12	1.80 \pm 0.23	1.90 \pm 0.18	1.82 \pm 0.16	3.58\pm0.09
Leucina	1.85 \pm 0.05	1.93 \pm 0.32	2.17 \pm 0.13	1.87 \pm 0.34	2.67 \pm 0.17
Fenilalanina	0.94 \pm 0.05	1.01 \pm 0.16	1.12 \pm 0.06	0.95 \pm 0.18	1.37 \pm 0.1

5.6-. Producción de compuestos aromáticos

La determinación de compuestos aromáticos se realizó con células en fase estacionaria (Tabla III.3). En V8.2, V10.5 y V10.12 se detectan aumentos significativos en la concentración de 2-feniletanol con respecto a la cepa parental. Estos aumentos varían entre 4.2 y 6.8 veces. En V900 el patrón de compuestos aromáticos es diferente al de los otros tres mutantes, detectándose reducciones en la producción de alcoholes de bajo peso molecular como etanol e isobutanol. La concentración de 2-feniletanol no sufre ninguna variación, aunque sí se detecta un incremento de hasta 2 veces en la concentración de fenilacetaldehído.

Tabla III.3. Productos aromáticos en levaduras cultivadas en medio MAB. Las unidades se dan en μg del compuesto por g de levadura. Los resultados son valores medios de hasta tres experimentos independientes con desviaciones estándar. ND no determinado.

	V1	V8.2	V10.5	V10.12	V900
Etanol	417.42 \pm 16.94	367.57 \pm 18.17	ND	429.43 \pm 52.99	226.03 \pm 68.91
Isobutanol	4.50 \pm 0.32	3.51 \pm 0.52	3.64 \pm 1.11	2.86 \pm 0.43	1.82 \pm 0.57
3-metilbutanol	28.43 \pm 10.93	23.91 \pm 3.86	25.15 \pm 7.93	22.16 \pm 1.53	14.40 \pm 3.80
fenilacetaldehído	0.07 \pm 0.01	0.08 \pm 0.03	0.09 \pm 0.01	0.12 \pm 0.05	0.17 \pm 0.00
2-fenetilacetato	0.03 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.02 \pm 0.00	0.03 \pm 0.01	0.01 \pm 0.00
2-feniletanol	0.65\pm0.21	3.38\pm0.60	4.42\pm0.28	2.73\pm0.09	0.51\pm0.18

6-. Valoración de pan y dulces.

Dados los resultados obtenidos respecto a la concentración de fenilalanina y la producción de compuestos aromáticos del mutante V900, se procedió a la valoración del comportamiento en panificación sólo de las cepas V8.2, V10.5 y V10.12.

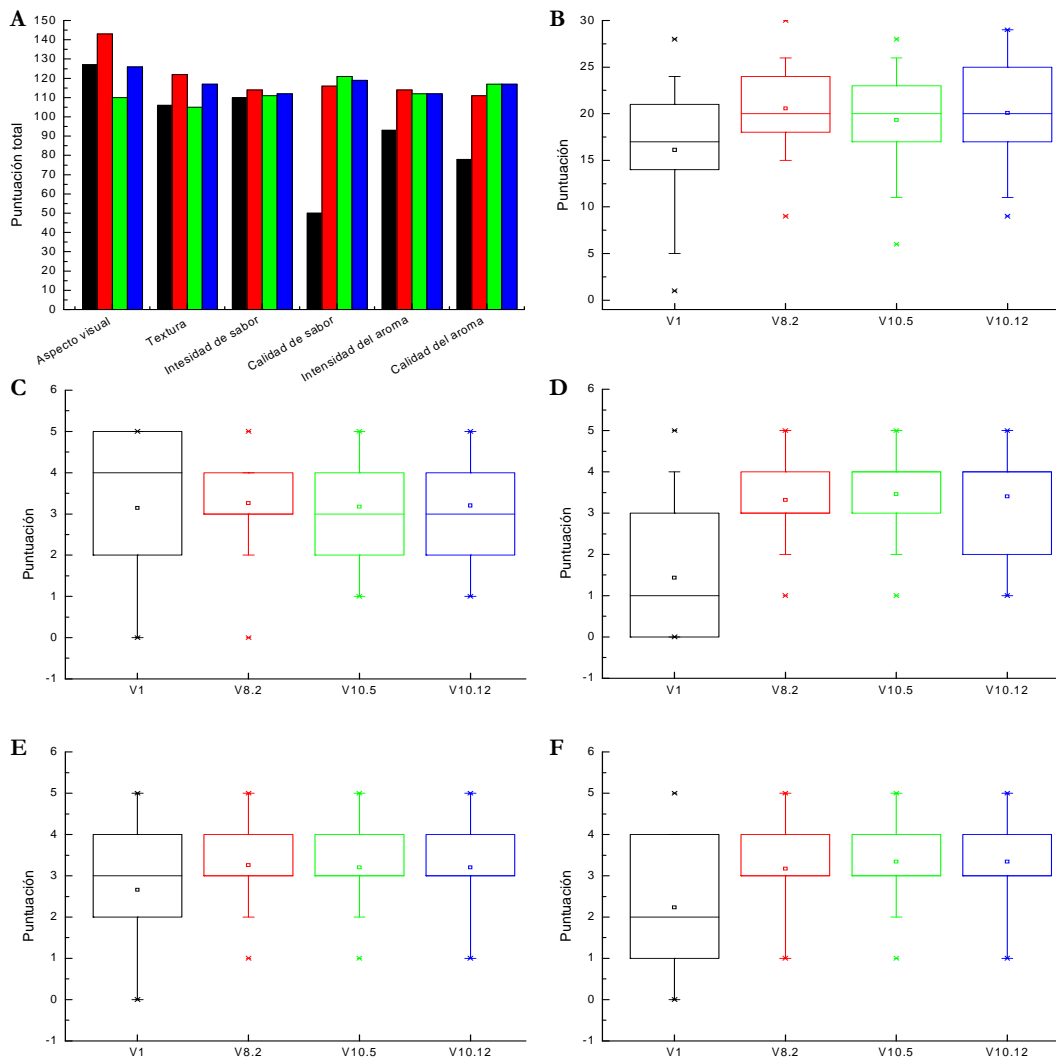


Figura III.10-. Valoración de las características sensoriales del pan. Puntuaciones totales para cada uno de los parámetros analizados (A), y distribuciones por puntuación total del pan (B); intensidad del sabor (C); calidad de sabor (D); intensidad del aroma (E); y calidad del aroma (F). En A el uso de colores es el mismo que en el resto de gráficas. En B-E, Las cajas engloban los percentiles 25 (parte inferior de la caja); 50 (sección interna en la caja, de estar presente) y 75 (lado superior de la caja). Las aspas representan los percentiles 1 ó 99. Las líneas horizontales de menor tamaño representan el valor mínimo y el máximo obtenidos en la distribución. Los cuadrados de menor tamaño, incluidos en las cajas y cercanos al percentil 50, representan la media de la distribución y la línea horizontal con una perpendicular cortándola representa la desviación estándar.

6.1- Elaboración y valoración de pan.

Tras el cultivo de las distintas cepas en medio MAB, se procedió a elaborar aproximadamente un kilogramo de pan con cada una de ellas. La fermentación de la masa presentó las deficiencias previamente observadas, tras lo cual los panes se cocieron cuando el volumen de la masa se estabilizó (aproximadamente a los 90^o). La valoración de los productos se realizó por 35 catadores no expertos, en cata ciega. A estos, se les solicitó que puntuaran del 0 al 5, varias propiedades importantes en el pan como son el aspecto visual, la textura, la intensidad y la calidad organoléptica tanto de sabor como de aroma (Figura III.10). Los mutantes presentan las mejores valoraciones en la calidad del sabor, presentando también buenas valoraciones en cuanto a la intensidad del aroma. Al tratarse de parámetros cualitativos se procedió al análisis de las distribuciones de las puntuaciones. Por un lado se sumaron los valores asignados por cada individuo a cada una de las propiedades evaluadas (Figura III.10-B), así como los aspectos de intensidad y calidad, en las variantes aroma y sabor (Figura III.10 C-F). La distribución de las puntuaciones indica una mejor valoración de los mutantes con respecto al silvestre, con mejores resultados en el percentil 25 y en algunos casos en el percentil 50, tanto en su valoración general como en los aspectos individuales.

6.2- Elaboración y valoración de masas dulces.

Se procedió a la elaboración de bollos suizos con los mismos mutantes y la cepa parental, cultivadas en las mismas condiciones que el apartado anterior. La fermentación de las masas realizadas con los mutantes fueron más prologadas que con la cepa parental, siendo la diferencia de aproximadamente unos 30^o. Tras la cocción de las masas fermentadas se procedió a la valoración de las mismas por unos 30 catadores no expertos, en cata ciega. Los resultados no indican diferencias de calidad del producto ni en cuanto a las puntuaciones por propiedad ni analizando las distribuciones de la puntuación total por cepa, (Figura III.11).

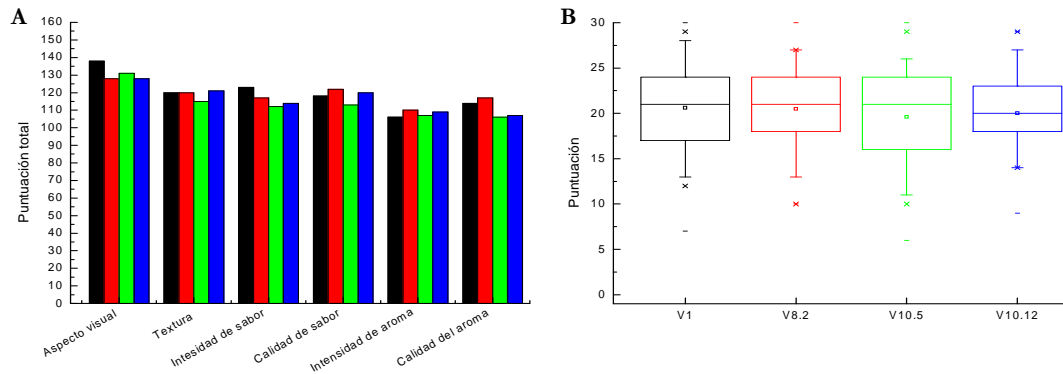


Figura III.11-. Valoración de bollos suizos. Puntuaciones totales para cada uno de las propiedades analizadas (A), y distribuciones por puntuación total de dulce elaborado con las distintas cepas (B). En A el uso de colores es el mismo que en B. En B, Las cajas engloban los percentiles 25 (parte inferior de la caja), 50 (sección interna en la caja) y 75 (lado superior de la caja). Las aspas representan los percentiles 1 ó 99. Las líneas horizontales de menor tamaño representan el valor mínimo y el máximo obtenidos en la distribución. Los cuadrados de tamaños menores incluidos en las cajas y cercanos al percentil 50, representan la media de la distribución y la línea horizontal con una perpendicular representa la desviación estándar.

Discusión

1- Caracterización en medios de laboratorio

La selección de mutantes superproductores de fenilalanina se realizó mediante cultivo en medio mínimo, con prolina como fuente de nitrógeno. De esta forma, se aislaron mutantes que no presentan pérdida de función en la permeasa general de aminoácidos, ya que esto impediría la entrada de la fuente de nitrógeno y por tanto de la capacidad de crecimiento en este tipo de medio. Bajo estas condiciones de cultivo, la cepa V1 es capaz de crecer en presencia de 5 μM de PFP y la resistencia se incrementa 200 veces en presencia de 1 mM de fenilalanina. El aumento de la resistencia a PFP en presencia de triptófano o tirosina se produce en mucho menor grado (Figura III.5). Las principales dianas del PFP son la DHAP sintasa inhibida por fenilalanina (Aro3p) y la prefontato deshidratasa (Pha2p) actuando mediante un mecanismo de inhibición (Fukuda et al., 1990). En este trabajo se pretendía la selección de mutantes espontáneos que hubieran perdido la retroinhibición por producto final, lo que a priori permitiría aumentar la concentración interna de fenilalanina. La ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos es compleja, y presenta varios puntos de regulación factibles de modificación. Por un lado se puede esperar que la pérdida de la retroinhibición de las enzimas DHAP sintasa inhibida por fenilalanina (Aro3p) y/o inhibida por tirosina (Aro4p) sea suficiente para observar un incremento en fenilalanina, o bien la pérdida de retroinhibición de la corismato mutasa (Aro7p) inhibida por tirosina y activada por triptófano. Se ha descrito que la pérdida de retroinhibición en estas enzimas se origina mediante mutaciones puntuales (Fukuda et al., 1991b; Schnappauf et al., 1998). La demostración de que estas mutaciones pueden alterar las concentraciones de aminoácidos aromáticos se ha realizado recientemente, mediante el empleo de diversas variantes alélicas que no presentan retroinhibición por producto final (Aro4p^{K229L} y Aro7p^{G141S}), así como el uso de alelos controlados por promotores que no presentan regulación por el control general de aminoácidos. De esta forma, se constataron el papel y la repercusión que cada uno de estos alelos tienen en el aumento de las concentraciones internas de los aminoácidos aromáticos, siendo la variante del alelo *ARO4* el principal responsable del incremento (Luttik et al., 2008).

No obstante, trabajos anteriores basados en mutagénesis mediante etilmetanosulfonato y la posterior selección de resistentes a análogos tóxicos de la fenilalanina, permiten la obtención de cepas de levaduras que presentan elevadas concentraciones de aminoácidos aromáticos, tanto en cepas empleadas en la elaboración de sake como en

cepas de laboratorio. De cepas de laboratorio, se aisló un mutante que presentaba un cambio en *Aro4p*^{k166L} que confiere resistencia tanto a OFP como a PFP (Fukuda et al., 1992; Cebollero and González, 2004), y otro mutante que presentaba una disminución en la actividad enzimática en la pfeonato deshidrogenasa (*TYR1*), que permite la adquisición de la resistencia a PFP (Fukuda et al., 1991a). En este último mutante, aumentó la producción de fenilalanina debido a un incremento en pfeonato, por lo que *Pha2p* dispone de mayor cantidad de sustrato. No obstante, debido al método de mutagénesis empleado no se pueden descartar otras mutaciones no identificadas que favorecieran la acumulación de aminoácidos aromáticos.

En los superproductores de fenilalanina aislados en este trabajo no se ha demostrado la existencia de mutaciones ni en *ARO3* ni en *ARO4* que pudieran indicar una pérdida en la retroinhibición por producto final. El estudio de la resistencia a PFP en presencia de los distintos aminoácidos aromáticos (Figura III.6) muestra el aumento de la resistencia al tóxico de todos los mutantes y que la misma no aumenta con la presencia de fenilalanina o triptófano. En los mutantes V8.2, V10.5 y V10.12 se observa un leve incremento en la resistencia a PFP en presencia de tirosina, lo cual podría sugerir que *Aro7p* puede tener una pérdida de la retroinhibición. No obstante, también pueden postularse otras alternativas como una/s mutación/es que permita/n una mayor expresión de los genes *ARO3/ARO4* ó bien un descenso en la actividad enzimática de la ruta de síntesis de tirosina que permite una desviación del flujo de síntesis hacia la producción de fenilalanina.

En general, tanto las cepas de sake resistentes a PFP como las cepas de laboratorio con variantes alélicas carentes de retroinhibición por producto final, los incrementos en la concentración de los aminoácidos aromáticos están asociadas con variaciones en la concentración de otros aminoácidos (Fukuda et al., 1990; Luttkik et al., 2008). También en el caso de los mutantes V8.2, V10.5, V10.12 y V900 se observan variaciones en otros aminoácidos que no están relacionados con la síntesis de los aminoácidos aromáticos, aunque debido a la gran dependencia de las concentraciones internas de aminoácidos a las condiciones de cultivo no se pueden realizar comparaciones entre los mutantes descritos previamente y los resultados obtenidos en esta tesis (Martínez-Force and Benítez, 1995). Estos efectos en la concentración de aminoácidos no aromáticos pueden deberse a diversas razones. Entre ellas, se podrían mencionar la baja afinidad de las transaminasas implicadas

en las distintas rutas de biosíntesis y a un efecto de la desviación de intermediarios metabólicos que permite en algunos casos un incremento y en otros un descenso en las concentraciones de diversos aminoácidos. En el caso de los mutantes bajo estudio, llama la atención la reducción de serina y el incremento de arginina. La serina se utiliza en la biosíntesis del triptófano (Braus, 1991), lo que puede sugerir un incremento de este en estos mutantes, pero que debido al método de detección empleado no se pudo determinar. No se ha descrito una relación entre la biosíntesis de aminoácidos aromáticos y la de arginina, pero diversos trabajos indican que un incremento en la concentración de aminoácidos cargados, como arginina o glutámico, y aminoácidos polares sin carga como prolina, provocan un aumento en la resistencia a congelación-descongelación en levaduras panaderas comerciales, ya que actuarían como crioprotectores (Shima et al., 2003). En este sentido, se procedió a la determinación de la resistencia a congelación en los cuatro mutantes superproductores y en la cepa silvestre ya que los mutantes presentan un incremento significativo en la concentración de arginina, al menos en fase exponencial (Figura III.11). En las condiciones anteriores, se observa un incremento en la resistencia tanto a ciclos de congelación-descongelación como a periodos prolongados de congelación. En fase estacionaria, el aumento de las concentraciones de otros compuestos, como por ejemplo trehalosa, y el desconocimiento de las concentraciones internas de aminoácidos con carga y polares, no permiten concluir que el aumento de ésta se deba a la acumulación de estos últimos.

2-. Uso en condiciones semi-industriales.

El objetivo del presente trabajo es la aplicabilidad directa de estos mutantes en la industria panadera. Esta aplicabilidad se basa en el análisis de seis propiedades importantes en levaduras panaderas: crecimiento en melazas, rendimiento, incremento en aminoácidos, aumento en la concentración de sustancias con propiedades organolépticas deseables, capacidad fermentativa y aceptación por el consumidor.

Tanto el crecimiento en fase exponencial como la producción final de biomasa (g/L) presentan defectos muy marcados. No obstante, los mutantes no presentan diferencias significativas en cuanto a la hidrólisis de sacarosa y posiblemente la mayor acumulación de azúcares reductores se deba a un menor número de células en los cultivo de los mutantes con respecto a la cepa parental (Figura III.7).

Las melazas industriales presentan una gran cantidad de aminoácidos mientras que el nitrógeno en forma de amonio es limitante (Capítulo II). Esto impide que se produzca la biosíntesis de ciertos aminoácidos, aunque no de todos. En el caso de fenilalanina y tirosina las concentraciones externas iniciales se aproximan a 0.2 mM y 0.5 mM, respectivamente. Un medio mínimo permite el crecimiento de auxótrofos para los aminoácidos aromáticos con suplementos de 0.3 mM de fenilalanina y 0.11 mM tanto de tirosina como de triptófano (Sherman et al., 1986). Las concentraciones internas de los distintos aminoácidos presentan un comportamiento similar entre los mutantes V8.2, V10.5 y V10.12, pero distinto con respecto al mutante V900. En los tres primeros se observan incrementos en las concentraciones de lisina, alanina y en menor grado glutámico. En V900 se acumulan glutámico, glicina, alanina, valina, isoleucina y en menor grado aspártico, serina y treonina. Si se asume que la utilización de estos aminoácidos tanto por V1 como por los cuatro mutantes ha sido similar, el incremento de estos aminoácidos se ha producido bien por síntesis y/o por no consumo de los esqueletos carbonados. De cualquier forma, esto último podría explicar tanto la reducción de la velocidad de crecimiento como de biomasa final obtenida de los mutantes.

Otra característica que diferencia a los mutantes es la superproducción de 2-feniletanol y otros alcoholes de fusel (Tabla III.3). V8.2, V10.5 y V10.12 presentan una alta producción de este compuesto mientras que V900 no. La búsqueda de resistentes a PFP permite aislar mutantes que sintetizan grandes cantidad de 2-feniletanol con relativa facilidad (Fukuda et al., 1991a), incluso cuando se pierde la retroinhibición de Aro4p también se observa un incremento significativo en este alcohol de fusel (Luttik et al., 2008). En este último caso, la detección de un incremento en la concentración interna de fenilalanina produce la activación de la ruta Ehrlich, ya que estos mutantes no excretan aminoácidos aromáticos. La regulación tanto de *ARO9* como de *ARO10*, se produce por inducción en presencia tanto de L-fenilalanina como L-triptófano, así como por otros aminoácidos que pueden ser degradados por ruta Ehrlich. Además se observa una fuerte represión en presencia de amonio (Iraqi et al., 1998; Vuralhan et al., 2003; Vuralhan et al., 2005; Boer et al., 2007). V1 y V900 sintetizan 2-feniletanol, pero los niveles producidos por V8.2, V10.5 y V10.12 son superiores, lo que plantea la posibilidad de que estos tres mutantes presenten mayor actividad enzimática en Aro9p y/o Aro10p.

Dado que los alcoholes de fusel en altas concentraciones pueden producir malas valoraciones en propiedades organolépticas se procedió a evaluar productos panarios elaborados con V8.2, V10.5 y V10.12. Los resultados de las catas indican una aceptación muy favorable, aunque estos mutantes tarden más tiempo en fermentar las masas. No obstante, en las fábricas de producción de levadura se pueden aplicar protocolos de alimentación de los fermentadores que permiten la obtención de levaduras con mayor grado de actividad fermentativa en masa, o alternativamente, estas levaduras podrían utilizarse mezcladas con otras levaduras panaderas no superproductoras. Otra posibilidad es su uso como saborizante o suplemento dietético mediante consumo directo.

Por tanto se dispone de cuatro mutantes con posible aplicación industrial que poseen incrementos significativos tanto en aminoácidos esenciales como en derivados de aminoácidos que confieren incrementos en las propiedades organolépticas de productos panarios.

Capítulo IV:

**Regulación transcripcional en levaduras panaderas y aplicaciones
industriales**

Introducción

1-. Metabolismo de hidratos de carbono en levaduras.

S. cerevisiae muestra una clara preferencia por el consumo de carbohidratos fermentables y fácilmente asimilables, entre los que destacan glucosa, fructosa y manosa. La presencia o ausencia de estos monosacáridos condiciona la fisiología de las levaduras hasta tal punto que imposibilita la incorporación o la utilización de otras fuentes de carbono fermentables y/o respirables. Entre éstas se pueden destacar monosacáridos como galactosa; disacáridos como sacarosa, maltosa, melibiosa y trehalosa; trisacáridos como rafinosa, y algunos tipos de oligosacáridos. Esta preferencia es tan marcada que aun pudiendo generar glucosa y/o fructosa mediante la hidrólisis de otros azúcares, por ejemplo sacarosa y/o maltosa, la utilización de estos azúcares está fuertemente regulada, teniendo lugar sólo por debajo de cierta concentración de glucosa (Gancedo, 1998; Zaman et al., 2008).

En presencia de fuentes de carbono fermentables se producen dos estadios metabólicos totalmente diferentes. En primer lugar, las levaduras llevan a cabo la fermentación alcohólica de gran parte del sustrato; una vez se ha/an consumido la/s fuente/s fermentable/s, se produce la respiración de los productos de la fase anterior. En la fase de fermentación se detecta una rápida división celular asociada a una producción de compuestos con dos y tres átomos de carbono (C2 y C3) así como CO₂. Por el contrario, en la fase de respiración se produce un incremento de biomasa así como mayor resistencia a diversos tipos de estrés.

Glucosa, fructosa, manosa y galactosa son incorporados a la célula por una superfamilia de transportadores (De Winde et al., 1997). Esta familia está constituida por al menos 17 transportadores de hexosas (Hxt1-17p) y por el específico de galactosa (Gal2p). El transporte de las fuentes de carbono preferentes se realiza a través de más de 20 transportadores, ya que para imposibilitar el crecimiento en glucosa como única fuente de carbono, se hacen necesarias las deleciones de todos los transportadores de hexosas y de los transportadores específicos de galactosa (*GAL2*), α -glucósidos (*AGT1*, *MPH2* y *MPH3*) y glicerol (*STL1*). Esto indica que aunque los transportadores presenten afinidad por otros hidratos de carbono, podrían tener cierta funcionalidad en la incorporación de las fuentes de carbono preferentes (Wieczorke et al., 1999; Gancedo, 2008). La gran cantidad de transportadores de hexosas y su no esencialidad indica la existencia de un solapamiento funcional entre los distintos transportadores. Este hecho sumado a las distintas afinidades

que esta superfamilia presenta, revela que en levaduras existe un sistema complejo de señalización y control de la expresión génica (Gagiano et al., 2002; Rolland et al., 2002). Otras fuentes de carbono fermentables pero no preferentes se transportan al interior de la levadura bien mediante un transporte específico, como es el caso de la galactosa, bien mediante un transporte específico y una posterior hidrólisis interna, como es el caso de la maltosa (*MALT* y *MALS*, respectivamente) o bien se hidrolizan en el exterior por enzimas específicas como puede ser el caso de la sacarosa y la rafinosa. La primera es hidrolizada por la invertasa (Suc2p) dando lugar a glucosa y fructosa, mientras que la segunda es hidrolizada mediante Suc2p que genera fructosa y melibiosa que a su vez se hidroliza mediante la melibiasa (Mel1p), dando lugar a glucosa y galactosa. La utilización o no de estas fuentes de carbono alternativas dependen de la cepa de levadura que se utilice, por ejemplo las cepas utilizadas en panadería son incapaces de hidrolizar la melibiosa (Gasent-Ramírez et al., 1995; Rincón et al., 2001; Gagiano et al., 2002).

Una vez la glucosa, fructosa y manosa han sido incorporadas se produce la fosforilación de las mismas mediante las hexoquinasas Hxk1p, Hxk2p y Glk1p. La glucosa-6-P y la manosa-6-P se isomerizan a fructosa-6-P, a partir de la cual se darán las sucesivas reacciones de la glucólisis (Figura IV.1; Gagiano et al., 2002). En el caso de la galactosa, tras el transporte se produce la fosforilación en el C1 mediante la galactoquinasa (Gal1p), tras lo cual se produce la transformación a glucosa-1-P (Gal7p) que posteriormente se metaboliza a glucosa-6-fosfato por la acción de la fosfoglucomutasa (Pgm1p y Pgm2p/Gal5p), lo que nuevamente permite la isomerización a fructosa-6-P entrando ésta en la vía glucolítica (Ostergaard et al., 2001). El rendimiento energético de la glucólisis depende del producto sintetizado. El principal producto C3 formado es el glicerol que se sintetiza a partir de dihidroxiacetona fosfato (DHAP), lo cual supone un gasto energético debido a que no hay una reacción de síntesis de ATP que recupere el utilizado anteriormente. Sin embargo, la mayoría de los intermediarios glucolíticos serán llevados hasta piruvato, lo que sí supone la obtención de energía. A partir de aquí se produce principalmente la fermentación alcohólica, que permite una reconstitución del estado redox y la formación del producto C2 mayoritario, el etanol. Para ello es necesaria la acción de alguna de las enzimas piruvato descarboxilasa, acoplada a la oxidación del acetaldehído que a su vez se realiza por alguna de las enzimas alcohol deshidrogenasa (Tabla IV.1). Una pequeña parte del acetaldehído

puede formar acetato a través de alguna de las enzimas aldehído deshidrogenasa (Pronk et al., 1996; Haurie et al., 2001).

Tabla IV.1. Principales enzimas implicadas en la utilización del piruvato y derivados. La piruvato deshidrogenasa es un complejo multiproteico, mientras que el resto de enzimas presentan varias isoenzimas (la principal se remarca en negro). La regulación génica se ha establecido mediante la búsqueda de evidencias directas (a) e indirectas (b) con los principales reguladores transcripcionales de fuentes de carbono: Mig1p, Mig2p, Mig3p, Hap4p y Cat8p tomada de las bases de datos YEASTRACT (Teixeira et al., 2006). El resto de información ha sido tomada de la base de datos SGD.

Enzima	Genes	Reguladores transcripcionales	Producción	Localización
Piruvato deshidrogenasa	<i>PDA1</i>		Acetil-CoA, CO ₂ y NADH	Mitocondria
	<i>PDB1</i>			
	<i>LAT1</i>			
	<i>LPD1</i>	Hap4p (b)		
	<i>PDX1</i>			
Piruvato descarboxilasa	<i>PDC1</i>	Mig1p (a)	Acetaldehído y CO ₂	Citosol-Núcleo
	<i>PDC5</i>	Hap4p (b)		Citosol-Núcleo
	<i>PDC6</i>			
Piruvato carboxilasa	<i>PYC1</i>		Oxalacetato y ADP	Citosólica
	<i>PYC2</i>			
Alcohol deshidrogenasa	<i>ADH1</i>		EtOH y NAD ⁺	Citosólica
	<i>ADH3</i>			Mitocondrial
	<i>ADH4</i>	Hap4p (b)		
	<i>ADH5</i>	Hap4p (b)		
	<i>ADH2</i>	Hap4p (b), Cat8p (b)	Acetaldehído y NADH	Citosólica
Aldehído deshidrogenasa	<i>ALD2</i>		Acetato y NADH	Citosólica
	<i>ALD3</i>	Mig1p (b), Hap4p (b)		Citosólica
	<i>ALD4</i>	Hap4p (b)	Acetato y NAD(P)H	Mitocondrial
	<i>ALD5</i>		Acetato y NAD(P)H	Mitocondrial
	<i>ALD6</i>	Cat8p (a)(b)	Acetato y NAD(P)H	Citosólica
Acetil-CoA sintetasa	<i>ACS1</i>	Hap4p (b), Cat8p (a)(b)	Acetil-CoA	
	<i>ACS2</i>			

El rendimiento en biomasa de la fermentación alcohólica es muy bajo si se compara con el que se obtiene de la respiración de los azúcares (Lehninger et al., 1993). En condiciones de cultivo aeróbico discontinuo (Batch) se ha podido constatar que en torno al 70% de la glucosa consumida se fermenta a etanol, un 20% se emplea en la generación de biomasa, un 8% se utiliza para sintetizar glicerol y tan sólo un 2% se emplea en la fosforilación oxidativa (De Winde et al., 1997).

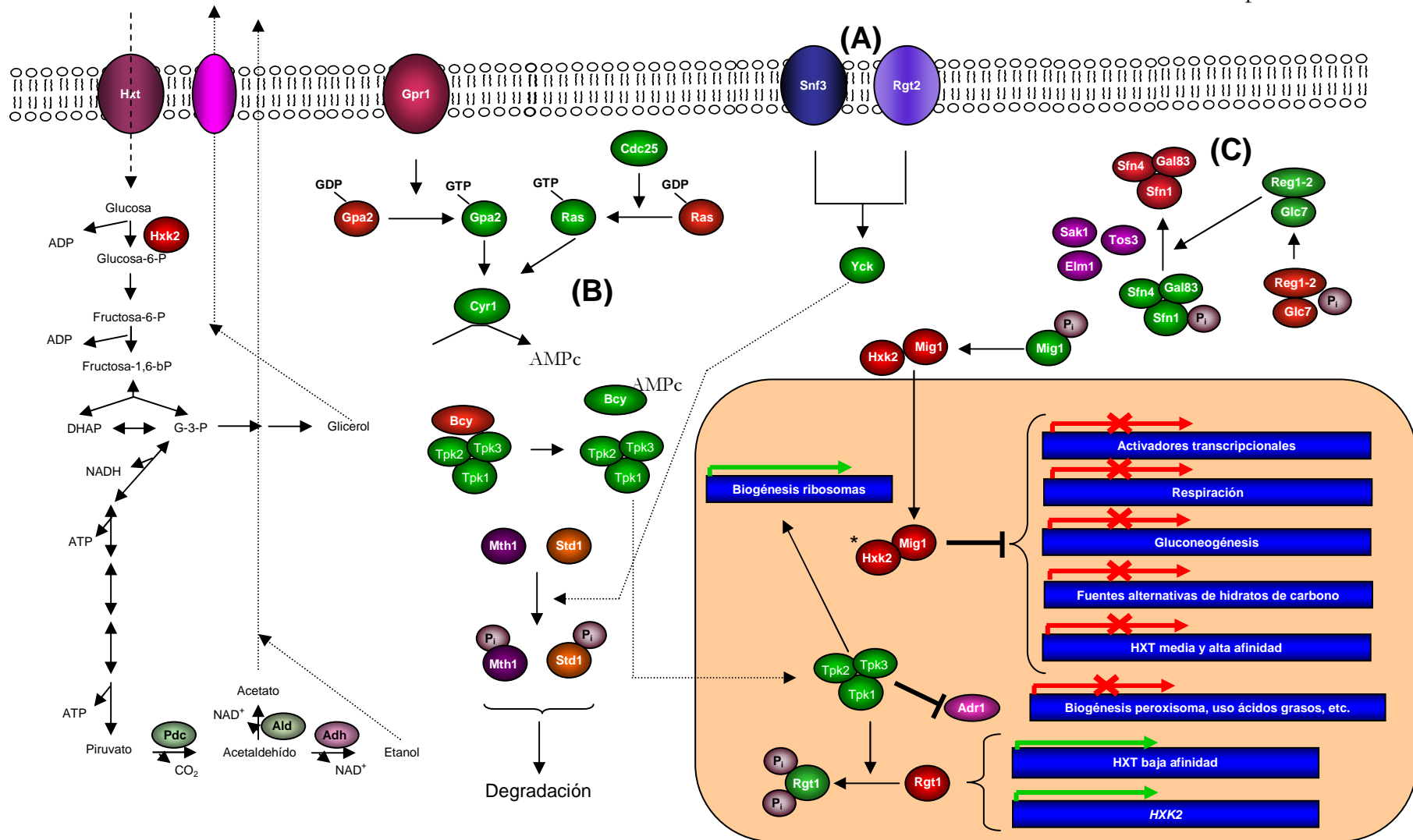


Figura IV.1. Rutas metabólicas y control de la expresión génica, en condiciones de represión. En líneas puntuadas, transporte tanto de sustancias a través de las distintas membranas como de complejos proteicos.

El hecho de que, a pesar de la aireación, la levadura a altas concentraciones de glucosa produzca una gran cantidad de etanol, se ha interpretado como una estrategia de control de los nutrientes en su nicho ecológico, dado que una gran variedad de microorganismos presentan una fuerte inhibición del crecimiento en presencia de etanol, y no lo utilizan como fuente de carbono (De Winde et al., 1997).

Por debajo de los $2 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucosa externa, comienza la respiración del etanol y el glicerol. Para ello, se necesita la transformación de los mismos en sustratos para las principales rutas metabólicas; de esta forma, el etanol se metaboliza en el citosol a acetaldehído por acción de Adh2p, y el acetaldehído formado se metabolizará a acetato por alguna de las dos aldehído deshidrogenasas citoplasmáticas (Figura IV.2 y Tabla IV.1). El acetato formará acetil-CoA mediante la acción de la acetil-CoA sintetasa, siendo éste incorporado a la mitocondria y utilizado para iniciar el ciclo de Krebs. La utilización del glicerol es un poco más compleja. Mediante dos reacciones se formará DHAP, que entrará en el flujo glucolítico. Una vez sea metabolizado hasta piruvato, puede seguir la ruta del acetato, anteriormente indicada, o bien el transporte del mismo a la mitocondria, en donde la piruvato deshidrogenasa lo metabolizará en acetil-CoA (Pronk et al., 1996).

Coincidiendo con la fase respiratoria, en levaduras se da una vía anabólica importante. Se conoce como gluconeogénesis y es un proceso por el cual se permite la síntesis de trehalosa y glucógeno a partir de etanol y glicerol. Dada la irreversibilidad de algunas de las reacciones de la glucólisis se requiere la activación del ciclo del glioxilato. De esta forma, se sintetiza oxalacetato a partir de etanol, que a su vez formará fosfoenolpiruvato que puede entrar en el flujo glucolítico inverso. Otra posibilidad para obtener oxalacetato citoplasmático es vía piruvato carboxilasa. El glicerol también puede utilizar tanto el flujo glucolítico inverso como la glucolisis normal, ya que la acción de las enzimas Gut1p y Gut2p permiten la síntesis de DHAP (Figura IV.2) (Pronk et al., 1996; Haurie et al., 2001).

El ciclo de los ácidos tricarboxílicos está íntimamente ligado al transporte de electrones de la cadena respiratoria. A su vez el ciclo de los ácidos tricarboxílicos está ligado a la síntesis de aminoácidos, puesto que algunos de los intermediarios del ciclo son los precursores de la síntesis de éstos (Capítulo III). Los precursores del ciclo de Krebs (Tabla IV.2) son acetil-CoA y oxalacetato, que se condensan por la acción de la citrato sintasa. Se producen posteriormente una serie de reacciones en las que intervienen la

aconitasa y la isocitrato deshidrogenasa, que generan α -cetoglutarato. Este se metaboliza a succinil-CoA por la acción de un complejo multienzimático denominado α -cetoglutarato deshidrogenasa. El succinil-CoA se metaboliza mediante la succinil-CoA ligasa, formándose succinato y energía en forma de GTP. El succinato es el sustrato de la succinato deshidrogenasa, que cederá electrones a la ubiquinona, y por tanto es una de las proteínas que contribuyen al transporte de electrones de la cadena respiratoria, siendo conocida con el nombre de complejo II. Además de ubiquinol, en el paso anterior se forma fumarato que se metaboliza a malato por la acción de la fumarato hidratasa. Por último, el malato formado será convertido a oxalacetato gracias a la acción de la malato dehidrogenasa mitocondrial, cerrándose el ciclo. Todas estas reacciones tienen como fin incrementar la concentración de NADH en la matriz mitocondrial, que se usará como donador de electrones en la cadena transportadora de electrones, permitiendo la generación de un gradiente electroquímico de protones que posibilita la generación de energía en forma de ATP (Figura IV.2).

Tabla IV.2. Enzimas pertenecientes al ciclo de los ácidos tricarbóxicos. La regulación génica se ha establecido mediante la búsqueda de evidencias directas (a) e indirectas (b) con los principales reguladores transcripcionales de fuentes de carbono: Mig1p, Mig2p, Mig3p, Hap4p y Cat8p tomada de las bases de datos YEASTRACT (Teixeira et al., 2006). El resto de información ha sido tomada de la base de datos SGD.

Actividad enzimática	Genes	Reguladores transcripcionales	Producto formado
Citrato sintasa	<i>CIT1</i>	Hap4p (b)	Citrato, CoA
Aconitasa	<i>ACO1</i>	Hap4p (b)	Isocitrato, H ₂ O
Complejo isocitrato deshidrogenasa	<i>IDH1</i>	Hap4p (b), Cat8p (b)	NADH, CO ₂ , α -cetoglutarato
	<i>IDH2</i>	Hap4p (b)	
Complejo α -cetoglutarato deshidrogenasa	<i>KGD2</i>	Hap4p (b)	NADH, CO ₂ Succinil-CoA
	<i>KGD1</i>	Hap4p (b)	
	<i>LPD1</i>	Hap4p (b)	
Complejo Succinil-CoA ligasa	<i>LSC2</i>		GTP, CoA Succinato
	<i>LSC1</i>		
Complejo Succinato deshidrogenasa	<i>SDH1</i>	Hap4p (b), Cat8p (b)	Ubiquinol, fumarato
	<i>SDH2</i>	Hap4p (b)	
	<i>SDH3</i>	Hap4p (b)	
	<i>SDH4</i>	Hap4p (b)	
	<i>SDH5</i>		
Fumarato hidratasa	<i>FUM1</i>	Hap4p (b), Cat8p (b)	Maltato
Malato dehidrogenasa	<i>MDH1</i>	Hap4p (b)	NADH, oxalacetato

La respiración en levaduras la llevan a cabo cuatro complejos proteicos encargados del transporte de electrones y un quinto que sintetiza ATP (Figura IV.2 y Tabla IV.3). El Complejo I o NADH deshidrogenasa está formado por una única proteína que se encarga de obtener electrones del NADH de la matriz mitocondrial y que los transfiere a la

ubiquinona. También, se han descrito otras dos NADH deshidrogenasas orientadas al espacio intermembrana y que se encargan de la utilización del NADH citosólico. Como particularidad, ninguna de las tres es capaz de bombear protones y son los únicos complejos no constituidos por varias proteínas diferentes. El Complejo II o succinato deshidrogenasa se encarga de transferir los electrones desde el succinato a la ubiquinona. Este complejo está formado por cuatro proteínas diferentes y como ocurre en otros organismos no tiene la capacidad de bombear protones. El Complejo III o citocromo bc1 está constituido por una gran cantidad de proteínas y tiene como función principal la transferencia de los electrones desde el ubiquinol al citocromo c; como consecuencia, se genera un transporte de protones desde la matriz mitocondrial al espacio intermembrana. Por último el citocromo c, está constituido por una única proteína, donando los electrones al Complejo IV ó citocromo c oxidasa que se encarga de formar agua a partir de O_2 y que también es capaz de bombear protones al espacio intermembrana. Para que resulte la transferencia de los electrones se hace necesaria la presencia de varios grupos prostéticos, entre los que destacan el FAD, los centro Fe-S y los grupos hemo, que las distintas proteínas pueden o no llevar incorporados.

El transporte de electrones se efectúa por los complejos III y IV lo que genera un gradiente electroquímico que se disipa por la acción del complejo V o ATP sintasa. Este, aprovechando la fuerza protón motriz, es capaz de realizar la fosforilación del ADP para formar ATP. El complejo V está constituido por dos partes, F0 y F1, constituidas por una gran variedad de proteínas. La primera se encarga de formar el poro que permite el paso de los protones, lo que provoca que la subunidad gire, mientras que el segundo aprovecha el giro para realizar su actividad catalítica (Lehninger et al., 1993; Ohlmeier et al., 2004).

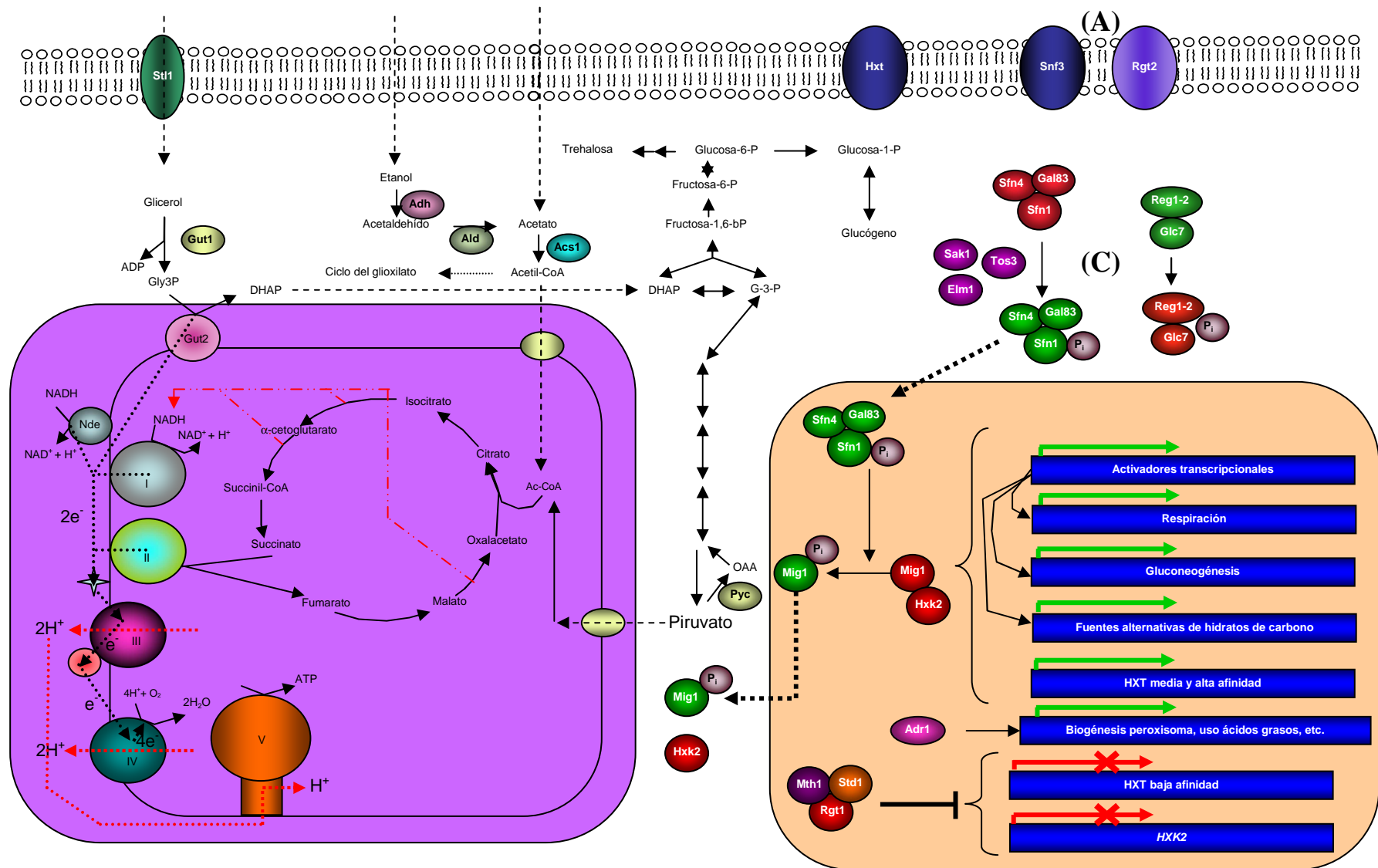


Figura IV.2. Rutas metabólicas y control de la expresión génica, en condiciones de no represión. En líneas puntuadas, transporte tanto de sustancias a través de las distintas membranas como de complejos proteicos. En violeta se muestra la mitocondria y en naranja el núcleo.

Tabla IV.3. Proteínas implicadas en la cadena de transporte de electrones y la síntesis de ATP. La regulación génica se ha establecido mediante la búsqueda de evidencias directas (a) e indirectas (b) con los principales reguladores transcripcionales de fuentes de carbono: Mig1p, Mig2p, Mig3p, Hap4p y Cat8p tomada de las bases de datos YEASTRACT (Teixeira et al., 2006). El resto de información ha sido tomada de la base de datos SGD. (c) indica la subunidad F0 y (d) la subunidad F1 de la ATP sintasa.

Complejo enzimático	Genes	Codificado en	Reguladores Transcripcionales
NADH deshidrogenasas	<i>NDI1</i>	núcleo	Hap4p (a)
	<i>NDE1</i>	núcleo	
	<i>NDE2</i>	núcleo	
Complejo II o Succinato deshidrogenasa	<i>SDH1</i>	núcleo	Hap4p (b), Cat8p (b)
	<i>SDH2</i>	núcleo	Hap4p (b)
	<i>SDH3</i>	núcleo	Hap4p (b)
	<i>SDH4</i>	núcleo	Hap4p (b)
	<i>YJL045W</i>	núcleo	Cat8p (b)
Complejo III ó citocromo bc1	<i>COB1</i>	mitocondria	
	<i>COR1</i>	núcleo	Hap4p (a)
	<i>QCR2</i>	núcleo	Hap4p (a)
	<i>QCR6</i>	núcleo	
	<i>QCR7</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>QCR8</i>	núcleo	Hap4p (b), Mig1p (b)
	<i>QCR9</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>QCR10</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>RIP1</i>	núcleo	Hap4p (a)
Complejo IV o Citocromo C oxidasa	<i>COX1</i>	mitocondria	Hap4p (b)
	<i>COX2</i>	mitocondria	Hap4p (b)
	<i>COX3</i>	mitocondria	
	<i>COX4</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>COX5A</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>COX5B</i>	núcleo	
	<i>COX6</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>COX7</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>COX8</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>COX9</i>	núcleo	Hap4p (a)
	<i>COX12</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>COX13</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
Citocromo c	<i>CYC1</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
Complejo V o ATP sintasa	<i>ATP1(d)</i>	núcleo	Hap4p (a)
	<i>ATP2(d)</i>	núcleo	Hap4p (a) (b), Cat8p (b)
	<i>ATP3(d)</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>ATP4(c)</i>	núcleo	Hap4p (b)
	<i>ATP5(d)</i>	núcleo	Hap4p (a)
	<i>ATP6(c)</i>	mitocondria	
	<i>ATP7(c)</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>ATP8(c)</i>	mitocondria	
	<i>ATP9/OLI1(c)</i>	mitocondria	
	<i>ATP14(c)</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>ATP15(d)</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>ATP16(d)</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
	<i>ATP17(c)</i>	núcleo	Hap4p (a) (b)
<i>TIM11(c)</i>	núcleo	Hap4p (b)	

2-. Señalización de presencia o ausencia de glucosa en el medio.

El metabolismo tan particular de la glucosa en *S. cerevisiae*, es consecuencia de una fuerte regulación ejercida por la presencia o ausencia de hidratos de carbono preferentes. La regulación se realiza tanto a nivel transcripcional como a nivel postraduccional. De esta forma la presencia o ausencia de glucosa y su concentración en el medio dispara una serie de señales que desembocan en la activación o desactivación de varios factores transcripcionales que modulan la expresión de los genes que codifican para las proteínas de las distintas rutas metabólicas.

En levaduras existen tres rutas de señalización, que están íntimamente interconectadas. Por un lado tenemos una ruta mediada por los sensores de glucosa Rgt2p y Sfn3p; otra mediada por AMPc y una tercera mediada por el complejo Snf (A, B y C en figuras IV.1 y IV.2) (Zaman et al., 2008).

Los principales receptores de glucosa son Rgt2p, Sfn3p y Gpr1p. La presencia de más de un receptor indica que la levadura es capaz de modular la respuesta a través de más de un tipo de cascada de señalización. De esta forma Rgt2p y Sfn3p son los sensores de alta y baja concentración de glucosa respectivamente. Sí el medio presenta glucosa, se produce la activación de la quinasa (Yckp)(**A**) que fosforila dos proteínas: Mth1p y Std1p. La fosforilación de estas dos proteínas es una señal para que sean degradadas, lo que permite una mejor exposición de Rgt1p a la hiperfosforilación mediada por la proteína quinasa A (Tpk1, 2 y 3). Esta hiperfosforilación tiene como resultado la inactivación de Rgt1p que es el represor transcripcional de genes implicados en el transporte de hexosas y de la hexoquinasa II (*HXK2*). Cuando no hay glucosa en el medio tanto Mth1p como Std1p se encuentran asociadas a Rgt1p lo que impide su hiperfosforilación; ésto provoca la represión de los genes anteriores. También se ha descrito que Rgt1p es capaz de reprimir la expresión de *STD1*, cuando está activo. El otro sensor, Gpr1p (**B**), se encarga de la transmisión de la señal de presencia de glucosa y sacarosa mediante la activación de las proteínas G (Ras y Gpa2) lo que permite la activación de la adenilato ciclasa que a su vez provoca un aumento de la concentración interna de AMPc. Este aumento en AMPc tiene como consecuencia la unión del mismo a la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (Bcy1p) que libera a la subunidad catalítica (PKA) constituida por tres proteínas (Tpk1, 2, 3p). Esta acción permite la progresión en el ciclo celular, la expresión de genes implicados en la biogénesis del

ribosoma, la glucólisis, la represión de genes implicados en la respuesta a estrés (Msn2,4p) y la gluconeogénesis (Gancedo, 2008; Zaman et al., 2008).

La tercera ruta de señalización descrita **(C)** (Figura IV.1) es la que implica al complejo Snf1p. El complejo está formado por Snf4p que tiene como función controlar la actividad autoinhibidora de Snf1p y cualquiera de las siguientes tres proteínas Sip1p, Sip2p y Gal83p. Dependiendo de las proteínas que constituyan el complejo se puede localizar en la vacuola, el citoplasma o el núcleo, respectivamente (Hedbacker and Carlson, 2008). El complejo encargado de la regulación a nivel transcripcional se compone por Snf4p y Gal83p. Cuando la concentración de glucosa es baja, se produce la fosforilación de Snf1p y su migración al núcleo. Esta es la forma activa del complejo y realiza la fosforilación del represor catabólico Mig1p, provocando su exportación al citoplasma y por tanto se produce la desrepresión catabólica. La activación de Snf1 se produce gracias a la acción de tres quinasas (Sak1p, Elm1p y Tos3p), mientras que la inactivación del complejo se realiza por desfosforilación vía Reg1-2-Glc7p. No se ha podido demostrar cómo se produce la activación ni de las quinasas de Snf1p ni de la fosfatasa (Hedbacker and Carlson, 2008; Zaman et al., 2008). Lo que sí se conoce del complejo de desactivación de Snf1p es que esta proteína es capaz de fosforilar a Reg1p mientras que Glc7p se encarga de desfosforilarla (Rolland et al., 2002). Con todo, parece que en la regulación de la actividad del complejo Snf1 podrían actuar otras proteínas como Hxk2p. Estudios previos indicaban que la presencia de Hxk2p era necesaria para la desfosforilación vía Reg1-Glc7p, aunque no se ha podido demostrar una relación directa entre estas tres proteínas. El papel de Hxk2p no está claro, por un lado su ausencia permite la expresión de diversos genes como *SUC2*, *HXK1*, *GLK1*, y diversos transportadores de hexosas de alta afinidad. Mutantes *hxk2Δ* presentan una reducción de hasta un 75% de la capacidad fermentativa de modo que su metabolismo es mayoritariamente respiratorio (Diderich et al., 2001; Rossell et al., 2008; Schuurmans et al., 2008b). Por otro lado, se conoce que Hxk2p interacciona tanto con el complejo Snf1p como con Mig1p y que la localización nuclear de Hxk2p es dependiente de Mig1p (Ahuatzi et al., 2007). Esta interacción se ha propuesto como un mecanismo de protección de la fosforilación de Mig1p en condiciones de alta concentración de glucosa y en las que hay presente una condición de estrés, hecho que permite la activación del complejo Sfn1. También se ha descrito que Hxk2p puede

interaccionar con Med8p, lo que en principio podría imposibilitar la interacción de esta proteína con la RNA polimerasa II (Gancedo, 2008).

3-. Principales factores transcripcionales que controlan el metabolismo respiro-fermentativo.

A pesar de la existencia de varias rutas de señalización diferentes, el control del metabolismo respiro-fermentativo se realiza principalmente por la intervención de tres factores transcripcionales. La importancia de los mismos se ve reflejada tanto en la cantidad de genes afectados por su desregulación, como por la importancia de las funciones desempeñadas. Esto no descarta la importancia de otros factores transcripcionales que controlen el metabolismo respiratorio, como por ejemplo la activación de ciertas enzimas del ciclo de Krebs necesarias para la asimilación de nitrógeno vía Rtg1-3p (Zaman et al., 2008).

En este sentido el principal represor catabólico es Mig1p, mientras que como activadores transcripcionales de la respiración y la gluconeogénesis están Hap4p y Cat8p, respectivamente (Figura IV.1)

3.1-. El represor transcripcional Mig1p.

Mig1p es uno de los principales factores transcripcionales que controlan la utilización de fuentes alternativas de glucosa. Mig1p realiza su función interaccionando con dos correpresores, Ssn6 y Tup1 (Schuller, 2003). Además de Mig1p existen otras dos proteínas relacionadas, Mig2p y Mig3p. Mig2p tiene funciones en la represión por glucosa aunque su localización no esta regulada por Snf1p; no obstante, su expresión también está inducida por la presencia de glucosa. Mig3p está regulada por Snf1p y su expresión se induce en presencia de glucosa. La regulación de los distintos genes sometidos a represión catabólica puede deberse principalmente a la acción de Mig1p, bien exclusivamente o bien con la participación de Mig2p, mientras que Mig3p actúa sin cooperación de Mig1p o de Mig2p (Westholm et al., 2008).

Mig1p se une físicamente a la secuencia consenso (G/C)(G/T)GG(G/A)G pero requiere que en su extremo 5' exista de una región rica en AT (Lundin et al., 1994). Esta secuencia ha sido descrita en genes implicados en el consumo de fuentes de carbono alternativas a la glucosa (*SUC2*, *MALR*, *MALT*, *GALA...*), la gluconeogénesis (*FBP1*, *CAT8*) y la respiración (*CYT1*, *COX5b*, *QCR8 y 9*, *HAP4*) (Klein et al., 1998). La

regulación que se realiza por Mig1p puede darse a dos niveles, por un lado la regulación directa del promotor del gen reprimido, y por otro la regulación tanto del gen que codifica para la enzima como del gen que actúa como activador transcripcional del mismo (Rolland et al, 2002).

3.2-. El activador transcripcional Cat8p.

Cat8p junto a Sip4p constituyen los principales elementos reguladores de las cajas CSRE (Carbon Source Response Elements). La regulación de *CAT8* se da a dos niveles, por un lado transcripcional, con Mig1p reprimiendo su expresión en presencia de glucosa y por otro postraduccional, ya que la proteína no es funcional hasta ser fosforilada por Snf1p. Cat8p fosforilado, y por tanto activo, permite a su vez la expresión de *SIP4*. Ambas proteínas se encargan de la activación de la expresión de genes implicados en procesos gluconeogénicos y del ciclo del glioxilato (Schuller, 2003), como por ejemplo *FBP1* e *ICL1* o incluso *REG2*, que junto a Reg1p controlan a Glc7p. Además, Cat8p coregula varios genes con Adr1p, cuya regulación a su vez se realiza por desfosforilación dependiente de la ruta de señalización de Snf1 (Ratnakumar et al., 2009). Entre los genes que son coregulados se podrían poner como ejemplo *ADH2* y *ACS1*, entre otros (Tachibana et al., 2005).

3.3-. El activador transcripcional HAP.

Para la identificación de los componentes responsables de la activación transcripcional de los genes implicados en la respiración, fue imprescindible el uso de la región promotora del gen *CYC1*. Este gen presenta una regulación en cis a dos niveles, por un lado su expresión es baja en condiciones de anaerobiosis o de baja concentración de grupos hemo intracelulares y además sufre represión catabólica (Guarente et al., 1984). Esta regulación se debe a una región implicada en la activación transcripcional, que se encuentra a una distancia aproximada de -275 pb. En estudios de deleciones de esta región promotora se pudo constatar que presentaba dos cajas de regulación colocadas en tandem y que fueron denominadas UAS1 y UAS2. La primera de ellas es la responsable de la regulación por anaerobiosis y grupo hemo, mientras que la segunda esta implicada en la activación del gen en condiciones de desrepresión catabólica (Guarente et al., 1984). El uso de estas secuencias fusionadas con el gen LacZ, que codifica la β -galactosidasa, permitió a su vez la identificación de elementos en *trans* que controlan la expresión del gen *CYC1*. De esta forma, se localizaron varios activadores de la expresión entre los que se encuentran: Hap1p,

responsable del control de UAS1 y Hap2p, Hap3p y Hap4p responsables de la regulación del UAS2 y por tanto de la activación transcripcional en condiciones de no represión catabólica por glucosa (Guarente et al., 1984; Pinkham et al., 1987; Forsburg and Guarente, 1988; Hahn and Guarente, 1988; Hahn et al., 1988; Forsburg and Guarente, 1989).

Ensayos realizados con las proteínas purificadas Hap2p y Hap3p, permitieron dilucidar la existencia de un tercer componente necesario para que éste tuviera la capacidad de unirse a ADN. Mediante metodología del doble híbrido, se determinó la presencia de otra proteína denominada Hap5p que forma parte del complejo de unión a ADN (McNabb et al., 1995).

HAP2 tiene una secuencia de nucleótidos de 798 pb que codifican una proteína de 265 aminoácidos. Hap2p presenta un dominio de ensamblaje de subunidades (SAD), localizada entre los residuos 162-178 y otro dominio de unión a ADN entre los residuos 194-214 (Xing et al., 1994). *HAP3* es un gen que codifica para una proteína de 144 aminoácidos. Hap3p presenta una región constituida por 7 aminoácidos responsable de la unión a ADN, localizada entre los residuos 42-48. También presenta una región SAD que se localiza entre los aminoácidos 69-80. Además de estas regiones, Hap3p presenta una región específica para el ensamblaje de Hap4p lo que favorece la unión de esta al heterotrimer, localizada entre las posiciones 81-113 (Xing et al., 1993). *HAP5* codifica para una proteína de 242 aminoácidos. Presenta una región SAD entre los aminoácidos 154-242, y también posee una región necesaria para que Hap4p se una al complejo entre los residuos 115-146 (McNabb et al., 1995; McNabb et al., 1997). *HAP4* codifica para una proteína de 554 aminoácidos. La región mínima necesaria para que Hap4p interactúe con el heterotrimer reside entre los residuos 23-180 de la proteína. Hap4p presenta dos dominios de activación transcripcional (TAD), el primero se localiza en la parte N-terminal de la proteína, entre los residuos 124 y 329, mientras que el segundo está en la región C-terminal y se localiza entre los residuos 330-554. Estos dos dominios tienen la capacidad de interactuar con diferentes proteínas lo que muestra diferentes niveles de dependencia de proteínas específicas que son coactivadoras de la transcripción (Stebbins and Triezenberg, 2004).

El complejo formado por Hap2p/Hap3p/Hap5p tiene la capacidad de unirse a la secuencia GCG TTG ATT GGT presente en el UAS2 identificándose por tanto la existencia de un homólogo a la caja CAAT que había sido anteriormente identificada en

eucariotas superiores (Forsburg and Guarente, 1988; McNabb and Pinto, 2005). La ausencia de cualquiera de las tres proteínas Hap2p/Hap3p/Hap5p, impide la formación del complejo de unión a ADN, y por tanto el mutante pierde la capacidad de crecer en medios con fuentes de carbono exclusivamente respirables. Hap2p y Hap3p interaccionan fuertemente a través de los dominios SAD, y Hap5p interacciona con ellas, favoreciendo una conformación que permite a los dominios de unión a ADN interactuar con la secuencia consenso, una interacción que se había demostrado algo débil en trabajos anteriores (Xing et al, 1993). Una vez unido el complejo al gen que se va a expresar, se produce la interacción de Hap2p/Hap3p/Hap5p con Hap4p, reclutando la maquinaria transcripcional (McNabb and Pinto, 2005).

Tanto *HAP2*, *HAP3* como *HAP5* presenta una expresión constitutiva, lo que permite al heterotrímero unirse a las secuencias que controla en todo momento. Por el contrario *HAP4* presenta represión catabólica, produciéndose la expresión a la entrada en fase de diauxia (DeRisi et al, 1997). Esto se debe a la existencia de una caja de unión funcional para Mig1p aproximadamente en la posición -350 de la región promotora de *HAP4* (Lundin et al., 1994). Existen tres inicios de transcripción, siendo los principales los situados a -280 pb y -330 pb (Forsburg and Guarente, 1989). La región 5' UTR de *HAP4* no presenta regulación postranscripcional, por lo que el control de *HAP4* es exclusivamente transcripcional (McNabb and Pinto, 2005). También se ha descrito cajas de unión para Cat8p en las posiciones -741 y -1006. No obstante, no se ha podido determinar si esta relación es directa o si median otros factores (Brons et al., 2002).

A la vista de la información existente en la literatura, en este trabajo se pretende por un lado determinar si el control de la expresión de genes en las cepas industriales de interés en la industria panadera, es similar a lo descrito para cepas de laboratorio; por otro también se pretende sobreexpresar en cepas panaderas el factor transcripcional *HAP4*, ya que éste presenta únicamente regulación transcripcional y por tanto su sobreexpresión permitiría la obtención de mayor cantidad de biomasa en cultivos con alta concentración de fuente de carbono fermentable y fácilmente asimilable.

Resultados

1-. Patrones de expresión génica en cepas panaderas.

Para el análisis de la expresión génica mediante macroarrays se utilizaron las cepas panaderas V1 y DOG21 (Materiales y Métodos). DOG21 es un derivado de V1 desregulado en la represión catabólica, que se seleccionó por ser capaz de crecer en presencia del análogo tóxico de la glucosa, 2-desoxiglucosa y rafinosa como fuente de carbono (Rincón et al., 2001).

El análisis de expresión se realizó en dos medios de cultivo diferentes: YPD que contiene glucosa como fuente de carbono (metabolismo fermentativo) e YPG que contiene glicerol como fuente de carbono (metabolismo respiratorio). En ambos casos se recogieron las células en fase exponencial para evitar el paso a metabolismo respiratorio que experimentan los cultivos en YPD al llegar a la fase estacionaria.

1.1-. Patrones de expresión génica en la cepa V1 (YPD/YPG).

El Apéndice I muestra una relación de genes que presentan una diferencia de expresión mayor a 2.5 veces entre las dos condiciones analizadas (YPD/YPG). La función del gen se ha incorporado siempre que se conoce. En V1, un total de 292 genes presentan mayor expresión en YPD que en YPG, mientras que 550 genes presentan mayor expresión en YPG que en YPD. Los nombres de todos los genes con mayor expresión en una condición que en la otra fueron listados independientemente y se procedió a la búsqueda de términos ontológicos. Una ontología génica (Gen Ontology, GO) consiste en la agrupación de genes de forma jerárquica en relación al proceso que desempeña, la función o la localización que presentan en un vocabulario internacional y aplicable a todos los organismos. Para ello, ambas listas (no mostradas) fueron introducidas en dos programas distintos alojados en dos bases de datos diferentes. Por un lado se introdujeron en GO-Slim mapper, alojado en SGD, que permite tener una visión general de cuáles son las ramas de ontologías génicas más frecuentes, de una relación de genes dada (Apéndice II, Tablas A.1 y A.2). También se compararon ambas listas entre si con el programa FatiGO, alojado en el portal Babelomics (Al-Shahrour et al., 2008), lo que permite la búsqueda de terminologías ontológicas con valores elevados de significancia estadística (Apéndice II, Tabla A.3). La búsqueda se realizó en todos los casos considerando ontologías de procesos, funciones moleculares y localización celular.

En YPD, la cepa V1 presenta en conjunto una elevada expresión de genes implicados tanto en la biogénesis como en la estructura del ribosoma, así como genes implicados en el metabolismo de aminoácidos y aminos. Por el contrario en YPG resaltan procesos catabólicos, mucho de los cuales están implicados en la utilización de carbohidratos, en la generación de precursores metabólicos y energía, metabolismo del fósforo y una gran cantidad de genes que desarrollan sus funciones en la mitocondria.

1.2-. Patrones de expresión en la cepa DOG21 (YPD/YPG).

Los cocientes de expresión así como las funciones se muestran en el Apéndice III. DOG21 presenta un incremento de la expresión mayor a 2.5 veces en YPD respecto a YPG en 133 genes, mientras que el caso contrario engloba un total de 337 genes. Se confeccionaron dos listas, una con los genes con mayor expresión en YPD y otra con los de mayor expresión en YPG (no mostradas). Mediante GO-Slim Mapper se ha determinado cuáles de las terminologías GO están más representadas tanto en YPD como en YPG (Apéndice IV, Tablas A.4 y A.5). Y ambas listas fueron comparadas con FatiGO (Apéndice IV, Tabla A.6) lo que indica un menor número de ontologías, estadísticamente significativas, de lo que poseía la cepa V1. Para DOG21 sólo se obtienen términos ontológicos en relación a procesos biológicos con valores adecuados de significancia estadística. Entre los procesos destacan los implicados con el metabolismo de carbohidratos, generación de precursores metabólicos y energía. Estando sobre-representadas en el caso de genes que se expresan más en YPG que en YPD.

1.3-. Comparativa de los patrones de expresión respiratorio de las cepas V1 y DOG21

La cepa V1 y DOG21 presentan patrones de expresión diferentes; para poner esto de manifiesto se realizaron diagramas de Venn (Figura IV.3), que se basan en la teoría de conjuntos. De esta forma se realizan listados de genes que presentan mayor expresión en condiciones fermentativas que en respiratorias (el cociente YPD/YPG en Log_2 sería un valor positivo: “sube”) en cada una de las cepas y con mayor expresión en condiciones respiratorias que en fermentativas (El cociente YPD/YPG en log_2 , sería negativo: “baja”). Esto origina 4 listas independientes (o subconjuntos) que podemos comparar en busca de genes con un patrón definido y que comparten ambas cepas o bien genes que presenta un patrón exclusivo en alguna de las cepas. El uso de programas de búsqueda de términos GO

como GO term finder (alojado en SGD), permite la comparación de una lista concreta con el conjunto de genes que constituyen el genoma de las levaduras y que aporta un valor p estadístico que cuanto más próximo a cero es, mayor significancia tiene. En el caso de esta tesis, la lista concreta se refiere a postulados como por ejemplo “genes que “suben” o “bajan” tanto en V1 como en DOG21 en el cociente de expresión YPD/YPG” o “genes que “suben” o “bajan” sólo en V1 o sólo en DOG21 en el cociente de expresión YPD/YPG”. Por tanto, se pueden realizar cuatro comparaciones:

a) Genes que incrementan su expresión en YPD con respecto a YPG (Figura IV.3-A). El 22.3% de los genes de un total de 233, que se expresan exclusivamente en la cepa V1 (51 genes) están implicados en procesos relacionados con la traducción, con un valor p de $1.67e-06$, además el 20.6% de estos genes (11 genes) forman parte de proteínas constituyentes del ribosoma, con un valor p de $1.34e-24$. Los genes expresados exclusivamente en DOG21 (un total de 74 genes) no están agrupados en terminologías con significado estadístico. Por el contrario, de los 59 genes que son comunes a ambas cepas, el 20.3% de ellos (12 genes) están implicado en la biosíntesis de aminoácidos y de aminas con valores p de $4.66e-09$ y $1.33e-08$.

b) Genes que disminuyen su expresión en YPD con respecto a YPG (Figura IV.3-B). Algunos de los genes exclusivos de la cepa V1 están relacionados con la generación de metabolitos precursores de energía y con el metabolismo catabólico, con valores p de $2.40e-06$ y 0.008 , respectivamente. En torno al 29% de estos genes realizan su función en la mitocondria, con valor p de $6.43e-08$. Los 99 genes exclusivos de la cepa DOG21 se asocian con funciones implicadas en el transporte de hexosa, con valores p de 0.0033 , aunque sólo representan en su conjunto un 4% del total. Los genes comunes a ambas cepas presentan ontologías relacionadas con la generación de precursores metabólicos y energía, con valor p de $1.66e-10$, respiración celular, con valor p de $2.42e-08$, y metabolismo de carbohidratos, con valor p de $1.33e-05$.

c) Genes que se expresan más en YPD con respecto a YPG en la cepa V1 pero tienen un patrón contrario en la cepa DOG21 (Figura IV.3-C). Únicamente los genes *FYV1*, *RAD59* y *TIR4* cumplen estas condiciones. El primero está indicado en SGD como una ORF de función dudosa, que no está conservada en otras especies de *Saccharomyces* y cuya mutación reduce la supervivencia en presencia de la toxina K1; también se ha descrito un defecto en el crecimiento en fuentes de carbono fermentables en mutantes nulos.

Rad59p es homologa a Rad52p, por lo que está relacionada con al reparación de roturas de doble cadena del ADN. *TIR4* es una manoproteína y se expresa bajo condiciones anaeróbicas, siendo esencial en estas condiciones.

d) Genes que se expresan más en YPD con respecto a YPG en la cepa DOG21 pero tienen un patrón contrario en la cepa V1 (Figura IV.3-D). Los genes con patrones diferentes son *YBL100C* y *RCK1*. El primero es una ORF de función dudosa, aunque un mutante nulo tiene crecimiento defectuoso en fuentes de carbono respirables. *RCK1* codifica para una quinasa de proteínas implicadas en el estrés oxidativo y que interacciona con el factor transcripcional *YAP2*.

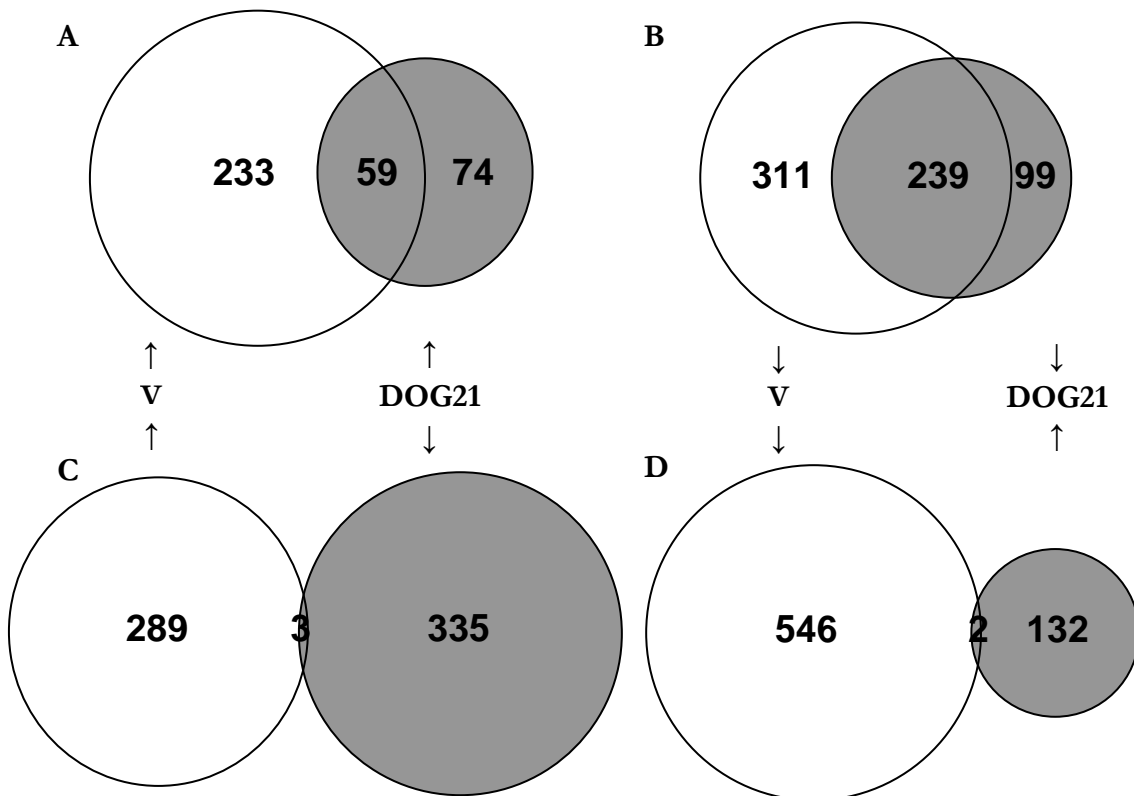


Figura IV.3-. Comparación de los patrones de expresión entre las cepas V1 y DOG21, mediante diagramas de Venn. El conjunto sin relleno representa a los genes de la cepa V1, mientras que el conjunto con relleno gris representa a genes de la cepa DOG21. La intersección indica un subconjunto de genes que ambas cepas presentan en común, mientras que los que no intersecan son exclusivos de cada una de las cepas. El conjunto de genes que “suben” en YPD/YPG tanto en V1 como en DOG21 (A), El conjunto de genes que “bajan” en YPD/YPG tanto en V1 como en DOG21 (B), El conjunto de genes que “suben” en V1 pero “bajan” en DOG21 en YPD/YPG (C) y viceversa (D).

1.4-. Diferencias de expresión entre la cepa V1 y DOG21 cultivadas en YPD o YPG.

Con el diseño experimental del apartado anterior sólo se pueden determinar diferencias relativas al cambio en la pauta de expresión en diferentes condiciones. Para establecer diferencias en la expresión entre las dos cepas se procedió a la realización de macroarrays de cada una de ellas en condiciones fermentativa o respiratoria. Como en apartados anteriores sólo se tuvieron en cuenta diferencias en la expresión de 2.5 veces, incorporándose toda la información en los Apéndices V y VII, respectivamente.

Nuevamente se realizaron dos listados correspondientes a genes con mayor o menor expresión en V1 que en DOG21 en condiciones fermentativas (no mostradas). En el caso de genes con mayor expresión en V1 que en DOG21 el listado está constituido por 262 genes mientras que el caso contrario está formado por un total de 170 genes. La relación de genes anteriores se introdujo en GO Slim-mapper (Apéndice VI, Tablas A.7 y A.8). La comparación entre las listas mediante FatiGO (Apéndice VI Tabla A.9) determina un enriquecimiento en genes relacionados con el metabolismo de las aminas y aminoácidos en el caso de V1, mientras que en DOG21 el incremento se da en genes del metabolismo de ácidos monocarboxílicos y del metabolismo de carbohidratos tales como *MAL* y *SUC2*, así como reguladores transcripcionales como *CAT8*.

El número de genes con mayor expresión en V1 que en DOG21 en YPG es de 170 genes, mientras que el caso contrario es de 51 genes. En estos casos, la introducción de las dos relaciones de genes en FatiGO no genera resultados estadísticamente significativos. No obstante, se ha realizado la búsqueda de términos ontológicos mediante GO-Slim mapper. En el caso de los genes con mayor expresión en V1 que en DOG21 en YPG, cabe destacar los implicados en el metabolismo de aminoácidos o factores transcripcionales como *RTG1* (Apéndice VIII, Tabla A.10), mientras que entre los genes con mayor expresión en DOG21 que en V1 en YPG, están los relacionados con la degradación de la L-fenilalanina (Apéndice VIII, Tabla A.11).

Las diferencias encontradas en las expresiones génicas tanto de V1 como de DOG21 cultivadas en condiciones fermentativas o respiratorias, son similares a las descritas en levaduras utilizadas en el laboratorio. Es decir, en condiciones fermentativas se produce una represión generalizada de los genes implicados en respiración y un incremento en la expresión de genes implicados en la biogénesis del ribosoma, asociada a un crecimiento rápido, mientras que en condiciones de respiración se induce la expresión de

genes involucrados en el ciclo del glioxilato, ciclo de Krebs, respiración y gluconeogénesis, todos asociados con procesos de generación de energía y por tanto de incremento en la biomasa. Sería posible por tanto mejorar las cepas incrementando su capacidad respiratoria mediante sobreexpresión del activador transcripcional *HAP4*

2-. Caracterización del gen *HAP4* en la cepa V1

Con objeto de clonar el gen *HAP4* de la cepa V1 se diseñaron los cebadores HAP4speI.u y HAP4bamHI.l a partir de la secuencia de la cepa S288C disponible en la base de datos SDG (Materiales y Métodos). Estos cebadores amplifican la región codificante del gen desde la posición +1 hasta la +1665 y poseen sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción SpeI o BamHI para facilitar su posterior clonación. El producto de la amplificación se clonó en vectores de la serie p416gpd y p416tef. El promotor del gen *TDH3* controla la expresión en el primero, mientras que en el segundo se realiza mediante el promotor del gen *TEF2*. Estos son promotores constitutivos en medio YPD, y que permiten diferentes niveles de expresión, mayor en el caso del promotor del

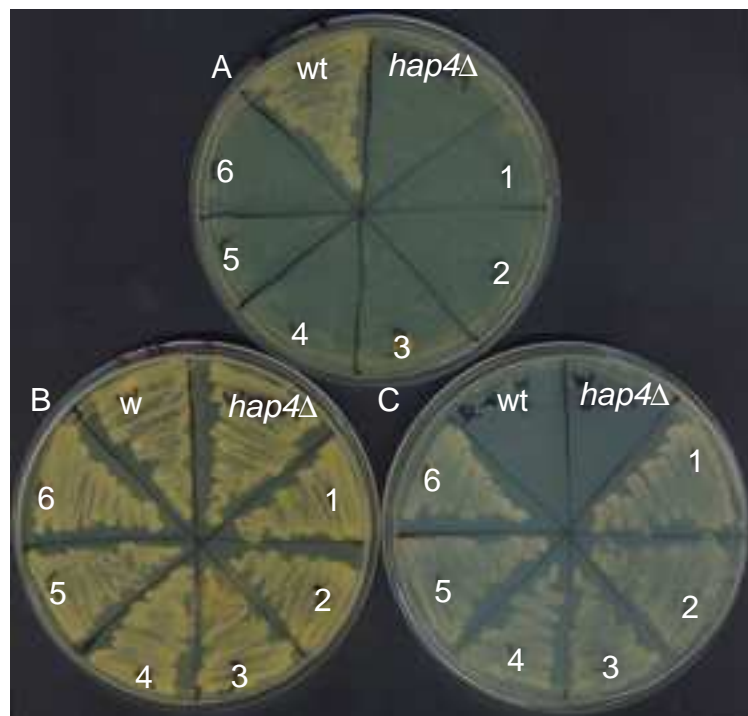


Figura IV.4. Panel representativo de la funcionalidad del alelo $v1hap4$ en las cepas BY $hap4\Delta$ ($hap4\Delta$), BY4741 (wt) y transformantes (1 a 6). YPG (A); YPD (B); SC -ura, (C).

gen *TDH3* que en el del gen *TEF2*. La funcionalidad de los plásmidos p416tef:: $v1HAP4$ y

p416gpd::v1*HAP4* (Materiales y Métodos) se realizó mediante transformación de cepa *BYhap4Δ* que posee una delección que comprende toda la región codificante de *HAP4*, y es por tanto incapaz de crecer en medios con fuentes de carbono respirables como el glicerol. Tras la transformación se seleccionaron los transformantes en medio SC –ura y posteriormente se replicaron a medio YPG, YPD y SC –ura. De todas las colonias seleccionadas ninguna fue capaz de complementar el fenotipo del mutante *BYhap4Δ* (Figura IV.4). Por este motivo, se secuenciaron los alelos de cada uno de los plásmidos. Las secuencias obtenidas presentaban una única diferencia en la posición 929, donde una adenina (A) es sustituida por una timina (T). Al comparar ambas secuencias con la secuencia disponible en SGD se observaron varias diferencias: una delección de una citosina (C) en la posición 218; una delección de un triplete ATA en la posición 385; una inserción de un triplete AAT en la posición 337; una transición T→C en la posición 344; una transición C→T en la posición 570; además en la posición 615 un doblete TC cambia su orientación por CT (Figura IV.5).

Atendiendo a estas diferencias se procedió a traducir, *in silico*, la secuencia de nucleótidos para determinar si la presencia de estas mutaciones provoca una pérdida en la función de la proteína (Figura IV.6). La delección de la citosina 218 provoca la aparición de un codón de terminación en la posición 286, así como el cambio de la secuencia de aminoácidos consenso desde el residuo 72 de la proteína, lo que produce una proteína truncada no funcional.

La cepa V1 es aneuploide, con un contenido en ADN de 4.2 (Capítulo I), lo que implica la existencia de varios loci *HAP4* de los que al menos uno de ellos ha de ser funcional ya que la cepa presenta crecimiento en medios que contienen etanol o glicerol como única fuente de carbono.

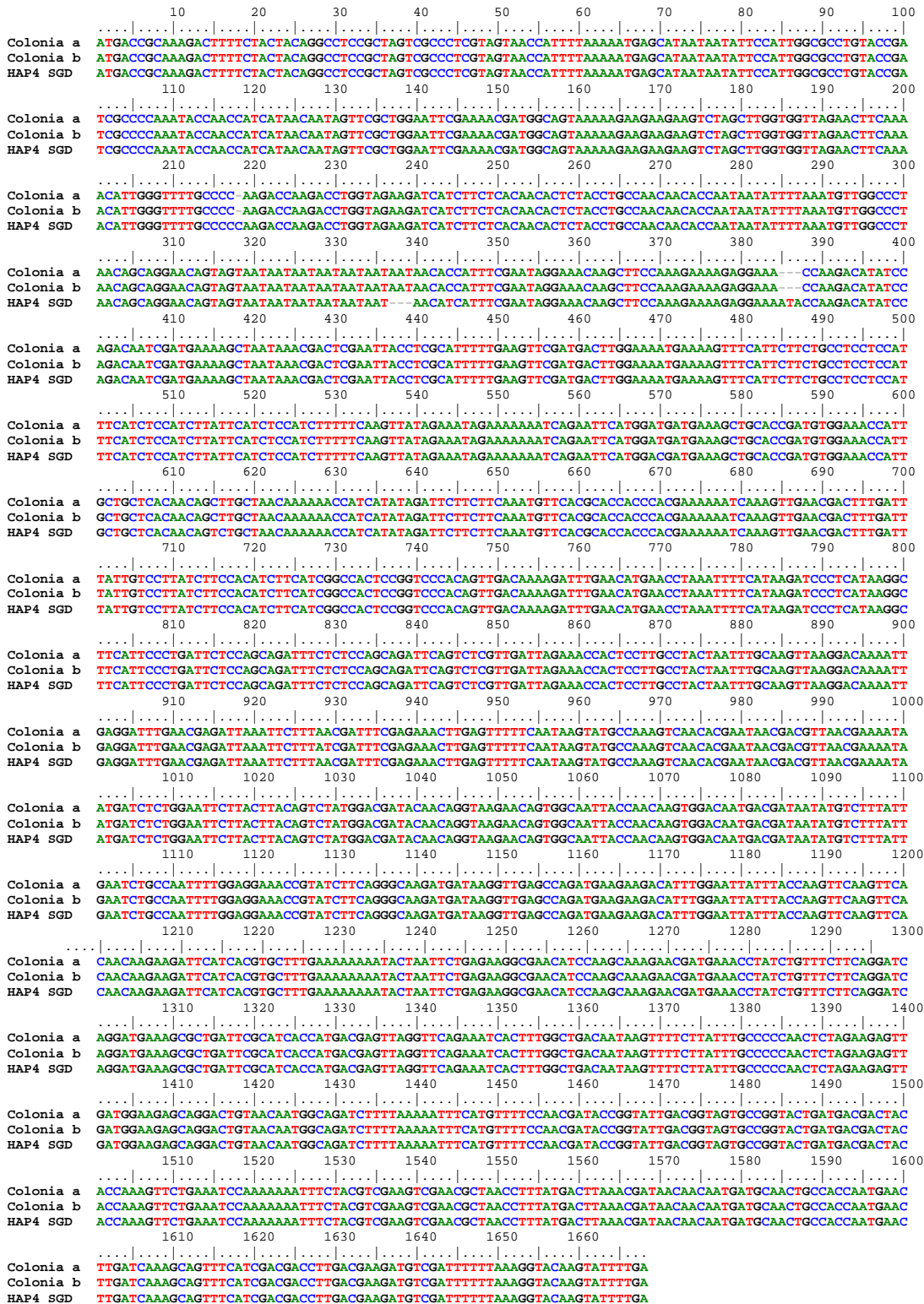


Figura IV.5. Alineación de secuencias mediante clustalW del alelo *v1hap4* contenidos en *p416tef::v1HAP4* (colonia a) y *p416gpd::v1HAP4* (colonia b) y la secuencia consenso de *HAP4* presente en SGD. – indica la ausencia de algún nucleótido.

A

```

1 Met Thr Ala Lys Thr Phe Leu Leu Gln Ala Ser Ala Ser Arg Pro
16 Arg Ser Asn His Phe Lys Asn Glu His Asn Asn Ile Pro Leu Ala
31 Pro Val Pro Ile Ala Pro Asn Thr Asn His His Asn Asn Ser Ser
46 Leu Glu Phe Glu Asn Asp Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Ser Ser
61 Leu Val Val Arg Thr Ser Lys His Trp Val Leu Pro Gln Asp Gln
76 Asp Leu Val Glu Asp His Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Leu Pro Thr
91 Thr Pro Ile Ile Phe End
    
```

B

```

1 Met Thr Ala Lys Thr Phe Leu Leu Gln Ala Ser Ala Ser Arg Pro
16 Arg Ser Asn His Phe Lys Asn Glu His Asn Asn Ile Pro Leu Ala
31 Pro Val Pro Ile Ala Pro Asn Thr Asn His His Asn Asn Ser Ser
46 Leu Glu Phe Glu Asn Asp Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Ser Ser
61 Leu Val Val Arg Thr Ser Lys His Trp Val Leu Pro Gln Asp Gln
76 Asp Leu Val Glu Asp His Leu Leu Thr Thr Leu Tyr Leu Pro Thr
91 Thr Pro Ile Ile Phe End
    
```

C

```

1 Met Thr Ala Lys Thr Phe Leu Leu Gln Ala Ser Ala Ser Arg Pro
16 Arg Ser Asn His Phe Lys Asn Glu His Asn Asn Ile Pro Leu Ala
31 Pro Val Pro Ile Ala Pro Asn Thr Asn His His Asn Asn Ser Ser
46 Leu Glu Phe Glu Asn Asp Gly Ser Lys Lys Lys Lys Lys Ser Ser
61 Leu Val Val Arg Thr Ser Lys His Trp Val Leu Pro Pro Arg Pro
76 Arg Pro Gly Arg Arg Ser Ser Ser Ser His Asn Thr Leu Pro Ala Asn
91 Asn Thr Asn Asn Ile Leu Asn Val Gly Pro Asn Ser Arg Asn Ser
106 Ser Asn Asn Asn Asn Asn Asn Asn Ile Ile Ser Asn Arg Lys Gln
121 Ala Ser Lys Glu Lys Arg Lys Ile Pro Arg His Ile Gln Thr Ile
136 Asp Glu Lys Leu Ile Asn Asp Ser Asn Tyr Leu Ala Phe Leu Lys
151 Phe Asp Asp Leu Glu Asn Glu Lys Phe His Ser Ser Ala Ser Ser
166 Ile Ser Ser Pro Ser Tyr Ser Ser Pro Ser Phe Ser Ser Tyr Arg
181 Asn Arg Lys Lys Ser Glu Phe Met Asp Asp Glu Ser Cys Thr Asp
196 Val Glu Thr Thr Ile Ala Ala His Asn Ser Leu Leu Thr Lys Asn His
211 His Ile Asp Ser Ser Ser Ser Asn Val His Ala Pro Pro Thr Lys Lys
226 Ser Lys Leu Asn Asp Phe Asp Leu Leu Ser Leu Ser Ser Thr Ser
241 Ser Ser Ala Thr Pro Val Pro Gln Leu Thr Lys Asp Leu Asn Met
256 Asn Leu Asn Phe His Lys Ile Pro His Lys Ala Ser Phe Pro Asp
271 Ser Pro Ala Asp Phe Ser Pro Ala Asp Ser Val Ser Leu Ile Arg
286 Asn His Ser Leu Pro Thr Asn Leu Gln Val Lys Asp Lys Ile Glu
301 Asp Leu Asn Glu Ile Lys Phe Phe Asn Asp Phe Glu Lys Leu Glu
316 Phe Phe Asn Lys Tyr Ala Lys Val Asn Thr Asn Asn Asp Val Asn
331 Glu Asn Asn Asp Leu Trp Asn Ser Tyr Leu Gln Ser Met Asp Asp
346 Thr Thr Gly Lys Asn Ser Gly Asn Tyr Gln Gln Val Asp Asn Asp
361 Asp Asn Met Ser Leu Leu Asn Leu Pro Ile Leu Glu Glu Thr Val
376 Ser Ser Gly Gln Asp Asp Lys Val Glu Pro Asp Glu Glu Asp Ile
391 Trp Asn Tyr Leu Pro Ser Ser Ser Ser Gln Gln Glu Asp Ser Ser
406 Arg Ala Leu Lys Lys Asn Thr Asn Ser Glu Lys Ala Asn Ile Gln
421 Ala Lys Asn Asp Glu Thr Tyr Leu Phe Leu Gln Asp Gln Asp Glu
436 Ser Ala Asp Ser His His His Asp Glu Leu Gly Ser Glu Ile Thr
451 Leu Ala Asp Asn Lys Phe Ser Tyr Leu Pro Pro Thr Leu Glu Glu
466 Leu Met Glu Glu Gln Asp Cys Asn Asn Gly Arg Ser Phe Lys Asn
481 Phe Met Phe Ser Asn Asp Thr Gly Ile Asp Gly Ser Ala Gly Thr
496 Asp Asp Asp Tyr Thr Lys Val Leu Lys Ser Lys Lys Ile Ser Thr
511 Ser Lys Ser Asn Ala Asn Leu Tyr Asp Leu Asn Asp Asn Asn Asn
526 Asp Ala Thr Ala Thr Asn Glu Leu Asp Gln Ser Ser Phe Ile Asp
541 Asp Leu Asp Glu Asp Val Asp Phe Leu Lys Val Gln Val Phe End
    
```

Figura IV.6. Secuencia de aminoácidos deducida de la traducción de las secuenciación (**A** y **B**) obtenidas de las dos colonias analizadas. Secuencia de aminoácidos de la proteína funcional (**C**). La delección de la citosina en posición 218 provoca la aparición de un codón de terminación, que genera una proteína truncaada.

Para clonar uno de los alelos funcionales de la cepa V1 se diseñaron nuevos cebadores complementarios al promotor y el terminador de *HAP4*, denominados HAP4pro.u y HAP4ter.l (Materiales y Métodos). Estos cebadores amplifican un fragmento que comprende desde la posición - 63, hasta la posición +1769 del terminador del gen con suficiente homología como para reemplazar la región delecionada del *HAP4* de la cepa *BYhap4Δ*. Esto permite seleccionar transformantes de esta cepa que presenten un alelo funcional de *HAP4* de la cepa V1, por selección en medio YPG. De esta forma, se ha podido establecer que el cebador HAP4bamH1.l, utilizado para amplificar en primera instancia el *HAP4* de V1, no es capaz de aparear con el alelo funcional (Figura IV.7).

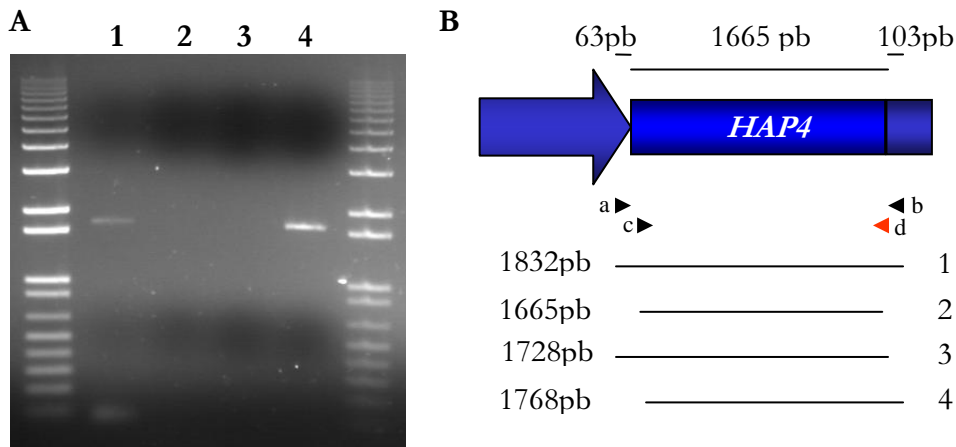


Figura IV.7. Obtención del alelo funcional *v1HAP4*. Se muestra electroforesis de los productos de PCR obtenidos con el uso de los distintos cebadores (A) y el esquema teórico-ilustrativo (B). 1 es el producto de amplificación obtenido con la pareja de cebadores HAP4pro.u (a) y HAP4ter.l (b); 2 con HAP4speI.u (c) y HAP4bamHI.l (d); 3 con a y d, y 4 con c y b.

El análisis de la secuencia y las comparaciones entre el alelo funcional de *HAP4* (*v1HAP4*), el no funcional (*v1hap4*) y el *HAP4* de la cepa S288c (*HAP4* SGD) (Figura IV.8) indican por un lado la existencia de similitudes entre *v1HAP4* y *v1hap4* pero que difieren de la secuencia consenso del *HAP4* de S288C (transición en las posiciones 344 y 570, la deleción del codón ATA en la posición 385 y la inversión de TC a CT de la posición 615), diferencias de *v1HAP4* con respecto a posiciones comunes para *v1hap4* y *HAP4* SGD (las transiciones de A→G de las posiciones 323, 375, 415 y 1164; y las transiciones de C ↔ T de las posiciones 426 y 1378) y diferencias de *v1hap4* con respecto a posiciones comunes para *v1HAP4* y *HAP4* SGD (deleción de C en la posición 217 y TAA en la posición 339).



Figura IV.8. Secuencias alineadas mediante clusterW del alelo *v1hap4* consenso, el alelo *v1HAP4* y la secuencia consenso de *HAP4* de la SGD. Los – indican la ausencia de nucleótidos.

La traducción in silico de la secuencia de este alelo funcional genera una proteína funcional, muy semejante a la de la cepa S288C salvo por los cambios de $\text{Apn}^{108} \rightarrow \text{Ser}^{108}$, $\text{Ile}^{114} \rightarrow \text{Thr}^{114}$, $\text{Lys}^{138} \rightarrow \text{Glu}^{137}$ y la eliminación del residuo Ile^{128} (Figura IV.9).

A

1	Met	Thr	Ala	Lys	Thr	Phe	Leu	Leu	Gln	Ala	Ser	Ala	Ser	Arg	Pro	15
16	Arg	Ser	Asn	His	Phe	Lys	Asn	Glu	His	Asn	Asn	Ile	Pro	Leu	Ala	30
31	Pro	Val	Pro	Ile	Ala	Pro	Asn	Thr	Asn	His	His	Asn	Asn	Ser	Ser	45
46	Leu	Glu	Phe	Glu	Asn	Asp	Gly	Ser	Lys	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Ser	60
61	Leu	Val	Val	Arg	Thr	Ser	Lys	His	Trp	Val	Leu	Pro	Pro	Arg	Pro	75
76	Arg	Pro	Gly	Arg	Arg	Ser	Ser	Ser	His	Asn	Thr	Leu	Pro	Ala	Asn	90
91	Asn	Thr	Asn	Asn	Ile	Leu	Asn	Val	Gly	Pro	Asn	Ser	Arg	Asn	Ser	105
106	Ser	Asn	Ser	Asn	Asn	Asn	Asn	Asn	Thr	Ile	Ser	Asn	Arg	Lys	Gln	120
121	Ala	Ser	Lys	Glu	Lys	Arg	Lys	Pro	Arg	His	Ile	Gln	Thr	Ile	Asp	135
136	Glu	Glu	Leu	Ile	Asn	Asp	Ser	Asn	Tyr	Leu	Ala	Phe	Leu	Lys	Phe	150
151	Asp	Asp	Leu	Glu	Asn	Glu	Lys	Phe	His	Ser	Ser	Ala	Ser	Ser	Ile	165
166	Ser	Ser	Pro	Ser	Tyr	Ser	Ser	Pro	Ser	Phe	Ser	Ser	Tyr	Arg	Asn	180
181	Arg	Lys	Lys	Ser	Glu	Phe	Met	Asp	Asp	Glu	Ser	Cys	Thr	Asp	Val	195
196	Glu	Thr	Ile	Ala	Ala	His	Asn	Ser	Leu	Leu	Thr	Lys	Asn	His	His	210
211	Ile	Asp	Ser	Ser	Ser	Asn	Val	His	Ala	Pro	Pro	Thr	Lys	Lys	Ser	225
226	Lys	Leu	Asn	Asp	Phe	Asp	Leu	Leu	Ser	Leu	Ser	Ser	Thr	Ser	Ser	240
241	Ser	Ala	Thr	Pro	Val	Pro	Gln	Leu	Thr	Lys	Asp	Leu	Asn	Met	Asn	255
256	Leu	Asn	Phe	His	Lys	Ile	Pro	His	Lys	Ala	Ser	Phe	Pro	Asp	Ser	270
271	Pro	Ala	Asp	Phe	Ser	Pro	Ala	Asp	Ser	Val	Ser	Leu	Ile	Arg	Asn	285
286	His	Ser	Leu	Pro	Thr	Asn	Leu	Gln	Val	Lys	Asp	Lys	Ile	Glu	Asp	300
301	Leu	Asn	Glu	Ile	Lys	Phe	Phe	Asn	Asp	Phe	Glu	Lys	Leu	Glu	Phe	315
316	Phe	Asn	Lys	Tyr	Ala	Lys	Val	Asn	Thr	Asn	Asn	Asp	Val	Asn	Glu	330
331	Asn	Asn	Asp	Leu	Trp	Asn	Ser	Tyr	Leu	Gln	Ser	Met	Asp	Asp	Thr	345
346	Thr	Gly	Lys	Asn	Ser	Gly	Asn	Tyr	Gln	Gln	Val	Asp	Asn	Asp	Asp	360
361	Asn	Met	Ser	Leu	Leu	Asn	Leu	Pro	Ile	Leu	Glu	Glu	Thr	Val	Ser	375
376	Ser	Gly	Gln	Asp	Asp	Lys	Val	Glu	Pro	Asp	Glu	Glu	Asp	Ile	Trp	390
391	Asn	Tyr	Leu	Pro	Ser	Ser	Ser	Ser	Gln	Gln	Glu	Asp	Ser	Ser	Arg	405
406	Ala	Leu	Lys	Lys	Asn	Thr	Asn	Ser	Glu	Lys	Ala	Asn	Ile	Gln	Ala	420
421	Lys	Asn	Asp	Glu	Thr	Tyr	Leu	Phe	Leu	Gln	Asp	Gln	Asp	Glu	Ser	435
436	Ala	Asp	Ser	His	His	His	Asp	Glu	Leu	Gly	Ser	Glu	Ile	Thr	Leu	450
451	Ala	Asp	Asn	Lys	Phe	Ser	Tyr	Leu	Pro	Pro	Thr	Leu	Glu	Glu	Leu	465
466	Met	Glu	Glu	Gln	Asp	Cys	Asn	Asn	Gly	Arg	Ser	Phe	Lys	Asn	Phe	480
481	Met	Phe	Ser	Asn	Asp	Thr	Gly	Ile	Asp	Gly	Ser	Ala	Gly	Thr	Asp	495
496	Asp	Asp	Tyr	Thr	Lys	Val	Leu	Lys	Ser	Lys	Lys	Ile	Ser	Thr	Ser	510
511	Lys	Ser	Asn	Ala	Asn	Leu	Tyr	Asp	Leu	Asn	Asp	Asn	Asn	Asn	Asp	525
526	Ala	Thr	Ala	Thr	Asn	Glu	Leu	Asp	Gln	Ser	Ser	Phe	Ile	Asp	Asp	540
541	Leu	Asp	Glu	Asp	Val	Asp	Phe	Leu	Lys	Val	Gln	Val	Phe	End		

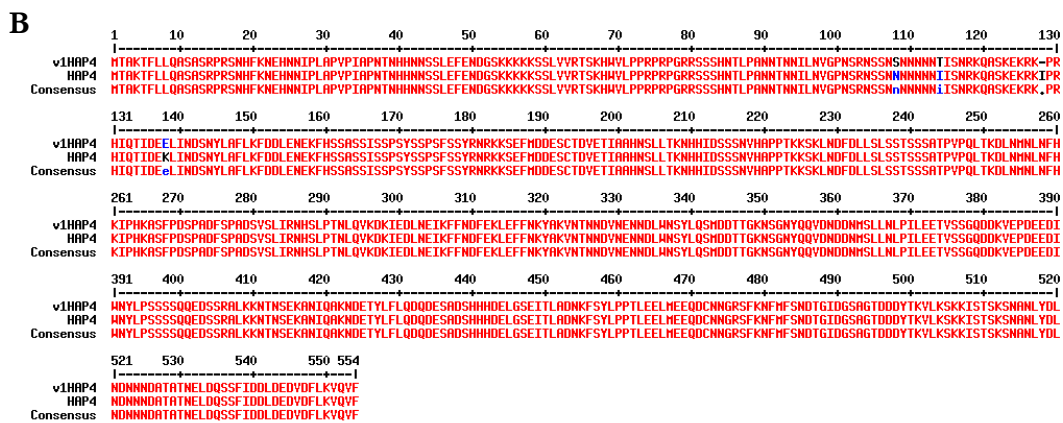


Figura IV.9. Proteína deducida del alelo funcional (A) y alineamiento entre las proteínas del apartado A y de la proteína de S288C (B).

3-. Estrategia para la integración del gen *HAP4* en cepas panaderas.

La amplificación del gen *HAP4* se realizó a partir de ADN genómico de la cepa cenpk113-7D. Para ello se utilizaron los cebadores HAP4speI.u y HAP4bamHI.l y el producto de la PCR se clonó en plásmidos de la serie p416tef y p416gpd.

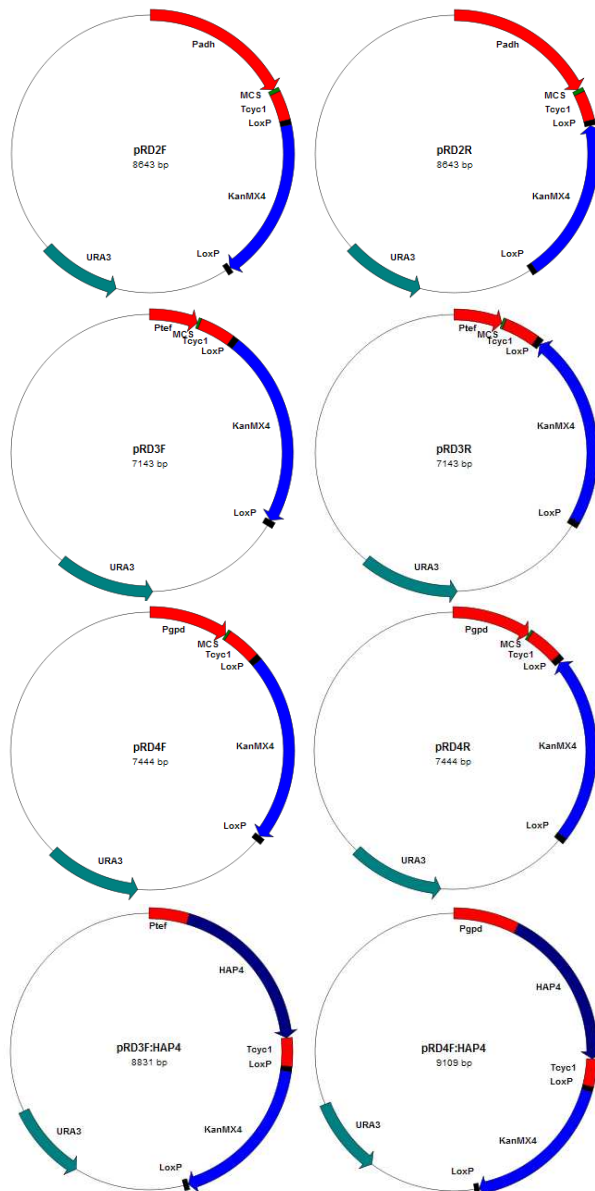


Figura IV.10. Plásmidos obtenidos de la inserción de *KanMX4*, flanqueado por secuencias *LoxP*. Todos presentan una casete de resistencia a ampicilina y un centrómero para su segregación en levaduras (no se muestra). El MCS, sólo presenta dianas únicas para las enzimas: BamHI, EcoRI y Sall.

Tras comprobar la funcionalidad del alelo, se modificaron estos plásmidos, insertando el casete de resistencia a genética (gen *KanMX4*) flanqueado por sitios *LoxP*. Además de éstos se construyeron los plásmidos vacíos, que no presentan ningún inserto en la región de clonado múltiple, y la modificación del plásmido de la serie p416adh (Figura IV.10, Materiales y Métodos).

De esta forma la estrategia consistió en amplificar la construcción con casete de resistencia incluido, dirigirla al locus *URA3* con los cebadores UraT3.u y Ura3LoxP2.l, (Materiales y Métodos).

Posteriormente se procedió a transformar de nuevo con el plásmido pGDF1 (Materiales y Métodos) que confiere resistencia a cicloheximida y porta la recombinasa Cre bajo el control de un promotor inducible por galactosa. En presencia de dicho azúcar, se produce la expresión de Cre, que realiza la recombinación entre las secuencias *LoxP*

flanqueantes del gen *KanMX4*, lo que provoca la escisión de dicho gen. Posteriormente se procede a cultivar estos transformantes en medios no selectivos lo que permite la pérdida del plásmido pGDF1. Por tanto, esta estrategia permite la obtención de transformantes que no presentan marcadores de resistencia a antibiótico. Además no es necesaria la obtención de cepas de levaduras auxótrofas para poder seleccionar construcciones y permitiría el uso del mismo marcador en sucesivas transformaciones, lo que facilita la manipulación genética en cepas poliploides.

Las transformaciones se llevaron a cabo en tres cepas panaderas: V1, DOG21 y V3, así como en la cepa de laboratorio S288C, utilizando las distintas construcciones. Las cepas V1 y DOG21 se transformaron con el plásmido P_{tef}:*HAP4*. y las cepas V3 y S288C tanto con P_{tef}:*HAP4* como con P_{gpd}:*HAP4*. En todas ellas se eliminó el gen de resistencia *KanMX4* y las cepas resultantes se denominaron VTH, DTH, 3TH, 3GH, STH y SGH, respectivamente.

4-. Comprobación de la estabilidad genómica y del número de inserciones de la construcción en los distintos transformantes.

La estabilidad genómica de las levaduras transformadas se determinó mediante cariotipado (Figura IV.11-A). No se observan cambios en los cromosomas de las cepas VTH, DTH, 3TH, STH ni SGH, mientras que el transformante 3GH aparentemente ha perdido un cromosoma o parte de él, de posición intermedia entre la pareja IV-XII y la pareja VII-XV en la cepa S288C.

La hibridación de sondas de los genes *HAP4* (amplificado con Hap4.u y Hap4.l) y *URA3* (amplificado con URA3.S2.u y URA3.ci.l)(Figura IV.11-B y C) revela que la integración de *HAP4* se ha producido en el cromosoma V en todas las cepas transformadas excepto en VTH, donde la integración probablemente se ha producido en una de las copias adicionales de *URA3* que podría encontrarse en el cromosoma XI o en un cromosoma V de mayor tamaño.

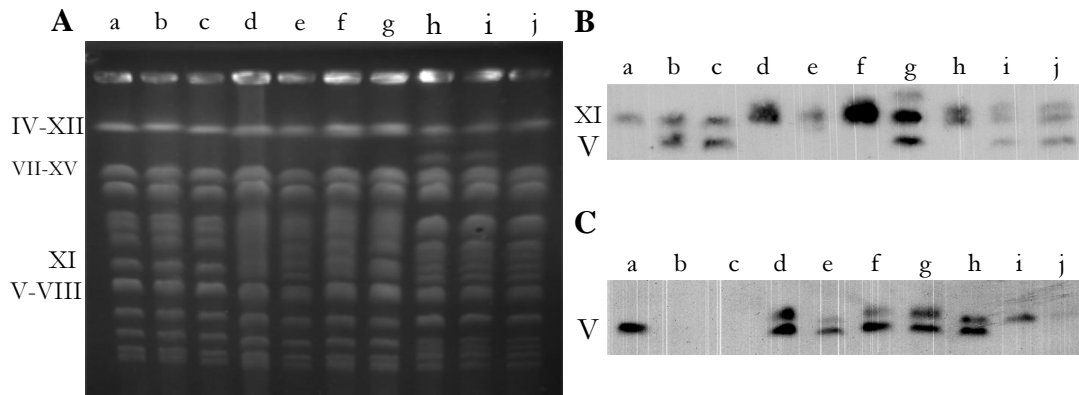


Figura IV.11. Cariotipo de las cepas (A), hibridación de cariotipos con las sondas de *HAP4* (B) y *URA3* (C) en las cepas S288C (a), STH (b), SGH (c), V1(d), VTH (e), DOG21 (f), DTH (g), V3 (h), 3TH(i) y 3GH (j). En números romanos se indican los cromosomas.

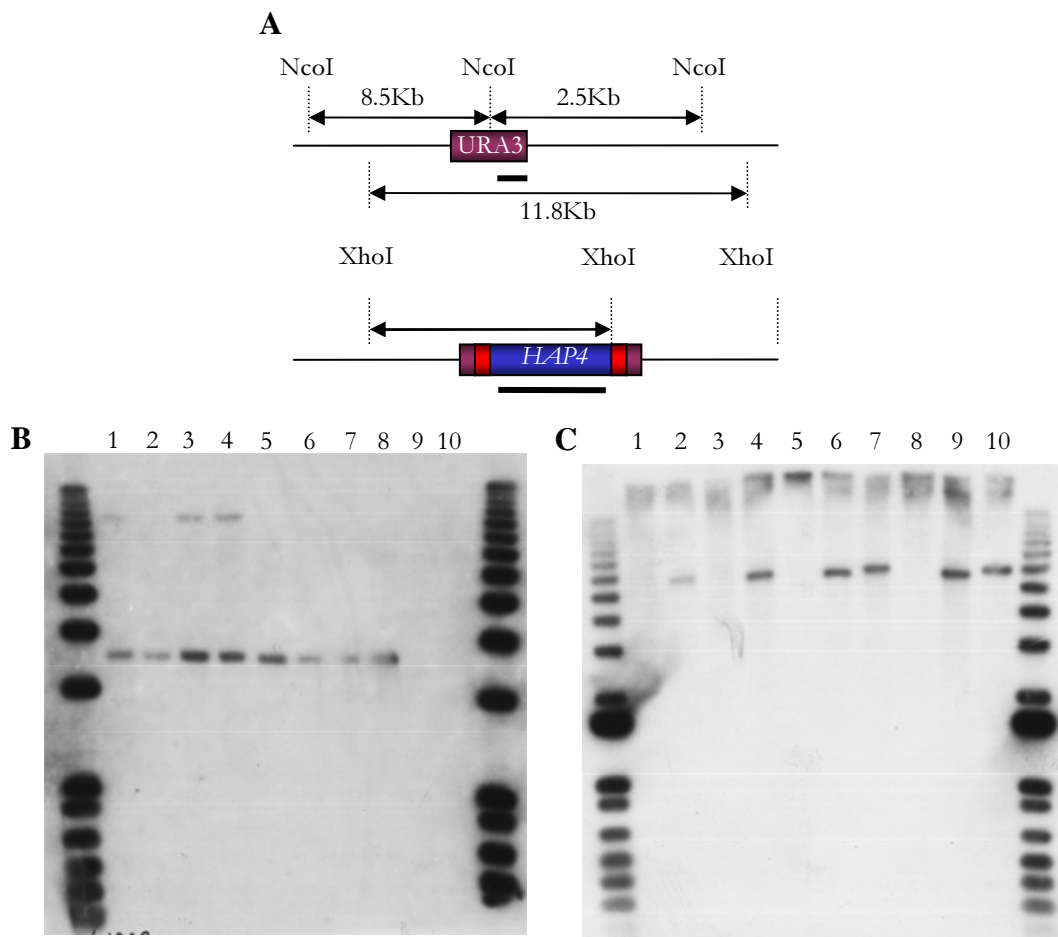


Figura IV.12. Esquema ilustrativo de las dianas utilizadas en Southern blot (A), Southern blot de digestión de ADN genómico con *NcoI* e hibridado con la sonda de *URA3* (B) y Southern blot de la digestión con *XhoI* e hibridado con una sonda de *HAP4* (C). Se representan V1 (1), VTH (2), DOG21 (3), DTH (4), V3 (5), 3TH (6), 3GH (7), S288C (8), STH (9) y SGH (10).

Para estimar el número de copias integradas se procedió al diseño experimental que se ilustra en la Figura IV.12-A. Consultando la secuencia de la cepa S288C, se utilizaron las enzimas NcoI y XhoI. NcoI corta dentro de la ORF del gen *URA3*, mientras que no lo hace en la de *HAP4*. Por el contrario, XhoI no corta ni en el gen *URA3*, ni en el gen *HAP4* endógeno, pero si lo hace dentro de la construcción utilizada. La distancia entre las dos dianas más inmediatas a la ORF del gen *HAP4* endógeno es superior a 20kb.

La digestión del ADN genómico con NcoI y su posterior hibridación con una sonda de la región posterior de *URA3* (Figura IV.12-A y B), nos permite la visualización de la región de menor tamaño. En el caso de V1 y DOG21 se ha podido distinguir polimorfismo en la región correspondiente al sitio de corte NcoI, que no se observó en el capítulo I. Dicho polimorfismo no se observa en la cepa V3.

La digestión del ADN genómico con XhoI y su posterior hibridación con una sonda que abarca todo el gen *HAP4* (Figura IV.12-A y C), permite visualizar tanto las copias endógenas de *HAP4* en las distintas cepas como la copia exógena. De esta forma, se observan varias hibridaciones, de las cuales, las de alto peso molecular corresponderían a las copia/as del gen endógeno y la de menor peso molecular a la copia exógena.

Debido a las aneuploidías de la cepa, no se puede concluir que el gen de la construcción esté en copia única. No se puede determinar la delección de cualquier otro gen ya que la mutación producida sería probablemente recesiva. De todas formas sí parece razonable que si el objetivo es la sobreexpresión del gen, el que exista una o más copias podría ser irrelevante.

5-. Niveles de expresión de *HAP4* y otros genes de interés en las cepas transformadas.

Los análisis de expresión génica se realizaron en dos condiciones. Por un lado se ensayó la expresión de dichos genes en condiciones de represión del gen *HAP4* (medio YPD) y por otro se analizó la expresión en un medio que mimetiza al empleado en condiciones industriales (medio MAB). Los genes analizados han sido, además de *HAP4*, *QCR7* y *QCR8*, dos genes implicados en respiración que transcriben proteínas para el complejo citocromo bc1 u oxidoreductasa de ubiquinol-citocromo C; y *MAL12* y *SUC2*, dos genes implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas a la glucosa, el primero codifica para la maltasa y el segundo codifica para la invertasa.

La expresión del gen *HAP4* en medio YPD, donde la fuente de carbono fermentable es glucosa, aumenta más de tres veces cuando está bajo el control del promotor *TEF2* (Figura IV.13-A), y más de diez veces cuando está bajo el control del promotor *TDH3* (gpd). Este incremento se ve reflejado en un aumento en la expresión de los dos genes implicados en procesos respiratorios. No obstante, niveles mayores de expresión de *HAP4* no se traducen en un incremento proporcional en la expresión de los genes *QCR7* y *QCR8*. La sobre-expresión de *HAP4* parece reprimir la expresión de *MAL12* en la cepa V1 aunque este comportamiento no es general si no que es dependiente del fondo genético de la cepa que se analice, no observándose diferencias significativas en la mayoría de los casos entre los transformantes y sus cepas parentales. En cuanto al gen *SUC2* no parece que haya diferencia significativa en su expresión.

En medio MAB, donde la fuente de carbono fermentable es sacarosa, la expresión de *HAP4*, alcanza niveles similares a los alcanzados en medio YPD (Figura IV.13-B). La expresión de *QCR7* y *QCR8* también aumenta, oscilando entre 2 y 4 veces más en los transformantes que en la cepa parental. Con respecto al gen *MAL12*, hay un incremento de hasta dos veces en todos los fondos analizados. La expresión del gen *SUC2* también parece estar afectada y además es dependiente del fondo genético. De esta forma, VTH presenta un incremento en la expresión de hasta 4 veces. Sin embargo, ni en DTH ni en 3TH se observan cambios significativos. El caso de 3GH es el más curioso debido a una represión de hasta 1.8 veces con respecto a la cepa parental.

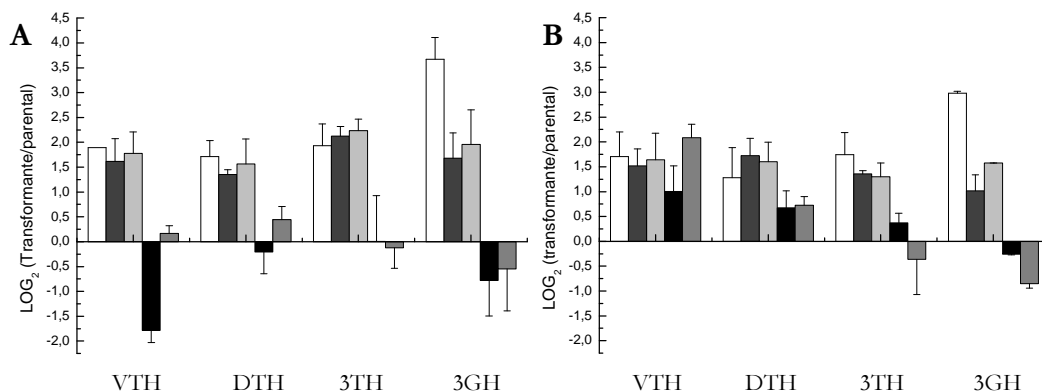


Figura IV.13-. Expresión relativa de *HAP4* en las cepas sobre-expresantes, en células creciendo en fase exponencial en medio YPD (A) y MAB (B). La expresión obtenida para cada uno de los genes en el las cepas transformantes se divide entre la expresión de cada uno de los genes de la cepa parental. *HAP4* (blanco), *QCR7* (gris oscuro), *QCR8* (gris claro), *MAL12* (negro) y *SUC2* (gris).

6-. Caracterización fisiológica.

6.1-. Caracterización fisiológica en medio de laboratorio YPD.

6.1.1-. Crecimiento y consumos de glucosa.

La cepa V1 y su transformante presentan un comportamiento similar tanto en crecimiento como en consumo de glucosa (Figura IV.14-A). La tasa máxima de crecimiento no presenta diferencias significativas (Tabla IV.4). No obstante, se observa un incremento en la DO del cultivo del transformante con respecto al parental al final de la fase exponencial y entrada en diauxia que se mantiene a lo largo de la fase estacionaria, alcanzando un incremento de hasta un 12% del valor medio del parental al final del cultivo. La tasa de consumo de glucosa no presenta diferencias significativas (Tabla IV.4).

La cepa DOG21 muestra grandes diferencias con respecto a DTH (Figura IV.14-B). El transformante DTH presenta un descenso del 11.5% en la velocidad de incorporación de la glucosa. Esto no tiene un efecto claro en la tasa de crecimiento (Tabla IV.4). De hecho, tras la salida de la fase de crecimiento exponencial, en la fase de diauxia la DO del transformante supera a la de la cepa parental. Esta diferencia no se observa tan

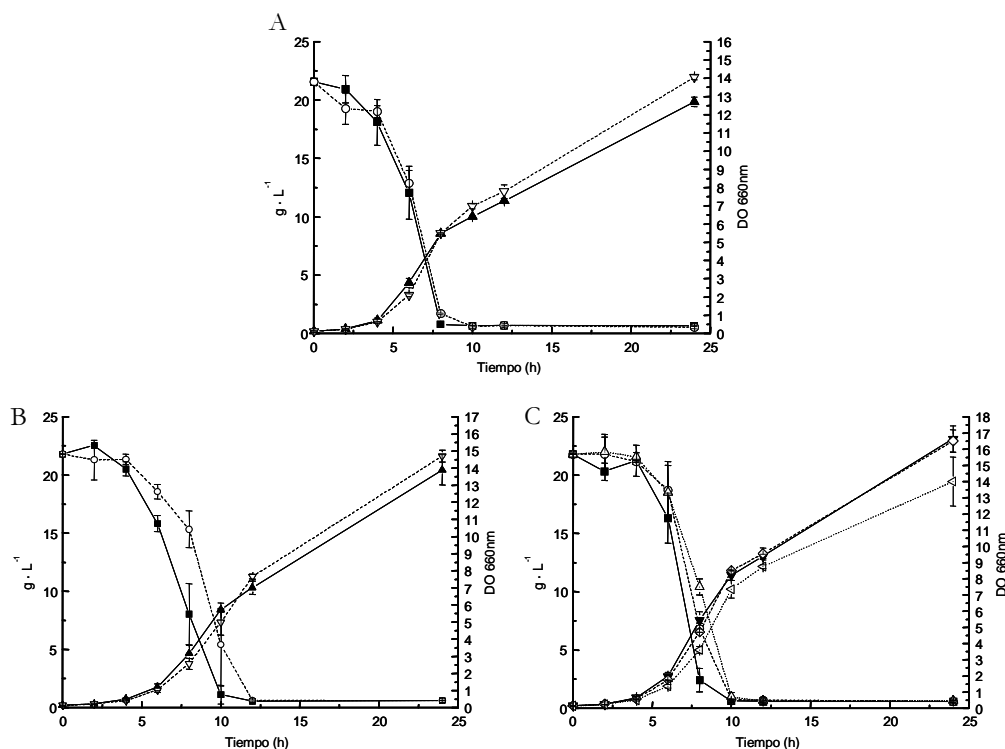


Figura III.14-. Crecimiento de las distintas cepas en medio YPD, V1-VTH, (A); DOG21-DTH, (B); y V3-3TH-3GH, (C). En todos los casos el símbolo relleno representa a la cepa parental tanto en el consumo como en el crecimiento, mientras que los vacíos a las cepas transformadas. En el caso de C, \circ y \diamond representan a 3TH, \triangle y \triangleleft a 3GH.

claramente al final de cultivo aunque en valor medio ronda el 6% y analizando los experimentos de forma independiente se puede observar que DTH mostró siempre un incremento de un 6% a un 8% con respecto a la cepa parental.

De un modo similar, en 3TH, las tasas de crecimiento no presentan diferencias significativas con el parental pero la velocidad de consumo de la glucosa se reduce en un 22.8% (Figura IV.14-C y Tabla IV.4). La DO no experimenta un incremento en la fase de diauxia del cultivo. En el caso de 3GH, tanto la tasa de crecimiento como la de consumo de glucosa sufren un descenso significativo de un 5% y un 26%, respectivamente. Además el cultivo experimenta un descenso en la DO final de un 15%.

Tabla IV.4. Tasa de crecimiento y tasa de consumo de glucosa en fase exponencial en medio YPD. La tasa de consumo es la pendiente de la recta de mínimos cuadrados.

Cepa/Transformante	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	Tasa de consumo en fase exponencial (g glc · L ⁻¹ · h ⁻¹)
V1	0.51 ± 0.05	-4.33 ± 0.00
VTH	0.50 ± 0.04	-4.33 ± 0.00
DOG21	0.40 ± 0.01	-3.24 ± 0.09
DTH	0.38 ± 0.01	-2.90 ± 0.23
V3	0.44 ± 0.01	-4.65 ± 0.00
3TH	0.44 ± 0.02	-3.59 ± 0.00
3GH	0.42 ± 0.01	-3.44 ± 0.00

6.1.2.- Producción y consumo de etanol en medio YPD.

Para determinar el efecto de la sobreexpresión de *HAP4* sobre el metabolismo de la levadura, se ha analizado la producción de etanol en las distintas cepas a distintos tiempos de cultivo: 6, 12 y 24 h (Tabla IV.5).

Durante la fase exponencial, aproximadamente a las 6 h, todos los transformantes presentan reducciones en la producción de etanol respecto a las cepas parentales. El transformante VTH presenta una reducción del 40.5%, DTH un 35.5%, 3TH un 36.7% y 3GH un 41.8%. A las 12 h de cultivo se observan los máximos niveles de etanol. Los transformantes DTH y 3TH presentan una disminución del 13.8% y 11.8% respectivamente en relación a su cepa parental. Por el contrario, los transformantes VTH y 3TH no presentaron diferencias significativas con sus respectivas cepas parentales. A las 24 h de cultivo, el transformante VTH presentó una disminución de la concentración final de etanol del 17% y DTH del 15% respecto a sus parentales. Los transformantes de la cepa V3, no mostraron diferencias significativas con respecto a la cepa parental.

Tabla IV.5. Concentración de etanol en medio de laboratorio YPD a las 6, 12 y 24 h.

Cepa/Transformante	Etanol (g· L ⁻¹) 6h	Etanol (g· L ⁻¹) 12h	Etanol (g· L ⁻¹) 24h
V1	3.91±0.58	8.97±0.07	4.22±0.11
VTH	2.33±0.58	8.73±0.36	3.51±0.14
DOG21	1.88±0.24	8.76±0.27	4.36±0.14
DTH	1.21±0.17	7.55±0.22	3.70±0.18
V3	2.49±0.24	9.5±0.29	3.74±0.97
3TH	1.73±0.06	8.39±0.31	3.58±0.85
3GH	1.45±0.21	9.57±0.34	4.59±0.25

Para estimar el rendimiento en la producción de etanol se determinaron los moles de etanol producidos con respecto a los moles de glucosa consumidos, tanto a las 6 como a las 12 h de cultivo (Tabla IV.6). A las 6 h, sólo se observan diferencias significativas en la cepa VTH.

A las 12 h de cultivo los transformantes DTH y 3TH presentaron una disminución en el rendimiento del 12.5 y del 10.9% respectivamente en relación a sus parentales, mientras que VTH y 3GH no mostraron diferencias significativas con respecto a sus cepas parentales (Tabla IV.6). A las 12 h de cultivo toda la glucosa asimilable ha sido consumida por todas las cepas y por ello el valor es más significativo que el de las 6 h (Tabla IV.6)

Tabla IV.6. Rendimiento (etanol producido por glucosa consumida). Un valor cercano a dos implica que el proceso ha sido sólo fermentativo, mientras que valores menores indicarían una desviación hacia el metabolismo respiratorio.

Cepa/Transformante	Rendimiento 6 h mol EtOH· (mol Glc consumida) ⁻¹	Rendimiento 12 h mol EtOH· (mol Glc consumida) ⁻¹
V1	1.61±0.29	1.68±0.00
VTH	1.04±0.30	1.64±0.06
DOG21	0.98±0.15	1.60±0.04
DTH	1.24±0.25	1.4±0.03
V3	1.39±0.16	1.75±0.00
3TH	1.39±0.06	1.56±0.07
3GH	1.14±0.2	1.77±0.05

Durante las primeras 12 h de cultivo el total de azúcar presente en el medio se empleará básicamente en dos procesos: la producción de etanol y la obtención de biomasa. A partir de las 12 h comienza la obtención de biomasa a partir del etanol obtenido en el estadio anterior (Tabla IV.7).

Tabla IV.7. Porcentaje del total de glucosa empleada en formación de biomasa y etanol a distintos tiempos del cultivo. Se han utilizado los valores medios de las tablas IV.5 y IV.6.

Cepa	Glucosa metabolizada (%) (12h)		Glucosa metabolizada (%) (24h)	
	Biomasa	Etanol	Biomasa	Etanol
V1	16	84	60.4	39.6
VTH	18	82	67	33
DOG21	20	80	60.16	39.84
DTH	30	70	65.7	34.3
V3	12.5	87.5	65.53	34.47
3TH	22	78	66.69	33.31
3GH	11.5	88.5	57.52	42.48

En las primeras 12 h de cultivo, el porcentaje del carbono empleado en la producción de biomasa o etanol para las cepas V1 y VTH no presentan diferencias significativas; DTH utiliza un 12.5% menos del carbono total para producir etanol que DOG21; mientras que el resultado para los transformantes de la cepa V3 es dispar, por un lado 3TH dedica un 10.9% menos mientras que 3GH no manifiesta diferencias significativas. A las 24 h de cultivo, se observa que la cepa VTH consume el etanol más rápidamente que su cepa parental. DOG21 es capaz de metabolizar más eficientemente el etanol que su transformante DTH de ahí que las diferencias observadas anteriormente, se reduzcan durante la fase estacionaria. En el caso de 3TH, las diferencias no se mantienen durante la fase estacionaria, mientras que 3GH presenta una deficiencia muy marcada de crecimiento y consumo de etanol al final del cultivo que impide la obtención de resultados positivos.

6.1.3-. Rendimientos en biomasa en medio YPD.

Se ha establecido el rendimiento biomasa/sustrato ($Y_{x/s}$) a lo largo del cultivo de las distintas cepas en YPD (Figura IV.15). El transformante VTH, presenta un rendimiento menor que el parental en los estadios iniciales del cultivo, pero a partir de las 8 h supera a la cepa parental y continua aumentando hasta alcanzar un 9% al final del cultivo (Figura IV.15-A). Los transformantes DTH y 3TH presentan diferencias significativas con sus parentales en las fases iniciales del cultivo, pero el rendimiento se iguala al final del mismo (Figura IV.15-B y C). El transformante 3GH, disminuye el rendimiento al entrar en fase estacionaria (Figura IV.15-C).

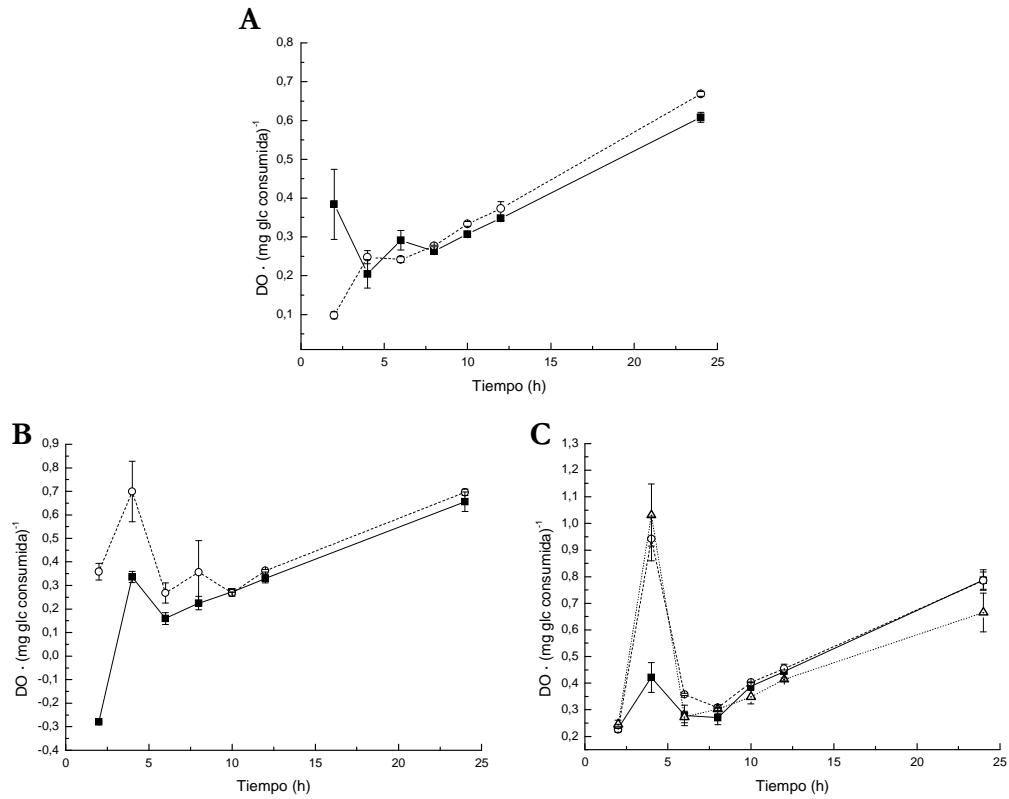


Figura IV.15. Rendimiento a lo largo del tiempo de cultivo de las distintas cepas en medio YPD, V1-VTH (A); DOG21-DTH (B); y V3-3TH-3GH (C). En todos los casos el símbolo relleno representa a la cepa parental. En C, \circ representa a 3TH y \triangle a 3GH

Tabla IV.8. Rendimiento biomasa /sustrato y producción final de los distintos parentales y transformantes a las 24 h. Los rendimientos se refieren a gramos de levadura seca por gramos de sustrato consumido.

Cepa	Rendimiento $\text{g levadura} \cdot (\text{g glc})^{-1}$	Producción final $\text{g levadura} \cdot \text{L}^{-1}$
V	0.31 ± 0.00	6.52 ± 0.03
VTH	0.34 ± 0.01	7.14 ± 0.12
DOG21	0.32 ± 0.01	6.84 ± 0.18
DTH	0.36 ± 0.01	7.56 ± 0.22
V3	0.32 ± 0.01	6.80 ± 0.29
3TH	0.32 ± 0.00	6.88 ± 0.00
3GH	0.32 ± 0.00	6.76 ± 0.04

El rendimiento calculado a las 24 h (Tabla IV.8) no tiene en cuenta el consumo de etanol que se produce desde las 12 h de cultivo (momento en el que la glucosa deja de estar presente en el medio). A pesar de ésta sobreestimación se obtienen diferencias significativas tanto en VTH como en DTH. Los valores de producción final de biomasa ponen de manifiesto lo anterior: el transformante VTH presenta un incremento de un 9.5% y DTH un 10.5% en valor medio, mientras que ninguno de los transformantes de la cepa V3 presentó diferencias significativas.

6.2-. Caracterización fisiológica en medio industrial MAB.

Los resultados obtenidos en medio YPD apuntan a un aumento en el rendimiento en alguno de los transformantes. Dado el interés aplicado de estas cepas se procedió a realizar una caracterización en medio industrial MAB.

6.2.1-. Crecimiento y consumo de hidratos de carbono.

Durante el cultivo en MAB el transformante VTH presenta un crecimiento similar al de la cepa parental. No existen diferencias significativas en la curva de crecimiento (Figura IV.16-A), ni en la tasa de crecimiento (Tabla IV.9), aunque la DO en el transformante es algo superior al finalizar el cultivo (Figura IV.16-A). La hidrólisis de sacarosa no presenta diferencias significativas con respecto a la cepa parental, aunque el transformante acumula glucosa y fructosa en mayor grado a partir de las 12 h de cultivo (final de la fase exponencial) lo que se traduce en un retraso en el tiempo necesario para el consumo total del azúcar (Figuras IV.16-B y IV.17-A).

La curva de crecimiento del transformante DTH es similar al de la cepa parental durante las primeras 12 h de cultivo, pero a las 24 h la DO alcanzada por el transformante es un 30% menor, aunque ésta diferencia se reduce a un 8% a 48 h de cultivo (Figura IV.16-C). La hidrólisis de sacarosa es algo más lenta en el transformante (Figura IV.16-C) y la cantidad de azúcares reductores acumulados aumenta en el transformante a partir de las 12 h, por lo que se necesita más tiempo para su total consumo que en el cepa parental (Figura IV.16-D y IV.17-B).

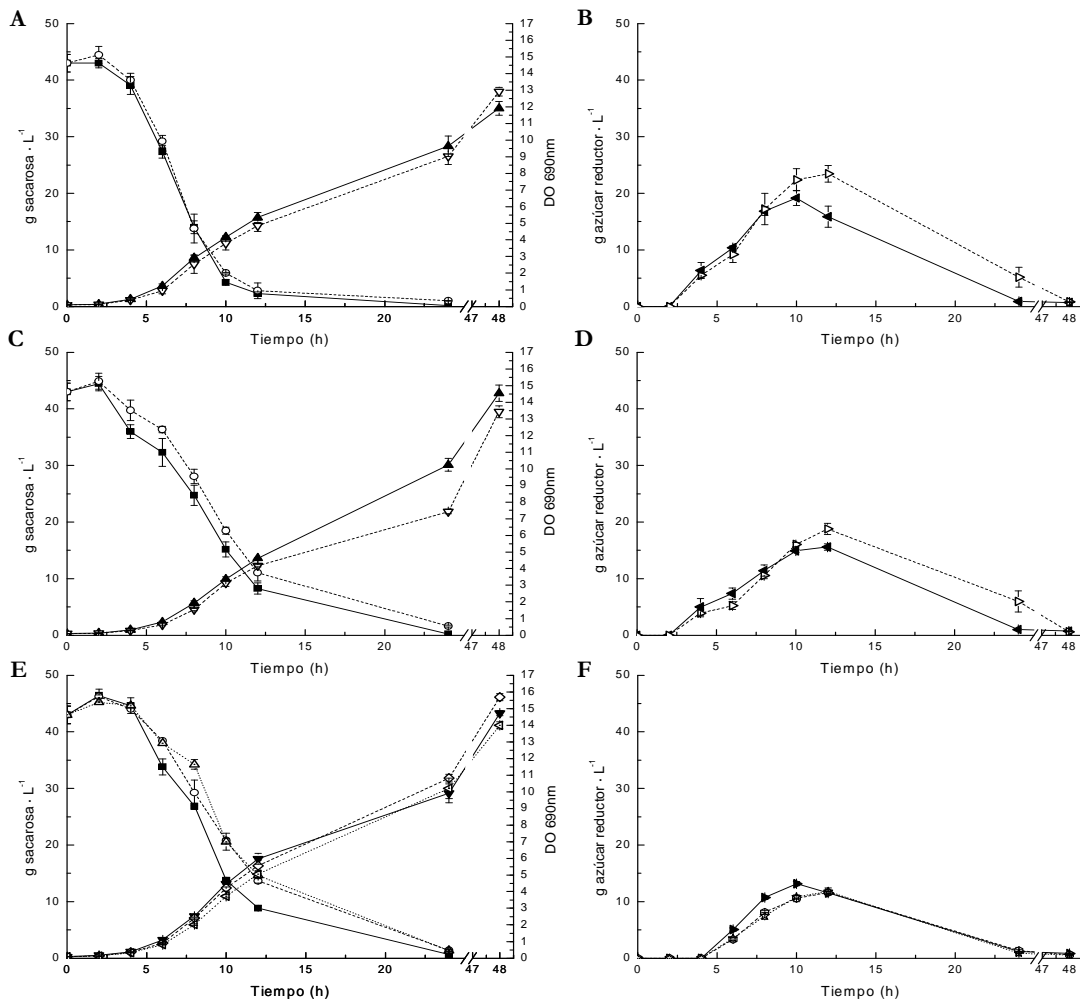


Figura IV.16-. Crecimiento y consumo de azúcares de las distintas cepas en medio MAB, V1-VTH, **A** y **B**; DOG21-DTH, **C** y **D**; y V3-3TH-3GH, **E** y **F**. En todos los casos el símbolo relleno representa a la cepa parental, mientras que los símbolos vacíos a las cepas transformadas. En el caso de **A** y **C**, **▲** y **▼** representan la DO, **■** y **○** representan la concentración de sacarosa. En **E**, **▼**, **◇** y **◁** indican la DO de V3, 3TH y 3GH, mientras que **■**, **○** y **△** representan la concentración de sacarosa. En **B** y **D**, **◀** y **▷** representan la concentración de azúcares reductores. En **F**, **▶**, **☆** y **○**; representan los azúcares reductores en las cepas V3, 3TH y 3GH. Se representan resultados medios de tres experimentos con desviación estándar.

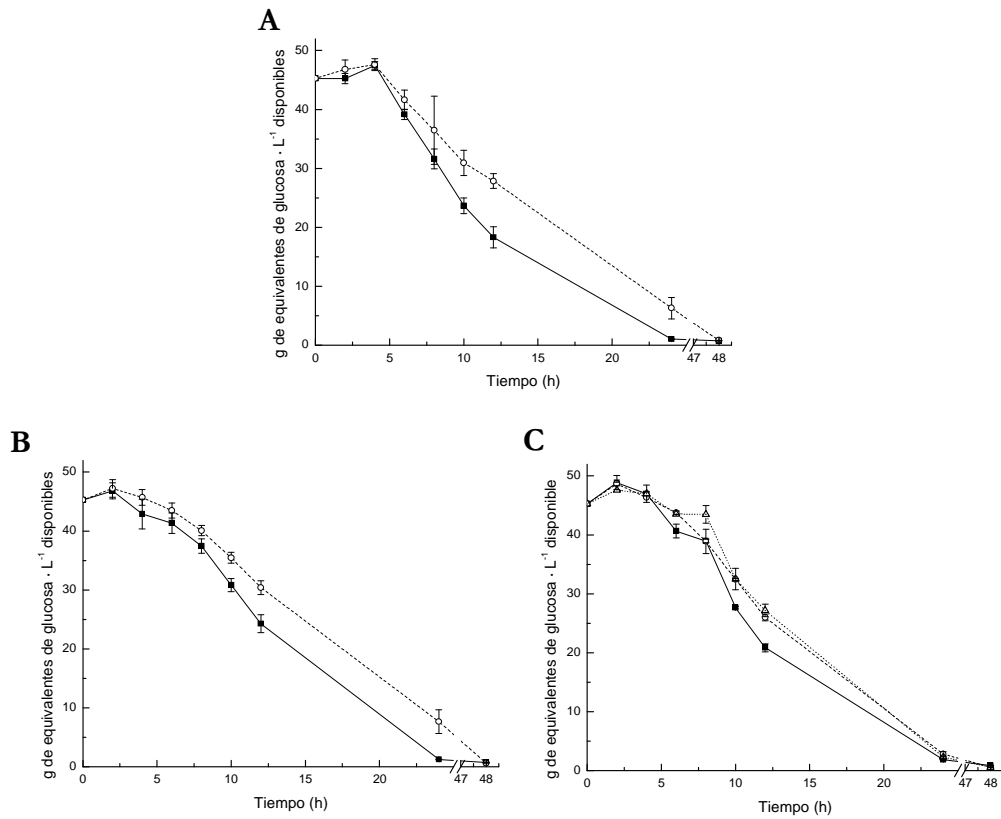


Figura IV.17. Consumo total de azúcares, expresados como equivalentes de glucosa. V1-VTH (A); DOG21-DTH (B); y V3-3TH-3GH (C). En todos los casos el símbolo relleno representa a la cepa parental, mientras que los símbolos vacíos a las cepas transformadas. En el caso de C, ■, ○ y △ representan a V3, 3TH y 3GH, respectivamente.

Tabla IV.9-. Tasa de crecimiento y tasa de consumo equivalentes de glucosa en fase exponencial en medio MAB. La tasa de consumo es el valor de la pendiente de la recta de ajuste de mínimos cuadrados.

Cepa/Transformante	Tasa de crecimiento (h ⁻¹)	Tasa de consumo (g glc · L ⁻¹ · h ⁻¹)
V1	0.42± 0.01	-3.69±0.15
VTH	0.41±0.02	-2.51±0.25
DOG21	0.38±0.01	-2.89±0.15
DTH	0.37±0.01	-2.40±0.30
V3	0.41±0.01	-3.27±0.29
3TH	0.41±0.01	-2.61±0.05
3GH	0.40±0.01	-2.53±0.23

Los transformantes 3TH y 3GH, presentan un comportamiento muy similar. No se observan diferencias significativas en la curva de crecimiento (Figura IV.16-E y Tabla IV.9). La hidrólisis de sacarosa es ligeramente inferior en los transformantes, lo que permite una menor acumulación de azúres reductores al menos durante las primeras 12 h de cultivo (Figura IV.16-E-F). Sin embargo, el consumo total de azúcares es más lento en ambos transformantes (Figura IV.17-C).

6.2.2-. Producción de etanol en medio MAB.

Se ha analizado la producción de etanol de las distintas cepas a distintos tiempos de cultivo (Tabla IV.10). La producción se reduce significativamente en todos los transformantes con respecto a las cepas parentales. Las diferencias más llamativas se observan a las 6 h del cultivo con reducciones de un 40% para VTH y DTH, de un 44% para 3TH y un 35% para 3GH. Estas diferencias se van haciendo menores a lo largo del cultivo y al final del mismo (48h) las reducciones en la producción de etanol son de un 25% aproximadamente en los transformantes VTH y DTH, mientras que los transformantes de la cepa V3 no presentan diferencias con la cepa parental.

Tabla IV.10-. Concentración de etanol a las 6, 12, 24 y 48 h, en medio MAB.

Cepa/Transformante	Etanol 6h (g· L ⁻¹)	Etanol 12h (g· L ⁻¹)	Etanol 24h (g· L ⁻¹)	Etanol 48h (g· L ⁻¹)
V1	2.13±0.31	9.73±0.00	8.83±1.19	7.49±0.29
VTH	1.27±0.23	6.14±0.47	5.18±0.96	5.76±0.45
DOG21	2.13±0.32	7.10±0.30	10.99±1.58	7.30±0.44
DTH	1.27±0.23	4.80±0.47	7.39±1.25	5.47±0.76
V3	1.24±0.06	8.06±1.70	12.16±0.80	6.91±0.86
3TH	0.69±0.00	6.91±0.67	10.70±0.45	6.53±0.93
3GH	0.81±0.09	6.77±0.86	10.35±0.85	6.91±1.04

Para determinar si ésta disminución en la concentración de etanol era una consecuencia de la reducción en el consumo de hidratos de carbono, se procedió a determinar la eficiencia de producción de etanol (Tabla IV.11). Los transformantes VTH y DTH, no presentan diferencias significativas entre ellos y sus cepas parentales ni a las 6 h ni a las 12 h, lo que significa que las diferencias observadas en la producción de etanol, se deben a un consumo más lento de los hidratos de carbono. A las 24 h cuando la concentración de hidratos de carbono es mínima, se redirecciona el flujo metabólico hacia respiración lo que se traduce en una reducción de un 33% para VTH y un 21% para DTH con respecto a sus parentales.

Los transformantes 3TH y 3GH presentan un metabolismo prácticamente fermentativo al inicio del cultivo, aunque conforme va reduciéndose la concentración externa de carbohidratos el metabolismo se vuelve más respiratorio.

Tabla IV.11.-Rendimiento en la fermentación de la fuente de carbono. Un valor cercano a dos implica que el proceso ha sido puramente fermentativo, mientras que valores menores indicarían una desviación hacia un metabolismo respiratorio. Se representan resultados medios de tres experimentos y desviación estándar.

Cepa/Transformante	Rendimiento 6h mol EtOH· (mol Glc consumida) ⁻¹	Rendimiento 12h mol EtOH· (mol Glc consumida) ⁻¹	Rendimiento 24h mol EtOH· (mol Glc consumida) ⁻¹
V1	1.38±0.26	1,42±0.10	0.78±0.08
VTH	1.24±0.20	1.38±0.04	0.52±0.04
DOG21	1.04±0.35	1.33±0.17	0.98±0.13
DTH	1.18±0.43	1.27±0.18	0.77±0.03
V3	1.08±0.24	1.29±0.36	1.09±0.09
3TH	1.82±0.37	1.40±0.20	0.97±0.01
3GH	1.83±0.19	1.47±0.30	0.94±0.10

6.2.3-. Rendimiento en biomasa en medio MAB.

En general todos los transformantes presentan mayor DO por mg de sustrato consumido que sus respectivas cepas parentales a lo largo de la fase exponencial (Tabla IV.12, segunda columna). Sin embargo, la producción global obtenida a las 24 h es inferior para los casos de VTH y DTH, mientras que 3TH y 3GH presentan incrementos significativos, de un 12% y un 10% respectivamente (Tabla IV.12, tercera columna). Como ya se indicó anteriormente, tanto VTH como DTH dejan carbohidratos residuales a las 24 h, lo que explicaría ese descenso en producción. El rendimiento tiene en cuenta ésta posibilidad, y se observa que en todos los transformantes se obtienen incrementos significativos que van desde un 10% para VTH, a un 20% para DTH, un 22% para 3TH y un 11% para 3GH (Tabla IV.12, cuarta columna). A las 48 h de cultivo los medios no presentan azúcares utilizables, lo que conlleva a un incremento en la producción de un 9.5% para VTH y un 5% para DTH con respecto a sus cepas parentales. En los transformantes de la cepa V3 se da una pérdida de las diferencias observadas a 24 h. En el caso de 3TH, la diferencia se reduce a un 5% a las 48 h, mientras que en 3GH no se observan diferencias significativas con respecto a la cepa parental (Tabla IV.12, quinta columna).

Tabla IV.12-. Rendimiento medio durante el crecimiento en fase exponencial (segunda columna) y en biomasa a 24 h (cuarta columna). Producciones obtenidas a 24 y 48 h de cultivo (tercera y quinta columna respectivamente). Se representan resultados de tres experimentos con desviación estándar.

Cepa/Transformante	Rendimiento DO·(mg glc consumido) ⁻¹	Producción 24 h (g levadura· L ⁻¹)	Rendimiento 24 h g levadura (g glc consumido) ⁻¹	Producción 48 h (g levadura· L ⁻¹)
V1	0.20±0.01	4.33±0.04	0.10±0.00	5.59±0.12
VTH	0.27±0.02	4.16±0.17	0.11±0.00	6.13±0.19
DOG21	0.23±0.01	4.51±0.12	0.10±0.00	6.52±0.18
DTH	0.30±0.02	3.84±0.02	0.12±0.01	6.85±0.02
V3	0.25±0.06	4.08±0.12	0.09±0.00	6.10±0.09
3TH	0.31±0.03	4.58±0.04	0.11±0.00	6.42±0.08
3GH	0.29±0.01	4.49±0.14	0.10±0.00	6.12±0.03

6.3-. Actividad invertasa y maltasa.

Como consecuencia de la reducción observada en la hidrólisis de sacarosa en los transformantes y para ver su posible efecto en panificación, se procedió a determinar si las actividades invertasa y maltasa estaban afectadas en las condiciones bajo estudio (Figura IV.18). La actividad invertasa no presenta diferencias significativas entre los transformantes y las cepas parentales cuando se cultivan en YPD (Figura IV.18-A). Lo mismo ocurre para las cepas parentales, y los transformantes VTH y DTH, cultivados en melazas (Figura IV.18-A). Sin embargo, sí parece existir una reducción en la actividad invertasa en los transformantes de V3, que podrían explicar el receso observado en la hidrólisis de sacarosa en medio MAB (Figura IV.18-A). En cuanto a la actividad maltasa indicar que al menos los niveles basales no se ven afectados de forma significativa ni en YPD ni en MAB en los transformantes VTH y DTH (Figura IV.18-B). 3TH y 3GH muestran niveles de actividad maltasa basales inferiores a la cepa V3 en medio YPD aunque en medio MAB los niveles no presentan diferencias significativas (Figura IV.18-B).

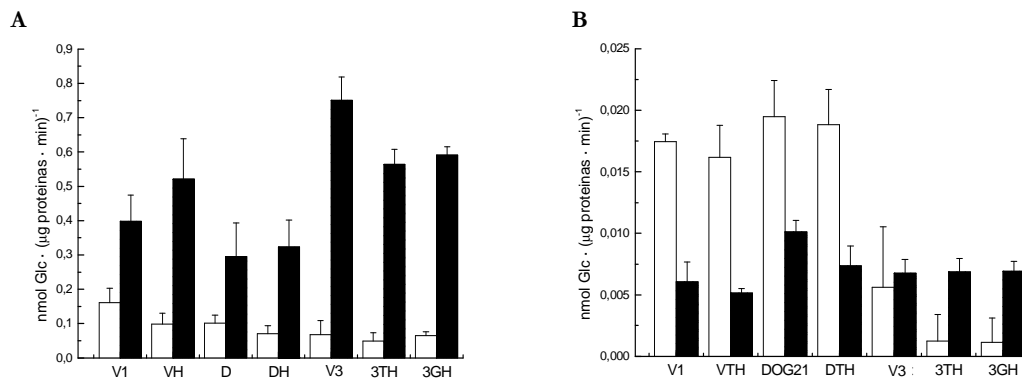


Figura IV.18-. Actividad invertasa (A) y maltasa (B) en células en fase exponencial cultivadas en YPD (blanco) y MAB (negro). Los resultados son media de tres experimentos independientes con desviación típica.

7-. Capacidad fermentativa en masas panarias.

Las levaduras panaderas se utilizan en dos tipos de masas, las que no contienen azúcar (masa seca) y las azucaradas. Las masas secas son utilizadas en la elaboración de pan, y se fermentan con cepas como V1. Las masas azucaradas contienen un 25% de sacarosa, y para su fermentación se utilizan levaduras seleccionadas para tales efectos como la cepa V3. La cepa DOG 21 es un derivado de la cepa V1 que podría utilizarse en masas azucaradas (Rincón et al., 2001).

7.1-. Capacidad fermentativa en masas panarias seca.

Todas las cepas transformadas tienen afectada en mayor o menor medida la capacidad de levantar masa seca (Figura IV.19). En el caso de VTH se produce un retraso en la producción de CO₂ que no supera los 15', y el volumen máximo alcanzado disminuye en un 13% (Figura IV.19-A). El transformante DTH presenta un retraso medio de unos 30' en la producción de CO₂ y el volumen máximo se reduce en aproximadamente un 19% (Figura IV.19-B). El comportamiento de los transformantes 3TH y 3GH es muy similar entre sí, en ambos casos la producción de CO₂ presenta un retraso de 30', sin embargo el volumen máximo alcanzado por la masa no presenta diferencias significativas con el alcanzado por la cepa parental (Figura IV.19-C).

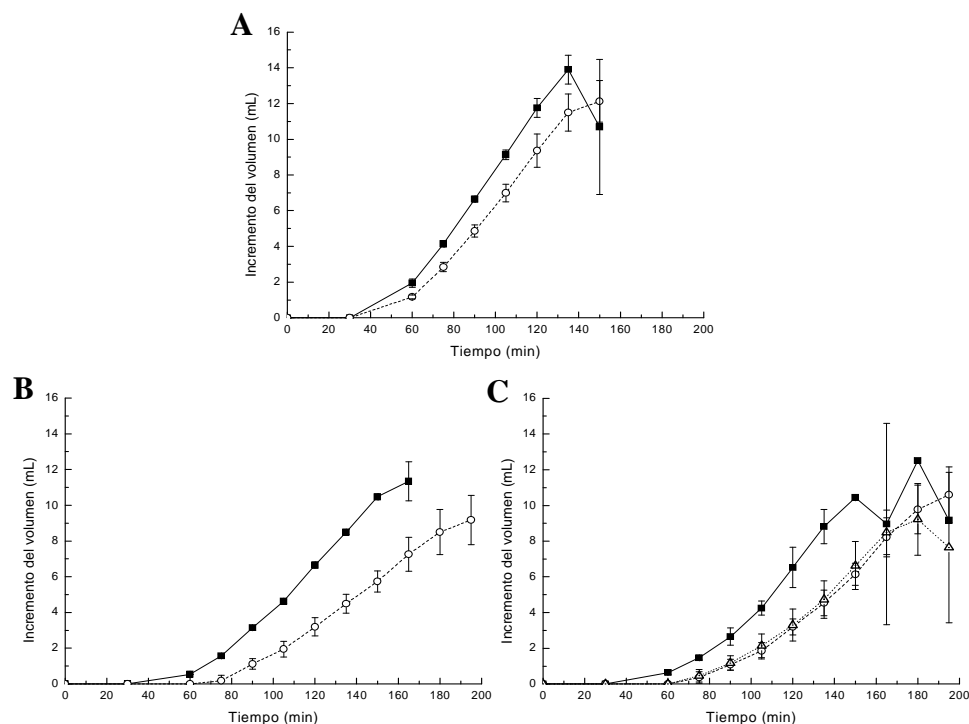


Figura IV.19-. Levantamiento de masa seca, V1-VTH (A); DOG21-DTH (B); y V3-3TH-3GH (C). En todos los casos el símbolo relleno representa a la cepa parental. En C, ○ representa a 3TH y △ a 3GH. Se representan resultados de al menos tres experimentos con desviación estándar.

7.2.- Capacidad fermentativa en masas dulces.

Tanto el transformante VTH como DTH presentan deficiencias significativas en la producción de CO₂. VTH presenta un retraso en la capacidad fermentativa de unos 15' (Figura IV.20-A), mientras que DTH presenta en la primera parte de la fermentación un retraso de 15' prolongándose hasta los 30' al final de la misma (Figura IV.20-B). No se observaron cambios en el volumen máximo alcanzado por la masa en ninguno de los casos. Los transformantes 3TH y 3GH tienen un comportamiento similar al de la cepa parental, no existen diferencias significativas ni en velocidad de producción de CO₂ ni en el volumen máximo alcanzado por la masa (Figura IV.20-C).

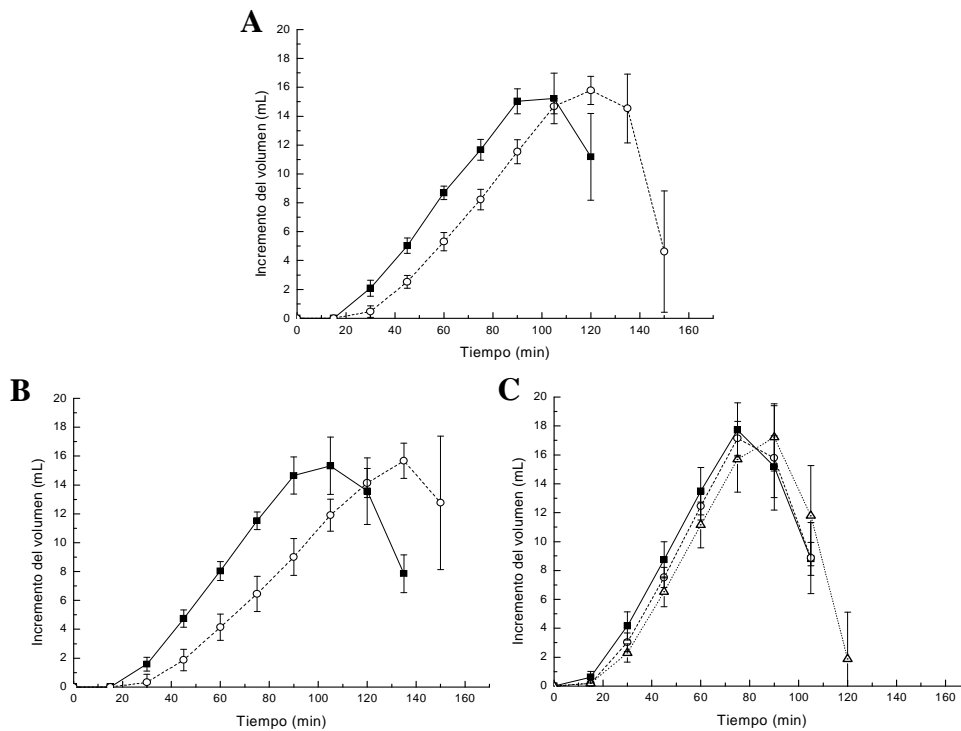


Figura IV.20-. Levantamiento de masa dulce, V1-VTH (A); DOG21-DTH (B); y V3-3TH-3GH (C). En todos los casos el símbolo relleno representa a la cepa parental. En C, O representa a 3TH y Δ a 3GH. Se representan resultados de al menos tres experimentos con desviación estándar.

Discusión

1-. Patrones de expresión de genes.

Aunque se dispone de abundante información acerca de la regulación génica en cepas de laboratorio, puede resultar interesante realizar análisis globales de la expresión en cepas panaderas, ya que la presión selectiva que han sufrido a lo largo de su uso industrial puede haber conllevado diferencias de expresión génica con respecto a las primeras. El uso de macroarrays permite analizar la expresión de genes de manera que se pueden agrupar en paquetes con funcionalidad relacionada o no (clustering). Además también se pueden agrupar genes con patrones de expresión similares o contrarios, dando una idea de las posibles relaciones que mantienen diversos genes. Se ha podido determinar cómo algunos genes pueden incrementar o reducir su expresión a lo largo de un cultivo (DeRisi et al., 1997) o bien cómo la expresión de un mutante o de varias mutaciones varía con respecto a la cepa parental (Haurie et al., 2001; Buschlen et al., 2003; Lascaris et al., 2003; Lascaris et al., 2004; Schuurmans et al., 2008b), obteniéndose en el primer caso una visión global del proceso y en el segundo-tercero un enfoque más particular de qué genes pueden estar regulados por la eliminación o la sobreexpresión de un determinado gen.

En el caso de las cepas V1 y DOG21 se ha optado por la realización de cuatro macroarrays independientes, que permiten valorar por un lado genes afectados por la regulación del carbono y por otro, la comparación de la cepa V1 con un mutante que presenta una desregulación parcial de la represión catabólica por glucosa (Rincón et al., 2001; Codón et al., 2003).

La cepa V1 presenta una variación muy acusada en el número de genes que se expresan más en YPG que en YPD. En condiciones fermentativas se da mayor expresión de genes implicados en la síntesis del ribosoma. Estudios previos ya indicaban que levaduras de laboratorio creciendo en medio YPD presentan una fuerte inducción de genes relacionados con proteínas ribosómicas, iniciación o elongación de la traducción así como en las sintetasas de ARNt, pero conforme la glucosa se va agotando, o en células creciendo en glicerol estos genes presentaban una fuerte represión (DeRisi et al., 1997; Roberts and Hudson, 2006). Este hecho se asocia al crecimiento rápido característico del medio YPD. De hecho, las rutas de incorporación de nitrógeno y azufre están más representadas en condiciones fermentativas que respiratorias, con un incremento en la expresión de genes implicados en la incorporación directa de amonio a esqueletos carbonados (*GDH1* y *GDH3*) y de sulfato (*MET3*, *MET14* Y *MET16*), de genes implicados en la síntesis de

arginina a partir de glutámico, en donde casi toda la ruta excepto *ARG2* y *ARG8* están representados, y de *ASN1* y *ASN2* cuyos productos están implicados en la síntesis de asparagina a partir de aspártico. De los aminoácidos de la familia del azufre se ha detectado un incremento en la expresión de genes implicados en la síntesis tanto de cisteína como de metionina (*MET17*, *STR3*, *CYS3* y *SAM2*).

En cuanto a los genes con mayor expresión en condiciones respiratorias que en fermentativas se detectan los relacionados con la utilización del etanol (*ADH2*), el glicerol (*GUT1* y *GUT2*) ó el acetato (*ACS1*) y los que posibilitan la utilización de hidratos de carbono alternativos a la glucosa como por ejemplo, *SUC2* o los genes MAL (*MAL13*, *MAL12* y *MAL32*). También tiene mayor expresión el gen implicado en el transporte del piruvato y lactato tanto al interior de la célula como de la mitocondria *JEN1*, permitiendo que se produzcan las reacciones de transformación del piruvato a acetil-CoA; los relacionados con el ciclo de Krebs (*ACO1*, *IDH1*, *KGD1*, *KGD2*, *LSC2*, *SDH2*, *SDH4* y *MDH1*), la cadena de transporte de electrones (*NDI1*, *NDE2*, *SDHx*, *COR1*, *RIP1*, *QCRx*, *CYC7* y *COXx*); la fosforilación oxidativa (*ATPx*); la síntesis del glioxilato (*CIT2*, *MDH2*, *ICL1* e *IDP2*); la gluconeogénesis (*PCK1*, *PYC1* y *FBP1*) y la síntesis de glucógeno (*PGM2*, *UGP1*, *GYS1* y *GLC3*). (DeRisi et al., 1997; Roberts and Hudson, 2006). Otra de las rutas metabólicas para la generación de energía que presenta mayor expresión en YPG, es la β -oxidación tanto de ácidos grasos saturados (*FAA2*, *POX1*, *FOX2* y *POT1*) como insaturados (*ECL1* y *DCL1*). La β -oxidación unida a la respiración incrementa las especies reactivas del oxígeno, lo que provoca la expresión de genes implicados en la adaptación a ROS como *MGA2* así como proteínas Rad o Mms21p encargadas de reparar roturas del ADN (Kelley and Ideker, 2009). Según la base de datos YEASTRACT, en YPG el 11% de los genes están relacionados directa o indirectamente con Rox1p, encargado junto a Mga2p de la respuesta temprana a la adaptación a estrés oxidativo, mientras que un 29% lo están a Yap1p y un 10.2% a Skn7p, responsables de la adaptación tardía. También se han obtenido altos porcentajes de genes regulados por las proteínas Sok2p (31.7%), Msn2p (24.8%) y Msn4p (21.5%), entre otras. Sok2p es un factor transcripcional de expresión constitutiva que actúa contra la función de Msn2p y Msn4p en la activación de genes inducidos en la fase estacionaria (Vachova et al., 2004). El hecho de que genes regulados por Msn2p y Msn4p, como por ejemplo *CTT1*, *GAC1*, *HSP26* y *HSP12*, presenten una mayor expresión en medio YPG hace suponer una activación de la ruta TOR de respuesta a estrés general

(Gagiano et al., 2002; Erkina et al., 2008). Más aun, la ruta de desactivación de Msn2/Msn4 incrementa su expresión en medio YPG, lo cual podría revelar una pre-adaptación a la posible aparición de glucosa en el medio. Se observan incrementos en la expresión de *GPR1*, *BCY1*, *RAS2* y *TPK1*, que forman parte de la anterior ruta Ras/AMPC/PKA y que desactiva a Msn2/Msn4. Algunos de estos genes son esenciales para el crecimiento de la levadura en sustratos no fermentables ya que la delección de *RAS2*, *BCY1* o el doble mutante en *ira2-ira3*, provocan defectos en el crecimiento (Swiegers et al., 2006). La sobreexpresión de *RAS2* dependiente de Tpk1p y de los niveles internos de AMPC, permite aumentar las proteínas relacionadas con el ciclo del glioxilato así como de genes implicados en la respiración, detectándose un incremento en el rendimiento del cultivo en este tipo de fuentes de carbono (Dejean et al., 2002; Swiegers et al., 2006). También se observa un incremento en la expresión de transportadores de hexosas (*HXT2*, *3*, *6* y *7*), y el sensor de glucosa de alta afinidad *SNF3*, lo que indicaría una regulación correcta del sistema Rgt1-Mig1p en medio YPD. Los factores transcripcionales que controlan el metabolismo central, *MIG1*, *CAT8-ADR1* y sobre todo *HAP4*, mantienen un patrón de expresión comparable al que presentan las levaduras de laboratorio, lo que ha facilitado los diseños experimentales que se describirían posteriormente en esta Tesis.

Respecto a las diferencias en el comportamiento en medios fermentativos o respiratorios de la cepa DOG21, parte de lo anteriormente descrito para V1 es también válido para DOG21, aunque no se detecta un incremento en la expresión de genes implicados en la biogénesis del ribosoma. Esto podría deberse a que la cepa DOG21 presenta una fase de latencia y tiempos de duplicación más prolongados, que V1. Tampoco se detecta activación del metabolismo del azufre en el mismo grado que en la cepa parental, aunque la síntesis de arginina parece estar sobre-representada más en YPD que en YPG. Al igual que en V1, en medio YPG aumenta la expresión de genes implicados en la utilización de otras fuentes de carbono, ciclo de Krebs, cadena respiratoria, fosforilación oxidativa, ciclo del glioxilato, etc, pero el número de genes es menor que en V1. Una diferencia entre DOG21 y V1, en medio YPG en comparación con YPD, es la estimulación de la expresión de genes implicados en estrés. Estas diferencias no son tan acusadas en DOG21; o no se detectan incrementos significativos en la expresión de *HSP26* o el nivel es inferior, como en *HSP12* u otros genes controlados por Msn2/4. Se presentan cambios en el patrón de expresión de *RCK1*, implicado en la señalización de estrés oxidativo y que interacciona con

el factor transcripcional Yap2p. No obstante, el papel funcional y posible relación de *RCK1* con la ruta *HOG1* no está del todo clara (Bilsland et al., 2004). Tampoco se observa un incremento significativo en los genes constituyentes de la ruta Ras/AMPC/PKA o el transportador de baja afinidad (*HXT1*) que presenta mayor expresión en YPG que en YPD (debería ocurrir de forma contraria). Sin embargo, el sensor de baja concentración de glucosa (*SNF3*) mantiene el patrón de expresión esperado (Rolland et al., 2002). Genes implicados en el control del cambio de metabolismo fermentativo a respiratorio, sí tienen un patrón de expresión adecuado. *DOG21* presenta desrepresión catabólica, y salvo *PGM1*, que es una isoenzima de *PGM2* implicada en la conversión de la glucosa-6-fosfato a glucosa-1-fosfato (enzima necesaria para la síntesis de glucógeno y trehalosa en medio YPD) no se observa desregulación. Esto podría deberse a que *DOG21* está parcialmente desreprimido en medio YPD, y por lo tanto la inducción en YPG podría enmascarar el resultado.

Se procedió además a realizar macroarrays de las dos cepas en las mismas condiciones de cultivo. *DOG21* presentó en YPD mayor expresión de genes relacionados con la utilización de fuentes alternativas de carbohidratos como *SUC2*, *MAL12*, *MAL32* y *MPH2*, de los factores transcripcionales *MGA2*, *CAT8* y *ADR1*, y de genes implicados en β -oxidación y gluconeogénesis (*FBP1* y *PCK1*). El hecho de que *MIG1* presente mayor expresión en *DOG21* podría indicar que se ha seleccionado un mutante con funcionalidad parcial de Mig1p. No obstante, no se detectan incrementos en genes relacionados con la respiración como *HAP4*, también controlado por Mig1p. Otra posibilidad es una mutación en *HXK2* o en el responsable de su fosforilación ya que mutantes nulos presentan un incremento en la expresión de genes implicados en el transporte de hexosas, invertasa y maltasa, gluconeogénesis, ciclo del glioxilato, ciclo de Krebs y en la cadena transportadora de electrones (Diderich et al., 2001; Schuurmans et al., 2008a). En *DOG21* se ha detectado una expresión de *HXK2* de 2.1 veces menor que en V1. No se han detectado incrementos en la expresión de genes de respiración, pero *DOG21* produce menos etanol por glucosa consumida que la cepa V1 (Tabla IV.7). No se conoce que Hxk2p y Mig1p puedan controlar conjuntamente la expresión de *CAT8*, pero trabajos recientes indican que a altas concentraciones de glucosa ambas proteínas pueden mantener interacciones (Ahuatzi et al., 2007). Por su parte, Cat8p está presente a bajos niveles en medios con glucosa pero su activación no se produce ya que Snf1 no está activo. En ciertas condiciones de estrés el

complejo Snf1 presenta actividad, pero no impide la represión catabólica gracias a la presencia de Hxk2p que impide la fosforilación de Mig1p (Ahuatzi et al., 2007). DOG21 en YPD presenta cierta desregulación de genes relacionados con la respuesta estrés, como *DOG1*, *DOG2* y *HSP12*, entre otros. *DOG1* y *DOG2*, confieren resistencia a 2-desoxiglucosa y están reprimidos por Mig1p (Lutfiyya et al., 1998). Ambos genes se inducen bajo condiciones de estrés oxidativo y osmótico, respondiendo al control de Msn2p y Msn4p (Tsujimoto et al., 2000). La sobreexpresión tanto de DOG1 como de DOG2 por sí solas no producen un incremento de los niveles de invertasa (Rández-Gil et al., 1995). *HSP12*, implicado en la resistencia a congelación presenta en YPD mayor expresión en DOG21 que en V1, y también es controlado por Msn2 y Msn4; de hecho DOG21 presenta mayor resistencia a congelación que la cepa V1 (Codón et al., 2003). Todo esto podría indicar que DOG21, en YPD, presenta desregulación en respuesta a estrés, con activación del complejo SNF, que sumado a una posible reducción en los niveles de Hxk2p, motiva los patrones de expresión anteriormente descritos. La comparación durante el crecimiento en YPG entre las cepas V1 y DOG21 no presenta grandes diferencias en la expresión de los genes.

2.- Incremento en el rendimiento en levaduras industriales.

El estudio de los patrones de expresión de las cepas V1 y DOG21 confirmó que la regulación de la respiración en estas cepas está mediada por *HAP4*. Por lo tanto resulta interesante sobre-expresar este gen en levaduras industriales, ya que en cepas de laboratorio produce incrementos notables en el rendimiento obtenido en cultivo continuo (Blom et al., 2000).

La falta de complementación observada al transformar la cepa *bap4Δ* con el gen *HAP4* amplificado desde la cepa V1 indica la presencia de alelos no funcionales del mismo. La secuenciación de los alelos clonados y utilizados para la transformación de *bap4Δ* confirmó que la no funcionalidad se debía a la aparición de un codón de parada prematuro, motivado por la delección de un único nucleótido. La posibilidad de que una cepa aneuploide acumule mutaciones en varios alelos es elevada, ya que se puede producir la complementación con los alelos funcionales. Esto, sumado a que se ha descrito que *HAP4* no es esencial en condiciones de cultivo con tasas de dilución muy bajas (Raghevedran et al., 2006), como se realiza en la industria, podrían haber motivado la acumulación de mutaciones en los diferentes alelos de *HAP4* de esta levadura. En el proceso industrial de

producción de levadura, se alternan procesos de cultivo discontinuo con otros de cultivo continuo en los que las tasas de dilución nunca alcanzan los niveles descritos en el trabajo anterior. Esto imposibilita la homocigosis total de un alelo *bap4* en la cepa V1, pero no la heterocigosis *HAP4/bap4*

Se clonó un alelo *HAP4* funcional de la cepa de laboratorio cenpK113-7D. Los resultados obtenidos muestran que en las cepas V1, DOG21 y V3, la expresión de *HAP4* bajo un promotor fuerte, produce un incremento en la expresión de genes implicados en respiración, tanto en medio YPD como en MAB, efecto que otros grupos habían observado en medio de laboratorio en condiciones de cultivo continuo y discontinuo (Blom et al., 2000; van Maris et al., 2001; Lascaris et al., 2004). En fondos *mig1Δ*, *mig1Δmig2Δ* y *hxxk2Δ*, cuando se sobreexpresa un alelo *HAP4*, se observa una reducción en la expresión de *SUC2* (Lascaris et al., 2004). Se determinó si la sobre-expresión de *HAP4* afectaba a genes implicados en la utilización de fuentes alternativas de carbono en las cepas analizadas. No se observó ningún efecto negativo en condiciones de represión, salvo para *MAL12* y sólo en la cepa VTH. En medios donde la desrepresión de *SUC2* es mayor existe una menor expresión en la cepa 3GH, pero mayor en VTH. No se detecta aumento o disminución de la expresión del gen de la maltasa en estas condiciones, salvo en la cepa VTH donde *MAL12* aumenta su expresión. El número de copias de *SUC2* en las cepas V1 y DOG21 es más elevado que en la cepa V3 (Capítulo I). Puede que en VTH, *SUC2* no permitiera una posible represión ejercida por *HAP4* o simplemente que este efecto no ocurra en esta cepa. DTH no parece sufrir efecto alguno en condiciones de inducción, mientras que en los transformantes de la cepa V3 la represión parece depender del nivel de expresión del promotor, siendo 3GH la que sobreexpresa más *HAP4* y la que presenta mayores niveles de represión de *SUC2*. En el caso de *MAL12* los transformantes parecen tener niveles de expresión iguales a sus parentales, salvo VTH. Para saber si estas diferencias en la expresión repercutían en la actividad invertasa o maltasa se procedió a determinar estas actividades. No existen diferencias significativas entre transformantes y parentales respecto a la actividad invertasa en condiciones de represión (YPD), aunque sí en MAB donde los transformantes de la cepa V3 presentan menor actividad que la cepa parental. Respecto a la actividad maltasa, la cepa V3 presenta niveles de actividad mucho menores que las otras cepas panaderas cuando se cultiva en YPD, además se observa una

disminución de actividad en los transformantes 3TH y 3GH respecto a la cepa parental en el mismo medio de cultivo.

Los transformantes presentan diferentes comportamientos en YPD. VTH no presenta diferencias ni en el consumo de glucosa ni en la producción de etanol y sólo se observan cambios significativos a las 24 h de cultivo. VTH presenta una mayor capacidad de consumir el etanol, lo que le confiere un incremento en el rendimiento. Las cepas DTH y 3TH presentan un comportamiento más parecido al descrito en trabajos anteriores (van Maris et al., 2001), se produce un consumo lento del sustrato, acoplado a una menor producción de etanol, lo que produce menor cantidad de etanol por gramo de glucosa consumida. 3GH parece ajustarse al caso descrito anteriormente. Los incrementos en rendimiento en biomasa en cultivo discontinuo son más difíciles de observar que en cultivo continuo con limitación de la fuente de carbono (van Maris et al., 2001). Por ese motivo, se decidió prolongar el tiempo de cultivo hasta las 24 h, de esta forma las cepas con mayor capacidad respiratoria, consumirán más etanol y por tanto la productividad será mayor. Este hecho se constató para las cepas VTH y DTH, con productividades superiores al 10%, con respecto a las cepas parentales. Ni 3TH ni 3GH presentaron mayor rendimiento al final del cultivo, aunque 3TH presenta un mejor aprovechamiento de la glucosa durante el crecimiento exponencial medio-exponencial tardío.

En cuanto a las condiciones de cultivo semi-industriales en medio MAB, se han observado comportamientos muy distintos en las diferentes cepas. En el transformante DTH la hidrólisis de sacarosa y el consumo de azúcares reductores son menores que en la cepa parental, mientras que en el transformante VTH, la velocidad de hidrólisis de sacarosa es igual a la de la cepa parental, pero con una menor incorporación de azúcares reductores. Esto genera una acumulación de azúcares reductores en los cultivos de las cepas transformantes, de modo que a las 24 h no se han consumido totalmente tal y como ocurre con las cepas parentales. En los transformantes 3TH y 3GH tanto la velocidad de hidrólisis de la sacarosa (debido a la menor actividad invertasa) como la tasa de consumo de azúcares reductores son menores que en la cepa parental. No obstante, no se produce una acumulación de hidratos de carbono en el medio, por lo que la incorporación de los mismos ha de ser más rápida. Por otro lado se observa una menor producción de etanol a lo largo de la curva de crecimiento.

La producción final de los cultivos (48 h) es superior en los casos de los transformantes VTH, DTH y 3TH lo que supone un resultado muy positivo bajo el punto de vista aplicado ya que supondría un abaratamiento de los costes de producción.

El consumo más lento de la fuente de carbono detectado en estos tres transformantes en todos los medios ha de ser interpretado como un posible efecto de regulación alostérica de las enzimas glucolíticas, ya que el incremento en el número de reacciones y el transporte de metabolitos a distintos compartimentos puede provocar aumento en las concentraciones de algunos de ellos. Además se postula que las levaduras puedan modular la expresión de genes implicados en la utilización de fuentes alternativas de carbono sensando el flujo de glucosa o la velocidad de consumo de la misma. No obstante, no hay evidencias de que se pueda modular el grado de represión de *SUC2* (Gancedo, 2008).

Los derivados de la cepa V3, utilizada para la fermentación de masas dulces, 3TH y 3GH no presentan diferencias significativas con la cepa parental fermentando este tipo de masas, sin embargo 3TH presenta un mayor rendimiento biomasa/sustrato cuando se cultiva en medio MAB lo que convierte a este transformante en una alternativa a la cepa parental para la industria panadera. En el caso de VTH, derivado de la cepa V1 utilizada para la fermentación de masa seca, se observa un retraso en el incremento de volumen de la masa inferior a 15 minutos. Esto podría indicar un retraso en la inducción de la maltasa, ya que las pendientes de incremento de volumen de la cepa parental y el transformante son prácticamente iguales. Aún así el volumen final alcanzado es similar en ambas cepas, lo que unido al aumento de rendimiento observado en el transformante cuando se cultiva en condiciones industriales podría hacer de él una buena alternativa a la cepa parental para la fermentación de masas secas.

Conclusiones

1. El estudio de los genes *SUC2* y *LEU2* ha permitido el establecimiento de relaciones de parentesco entre cepas panaderas mediante RFLP.
2. La utilización de q-PCR permite estimar el número de copias de un gen y el número de copias de cada cromosoma en cepas industriales. Los resultados obtenidos son consistentes con datos previos obtenidos mediante otras técnicas.
3. Alteraciones de parámetros durante el cultivo industrial de las levaduras panaderas como el pH o la producción de etanol pueden dar lugar a cambios en las propiedades del producto final. La concentración intracelular de trehalosa al final del cultivo parece ser un buen indicador del estado del mismo.
4. El uso de PFP permite el aislamiento de mutantes superproductores de fenilalanina. Los productos panarios elaborados con alguno de estos mutantes presentan sabor y aroma diferentes a los de la cepa parental con una buena aceptación por parte del consumidor.
5. La regulación transcripcional en cepas panaderas es similar a la descrita en cepas de laboratorio, con grandes diferencias de expresión génica en condiciones fermentativas y respiratorias, y con fuertes indicios de control transcripcional por Mig1p, Hap4p y Cat8p.
6. El mutante DOG21 presenta diferencias con respecto a su cepa parental V1 en la expresión de numerosos genes, especialmente en condiciones fermentativas. Las diferencias de expresión pueden estar motivadas por la desregulación de genes implicados en la respuesta a estrés. Se postula además que la reducción en los niveles de expresión de *HXK2* permite la activación de Cat8p y la expresión de genes implicados en la utilización de fuentes de carbono alternativas a la glucosa como *SUC* y *MAL*.
7. La sobreexpresión del factor transcripcional *HAP4* da lugar a un aumento en el rendimiento en biomasa tanto en medio de laboratorio YPD como en MAB debido a un aumento del metabolismo respiratorio. La sobreexpresión no afecta a propiedades importantes en cepas panaderas como las tasas de crecimiento, la

actividad invertasa en medios industriales o la capacidad fermentativa en los transformantes VTH (masa seca) y 3TH (masa dulce).

8. Tanto los mutantes espontáneos productores de 2-feniletanol como los que sobreexpresan *HAP4* carecen de marcadores de resistencia a antibióticos, por lo que tienen características ideales para ser utilizadas en la industria panadera.

APÉNDICE I

Resultados de la comparación entre la expresión de los genes en condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1. FC viene dada por la expresión en Log_2 b, siendo b el cociente de la expresión en YPD frente a YPG.

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>Gen</i>	Biological Process	FC
<i>AAC1</i>	ATP/ADP exchange	-3,42
<i>ACO1</i>	citrate metabolism, glutamate biosynthesis, propionate metabolism, tricarboxylic acid cycle	-1,59
<i>ACS1</i>	* acetate fermentation, acetyl-CoA biosíntesis	-5,73
<i>ADA2</i>	chromatin modification, histone acetylation	1,42
<i>ADE12</i>	adenosine biosynthesis	-2,20
<i>ADH2</i>	ethanol metabolism, fermentation	-1,91
<i>ADR1</i>	peroxisome organization and biogenesis, regulation of carbohydrate metabolism, transcription	-4,10
<i>ADY2</i>	DNA metabolism, meiosis, nitrogen utilization, transport	-3,46
<i>AFR1</i>	regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway, signal transduction during conjugation with cellular fusion	-2,54
<i>AGP1</i>	amino acid transport	1,71
<i>AGP2</i>	fatty acid metabolism, response to osmotic stress	-2,49
<i>AGX1</i>	glyoxylate cycle	-3,80
<i>AHP1</i>	regulation of redox homeostasis	1,98
<i>ALD3</i>	response to stress	-2,73
<i>ALD4</i>	ethanol metabolism	-5,91
<i>ALK1</i>	Unknown	3,50
<i>AMD2</i>	Unknown	-1,37
<i>AMS1</i>	carbohydrate metabolism	-5,33
<i>AOR1</i>	Unknown	1,59
<i>APE2</i>	peptide metabolism	-1,47
<i>APG9</i>	autophagy, autophagic vacuole formation, protein-vacuolar targeting	-1,66
<i>APT2</i>	Unknown	-2,67
<i>AQY1</i>	transport, water	-2,25

<i>ARA1</i>	carbohydrate metabolism	-2,05
<i>ARG1</i>	arginine biosynthesis, argininosuccinate metabolism, citrulline metabolism	2,50
<i>ARG3</i>	arginine biosynthesis, ornithine metabolism	2,75
<i>ARG4</i>	arginine biosynthesis	1,52
<i>ARG5,6</i>	ornithine biosynthesis	2,96
<i>ARO10</i>	leucine catabolism, phenylalanine catabolism	-4,06
<i>ARO2</i>	aromatic amino acid family biosynthesis	1,38
<i>ARO7</i>	aromatic amino acid family biosynthesis	1,82
<i>ARO9</i>	aromatic amino acid family metabolism	-2,86
<i>ASE1</i>	mitotic anaphase B, mitotic spindle assembly	-1,82
<i>ASH1</i>	pseudohyphal growth, regulation of transcription, mating-type specific	-1,51
<i>ASN1</i>	asparagine biosynthesis	1,54
<i>ASN2</i>	asparagine biosynthesis	1,43
<i>AST1</i>	protein-membrane targeting	1,71
<i>ATH1</i>	* response to stress, trehalose catabolism	-4,35
<i>ATO3</i>	nitrogen utilization, transport	-3,39
<i>ATP15</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-2,11
<i>ATP16</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,61
<i>ATP17</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,80
<i>ATP18</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-2,13
<i>ATP19</i>	unknown	-1,87
<i>ATP2</i>	ATP synthesis coupled proton transport, cell aging (sensu Saccharomyces)	-1,60
<i>ATP3</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,73
<i>ATP4</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,62
<i>ATP5</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,91
<i>ATP7</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,87
<i>AYR1</i>	phosphatidic acid biosynthesis	-1,84

<i>AZR1</i>	transport	2,40
<i>BAP2</i>	amino acid transport	-1,59
<i>BAT1</i>	amino acid catabolism, branched chain family amino acid biosynthesis	2,08
<i>BCD1</i>	unknown	2,15
<i>BCP1</i>	unknown	1,49
<i>BCY1</i>	pseudohyphal growth, response to heat, response to stress, signal transduction	-1,64
<i>BDH1</i>	butanediol fermentation	-2,24
<i>BNA1</i>	nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis	1,99
<i>BNA3</i>	nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis	1,52
<i>BNA4</i>	nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis	1,53
<i>BNS1</i>	meiosis	-2,06
<i>BSC1</i>	unknown	-1,48
<i>BUD16</i>	bud site selection	1,59
<i>BUD19</i>	bud site selection	1,39
<i>BUD31</i>	bud site selection	1,98
<i>BUR2</i>	mitotic chromosome segregation, transcription	-1,94
<i>CAR2</i>	arginine catabolism	-2,66
<i>CAT8</i>	gluconeogenesis, positive regulation of transcription from Pol II promoter	-5,20
<i>CBP4</i>	protein complex assembly	-3,23
<i>CBP6</i>	protein biosynthesis	-2,62
<i>CDC13</i>	telomere capping, telomere maintenance	-4,50
<i>CDC40</i>	DNA replication, S phase of mitotic cell cycle, mitotic spindle assembly (sensu Saccharomyces), nuclear mRNA splicing, via spliceosome	-1,66
<i>CDC8</i>	* DNA dependent DNA replication, DNA repair, dTTP biosynthesis, dTTP biosynthesis, mutagenesis, plasmid maintenance	1,46

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>CIK1</i>	meiosis, mitotic chromosome segregation, mitotic spindle assembly (sensu Saccharomyces), mitotic spindle orientation	-7,82
<i>CIN4</i>	microtubule-based process	2,18
<i>CIN5</i>	regulation of transcription from Pol II promoter, response to drug, salinity response	-2,24
<i>CIN8</i>	mitotic anaphase B, mitotic chromosome segregation, mitotic spindle assembly (sensu Saccharomyces)	-1,76
<i>CIT2</i>	citrate metabolism, glutamate biosynthesis, glyoxylate cycle	-1,88
<i>CLB1</i>	G2/M transition of mitotic cell cycle, meiotic G2/MI transition, mitotic spindle assembly (sensu Saccharomyces), regulation of CDK activity	1,37
<i>CLB6</i>	G1/S transition of mitotic cell cycle, premeiotic DNA synthesis, regulation of CDK activity	2,72
<i>CMK1</i>	protein amino acid phosphorylation, signal transduction	-2,07
<i>COR1</i>	aerobic respiration	-1,58
<i>COX111</i>	signal transduction	-2,61
<i>COX13</i>	aerobic respiration	-1,80
<i>COX20</i>	aerobic respiration, * cytochrome c oxidase biogenesis, protein processing	-1,37
<i>COX4</i>	aerobic respiration	-2,05
<i>COX5A</i>	aerobic respiration	-2,57
<i>COX5B</i>	anaerobic respiration	1,44
<i>COX6</i>	aerobic respiration	-2,08
<i>COX7</i>	aerobic respiration	-2,39
<i>COX9</i>	aerobic respiration	-1,53
<i>CPS1</i>	nitrogen metabolism, proteolysis and peptidolysis	-1,56
<i>CRR1</i>	Unknown	1,94
<i>CRS5</i>	response to heavy metal	-2,89

<i>CSR2</i>	cell wall organization and biogenesis, * regulation of transcription from Pol II promoter	-6,15
<i>CTA1</i>	oxygen and reactive oxygen species metabolism	-4,18
<i>CTL1</i>	RNA processing	-1,35
<i>CTM1</i>	protein modification	-1,86
<i>CTR86</i>	unknown	1,38
<i>CTT1</i>	response to stress	-2,03
<i>CUE2</i>	unknown	1,56
<i>CUP1-1</i>	response to copper ion	-3,22
<i>CUP1-2</i>	response to copper	-3,08
<i>CUP2</i>	response to copper, transcription initiation from Pol II promoter	-2,60
<i>CVT19</i>	protein-vacuolar targeting	-1,39
<i>CVT9</i>	peroxisome degradation, protein-vacuolar targeting	-1,32
<i>CYC7</i>	electron transport	-1,42
<i>CYS3</i>	cysteine metabolism, sulfur amino acid metabolism, transsulfuration	1,72
<i>DAD1</i>	mitotic spindle assembly (sensu Saccharomyces)	1,79
<i>DAL1</i>	allantoin catabolism	2,67
<i>DAL7</i>	allantoin catabolism	-1,70
<i>DBP7</i>	35S primary transcript processing, ribosomal large subunit assembly and maintenance	-1,44
<i>DCD1</i>	* pyrimidine nucleotide metabolism	1,86
<i>DCI1</i>	fatty acid beta-oxidation	-5,56
<i>DCR1</i>	unknown	-3,42
<i>DCS1</i>	deadenylation-dependent decapping	-1,88
<i>DDI1</i>	ubiquitin-dependent protein catabolism, vesicle-mediated transport	-1,56
<i>DDR2</i>	response to stress	-6,39
<i>DDR48</i>	DNA repair	-1,81
<i>DFR1</i>	folic acid and derivative metabolism	3,25

<i>DGA1</i>	lipid storage, triacylglycerol biosynthesis	-1,33
<i>DLA3</i>	invasive growth, pseudohyphal growth	1,74
<i>DIC1</i>	dicarboxylic acid transport	-1,57
<i>DIP5</i>	amino acid transport	-1,56
<i>DLD1</i>	aerobic respiration, carbohydrate metabolism	-2,03
<i>DNF3</i>	intracellular protein transport, intracellular protein transport	-1,33
<i>DOC1</i>	cyclin catabolism, mitotic chromosome segregation, mitotic metaphase/anaphase transition, mitotic spindle elongation, ubiquitin-dependent protein catabolism	-1,96
<i>DOG1</i>	2-deoxyglucose resistance	-2,59
<i>DOG2</i>	glucose metabolism, response to stress	-1,95
<i>DUR1,2</i>	urea metabolism	1,50
<i>DUR3</i>	urea transport	2,63
<i>DYS1</i>	hypusine biosynthesis from peptidyl-lysine	1,33
<i>ECI1</i>	fatty acid beta-oxidation	-2,61
<i>ECM25</i>	cell wall organization and biogenesis	-5,37
<i>ECM37</i>	cell wall organization and biogenesis	-1,76
<i>ECM4</i>	cell wall organization and biogenesis	-4,38
<i>ECM40</i>	cell wall organization and biogenesis, ornithine biosynthesis	1,62
<i>EDC2</i>	deadenylation-dependent decapping	-1,54
<i>ELP6</i>	regulation of transcription from Pol II promoter	-1,46
<i>EMI5</i>	unknown	-1,76
<i>ENA2</i>	sodium ion transport	-1,84
<i>ERF2</i>	protein amino acid palmitoylation, protein-membrane targeting	-2,41
<i>ERG2</i>	ergosterol biosynthesis	1,61
<i>ERO1</i>	protein folding, protein thiol-disulfide exchange	-2,01
<i>ESBP6</i>	transport	-2,25

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>ETR1</i>	aerobic respiration, fatty acid biosynthesis	-3,71
<i>FAA2</i>	* N-terminal protein myristoylation, lipid metabolism	-4,72
<i>FBP1</i>	gluconeogenesis	-3,85
<i>FDH2</i>	formate catabolism	-1,78
<i>FDH2</i>	formate catabolism	-3,78
<i>FIS1</i>	Unknown	-1,98
<i>FIT1</i>	siderochrome transport	-2,20
<i>FIT3</i>	siderochrome transport	-2,37
<i>FLO1</i>	Flocculation	-1,56
<i>FLX1</i>	mitochondrial transport	1,41
<i>FOX2</i>	fatty acid metabolism	-1,91
<i>FSP2</i>	Unknown	-6,19
<i>FUN14</i>	Unknown	-2,14
<i>FUN26</i>	nucleoside transport	2,24
<i>FUN31</i>	hexose metabolism, protein amino acid phosphorylation	-1,33
<i>FUN34</i>	nitrogen utilization, transport	-4,89
<i>FYV1</i>	Unknown	2,79
<i>FYV10</i>	Unknown	-4,54
<i>GAC1</i>	glycogen metabolism, meiosis	-2,95
<i>GAD1</i>	glutamate catabolism, response to oxidative stress	-3,66
<i>GAT1</i>	regulation of nitrogen utilization, transcription initiation from Pol II promoter	2,95
<i>GAT2</i>	Transcription	-2,19
<i>GCY1</i>	salinity response	-1,83
<i>GDB1</i>	glycogen catabolism	-4,73
<i>GDH1</i>	glutamate biosynthesis, using glutamate dehydrogenase (NAD(P)+)	3,20
<i>GDH2</i>	nitrogen metabolism	-4,41
<i>GDH3</i>	glutamate biosynthesis	1,68

<i>GIP2</i>	biological_process unknown	-7,51
<i>GLC3</i>	glycogen metabolism	-1,84
<i>GLE1</i>	poly(A)+ mRNA-nucleus export	-2,69
<i>GLK1</i>	carbohydrate metabolism	-2,38
<i>GLO1</i>	glutathione metabolism	-1,86
<i>GND1</i>	glucose metabolism	1,66
<i>GND2</i>	glucose metabolism	1,59
<i>GPI2</i>	GPI anchor biosynthesis	3,05
<i>GPM2</i>	glycolysis, gluconeogenesis	-1,71
<i>GPR1</i>	G-protein coupled receptor protein signaling pathway, pseudohyphal growth	-1,34
<i>GPX1</i>	response to oxidative stress	-2,99
<i>GPX2</i>	response to oxidative stress	1,71
<i>GRE3</i>	arabinose metabolism, response to stress	-2,72
<i>GRX4</i>	response to oxidative stress	1,34
<i>GSC2</i>	beta-1,3 glucan biosynthesis, cell wall organization and biogenesis	-1,57
<i>GSY1</i>	glycogen metabolism	-2,65
<i>GTT1</i>	glutathione metabolism	-3,55
<i>GUT1</i>	glycerol metabolism	-4,15
<i>GUT2</i>	* carbohydrate metabolism	-1,33
<i>GYP7</i>	vesicle-mediated transport	-2,19
<i>HAA1</i>	transcription initiation from Pol II promoter	-1,48
<i>HAL1</i>	salinity response, transcription initiation from Pol II promoter	-1,38
<i>HAP1</i>	aerobic respiration, positive regulation of transcription from Pol II promoter	1,42
<i>HAP4</i>	regulation of carbohydrate metabolism, transcription	-1,92
<i>HBT1</i>	shmo0 tip	-5,87
<i>HDR1</i>	unknown	-1,64
<i>HEF3</i>	translational elongation	1,50

<i>HIS3</i>	histidine biosynthesis	1,45
<i>HIS4</i>	histidine biosynthesis	1,81
<i>HIS6</i>	histidine biosynthesis	2,64
<i>HMS1</i>	pseudohyphal growth	-1,76
<i>HMX1</i>	unknown	-1,66
<i>HNT2</i>	nucleoside catabolism	1,91
<i>HOM3</i>	methionine metabolism, threonine metabolism	1,42
<i>HOP1</i>	meiosis, synaptonemal complex formation	-2,02
<i>HOR7</i>	response to stress	-1,73
<i>HSP12</i>	cell adhesion, hyperosmotic response, response to dessication, response to heat, response to oxidative stress	-8,74
<i>HSP26</i>	protein folding, response to stress	-3,54
<i>HUL4</i>	protein polyubiquitination, protein monoubiquitination	-4,02
<i>HXK1</i>	fructose metabolism	-2,99
<i>HXT10</i>	unknown	1,44
<i>HXT2</i>	hexose transport	-1,75
<i>HXT3</i>	transport	-1,47
<i>HXT6</i>	hexose transport	-1,78
<i>HXT7</i>	hexose transport	-2,21
<i>ICL1</i>	glyoxylate cycle	-3,51
<i>ICL2</i>	propionate metabolism, threonine catabolism	-3,33
<i>IDH1</i>	glutamate biosynthesis, isocitrate metabolism, tricarboxylic acid cycle	-1,46
<i>IDP2</i>	glutamate biosynthesis, isocitrate metabolism	-6,92
<i>IES2</i>	unknown	-1,45
<i>IFH1</i>	chromatin silencing at telomere, rRNA processing	-1,62
<i>ILV1</i>	branched chain family amino acid biosynthesis	1,37
<i>INH1</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,57

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>INO1</i>	myo-inositol metabolism	-2,78
<i>INP51</i>	cell wall organization and biogenesis, dephosphorylation, phosphatidylinositol biosynthesis	-2,44
<i>IPK1</i>	myo-inositol metabolism	-1,96
<i>ISF1</i>	aerobic respiration	-4,23
<i>IST1</i>	Unknown	-2,40
<i>IST3</i>	spliceosome assembly	1,44
<i>ISU1</i>	iron homeostasis, iron-sulfur cluster assembly	-1,71
<i>ITT1</i>	regulation of translational termination	-1,37
<i>JEN1</i>	lactate transporter	-1,90
<i>JIP3</i>	Unknown	-1,61
<i>KAP114</i>	protein-nucleus import	1,38
<i>KAP122</i>	protein-nucleus import, response to drug	2,07
<i>KAR5</i>	karyogamy during conjugation with cellular fusion	1,80
<i>KGD1</i>	2-oxoglutarate metabolism, tricarboxylic acid cycle	-1,54
<i>KGD2</i>	2-oxoglutarate metabolism, tricarboxylic acid cycle	-2,40
<i>KHA1</i>	monovalent inorganic cation transport	-2,49
<i>KIP2</i>	microtubule stabilization, * mitotic anaphase B, nuclear migration (sensu Saccharomyces)	-3,48
<i>KRE26</i>	Unknown	1,48
<i>KRE29</i>	Unknown	-1,71
<i>KRR1</i>	ribosome biogenesis	1,80
<i>LEE1</i>	Unknown	-2,83
<i>LEU2</i>	leucine biosynthesis	1,79
<i>LRO1</i>	lipid storage, triacylglycerol biosynthesis	-1,53
<i>LSB3</i>	Unknown	-1,35
<i>LSC2</i>	succinyl-CoA metabolism, tricarboxylic acid cycle	-4,28

<i>LSP1</i>	unknown	-1,44
<i>LYS21</i>	lysine biosynthesis, aminoacidic pathway	-2,01
<i>MAG1</i>	DNA dealkylation	-2,67
<i>MAL11</i>	alpha-glucoside transport, trehalose transport	-7,52
<i>MAL12</i>	maltose catabolism	-7,47
<i>MAL13</i>	carbohydrate metabolism, regulation of transcription, DNA-dependent	-2,30
<i>MAL31</i>	alpha-glucoside transport	-6,29
<i>MAL32</i>	maltose catabolism	-7,79
<i>MAM3</i>	mitochondrion organization and biogenesis	-1,52
<i>MAP1</i>	proteolysis and peptidolysis	1,52
<i>MBF1</i>	positive regulation of transcription from Pol II promoter	1,51
<i>MBR1</i>	aerobic respiration	-5,36
<i>MCM21</i>	chromosome segregation	-1,78
<i>MCM3</i>	DNA replication initiation, DNA unwinding, pre-replicative complex formation and maintenance	-3,07
<i>MCR1</i>	electron transport, ergosterol biosynthesis, response to oxidative stress	-2,62
<i>MCH2</i>	transport	-3,16
<i>MCH5</i>	* transport	-2,09
<i>MDG1</i>	signal transduction during conjugation with cellular fusion	-1,72
<i>MDH1</i>	malate metabolism, tricarboxylic acid cycle	-1,95
<i>MDH2</i>	gluconeogenesis, glyoxylate cycle, malate metabolism	-3,10
<i>MDM10</i>	mitochondrial genome maintenance, mitochondrion inheritance, mitochondrion organization and biogenesis	-2,21
<i>MDM20</i>	cytoskeleton organization and biogenesis, mitochondrion inheritance	1,53
<i>MDM32</i>	mitochondrion organization and biogenesis	-1,40
<i>MED11</i>	transcription from Pol II promoter	2,02

<i>MEK1</i>	meiosis, * protein amino acid phosphorylation	5,26
<i>MEP3</i>	* ammonium transport	1,58
<i>MET14</i>	methionine metabolism, sulfate assimilation	2,36
<i>MET16</i>	sulfate assimilation, methionine metabolism	1,99
<i>MET17</i>	methionine metabolism	1,82
<i>MET3</i>	methionine metabolism, sulfate assimilation	1,78
<i>MFA2</i>	signal transduction during conjugation with cellular fusion	2,92
<i>MGA2</i>	fatty acid metabolism, positive regulation of transcription from Pol II promoter, response to cold	-1,62
<i>MHP1</i>	cell wall organization and biogenesis, microtubule stabilization	-1,40
<i>MHR1</i>	mitochondrial genome maintenance	-2,08
<i>MIG1</i>	glucose metabolism, regulation of transcription from Pol II promoter	-1,71
<i>MIH1</i>	G2/M transition of mitotic cell cycle, regulation of CDK activity	-2,53
<i>MLH3</i>	DNA repair; DNA recombination, mismatch repair	-2,31
<i>MMS21</i>	DNA repair	-6,05
<i>MMS22</i>	double-strand break repair	1,55
<i>MNE1</i>	unknown	-1,52
<i>MNR2</i>	magnesium ion transport	-1,55
<i>MPD1</i>	protein disulfide-isomerase reaction, protein folding	-1,46
<i>MPH2</i>	carbohydrate transport	-5,48
<i>MRH1</i>	unknown	1,42
<i>MRK1</i>	protein amino acid phosphorylation, proteolysis and peptidolysis, response to stress	-2,01
<i>MRP5</i>	endocytosis	-1,75
<i>MRPL19</i>	protein biosynthesis	-1,82
<i>MRPL32</i>	protein biosynthesis	1,86

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>MRPL6</i>	protein biosynthesis	-2,07
<i>MRPL7</i>	protein biosynthesis	-1,53
<i>MRPS28</i>	protein biosynthesis, ribosomal small subunit assembly and maintenance	-1,60
<i>MRS3</i>	RNA splicing, transport	1,58
<i>MRS5</i>	mitochondrial translocation	2,20
<i>MSB2</i>	establishment of cell polarity (sensu <i>Saccharomyces</i>), response to osmotic stress	-1,90
<i>MSC1</i>	meiotic recombination	-2,57
<i>MSD1</i>	protein biosynthesis	-1,91
<i>MSS18</i>	mRNA splicing	-1,47
<i>MTD1</i>	one-carbon compound metabolism, purine base biosynthesis	-1,56
<i>MTF2</i>	mRNA processing, protein biosynthesis	-1,46
<i>NAT5</i>	protein amino acid acetylation	1,52
<i>NBP1</i>	Unknown	1,39
<i>NCA3</i>	mitochondrion organization and biogenesis	-1,74
<i>NCE103</i>	secretion, non-classical	-2,73
<i>NDE2</i>	NADH oxidation, ethanol fermentation	-1,43
<i>NDI1</i>	oxidative phosphorylation, NADH to ubiquinone	-2,75
<i>NEJ1</i>	DNA repair, double-strand break repair	1,58
<i>NEM1</i>	nuclear organization and biogenesis, sporulation (sensu <i>Saccharomyces</i>)	-1,54
<i>NFT1</i>	Transport	-2,03
<i>NFT1</i>	Transport	-1,32
<i>NGL3</i>	Unknown	-3,38
<i>NHP2</i>	35S primary transcript processing, rRNA modification	1,35
<i>NHP6B</i>	Unknown	-1,44
<i>NIP100</i>	mitotic anaphase B	-1,61
<i>NIT1</i>	Unknown	-1,62
<i>NTH2</i>	response to stress, trehalose catabolism	-2,02

<i>NUP1</i>	NLS-bearing substrate-nucleus import, RNA-nucleus export, mRNA-binding (hnRNP) protein-nucleus import, mRNA-nucleus export, nuclear membrane organization and biogenesis, nuclear pore organization and biogenesis, protein-nucleus export, protein	-3,08
<i>OAC1</i>	oxaloacetate transport, sulfate transport	1,75
<i>ODC1</i>	mitochondrial transport	-4,56
<i>ODC2</i>	mitochondrial transport	1,67
<i>OM45</i>	unknown	-4,26
<i>OPI3</i>	phosphatidylcholine biosynthesis	-2,24
<i>OPT2</i>	oligopeptide transport	2,67
<i>ORT1</i>	arginine biosynthesis, nuclear migration (sensu <i>Saccharomyces</i>)	1,93
<i>OSH1</i>	steroid biosynthesis	-1,42
<i>PAI3</i>	vacuolar protein catabolism	-1,39
<i>PBI2</i>	regulation of proteolysis and peptidolysis, vacuole fusion (non-autophagic)	-3,76
<i>PCD1</i>	unknown	-2,13
<i>PCK1</i>	gluconeogenesis	-5,70
<i>PCL7</i>	regulation of glycogen biosynthesis, regulation of glycogen catabolism	-1,58
<i>PCP1</i>	mitochondrial intermembrane space protein import, mitochondrion organization and biogenesis	-1,39
<i>PDC5</i>	ethanol fermentation, pyruvate metabolism	1,42
<i>PDE2</i>	cAMP-mediated signaling	-1,34
<i>PDH1</i>	propionate metabolism	-1,97
<i>PDR10</i>	multidrug transport	-1,59
<i>PDR12</i>	organic acid transport, propionate metabolism, transport	1,81
<i>PDR3</i>	regulation of transcription from Pol II promoter, response to drug	-1,34
<i>PEP4</i>	cellular response to starvation, microautophagy, sporulation, vacuolar protein catabolism	-1,40

<i>PET111</i>	protein synthesis	-3,64
<i>PET18</i>	mitochondrion organization and biogenesis, * thiamin metabolism	3,00
<i>PET494</i>	protein biosynthesis	2,00
<i>PEX11</i>	peroxisome organization and biogenesis	-2,95
<i>PEX13</i>	peroxisome organization and biogenesis, protein-peroxisome targeting	2,20
<i>PFD1</i>	cytoskeleton organization and biogenesis, protein folding	2,36
<i>PFK26</i>	fructose 2,6-bisphosphate metabolism, regulation of glycolysis	-2,38
<i>PGM2</i>	glucose 1-phosphate utilization, glucose 6-phosphate utilization	-3,46
<i>PHM8</i>	unknown	-2,21
<i>PHO81</i>	phosphate metabolism	-1,90
<i>PHO89</i>	phosphate transport	-6,13
<i>PIB1</i>	protein ubiquitination	-2,31
<i>PKH2</i>	MAPKKK cascade (cell wall biogenesis), protein amino acid phosphorylation	-1,54
<i>PMD1</i>	sporulation	1,78
<i>PMP2</i>	unknown	1,48
<i>PNG1</i>	misfolded or incompletely synthesized protein catabolism, protein deglycosylation	-2,30
<i>POG1</i>	re-entry into mitotic cell cycle after pheromone arrest	-1,75
<i>POL32</i>	base-excision repair, lagging strand elongation, leading strand elongation, mismatch repair, mutagenesis, nucleotide-excision repair, post-replication repair	1,65
<i>POR1</i>	aerobic respiration, ion transport, mitochondrion organization and biogenesis	-3,00
<i>POT1</i>	fatty acid beta-oxidation	-5,38
<i>POX1</i>	fatty acid beta-oxidation	-8,54
<i>PPA2</i>	respiratory gaseous exchange	-1,41
<i>PRB1</i>	response to starvation, sporulation, * vacuolar protein catabolism	-1,84
<i>PRC1</i>	vacuolar protein catabolism	-2,18

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>PRM7</i>	conjugation with cellular fusion	-2,09
<i>PRP24</i>	snRNP recycling, spliceosome assembly	-2,71
<i>PRX1</i>	regulation of redox homeostasis	-3,21
<i>PRY1</i>	Unknown	-2,72
<i>PSD1</i>	phosphatidylcholine biosynthesis	-1,74
<i>PSP2</i>	Unknown	-1,45
<i>PSY2</i>	Unknown	-1,35
<i>PTK1</i>	polyamine transport	-3,79
<i>PUT1</i>	glutamate biosynthesis, proline catabolism	-2,28
<i>PUT4</i>	neutral amino acid transport	-3,72
<i>PXA2</i>	fatty acid transport	-3,78
<i>PYC1</i>	NADPH regeneration, gluconeogenesis	-1,38
<i>QCR10</i>	aerobic respiration	-2,68
<i>QCR6</i>	aerobic respiration, oxidative phosphorylation, ubiquinone to cytochrome c	-1,56
<i>QCR8</i>	aerobic respiration, oxidative phosphorylation, ubiquinone to cytochrome c	-2,42
<i>QCR9</i>	* aerobic respiration, iron-sulfur cluster assembly, oxidative phosphorylation, ubiquinone to cytochrome c	-1,51
<i>RAD2</i>	nucleotide-excision repair, DNA incision, 3' to lesion	-1,96
<i>RAD51</i>	chromatin modeling, NOT involved in double-strand break repair via break-induced replication, NOT involved in double-strand break repair via single-strand annealing, double-strand break repair via synthesis-dependent strand annealing, heteroduplex f	-1,52
<i>RAD54</i>	NOT involved in double-strand break repair via break-induced replication, NOT involved in double-strand break repair via single-strand annealing, double-strand break repair via synthesis-dependent strand annealing, heteroduplex formation, telomerase	-1,32

<i>RAD59</i>	double-strand break repair via break-induced replication, double-strand break repair via single-strand annealing, telomerase-independent telomere maintenance	2,13
<i>RAD7</i>	nucleotide-excision repair, DNA damage recognition	-1,44
<i>RAS2</i>	RAS protein signal transduction, adenylate cyclase activation, pseudohyphal growth, sporulation (sensu Saccharomyces)	-2,13
<i>RCK1</i>	protein amino acid phosphorylation, regulation of meiosis	-1,63
<i>RCS1</i>	high affinity iron transport, * positive regulation of transcription from Pol II promoter	-1,98
<i>REC102</i>	meiotic DNA double-strand break formation, meiotic recombination	1,66
<i>REV7</i>	DNA repair, mutagenesis	1,81
<i>REX4</i>	rRNA processing, ribosome assembly	1,67
<i>RGJ2</i>	G-protein signaling, coupled to cAMP nucleotide second messenger	-1,44
<i>RIB1</i>	vitamin B2 biosynthesis	-1,76
<i>RIB7</i>	vitamin B2 biosynthesis	-1,61
<i>RIM11</i>	protein amino acid phosphorylation, proteolysis and peptidolysis, response to stress, sporulation (sensu Saccharomyces)	-1,90
<i>RIM4</i>	meiosis, meiotic recombination, premeiotic DNA synthesis, sporulation	-2,03
<i>RIM8</i>	* invasive growth, * meiosis, protein processing	-1,68
<i>RIP1</i>	aerobic respiration, oxidative phosphorylation, ubiquinone to cytochrome c	-2,50
<i>RIS1</i>	chromatin assembly/disassembly, mating-type switching/recombination	-1,40
<i>RMD8</i>	unknown	-1,79
<i>ROG1</i>	* lipid metabolism	-4,83
<i>RPC11</i>	transcription from Pol III promoter	1,36
<i>RPC25</i>	transcription from Pol III promoter	1,66
<i>RPL12B</i>	protein biosynthesis, ribosomal large subunit assembly and maintenance	1,32

<i>RPL16A</i>	protein biosynthesis	1,51
<i>RPL16B</i>	protein biosynthesis	1,45
<i>RPL22A</i>	protein biosynthesis	1,57
<i>RPL23A</i>	protein biosynthesis	1,43
<i>RPL23B</i>	protein biosynthesis	1,48
<i>RPL24A</i>	protein biosynthesis	1,54
<i>RPL24B</i>	protein biosynthesis	1,39
<i>RPL26A</i>	protein biosynthesis	1,44
<i>RPL26B</i>	protein biosynthesis	1,92
<i>RPL27A</i>	protein biosynthesis	1,40
<i>RPL27B</i>	protein biosynthesis	1,59
<i>RPL29</i>	protein biosynthesis	1,39
<i>RPL31A</i>	protein biosynthesis	1,46
<i>RPL32</i>	protein biosynthesis	1,45
<i>RPL33A</i>	protein biosynthesis	1,65
<i>RPL33B</i>	protein biosynthesis	1,51
<i>RPL34A</i>	protein biosynthesis	1,71
<i>RPL34B</i>	protein biosynthesis	1,45
<i>RPL35A</i>	protein biosynthesis	1,55
<i>RPL35B</i>	protein biosynthesis	1,41
<i>RPL36A</i>	protein biosynthesis	1,58
<i>RPL37A</i>	protein biosynthesis	1,73
<i>RPL37B</i>	protein biosynthesis	1,75
<i>RPL42A</i>	protein biosynthesis	1,52
<i>RPL42B</i>	protein biosynthesis	1,42
<i>RPL6A</i>	protein biosynthesis, ribosomal large subunit assembly and maintenance	1,55
<i>RPL6B</i>	protein biosynthesis, ribosomal large subunit assembly and maintenance	1,74

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>RPM2</i>	mitochondrion organization and biogenesis, * protein biosynthesis, tRNA 5'-leader removal	-1,46
<i>RPS10A</i>	protein biosynthesis	1,67
<i>RPS10B</i>	protein biosynthesis	1,75
<i>RPS11A</i>	protein biosynthesis, regulation of translational fidelity, ribosomal small subunit assembly and maintenance	1,42
<i>RPS11B</i>	protein biosynthesis, * regulation of translational fidelity, ribosomal small subunit assembly and maintenance	1,36
<i>RPS14A</i>	protein biosynthesis, ribosomal small subunit assembly and maintenance	1,38
<i>RPS16B</i>	protein biosynthesis	1,39
<i>RPS17B</i>	protein biosynthesis, ribosomal small subunit assembly and maintenance	1,47
<i>RPS18A</i>	protein biosynthesis	1,49
<i>RPS18B</i>	protein biosynthesis	1,66
<i>RPS22A</i>	protein biosynthesis	1,64
<i>RPS22B</i>	protein biosynthesis	1,55
<i>RPS24A</i>	protein biosynthesis	1,49
<i>RPS24B</i>	protein biosynthesis	1,49
<i>RPS25A</i>	protein biosynthesis	1,34
<i>RPS26B</i>	protein biosynthesis	1,50
<i>RPS27B</i>	protein biosynthesis	1,50
<i>RPS28B</i>	protein biosynthesis	1,84
<i>RPS31</i>	protein biosynthesis, ribosomal small subunit assembly and maintenance	1,35
<i>RPS7A</i>	protein biosynthesis	1,55
<i>RPS7B</i>	protein biosynthesis	1,57
<i>RPS9B</i>	protein biosynthesis, regulation of translational fidelity	1,37
<i>RR11</i>	adaptation to pheromone during conjugation with cellular fusion, protein deneddylation	1,33
<i>RR12</i>	adaptation to pheromone during conjugation with cellular fusion, protein deneddylation	-1,43

<i>RRS1</i>	rRNA processing, * ribosome biogenesis	1,41
<i>RSC30</i>	regulation of transcription, DNA-dependent	1,40
<i>SAG1</i>	agglutination during conjugation with cellular fusion	1,38
<i>SAM1</i>	methionine metabolism	1,69
<i>SAM4</i>	sulfur amino acid metabolism	1,38
<i>SAP1</i>	unknown	-1,49
<i>SAP185</i>	G1/S transition of mitotic cell cycle	-1,34
<i>SCW4</i>	conjugation with cellular fusion	-1,54
<i>SDH2</i>	oxidative phosphorylation, succinate to ubiquinone, tricarboxylic acid cycle	-2,20
<i>SDH4</i>	mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone, tricarboxylic acid cycle	-3,16
<i>SDT1</i>	pyrimidine base metabolism	2,19
<i>SED1</i>	cell wall organization and biogenesis	-1,41
<i>SET4</i>	unknown	1,32
<i>SFH1</i>	chromatin modeling	1,36
<i>SHG1</i>	histone methylation	3,04
<i>SHO1</i>	osmosensory signaling pathway via Sho1 osmosensor, pseudohyphal growth	1,42
<i>SHR5</i>	RAS protein signal transduction, protein amino acid palmitoylation, protein localization	-1,70
<i>SIP2</i>	cell aging (sensu Saccharomyces), filamentous growth, protein amino acid phosphorylation, signal transduction	-2,35
<i>SIZ1</i>	sumoylation	-1,95
<i>SKM1</i>	protein amino acid phosphorylation, regulation of cell cycle	-1,35
<i>SMA1</i>	spore wall assembly (sensu Saccharomyces)	1,61
<i>SNA2</i>	unknown	-1,54
<i>SNF3</i>	response to glucose stimulus, signal transduction	-1,48
<i>SNZ1</i>	pyridoxine metabolism, NOT involved in thiamin biosynthesis	-3,51

<i>SOK1</i>	cAMP-mediated signaling	-2,02
<i>SOLA</i>	unknown	-4,27
<i>SPG1</i>	unknown	-3,13
<i>SPH1</i>	Rho protein signal transduction, actin filament organization, establishment of cell polarity (sensu Saccharomyces), polar budding, pseudohyphal growth	-1,39
<i>SPI1</i>	unknown	-1,64
<i>SPO14</i>	exocytosis, phospholipid metabolism, sporulation (sensu Fungi)	-1,93
<i>SPR28</i>	cell wall organization and biogenesis, cellular morphogenesis	-1,45
<i>SPS19</i>	* fatty acid catabolism, sporulation (sensu Saccharomyces)	-6,28
<i>SPT8</i>	chromatin modification, histone acetylation	-2,25
<i>SRB8</i>	negative regulation of transcription from Pol II promoter	-1,38
<i>SRN2</i>	RNA export, putative	2,20
<i>SSA1</i>	SRP-dependent, co-translational membrane targeting, translocation, * protein folding, * protein-nucleus import, translocation	1,39
<i>SSA4</i>	SRP-dependent, co-translational membrane targeting, translocation, protein folding, response to stress,	1,88
<i>SSH4</i>	unknown	-2,18
<i>STB1</i>	G1/S transition of mitotic cell cycle	1,45
<i>STE14</i>	peptide pheromone maturation	2,27
<i>STE50</i>	MAPKKK cascade (osmolarity sensing), MAPKKK cascade (pseudohyphal growth), response to pheromone, signal transduction during conjugation with cellular fusion	-1,54
<i>STE6</i>	peptide pheromone export	-1,40
<i>STF1</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-2,86
<i>STF2</i>	ATP synthesis coupled proton transport, response to desiccation	-3,23
<i>STR3</i>	methionine biosynthesis	2,73

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>STT4</i>	actin cytoskeleton organization and biogenesis, phosphatidylethanolamine biosynthesis, NOT involved in protein secretion	1,57
<i>SUC2</i>	sucrose catabolism	-6,05
<i>SUN4</i>	mitochondrion organization and biogenesis	-1,75
<i>SUR1</i>	mannose inositol phosphoceramide metabolism, sphingolipid biosynthesis	-1,82
<i>SUR4</i>	fatty acid metabolism, fatty acid elongation, post-Golgi transport, sphingolipid biosynthesis	1,63
<i>SUT1</i>	regulation of transcription from Pol II promoter, sterol transport	-1,34
<i>SUT2</i>	regulation of transcription from Pol II promoter, sterol transport	-2,32
<i>SWD1</i>	chromatin silencing at telomere, histone methylation	1,90
<i>TAD3</i>	tRNA modification	1,85
<i>TAT1</i>	amino acid transport	-2,22
<i>TBF1</i>	loss of chromatin silencing	1,55
<i>TEF4</i>	translational elongation	1,46
<i>TEP1</i>	spore wall assembly (sensu Saccharomyces)	-2,50
<i>TES1</i>	fatty acid oxidation	-3,37
<i>TFC3</i>	transcription initiation from Pol III promoter	-1,80
<i>TFS1</i>	regulation of proteolysis and peptidolysis	-3,87
<i>THI3</i>	thiamin biosynthesis	-2,59
<i>TID3</i>	chromosome segregation, microtubule nucleation	-1,67
<i>TIP1</i>	cell wall organization and biogenesis	-3,07
<i>TTR4</i>	Unknown	1,68
<i>TKL2</i>	pentose-phosphate shunt	-2,27
<i>TNA1</i>	* nicotinamide mononucleotide transport	1,79

<i>TOR2</i>	G1 phase of mitotic cell cycle, Rho protein signal transduction, cell cycle dependent actin filament reorganization, cytoskeleton organization and biogenesis, regulation of cell cycle, ribosome biogenesis, signal transduction	-1,48
<i>TOS2</i>	unknown	2,55
<i>TOS8</i>	unknown	-3,96
<i>TPK1</i>	RAS protein signal transduction, protein amino acid phosphorylation, pseudohyphal growth	-1,62
<i>TPO2</i>	polyamine transport	2,18
<i>TPT1</i>	tRNA splicing	3,35
<i>TRP3</i>	tryptophan biosynthesis	1,48
<i>TSL1</i>	response to stress, trehalose biosynthesis	-2,74
<i>TTR1</i>	regulation of redox homeostasis, response to oxidative stress	-1,37
<i>TUS1</i>	cell wall organization and biogenesis, signal transduction	-1,63
<i>TYS1</i>	amino acid activation, tyrosyl-tRNA aminoacylation	1,35
<i>UBA1</i>	ubiquitin cycle	-1,90
<i>UBP13</i>	unknown	-1,81
<i>UBP9</i>	protein deubiquitination	-1,79
<i>UGA1</i>	nitrogen utilization	-1,90
<i>UGP1</i>	UDP-glucose metabolism, protein amino acid glycosylation	-1,38
<i>UGX2</i>	unknown	-3,91
<i>UIP4</i>	unknown	-4,25
<i>ULP2</i>	desumoylation, mitotic spindle checkpoint, plasmid maintenance	1,38
<i>UNG1</i>	DNA repair	2,77
<i>UTP18</i>	unknown	-2,57
<i>VAB2</i>	unknown	-1,45
<i>VGR4</i>	N-linked glycosylation, lipid glycosylation, nucleotide-sugar transport	1,88

<i>VHT1</i>	biotin transport	-1,52
<i>VPS61</i>	protein-vacuolar targeting	2,13
<i>VTH1</i>	Golgi to vacuole transport	1,88
<i>VTH2</i>	Golgi to vacuole transport	2,04
<i>WWM1</i>	unknown	1,33
<i>XBP1</i>	stress response	-2,04
<i>XYL2</i>	monosaccharide metabolism	-1,47
<i>YAH1</i>	heme a biosynthesis	1,43
<i>YAK1</i>	cell growth and/or maintenance, protein amino acid phosphorylation	-1,42
<i>YAT1</i>	alcohol metabolism, carnitine metabolism	-2,92
<i>YEF3</i>	translational elongation	1,35
<i>YGP1</i>	response to nutrients, response to stress	-3,37
<i>YHM1</i>	transport, mitochondrial genome maintenance	1,71
<i>YIH1</i>	regulation of amino acid metabolism	1,52
<i>YIM1</i>	mitochondrial processing	-1,92
<i>YKT9</i>	unknown	-2,00
<i>YKU70</i>	chromatin assembly/disassembly, double-strand break repair via homologous recombination, double-strand break repair via nonhomologous end-joining, telomere maintenance, transcriptional gene silencing	-1,60
<i>YMC2</i>	transport	2,01
<i>YPT11</i>	mitochondrion inheritance	1,47
<i>YRR1</i>	multidrug transport, positive regulation of transcription from Pol II promoter	-1,70
<i>YSN1</i>	unknown	2,03
<i>ZPR1</i>	regulation of cell cycle	1,59
<i>YOR225W</i>	unknown	5,52
<i>YGR176W</i>	unknown	4,98
<i>YAR053W</i>	unknown	4,74
<i>YMR209C</i>	unknown	3,73

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

YER188W	Unknown	3,61
YJL028W	Unknown	3,52
YOL014W	Unknown	2,85
YOL085C	Unknown	2,82
YOR376W	Unknown	2,77
YHR182C-A	Unknown	2,64
YOR203W	Unknown	2,62
YOL024W	Unknown	2,61
YDL242W	Unknown	2,55
YNL024C	Unknown	2,51
YDR367W	Unknown	2,39
YOR199W	Unknown	2,38
YDL241W	Unknown	2,38
YBR032W	Unknown	2,37
YGL230C	Unknown	2,36
YDR149C	Unknown	2,33
YNL146W	Unknown	2,30
YEL008W	Unknown	2,26
YJL135W	Unknown	2,22
YDL085C-A	Unknown	2,22
YLR042C	Unknown	2,20
YCR099C	Unknown	2,17
YNR009W	Unknown	2,03
YPL245W	Unknown	2,01
YDR102C	Unknown	2,00
YHR125W	Unknown	1,98
YKL115C	Unknown	1,98
YGL193C	Unknown	1,95
YPL251W	Unknown	1,94

YTR035C	unknown	1,93
YCR043C	unknown	1,93
YOR364W	unknown	1,92
YDL071C	unknown	1,90
YDL218W	unknown	1,88
YMR132C	unknown	1,87
YHR022C	unknown	1,82
YBL028C	unknown	1,81
YEL014C	unknown	1,81
YGR263C	unknown	1,78
YPR039W	unknown	1,78
YPR059C	unknown	1,76
YFL054C	unknown	1,73
YHR130C	unknown	1,71
YNL303W	unknown	1,70
YML125C	unknown	1,69
YDR210W	unknown	1,66
YPL142C	unknown	1,65
YTR042C	unknown	1,64
YDL162C	unknown	1,64
YLR311C	unknown	1,63
YLR040C	unknown	1,59
YGR117C	unknown	1,56
YCR050C	unknown	1,54
YKL215C	unknown	1,52
YGL239C	unknown	1,51
YEL010W	unknown	1,49
YMR135W-A	unknown	1,49
YLR179C	unknown	1,46

YPR044C	unknown	1,46
YCR015C	unknown	1,45
YBR028C	unknown	1,45
YLR112W	unknown	1,44
YER078C	unknown	1,44
YDL221W	unknown	1,44
YCR101C	unknown	1,44
YGR206W	unknown	1,43
YLR416C	unknown	1,42
YIL060W	unknown	1,41
YMR316C-B	unknown	1,40
YGR050C	unknown	1,40
YJL122W	unknown	1,40
YLR054C	unknown	1,38
YLR269C	unknown	1,38
YGL157W	unknown	1,37
YHR029C	unknown	1,37
YLL033W	unknown	1,37
YIL141W	unknown	1,37
YEL059W	unknown	1,36
YHR145C	unknown	1,35
YBR232C	unknown	1,35
YLR145W	unknown	1,33
YLR108C	unknown	1,33
YPL112C	peroxisome organization and biogenesis	1,33
YMR075C-A	unknown	1,32
YKR018C	unknown	-1,32
YNR036C	unknown	-1,35
YPL185W	unknown	-1,36

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>YKL169C</i>	Unknown	-1,36
<i>YER079C-A</i>	Unknown	-1,37
<i>YKL151C</i>	Unknown	-1,38
<i>YLL023C</i>	Unknown	-1,40
<i>YKR096W</i>	Unknown	-1,40
<i>YDL183C</i>	Unknown	-1,40
<i>YAR009C</i>	Unknown	-1,40
<i>YTR036C</i>	Unknown	-1,40
<i>YFR006W</i>	Unknown	-1,41
<i>YJL149W</i>	Unknown	-1,41
<i>YJL067W</i>	Unknown	-1,42
<i>YML107C</i>	Unknown	-1,43
<i>YMR155W</i>	Unknown	-1,45
<i>YKL100C</i>	Unknown	-1,45
<i>YFL006W</i>	Unknown	-1,45
<i>YDR338C</i>	Unknown	-1,46
<i>YPR197C</i>	Unknown	-1,47
<i>YOR285W</i>	Unknown	-1,49
<i>YTL165C</i>	Unknown	-1,49
<i>YOL099C</i>	Unknown	-1,49
<i>YOL053W</i>	Unknown	-1,49
<i>YBR134W</i>	Unknown	-1,50
<i>YKR017C</i>	Unknown	-1,51
<i>YMR160W</i>	Unknown	-1,52
<i>YJL142C</i>	Unknown	-1,53
<i>YMR030W</i>	calcium-mediated signaling	-1,54
<i>YOR227W</i>	Unknown	-1,55
<i>YPL272C</i>	Unknown	-1,56
<i>YMR110C</i>	Unknown	-1,56

<i>YCR072C</i>	unknown	-1,57
<i>YJR096W</i>	arabinose metabolism	-1,58
<i>YLR326W</i>	unknown	-1,58
<i>YJR061W</i>	unknown	-1,59
<i>YFL044C</i>	unknown	-1,59
<i>YPL206C</i>	unknown	-1,59
<i>YEL041W</i>	unknown	-1,60
<i>YNL187W</i>	unknown	-1,60
<i>YPL196W</i>	response to oxidative stress	-1,60
<i>YJL083W</i>	unknown	-1,61
<i>YMR041C</i>	unknown	-1,62
<i>YLR345W</i>	unknown	-1,62
<i>YER182W</i>	unknown	-1,62
<i>YBL029C-A</i>	unknown	-1,63
<i>YLR356W</i>	unknown	-1,63
<i>YOL078W</i>	regulation of cell growth	-1,63
<i>YER064C</i>	unknown	-1,64
<i>YBL004W</i>	unknown	-1,64
<i>YJL021C</i>	unknown	-1,65
<i>YOL050C</i>	unknown	-1,65
<i>YJL147C</i>	unknown	-1,65
<i>YLR149C</i>	unknown	-1,65
<i>YBR255C-A</i>	unknown	-1,65
<i>YCL068C</i>	unknown	-1,65
<i>YBL059W</i>	unknown	-1,66
<i>YNL326C</i>	unknown	-1,66
<i>YGL080W</i>	unknown	-1,67
<i>YMR073C</i>	unknown	-1,67
<i>YPL109C</i>	unknown	-1,68

<i>YLR282C</i>	unknown	-1,68
<i>YLR431C</i>	unknown	-1,69
<i>YKR077W</i>	unknown	-1,69
<i>YLR454W</i>	unknown	-1,69
<i>YGR127W</i>	unknown	-1,69
<i>YNL208W</i>	unknown	-1,70
<i>YNL134C</i>	unknown	-1,70
<i>YLR012C</i>	unknown	-1,72
<i>YER158C</i>	unknown	-1,74
<i>YNL046W</i>	unknown	-1,75
<i>YLR089C</i>	unknown	-1,76
<i>YNL100W</i>	unknown	-1,78
<i>YLR294C</i>	cellular respiration	-1,78
<i>YCR102C</i>	unknown	-1,78
<i>YOR175C</i>	unknown	-1,82
<i>YCR051W</i>	unknown	-1,82
<i>YMR098C</i>	unknown	-1,83
<i>YMR181C</i>	unknown	-1,84
<i>YLR023C</i>	unknown	-1,85
<i>YPL162C</i>	unknown	-1,87
<i>YPL110C</i>	unknown	-1,88
<i>YKL066W</i>	unknown	-1,88
<i>YLR327C</i>	unknown	-1,88
<i>YHR087W</i>	unknown	-1,89
<i>YNL200C</i>	unknown	-1,90
<i>YKL036C</i>	unknown	-1,92
<i>YDL133W</i>	unknown	-1,94
<i>YJR085C</i>	unknown	-1,95
<i>YOR215C</i>	unknown	-1,96

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

YDR221W	Unknown	-2,01
YDR287W	myo-inositol metabolism	-2,03
YER077C	Unknown	-2,06
YDR504C	Unknown	-2,09
YIL087C	Unknown	-2,10
YDR034W-B	Unknown	-2,10
YPL182C	Unknown	-2,14
YPR022C	Unknown	-2,15
YBR225W	Unknown	-2,17
YOR356W	NADH catabolism	-2,18
YHR213W	Unknown	-2,19
YPL257W	Unknown	-2,21
YJL048C	Unknown	-2,22
YFR054C	Unknown	-2,25
YNL119W	Unknown	-2,26
YOR019W	Unknown	-2,28
YHL021C	Unknown	-2,30
YNR048W	Unknown	-2,31
YIL042C	Unknown	-2,35
YTR016W	Unknown	-2,37
YOL083W	Unknown	-2,39
YJL217W	Unknown	-2,43
YMR090W	Unknown	-2,45
YHR210C	Unknown	-2,48
YMR291W	Unknown	-2,48
YGR146C	Unknown	-2,48
YNL105W	Unknown	-2,50
YBR053C	Unknown	-2,54
YGR052W	Unknown	-2,56

YLR301W	cotranslational membrane targeting	-2,57
YNL194C	unknown	-2,62
YOR228C	unknown	-2,72
YGL088W	unknown	-2,76
YHR097C	unknown	-2,78
YEL070W	unknown	-2,80
YGR079W	unknown	-2,82
YBL100C	unknown	-2,82
YDL203C	unknown	-2,83
YPR061C	unknown	-2,87
YPR115W	unknown	-2,93
YIL172C	unknown	-2,94
YKL171W	proteolysis and peptidolysis	-2,94
YIL130W	unknown	-2,95
YJL220W	unknown	-2,96
YBR235W	unknown	-2,97
YIL012W	unknown	-3,00
YOR289W	unknown	-3,03
YLR312C	unknown	-3,06
YER067W	unknown	-3,13
YKR075C	unknown	-3,19
YFR017C	unknown	-3,19
YIL055C	unknown	-3,28
YPL201C	unknown	-3,28
YJR008W	unknown	-3,32
YOL157C	unknown	-3,32
YGR205W	unknown	-3,36
YGR290W	unknown	-3,43
YOL048C	unknown	-3,46

YGR201C	unknown	-3,51
YAL061W	unknown	-3,52
YDR223W	unknown	-3,59
YBR269C	unknown	-3,61
YBR230C	unknown	-3,63
YDL124W	unknown	-3,65
YBR241C	unknown	-3,68
YOR121C	unknown	-3,81
YCR079W	unknown	-3,83
YKL187C	unknown	-3,84
YIL077C	unknown	-3,92
YDR533C	unknown	-4,04
YNL195C	unknown	-4,07
YML131W	unknown	-4,07
YPL277C	unknown	-4,08
YJL049W	unknown	-4,19
YNL144C	unknown	-4,26
YGR243W	unknown	-4,27
YBR051W	unknown	-4,33
YJL216C	unknown	-4,33
YNL274C	metabolism	-4,55
YGR043C	unknown	-4,74
YOR389W	unknown	-4,80
YPR150W	unknown	-5,15
YJR160C	carbohydrate transport	-5,15
YDL222C	unknown	-5,18
YMR191W	unknown	-5,25
YBR285W	unknown	-5,58
YDR070C	unknown	-5,80

Apéndice I: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa V1

<i>YIL057C</i>	Unknown	-6,20
<i>YFL012W</i>	Unknown	-6,46
<i>YGR287C</i>	Unknown	-6,90

APÉNDICE II

Tablas con los genes con mayor expresión en YPD que en YPG en la cepa V1 y viceversa.

Tabla A.1-. Términos GO de los 292 genes con mayor expresión tras el crecimiento de V1 en medio YPD. La primera columna representa el número de índice GO. Se han eliminado las ORFs de las que se desconoce la función o en el proceso que participan, así como las GO con menos de 5 genes.

ID	Término GO	Genes
6412	Traducción	RPL32, RPS11B, RPS9B, MRPL32, RPS16B, RPL35B, RPL12B, RPS17B, RPL27B, RPL37B, RPL23B, RPS26B, RPL29, RPL26B, RPL24B, TYS1, RPS27B, RPL42B, RPL34B, RPS24B, TEF4, RPS31, YEF3, RPS28B, RPS22B, RPL6B, RPS18B, RPS10B, HEF3, RPL16B, RPS7B, PET494, RPL33B, RPL31A, RPL33A, RPL34A, RPL35A, RPL36A, RPL37A, RPL42A, RPL6A, RPS7A, RPS10A, RPS11A, RPS14A, RPL16A, RPS18A, RPS22A, RPL22A, RPL23A, RPS24A, RPL24A, RPS25A, RPL26A, RPL27A, SSA1
6810	Transporte	AGP1, AST1, AUA1, AZR1, BCP1, DUR3, FLX1, FUN26, GGC1, IST3, KAP114, KAP122, MEP3, MRS3, MVB12, OAC1, ODC2, OPT2, ORT1, PDR12, PEX13, PEX25, PGA3, PMP2, RPS10A, RPS10B, RPS18A, RPS18B, RPS26B, RPS28B, SRN2, SSA1, SSA4, SUR4, TIM12, TNA1, TPO2, VPS61, VRG4, VTH1, VTH2, YFL054C, YMC2
5975	Proceso metabólico de carbohidratos	ARG1, ARG3, ARG4, ARG5,6, ARO2, ARO7, ASN1, ASN2, BAT1, CDC8, CYS3, ECM40, GDH1, GDH3, GND1, GND2, HIS3, HIS4, HIS6, HOM3, ILV1, LEU2, MET14, MET16, MET17, MET3, ORT1, PDC5, SAM1, SAM4, STR3, TRP3, TYS1, VRG4, YIH1
16070	Proceso metabólico del ARN	BCD1, BUD31, GAT1, HAP1, IST3, KRR1, MBF1, MED11, MRS3, NHP2, POL32, REX4, RMP1, RPC11, RPC25, RPS11A, RPS11B, RPS14A, RPS16B, RPS18A, RPS18B, RPS24A, RPS24B, RPS27B, RPS31, RPS9B, RRS1, RSC30, SFH1, SWD1, TAD3, TBF1, TPT1, TYS1, YLR269C
6519	Proceso metabólico de aminoácidos y derivados celulares	ARG1, ARG3, ARG4, ARG5,6, ARO2, ARO7, ASN1, ASN2, BAT1, CYS3, DYS1, ECM40, GDH1, GDH3, HIS3, HIS4, HIS6, HOM3, ILV1, LEU2, MET14, MET16, MET17, MET3, ORT1, PDC5, SAM1, SAM4, STR3, TRP3, TYS1, YIH1
42254	Biogénesis del ribosoma	ALB1, BCP1, KRR1, NHP2, REX4, RMP1, RPL12B, RPL6A, RPL6B, RPS10A, RPS10B, RPS11A, RPS11B, RPS14A, RPS16B, RPS17B, RPS18A, RPS18B, RPS24A, RPS24B, RPS26B, RPS27B, RPS28B, RPS31, RPS7A, RPS7B, RPS9B, RRS1
6996	Organización de organelos	ADA2, ALK1, CLB1, DAD1, GGC1, KAR5, MDM20, MMS22, MRPL32, NBP1, PET18, PEX13, PEX25, PFD1, RAD59, RSC30, SFH1, SHG1, SSA1, SWC5, SWD1, TBF1, TIM12, ULP2, YPT11
42221	Respuesta a estímulos químicos	AHP1, AZR1, CYS3, GND1, GPX2, GRX4, HOM3, KAP122, MET14, MET16, MET17, MFA2, MMS22, OPI11, RPL23B, RRI1, SAG1, SAY1, YDL041W, YDL218W, YHI9
6950	Respuesta a estrés	AHP1, CDC8, GND1, GPX2, GRX4, MMS22, NEJ1, POL32, RAD59, REV7, RSC30, SFH1, SHO1, SSA1, SSA4, UNG1, YHI9, ZPR1
6350	Transcripción	ARG5,6, GAT1, HAP1, MBF1, MED11, NRM1, RPC11, RPC25, RSC30, SFH1, SWD1, TBF1, YLR269C
6464	Proceso de modificación de proteína	ADA2, ALK1, DYS1, GPI2, MDM20, MEK1, NAT5, RRI1, SHG1, STE14, SWD1, ULP2, VRG4
6259	Proceso metabólico del ADN	CDC8, CLB6, IRC19, MMS22, NEJ1, POL32, RAD59, REC102, REV7, RSC30, SFH1, SWD1, UNG1
46483	Proceso metabólico de heterociclo	BN43, BUD16, CDC8, DAL1, DCD1, DFR1, DUR1,2, HNT2, PDC5, PET18, SDT1, TRP3, YAH1
7049	Ciclo celular	ALK1, CLB1, CLB6, DAD1, MEK1, MMS22, NBP1, REC102, SFH1, STB1, ULP2, ZPR1
6725	Proceso metabólico de compuestos aromáticos celulares	ARO2, ARO7, DFR1, PDC5, PET18, SAM1, SAM4, SDT1, TRP3
51186	Proceso metabólico de cofactores	BN41, BN44, BUD16, DFR1, GND1, GND2, YAH1
30435	Esporulación	CRR1, IRC19, OSW2, PMD1, SMA1, YLR269C
6629	Proceso metabólico de lípidos	ERG2, GPI2, SAY1, STT4, SUR4, VRG4
6766	Proceso metabólico de vitaminas	BN41, BN44, BUD16, GND1, GND2, PET18,
7010	Organización del citoesqueleto	CLB1, DAD1, MDM20, NBP1, PFD1

Tabla A.2-. Términos GO de los 550 genes con mayor expresión en medio YPG que YPD en la cepa V1. La primera columna indica el número de índice GO. Han sido eliminado las ORFs de las que se desconoce la función o en el proceso que participan, así como las GO con menos de 5 genes

ID	Término GO	Genes
6810	Transporte	<i>AAC1, ADY2, AFT1, AGP2, AQY1, ATG11, ATG19, ATG23, ATG9, ATO2, ATO3, ATP15, ATP16, ATP17, ATP18, ATP19, ATP2, ATP3, ATP4, ATP5, ATP7, BAP2, CIK1, DDI1, DIC1, DIP5, DNF3, ENA2, ERF2, ESBP6, FIT1, FIT3, GLE1, GLK1, GYP7, HXK1, HXT2, HXT3, HXT6, HXT7, IST1, JEN1, KHA1, KIP2, LSP1, MAL11, MAL31, MCH2, MCH5, MDH2, MDM10, MNR2, MPH2, MPH3, NFT1, NUP1, ODC1, PCP1, PDR10, PHO89, PML39, POR1, PTK1, PUT4, PXA2, SHR5, SNF3, SPO14, SSH4, STE6, SUT1, SUT2, TAT1, TOR2, VHT1, YBR235W, YBR241C, YKR104W, YLR301W, YRR1</i>
5975	Proceso metabólico de carbohidratos	<i>ACO1, ADH2, ADR1, AGX1, ALD3, ALT1, AMS1, ARA1, ARO10, ARO9, ATH1, CAR2, CAT8, CIT2, DLD1, DOG1, DOG2, FBP1, FYV10, GAC1, GAD1, GCY1, GDB1, GID8, GIP2, GLC3, GLK1, GRE3, GSC2, GSY1, GTB1, GUT1, GUT2, HAP4, HXK1, ICL1, ICL2, IDH1, IDP2, INM2, LYS21, MAL12, MAL13, MAL32, MDH2, MSD1, NDE2, NTH2, PCK1, PCL7, PFK26, PGM2, PSK1, PUT1, PUT4, PYC1, SOL4, SUC2, TH13, TKL2, TSL1, UGP1, XYL2, YGR287C, YIG1, YJR096W, YLR345W</i>
6091	Generación de precursores metabólicos y energía.	<i>AAC1, ACO1, ACS1, ADH2, ATP15, ATP16, ATP17, ATP18, ATP19, ATP2, ATP3, ATP4, ATP5, ATP7, COR1, COX13, COX20, COX4, COX5A, COX6, COX7, COX9, CYC7, DLD1, ETR1, GAC1, GDB1, GIP2, GLC3, GLK1, GSY1, HXK1, IDH1, ISF1, KGD1, KGD2, LSC2, MBR1, MDH1, NDE2, NDI1, PCL7, PFK26, PGM2, POR1, PPA2, QCR10, QCR6, QCR8, QCR9, RIP1, RSF1, SDH2, SDH4, UGP1, YIG1, YLR294C, YLR345W</i>
6950	Respuesta a estrés	<i>AGP2, ALD3, ATG23, ATG9, ATH1, BUR2, CIN5, CTA1, CTT1, DDR2, DDR48, DOG2, FLO1, GAC1, GAD1, GCY1, GPX1, GRE3, GRX2, HAL1, HOR7, HSP12, HSP26, KRE29, LSP1, MAG1, MCR1, MGA2, MLH3, MMS21, MRK1, MSB2, NCE103, OXR1, PEP4, PRB1, PRX1, PSY2, PTC6, RAD2, RAD54, RAD7, RIM11, SIP2, STE50, STF2, TAX4, TSL1, XBP1, YDL124W, YGP1, YIM1, YJR096W, YKL151C, YKU70, YML131W</i>
6996	Organización de organelos	<i>ACO1, ACS1, ADR1, ASE1, ATG11, ATG19, ATG9, ATP25, AVO1, BUR2, CBP4, CDC13, CIK1, CIN8, COX20, DOC1, FIS1, GAC1, HER1, HOP1, KIP2, MAM3, MDH2, MDM10, MDM32, MHP1, MHR1, MRPL19, MRPL6, MRPL7, MRPS12, MRPS28, MSD1, NCA3, NEM1, NIP100, NUP1, PBI2, PCP1, PEX11, PFA3, POR1, RAD51, RAD54, RAD7, RPM2, RSF1, SED1, SPH1, SUN4, TID3, TOR2, ULS1, YKU70</i>
42221	Respuesta a estímulo químico	<i>ACO1, ADR1, AFR1, CIN5, CRS5, CTA1, CTT1, CUP1-1, CUP1-2, CUP2, ECM25, ECM4, FIS1, GAD1, GCY1, GPR1, GPX1, GRE3, GRX2, HAA1, HBT1, HSP12, IRC21, MCR1, MDG1, MIG1, NCA3, NCE103, OXR1, PDR10, PDR3, POG1, PRM7, PRX1, PSY2, RAS2, RIB1, RMD8, RRI2, SNF3, SPI1, SPO14, STE50, YCR102C, YDL124W, YGP1, YIL077C, YJR096W, YML131W, YNL046W, YNR048W, YOL050C, YRR1</i>
16070	Proceso metabólico del ARN	<i>ADR1, AFT1, ASH1, ATP25, CAT8, CDC40, CIN5, CSR2, CTL1, CUP2, DBP7, DCS1, EDC2, ELP6, EMI5, GAC1, HAA1, HAL1, IFH1, IPK1, ISU1, MAL13, MCM3, MGA2, MHR1, MIG1, MSA2, MSD1, MSS18, MTF2, NCS2, PDR3, PRP24, RAD2, RAS2, RPM2, RSF1, RTC3, SAP185, SPT8, SRB8, SUT1, SUT2, TFC3, TH13, UTP18, UTP20, YKU70, YRR1</i>

6350	Transcripción	<i>ADR1, AFT1, ASH1, BUR2, CAT8, CIN5, CRF1, CSR2, CUP2, ELP6, EM15, GAC1, GAT2, HAA1, HAL1, HAP4, IFH1, MAL13, MCM3, MGA2, MHR1, MIG1, MSA2, OTU1, PDR3, RAD2, RAS2, RPM2, RSF1, SPT8, SRB8, SUT1, SUT2, TFC3, THI3, YER064C, YKU70, YRR1</i>
6464	Proceso de modificación de proteínas	<i>ACS1, BUR2, CMK1, CTM1, ELP6, ERF2, ERO1, FAA2, GIP2, GTB1, HULA, MRK1, NCS2, OTU1, PFA3, PIB1, PKH2, PKP1, PNG1, PSK1, PTC6, RAD7, RCK1, RIM11, RRI2, SHR5, SIP2, SIZ1, SKM1, TPK1, UBA1, UBP9, UGP1, YAK1</i>
45333	Respiración celular	<i>AAC1, ACO1, COR1, COX13, COX20, COX4, COX5A, COX6, COX7, COX9, CYC7, DLD1, ETR1, IDH1, ISF1, KGD1, KGD2, LSC2, MBR1, MDH1, NDI1, POR1, PPA2, QCR10, QCR6, QCR8, QCR9, RIP1, RSF1, SDH2, SDH4, YLR294C</i>
6629	Proceso metabólico de lípidos	<i>AGP2, ALE1, AYR1, DCI1, DGA1, ECI1, ETR1, FAA2, FOX2, GDE1, INP51, LRO1, MCR1, MGA2, NEM1, OPI3, PEX11, PGC1, POT1, POX1, PSD1, ROG1, SPO14, SPS19, SUR1, TEP1, TES1, UGA1</i>
7049	Ciclo celular	<i>ASE1, BNS1, BUR2, CDC40, CIK1, CIN8, DOC1, GAC1, GID8, HOP1, KIP2, MCM3, MIH1, MLH3, MSA2, MSC1, NIP100, PCL7, POG1, RAD51, RCK1, RIM4, RIM8, SAP185, SKM1, SNF3, TOR2</i>
51186	Proceso metabólico de cofactores	<i>AAC1, ACO1, ACS1, ADH2, ALD4, ECM4, GLO1, GTT1, GUT2, HMX1, IDH1, ISU1, KGD1, KGD2, LSC2, MDH1, MTD1, NDE2, NDI1, PYC1, QCR9, SDH2, SDH4, SOLA, TKL2, YEF1</i>
7165	Transducción de señales	<i>ACK1, AFR1, AVO1, BCY1, CMK1, COS111, GPR1, MDG1, MSB2, PDE2, PKH2, POG1, RAS2, RGS2, RRI2, RSF1, SIP2, SNF3, SOK1, SPH1, STE50, TAX4, TEP1, TOR2, TPK1, TUS1</i>
6519	Proceso metabólico de aminoácidos celulares y derivados	<i>ACO1, ADH2, AGX1, ALD3, ALT1, ARO10, ARO9, CAR2, CIT2, ECM4, GAD1, GLO1, GTT1, ICL2, IDH1, IDP2, LYS21, MSD1, OPI3, PSD1, PUT1, PUT4, THI3, UGA1, YAT1</i>
46483	Proceso metabólico de heterociclos	<i>AAC1, ADE12, ARA2, ARO10, ATP15, ATP16, ATP17, ATP18, ATP19, ATP2, ATP3, ATP4, ATP5, ATP7, DAL7, HMX1, MTD1, PUT1, PUT4, RAS2, SNZ1, THI3</i>
30163	Proceso catabólico de proteínas	<i>ATG19, CPS1, DDI1, DOC1, DOG2, FYV10, GID8, MRK1, PAI3, PBI2, PEP4, PNG1, PRB1, PRC1, RAD7, RIM11, SSH4, TFS1, UBX6, YKL171W</i>
6259	Proceso metabólico del ADN	<i>CDC13, DDR48, IRC9, KRE29, MAG1, MCM3, MLH3, MMS21, MSC1, RAD2, RAD51, RAD54, RAD7, RIM4, ULS1, YKU70</i>
30435	Esporulación	<i>AQY1, EM15, FMP45, GSC2, NEM1, PEP4, PRB1, RAS2, RIM11, RIM4, SPO14, SPS19, TEP1, UBX6, YNL194C</i>
7047	Organización de la pared celular	<i>ACK1, ATG32, AVO1, CSR2, ECM25, ECM4, FMP45, GSC2, MHP1, SEDI1, SPR28, TAX4, TEP1, TIP1, TUS1</i>
6766	Proceso metabólico de vitaminas	<i>ADH2, ALD4, GUT2, NDE2, NDI1, PYC1, RIB1, RIB7, SNZ1, SOLA, THI3, TKL2, YAT1, YEF1</i>
6412	Traducción	<i>CBP6, GLE1, ITT1, MRPL19, MRPL6, MRPL7, MRPS12, MRPS28, MSD1, MTF2, PET111, RPM2</i>
7010	Organización del citoesqueleto	<i>ASE1, AVO1, CIK1, CIN8, DOC1, KIP2, MHP1, NIP100, SPH1, TID3, TOR2</i>
7126	Meiosis	<i>BNS1, CIK1, GAC1, HOP1, MLH3, MSC1, RAD51, RCK1, RIM4, RIM8, SNF3</i>
16044	Organización de membrana	<i>ATG11, ATG9, DNF3, LSP1, MDM10, NEM1, NUP1, PBI2, PEP4, PFA3, TOR2</i>
746	Conjugación	<i>AFR1, CIK1, HBT1, MDG1, POG1, PRM7, RRI2, SCW4, SPO14, STE50</i>
19725	Homeostasis celular	<i>GRX2, HMX1, ISU1, IZH3, MAM3, MDM32, PGM2, PRX1</i>
42254	Biogénesis del ribosoma	<i>DBP7, MRPS28, NUP1, RSA4, TOR2, UTP18, UTP20</i>
16192	Transporte mediado por vesícula	<i>DDI1, GYP7, IST1, LSP1, SPO14, SSH4, TOR2</i>
9653	Morfogénesis	<i>AFR1, FIS1, HBT1, MSB2, SPH1, SPO14, SPR28</i>
7124	Crecimiento en pseudohifa	<i>ASH1, GPR1, HMS1, NCS2, RAS2, SPH1</i>
6725	Proceso metabólico de compuestos aromáticos celulares	<i>ARO10, ARO9, MTD1, THI3, UGA1, YDL124W</i>

Tabla A.3-. Análisis realizado con FatiGO. En la tercera columna se indica el porcentaje de genes de la lista YPD anotados en el término GO dividido por el número de genes anotados a esta función en ambas listas, valor superior YPD e inferior YPG. Como umbral se ha utilizado un valor de p ajustado < 0.01 en el test de Fisher exacto.

Indice	Términos	YPD YPG	Valor p	Valor p ajustado
GO proceso biológico a nivel 3				
	Proceso biosintético (GO:0009058)	71.52% 8.48%	3.40E-12	1.32E-10
	Proceso metabólico de compuestos del nitrógeno (GO:0006807)	74.97% 25.03%	7.60E-06	0.0001
	Proceso catabólico (GO:0009056)	24.42% 75.58%	0.0001	0.002
GO proceso biológico a nivel 4				
	Generación de metabolitos precursores y energía (GO:0006091)	13.58% 86.42%	1.02E-13	7.75E-12
	Proceso biosintético celular (GO:0044249)	72.35% 27.65%	1.40E-12	5.32E-11
	Proceso metabólico de carbohidratos (GO:0005975)	7.44% 92.56%	3.52E-11	8.92E-10
	Proceso metabólico de aminas (GO:0009308)	76.68% 23.32%	1.99E-06	3.79E-05
	Proceso metabólico de aminoácidos y derivados (GO:0006519)	76.19% 23.81%	3.91E-06	5.94E-05
	Proceso del metabolismo del fósforo (GO:0006793)	16.63% 83.37%	2.94E-05	0.0003
	Proceso metabólico de proteína (GO:0019538)	64.11% 35.89%	3.16E-05	0.0003
	Proceso metabólico de macromoléculas celulares (GO:0044260)	63.27% 36.73%	8.23E-05	0.0009
	Proceso metabólico del alcohol (GO:0006066)	19.26% 80.74%	0.0003	0.002
	Organización de organelo y biogénesis(GO:0006996)	66.16% 33.84%	0.0003	0.002
	Biogénesis y ensamblado de complejo ribonucleoproteicos (GO:0022613)	83.91% 16.09%	0.0003	0.002
	Proceso catabólico celular (GO:0044248)	25.21% 74.79%	0.0003	0.002
	Proceso del metabolismo del azúfre (GO:0006790)	89.8% 10.2%	0.001	0.008
	Proceso metabólico de cofactores (GO:0051186)	24.15% 75.85%	0.001	0.008
	Proceso catabólico de macromoléculas (GO:0009057)	19.64% 80.36%	0.002	0.001
GO proceso biológico a nivel 5				
	Derivación de energía por oxidación de compuestos orgánicos (GO:0015980)	8.3% 91.7%	1.06E-12	1.63E-10
	Proceso de biosíntesis de macromoléculas (GO:0009059)	75.32% 24.68%	2.99E-08	2.28E-06
	Proceso biosíntesis de compuestos del nitrógeno (GO:0044271)	85.07% 14.93%	9.03E-08	4.60E-06
	Proceso del metabolismo del fosfato (GO:0006796)	16.24% 83.76%	1.56E-05	0.0006
	Proceso metabólico de proteína celular (GO:0044267)	64.32% 35.68%	2.76E-05	0.0008
	Biogénesis y ensamblado de ribosoma (GO:0042254)	87.69% 12.31%	7.26E-05	0.002
GO proceso biológico a nivel 6				

Apéndice II. Tablas

Traducción (GO:0006412)	88.62%	3.57E-17	6.81E-13
	11.38%		
Proceso del metabolismo de carbohidratos celulares (GO:0044262)	5.5%	6.74E-11	6.44E-09
	94.5%		
Proceso de biosíntesis de aminas (GO:0009309)	84.61%	1.38E-07	8.76E-06
	15.39%		
Proceso metabólico de aminoácidos (GO:0006520)	75.7%	1.72E-05	0.0008
	24.3%		
Respiración celular (GO:0045333)	5.76%	2.31E-05	0.0009
	94.24%		
Fosforilación (GO:0016310)	17.91%	9.83E-05	0.003
	82.09%		
GO proceso biológico a nivel 7			
Proceso de biosíntesis de aminoácidos (GO:0008652)	86.31%	1.10E-08	2.18E-06
	13.69%		
Proceso del metabolismo de aminoácidos del azufre (GO:0000096)	100%	2.58E-05	0.002
	0%		
GO función molecular a nivel 3			
Constituyente estructural del ribosoma (GO:0003735)	95.05%	6.47E-20	3.56E-18
	4.95%		
GO función molecular a nivel 4.			
Unión al ARN (GO:0003723)	81.61%	6.00E-06	0.0006
	18.39%		
GO componente celular a nivel 6.			
Complejo ribonucleoproteico (GO:0030529)	92.07%	6.39E-21	1.98E-19
	7.93%		
GO componente celular a nivel 7.			
intracellular non-membrane-bound organelle (GO:0043232)	81.13%	9.07E-15	1.63E-13
	18.87%		
intracellular membrane-bound organelle (GO:0043231)	42.68%	1.23E-07	1.11E-06
	57.32%		
GO componente celular a nivel 8.			
Ribosoma (GO:0005840)	94.77%	1.81E-22	6.50E-21
	5.23%		
Citosol (GO:0005829)	85.07%	1.59E-13	2.86E-12
	14.93%		
Complejo de preiniciación eucariótico 43S (GO:0016282)	100%	1.21E-10	1.09E-09
	0%		
Complejo de iniciación eucariótico 48S (GO:0016283)	100%	1.21E-10	1.09E-09
	0%		
Mitocondria (GO:0005739)	30.83%	2.30E-09	1.66E-08
	69.17%		
Envuelta de organelo (GO:0031967)	29.39%	0.002	0.01
	70.61%		
GO componente celular a nivel 9.			
Parte citosólica (GO:0044445)	100%	5.03E-22	1.66E-20
	0%		
Subunidad grande del ribosoma (GO:0015934)	91.64%	2.61E-08	3.56E-06
	8.36%		
Subunidad pequeña del ribosoma (GO:0015935)	93.73%	3.24E-07	3.56E-06
	6.27%		
Parte mitocondrial (GO:0044429)	25.36%	8.78E-07	7.24E-07
	74.64%		

APÉNDICE III

Resultados de la comparación entre la expresión de los genes en condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa DOG21. FC viene dada por la expresión en $\text{Log}_2 b$, siendo b el cociente de la expresión en YPD frente a YPG.

Apéndice III: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa DOG21.

<i>Gen</i>	Biological Process	FC
<i>AAC1</i>	ATP/ADP exchange	-1,98
<i>AAD10</i>	aldehyde metabolism	-1,65
<i>ACS1</i>	* acetate fermentation, acetyl-CoA biosynthesis	-1,84
<i>ADE12</i>	adenosine biosynthesis	-1,38
<i>ADH2</i>	ethanol metabolism, fermentation	-1,78
<i>ADR1</i>	peroxisome organization and biogenesis, regulation of carbohydrate metabolism, transcription	-2,43
<i>ADY2</i>	DNA metabolism, meiosis, nitrogen utilization, transport	-3,17
<i>AFR1</i>	regulation of G-protein coupled receptor protein signaling pathway, signal transduction during conjugation with cellular fusion	-1,44
<i>AGP2</i>	fatty acid metabolism, response to osmotic stress	-1,66
<i>AGP3</i>	amino acid transport	1,70
<i>AGX1</i>	glyoxylate cycle	-1,79
<i>AHP1</i>	regulation of redox homeostasis	1,62
<i>ALD4</i>	ethanol metabolism	-1,91
<i>ALD5</i>	electron transport	1,78
<i>AMS1</i>	carbohydrate metabolism	-2,65
<i>AOR1</i>	Unknown	1,41
<i>APT2</i>	unknown	-1,50
<i>ARA1</i>	carbohydrate metabolism	-1,33
<i>ARG1</i>	arginine biosynthesis, argininosuccinate metabolism, citrulline metabolism	1,40
<i>ARG3</i>	arginine biosynthesis, ornithine metabolism	1,64
<i>ARG5,6</i>	ornithine biosynthesis	2,00
<i>ARO10</i>	leucine catabolism, phenylalanine catabolism	-3,71
<i>ARO7</i>	aromatic amino acid family biosynthesis	1,58
<i>ARO9</i>	aromatic amino acid family metabolism	-2,51

<i>ASH1</i>	pseudohyphal growth, regulation of transcription, mating-type specific	-1,36
<i>ASN1</i>	asparagine biosynthesis	1,47
<i>ATH1</i>	* response to stress, trehalose catabolism	-1,53
<i>ATO3</i>	nitrogen utilization, transport	-3,05
<i>ATP15</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,62
<i>ATP16</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,38
<i>ATP17</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,67
<i>ATP18</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,54
<i>AVT5</i>	* transport	1,39
<i>BAT1</i>	amino acid catabolism, branched chain family amino acid biosynthesis	1,67
<i>BDH1</i>	butanediol fermentation	-1,67
<i>BNA1</i>	nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis	1,60
<i>BNA4</i>	nicotinamide adenine dinucleotide biosynthesis	2,25
<i>CAT8</i>	gluconeogenesis, positive regulation of transcription from Pol II promoter	-2,10
<i>CBP4</i>	protein complex assembly	-1,80
<i>CBP6</i>	protein biosynthesis	-2,84
<i>CBS1</i>	protein biosynthesis	-1,50
<i>CCA1</i>	tRNA modification	1,63
<i>CCC2</i>	copper ion transport, intracellular copper ion transport	-3,49
<i>CDC13</i>	telomere capping, telomere maintenance	-1,75
<i>CDC19</i>	glycolysis, pyruvate metabolism	1,32
<i>CIK1</i>	meiosis, mitotic chromosome segregation, mitotic spindle assembly (sensu <i>Saccharomyces</i>), mitotic spindle orientation	-2,34
<i>CIT2</i>	citrate metabolism, glutamate biosynthesis, glyoxylate cycle	-2,75
<i>CLB1</i>	G2/M transition of mitotic cell cycle, meiotic G2/M1 transition, mitotic spindle assembly (sensu <i>Saccharomyces</i>), regulation of CDK activity	1,48
<i>COS11</i>	signal transduction	-1,53

<i>COX4</i>	aerobic respiration	-1,32
<i>COX5A</i>	aerobic respiration	-1,32
<i>COX7</i>	aerobic respiration	-2,02
<i>CRR1</i>	unknown	1,42
<i>CSN9</i>	adaptation to pheromone during conjugation with cellular fusion, protein deneddylation	-1,81
<i>CSR2</i>	cell wall organization and biogenesis, * regulation of transcription from Pol II promoter	-2,38
<i>CTA1</i>	oxygen and reactive oxygen species metabolism	-1,74
<i>CTP1</i>	mitochondrial citrate transport	2,45
<i>CUE2</i>	unknown	1,40
<i>CUP1-2</i>	response to copper	-2,37
<i>CUP2</i>	response to copper, transcription initiation from Pol II promoter	-1,89
<i>CVT17</i>	autophagy, membrane degradation, vacuolar protein processing/maturation	1,34
<i>CYS3</i>	cysteine metabolism, sulfur amino acid metabolism, transsulfuration	1,61
<i>CHA1</i>	serine family amino acid catabolism, threonine catabolism	-1,38
<i>DAL5</i>	allantoin utilization	-2,21
<i>DAL7</i>	allantoin catabolism	-1,93
<i>DAM1</i>	mitotic spindle assembly (sensu <i>Saccharomyces</i>)	3,18
<i>DAN1</i>	sterol transport	-1,73
<i>DCI1</i>	fatty acid beta-oxidation	-4,19
<i>DDR2</i>	response to stress	-3,76
<i>DDR48</i>	DNA repair	-1,40
<i>DLD1</i>	aerobic respiration, carbohydrate metabolism	-1,70
<i>DOG1</i>	2-deoxyglucose resistance	-1,58
<i>DOG2</i>	glucose metabolism, response to stress	-1,53
<i>DSE1</i>	cell wall organization and biogenesis	-1,44
<i>DUR3</i>	urea transport	1,96

Apéndice III: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa DOG21.

<i>ECI1</i>	fatty acid beta-oxidation	-2,33
<i>ECM25</i>	cell wall organization and biogenesis	-1,78
<i>ECM4</i>	cell wall organization and biogenesis	-2,41
<i>ELP6</i>	regulation of transcription from Pol II promoter	-1,35
<i>ENA2</i>	sodium ion transport	-1,63
<i>ERG2</i>	ergosterol biosynthesis	1,91
<i>ERG24</i>	ergosterol biosynthesis	1,35
<i>ESBP6</i>	transport	-1,75
<i>EST3</i>	telomerase-dependent telomere maintenance	2,67
<i>ETR1</i>	aerobic respiration, fatty acid biosynthesis	-2,46
<i>EXO1</i>	mismatch repair	1,41
<i>FAA2</i>	* N-terminal protein myristoylation, lipid metabolism	-2,21
<i>FHL1</i>	rRNA processing, transcription from Pol III promoter	-1,53
<i>FLO8</i>	invasive growth, pseudohyphal growth	-1,50
<i>FPR4</i>	unknown	1,36
<i>FYP2</i>	unknown	-2,87
<i>FUN26</i>	nucleoside transport	2,54
<i>FUN34</i>	nitrogen utilization, transport	-3,15
<i>FUS3</i>	cell cycle arrest, protein amino acid phosphorylation, signal transduction during conjugation with cellular fusion	-3,75
<i>FYV1</i>	unknown	-1,85
<i>FYV10</i>	unknown	-2,07
<i>GAT1</i>	regulation of nitrogen utilization, transcription initiation from Pol II promoter	3,52
<i>GAT2</i>	transcription	-1,65
<i>GCV2</i>	one-carbon compound metabolism	-1,86
<i>GDB1</i>	glycogen catabolism	-1,61
<i>GDH1</i>	glutamate biosynthesis, using glutamate dehydrogenase (NAD(P) ⁺)	2,75

<i>GDH2</i>	nitrogen metabolism	-2,91
<i>GFD2</i>	unknown	-1,80
<i>GIS1</i>	intracellular signaling cascade	-1,58
<i>GLK1</i>	carbohydrate metabolism	-1,47
<i>GPB1</i>	signal transduction	-4,23
<i>GPI2</i>	GPI anchor biosynthesis	1,88
<i>GPM2</i>	glycolysis, gluconeogenesis	-1,92
<i>GPX1</i>	response to oxidative stress	-1,61
<i>GPX2</i>	response to oxidative stress	1,47
<i>GSC2</i>	beta-1,3 glucan biosynthesis, cell wall organization and biogenesis	-1,92
<i>GTT1</i>	glutathione metabolism	-1,95
<i>GUP2</i>	unknown	3,17
<i>GUT1</i>	glycerol metabolism	-2,56
<i>GYP7</i>	vesicle-mediated transport	-1,53
<i>HAP4</i>	regulation of carbohydrate metabolism, transcription	-1,42
<i>HBT1</i>	shmoo tip	-2,83
<i>HIS4</i>	histidine biosynthesis	1,74
<i>HIS6</i>	histidine biosynthesis	1,42
<i>HMS1</i>	pseudohyphal growth	-1,50
<i>HMX1</i>	unknown	-1,92
<i>HOR7</i>	response to stress	-2,07
<i>HSP12</i>	cell adhesion, hyperosmotic response, response to desiccation, response to heat, response to oxidative stress	-2,14
<i>HTL1</i>	DNA replication and chromosome cycle, regulation of cell cycle	-1,52
<i>HUL4</i>	protein polyubiquitination, protein monoubiquitination	-1,97
<i>HVG1</i>	unknown	-2,22
<i>HXK1</i>	fructose metabolism	-1,96
<i>HXT1</i>	hexose transport	-1,40

<i>HXT13</i>	hexose transport	-2,90
<i>HXT16</i>	hexose transport	-2,47
<i>HXT5</i>	hexose transport	-2,49
<i>HXT7</i>	hexose transport	-1,48
<i>ICL1</i>	glyoxylate cycle	-2,45
<i>ICL2</i>	propionate metabolism, threonine catabolism	-3,52
<i>IDP2</i>	glutamate biosynthesis, isocitrate metabolism	-3,05
<i>IML3</i>	chromosome segregation	2,29
<i>IMP2</i>	mitochondrial processing	-1,56
<i>INH1</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-2,26
<i>INO2</i>	phospholipid biosynthesis, positive regulation of transcription from Pol II promoter	-2,31
<i>ISF1</i>	aerobic respiration	-2,36
<i>ISU1</i>	iron homeostasis, iron-sulfur cluster assembly	-1,35
<i>JEN1</i>	lactate transporter	-1,44
<i>JIP3</i>	unknown	-1,49
<i>KAP114</i>	protein-nucleus import	1,52
<i>KAP122</i>	protein-nucleus import, response to drug	2,05
<i>KAR3</i>	karyogamy during conjugation with cellular fusion, meiosis, mitosis	-1,93
<i>KCC4</i>	axial budding, protein amino acid phosphorylation, bud growth, septin checkpoint, septin ring assembly	3,25
<i>KGD1</i>	2-oxoglutarate metabolism, tricarboxylic acid cycle	-1,48
<i>KIN82</i>	unknown	-1,40
<i>KRE29</i>	unknown	-2,58
<i>LCD1</i>	DNA damage checkpoint, establishment of protein localization, telomerase-dependent telomere maintenance	-2,19
<i>LEE1</i>	unknown	-1,38
<i>LSC2</i>	succinyl-CoA metabolism, tricarboxylic acid cycle	-1,82
<i>LSM5</i>	mRNA splicing, rRNA processing	1,54

Apéndice III: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa DOG21.

<i>LYS1</i>	lysine biosynthesis, aminoacidic pathway	1,59
<i>MAG1</i>	DNA dealkylation	-1,38
<i>MAL11</i>	alpha-glucoside transport, trehalose transport	-2,06
<i>MAL12</i>	maltose catabolism	-2,90
<i>MAL13</i>	carbohydrate metabolism, regulation of transcription, DNA-dependent	-1,53
<i>MAL31</i>	alpha-glucoside transport	-2,85
<i>MAL32</i>	maltose catabolism	-2,71
<i>MBR1</i>	aerobic respiration	-1,88
<i>MDH2</i>	gluconeogenesis, glyoxylate cycle, malate metabolism	-2,04
<i>MDM10</i>	mitochondrial genome maintenance, mitochondrion inheritance, mitochondrion organization and biogenesis	-1,71
<i>MDN1</i>	protein complex assembly	-2,09
<i>MEP1</i>	ammonium transport	1,52
<i>MFA2</i>	signal transduction during conjugation with cellular fusion	3,40
<i>MFApha2</i>	mating	2,11
<i>MHR1</i>	mitochondrial genome maintenance	-2,23
<i>MIG3</i>	transcription initiation	1,71
<i>MIH1</i>	G2/M transition of mitotic cell cycle, regulation of CDK activity	-1,68
<i>MLS1</i>	glyoxylate cycle	-2,23
<i>MMS21</i>	DNA repair	-3,31
<i>MPH2</i>	carbohydrate transport	-1,71
<i>MRK1</i>	protein amino acid phosphorylation, proteolysis and peptidolysis, response to stress	-1,45
<i>MRM2</i>	rRNA modification	-1,53
<i>MRP20</i>	protein biosynthesis	-1,41
<i>MRS5</i>	mitochondrial translocation	1,86
<i>MSB2</i>	establishment of cell polarity (sensu <i>Saccharomyces</i>), response to osmotic stress	-2,56

<i>MTG1</i>	unknown	-1,96
<i>MXR1</i>	response to oxidative stress	1,68
<i>NCE101</i>	protein secretion	-3,40
<i>NCE103</i>	secretion, non-classical	-1,94
<i>NDI1</i>	oxidative phosphorylation, NADH to ubiquinone	-1,56
<i>NFT1</i>	transport	-2,95
<i>NGL3</i>	unknown	-2,85
<i>NIT1</i>	unknown	-1,34
<i>ODC1</i>	mitochondrial transport	-1,99
<i>OM45</i>	unknown	-1,94
<i>OPT2</i>	oligopeptide transport	2,05
<i>PAU2</i>	unknown	2,65
<i>PBI2</i>	regulation of proteolysis and peptidolysis, vacuole fusion (non-autophagic)	-2,68
<i>PCK1</i>	gluconeogenesis	-1,74
<i>PCL5</i>	cell cycle	1,36
<i>PDH1</i>	propionate metabolism	-2,44
<i>PDR10</i>	multidrug transport	-1,58
<i>PDR11</i>	* sterol transport	1,45
<i>PDR3</i>	regulation of transcription from Pol II promoter, response to drug	-1,34
<i>PET111</i>	protein synthesis	-1,44
<i>PET18</i>	mitochondrion organization and biogenesis, * thiamin metabolism	2,07
<i>PEX11</i>	peroxisome organization and biogenesis	-2,17
<i>PGM1</i>	glucose 1-phosphate utilization, glucose 6-phosphate utilization	1,32
<i>PHM7</i>	unknown	-4,55
<i>PHO84</i>	phosphate transport	-3,30
<i>PHO89</i>	phosphate transport	-4,07
<i>PIB1</i>	protein ubiquitination	-1,56

<i>PIS1</i>	phosphatidylinositol biosynthesis	1,44
<i>PKH2</i>	MAPKKK cascade (cell wall biogenesis), protein amino acid phosphorylation	-1,34
<i>PMD1</i>	sporulation	1,77
<i>PMP2</i>	unknown	1,42
<i>POR1</i>	aerobic respiration, ion transport, mitochondrion organization and biogenesis	-1,79
<i>POT1</i>	fatty acid beta-oxidation	-2,00
<i>POX1</i>	fatty acid beta-oxidation	-3,17
<i>PRM4</i>	conjugation with cellular fusion	-2,26
<i>PRM7</i>	conjugation with cellular fusion	-1,37
<i>PRP45</i>	positive regulation of transcription from Pol II promoter	2,10
<i>PRX1</i>	regulation of redox homeostasis	-1,58
<i>PRY1</i>	unknown	-1,97
<i>PRY2</i>	unknown	-1,37
<i>PSD1</i>	phosphatidylcholine biosynthesis	-1,73
<i>PTK1</i>	polyamine transport	-2,34
<i>PUT4</i>	neutral amino acid transport	-1,51
<i>PXA2</i>	fatty acid transport	-1,66
<i>QCR10</i>	aerobic respiration	-2,08
<i>QCR8</i>	aerobic respiration, oxidative phosphorylation, ubiquinone to cytochrome c	-1,54
<i>QCR9</i>	* aerobic respiration, iron-sulfur cluster assembly, oxidative phosphorylation, ubiquinone to cytochrome c	-1,44
<i>RAD26</i>	nucleotide-excision repair, transcription-coupled nucleotide-excision repair	-2,75
<i>RAD59</i>	double-strand break repair via break-induced replication, double-strand break repair via single-strand annealing, telomerase-independent telomere maintenance	-1,92
<i>RCK1</i>	protein amino acid phosphorylation, regulation of meiosis	2,20
<i>RCS1</i>	high affinity iron transport, * positive regulation of transcription from Pol II promoter	-1,47

Apéndice III: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa DOG21.

<i>REG2</i>	cell growth and/or maintenance, negative regulation of transcription from Pol II promoter	-3,11
<i>REM50</i>	negative regulation of DNA transposition	2,85
<i>REX3</i>	RNA processing	-3,20
<i>RHO2</i>	actin filament organization, cell wall organization and biogenesis, establishment of cell polarity (sensu Saccharomyces), microtubule-based process, small GTPase mediated signal transduction	1,46
<i>RIB1</i>	vitamin B2 biosynthesis	-1,51
<i>RIB7</i>	vitamin B2 biosynthesis	-1,58
<i>RIM8</i>	* invasive growth, * meiosis, protein processing	-2,38
<i>RIP1</i>	aerobic respiration, oxidative phosphorylation, ubiquinone to cytochrome c	-1,76
<i>RNA15</i>	mRNA cleavage, * mRNA polyadenylation	1,43
<i>RPL29</i>	protein biosynthesis	1,58
<i>RPM2</i>	mitochondrion organization and biogenesis, * protein biosynthesis, tRNA 5'-leader removal	-1,74
<i>RPP1B</i>	protein biosynthesis, * translational elongation	1,49
<i>RPS14A</i>	protein biosynthesis, ribosomal small subunit assembly and maintenance	1,39
<i>RSN1</i>	unknown	-1,39
<i>RSR1</i>	bud site selection, axial budding, polar budding, small GTPase mediated signal transduction	1,56
<i>SAM1</i>	methionine metabolism	1,68
<i>SAP1</i>	unknown	-1,65
<i>SDH2</i>	oxidative phosphorylation, succinate to ubiquinone, tricarboxylic acid cycle	-1,37
<i>SDH4</i>	mitochondrial electron transport, succinate to ubiquinone, tricarboxylic acid cycle	-2,54
<i>SDS23</i>		-1,97
<i>SEC24</i>	ER to Golgi transport, autophagy	1,47
<i>SED1</i>	cell wall organization and biogenesis	-1,45
<i>SFC1</i>	fumarate transport, succinate transport	-3,98

<i>SFI1</i>	G2/M transition of mitotic cell cycle	-1,35
<i>SIP2</i>	cell aging (sensu Saccharomyces), filamentous growth, protein amino acid phosphorylation, signal transduction	-1,73
<i>SIZ1</i>	sumoylation	-1,44
<i>SMA1</i>	spore wall assembly (sensu Saccharomyces)	1,34
<i>SNA2</i>	unknown	-1,46
<i>SNF3</i>	response to glucose stimulus, signal transduction	-1,55
<i>SNL1</i>	nuclear pore organization and biogenesis	1,35
<i>SOK1</i>	cAMP-mediated signaling	-1,68
<i>SOL4</i>	unknown	-1,38
<i>SPH1</i>	Rho protein signal transduction, actin filament organization, establishment of cell polarity (sensu Saccharomyces), polar budding, pseudohyphal growth	-1,44
<i>SPI1</i>	unknown	-1,33
<i>SPO12</i>	meiosis I, mitotic cell cycle, regulation of exit from mitosis	1,42
<i>SPO14</i>	exocytosis, phospholipid metabolism, sporulation (sensu Fungi)	-1,42
<i>SPP381</i>	mRNA splicing	-1,69
<i>SPS19</i>	* fatty acid catabolism, sporulation (sensu Saccharomyces)	-1,99
<i>SRO77</i>	Golgi to plasma membrane transport, exocytosis	-1,47
<i>STF1</i>	ATP synthesis coupled proton transport	-1,86
<i>STF2</i>	ATP synthesis coupled proton transport, response to desiccation	-2,08
<i>STR3</i>	methionine biosynthesis	2,93
<i>SUC2</i>	sucrose catabolism	-2,28
<i>SUE1</i>	unknown	-3,47
<i>SUR1</i>	mannose inositol phosphoceramide metabolism, sphingolipid biosynthesis	-1,61
<i>SWH1</i>	unknown	1,61

<i>SWM1</i>	regulation of mitotic metaphase/anaphase transition, spore wall assembly (sensu Saccharomyces)	-1,82
<i>SYM1</i>	unknown	-2,15
<i>TAD2</i>	* tRNA modification	1,47
<i>TAF1</i>	iron ion homeostasis, iron-siderochrome transport, siderochrome metabolism	-2,42
<i>TAT1</i>	amino acid transport	-1,58
<i>TEF4</i>	translational elongation	1,38
<i>TEP1</i>	spore wall assembly (sensu Saccharomyces)	-1,37
<i>TFS1</i>	regulation of proteolysis and peptidolysis	-1,37
<i>THI2</i>	thiamin biosynthesis	2,36
<i>THI3</i>	thiamin biosynthesis	-1,46
<i>THI4</i>	* DNA repair, thiamin biosynthesis	3,50
<i>THR1</i>	homoserine metabolism, isoleucine metabolism, methionine metabolism, threonine metabolism	1,32
<i>TIP1</i>	cell wall organization and biogenesis	-1,49
<i>TIR1</i>	response to stress	-1,46
<i>TIR3</i>	unknown	1,38
<i>TIR4</i>	unknown	-2,57
<i>TOS8</i>	unknown	-1,75
<i>TRS20</i>	ER to Golgi transport	2,02
<i>TSL1</i>	response to stress, trehalose biosynthesis	-2,01
<i>TYE7</i>	positive regulation of glycolysis, transcription	-1,53
<i>TYS1</i>	amino acid activation, tyrosyl-tRNA aminoacylation	1,35
<i>UBC12</i>	RUB1-protein conjugation, protein monoubiquitination, protein polyubiquitination	3,08
<i>UBC5</i>	endocytosis, protein monoubiquitination, protein polyubiquitination, response to stress, response to unfolded protein, sporulation (sensu Saccharomyces)	-1,65
<i>UGX2</i>	unknown	-2,43

Apéndice III: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa DOG21.

<i>UTP4</i>	unknown	-1,70
<i>UTR5</i>	unknown	1,39
<i>VMA7</i>	vacuolar acidification	1,50
<i>VPS13</i>	protein-Golgi retention, late endosome to vacuole transport	-1,34
<i>VPS3</i>	protein-vacuolar targeting	-1,79
<i>VTH2</i>	Golgi to vacuole transport	1,34
<i>XYL2</i>	monosaccharide metabolism	-1,37
<i>YAT2</i>	alcohol metabolism, carnitine metabolism	-2,32
<i>YCS4</i>	mitotic chromosome condensation	-2,02
<i>YKT9</i>	unknown	-2,30
<i>YMR31</i>	* protein biosynthesis	-1,81
<i>YNG2</i>	chromatin modification	-1,56
<i>YPT11</i>	mitochondrion inheritance	1,51
<i>YRO2</i>	unknown	-2,14
<i>YSN1</i>	unknown	1,63
<i>YVC1</i>	cation homeostasis	3,92
<i>ZUO1</i>	protein folding	1,55
<i>YOR225W</i>	unknown	3,77
<i>YKL037W</i>	unknown	3,71
<i>YNL184C</i>	unknown	3,46
<i>YJR120W</i>	unknown	3,33
<i>YBR032W</i>	unknown	3,09
<i>YLR343W</i>	unknown	3,06
<i>YPL199C</i>	unknown	3,06
<i>YOR364W</i>	unknown	2,70
<i>YLR152C</i>	unknown	2,53
<i>YIL174W</i>	unknown	2,45
<i>YOL014W</i>	unknown	2,28
<i>YBL100C</i>	unknown	2,26

<i>YDL241W</i>	unknown	2,13
<i>YAR068W</i>	unknown	2,09
<i>YPL245W</i>	unknown	2,09
<i>YER074W-A</i>	unknown	1,88
<i>YJL135W</i>	unknown	1,86
<i>YTR035C</i>	unknown	1,86
<i>YBR184W</i>	unknown	1,86
<i>YHR168W</i>	unknown	1,81
<i>YIL169C</i>	unknown	1,77
<i>YJL091C</i>	unknown	1,75
<i>YOL155C</i>	cell wall organization and biogenesis	1,75
<i>YDR013W</i>	unknown	1,72
<i>YAL066W</i>	unknown	1,68
<i>YPR059C</i>	unknown	1,67
<i>YML083C</i>	unknown	1,62
<i>YHR022C</i>	unknown	1,62
<i>YGR210C</i>	unknown	1,61
<i>YDL242W</i>	unknown	1,53
<i>YGR117C</i>	unknown	1,52
<i>YCL049C</i>	unknown	1,51
<i>YBR219C</i>	unknown	1,50
<i>YPL251W</i>	unknown	1,49
<i>YIL121W</i>	unknown	1,49
<i>YCR043C</i>	unknown	1,48
<i>YCL021W-A</i>	unknown	1,47
<i>YGR294W</i>	unknown	1,45
<i>YDR360W</i>	unknown	1,44
<i>YGL034C</i>	unknown	1,44
<i>YCR050C</i>	unknown	1,41

<i>YBR232C</i>	unknown	1,38
<i>YER078C</i>	unknown	1,36
<i>YLR413W</i>	unknown	1,36
<i>YCR101C</i>	unknown	1,33
<i>YMR041C</i>	unknown	-1,33
<i>YPR115W</i>	unknown	-1,35
<i>YJR096W</i>	arabinose metabolism	-1,37
<i>YGL080W</i>	unknown	-1,37
<i>YLR012C</i>	unknown	-1,37
<i>YKL171W</i>	proteolysis and peptidolysis	-1,37
<i>YNL179C</i>	unknown	-1,38
<i>YGL072C</i>	unknown	-1,38
<i>YNR074C</i>	response to singlet oxygen	-1,38
<i>YBL071C</i>	unknown	-1,38
<i>YHR097C</i>	unknown	-1,38
<i>YDR357C</i>	unknown	-1,39
<i>YHR087W</i>	unknown	-1,39
<i>YMR181C</i>	unknown	-1,40
<i>YMR040W</i>	unknown	-1,41
<i>YOR215C</i>	unknown	-1,41
<i>YBR235W</i>	unknown	-1,44
<i>YHR138C</i>	vacuole fusion (non-autophagic)	-1,44
<i>YLR023C</i>	unknown	-1,45
<i>YOL083W</i>	unknown	-1,46
<i>YMR290W-A</i>	unknown	-1,46
<i>YDR010C</i>	unknown	-1,46
<i>YBR047W</i>	unknown	-1,46
<i>YMR193C-A</i>	unknown	-1,47
<i>YJR160C</i>	carbohydrate transport	-1,48

Apéndice III: comparación entre condiciones fermentativas frente a respiración en la cepa DOG21.

<i>YPL039W</i>	unknown	-1,48
<i>YEL043W</i>	unknown	-1,49
<i>YBL029C-A</i>	unknown	-1,50
<i>YLR282C</i>	unknown	-1,51
<i>YMR090W</i>	unknown	-1,51
<i>YMR030W</i>	calcium-mediated signaling	-1,51
<i>YLR301W</i>	cotranslational membrane targeting	-1,52
<i>YGR110W</i>	unknown	-1,52
<i>YER182W</i>	unknown	-1,53
<i>YIL087C</i>	unknown	-1,53
<i>YNL313C</i>	unknown	-1,53
<i>YDR287W</i>	myo-inositol metabolism	-1,55
<i>YNL144C</i>	unknown	-1,55
<i>YKL187C</i>	unknown	-1,56
<i>YNL105W</i>	unknown	-1,58
<i>YML131W</i>	unknown	-1,59
<i>YLR294C</i>	cellular respiration	-1,59
<i>YGR153W</i>	unknown	-1,61
<i>YPL201C</i>	unknown	-1,61
<i>YFR054C</i>	unknown	-1,61
<i>YLR327C</i>	unknown	-1,62
<i>YFL012W</i>	unknown	-1,64
<i>YDL124W</i>	unknown	-1,65
<i>YJL217W</i>	unknown	-1,65
<i>YDR034W-B</i>	unknown	-1,72
<i>YNI274C</i>	metabolism	-1,72
<i>YIL042C</i>	unknown	-1,72
<i>YPR061C</i>	unknown	-1,76
<i>YPR093C</i>	unknown	-1,77

<i>YTR044C</i>	unknown	-1,77
<i>YNL100W</i>	unknown	-1,78
<i>YMR206W</i>	unknown	-1,79
<i>YOL157C</i>	unknown	-1,79
<i>YPR195C</i>	unknown	-1,79
<i>YDL133W</i>	unknown	-1,79
<i>YGR146C</i>	unknown	-1,80
<i>YJR012C</i>	unknown	-1,80
<i>YML107C</i>	unknown	-1,81
<i>YTR016W</i>	unknown	-1,82
<i>YKL066W</i>	unknown	-1,85
<i>YJL048C</i>	unknown	-1,86
<i>YGR043C</i>	unknown	-1,86
<i>YMR191W</i>	unknown	-1,87
<i>YBR053C</i>	unknown	-1,87
<i>YFL061W</i>	unknown	-1,87
<i>YBR004C</i>	unknown	-1,89
<i>YDR504C</i>	unknown	-1,95
<i>YDR338C</i>	unknown	-1,95
<i>YDL068W</i>	unknown	-1,95
<i>YGR243W</i>	unknown	-2,05
<i>YBR293W</i>	unknown	-2,06
<i>YIL024C</i>	unknown	-2,06
<i>YOR289W</i>	unknown	-2,06
<i>YJR008W</i>	unknown	-2,07
<i>YHR210C</i>	unknown	-2,09
<i>YIL055C</i>	unknown	-2,13
<i>YFR017C</i>	unknown	-2,14
<i>YOL048C</i>	unknown	-2,16

<i>YMR111C</i>	unknown	-2,20
<i>YBR269C</i>	unknown	-2,43
<i>YIL077C</i>	unknown	-2,47
<i>YBR230C</i>	unknown	-2,53
<i>YGR287C</i>	unknown	-2,58
<i>YPR150W</i>	unknown	-2,63
<i>YOR121C</i>	unknown	-2,64
<i>YIL102C</i>	unknown	-2,74
<i>YDR070C</i>	unknown	-2,77
<i>YJL049W</i>	unknown	-2,80
<i>YDR230W</i>	unknown	-2,84
<i>YDR379C-A</i>	unknown	-2,85
<i>YIL057C</i>	unknown	-2,86
<i>YCR079W</i>	unknown	-2,92
<i>YPR097W</i>	unknown	-2,98
<i>YDI222C</i>	unknown	-3,00
<i>YDR223W</i>	unknown	-3,01
<i>YDR271C</i>	unknown	-3,04
<i>YBR285W</i>	unknown	-3,12
<i>YEL070W</i>	unknown	-3,13
<i>YPL162C</i>	unknown	-3,13
<i>YNL028W</i>	unknown	-3,45
<i>YHR069C-A</i>	unknown	-3,57
<i>YER121W</i>	unknown	-3,94
<i>YCL068C</i>	unknown	-4,06
<i>YHR033W</i>	unknown	-4,23
<i>YJR097W</i>	unknown	-4,26

APÉNDICE IV

Tablas con los genes con mayor expresión en YPD que en YPG en la cepa DOG21 y viceversa.

.

Apéndice IV: Tablas

Tabla A.4-. Términos GO en la lista de genes con mayor expresión en YPD. Se ha procedido a la eliminación de aquellos genes cuya función es desconocida, así como de las GO con menos de 5 genes.

ID	Término GO	Genes
6810	Transporte	<i>AGP3, AVT5, CTP1, DUR3, FUN26, GUP2, KAP114, KAP122, MEP1, OPT2, PDR11, PMP2, QDR2, SEC24, SWH1, TIM12, TRS20, VTH2, YJR120W, YOS1</i>
6996	Organización organelos	<i>CLB1, DAM1, EST3, EXO1, FPR4, IML3, KCC4, PET18, RHO2, RTT109, SNL1, SPO12, SWC5, THI4, TIM12, YJR120W, YPT11</i>
6519	Proceso del metabolismo de aminoácidos celulares y derivados	<i>ARG1, ARG3, ARG5,6, ARO7, ASN1, BAT1, CYS3, GDH1, HIS4, HIS6, LYS1, SAM1, STR3, THR1, TYS1</i>
16070	Proceso del metabolismo del ARN	<i>CCA1, FPR4, GAT1, LSM5, MIG3, PRP45, RNA15, RPS14A, RTT109, TAD2, THI2, TYS1</i>
6350	Transcripción	<i>ARG5,6, FPR4, GAT1, MIG3, PCL5, PRP45, RTT109, THI2</i>
42221	Respuesta a estímulo químico	<i>AHP1, CYS3, GPX2, KAP122, MFA2, MXR1, QDR2</i>
7049	Ciclo celular	<i>CLB1, DAM1, IML3, KCC4, PIS1, RCK1, SPO12</i>
6464	Proceso de modificación de proteínas	<i>KCC4, RCK1, GWT1, RTT109, UBC12, FPR4, GPI2</i>
6412	Traducción	<i>MTG2, RPL29, RPP1B, RPS14A, TEF4, TYS1, ZUO1</i>
6950	Respuesta a estrés	<i>AHP1, EXO1, GPX2, MIG3, MXR1, RTT109</i>
30435	sporulation resulting in formation of a cellular spore	<i>CRR1, GAS2, IML3, PMD1, SMA1</i>
6629	Proceso metabólico de lípidos	<i>ERG2, ERG24, GPI2, GWT1, PIS1</i>
6766	Proceso del metabolismo de vitaminas	<i>BN A1, BN A4, PET18, THI2, THI4</i>
6725	Proceso metabólico de compuestos aromáticos celulares	<i>ARO7, PET18, SAM1, THI2, THI4</i>
16192	Transporte mediado por vesículas	<i>SEC24, SWH1, TRS20, VTH2, YOS1</i>

Tabla A.5-. Términos GO en la lista de genes con mayor expresión en YPG. Se ha procedido a eliminar todos aquellos genes cuya función es desconocida, así como de las GO con menos de 5 genes.

ID	Término GO	Genes
6810	Transporte	<i>AAC1, ADY2, AFT1, AGP2, ATO2, ATO3, ATP15, ATP16, ATP17, ATP18, CCC2, CIK1, DAL5, DAN1, ENA2, ESBP6, GLK1, GYP7, HXK1, HXT1, HXT13, HXT16, HXT5, HXT7, IMP2, JEN1, KAR3, MAL11, MAL31, MDH2, MDM10, MPH2, MPH3, NCE101, NFT1, ODC1, PDR10, PHO84, PHO89, POR1, PTK1, PUT4, PXA2, RSN1, SFC1, SNF3, SPO14, SRO77, TAT1, UBC5, VBA2, VPS13, VPS3, YBR235W, YLR301W</i>
5975	Proceso del metabolismo de carbohidratos	<i>ADR1, AMS1, ARA1, ATH1, CAT8, CIT2, DLD1, DOG1, DOG2, FYV10, GDB1, GLK1, GSC2, GUT1, HAP4, HXK1, ICL1, INM2, MAL12, MAL13, MAL32, MDH2, MLS1, PCK1, SOL4, SUC2, TSL1, TYE7, XYL2, YGR287C, YIG1, YJR096W</i>
42221	Respuesta es estímulo químico	<i>AAD10, ADR1, AFR1, AIF1, ASR1, CSN9, CTA1, CUP1-2, CUP2, ECM25, ECM4, FUS3, GPB1, GPX1, HBT1, HSP12, KIN82, NCE103, PDR10, PDR3, PRM4, PRM7, PRX1, RIB1, SNF3, SPI1, SPO14, UBC5, YDL124W, YIL077C, YJR096W, YML131W</i>
6091	Generación de metabolitos precursores y energía	<i>AAC1, ACS1, ADH2, ATP15, ATP16, ATP17, ATP18, COX4, COX5A, COX7, DLD1, ETR1, GDB1, GLK1, HXK1, ISF1, KGD1, LSC2, MBR1, NDI1, POR1, QCR10, QCR8, QCR9, RIP1, RSF1, SDH2, SDH4, TYE7, YIG1, YLR294C</i>
6950	Respuesta a estrés	<i>AGP2, AIF1, ATH1, CTA1, DDR2, DDR48, DOG2, GPX1, HOR7, HSP12, HTL1, KRE29, LCD1, MAG1, MMS21, MRK1, MSB2, NCE103, PRX1, PTC6, RAD26, RAD59, SIP2, STF2, TIR1, TSL1, UBC5, YDL124W, YJR096W, YML131W, YNG2</i>

Apéndice IV: Tablas

6996	Organización de organelos	<i>ACS1, ADR1, CBP4, CDC13, CIK1, GIS1, HTL1, IMP2, KAR3, LCD1, MDH2, MDM10, MHR1, MRP20, PBI2, PEX11, POR1, RAD59, RPM2, RSF1, SED1, SFI1, SPH1, SWM1, VPS3, YCS4, YHR138C, YNG2,</i>
16070	Proceso del metabolismo del ARN	<i>ADR1, AFT1, ASH1, CAT8, CSR2, CUP2, ELP6, FHL1, FLO8, HTL1, INO2, ISU1, MAL13, MDN1, MHR1, MRM2, PDR3, REG2, REX3, RPM2, RSF1, RTC3, SPP381, TAF1, THI3, YCS4</i>
6350	Transcripción	<i>ADR1, AFT1, ASH1, CAT8, CRF1, CSR2, CUP2, ELP6, FHL1, FLO8, GAT2, HAP4, HTL1, INO2, MAL13, MHR1, PDR3, REG2, RPM2, RSF1, TAF1, THI3, TYE7, YCS4</i>
6464	Proceso de modificación de proteínas	<i>ACS1, CSN9, ELP6, FAA2, FUS3, GIS1, GPI18, HULA, JJJ3, KIN82, MRK1, PIB1, PKH2, PKP1, PTC6, SIP2, SIZ1, SWM1, TAF1, UBC5, YNG2</i>
45333	Respiración celular	<i>AAC1, COX4, COX5A, COX7, DLD1, ETR1, ISF1, KGD1, LSC2, MBR1, NDI1, POR1, QCR10, QCR8, QCR9, RIP1, RSF1, SDH2, SDH4, YLR294C</i>
6629	Proceso del metabolismo de lípidos	<i>AGP2, CLD1, DCI1, ECI1, ETR1, FAA2, GIS1, GPI18, INO2, PEX11, POT1, POX1, PSD1, SPO14, SPS19, SUR1, TEP1</i>
6519	Proceso del metabolismo de aminoácidos celulares y derivad	<i>ADH2, AGX1, ARO10, ARO9, CIT2, CHA1, ECM4, GCV2, GTT1, ICL2, IDP2, PSD1, PUT4, THI3, YAT2</i>
51186	Proceso metabólico de cofactores	<i>AAC1, ACS1, ADH2, ALD4, ECM4, GTT1, HMX1, ISU1, KGD1, LSC2, NDI1, QCR9, SDH2, SDH4, SOL4</i>
7165	Transducción de la señal	<i>AFR1, COS111, CSN9, FUS3, GPB1, LCD1, MSB2, PKH2, RSF1, SIP2, SNF3, SOK1, SPH1, TEP1, TFS1</i>
7049	Ciclo celular	<i>FUS3, HTL1, SNF3, SWM1, LCD1, RIM8, TAF1, SFI1, YCS4, MIH1, CIK1, KAR3</i>
46483	Proceso metabólico de heterociclos	<i>AAC1, ADE12, ARA2, ARO10, ATP15, ATP16, ATP17, ATP18, DAL7, HMX1, PUT4, THI3</i>
30163	Proceso del catabolismo de proteínas	<i>DOG2, FYV10, MRK1, PBI2, SUE1, SWM1, TFS1, UBX6, VPS13, YKL171W</i>
7047	Organización de la pared celular	<i>CSR2, ECM25, ECM4, FMP45, GIS1, GSC2, SED1, SWM1, TEP1, TIP1</i>
6259	Proceso del metabolismo del ADN	<i>CDC13, DDR48, KRE29, LCD1, MLAG1, MMS21, RAD26, RAD59, YCS4, YNG2</i>
746	Conjugación	<i>AFR1, CIK1, CSN9, FUS3, HBT1, KAR3, PRM4, PRM7, SPO14</i>
30435	sporulation resulting in formation of a cellular spore	<i>FMP45, GIS1, GSC2, SPO14, SPS19, SWM1, TEP1, UBX6, VPS13</i>
6766	vitamin metabolic process	<i>ADH2, ALD4, NDI1, RIB1, RIB7, SOL4, THI3, YAT2</i>
6412	Traducción	<i>CBP6, CBS1, MRP20, MTG1, PET111, RPM2, YMR31</i>
19725	Homeostasis celular	<i>CCC2, HMX1, ISU1, IZH3, PRX1, VPS3</i>
16192	Transporte mediado por vesículas	<i>GYP7, RSN1, SPO14, SRO77, UBC5, VPS13</i>
42254	Biogénesis del ribosoma	<i>FHL1, MDN1, MRM2, MTG1, REX3</i>
7124	Crecimiento en pseudohifa	<i>ASH1, FLO8, GPB1, HMS1, SPH1</i>
9653	anatomical structure morphogenesis	<i>AFR1, HBT1, MSB2, SPH1, SPO14</i>

Tabla A.6-. Comparación entre los enriquecimientos ontológicos. En la casilla YPD vs YPG se indica el porcentaje del número de genes de la lista YPD anotados en los términos GO dividido del número de genes anotados a esta función de las listas de YPD e YPG juntos. Se ha decidido utilizar un valor de p ajustado < 0.01 en el test de Fisher exacto.

Índice	Término	YPD YPG	Valor p	Valor p ajustado
GO proceso biológico a nivel 3	Proceso catabólico (GO:0009056)	12.4% 87.6%	0.0004	0.008
	Proceso biosintético (GO:0009058)	68.7% 31.3%		
GO proceso biológico a nivel 4	Proceso del metabolismo de carbohidrato (GO:0005975)	10.36% 89.64%	1.73E-05	0.0006
	Generación de metabolitos precursores y energía (GO:0006091)	19.47% 80.53%		
GO proceso biológico a nivel 5	Derivación de la energía por oxidación de compuestos orgánicos (GO:0015980)	8.78% 91.22%	8.20E-07	0.0001
GO proceso biológico a nivel 6	Proceso metabólico de carbohidratos celulares (GO:0044262)	6.13% 93.87%	1.69E-05	0.002

APÉNDICE V

Resultados de la comparación entre las cepas V1 y DOG21 creciendo en condiciones fermentativas. FC viene dada por la expresión en $\text{Log}_2 b$, siendo b el cociente de la expresión en la cepa V1 frente a la de DOG21.

Apéndice V: Comparación entre V1 y DOG21 en condiciones fermentativas

<i>Gene</i>	Biological Process	FC
<i>AAD10</i>	aldehyde metabolism	1,77
<i>ACS1</i>	* acetate fermentation, acetyl-CoA biosíntesis	-3,54
<i>ADE16</i>	'de novo' IMP biosynthesis, aerobic respiration, sporulation (sensu Saccharomyces)	1,57
<i>ADH5</i>	alcohol metabolism	2,11
<i>ADO1</i>	purine base metabolism	1,38
<i>ADR1</i>	peroxisome organization and biogenesis, regulation of carbohydrate metabolism, transcription	-1,55
<i>ALD4</i>	ethanol metabolism	-3,04
<i>ALF1</i>	alpha-tubulin folding, post-chaperonin tubulin folding pathway	-1,57
<i>ALO1</i>	response to oxidative stress	-1,84
<i>AMS1</i>	carbohydrate metabolism	-1,73
<i>APG16</i>	Autophagy	1,52
<i>APT2</i>	Unknown	-1,36
<i>ARG1</i>	arginine biosynthesis, argininosuccinate metabolism, citrulline metabolism	2,09
<i>ARG4</i>	arginine biosynthesis	1,49
<i>ARG5,6</i>	ornithine biosynthesis	1,57
<i>ARG80</i>	arginine metabolism, positive regulation of transcription from Pol II promoter	1,63
<i>ARO10</i>	leucine catabolism, phenylalanine catabolism	-2,13
<i>ARO9</i>	aromatic amino acid family metabolism	-1,64
<i>ATH1</i>	* response to stress, trehalose catabolism	-2,12
<i>AUA1</i>	amino acid uptake	2,52
<i>BAP2</i>	amino acid transport	-1,89
<i>BET1</i>	ER to Golgi transport, retrograde (Golgi to ER) transport	2,28
<i>BNR1</i>	actin filament organization, axial budding, response to osmotic stress	-1,68
<i>BPL1</i>	protein modification	1,43
<i>BVC3</i>	unknown	1,69

<i>BTN2</i>	intracellular protein transport, regulation of pH	1,51
<i>BUR2</i>	mitotic chromosome segregation, transcription	-2,23
<i>CAT8</i>	gluconeogenesis, positive regulation of transcription from Pol II promoter	-2,78
<i>CBF1</i>	DNA replication and chromosome cycle, methionine biosynthesis	2,95
<i>CBK1</i>	cellular morphogenesis during conjugation with cellular fusion, establishment and/or maintenance of cell polarity (sensu Saccharomyces), exit from mitosis, response to pheromone during conjugation with cellular fusion	1,98
<i>CDA2</i>	spore wall assembly (sensu Saccharomyces)	-4,07
<i>CDC13</i>	telomere capping, telomere maintenance	-1,99
<i>CDC43</i>	calcium ion homeostasis, establishment of cell polarity (sensu Saccharomyces), protein amino acid geranylgeranylation, small GTPase mediated signal transduction	1,55
<i>CDC54</i>	DNA replication initiation, DNA unwinding, pre-replicative complex formation and maintenance	1,43
<i>CHA4</i>	amino acid catabolism, regulation of transcription, DNA-dependent	1,88
<i>CHS3</i>	cell wall chitin biosynthesis, cytokinesis, response to osmotic stress	-1,42
<i>CIK1</i>	meiosis, mitotic chromosome segregation, mitotic spindle assembly (sensu Saccharomyces), mitotic spindle orientation	-3,86
<i>CLA4</i>	Rho protein signal transduction, apical bud growth, cytokinesis, establishment of cell polarity (sensu Saccharomyces), protein amino acid phosphorylation	2,08
<i>CLB4</i>	G1/S transition of mitotic cell cycle, G2/M transition of mitotic cell cycle, regulation of CDK activity	-1,75
<i>COG5</i>	intra-Golgi transport	1,44
<i>COX19</i>	cytochrome c oxidase biogenesis, metal ion transport	1,51
<i>CRS5</i>	response to heavy metal	-1,42
<i>CSR2</i>	cell wall organization and biogenesis, * regulation of transcription from Pol II promoter	-3,43
<i>CTA1</i>	oxygen and reactive oxygen species metabolism	-2,04

<i>CTP1</i>	mitochondrial citrate transport	-2,75
<i>CUP1-2</i>	response to copper	-1,77
<i>CWC25</i>	unknown	2,08
<i>CYT2</i>	cytochrome c-heme linkage	1,40
<i>DAK2</i>	carbohydrate metabolism; stress response	-1,64
<i>DAL1</i>	allantoin catabolism	2,30
<i>DAL5</i>	allantoin utilization	2,68
<i>DDC1</i>	cell cycle checkpoint, meiosis	1,56
<i>DDR2</i>	response to stress	-1,52
<i>DHR2</i>	ribosome biogenesis	1,36
<i>DOG1</i>	2-deoxyglucose resistance	-2,21
<i>DOG2</i>	glucose metabolism, response to stress	-1,43
<i>DPB3</i>	lagging strand elongation, leading strand elongation, * mismatch repair, nucleotide-excision repair	-1,55
<i>DPB4</i>	* lagging strand elongation, leading strand elongation	-1,43
<i>DUR1,2</i>	urea metabolism	1,51
<i>ECM10</i>	protein-mitochondrial targeting	1,46
<i>ECM11</i>	cell wall organization and biogenesis	3,99
<i>ECM25</i>	cell wall organization and biogenesis	-3,00
<i>ECM4</i>	cell wall organization and biogenesis	-1,99
<i>ECM40</i>	cell wall organization and biogenesis, ornithine biosynthesis	1,69
<i>END3</i>	actin cortical patch assembly, actin filament organization, endocytosis, cytokinesis, polar budding	1,38
<i>ERC1</i>	Unknown	2,18
<i>ERF2</i>	protein amino acid palmitoylation, protein-membrane targeting	-2,65
<i>ERR1</i>	Unknown	1,57
<i>ERR2</i>	Unknown	2,57
<i>ETR1</i>	aerobic respiration, fatty acid biosynthesis	-1,33
<i>FAA2</i>	* N-terminal protein myristoylation, lipid metabolism	-2,16

Apéndice V: Comparación entre V1 y DOG21 en condiciones fermentativas

<i>FBP1</i>	gluconeogenesis	-2,01
<i>FET4</i>	intracellular copper ion transport, low affinity iron ion transport	2,17
<i>FHL1</i>	rRNA processing, transcription from Pol III promoter	2,06
<i>FIT3</i>	siderochrome transport	1,68
<i>FKS3</i>	Unknown	2,74
<i>FLO8</i>	invasive growth, pseudohyphal growth	2,20
<i>FOL3</i>	folic acid and derivative biosynthesis	-1,83
<i>FRS2</i>	phenylalanyl-tRNA aminoacylation	1,33
<i>FSP2</i>	Unknown	-2,08
<i>FUN14</i>	Unknown	-1,50
<i>FUN34</i>	nitrogen utilization, transport	-2,18
<i>FUS3</i>	cell cycle arrest, protein amino acid phosphorylation, signal transduction during conjugation with cellular fusion	5,38
<i>FYV1</i>	Unknown	2,69
<i>FYV10</i>	Unknown	-2,55
<i>FYV15</i>	Unknown	1,71
<i>FYV7</i>	unknown	-1,40
<i>GAD1</i>	glutamate catabolism, response to oxidative stress	-1,83
<i>GAL2</i>	extracellular carbohydrate transport, galactose metabolism	1,58
<i>GAP1</i>	amino acid transport	1,73
<i>GAT1</i>	regulation of nitrogen utilization, transcription initiation from Pol II promoter	1,94
<i>GCV2</i>	one-carbon compound metabolism	1,49
<i>GDB1</i>	glycogen catabolism	-2,36
<i>GDH1</i>	glutamate biosynthesis, using glutamate dehydrogenase (NAD(P)+)	1,82
<i>GDH2</i>	nitrogen metabolism	-2,00
<i>GDH3</i>	glutamate biosynthesis	3,39
<i>GIC2</i>	Rho protein signal transduction, axial budding, establishment of cell polarity (sensu Saccharomyces)	2,06

<i>GIP1</i>	spore wall assembly (sensu Saccharomyces)	1,89
<i>GIP2</i>	biological_process unknown	-4,74
<i>GIT1</i>	phospholipid transport	1,69
<i>GLE1</i>	poly(A)+ mRNA-nucleus export	-3,10
<i>GND2</i>	glucose metabolism	1,68
<i>GNP1</i>	amino acid transport	-1,41
<i>GPB1</i>	signal transduction	6,07
<i>GPD2</i>	glycerol metabolism	1,43
<i>GUT1</i>	glycerol metabolism	-1,43
<i>HAP1</i>	aerobic respiration, positive regulation of transcription from Pol II promoter	1,91
<i>HAP2</i>	regulation of carbohydrate metabolism, transcription	1,59
<i>HBT1</i>	shmoo tip	-2,89
<i>HEF3</i>	translational elongation	1,95
<i>HIR3</i>	G1/S-specific transcription in mitotic cell cycle	1,47
<i>HIS2</i>	histidine biosynthesis	2,43
<i>HIS4</i>	histidine biosynthesis	1,95
<i>HOF1</i>	cytokinesis	1,92
<i>HOM3</i>	methionine metabolism, threonine metabolism	1,53
<i>HOR2</i>	carbohydrate metabolism, glycerol biosynthesis, response to osmotic stress	2,05
<i>HSP12</i>	cell adhesion, hyperosmotic response, response to dessication, response to heat, response to oxidative stress	-4,50
<i>HSP30</i>	protein folding, response to stress	2,29
<i>HUL4</i>	protein polyubiquitination, protein monoubiquitination	-2,52
<i>HVG1</i>	unknown	2,23
<i>HXT13</i>	hexose transport	2,26
<i>IDP2</i>	glutamate biosynthesis, isocitrate metabolism	-3,69
<i>ILV1</i>	branched chain family amino acid biosynthesis	2,05
<i>INO2</i>	phospholipid biosynthesis, positive regulation of transcription from Pol II promoter	1,44

<i>IPK1</i>	myo-inositol metabolism	-2,58
<i>ISF1</i>	aerobic respiration	-1,95
<i>ITT1</i>	regulation of translational termination	-1,36
<i>KHA1</i>	monovalent inorganic cation transport	-1,71
<i>KRE29</i>	unknown	1,78
<i>KTT11</i>	G1 phase of mitotic cell cycle	1,43
<i>LCD1</i>	DNA damage checkpoint, establishment of protein localization, telomerase-dependent telomere maintenance	1,60
<i>LEU2</i>	leucine biosynthesis	2,25
<i>LEU4</i>	leucine biosynthesis	1,44
<i>LSC2</i>	succinyl-CoA metabolism, tricarboxylic acid cycle	-1,81
<i>MAG1</i>	DNA dealkylation	-2,05
<i>MAL11</i>	alpha-glucoside transport, trehalose transport	-4,57
<i>MAL12</i>	maltose catabolism	-4,36
<i>MAL31</i>	alpha-glucoside transport	-3,17
<i>MAL32</i>	maltose catabolism	-5,01
<i>MAM3</i>	mitochondrion organization and biogenesis	-1,94
<i>MBR1</i>	aerobic respiration	-2,23
<i>MCH2</i>	transport	-2,26
<i>MCM21</i>	chromosome segregation	-2,46
<i>MCM3</i>	DNA replication initiation, DNA unwinding, pre-replicative complex formation and maintenance	-2,72
<i>MET10</i>	sulfate assimilation	2,39
<i>MET13</i>	methionine metabolism, protein biosynthesis, sulfur amino acid biosynthesis	1,92
<i>MET14</i>	methionine metabolism, sulfate assimilation	2,94
<i>MET16</i>	sulfate assimilation, methionine metabolism	3,63
<i>MET17</i>	methionine metabolism	2,53
<i>MET18</i>	methionine metabolism, nucleotide-excision repair, transcription from Pol II promoter	-1,44

Apéndice V: Comparación entre V1 y DOG21 en condiciones fermentativas

<i>MET28</i>	regulation of transcription from Pol II promoter, sulfur amino acid biosynthesis	1,59
<i>MET3</i>	methionine metabolism, sulfate assimilation	2,72
<i>MFA2</i>	signal transduction during conjugation with cellular fusion	1,53
<i>MG41</i>	filamentous growth	1,84
<i>MG42</i>	fatty acid metabolism, positive regulation of transcription from Pol II promoter, response to cold	-1,36
<i>MGS1</i>	DNA replication, regulation of DNA replication	5,87
<i>MIP1</i>	DNA dependent DNA replication	2,21
<i>MLH3</i>	DNA repair, DNA recombination, mismatch repair	-1,50
<i>MMS21</i>	DNA repair	-3,21
<i>MPH2</i>	carbohydrate transport	-1,78
<i>MRC1</i>	DNA replication checkpoint, chromatin silencing at HML and HMR (sensu <i>Saccharomyces</i>), chromatin silencing at telomere	1,53
<i>MRH1</i>	unknown	1,37
<i>MRPL6</i>	protein biosynthesis	-2,25
<i>MRPS18</i>	protein biosynthesis	2,16
<i>MRPS28</i>	protein biosynthesis, ribosomal small subunit assembly and maintenance	-2,04
<i>MSL5</i>	mRNA splicing	-1,54
<i>MSW1</i>	tryptophanyl-tRNA aminoacylation	1,68
<i>MTF2</i>	mRNA processing, protein biosynthesis	-1,53
<i>MTH1</i>	glucose transport, signal transduction	1,45
<i>MUP3</i>	amino acid transport	-1,56
<i>MUQ1</i>	phosphatidylethanolamine biosynthesis	3,25
<i>NEM1</i>	nuclear organization and biogenesis, sporulation (sensu <i>Saccharomyces</i>)	-1,83
<i>NOP10</i>	35S primary transcript processing, rRNA modification	-1,60

<i>NUP1</i>	NLS-bearing substrate-nucleus import, RNA-nucleus export, mRNA-binding (hnRNP) protein-nucleus import, mRNA-nucleus export, nuclear membrane organization and biogenesis, nuclear pore organization and biogenesis, protein-nucleus export, protein-nucleus import, rRNA-nucleus export, ribosomal protein-nucleus import, snRNA-nucleus export, snRNP protein-nucleus import, tRNA-nucleus export	-1,49
<i>ODC1</i>	mitochondrial transport	-1,77
<i>ODC2</i>	mitochondrial transport	2,00
<i>OM45</i>	unknown	-1,46
<i>PAU7</i>	unknown	1,46
<i>PCK1</i>	gluconeogenesis	-3,32
<i>PCL1</i>	cell cycle	-1,50
<i>PDC5</i>	ethanol fermentation, pyruvate metabolism	1,79
<i>PDC6</i>	ethanol metabolism	2,23
<i>PET111</i>	protein synthesis	-2,18
<i>PET494</i>	protein biosynthesis	3,30
<i>PHO4</i>	cellular response to phosphate starvation, phosphate metabolism	3,07
<i>PHO89</i>	phosphate transport	-3,76
<i>PM42</i>	proton transport, regulation of pH	1,52
<i>PNG1</i>	misfolded or incompletely synthesized protein catabolism, protein deglycosylation	-1,69
<i>POP5</i>	tRNA processing, rRNA processing	-1,95
<i>POT1</i>	fatty acid beta-oxidation	-2,27
<i>POX1</i>	fatty acid beta-oxidation	-5,62
<i>PRM6</i>	conjugation with cellular fusion	2,08
<i>PRM8</i>	conjugation with cellular fusion	2,10
<i>PRP24</i>	snRNP recycling, spliceosome assembly	-3,04
<i>PRR1</i>	MAPKKK cascade	2,04
<i>PRX1</i>	regulation of redox homeostasis	-1,49
<i>PSY3</i>	unknown	1,43

<i>PTH1</i>	protein biosynthesis	-1,47
<i>PXA2</i>	fatty acid transport	-1,80
<i>QCR8</i>	aerobic respiration, oxidative phosphorylation, ubiquinone to cytochrome c	-1,43
<i>REC107</i>	meiotic recombination	1,51
<i>RIM11</i>	protein amino acid phosphorylation, proteolysis and peptidolysis, response to stress, sporulation (sensu <i>Saccharomyces</i>)	-1,78
<i>RMD8</i>	unknown	-1,40
<i>RNR3</i>	DNA replication	4,87
<i>ROG1</i>	* lipid metabolism	-4,28
<i>RPI1</i>	RAS protein signal transduction, thiamin biosynthesis	1,39
<i>RRP40</i>	35S primary transcript processing, mRNA catabolism	-1,56
<i>SAE2</i>	meiotic DNA double-strand break processing	2,68
<i>SBP1</i>	RNA metabolism	-1,42
<i>SCT1</i>	phospholipid biosynthesis	-1,55
<i>SDT1</i>	pyrimidine base metabolism	1,97
<i>SEC21</i>	ER to Golgi transport, retrograde (Golgi to ER) transport	1,62
<i>SEC53</i>	protein-ER targeting	1,60
<i>SEC61</i>	SRP-dependent cotranslational membrane targeting, translocation	1,42
<i>SEC63</i>	SRP-dependent cotranslational membrane targeting, translocation	1,41
<i>SET1</i>	chromatin silencing at telomere, histone methylation	-1,37
<i>SET4</i>	unknown	1,52
<i>SIR3</i>	cell aging (sensu <i>Saccharomyces</i>), chromatin silencing, double-strand break repair via nonhomologous end-joining	2,61
<i>SNZ1</i>	pyridoxine metabolism, NOT involved in thiamin biosynthesis	-1,63
<i>SNZ2</i>	* pyridoxine metabolism, thiamin biosynthesis	2,27
<i>SOLA</i>	unknown	-1,54
<i>SPI1</i>	unknown	1,71

Apéndice V: Comparación entre V1 y DOG21 en condiciones fermentativas

<i>SPO7</i>	meiosis, nuclear organization and biogenesis, sporulation (sensu Saccharomyces)	-1,57
<i>SPS19</i>	* fatty acid catabolism, sporulation (sensu Saccharomyces)	-3,41
<i>SPT8</i>	chromatin modification, histone acetylation	-3,38
<i>SRL3</i>	nucleobase, nucleoside, nucleotide and nucleic acid metabolism	1,85
<i>SSA3</i>	SRP-dependent, co-translational membrane targeting, translocation, protein folding, response to stress	2,48
<i>SSA4</i>	SRP-dependent, co-translational membrane targeting, translocation, protein folding, response to stress,	2,50
<i>SSU72</i>	transcription initiation from Pol II promoter	-1,68
<i>STE5</i>	signal transduction during conjugation with cellular fusion	3,07
<i>STL1</i>	transport	-1,65
<i>STR3</i>	methionine biosynthesis	1,86
<i>SUC2</i>	sucrose catabolism	-3,10
<i>SWI4</i>	G1/S transition of mitotic cell cycle, cell cycle, transcription	-1,44
<i>SYT1</i>	secretory pathway	-2,10
<i>TAF1</i>	iron ion homeostasis, iron-siderochrome transport, siderochrome metabolism	3,13
<i>TAT1</i>	amino acid transport	-2,51
<i>TBF1</i>	loss of chromatin silencing	1,73
<i>TFC3</i>	transcription initiation from Pol III promoter	-1,72
<i>TGL1</i>	lipid metabolism	1,53
<i>THI11</i>	thiamin biosynthesis	1,63
<i>THP1</i>	DNA recombination, RNA elongation from Pol II promoter, RNA-nucleus export, bud site selection	1,98
<i>TIF6</i>	processing of 27S pre-rRNA, ribosomal large subunit biogenesis	-1,65
<i>TIM8</i>	mitochondrial translocation	-1,55
<i>TIR1</i>	response to stress	3,22
<i>TIR2</i>	response to stress	1,85
<i>TIR4</i>	unknown	2,41

<i>TPM2</i>	actin filament organization, actin polymerization and/or depolymerization, apical bud growth, establishment of cell polarity (sensu Saccharomyces), exocytosis, isotropic bud growth, mRNA localization, intracellular, mitochondrion inheritance, vacuole inheritance, vesicle-mediated transport	2,08
<i>TPO1</i>	polyamine transport	1,45
<i>TPO2</i>	polyamine transport	2,04
<i>TPO4</i>	polyamine transport	1,93
<i>TRP3</i>	tryptophan biosynthesis	1,39
<i>TRP5</i>	tryptophan biosynthesis	1,68
<i>UAF30</i>	transcription from Pol I promoter	-2,10
<i>UBA1</i>	ubiquitin cycle	-1,89
<i>UBP13</i>	unknown	-1,40
<i>UIP4</i>	unknown	-1,74
<i>ULA1</i>	protein neddylation	1,51
<i>VGR4</i>	N-linked glycosylation, lipid glycosylation, nucleotide-sugar transport	1,46
<i>VMA7</i>	vacuolar acidification	1,47
<i>VPS25</i>	negative regulation of transcription by glucose, protein-vacuolar targeting	2,00
<i>VPS36</i>	negative regulation of transcription by glucose, protein-Golgi retention, protein-vacuolar targeting	-1,36
<i>WWM1</i>	unknown	1,43
<i>YCF1</i>	arsenite transport, bilirubin transport, cadmium ion transport, response to mercury ion	1,36
<i>YEN1</i>	unknown	1,45
<i>YHB1</i>	response to stress	-2,96
<i>YIM1</i>	mitochondrial processing	-1,38
<i>YMR31</i>	* protein biosynthesis	2,02
<i>YPS5</i>	unknown	2,65
<i>YRO2</i>	unknown	2,06

<i>ZIP1</i>	meiosis, synapsis	1,62
<i>ZPR1</i>	regulation of cell cycle	1,42
<i>YDL071C</i>	unknown	5,81
<i>YJR097W</i>	unknown	5,41
<i>YDL118W</i>	unknown	5,16
<i>YPL080C</i>	unknown	5,02
<i>YHR182C-A</i>	unknown	4,90
<i>YFR018C</i>	unknown	4,71
<i>YIR044C</i>	unknown	4,60
<i>YDR015C</i>	unknown	4,48
<i>YNL028W</i>	unknown	4,33
<i>YGR045C</i>	unknown	4,29
<i>YJR071W</i>	unknown	4,17
<i>YKL115C</i>	unknown	4,00
<i>YGR269W</i>	unknown	3,91
<i>YOR385W</i>	unknown	3,90
<i>YHL018W</i>	unknown	3,89
<i>YKL044W</i>	unknown	3,74
<i>YOR366W</i>	unknown	3,56
<i>YPL136W</i>	unknown	3,50
<i>YCL068C</i>	unknown	3,41
<i>YDR521W</i>	unknown	3,39
<i>YJR012C</i>	unknown	3,25
<i>YAL004W</i>	unknown	3,19
<i>YPR197C</i>	unknown	3,09
<i>YNR062C</i>	unknown	3,08
<i>YDL023C</i>	unknown	3,00
<i>YGL211W</i>	unknown	2,99
<i>YHR145C</i>	unknown	2,93

Apéndice V: Comparación entre V1 y DOG21 en condiciones fermentativas

<i>YDR102C</i>	unknown	2,88
<i>YHL037C</i>	unknown	2,86
<i>YIL060W</i>	unknown	2,79
<i>YPR195C</i>	unknown	2,76
<i>YPR039W</i>	unknown	2,67
<i>YKL097C</i>	mitotic chromosome segregation	2,65
<i>YDR010C</i>	unknown	2,65
<i>YLR145W</i>	unknown	2,64
<i>YLR125W</i>	unknown	2,58
<i>YDR466W</i>	unknown	2,54
<i>YIL102C</i>	unknown	2,54
<i>YIL142C-A</i>	unknown	2,52
<i>YOL085C</i>	unknown	2,51
<i>YIL029C</i>	unknown	2,49
<i>YOR376W</i>	unknown	2,44
<i>YGR131W</i>	unknown	2,43
<i>YGR265W</i>	unknown	2,43
<i>YJR013W</i>	GPI anchor biosynthesis	2,42
<i>YMR290W-A</i>	unknown	2,39
<i>YJL120W</i>	unknown	2,37
<i>YGR153W</i>	unknown	2,32
<i>YNR005C</i>	unknown	2,30
<i>YOR199W</i>	unknown	2,30
<i>YKL161C</i>	unknown	2,28
<i>YPR147C</i>	unknown	2,27
<i>YPL205C</i>	unknown	2,25
<i>YDR220C</i>	unknown	2,17
<i>YJR018W</i>	unknown	2,12
<i>YMR135W-A</i>	unknown	2,11

<i>YNR009W</i>	unknown	2,08
<i>YER130C</i>	unknown	2,08
<i>YOL106W</i>	unknown	2,07
<i>YKL036C</i>	unknown	2,06
<i>YOL037C</i>	unknown	2,01
<i>YDL068W</i>	unknown	2,00
<i>YDR366C</i>	unknown	1,99
<i>YKL071W</i>	unknown	1,95
<i>YCR100C</i>	unknown	1,90
<i>YPR021C</i>	transport	1,87
<i>YIL152W</i>	unknown	1,87
<i>YGL117W</i>	unknown	1,87
<i>YDL157C</i>	unknown	1,87
<i>YHR210C</i>	unknown	1,86
<i>YJR111C</i>	unknown	1,86
<i>YER188W</i>	unknown	1,85
<i>YIR035C</i>	unknown	1,83
<i>YMR103C</i>	unknown	1,81
<i>YOL024W</i>	unknown	1,81
<i>YGL239C</i>	unknown	1,79
<i>YDL187C</i>	unknown	1,78
<i>YPL044C</i>	unknown	1,77
<i>YGL218W</i>	unknown	1,77
<i>YPR114W</i>	unknown	1,74
<i>YJR120W</i>	unknown	1,73
<i>YDL032W</i>	unknown	1,70
<i>YGR073C</i>	unknown	1,69
<i>YGR018C</i>	unknown	1,67
<i>YCL048W</i>	unknown	1,64

<i>YJR115W</i>	unknown	1,63
<i>YGR294W</i>	unknown	1,63
<i>YAL048C</i>	vesicle-mediated transport	1,62
<i>YKL215C</i>	unknown	1,61
<i>YGR259C</i>	unknown	1,56
<i>YIR042C</i>	unknown	1,54
<i>YOR135C</i>	unknown	1,54
<i>YLR339C</i>	unknown	1,52
<i>YGR190C</i>	unknown	1,51
<i>YDR230W</i>	unknown	1,50
<i>YGR160W</i>	unknown	1,49
<i>YOR292C</i>	unknown	1,49
<i>YEL067C</i>	unknown	1,48
<i>YNL123W</i>	unknown	1,48
<i>YPL039W</i>	unknown	1,46
<i>YFL067W</i>	unknown	1,45
<i>YGR149W</i>	unknown	1,41
<i>YOR029W</i>	unknown	1,40
<i>YOR345C</i>	unknown	1,39
<i>YIR007W</i>	unknown	1,39
<i>YDR199W</i>	unknown	1,39
<i>YGL046W</i>	unknown	1,38
<i>YPL208W</i>	unknown	1,37
<i>YGR251W</i>	unknown	1,36
<i>YNL179C</i>	unknown	1,36
<i>YCR099C</i>	unknown	1,33
<i>YMR071C</i>	unknown	-1,33
<i>YOR228C</i>	unknown	-1,36
<i>YBR225W</i>	unknown	-1,40

Apéndice V: Comparación entre V1 y DOG21 en condiciones fermentativas

YPR115W	unknown	-1,41
YOL029C	unknown	-1,42
YBR241C	unknown	-1,45
YLR238W	unknown	-1,46
YMR289W	unknown	-1,47
YER077C	unknown	-1,48
YJL049W	unknown	-1,50
YOL101C	unknown	-1,50
YGR205W	unknown	-1,55
YNR048W	unknown	-1,56
YDR278C	unknown	-1,59
YNL033W	unknown	-1,59
YIL130W	unknown	-1,64
YHL026C	unknown	-1,69
YGR043C	unknown	-1,71
YPL277C	unknown	-1,71
YKR075C	unknown	-1,74
YLR446W	unknown	-1,75
YNL274C	metabolism	-1,81
YML083C	unknown	-1,82
YIL012W	unknown	-1,84
YDR533C	unknown	-1,84
YJL147C	unknown	-1,87
YFR043C	unknown	-1,99
YDL124W	unknown	-2,00
YMR067C	unknown	-2,01
YNL144C	unknown	-2,01
YGR243W	unknown	-2,08
YLR225C	unknown	-2,09

YOR389W	unknown	-2,13
YDR070C	unknown	-2,19
YFL012W	unknown	-2,19
YIL174W	unknown	-2,27
YPR150W	unknown	-2,31
YOL114C	unknown	-2,31
YER074W-A	unknown	-2,42
YDR013W	unknown	-2,52
YMR191W	unknown	-2,69
YHL012W	unknown	-2,69
YGR287C	unknown	-3,01
YIL057C	unknown	-3,13
YML131W	unknown	-3,40

APÉNDICE VI

Tablas con los genes con mayor expresión en V1 que en DOG21 en YPD y viceversa.

Tabla A.7-. Ontología de genes ordenados por procesos biológicos con una expresión mayor a 2.5 en V1 con respecto a DOG21 en medio YPD. Se han eliminado todos los genes implicados en procesos biológicos desconocidos y las GO que presentan menos de 5 genes.

ID	Término GO	Genes
6810	Transporte	<i>AGC1, AUA1, BET1, BTN2, COG5, COX19, DAL5, ECM10, END3, FET4, FIT3, GAL2, GAP1, GEM1, GIT1, HXT13, MTH1, ODC2, PMA2, SEC21, SEC53, SEC61, SEC63, SSA3, SSA4, THP1, TPM2, TPO1, TPO2, TPO4, VPS25, YCF1, YJR120W</i>
6519	Proceso metabólico de aminoácidos celulares y derivados	<i>ADH5, ARG1, ARG4, ARG80, CBF1, CHA4, ECM40, FRS2, GAP1, GCV2, GDH1, GDH3, HIS2, HIS4, HOM3, ILV1, LEU2, LEU4, MET13, MET14, MET16, MET17, MET28, MET3, MSW1, MUQ1, PDC5, PDC6, STR3, TRP3, TRP5</i>
16070	Proceso del metabolismo del ARN	<i>ARG80, CBF1, CWC25, CHA4, DHR2, FHL1, FLO8, FRS2, GAT1, HAP1, HIR3, INO2, IRC14, KTI11, MET28, MRC1, MSW1, NCS6, PRR1, RMP1, SIR3, TAF1, TBF1, THP1, VPS25, YGR251W, YPL205C</i>
42221	Respuesta a estímulo químico	<i>AAD10, CBF1, CBK1, CLA4, FUS3, GPB1, HOM3, MET10, MET14, MET16, MET17, MET28, MFA2, NCS6, PRM6, PRM8, PRR1, RKM1, SPI1, STE5, VPS25, YCF1, YDL023C, YIL029C, YJL120W, YKL071W</i>
6350	Transcripción	<i>ARG80, CBF1, CHA4, FHL1, FLO8, GAT1, HAP1, HAP2, HIR3, INO2, IRC14, MET28, MRC1, NRM1, PRR1, SIR3, TAF1, TBF1, THP1, VPS25, YPL205C</i>
6950	Respuesta a estrés	<i>ATG16, DDC1, HOF1, HOR2, HSP30, KRE29, LCD1, MGS1, MRC1, NMA111, PHO4, PSY3, SAE2, SIR3, SSA3, SSA4, THP1, TIR1, TIR2, ZPR1</i>
6996	Organización de organelos	<i>CBF1, CBK1, CLA4, COX19, ECM10, END3, GEM1, GIC2, HIR3, LCD1, MIP1, MRC1, MRPS18, MSW1, SIR3, TBF1, TPM2, YJR120W, ZIP1</i>
7049	Ciclo celular	<i>CBK1, CLA4, DDC1, ECM11, FUS3, GIC2, HIR3, KTI11, LCD1, MCM4, MRC1, REC107, SAE2, TAF1, ZIP1, ZPR1</i>
6464	Proceso de modificación de proteínas	<i>BPL1, CBK1, CDC43, CLA4, CYT2, FUS3, GPI14, JJJ3, KTI11, NCS6, RKM1, STE5, TAF1, ULA1</i>
6259	Proceso del metabolismo de ADN	<i>DDC1, ECM11, IRC14, KRE29, LCD1, MCM4, MGS1, MIP1, MRC1, PSY3, REC107, SAE2, SIR3, THP1</i>
7165	Transducción de señales	<i>CDC43, CLA4, DDC1, FUS3, GIC2, GPB1, LCD1, MFA2, MTH1, PKH3, RPI1, STE5</i>
46483	Proceso del metabolismo de heterociclos	<i>ADE16, ADO1, DAL1, DUR1,2, PDC5, PDC6, RPI1, SDT1, SNZ2, THI11, TRP3, TRP5</i>
6725	Proceso del metabolismo de compuestos aromáticos celulares	<i>ADO1, PDC5, PDC6, RPI1, SDT1, SNZ2, THI11, TRP3, TRP5</i>
5975	Proceso del metabolismo de carbohidratos	<i>ADH5, GAL2, GND2, GPD2, HAP2, HOR2, PDC5</i>
746	Conjugación	<i>CBK1, FUS3, MFA2, PRM6, PRM8, PRR1, STE5</i>
30435	Esporulación	<i>ADE16, END3, FKS3, GPI1, IRC14, SPS22, YPL205C</i>
7047	Organización de la pared celular	<i>ECM11, ECM40, END3, FKS3, GPI1, GPI14, SPS22</i>
16192	Transporte mediado por vesículas	<i>BET1, BTN2, COG5, END3, GEM1, SEC21, TPM2</i>
9653	Morfogénesis	<i>CBK1, CDC43, CLA4, END3, GIC2, THP1, TPM2</i>
6091	Generación de metabolitos precursores y energía	<i>ADE16, ADH5, HAP1, HOR2, PDC5, YJR120W</i>
6412	Traducción	<i>FRS2, HEF3, MRPS18, MSW1, PET494, YMR31</i>
6766	Proceso del metabolismo de vitaminas	<i>ADH5, GND2, GPD2, RPI1, SNZ2, THI11</i>
910	Citocinesis	<i>CLA4, END3, GIC2, HOF1, THP1</i>
6629	Proceso el metabolismo de lípidos	<i>GPI14, INO2, MUQ1, NMA111, TGL1</i>

Tabla A.8-. Ontologías génicas ordenadas por procesos biológicos con una expresión menor a 2.5 en la cepa V1 con respecto DOG21. Los genes con procesos desconocidos han sido eliminados.

ID	Término GO	Genes
6810	Transporte	<i>ATO2, BAP2, CIK1, CTP1, ERF2, GLE1, GNP1, KHA1, MAL11, MAL31, MCH2, MPH2, MUP3, NUP1, ODC1, PHO89, PXA2, STL1, SYT1, TAT1, TIF6, TIM8, TVP18, VPS36, YBR241C, YOS1</i>
16070	Proceso del metabolismo del ARN	<i>ADR1, CAT8, CSR2, DPB3, DPB4, FYV7, IPK1, MCM3, MET18, MGA2, MSL5, MTF2, NOP10, POP5, PRP24, RRP40, SET1, SPT8, SSU72, SWI4, TFC3, TIF6, UAF30, VPS36</i>
6950	Respuesta a estrés	<i>ALO1, ATH1, BNR1, BUR2, CTA1, DAK2, DDR2, DOG2, DPB3, GAD1, HSP12, MAG1, MET18, MGA2, MLH3, MMS21, PRX1, RIM11, SBP1, SET1, YDL124W, YHB1, YIM1, YML131W</i>
5975	Proceso del metabolismo de carbohidratos	<i>ADR1, AMS1, ATH1, CAT8, CHS3, DAK2, DOG1, DOG2, FBP1, FYV10, GDB1, GIP2, GUT1, MAL12, MAL32, PCK1, SOL4, SUC2, YGR287C</i>
42221	Respuesta a estímulo químico	<i>ADR1, ALO1, CRS5, CTA1, CUP1-2, ECM25, ECM4, FAR10, GAD1, HBT1, HSP12, PRX1, RMD8, VPS36, YDL124W, YML131W, YNR048W</i>
6996	Organización de organelos	<i>ACS1, ADR1, BNR1, BUR2, CDC13, CIK1, CLB4, MAM3, MRPL6, MRPS28, NEM1, NUP1, PCL1, PTH1, SET1, SPO7, TIM8</i>
6350	Transcripción	<i>ADR1, BUR2, CAT8, CSR2, DPB3, DPB4, MCM3, MET18, MGA2, SET1, SPT8, SSU72, SWI4, TFC3, UAF30, VPS36</i>
6629	Proceso del metabolismo de lípidos	<i>ETR1, FAA2, IZH4, MGA2, NEM1, POT1, POX1, ROG1, SCT1, SPO7, SPS19</i>
6464	Proceso de modificación de proteínas	<i>ACS1, BUR2, ERF2, FAA2, GIP2, HULA, PNG1, RIM11, SET1, UBA1</i>
6259	Proceso del metabolismo del ADN	<i>CDC13, DPB3, DPB4, MAG1, MCM3, MET18, MLH3, MMS21, PSF1, SET1</i>
7049	Ciclo celular	<i>BUR2, CIK1, CLB4, FAR10, MCM3, MLH3, PCL1, SPO7, SWI4</i>
6091	Generación de metabolitos precursores y energía	<i>ACS1, ETR1, GDB1, GIP2, ISF1, LSC2, MBR1, QCR8</i>
30435	sporulation resulting in formation of a cellular spore	<i>CDA2, CHS3, NEM1, RIM11, SET1, SPO7, SPS19, UBX4</i>
42254	Biogénesis del ribosoma	<i>FYV7, MRPS28, NOP10, NUP1, POP5, RRP40, SSU72, TIF6</i>
6412	Traducción	<i>GLE1, ITT1, MRPL6, MRPS28, MTF2, PET111, PTH1, SBP1</i>
6519	Proceso del metabolismo de aminoácidos celulares y derivados	<i>ABZ2, ARO10, ARO9, ECM4, GAD1, IDP2, MET18</i>
51186	Proceso del metabolismo de cofactores	<i>ABZ2, ACS1, ALD4, ECM4, FOL3, LSC2, SOL4</i>
30163	Proceso del catabolismo de proteína	<i>DOG2, FYV10, PNG1, RIM11, UBX4, VPS36</i>
45333	Respiración celular	<i>ETR1, ISF1, LSC2, MBR1, QCR8</i>
7047	Organización de la pared celular	<i>CDA2, CSR2, CHS3, ECM25, ECM4</i>
46483	Proceso metabólico de heterociclos	<i>ABZ2, ALO1, ARO10, FOL3, SNZ1</i>
6725	Proceso del metabolismo de compuestos aromáticos celulares	<i>ABZ2, ARO10, ARO9, FOL3, YDL124W</i>

Tabla A.9-. Comparación de términos ontológicos. En la casilla V1 vs DOG21 se indica el porcentaje de genes pertenecientes al término de V1 ó DOG21 por el total de genes de ambos. Como umbral de significación estadística se ha decidido utilizar un valor de $p < 0.05$ en el test exacto de Fisher.

Índice	Término	V1 vs DOG21	Valor p	Valor p ajustado
GO proceso biológico a nivel 3	Proceso del metabolismo de compuestos del nitrógeno (GO:0006807)	75.55% 24.45%	0.0006	0.02
GO proceso biológico a nivel 4	Proceso del metabolismo de aminoácidos y derivados (GO:0006519)	79.14% 20.86%	0.0003	0.02
	Proceso del metabolismo de aminas (GO:0009308)	75.3% 24.7%	0.001	0.03
GO proceso biológico a nivel 5	Proceso de la biosíntesis de compuestos del nitrógeno (GO:0044271)	91.03% 8.97%	2,64E-05	0.0036
GO proceso biológico a nivel 6	Proceso de la biosíntesis de aminas (GO:0009309)	90.6% 9.4%	3,30E-05	0.005
	Proceso del metabolismo de aminoácidos (GO:0006520)	77.64% 22.36%	0.0006	0.02
	Proceso del metabolismo de ácidos monocarboxílicos (GO:0032787)	6.06% 93.94%	0.0004	0.02
	Procesos del metabolismo de carbohidratos celulares (GO:0044262)	21.05% 78.95%	0.0006	0.02
GO proceso biológico a nivel 7	Procesos de la biosíntesis de aminoácidos (GO:0008652)	90.48% 9.52%	4,82E-05	0.007
GO componente celular a nivel 3	Unidos a la membrana de organelos (GO:0043227)	43.33% 56.67%	0.002	0.01
GO componente celular a nivel 7	intracellular membrane-bound organelle (GO:0043231)	44.37% 55.63%	0.002	0.02

APÉNDICE VII

Resultados de la comparación de las cepas V1 y DOG21 creciendo en condiciones de respiración. FC viene dada por la expresión en $\text{Log}_2 b$, siendo b el cociente de la expresión en la cepa V1 frente a la de DOG21.

Apéndice VII: Comparación entre V1 y DOG21 en condiciones de respiración

<i>Gene</i>	Biological Process	FC
<i>ACA1</i>	transcription initiation from Pol II promoter	1,70
<i>ADE16</i>	'de novo' IMP biosynthesis, aerobic respiration, sporulation (sensu Saccharomyces)	1,36
<i>ADH5</i>	alcohol metabolism	1,34
<i>AGE1</i>	ER to Golgi transport, intra-Golgi transport	-1,35
<i>ALD3</i>	response to stress	1,97
<i>ALF1</i>	alpha-tubulin folding, post-chaperonin tubulin folding pathway	-1,68
<i>AMD2</i>	Unknown	1,36
<i>ARO10</i>	leucine catabolism, phenylalanine catabolism	-1,84
<i>ARO9</i>	aromatic amino acid family metabolism	-1,34
<i>ASF2</i>	chromatin silencing at HML and HMR (sensu Saccharomyces)	1,89
<i>AVO2</i>	regulation of cell growth	-3,18
<i>AZR1</i>	Transport	-3,70
<i>BCD1</i>	Unknown	-2,18
<i>BET1</i>	ER to Golgi transport, retrograde (Golgi to ER) transport	1,92
<i>BIO2</i>	biotin biosynthesis	1,70
<i>BNS1</i>	Meiosis	1,81
<i>CBF1</i>	DNA replication and chromosome cycle, methionine biosynthesis	2,14
<i>CCC2</i>	copper ion transport, intracellular copper ion transport	-2,05
<i>CCZ1</i>	autophagic vacuole fusion, * autophagy, vacuolar transport	-1,81
<i>CDC19</i>	glycolysis, pyruvate metabolism	1,63
<i>CDC54</i>	DNA replication initiation, DNA unwinding, pre-replicative complex formation and maintenance	1,60
<i>CHA4</i>	amino acid catabolism, regulation of transcription, DNA-dependent	1,72
<i>CIK1</i>	meiosis, mitotic chromosome segregation, mitotic spindle assembly (sensu Saccharomyces), mitotic spindle orientation	1,57

<i>CIT2</i>	citrate metabolism, glutamate biosynthesis, glyoxylate cycle	-1,94
<i>COG5</i>	intra-Golgi transport	1,67
<i>COX19</i>	cytochrome c oxidase biogenesis, metal ion transport	2,02
<i>CPA1</i>	arginine biosynthesis	1,59
<i>CTP1</i>	mitochondrial citrate transport	-1,47
<i>CTR3</i>	copper ion import	-1,66
<i>CYC7</i>	electron transport	1,46
<i>DFR1</i>	folic acid and derivative metabolism	-2,37
<i>DIE2</i>	N-linked glycosylation, oligosaccharide-PP-dolichol assembly	1,98
<i>ECM11</i>	cell wall organization and biogenesis	3,79
<i>EMI1</i>	unknown	-1,37
<i>ERG26</i>	ergosterol biosynthesis	1,67
<i>ERO1</i>	protein folding, protein thiol-disulfide exchange	2,11
<i>ERV1</i>	iron ion homeostasis, mitochondrion organization and biogenesis	2,25
<i>FAT2</i>	transport	3,00
<i>FDH2</i>	formate catabolism	1,50
<i>FET4</i>	intracellular copper ion transport, low affinity iron ion transport	1,46
<i>FIT3</i>	siderochrome transport	5,69
<i>FMC1</i>	protein complex assembly	-1,51
<i>FOL1</i>	folic acid and derivative biosynthesis	1,40
<i>GAP1</i>	amino acid transport	1,52
<i>GAT1</i>	regulation of nitrogen utilization, transcription initiation from Pol II promoter	2,45
<i>GIC2</i>	Rho protein signal transduction, axial budding, establishment of cell polarity (sensu Saccharomyces)	1,33
<i>GIP2</i>	biological_process unknown	1,68
<i>GPB1</i>	signal transduction	1,75
<i>GPD2</i>	glycerol metabolism	1,46

<i>GPG1</i>	signal transduction	1,55
<i>GPH1</i>	glycogen catabolism	2,09
<i>GPI11</i>	GPI anchor biosynthesis	-1,45
<i>GSY1</i>	glycogen metabolism	1,55
<i>HIS4</i>	histidine biosynthesis	1,82
<i>HIS6</i>	histidine biosynthesis	-1,44
<i>HNT2</i>	nucleoside catabolism	-2,20
<i>HSP12</i>	cell adhesion, hyperosmotic response, response to desiccation, response to heat, response to oxidative stress	2,04
<i>HSP150</i>	cell wall organization and biogenesis	1,35
<i>HSP26</i>	protein folding, response to stress	2,63
<i>HXT8</i>	hexose transport	1,43
<i>HXT9</i>	hexose transport	1,45
<i>ILV1</i>	branched chain family amino acid biosynthesis	1,36
<i>INO1</i>	myo-inositol metabolism	1,89
<i>IST3</i>	spliceosome assembly	-1,74
<i>LEU4</i>	leucine biosynthesis	1,47
<i>LEU9</i>	leucine biosynthesis	1,32
<i>MCH5</i>	* transport	2,52
<i>MCM21</i>	chromosome segregation	-1,99
<i>MDJ2</i>	protein folding	1,87
<i>MDM10</i>	mitochondrial genome maintenance, mitochondrion inheritance, mitochondrion organization and biogenesis	1,36
<i>MED11</i>	transcription from Pol II promoter	-2,29
<i>MET17</i>	methionine metabolism	1,80
<i>MGA1</i>	filamentous growth	3,01
<i>MPD1</i>	protein disulfide-isomerase reaction, protein folding	1,52
<i>MPH2</i>	carbohydrate transport	1,94

Apéndice VII: Comparación entre V1 y DOG21 en condiciones de respiración

<i>MRPL16</i>	protein biosynthesis	-1,63
<i>MRPL32</i>	protein biosynthesis	-2,49
<i>MRPL7</i>	protein biosynthesis	1,83
<i>MRPS18</i>	protein biosynthesis	2,15
<i>MSW1</i>	tryptophanyl-tRNA aminoacylation	1,49
<i>NCE101</i>	protein secretion	-1,68
<i>NFT1</i>	transport	-2,38
<i>PCP1</i>	mitochondrial intermembrane space protein import, mitochondrion organization and biogenesis	2,15
<i>PDC6</i>	ethanol metabolism	1,49
<i>PDR12</i>	organic acid transport, propionate metabolism, transport	-1,57
<i>PFD1</i>	cytoskeleton organization and biogenesis, protein folding	-2,28
<i>PHM7</i>	unknown	1,64
<i>PHO4</i>	cellular response to phosphate starvation, phosphate metabolism	2,96
<i>PHO89</i>	phosphate transport	-1,75
<i>PIR3</i>	cell wall organization and biogenesis	1,36
<i>PRC1</i>	vacuolar protein catabolism	1,71
<i>PRM7</i>	conjugation with cellular fusion	1,51
<i>PRP45</i>	positive regulation of transcription from Pol II promoter	1,78
<i>PUT4</i>	neutral amino acid transport	1,37
<i>RAD59</i>	double-strand break repair via break-induced replication, double-strand break repair via single-strand annealing, telomerase-independent telomere maintenance	-3,01
<i>RCK1</i>	protein amino acid phosphorylation, regulation of meiosis	2,92
<i>RNR2</i>	DNA replication	1,33
<i>RNR3</i>	DNA replication	3,26
<i>RPI1</i>	RAS protein signal transduction, thiamin biosynthesis	1,39
<i>RSM10</i>	protein biosynthesis	-1,98

<i>RTG1</i>	protein localization, transcription initiation from Pol II promoter	3,07
<i>SAS5</i>	chromatin silencing at telomere	-1,38
<i>SHE3</i>	mRNA localization, intracellular	1,56
<i>SHG1</i>	histone methylation	-2,33
<i>SHR5</i>	RAS protein signal transduction, protein amino acid palmitoylation, protein localization	2,10
<i>SMC5</i>	DNA repair, cell proliferation	1,91
<i>SNU23</i>	mRNA splicing	-2,37
<i>SNZ2</i>	* pyridoxine metabolism, thiamin biosynthesis	1,96
<i>SPG1</i>	unknown	2,34
<i>SPI1</i>	unknown	1,96
<i>SPS1</i>	protein amino acid phosphorylation, sporulation (sensu Saccharomyces)	1,95
<i>SPS100</i>	spore wall assembly (sensu Saccharomyces)	4,05
<i>SSA3</i>	SRP-dependent, co-translational membrane targeting, translocation, protein folding, response to stress	1,47
<i>STB4</i>	unknown	1,42
<i>STE5</i>	signal transduction during conjugation with cellular fusion	1,40
<i>STT3</i>	N-linked glycosylation	1,34
<i>SUL1</i>	sulfate transport	1,91
<i>TAD2</i>	* tRNA modification	1,45
<i>TAT1</i>	amino acid transport	-1,93
<i>TES1</i>	fatty acid oxidation	1,69
<i>TFS1</i>	regulation of proteolysis and peptidolysis	1,45
<i>TIR3</i>	unknown	3,17
<i>TIR4</i>	unknown	-1,89
<i>TKL2</i>	pentose-phosphate shunt	2,47

<i>TPM2</i>	actin filament organization, actin polymerization and/or depolymerization, apical bud growth, establishment of cell polarity (sensu Saccharomyces), exocytosis, isotropic bud growth, mRNA localization, intracellular, mitochondrion inheritance, vacuole inheritance, vesicle-mediated transport	2,10
<i>TPO1</i>	polyamine transport	1,48
<i>TPO4</i>	polyamine transport	1,51
<i>TPT1</i>	tRNA splicing	-2,86
<i>VHT1</i>	biotin transport	3,73
<i>VMA7</i>	vacuolar acidification	1,86
<i>VPS3</i>	protein-vacuolar targeting	-1,90
<i>WBP1</i>	N-linked glycosylation, cell cycle	1,66
<i>YGP1</i>	response to nutrients, response to stress	1,38
<i>YHB1</i>	response to stress	-2,86
<i>YMC2</i>	transport	-1,38
<i>ZRT1</i>	high-affinity zinc ion transport	2,24
<i>YJR120W</i>	unknown	5,73
<i>YKL044W</i>	unknown	5,18
<i>YBL100C</i>	unknown	4,84
<i>YAL004W</i>	unknown	4,19
<i>YDL118W</i>	unknown	3,92
<i>YPL272C</i>	unknown	3,87
<i>YKL161C</i>	unknown	3,74
<i>YJL120W</i>	unknown	3,46
<i>YNL184C</i>	unknown	3,43
<i>YBR074W</i>	unknown	3,43
<i>YGL211W</i>	unknown	3,03
<i>YDL023C</i>	unknown	2,82

Apéndice VII: Comparación entre V1 y DOG21 en condiciones de respiración

YTR04C	unknown	2,75
YDR220C	unknown	2,64
YJL216C	unknown	2,58
YFL012W	unknown	2,58
YGR131W	unknown	2,54
YNR005C	unknown	2,50
YHL037C	unknown	2,49
YIL142C-A	unknown	2,45
YGR269W	unknown	2,43
YHR182C-A	unknown	2,36
YDR491C	unknown	2,35
YGR052W	unknown	2,30
YJR071W	unknown	2,28
YPL205C	unknown	2,27
YLR125W	unknown	2,23
YHR210C	unknown	2,19
YGR039W	unknown	2,19
YFR022W	unknown	2,18
YGR294W	unknown	2,16
YMR147W	unknown	2,15
YGR079W	unknown	2,12
YHR126C	unknown	2,08
YNL195C	unknown	2,06
YLR030W	unknown	2,04
YJL220W	unknown	2,04
YGL034C	unknown	1,97
YJR012C	unknown	1,94
YJL107C	unknown	1,93

YJR160C	carbohydrate transport	1,90
YGL088W	unknown	1,82
YHR145C	unknown	1,74
YER138C	unknown	1,71
YIR035C	unknown	1,70
YGR160W	unknown	1,69
YGL046W	unknown	1,67
YAL064W-B	unknown	1,66
YMR103C	unknown	1,65
YAL061W	unknown	1,64
YPL277C	unknown	1,64
YAR068W	unknown	1,64
YPI222W	unknown	1,63
YGR154C	unknown	1,60
YDL222C	unknown	1,60
YOL155C	cell wall organization and biogenesis	1,58
YGL218W	unknown	1,56
YGR127W	unknown	1,50
YJL175W	unknown	1,50
YIL029C	unknown	1,49
YOR389W	unknown	1,49
YJL211C	unknown	1,44
YIL172C	unknown	1,43
YJR018W	unknown	1,42
YGL117W	unknown	1,41
YOR175C	unknown	1,40
YOR154W	unknown	1,39
YPR114W	unknown	1,37

YER067W	unknown	1,37
YER160C	unknown	1,37
YMR222C	unknown	1,34
YGR242W	unknown	1,33
YFL044C	unknown	1,32
YNL134C	unknown	1,32
YCR041W	unknown	-1,44
YDR520C	unknown	-1,53
YDR230W	unknown	-1,71
YDR278C	unknown	-1,89
YOL114C	unknown	-2,10
YDR271C	unknown	-2,18
YDR367W	unknown	-2,36
YDR149C	unknown	-2,41
YLR225C	unknown	-2,53
YMR204C	unknown	-2,61
YMR209C	unknown	-2,94

APÉNDICE VIII

Tablas con los genes con mayor expresión en V1 que en DOG21 en medio YPG y vicerversa.

Tabla A.10-. Ontología de genes ordenadas por procesos biológicos con una expresión mayor a 2.5 en la cepa V1 con respecto a DOG21, en medio YPG. Los genes con procesos desconocidos han sido eliminados, así como las ontologías con menos de 5 genes

ID	Termino GO	Genes
6810	Transporte	<i>BET1, CIK1, COG5, COX19, ERV1, FET4, FIT3, GAP1, HXT8, HXT9, MCH5, MDJ2, MDM10, MPH2, MPH3, PCP1, PUT4, SHR5, SSA3, SUL1, TPM2, TPO1, TPO4, VHT1, YJR120W, ZRT1</i>
6519	Proceso del metabolismo de aminoácidos celulares y derivados	<i>ADH5, ALD3, CBF1, CPA1, CHA4, GAP1, GTO1, HIS4, ILV1, LEU4, LEU9, MET17, MSW1, PDC6, PUT4</i>
42221	Respuesta a estímulo químico	<i>CBF1, ERV1, GPB1, HSP12, MET17, NCS6, PRM7, SPI1, SPS100, STE5, YDL023C, YGP1, YIL029C, YJL120W</i>
6996	Organización de organelos	<i>CBF1, CIK1, COX19, ERV1, GIC2, MDJ2, MDM10, MRPL7, MRPS18, MSW1, PCP1, SHE3, TPM2, YJR120W</i>
6464	Procesos de modificación de proteínas	<i>DIE2, ERO1, GIP2, NCS6, OTU1, RCK1, SHR5, SPS1, STE5, STT3, WBP1</i>
16070	Proceso del metabolismo del ARN	<i>ACA1, ASF2, CBF1, CHA4, GAT1, MSW1, NCS6, PRP45, RTG1, TAD2, YPL205C</i>
5975	Proceso del metabolismo de carbohidratos	<i>ADH5, CDC19, DIE2, GIP2, GPD2, GPH1, GSY1, STT3, TKL2, WBP1</i>
6350	Transcripción	<i>ACA1, ASF2, CBF1, CHA4, GAT1, OTU1, PRP45, RTG1, YPL205C</i>
6091	Generación de metabolitos precursores y energía	<i>ADE16, ADH5, CDC19, CYC7, GIP2, GPH1, GSY1, YJR120W</i>
6950	Respuesta a estrés	<i>ALD3, ERV1, HSP12, HSP26, PHO4, SMC5, SSA3, YGP1</i>
7049	Ciclo celular	<i>BNS1, CIK1, ECM11, GIC2, MCM4, RCK1, WBP1</i>
7047	Organización de la pared celular	<i>ECM11, FMP45, HPF1, HSP150, PIR3, SPS1, SPS100</i>
46483	Proceso del metabolismo de heterociclos	<i>ADE16, BIO2, FOL1, PDC6, PUT4, RPI1, SNZ2</i>
51186	Proceso del metabolismo de cofactores	<i>ADH5, BIO2, FOL1, GPD2, GTO1, TKL2</i>
6766	Proceso del metabolismo de vitaminas	<i>ADH5, BIO2, GPD2, RPI1, SNZ2, TKL2</i>
7165	Transducción de señales	<i>GIC2, GPB1, GPG1, RPI1, RTG1, STE5</i>
30435	sporulation resulting in formation of a cellular spore	<i>ADE16, FMP45, SPS1, SPS100, YPL205C</i>

Tabla A.11-. Ontología de genes ordenadas por procesos biológicos con una expresión menor a 2.5 en la cepa V1 con respecto a DOG21, en medio YPG. Los genes con procesos desconocidos han sido eliminados, así como las ontologías con menos de 3 genes.

ID	Términos GO	Genes
6810	Transporte	<i>AGE1, AZR1, CCC2, CCZ1, CTP1, CTR3, IST3, NCE101, NFT1, PDR12, PHO89, TAT1, VPS3, YMC2</i>
6996	Organización de organelos	<i>AVO2, CCZ1, FMC1, INP1, MRPL16, MRPL32, PFD1, RAD59, RSM10, SHG1, VPS3</i>
16070	Proceso del metabolismo de ARN	<i>BCD1, EMU1, IST3, MED11, SAS5, SNU23, TPT1</i>
46483	Proceso del metabolismo de heterociclos	<i>ARO10, DFR1, HNT2, URC2</i>
6519	Proceso del metabolismo de aminoácidos celulares y derivados	<i>ARO10, ARO9, CIT2, HIS6</i>
6725	Proceso del metabolismo de compuestos aromáticos celulares	<i>ARO10, ARO9, DFR1, URC2</i>
6412	Traducción	<i>MRPL16, MRPL32, RSM10</i>

Bibliografía

Aguilera, A. and Gómez-González, B. (2008) Genome instability: a mechanistic view of its causes and consequences. *Nat Rev Genet*, **9**, 204-217.

Aguilera, A. and Klein, H.L. (1993) Chromosome Aberrations in Simpler Eukaryotes. In Kirsch, I.R. (ed.), *The causes and consequences of chromosomal aberrations*. CRC Press, Boca Raton, pp. 51-90.

Ahuatzi, D., Riera, A., Pelaez, R., Herrero, P. and Moreno, F. (2007) Hxk2 regulates the phosphorylation state of Mig1 and therefore its nucleocytoplasmic distribution. *J Biol Chem*, **282**, 4485-4493.

Al-Shahrour, F., Carbonell, J., Mínguez, P., Goetz, S., Conesa, A., Tarraga, J., Medina, I., Alloza, E., Montaner, D. and Dopazo, J. (2008) Babelomics: advanced functional profiling of transcriptomics, proteomics and genomics experiments. *Nucleic Acids Res*, **36**, W341-346.

Attfield, P.V. (1997) Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nat Biotechnol*, **15**, 1351-1357.

Azumi, M. and Goto-Yamamoto, N. (2001) AFLP analysis of type strains and laboratory and industrial strains of *Saccharomyces sensu stricto* and its application to phenetic clustering. *Yeast*, **18**, 1145-1154.

Benítez, T. and Codón, A.C. (1995) Genetic bases of the chromosomal polymorphism of industrial yeasts. *Microbiologia*, **11**, 383-385.

Bhattacharjee, J.K. (1983) *The lysine biosynthesis in Eukaryotes*. Addison Wesley Publishing Co., US.

Bilsland, E., Molin, C., Swaminathan, S., Ramne, A. and Sunnerhagen, P. (2004) Rck1 and Rck2 MAPKAP kinases and the HOG pathway are required for oxidative stress resistance. *Mol Microbiol*, **53**, 1743-1756.

Blom, J., De Mattos, M.J. and Grivell, L.A. (2000) Redirection of the respiro-fermentative flux distribution in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of the transcription factor Hap4p. *Appl Environ Microbiol*, **66**, 1970-1973.

Boer, V.M., Tai, S.L., Vuralhan, Z., Arifin, Y., Walsh, M.C., Piper, M.D., de Winde, J.H., Pronk, J.T. and Daran, J.M. (2007) Transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* to preferred and nonpreferred nitrogen sources in glucose-limited chemostat cultures. *FEMS Yeast Res*, **7**, 604-620.

Bond, U. and Blomberg, A. (2005) Principles and applications of genomics and proteomics in the analysis of industrial yeast strains. In Querol, A. and Fleet, G.H. (eds.), *Yeasts in foods and beverages*. Springer, Berlin ; London, pp. viii, 453 p.

Bradford, M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, **72**, 248-254.

- Braus, G.H. (1991) Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiol Rev*, **55**, 349-370.
- Brons, J.F., De Jong, M., Valens, M., Grivell, L.A., Bolotin-Fukuhara, M. and Blom, J. (2002) Dissection of the promoter of the *HAP4* gene in *S. cerevisiae* unveils a complex regulatory framework of transcriptional regulation. *Yeast*, **19**, 923-932.
- Burrows, S. (1979) Baker's yeast. In Rose, A.H. (ed.), *Economic Microbiology vol4. Microbial biomass*. Academic Press, London, pp. xvii,459p.
- Buschlen, S., Amillet, J.M., Guiard, B., Fournier, A., Marcireau, C. and Bolotin-Fukuhara, M. (2003) The *S. cerevisiae* HAP Complex, a Key Regulator of Mitochondrial Function, Coordinates Nuclear and Mitochondrial Gene Expression. *Comp Funct Genomics*, **4**, 37-46.
- Carlson, M., Celenza, J.L. and Eng, F.J. (1985) Evolution of the dispersed SUC gene family of *Saccharomyces* by rearrangements of chromosome telomeres. *Mol Cell Biol*, **5**, 2894-2902.
- Castrejón, F., Codón, A.C., Cubero, B. and Benítez, T. (2002) Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Syst Appl Microbiol*, **25**, 462-467.
- Cebollero, E. and González, R. (2004) Comparison of two alternative dominant selectable markers for wine yeast transformation. *Appl Environ Microbiol*, **70**, 7018-7023.
- Cerrutti, P., Segovia de Huerdo, M., Galvagno, M., Schebor, C. and del Pilar Buera, 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.
- Codón, A.C. and Benítez, T. (1995) Variability of the physiological features and of the nuclear and mitochondrial genomes of bakers' yeasts. *Syst Appl Microbiol*, **18**, 343-352.
- Codón, A.C., Benítez, T. and Korhola, M. (1997) Chromosomal reorganization during meiosis of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Curr Genet*, **32**, 247-259.
- Codón, A.C., Benítez, T. and Korhola, M. (1998) Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl Microbiol Biotechnol*, **49**, 154-163.
- Codón, A.C., Gasent-Ramírez, J.M. and Benítez, T. (1995) Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 630-638.
- Codón, A.C., Rincón, A.M., Moreno-Mateos, M.A., Delgado-Jarana, J., Rey, M., Limón, C., Rosado, I.V., Cubero, B., Penate, X., Castrejón, F. and Benítez, T. (2003) New *Saccharomyces*

- cerevisiae* baker's yeast displaying enhanced resistance to freezing. *J Agric Food Chem*, **51**, 483-491.
- Crowe, J.H., Crowe, L.M. and Chapman, D. (1984) Preservation of Membranes in Anhydrobiotic Organisms: The Role of Trehalose. *Science*, **223**, 701-703.
- Cherry, J.M., Ball, C., Weng, S., Juvik, G., Schmidt, R., Adler, C., Dunn, B., Dwight, S., Riles, L., Mortimer, R.K. and Botstein, D. (1997) Genetic and physical maps of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*, **387**, 67-73.
- Chung, C.W. and Nickerson, W.J. (1954) Polysaccharide syntheses in growing yeasts. *J Biol Chem*, **208**, 395-407.
- De Winde, J.H., Thevelein, J.M. and Winderickx, J. (1997) From Feast to Famine: Adaptation to Nutrient Depletion in Yeast. In Hohmann, S. and Mager, W.H. (eds.), *Yeast Stress Responses*. Springer, New York, pp. 7-52.
- Dejean, L., Beauvoit, B., Bunoust, O., Guerin, B. and Rigoulet, M. (2002) Activation of Ras cascade increases the mitochondrial enzyme content of respiratory competent yeast. *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 1383-1388.
- Delneri, D., Tomlin, G.C., Wixon, J.L., Hutter, A., Sefton, M., Louis, E.J. and Oliver, S.G. (2000) Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-loxP system. *Gene*, **252**, 127-135.
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R. and Brown, P.O. (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science*, **278**, 680-686.
- Dickinson, J.R., Harrison, S.J. and Hewlins, M.J. (1998) An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **273**, 25751-25756.
- Dickinson, J.R., Lanterman, M.M., Danner, D.J., Pearson, B.M., Sanz, P., Harrison, S.J. and Hewlins, M.J. (1997) A ¹³C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **272**, 26871-26878.
- Dickinson, J.R., Salgado, L.E. and Hewlins, M.J. (2003) The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **278**, 8028-8034.
- Diderich, J.A., Raamsdonk, L.M., Kruckeberg, A.L., Berden, J.A. and Van Dam, K. (2001) Physiological properties of *Saccharomyces cerevisiae* from which hexokinase II has been deleted. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 1587-1593.
- Erkina, T.Y., Tschetter, P.A. and Erkin, A.M. (2008) Different requirements of the SWI/SNF complex for robust nucleosome displacement at promoters of heat shock factor and Msn2- and Msn4-regulated heat shock genes. *Mol Cell Biol*, **28**, 1207-1217.
- Evans, I. (1990) Yeast strains for baking: recent developments. In Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (eds.), *Yeast technology*. Springer, Berlin, p. 407p.

- Fernández-Espinar, M., Martorell, P., de Llanos, R. and Querol, A. (2005) Molecular methods to identify and characterize yeasts in foods and beverages. In Querol, A. and Fleet, G.H. (eds.), *Yeasts in foods and beverages*. Springer, Berlin ; London, pp. viii, 453 p.
- Forsburg, S.L. and Guarente, L. (1988) Mutational analysis of upstream activation sequence 2 of the *CYC1* gene of *Saccharomyces cerevisiae*: a *HAP2-HAP3*-responsive site. *Mol Cell Biol*, **8**, 647-654.
- Forsburg, S.L. and Guarente, L. (1989) Identification and characterization of *HAP4*: a third component of the CCAAT-bound *HAP2/HAP3* heteromer. *Genes Dev*, **3**, 1166-1178.
- Francois, J., Eraso, P. and Gancedo, C. (1987) Changes in the concentration of cAMP, fructose 2,6-bisphosphate and related metabolites and enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* during growth on glucose. *Eur J Biochem*, **164**, V3-373.
- Francois, J. and Parrou, J.L. (2001) Reserve carbohydrates metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev*, **25**, 125-145.
- Fukuda, K., Asano, K., Ouchi, K. and Takasawa, S. (1992) Feedback-insensitive mutation of 3-deoxy-D-arabino-hepturosonate-7-phosphate synthase caused by a single nucleotide substitution of *ARO4* structural gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **74**, 117-119.
- Fukuda, K., Watanabe, M. and Asano, K. (1990) Altered regulation of aromatic amino acid biosynthesis in *b* phenylethyl-alcohol-overproducing mutantas of sake yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Agricultural and Biological and Chemistry*, **54**, 3151-3156.
- Fukuda, K., Watanabe, M., Asano, K., Ouchi, K. and Takasawa, S. (1991a) Isolation and genetic study of p-fluoro-DL-phenylalanine-resistant mutants overproducing beta-phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **20**, 449-452.
- Fukuda, K., Watanabe, M., Asano, K., Ouchi, K. and Takasawa, S. (1991b) A mutated *ARO4* gene for feedback-resistant DAHP synthase which causes both o-fluoro-DL-phenylalanine resistance and beta-phenethyl-alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **20**, 453-456.
- Gagliano, M., Bauer, F.F. and Pretorius, I.S. (2002) The sensing of nutritional status and the relationship to filamentous growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **2**, 433-470.
- Gancedo, J.M. (1998) Yeast carbon catabolite repression. *Microbiol Mol Biol Rev*, **62**, 334-361.
- Gancedo, J.M. (2008) The early steps of glucose signalling in yeast. *FEMS Microbiol Rev*, **32**, 673-704.
- Gasent-Ramírez, J.M. and Benítez, T. (1997) Lysine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast isolated in continuous culture. *Appl Environ Microbiol*, **63**, 4800-4806.

- Gasent-Ramírez, J.M., Castrejón, F., Querol, A., Ramón, D. and Benítez, T. (1999) Genomic stability of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Syst Appl Microbiol*, **22**, 329-340.
- Gasent-Ramírez, J.M., Codón, A.C. and Benítez, T. (1995) Characterization of genetically transformed *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts able to metabolize melibiose. *Appl Environ Microbiol*, **61**, 2113-2121.
- Gietz, R.D. and Woods, R.A. (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol*, **350**, 87-96.
- Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E.J., Mewes, H.W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S.G. (1996) Life with 6000 genes. *Science*, **274**, 546, 563-547.
- Guarente, L., Lalonde, B., Gifford, P. and Alani, E. (1984) Distinctly regulated tandem upstream activation sites mediate catabolite repression of the *CYC1* gene of *S. cerevisiae*. *Cell*, **36**, 503-511.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J.H. (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res*, **24**, 2519-2524.
- Hahn, S. and Guarente, L. (1988) Yeast *HAP2* and *HAP3*: transcriptional activators in a heteromeric complex. *Science*, **240**, 317-321.
- Hahn, S., Pinkham, J., Wei, R., Miller, R. and Guarente, L. (1988) The *HAP3* regulatory locus of *Saccharomyces cerevisiae* encodes divergent overlapping transcripts. *Mol Cell Biol*, **8**, 655-663.
- Hansen, A. and Schieberle, P. (2005) Generation of aroma compounds during sourdough fermentation: applied and fundamental aspects. *Trends in Food Science and Technology*, **16**, 85-94.
- Haurie, V., Perrot, M., Mini, T., Jenö, P., Sogliocco, F. and Boucherie, H. (2001) The transcriptional activator Cat8p provides a major contribution to the reprogramming of carbon metabolism during the diauxic shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **276**, 76-85.
- Hazelwood, L.A., Daran, J.M., van Maris, A.J., Pronk, J.T. and Dickinson, J.R. (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 2259-2266.
- Hazelwood, L.A., Walsh, M.C., Luttki, M.A., Daran-Lapujade, P., Pronk, J.T. and Daran, J.M. (2009) Identity of the growth-limiting nutrient strongly affects storage carbohydrate accumulation in anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, **75**, 6876-6885.
- He, C. and Klionsky, D.J. (2009) Regulation mechanisms and signaling pathways of autophagy. *Annu Rev Genet*, **43**, 67-93.

- Hedbacker, K. and Carlson, M. (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci*, **13**, 2408-2420.
- Helmstaedt, K., Strittmatter, A., Lipscomb, W.N. and Braus, G.H. (2005) Evolution of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase-encoding genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 9784-9789.
- Hinnebusch, A.G. (2005) Translational regulation of GCN4 and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol*, **59**, 407-450.
- Hudson, C.S. (1910) The Quantitative determination of cane sugar by the use of invertase. *Ind. Eng. Chem.*, **2**, 143-146.
- Infante, J.J., Dombek, K.M., Rebordinos, L., Cantoral, J.M. and Young, E.T. (2003) Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics*, **165**, 1745-1759.
- Iraqui, I., Vissers, S., Cartiaux, M. and Urrestarazu, A. (1998) Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* *ARO8* and *ARO9* genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol Gen Genet*, **257**, 238-248.
- James, T.C., Usher, J., Campbell, S. and Bond, U. (2008) Lager yeasts possess dynamic genomes that undergo rearrangements and gene amplification in response to stress. *Curr Genet*, **53**, 139-152.
- Jiménez, J. and Benítez, T. (1986) Characterization of wine yeast for ethanol production. *Appl Microbiol Biotechnol*, **25**, 150-154.
- Jiménez, J. and Benítez, T. (1988) Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentrations depends on the mitochondrial genome. *Curr Genet*, **13**, 461-469.
- Jorgensen, H., Olsson, L., Ronnow, B. and 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.
- Kaino, T., Tateiwa, T., Mizukami-Murata, S., Shima, J. and Takagi, H. (2008) Self-cloning baker's yeasts that accumulate proline enhance freeze tolerance in doughs. *Appl Environ Microbiol*, **74**, 5845-5849.
- Kelley, R. and Ideker, T. (2009) Genome-wide fitness and expression profiling implicate Mga2 in adaptation to hydrogen peroxide. *PLoS Genet*, **5**, e1000488.
- Keston, A.S. (1956) *Abstracts of papers 129th Meeting, ACS*, 31c.
- Klein, C.J., Olsson, L. and Nielsen, J. (1998) Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of Mig1 in metabolic functions. *Microbiology*, **144** (Pt 1), 13-24.

- Kowkabany, G.N., Binkley, W.W. and Wolfrom, M.L. (1953) Amino acids in cane juice and cane final molasses. *J Agric Food Chem*, **1**, 84-87.
- Kradolfer, P., Niederberger, P. and Hutter, R. (1982) Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of two aromatic aminotransferases. *Arch Microbiol*, **133**, 242-248.
- Krappmann, S., Lipscomb, W.N. and Braus, G.H. (2000) Coevolution of transcriptional and allosteric regulation at the chorismate metabolic branch point of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 13585-13590.
- Lascaris, R., Bussemaker, H.J., Boorsma, A., Piper, M., van der Spek, H., Grivell, L. and Blom, J. (2003) Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol*, **4**, R3.
- Lascaris, R., Piwowarski, J., van der Spek, H., Teixeira de Mattos, J., Grivell, L. and Blom, J. (2004) Overexpression of *HAP4* in glucose-derepressed yeast cells reveals respiratory control of glucose-regulated genes. *Microbiology*, **150**, 929-934.
- Legras, J.L., Merdinoglu, D., Cornuet, J.M. and Karst, F. (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol Ecol*, **16**, 2091-2102.
- Legras, J.L., Ruh, O., Merdinoglu, D. and Karst, F. (2005) Selection of hypervariable microsatellite loci for the characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Int J Food Microbiol*, **102**, 73-83.
- Lehninger, A.L., Cox, M.M. and Nelson, D.L. (1993) *Principles of biochemistry*. Worth, New York.
- Lewin, B. (2000) *Genes VII*. Oxford University Press, Oxford.
- Lillie, S.H. and Pringle, J.R. (1980) Reserve carbohydrate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*: responses to nutrient limitation. *J Bacteriol*, **143**, 1384-1394.
- Livak, K.J. and Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lue, N.F. (2010) Plasticity of telomere maintenance mechanisms in yeast. *Trends Biochem Sci*, **35**, 8-17.
- Lundin, M., Nehlin, J.O. and Ronne, H. (1994) Importance of a flanking AT-rich region in target site recognition by the GC box-binding zinc finger protein MIG1. *Mol Cell Biol*, **14**, 1979-1985.
- Lutfiyya, L.L., Iyer, V.R., DeRisi, J., DeVit, M.J., Brown, P.O. and Johnston, M. (1998) Characterization of three related glucose repressors and genes they regulate in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **150**, 1377-1391.

- Luttik, M.A., Vuralhan, Z., Suir, E., Braus, G.H., Pronk, J.T. and Daran, J.M. (2008) Alleviation of feedback inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* aromatic amino acid biosynthesis: quantification of metabolic impact. *Metab Eng*, **10**, 141-153.
- Mahmud, S.A., Hirasawa, T. and Shimizu, H. (2010) Differential importance of trehalose accumulation in *Saccharomyces cerevisiae* in response to various environmental stresses. *J Biosci Bioeng*, **109**, 262-266.
- Martínez-Force, E. and Benítez, T. (1992) Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. *Current Genetics*, **21**, 191-196.
- Martínez-Force, E. and Benítez, T. (1995) Effects of varying media, temperature, and growth rates on the intracellular concentrations of yeast amino acids. *Biotechnol Prog*, **11**, 386-392.
- McNabb, D.S. and Pinto, I. (2005) Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, **4**, 1829-1839.
- McNabb, D.S., Tseng, K.A. and Guarente, L. (1997) The *Saccharomyces cerevisiae* Hap5p homolog from fission yeast reveals two conserved domains that are essential for assembly of heterotetrameric CCAAT-binding factor. *Mol Cell Biol*, **17**, 7008-7018.
- McNabb, D.S., Xing, Y. and Guarente, L. (1995) Cloning of yeast HAP5: a novel subunit of a heterotrimeric complex required for CCAAT binding. *Genes Dev*, **9**, 47-58.
- Mieczkowski, P.A., Lemoine, F.J. and Petes, T.D. (2006) Recombination between retrotransposons as a source of chromosome rearrangements in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *DNA Repair (Amst)*, **5**, 1010-1020.
- Mortimer, R.K. and Johnston, J.R. (1986) Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*, **113**, 35-43.
- Mumberg, D., Muller, R. and Funk, M. (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene*, **156**, 119-122.
- Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M. and Ashikari, T. (2009) Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res*, **16**, 115-129.
- Nakatogawa, H., Suzuki, K., Kamada, Y. and Ohsumi, Y. (2009) Dynamics and diversity in autophagy mechanisms: lessons from yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol*, **10**, 458-467.
- Natarajan, K., Meyer, M.R., Jackson, B.M., Slade, D., Roberts, C., Hinnebusch, A.G. and Marton, M.J. (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol*, **21**, 4347-4368.
- Naumov, G.I., Naumova, E.S., Lantto, R.A., Louis, E.J. and Korhola, M. (1992) Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes. *Yeast*, **8**, 599-612.

- Nelson, N.J. (1957) Colorimetric analysis of sugars. *Methods Enzymol*, **3**, 85-86.
- Oda, Y. and Tonomura, K. (1993) Sodium chloride enhances the potential leavening ability of yeast in dough. *Food Microbiology*, **10**, 249-254.
- Ohlmeier, S., Kastaniotis, A.J., Hiltunen, J.K. and Bergmann, U. (2004) The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth. *J Biol Chem*, **279**, 3956-3979.
- Ostergaard, S., Walloe, K.O., Gomes, S.G., Olsson, L. and Nielsen, J. (2001) The impact of GAL6, GAL80, and MIG1 on glucose control of the GAL system in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **1**, 47-55.
- Panadero, J., Hernández-López, M.J., Prieto, J.A. and Ráñez-Gil, F. (2007) Overexpression of the calcineurin target *CRZ1* provides freeze tolerance and enhances the fermentative capacity of baker's yeast. *Appl Environ Microbiol*, **73**, 4824-4831.
- Parrou, J.L., Enjalbert, B., Plourde, L., Bauche, A., González, B. and Francois, J. (1999) Dynamic responses of reserve carbohydrate metabolism under carbon and nitrogen limitations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **15**, 191-203.
- Parrou, J.L. and Francois, 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.
- Pinkham, J.L., Olesen, J.T. and Guarente, L.P. (1987) Sequence and nuclear localization of the *Saccharomyces cerevisiae* HAP2 protein, a transcriptional activator. *Mol Cell Biol*, **7**, 578-585.
- Pronk, J.T., Yde Steensma, H. and Van Dijken, J.P. (1996) Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **12**, 1607-1633.
- Pulvirenti, A., Caggia, C., Restuccia, C., Gullo, M. and Guidici, P. (2001) DNA fingerprinting methods used for identification of yeast isolated from Sicilian sourdoughs. *Annals of Microbiology*, **51**, 107-120.
- Querol, A. and Bond, U. (2009) The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol Lett*, **293**, 1-10.
- Raghevendran, V., Patil, K.R., Olsson, L. and Nielsen, J. (2006) Hap4 is not essential for activation of respiration at low specific growth rates in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, **281**, 12308-12314.
- Ramos, C. and Calderón, I.L. (1992) Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl Environ Microbiol*, **58**, 1677-1682.
- Ráñez-Gil, F., Aguilera, J., Codón, A., Rincón, A.M., Estruch, F. and Prieto, J.A. (2003) Baker's yeast: challenges and future prospects. In Winde, J.H.d. (ed.), *Functional genetics of industrial yeasts*. Springer, Berlin ; London, pp. xiv, 367 p.

- Rández-Gil, F., Prieto, J.A. and Sanz, P. (1995) The expression of a specific 2-deoxyglucose-6P phosphatase prevents catabolite repression mediated by 2-deoxyglucose in yeast. *Curr Genet*, **28**, 101-107.
- Ratnakumar, S., Kacherovsky, N., Arms, E. and Young, E.T. (2009) Snf1 controls the activity of *adr1* through dephosphorylation of ser230. *Genetics*, **182**, 735-745.
- Ratnakumar, S. and Tunnacliffe, A. (2006) Intracellular trehalose is neither necessary nor sufficient for desiccation tolerance in yeast. *FEMS Yeast Res*, **6**, 902-913.
- Reed, G. and Nagodawithana, T.W. (1991) *Yeast technology*. Van Nostrand Reinhold, New York.
- Rehm, H.J., Reed, G. and Nagodawithana, T. (1995) *Biotechnology*. VCH, Weinheim ; Cambridge.
- Rincón, A.M., Codón, A.C., Castrejón, F. and Benítez, T. (2001) Improved properties of baker's yeast mutants resistant to 2-deoxy-D-glucose. *Appl Environ Microbiol*, **67**, 4279-4285.
- Roberts, G.G. and Hudson, A.P. (2006) Transcriptome profiling of *Saccharomyces cerevisiae* during a transition from fermentative to glycerol-based respiratory growth reveals extensive metabolic and structural remodeling. *Mol Genet Genomics*, **276**, 170-186.
- Rolland, F., Winderickx, J. and Thevelein, J.M. (2002) Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. *FEMS Yeast Res*, **2**, 183-201.
- Rossell, S., Lindenbergh, A., van der Weijden, C.C., Kruckeberg, A.L., van Eunen, K., Westerhoff, H.V. and Bakker, B.M. (2008) Mixed and diverse metabolic and gene-expression regulation of the glycolytic and fermentative pathways in response to a *HXK2* deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **8**, 155-164.
- Sambrook, J. and Russell, D.W. (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Schnappauf, G., Hartmann, M., Kunzler, M. and Braus, G.H. (1998) The two 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* show different kinetic modes of inhibition. *Arch Microbiol*, **169**, 517-524.
- Schuller, H.J. (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet*, **43**, 139-160.
- Schuurmans, J.M., Boorsma, A., Lascaris, R., Hellingwerf, K.J. and Teixeira de Mattos, M.J. (2008a) Physiological and transcriptional characterization of *Saccharomyces cerevisiae* strains with modified expression of catabolic regulators. *FEMS Yeast Res*, **8**, 26-34.
- Schuurmans, J.M., Rossell, S.L., van Tuijl, A., Bakker, B.M., Hellingwerf, K.J. and Teixeira de Mattos, M.J. (2008b) Effect of *hvk2* deletion and *HAP4* overexpression on fermentative capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **8**, 195-203.

- Sherman, F. (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol*, **350**, 3-41.
- Sherman, F., Fink, G.R., Hicks, J.B. and Cold Spring Harbor Laboratory. (1986) *Laboratory course manual for methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, N.Y.
- Shima, J., Hino, A., Yamada-Iyo, C., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Mori, K. and Takano, H. (1999) Stress tolerance in doughs of *Saccharomyces cerevisiae* trehalase mutants derived from commercial Baker's yeast. *Appl Environ Microbiol*, **65**, 2841-2846.
- Shima, J., Sakata-Tsuda, Y., Suzuki, Y., Nakajima, R., Watanabe, H., Kawamoto, S. and Takano, H. (2003) Disruption of the CAR1 gene encoding arginase enhances freeze tolerance of the commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 715-718.
- Singer, M.A. and Lindquist, S. (1998) Multiple effects of trehalose on protein folding in vitro and in vivo. *Mol Cell*, **1**, 639-648.
- Somogyi, M. (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem*, **195**, 19-23.
- Spencer, J.F.T. and Spencer, D.M. (1997) *Yeasts in natural and artificial habitats*. Springer, Berlin ; London.
- Stebbins, J.L. and Triezenberg, S.J. (2004) Identification, mutational analysis, and coactivator requirements of two distinct transcriptional activation domains of the *Saccharomyces cerevisiae* Hap4 protein. *Eukaryot Cell*, **3**, 339-347.
- Swiegers, J.H., Pretorius, I.S. and Bauer, F.F. (2006) Regulation of respiratory growth by Ras: the glyoxylate cycle mutant, cit2Delta, is suppressed by RAS2. *Curr Genet*, **50**, 161-171.
- Tachibana, C., Yoo, J.Y., Tagne, J.B., Kacherovsky, N., Lee, T.I. and Young, E.T. (2005) Combined global localization analysis and transcriptome data identify genes that are directly coregulated by Adr1 and Cat8. *Mol Cell Biol*, **25**, 2138-2146.
- Tamame, M., Calvo, O., Fernández, F. and Abad, A. (2003) Ingeniería genética de las levaduras del pan. In Arber, W., Cerdá-Olmedo, E., Carbonero, P., Benítez, T., Tamame, M., Ramón, D. and Bobet, R. (eds.), *La ingeniería del pan y del vino*. Real Academia de Ingeniería, Madrid, p. 120.
- Teixeira, M.C., Monteiro, P., Jain, P., Tenreiro, S., Fernandes, A.R., Mira, N.P., Alenquer, M., Freitas, A.T., Oliveira, A.L. and Sa-Correia, I. (2006) The YEASTRACT database: a tool for the analysis of transcription regulatory associations in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, **34**, D446-451.
- Trivedi, N.B., Jacobson, G.K. and Tesch, W. (1986) Bakers' yeast. *CRC Critical reviews in biotechnology*, **24**, 75-109.
- Tsujimoto, Y., Izawa, S. and Inoue, Y. (2000) Cooperative regulation of DOG2, encoding 2-deoxyglucose-6-phosphate phosphatase, by Snf1 kinase and the high-osmolarity glycerol-

- mitogen-activated protein kinase cascade in stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, **182**, 5121-5126.
- Urrestarazu, A., Vissers, S., Iraqui, I. and Grenson, M. (1998) Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. *Mol Gen Genet*, **257**, 230-237.
- Vachova, L., Devaux, F., Kucerova, H., Rivicova, M., Jacq, C. and Palkova, Z. (2004) Sok2p transcription factor is involved in adaptive program relevant for long term survival of *Saccharomyces cerevisiae* colonies. *J Biol Chem*, **279**, 37973-37981.
- van Maris, A.J., Bakker, B.M., Brandt, M., Boorsma, A., Teixeira de Mattos, M.J., Grivell, L.A., Pronk, J.T. and Blom, J. (2001) Modulating the distribution of fluxes among respiration and fermentation by overexpression of *HAP4* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res*, **1**, 139-149.
- Vosti, D.C. and Joslyn, M.A. (1954) Autolysis of Bakers' yeast. *Applied Microbiology*, **2**, 70-78.
- Vrancken, G., de Vuyst, L., Van der Meulen, R., Huys, G., Vandamme, P. and Daniel, H. (2010) Yeast species composition differs between artisan bakery and spontaneous laboratory sourdoughs. *FEMS Yeast Res*, **10**.
- Vuralhan, Z., Luttik, M.A., Tai, S.L., Boer, V.M., Morais, M.A., Schipper, D., Almering, M.J., Kotter, P., Dickinson, J.R., Daran, J.M. and Pronk, J.T. (2005) Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, **71**, 3276-3284.
- Vuralhan, Z., Morais, M.A., Tai, S.L., Piper, M.D. and Pronk, J.T. (2003) Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol*, **69**, 4534-4541.
- Westholm, J.O., Nordberg, N., Muren, E., Ameer, A., Komorowski, J. and Ronne, H. (2008) Combinatorial control of gene expression by the three yeast repressors Mig1, Mig2 and Mig3. *BMC Genomics*, **9**, 601.
- Wieczorke, R., Krampe, S., Weierstall, T., Freidel, K., Hollenberg, C.P. and Boles, E. (1999) Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, **464**, 123-128.
- Xing, Y., Fikes, J.D. and Guarente, L. (1993) Mutations in yeast *HAP2/HAP3* define a hybrid CCAAT box binding domain. *Embo J*, **12**, 4647-4655.
- Xing, Y., Zhang, S., Olesen, J.T., Rich, A. and Guarente, L. (1994) Subunit interaction in the CCAAT-binding heteromeric complex is mediated by a very short alpha-helix in HAP2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **91**, 3009-3013.
- Zaman, S., Lippman, S.I., Zhao, X. and Broach, J.R. (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet*, **42**, 27-81.

Zhang, Q., Ames, J.M., Smith, R.D., Baynes, J.W. and Metz, T.O. (2009) A perspective on the Maillard reaction and the analysis of protein glycation by mass spectrometry: probing the pathogenesis of chronic disease. *J Proteome Res*, **8**, 754-769.

Zhu, X. and Gustafsson, C.M. (2009) Distinct differences in chromatin structure at subtelomeric X and Y' elements in budding yeast. *PLoS One*, **4**, e6363.