



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



**ESTUDIO DE LAS INTERACCIONES DE LA MELATONINA CON
PROTEÍNAS GLUCOLÍTICAS EN SACCHAROMYCES**

Joan Almellones Ferrer

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

Tutora académica: María Jesús Torija Martínez, Doctor en Bioquímica,
Departamento de Bioquímica y Biotecnología, mjesus.torija@urv.cat

En cooperación con: Grupo de Biotecnología Enológica

Supervisoras:

María Jesús Torija Martínez, Doctor en Bioquímica, Departamento de Bioquímica
y Biotecnología, mjesus.torija@urv.cat

Sandra Martín Esteban, Personal predoctoral en formación, Departamento de
Bioquímica y Biotecnología, sandra.martin@urv.cat

Tarragona, Junio 2023

Yo, Joan Almellones Ferrer, con DNI 20860168L, soy conocedor de la guía de prevención de plagio en la URV *Prevención, detección y tratamiento de plagio en la docencia: guía para estudiantes* (aprobada en julio 2017) (<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/queusoferim/formaciocompetencies-nuclears/plagi/>) y afirmo que este TFG no constituye ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, Junio 2023

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, agradecer a mi tutora, Dra. María Jesús Torija, por depositar en mí su confianza, abrirme las puertas de su laboratorio y por guiarme en mis primeros pasos en el mundo de la investigación.

Gracias a Sandra Martín Esteban, por acogerme como su aprendiz, enseñándome todo lo que se puede llegar a saber sobre la melatonina y las levaduras, solucionándome todos los problemas que me surgían en el laboratorio aun estando a más de 15.000 km de distancia.

Gracias a todos los que de una forma u otra me han hecho más fácil la vida en el laboratorio, tanto técnicos, como doctorandos, como estudiantes de máster. La verdad es que da gusto trabajar cuando hay tan buen ambiente.

Gracias también a todos mis amigos, a los de toda la vida y a los que he hecho durante estos cuatro años de carrera. A veces no nos damos cuenta de que para trabajar bien también hay que desconectar.

Agradecer también a Sandra Les Bueno, por aparecer en mi vida. Gracias por creer en mi cuando a veces ni yo mismo lo hacía.

Por último, quiero agradecer a mi familia, a todos los que están y los que estuvieron en algún momento, por ser mi pilar fundamental, pero sobre todo a mis padres y a mi hermana, por hacer posible todo lo que hago siendo siempre mis fans número uno.

ÍNDICE

1. DATOS DEL CENTRO	5
2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE	6
3. INTRODUCCIÓN	7
3.1 Melatonina.....	7
3.2 La melatonina en las levaduras.....	9
3.2.1 Producción de melatonina en levaduras	10
3.2.2 Interacción melatonina proteínas glucolíticas	12
3.2.3 Rol de la melatonina en el metabolismo fermentativo de las levaduras.....	13
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO	17
5. MATERIALES Y MÉTODOS	18
5.1 Cepas de estudio y preparación del inóculo.....	18
5.2 Condiciones de crecimiento	18
5.3 Obtención de muestras	19
5.4 Análisis de proteínas.....	19
5.5 Identificación de proteínas.....	20
6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	21
6.1 Estudio de la unión de la melatonina con las proteínas glucolíticas en fermentaciones a baja temperatura	21
6.2 Efecto de la fuente de carbono en la unión de la melatonina con las proteínas glucolíticas	25
6.3 Identificación de proteínas.....	31
7. CONCLUSIONES	34
8. BIBLIOGRAFÍA	35
9. AUTOEVALUACIÓN	40

1. DATOS DEL CENTRO

El grupo de investigación Biotecnología Enológica, coordinado por María Jesús Torija Martínez, se ubica en el Campus Sescelades de la Universidad Rovira i Virgili, en Tarragona (Cataluña, España). Los miembros del grupo están adscritos al Departamento de Bioquímica y Biotecnología y a la Facultad de Enología.

El grupo estudia los microorganismos implicados en los procesos enológicos, así como las aplicaciones biotecnológicas de estos microorganismos y sus moléculas funcionales. Los principales microorganismos con los que trabaja son las levaduras (tanto *Saccharomyces cerevisiae* como *Non-Saccharomyces*) y las bacterias lácticas (especialmente *Oenococcus oeni*), responsables respectivamente de la fermentación alcohólica y maloláctica de los vinos.

Estudia las características genéticas, fisiológicas y necesidades nutricionales de todos ellos, así como su diversidad de especies y cepas, y las interacciones entre los distintos tipos, todo ello en relación con su papel en estas fermentaciones. Para estos estudios utilizan técnicas bioquímicas y moleculares, incluidas las de biología de sistemas como la genómica, la transcriptómica, la proteómica y la metabolómica. También estudian la biodiversidad de los entornos relacionados con la vinificación utilizando tecnologías de secuenciación de alto rendimiento. Dentro de las aplicaciones de estos microorganismos también se estudia las funciones de algunas moléculas bioactivas que producen, como la melatonina en levaduras.

El grupo ha estudiado la ecología y el potencial biotecnológico de las bacterias lácticas en otros alimentos fermentados, como las aceitunas de mesa, y durante muchos años el grupo tuvo otra línea activa de investigación centrada en las bacterias acéticas y su papel en el vinagre y otros condimentos.

El grupo ha sido reconocido como grupo de investigación de calidad por AGAUR (2021 SGR 00202) de la Generalitat de Catalunya.

2. RESUMEN Y PALABRAS CLAVE

La melatonina es un compuesto bioactivo presente en bebidas fermentadas y sintetizado por las levaduras durante la fermentación alcohólica. Estudios anteriores han demostrado la existencia de interacciones de melatonina con diferentes proteínas glucolíticas. El objetivo de este estudio fue determinar la relación de dichas interacciones con la fase de crecimiento de la levadura y como se ven afectadas dichas interacciones al crecer con diferentes fuentes de carbono. Las proteínas unidas a la melatonina fueron inmunopurificadas por melatonina-IgG-Dynabeads.

La unión de la melatonina con las proteínas glucolíticas durante la fermentación alcohólica está ligada a la fase de crecimiento, iniciándose al final de la fase de latencia, aumentando su intensidad coincidiendo con el final de la fase exponencial e inicio de la fase de estacionaria. Por otro lado, dichas interacciones parecen estar ligadas a la fuente de carbono, más específicamente a la glucosa, siendo la maltosa la fuente de carbono que muestra un perfil de unión diferente al de las otras fuentes de carbono estudiadas. El perfil de bandas observadas suele ser similar, aunque existen pequeñas diferencias en cuanto a intensidad y aparición/ausencia de bandas dependiendo del medio y cepas utilizadas.

Estos resultados refuerzan el papel de la melatonina como molécula señal, relacionada con la fase de crecimiento y la fuente de carbono utilizada. Además, proporciona una nueva perspectiva para entender su papel en la levadura.

Palabras clave: melatonina, levaduras, proteínas glucolíticas, glucosa.

3. INTRODUCCIÓN

3.1 Melatonina

La melatonina (N-acetil-5-triptamina) es una molécula perteneciente a la clase de compuestos llamados indolaminas, que tiene como precursor el triptófano (Tan et al., 2016; Paredes et al., 2009).

En 1958 el investigador Aaron B. Lerner identificó por primera vez la melatonina en la glándula pineal de una vaca (Lerner et al., 1958), a partir de entonces, esta molécula ha sido comúnmente conocida por su importante papel en la regulación del ciclo del sueño en humanos (Paredes et al., 2009).

Desde su descubrimiento, se han observado distintas funciones en las células humanas que sugieren la existencia de receptores específicos. Diferentes estudios han asociado la melatonina con diversas proteínas en mamíferos, como es el caso de las proteínas de la superfamilia GPCR, las sirtuinas o proteínas nucleares como la carleticulina (Daulat et al., 2007; Mayo et al., 2017). Recientemente la melatonina ha ganado importancia, ya que son muchas las investigaciones que afirman que puede servir como terapia contra diversas enfermedades como el cáncer de próstata, trastornos de ansiedad o la fibrosis hepática (Megerian et al., 2022; Repova et al., 2022; San-Miguel et al., 2022).

A día de hoy, se ha documentado que la melatonina tiene propiedades antioxidantes, neuroprotectoras y antiinflamatorias además de estar involucrada en la regulación de la secreción de hormonas y del estado del ánimo (Eghbal et al., 2016; Romero et al., 2014). Por otro lado, numerosos artículos han descrito la presencia de esta molécula en un amplio abanico de organismos, tales como plantas, invertebrados, hongos, y bacterias (Hardeland & Poeggeler, 2003).

3.1.1 Síntesis de la melatonina

La ruta de biosíntesis de la melatonina ha sido descrita en diferentes organismos (Arnao & Hernández-Ruiz, 2015; Axelrod & Weissbach, 1960; Weissbach et al., 1960).

En el caso de los animales, esta ruta empieza con el triptófano, el cual es convertido en melatonina en cuatro pasos enzimáticos consecutivos (Tan et al., 2016). Las plantas, a diferencia de los animales, son capaces de sintetizar triptófano mediante la ruta del ácido siquímico. A pesar de estas diferencias, se cree que en ambos casos las rutas guardan similitud en las últimas etapas (Figura 1). En levaduras todavía no está claro como sucede su síntesis. Solo se ha podido describir un gen que participe en la síntesis de melatonina (Ganguly et al., 2001) aunque existen diferentes estudios que describen posibles rutas de síntesis similares a plantas (Muñiz-Calvo et al., 2019) y pasos alternativos para la producción de diferentes precursores (Dei Cas et al., 2021; Gallardo-Fernández et al., 2022).

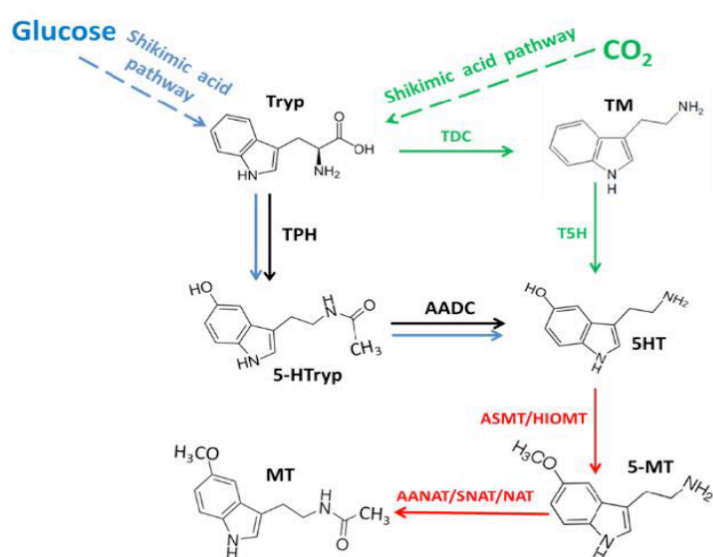


Figura 1. Vías de síntesis hipotéticas de la melatonina en animales (negro), plantas (verde) y levaduras (azul). Pasos comunes en rojo. Abreviaturas: Tryp, triptófano; TM, triptamina; 5-HTryp, 5-hidroxitriptófano; 5HT, serotonina; MT, melatonina; 5-MT, N-acetil serotonina; TDC, triptófano descarboxilasa; TPH, triptófano-5-hidroxilasa; T5H, triptamina-5-hidroxilasa; AADC, aminoácido aromático descarboxilasa; ASMT/HIOMIT, arilalquilamina N-acetiltransferasa; AANAT/SNAT/NAT, N-acetil serotonina O metiltransferasa (Morcillo Parra, 2019)

3.2 La melatonina en las levaduras

En el caso de las levaduras, la presencia de la melatonina se documentó por primera vez en *Sacharomyces cerevisiae*, siendo capaz de sintetizarla cualquier especie, tanto de *Sacharomyces* como de *no-Sacharomyces* (Morcillo Parra, 2019). Desde entonces, numerosos ensayos han estudiado su papel en las levaduras.

Recientemente, se ha descrito su función antioxidante también en levaduras, al ser capaz de aliviar el estrés oxidativo de la levadura generado en la fase estacionaria, reduciendo intracelularmente especies reactivas de oxígeno y peroxidación de lípidos, permitiendo, así, una mejor adaptación al estrés (Vázquez et al., 2017, 2018). Además, se ha observado que la melatonina activa los genes del sistema de defensa antioxidante, aumentando la acumulación de peroxisomas y la actividad de la catalasa cuando se exponen a estrés oxidativo. Por otro lado, también se ha descrito un efecto protector de la melatonina contra radiación UV. La melatonina mejora la viabilidad y el crecimiento de las levaduras después de ser expuestas a un estrés por radiación UV al modificar la expresión génica de genes antioxidantes y de reparación del ADN (Bisquert et al., 2018; Farrugia & Balzan, 2012).

También se ha documentado que la presencia de melatonina puede ayudar a mejorar el rendimiento de la fermentación al reducir la expresión de genes relacionados con las mitocondrias como el complejo de transporte de electrones (Sunyer-Figueres et al., 2020). Por lo tanto, al igual que se describe en humanos, la melatonina en levaduras puede proteger a varias biomoléculas del daño causado por los radicales libres, de forma directa, eliminando especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno (Anisimov et al., 2006; Murch & Erland, 2021; Sprenger et al., 1999) y de forma indirecta, aumentando las actividades de los sistemas de defensa antioxidantes (Vázquez et al., 2017).

Sin embargo, otros roles como el papel que tiene durante la fermentación alcohólica no son del todo conocidos.

3.2.1 Producción de melatonina en levaduras

Diversos estudios han revelado la presencia de la melatonina en diferentes bebidas fermentadas como la cerveza (Kocadağlı et al., 2014) o el vino (Fernández-Cruz et al., 2017; Wang et al., 2016). Cuando se monitorea el proceso de vinificación, *S. cerevisiae* produce melatonina durante el crecimiento de la levadura.

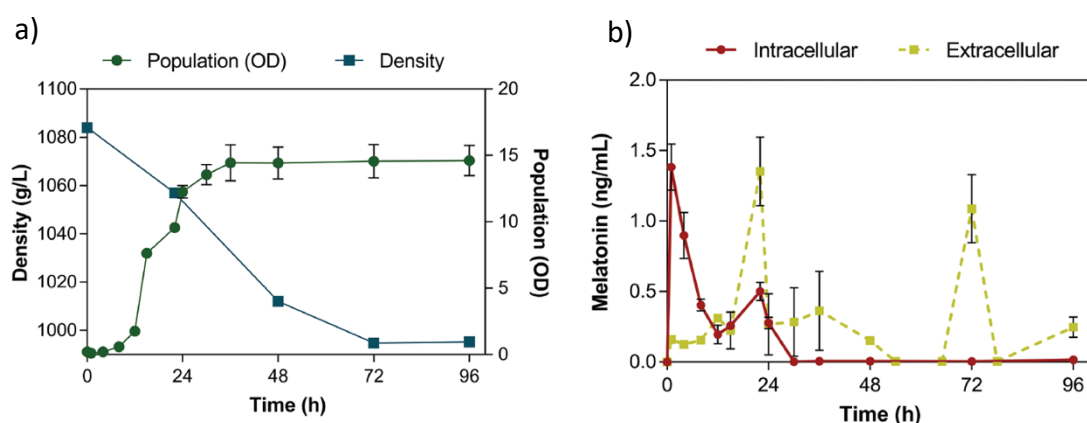


Figura 2. a) Cinética de fermentación de la cepa QA23 de *S. cerevisiae* mediante el seguimiento de la densidad y la población a lo largo de la fermentación. b) Concentraciones de melatonina intra y extracelular durante la fermentación alcohólica realizada por la cepa QA23 (Morcillo-Parra et al., 2019)

Típicamente en levaduras, se ha observado que la melatonina se sintetiza intracelularmente durante las primeras fases del crecimiento (Anisimov et al., 2006; Bisquert et al., 2018; Morcillo-Parra et al., 2019), más específicamente durante la fase de latencia; y es secretada al medio extracelular durante el final de la fase exponencial - principio de la fase estacionaria (Figura 2), aunque puede variar dependiendo de la especie de levadura involucrada en la fermentación (Figura 3).

La síntesis también puede verse influenciada por algunos factores entre los que destacan la disponibilidad de precursores, como el triptófano; o la composición del medio, siendo el azúcar el componente con mayor efecto aparente sobre la síntesis de melatonina, pudiendo estar relacionada su síntesis con la adaptación al medio (Morcillo-Parra, Beltran, et al., 2020a; Rodríguez-Naranjo et al., 2012).

De hecho, como se ha comentado, la acumulación intracelular de melatonina se activa cuando las levaduras se inoculan en el mosto a fermentar (0-6 horas) para ser movilizada posteriormente de forma rápida, lo que parece asociar esta síntesis con una respuesta al estrés y probablemente con cambios de fases de crecimiento de la levadura. Sin embargo, a pesar de esta rápida movilización, la melatonina extracelular no se detecta hasta las 24 h, siendo, además, un pico que desaparece rápidamente y que en algunos casos se repite alrededor de las 48 h (Figura 2) (Morcillo-Parra et al., 2019).

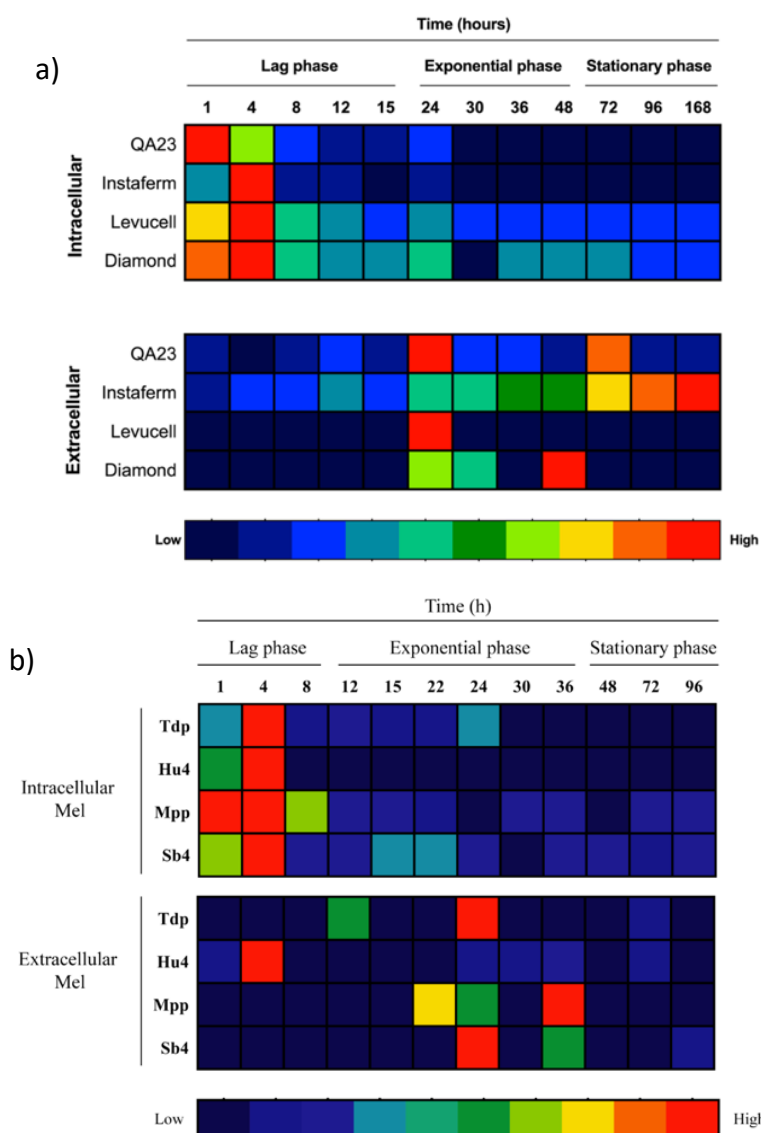


Figura 3. Mapa de calor de la producción de melatonina. a) cepas de *Saccharomyces*: QA23, Instaferm, Leuvucell, Diamond. b) diferentes especies de no-*Saccharomyces*: *Torulaspora delbrueckii* (Tdp), *Hanseniaspora uvarum* (Hu4) *Metschnikowia pulcherrima* (Mpp), *Starmerella bacillaris* (Sb4)(Morcillo Parra, 2019 manuscrito en preparación; Morcillo-Parra et al., 2020b)

3.2.2 Interacción melatonina proteínas glucolíticas

A raíz de los resultados observados durante la síntesis y secreción de la melatonina durante la fermentación alcohólica, se estudió cuál era el destino de la melatonina en el intervalo de tiempo desde que se sintetiza intracelularmente hasta que se detecta en el medio extracelular (Figura 2b). Se observó que, durante este periodo, la melatonina se unía a diferentes proteínas, principalmente enzimas glucolíticas, como la gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, la enolasa y la piruvato quinasa, sugiriendo la presencia de un complejo glucolítico (Figuras 4 y 6) (Morcillo-Parra et al., 2019).

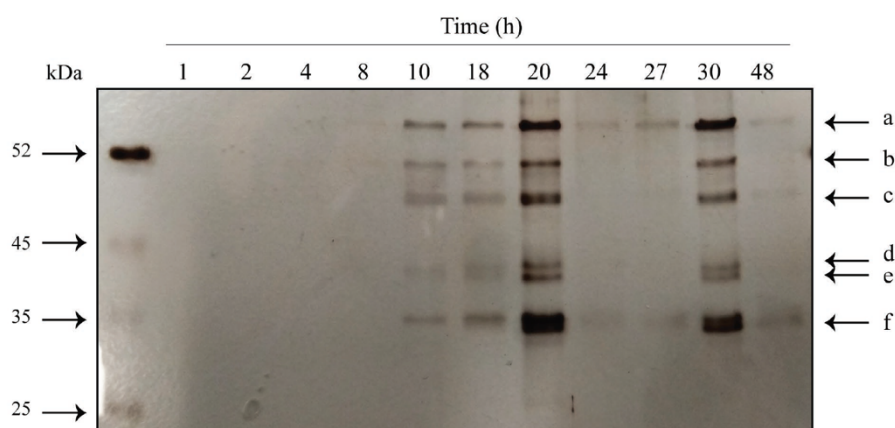


Figura 4. Proteínas unidas a la melatonina durante la fermentación alcohólica de QA23 en mosto sintético, purificadas mediante un anticuerpo anti-melatonina (antimelatonin rabbit IgG polyclonal) y visualizadas en una electroforesis SDS-PAGE. Las bandas marcadas fueron identificadas: a) piruvato quinasa 1, b) factor alfa de elongación, c) enolasa, d) alcohol deshidrogenasa, e) fructosa bifosfato aldolasa, f) gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Morcillo-Parra et al., 2019)

La detección de proteínas unidas a la melatonina estuvo inversamente relacionada con su concentración intracelular, observándose las primeras proteínas unidas a la melatonina a las 10h, y la mayor intensidad de las bandas en el gel coincidían con los puntos de menor concentración de melatonina en el medio intracelular, lo que podría indicar una relación de la síntesis de melatonina con las fases de crecimiento de la levadura durante la fermentación.

3.2.3 Rol de la melatonina en el metabolismo fermentativo de las levaduras

Para entender mejor la interacción melatonina-proteínas glucolíticas observadas durante la fermentación de QA23 en mosto (Figura 4) y estudiar si este comportamiento sucede también en levaduras *no-Saccharomyces* se llevaron a cabo distintas fermentaciones con levaduras *no-Saccharomyces* (*Torulaspota delbrueckii*, *Hanseniaspora uvarum*, *Starmerella bacillaris* y *Metschnikowia pulcherrima*) (Morcillo-Parra, González, et al., 2020b).

Como se ha comentado anteriormente, se detectó melatonina intracelular y extracelularmente en todas las levaduras (Figura 3b), sin embargo, solo se observó unión por parte de la melatonina con las proteínas glucolíticas en *S. bacillaris* y *T. delbrueckii*, cepas con alta capacidad fermentativa. Por otra parte, no se observó esta interacción en *H. uvarum* y *M. pulcherrima*, las cuales presentaban menor capacidad fermentativa y predominio del metabolismo oxidativo (Figura 5).

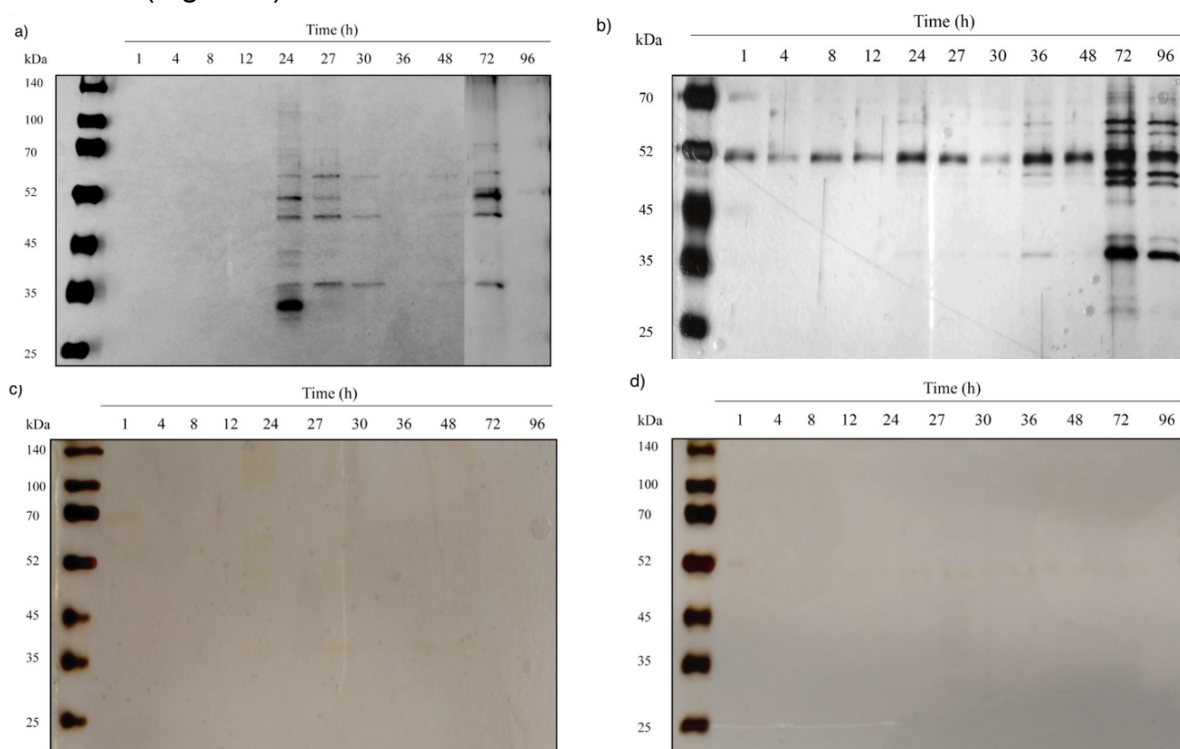


Figura 5. Proteínas unidas a la melatonina durante la fermentación alcohólica con diferentes levaduras *no-Saccharomyces* en mosto sintético, purificadas mediante un anticuerpo anti-melatonina (*antimelatonin rabbit IgG polyclonal*) y visualizadas en una electroforesis SDS-PAGE. a) *T. delbrueckii* b) *S. bacillaris* c) *H. uvarum* d) *M. pulcherrima*. (Morcillo-Parra,2019)

El análisis de secuencia mostró que la mayoría de las proteínas compartían altos niveles de homología con las enzimas glucolíticas ya identificadas en QA23 (Figura 6), pero se identificó una nueva proteína, el factor alfa de elongación, que está relacionado con las mitocondrias. Estos resultados refuerzan el posible papel de la melatonina como molécula señal, probablemente relacionado con el metabolismo fermentativo, aunque se desconoce todavía si como regulador positivo o negativo.

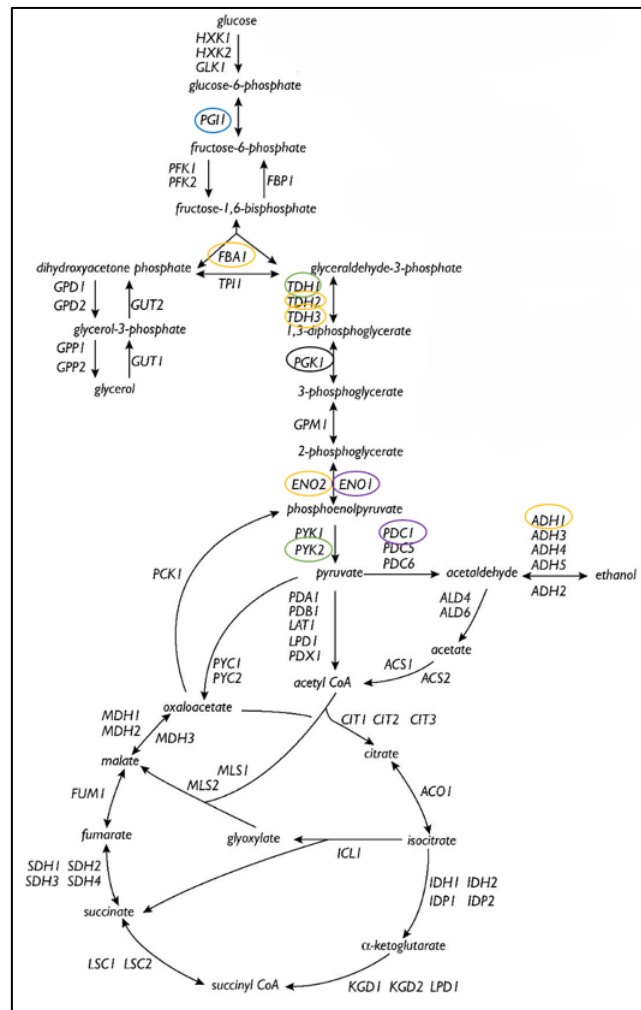


Figura 6. Vía de glucólisis y ciclo de Krebs en *S. cerevisiae*. Marcadas en círculos las diferentes proteínas que se han detectado unidas a la melatonina en diferentes levaduras (*S. cerevisiae* QA23; *St. bacillaris* Sb4; *T. delbrueckii* TdP). En amarillo, proteínas identificadas sólo en QA23; en azul, proteínas identificadas únicamente en Sb4; en morado, proteínas identificadas tanto en QA23 como en Sb4; en negro, proteínas identificadas tanto en TdP como en Sb4; y en verde, proteínas identificadas en las tres levaduras estudiadas (QA23, Sb4 y TdP). Imagen editada de "Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces Cerevisiae," 2004.

Para comprender si dicha unión estaba relacionada con el metabolismo de la levadura, se estudió la síntesis de melatonina y la unión de ésta a proteínas tanto en condiciones fermentativas como respiratorias (Morcillo-Parra et al., manuscrito en preparación), observándose que en condiciones respiratorias, no había unión de la melatonina a proteínas en ninguna de las especies, mientras que esta sí que se observaba en condiciones de fermentación en las levaduras con alta capacidad fermentativa (Figura 7).

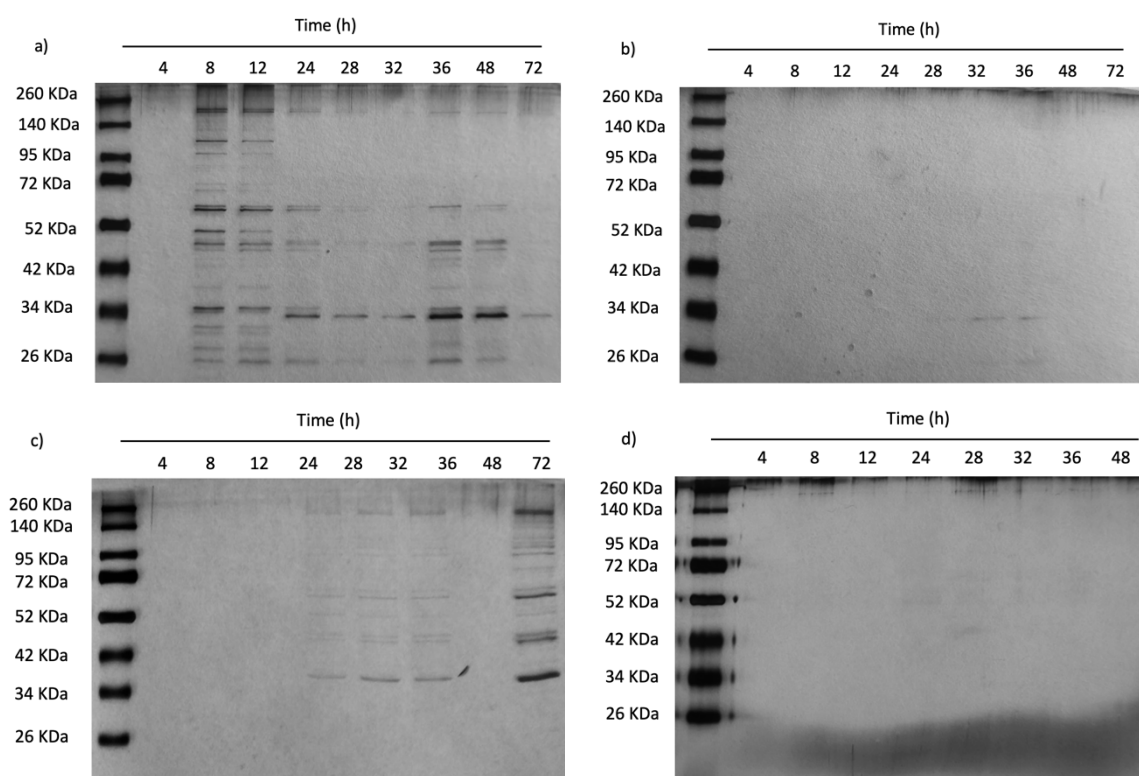


Figura 7. Perfil de proteínas unidas a la melatonina intracelular durante condiciones de fermentación y respiración. a) Fermentación de *S. cerevisiae* b) Respiración de *S. cerevisiae* c) Fermentación de *L. thermotolerans* d) Respiración de *L. thermotolerans*.

Para confirmar estos resultados, se realizaron cambios de metabolismo, haciendo crecer las levaduras en condiciones respiratorias, y posteriormente realizando un pulso de glucosa para pasar a condiciones fermentativas, observándose de nuevo, sólo unión de las proteínas, una vez dado el pulso de glucosa, es decir, en condiciones fermentativas. Estos resultados refuerzan el posible papel de la melatonina como molécula señal, probablemente relacionado con el metabolismo fermentativo.

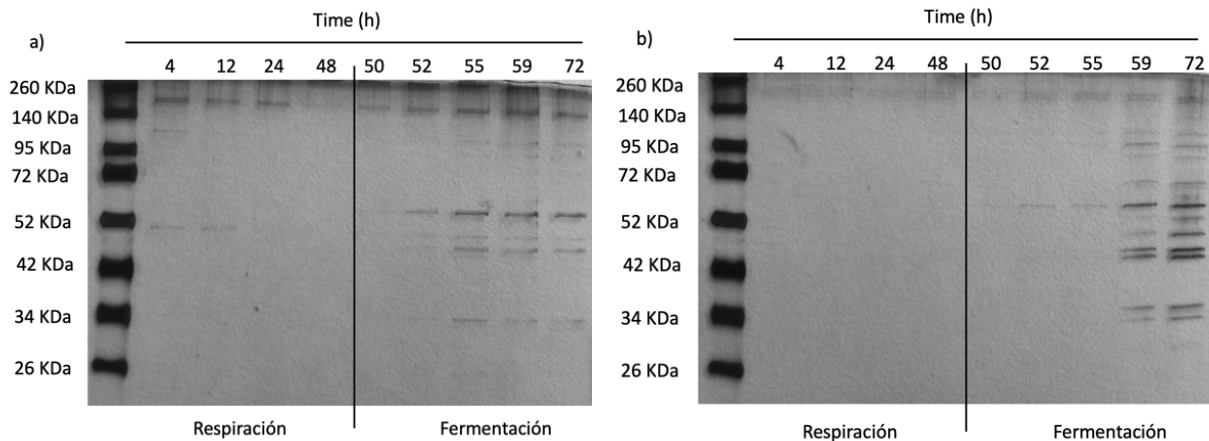


Figura 8. Perfil de proteínas unidas a la melatonina intracelular durante el cambio de metabolismo respiratorio a fermentativo. a) *S. cerevisiae* b) *L. thermotolerans*.

A día de hoy, y a modo resumen, se ha demostrado que:

- La melatonina es sintetizada intracelularmente durante las primeras horas de crecimiento (fase de latencia) y es secretada al medio extracelular durante su fase exponencial - principio de fase estacionaria.
- En el metabolismo fermentativo y durante el tiempo que permanece intracelularmente, la melatonina es capaz de interactuar con proteínas glucolíticas.
- Esta interacción melatonina-proteínas glucolíticas sucede tanto en *Saccharomyces* como en *no-Saccharomyces*.
- Esta interacción melatonina-proteínas glucolíticas puede indicar una función señalizadora, que parece estar relacionada con el metabolismo respiro-fermentativo de la levadura y las fases de crecimiento.

Sin embargo, el porqué de la producción de melatonina durante la fermentación y su papel al interactuar con las proteínas glucolíticas todavía se desconocen.

4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS DEL TRABAJO

Por tanto, la hipótesis de este estudio es ***La interacción de la melatonina con las proteínas glucolíticas durante la fermentación alcohólica está relacionada con la fase de crecimiento de la levadura, y es dependiente de la fuente de carbono utilizada.***

Para resolver dicha hipótesis, se establecen los siguientes objetivos:

- Estudiar la relación de la unión melatonina-proteínas glucolíticas con la fase de crecimiento de la levadura.
- Evaluar el efecto la fuente de carbono utilizada sobre la interacción melatonina-proteínas glucolíticas.

Para ello se han planteado dos experimentos. Por un lado, realizar una fermentación a baja temperatura (16 °C) para ver si el hecho de alargar las diferentes fases de crecimiento de la levadura modifica el perfil de unión de la melatonina a estas proteínas y, por otro lado, utilizar diferentes fuentes de carbono en el medio para determinar si existe alguna relación entre la fuente de carbono y la unión de las proteínas glucolíticas a la melatonina.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Cepas de estudio y preparación del inóculo

Para los ensayos, se utilizó una cepa vínica, *S. cerevisiae*, Lalvin Clos (S. Clos, Lallemand, S.A. (Canadá). Adicionalmente, para el ensayo con maltosa, se utilizaron dos levaduras cerveceras, la cepa ale, SafAle-04 de *S. cerevisiae* y la cepa lager, Saflager W34/70 de *S. pastorianus* (Lallemand).

Se preparó el precultivo en 50 mL de medio YPD (1% (p/v) de extracto de levadura, 2% (p/v) de glucosa y 2% (p/v) de peptona bacteriológica y se agitó toda la noche a 120 rpm y 28°C.

5.2 Condiciones de crecimiento

Fermentación a baja temperatura (16 °C)

Las células de levadura se transfirieron desde el precultivo a un medio mínimo fresco YNB (1X base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni amoníaco (Becton, Dickinson and Company, Sparks, MD, EE. UU.), glucosa al 2 % (p/v) y $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 350 mM (Panreac Química SLU, Barcelona, España)) y se cultivaron durante 3 días a 28°C y 120 rpm.

Posteriormente, se preparó mosto sintético (MS) (Anexo 1) en base a Beltran et al., (2004) con algunas modificaciones: se incrementó la concentración de aminoácidos aromáticos (triptófano, tirosina y fenilalanina) cinco veces en relación con la concentración normal (González et al., 2018). Estos aumentos de las concentraciones de aminoácidos aromáticos se produjeron a expensas de los aminoácidos restantes para mantener la concentración de YAN (nitrógeno asimilable de levadura) a 300 mg/L. Para las fermentaciones, 450 ml de MS se pusieron en botellas de 500 mL estériles y se inocularon con 2×10^6 células/mL a partir del precultivo en YNB. Las fermentaciones se realizaron por triplicado a 16°C con agitación orbital continua (120 rpm).

Medios con diferentes azúcares

Se prepararon medios con diferentes fuentes de carbono, usando como base el medio YPD (1% (p/v) de extracto de levadura, 2% (p/v) de peptona bacteriológica y 2% (p/v) glucosa), y variando el azúcar, 2% (p/v) fructosa (YPF), 2% (p/v) galactosa (YPGal), 2% (p/v) sacarosa (YPS) y 2% (p/v) maltosa (YPM) (Anexo1).

En este caso, se utilizó 450 ml de los diferentes medios, en matraces estériles oscuros de 500 mL, a los que se inoculó 2×10^6 células/mL. Las fermentaciones se realizaron por triplicado a 28 °C con agitación orbital continua (120 rpm).

5.3 Obtención de muestras

El seguimiento de la fermentación se hizo por seguimiento de la densidad (Densímetro portátil Densito 30PX) y el de poblaciones celulares por la densidad óptica (OD 600nm). Se tomaron muestras (10^8 células) en diferentes puntos durante el crecimiento de la levadura para realizar el estudio de la interacción de proteínas y la síntesis intra y extracelular de melatonina.

Las muestras se centrifugaron a 7830 rpm durante 5 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se guardó a -20 °C para el análisis de la melatonina extracelular. El precipitado se lavó con agua mili Q, se centrifugó a 13000 rpm durante 2 min y también se almacenó a -20°C.

5.4 Análisis de proteínas

Las muestras se purificaron mediante Pierce™ Crosslinking Magnetic Kit IP/Co-IP (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Las Melatonina-IgG-Dynabeads se prepararon entrecruzando el anticuerpo IgG de conejo anti-melatonina con las Dynabeads (LifeSpan BioSciences, Seattle, WA, USA). Luego, 10^8 células se resuspendieron en 1 mL de tampón de extracción (25 Tris mM, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM y NP40 al 1%; pH 7,4) y se lisaron con perlas de vidrio, aplicando cinco ciclos de agitación de 30" en Mini Beadbeater-24

(BioSpec Products, Bartlesville, OK, USA) y 30" en hielo. Las células lisadas se centrifugaron a 13000 rpm a 4 °C durante 10 min para eliminar las partículas insolubles. Posteriormente, se añadieron las Melatonina-IgG-Dynabeads a cada lisado y la suspensión se incubó durante 1 h a temperatura ambiente. Las Melatonina-IgG-Dynabeads se recogieron con un imán y se lavaron tres veces con 500 µL de tampón de extracción frío. Las proteínas aisladas se eluyeron de las Melatonina-IgG-Dynabeads y se analizaron por SDS-PAGE al 12%. Las proteínas en el gel se visualizaron mediante el kit Pierce™ Silver Stain (Thermo Fisher Scientific) (Anexos 2 y 3).

5.5 Identificación de proteínas

Algunas bandas de interés (Figuras 10, 15b, 17a) se enviaron a analizar al servicio de Proteómica del Centro de Ciencias Ómicas (COS) de la URV-Eurecat. Para ello, las bandas se recortaron de los geles con una cuchilla estéril y se conservaron en ácido acético 5% hasta su análisis.

6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Estudio de la unión de la melatonina con las proteínas glucolíticas en fermentaciones a baja temperatura

Para entender si la interacción de la melatonina con algunas proteínas glucolíticas está relacionada con la fase de crecimiento de las levaduras, se realizaron fermentaciones a baja temperatura para retrasar el crecimiento de la levadura y prolongar las diferentes fases de crecimiento. Es por ello que ajustamos la temperatura de la fermentación de estudio a 16°C, en comparación con 28°C que era la temperatura control.

En el caso de la fermentación a 16°C, se puede observar como la cepa *S. Clos* alargó su fase de latencia de forma significativa en relación a la fase de latencia a 28 °C, unas 24 h a 16 °C respecto a las 3-6 h observadas en la fermentación a 28 °C (Figura 9).

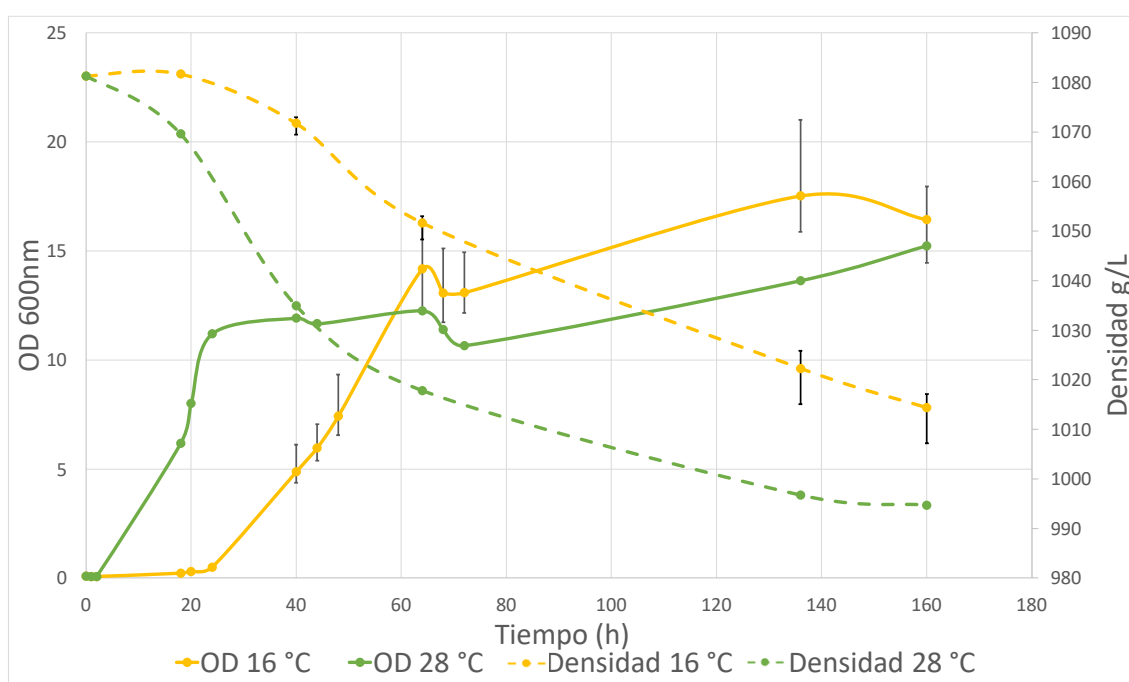


Figura 9. Evolución de la densidad y OD600nm a lo largo de la fermentación de la cepa de levadura *S. Clos* a 16°C y a 28°C.

El efecto de la temperatura también afectó a la duración de la fermentación, ya que, tras 160 h, la fermentación a 28 °C había finalizado, mientras que a 16°C todavía quedaban más de 50 g/L de azúcar por fermentar. El desarrollo de la fermentación a menor temperatura afectó al crecimiento de la levadura, como se ha señalado en otros estudios (Beltran et al., 2008; Torija et al., 2003).

Durante la fermentación a 16 °C, se tomaron varias muestras a lo largo crecimiento de la levadura para analizar si había unión de la melatonina a proteínas. Los resultados obtenidos mostraron unión de la melatonina en todas las muestras analizadas, desde la fase de latencia hasta la fase estacionaria, aunque se observaba distinta intensidad (Figura 10).

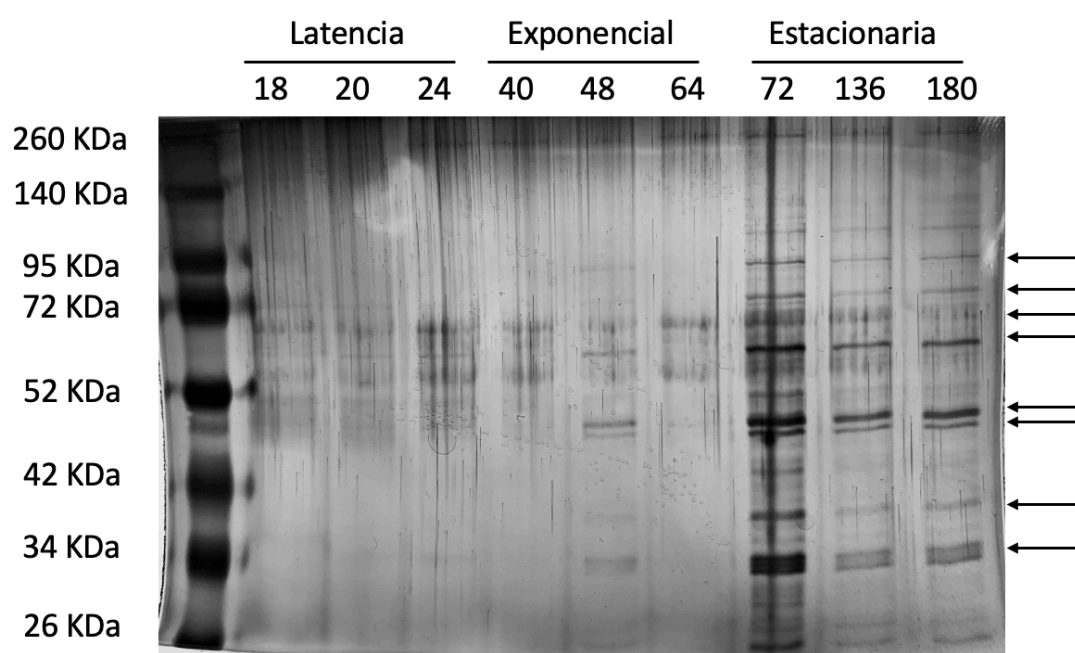


Figura 10. Proteínas unidas a melatonina durante la fermentación alcohólica de *S. Clos* a 16°C, purificadas mediante un anticuerpo anti-melatonina (antimelatonin rabbit IgG polyclonal) y visualizadas en una electroforesis SDS-PAGE. Marcadas con una flecha las proteínas mandadas a identificar.

La intensidad aumenta desde las primeras muestras hasta llegar al punto de mayor intensidad al cabo de 72h, coincidiendo en el momento inicial de la fase estacionaria. En este, se pueden diferenciar hasta 13 bandas diferentes, pudiéndose apreciar gran parte de estas bandas en la mayoría de las muestras analizadas. A partir de aquí, la intensidad disminuye, pero parece mantenerse estable en el tiempo.

Comparando estos resultados con los de QA23 en mosto sintético a 28°C (Figura 4) se observan ciertas similitudes. En ambas se observa una fuerte interacción al llegar a la fase estacionaria, en el caso QA23 a las 30h y en *S. Clos* a las 72h. También se observa interacción desde la fase inicial de latencia.

Durante la fermentación, también se tomaron muestras para el análisis de la concentración de melatonina intra y extracelular, que están pendientes de ser analizadas. El disponer de estos resultados podrá mejorar la comprensión de los resultados para comprobar si también hay un retardo en los “picos” de concentración intra y extracelulares. Previamente en el grupo de investigación, se había realizado un estudio similar, utilizando otra cepa de *S. cerevisiae*, QA23, a 16°C (Figura 11; Morcillo-Parra, 2019). Los resultados de las interacciones melatonina-proteínas en QA23 a 16 °C (Figura 11c) mostraron similitudes con los obtenidos en *S. Clos* a 16°C (Figura 10), intuyéndose interacción de la melatonina desde el final de la fase de latencia, aumentando la intensidad hasta llegar a la fase exponencial.

Además, en este estudio, también se comparó la síntesis de la melatonina intra y extracelular (Figura 11b), y se observó un retraso en la detección de la melatonina extracelular, obteniendo un “pico” extracelular a las 72h, en lugar de a las 24h como a 28°C (Figura 2b).

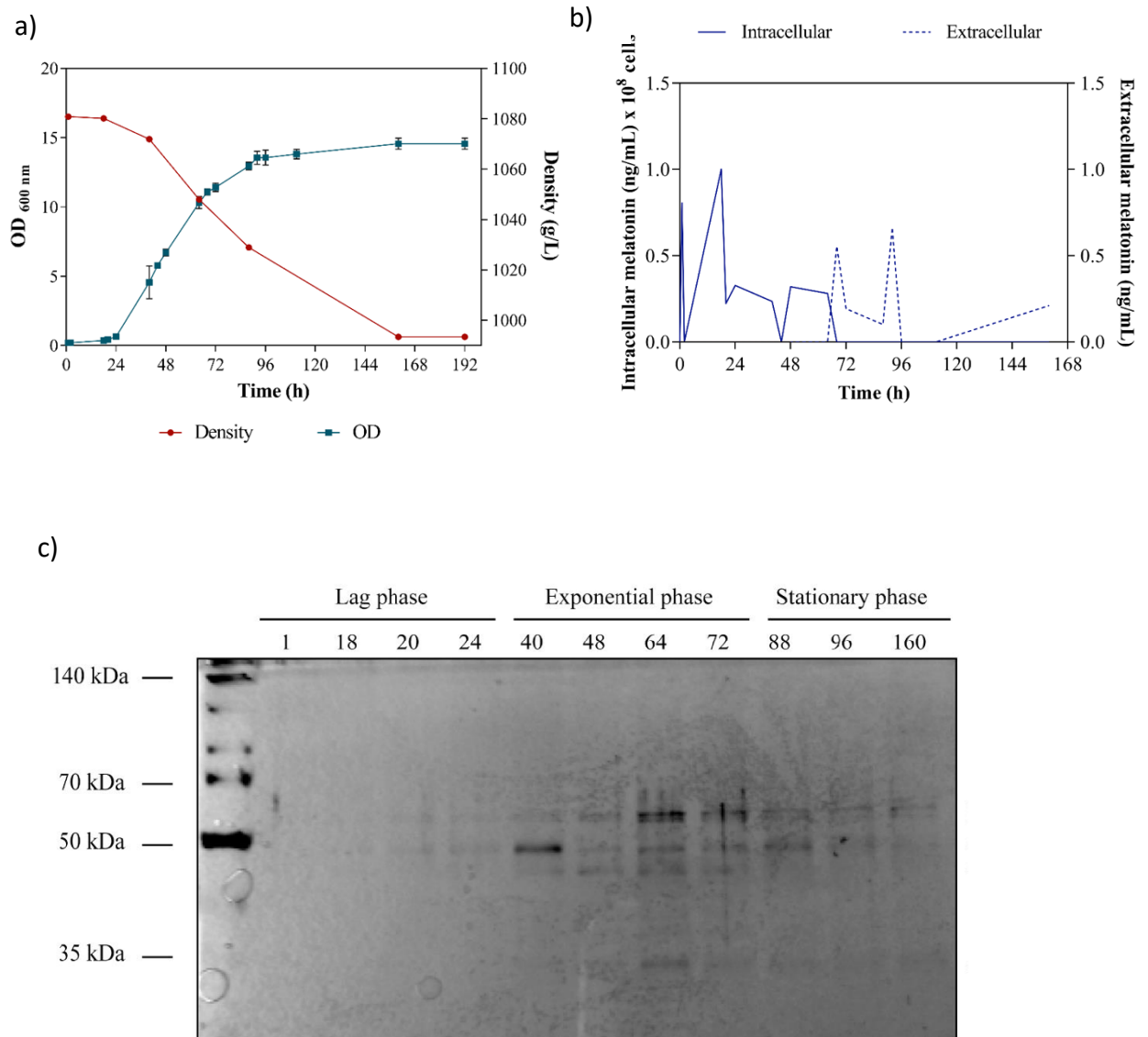


Figura 11. Fermentación de QA23 en mosto sintético a 16°C. a) Evolución de la densidad y OD 600nm, b) Producción de melatonina intra y extracelular, c) Proteínas unidas a melatonina durante la fermentación alcohólica (Morcillo Parra, 2019)

Estos resultados corroboran la relación que tiene la síntesis de la melatonina y su unión con las proteínas glucolíticas con las fases de crecimiento en *Saccharomyces*, empezando la interacción melatonina-proteínas glucolíticas al final de la fase de latencia llegando a su punto más intenso al final de la fase exponencial - inicio de la fase estacionaria.

6.2 Efecto de la fuente de carbono en la unión de la melatonina con las proteínas glucolíticas

Para entender si la síntesis de melatonina y su interacción con algunas proteínas glucolíticas estaba relacionado con la fuente de carbono presente en el medio, se creció la levadura *S. Clos* en medios de cultivo con diferentes azúcares. Inicialmente se testaron monosacáridos como la fructosa y la galactosa, utilizando la glucosa como control.

A nivel de crecimiento, *S. Clos* tuvo una mejor cinética de crecimiento en el medio de cultivo con galactosa como fuente de carbono. Sorprendentemente, las levaduras alcanzaron poblaciones superiores creciendo en este medio que en presencia de glucosa. Incluso el crecimiento también fue algo superior en el medio con fructosa, aunque fue más parecido al obtenido con glucosa (Figura 12).

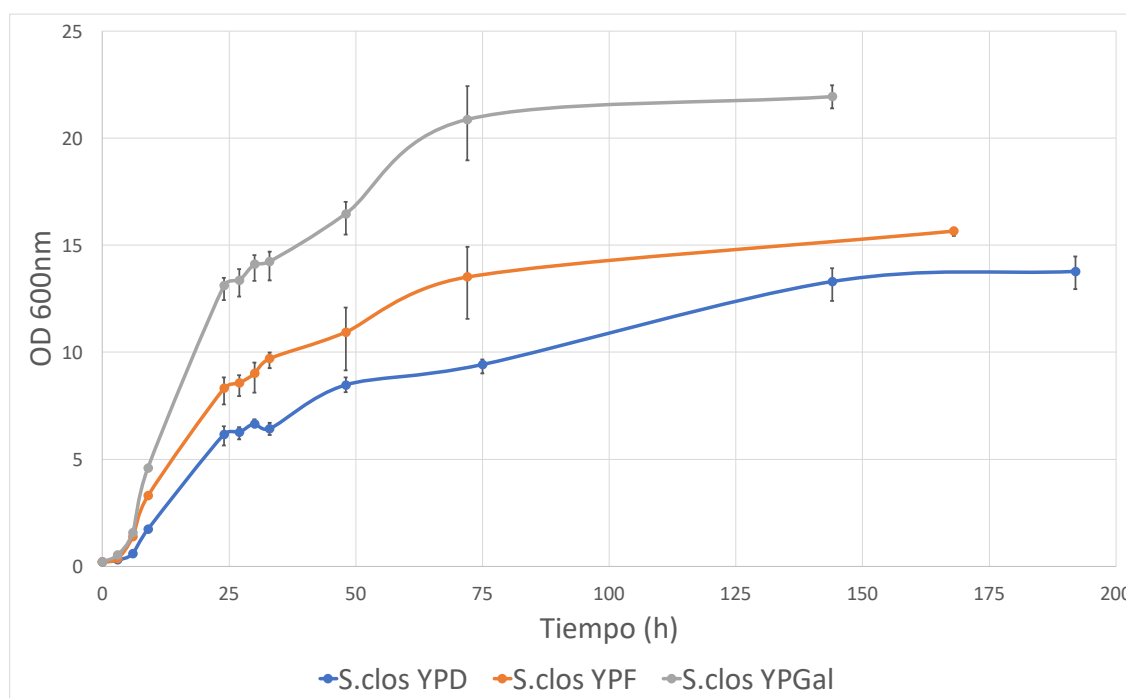


Figura 12. Crecimiento de la cepa *S. Clos* en medios de cultivo con glucosa (YPD), fructosa (YPF) o galactosa (YPGal) como fuente de carbono.

Este comportamiento observado en el medio de cultivo con galactosa podría deberse a la inhibición del efecto Crabtree. El efecto Crabtree se refiere a un fenómeno observado en algunos microorganismos, como las levaduras, en el cual la presencia de glucosa o altas concentraciones de azúcares simples en el medio de cultivo inhibe la respiración aeróbica y estimula la fermentación (Ribéreau-Gayon et al., 2006), incluso en presencia de oxígeno. Sin embargo, en medios con galactosa, por su forma de asimilación, puede no suceder este efecto (Mot et al., 2016; Orlicka-Płocka et al., 2020). En este caso, lo que podría estar pasando sería que, en el medio de cultivo con galactosa, *S. Clos* estaría respirando, al menos parcialmente, explicando así alto crecimiento comparado con los cultivos de fructosa y glucosa.

Por otro lado, las diferentes etapas de crecimiento (latencia, exponencial y estacionaria) coincidieron en el mismo lapso, independientemente de la composición del medio y de la población celular.

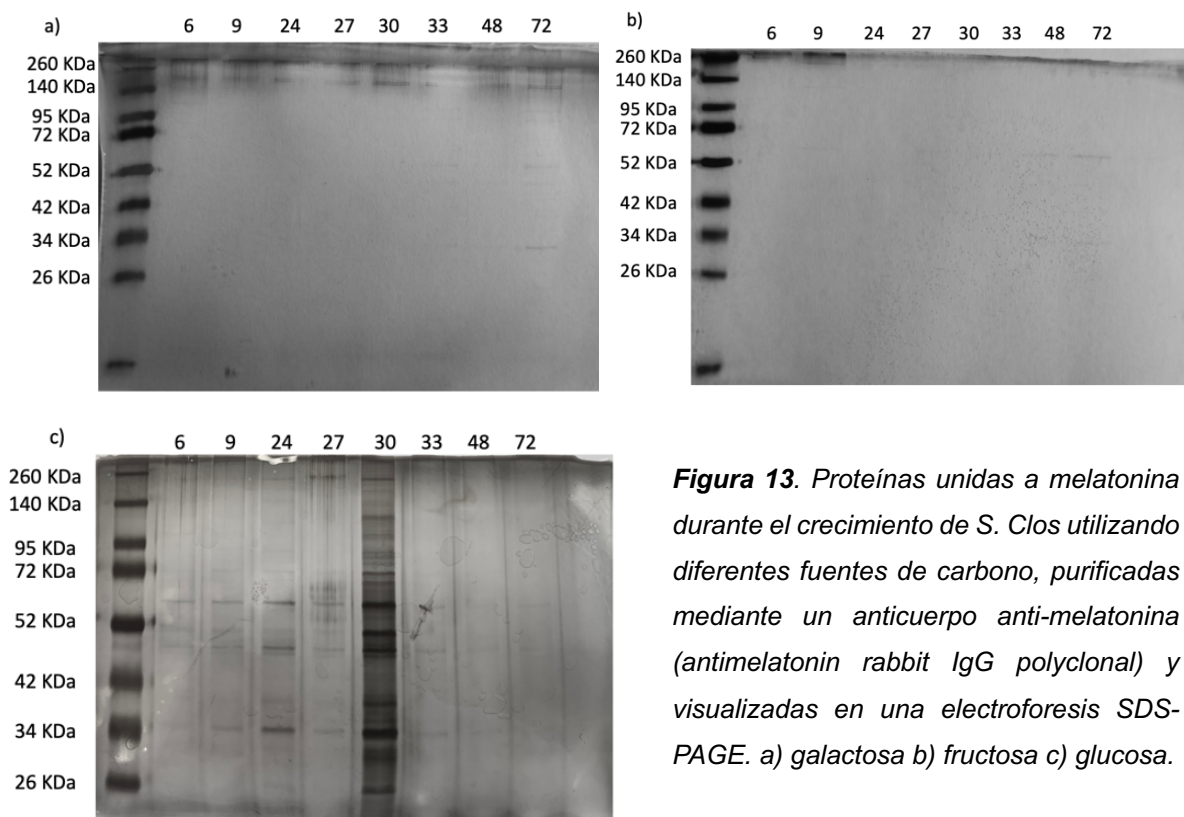


Figura 13. Proteínas unidas a melatonina durante el crecimiento de *S. Clos* utilizando diferentes fuentes de carbono, purificadas mediante un anticuerpo anti-melatonina (*antimelatonin rabbit IgG polyclonal*) y visualizadas en una electroforesis SDS-PAGE. a) galactosa b) fructosa c) glucosa.

Al revelar los resultados en SDS-PAGE después de la inmunoprecipitación, se observó que tanto las muestras procedentes del crecimiento en medio con galactosa como en fructosa no se observaba ninguna interacción de la melatonina con proteína glucolíticas, sin embargo, estas interacciones, sí que se pudieron ver en el medio con glucosa (Figura 12). En el caso de la galactosa, esta falta de interacción podría explicarse debido al posible metabolismo respiratorio, del cual se tiene constancia que no se observa dicha interacción melatonina-proteínas glucolíticas.

Más sorprendente fue el resultado obtenido en la fructosa, ya que era de esperar un resultado similar al obtenido en glucosa, dado su similitud a nivel metabólico. En las muestras de glucosa, tal y como se había observado previamente, se puede observar la interacción es más intensa alrededor de las 30h, siendo las bandas más tenues hasta llegar a ese momento. En el punto de mayor intensidad se llegan a diferenciar hasta 17 bandas distintas de diferentes pesos moleculares, desde 26 kDa hasta 260 kDa. Gran parte de estas bandas se observan también en el resto de las muestras (Figura 12).

Dados los resultados del primer grupo, donde solo se observó interacción en medio con glucosa se decidió observar la interacción de la melatonina en medios donde la composición de azúcares estaba compuesta por moléculas de base glucosídica como la sacarosa, disacárido formado por glucosa-fructosa; y maltosa, disacárido formado por la unión de dos moléculas de glucosa. Al igual que en el ensayo anterior, se midió el crecimiento de la levadura desde el primer momento de inoculación hasta su entrada a la fase estacionaria.

En este caso, comparando los crecimientos en los tres medios se alcanzaron OD finales similares, aunque en sacarosa y maltosa se obtuvieron poblaciones finales mayores que en el medio con glucosa.

El crecimiento en medio con sacarosa tuvo una fase de latencia más larga, sin embargo, una vez empezada la fase exponencial creció más rápido que las demás, siendo con la fuente de carbono que se alcanzó una mayor población final. Por otro lado, el crecimiento en el medio maltosa se inició de forma similar

al medio glucosa, aunque luego el crecimiento se ralentizó, necesitando más días para alcanzar la fase estacionaria.

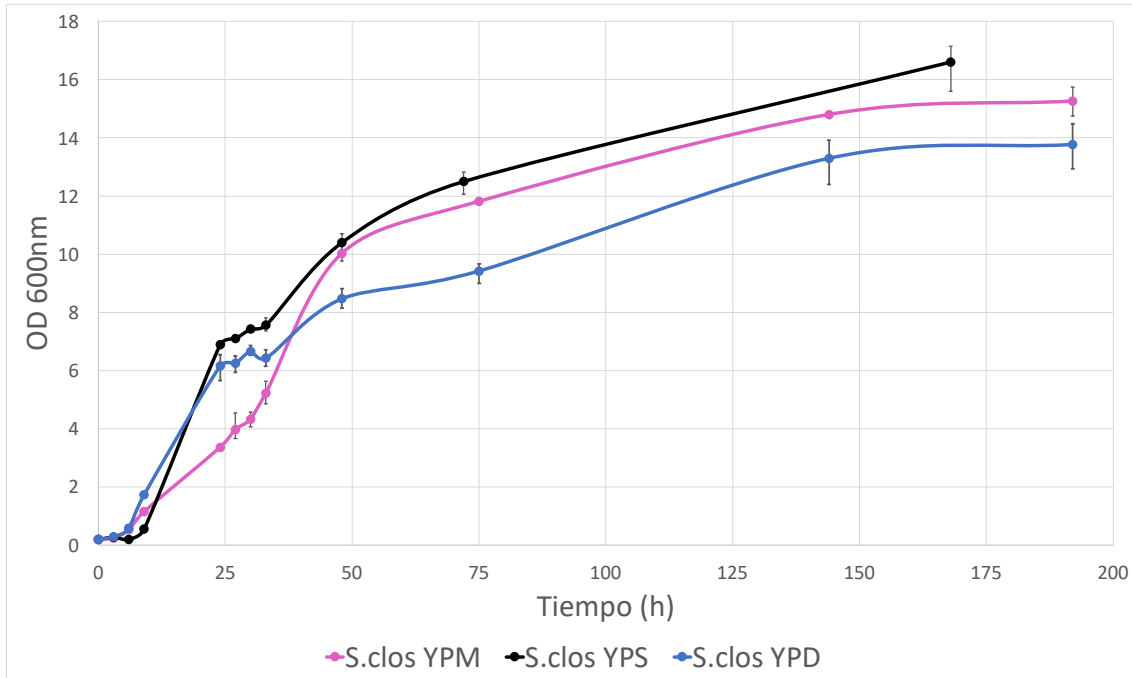


Figura 14. Crecimiento de la cepa *S. Clos* en medios con sacarosa (YPS) y maltosa (YPM) como fuente de carbono, utilizando el medio con glucosa como control (YPD).

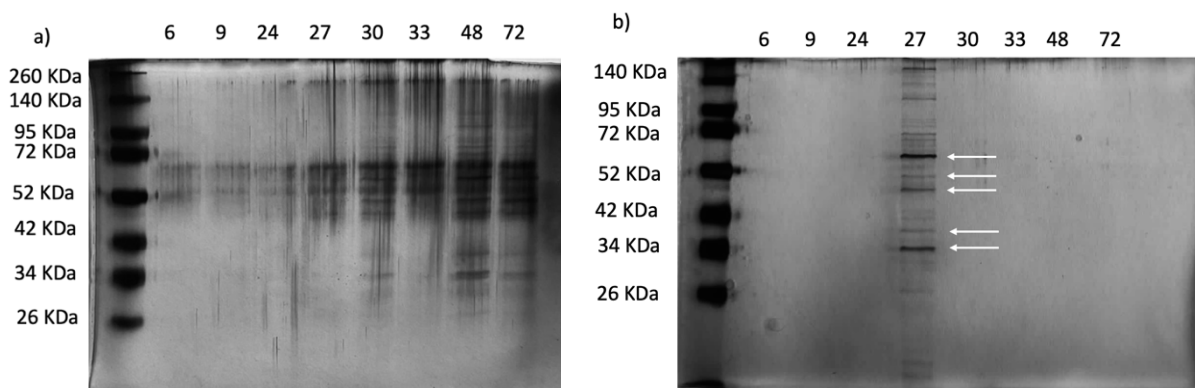


Figura 15. Proteínas unidas a melatonina durante el crecimiento de *S. Clos* utilizando diferentes fuentes de carbono, purificadas mediante un anticuerpo anti-melatonina (antimelatonin rabbit IgG polyclonal) y visualizadas en una electroforesis SDS-PAGE. a) maltosa b) sacarosa. Marcadas con una flecha las proteínas mandadas a identificar.

Los resultados mostraron que el perfil de proteínas obtenido en sacarosa (Figura 15b) fue similar al de glucosa (Figura 12c) observándose un punto de fuerte interacción de la melatonina con proteínas. En este caso, el punto de unión fue a las 27 h (final de la fase exponencial), sin embargo, no se observó más proteínas unidas en ninguna de las muestras restantes. El perfil de las bandas obtenido en este punto coincidía con el observado en glucosa, observándose hasta 16-17 bandas distintas entre 26 y 260kDa.

Por otro lado, los resultados con maltosa fueron algo diferentes, ya que se observó una interacción de la melatonina con proteínas desde las primeras horas (6 h), aumentando la intensidad en el transcurso del crecimiento. Este perfil de interacción recuerda al obtenido en la fermentación de *S. Clos* a 16 °C (Figura 10), esta relación podría deberse al hecho de que en maltosa también crece más lento, alargando las fases de crecimiento.

Comparando el perfil de las bandas obtenidas en esta fuente de carbono, se observan dos bandas claras en las primeras muestras (6, 9, 24, 27h) con pesos entre 50 y 72kDa. A partir de la muestra de 30h, se observan 4 bandas bien definidas alrededor de los 42-72 kDa. En algunas de las muestras se observan más bandas, pero poco definidas.

El perfil de interacción de la melatonina con las proteínas glucolíticas observado en sacarosa se pareció en gran medida al observado en glucosa, sin embargo, los resultados observados en maltosa presentan un comportamiento diferente. Esto puede deberse a que *S. Clos* es una cepa vínica, aislada de fermentaciones alcohólicas de la DOC Priorat (Torija, 2002) y, por tanto, la maltosa no es una fuente de carbono a la que esté habituada, ya que no se encuentra en el mosto. Por tanto, para intentar entender si el perfil observado en *S. Clos* creciendo en maltosa, podía estar relacionado con el hecho de que esta cepa creciera peor en maltosa, se comparó su perfil de crecimiento y la posible unión de la melatonina a las proteínas glucolíticas en dos levaduras cerveceras, concretamente una cepa lager Saflager W34/70 (W34/70) y una cepa ale SafAle04 (S-04).

Comparando el crecimiento de las tres cepas en medio con maltosa, las dos levaduras cerveceras tuvieron un crecimiento similar y más rápido que *S. Clos*. Sin embargo, aunque *S. Clos* creció más lento durante su fase exponencial, logró alcanzar una mayor población final (Figura 16).

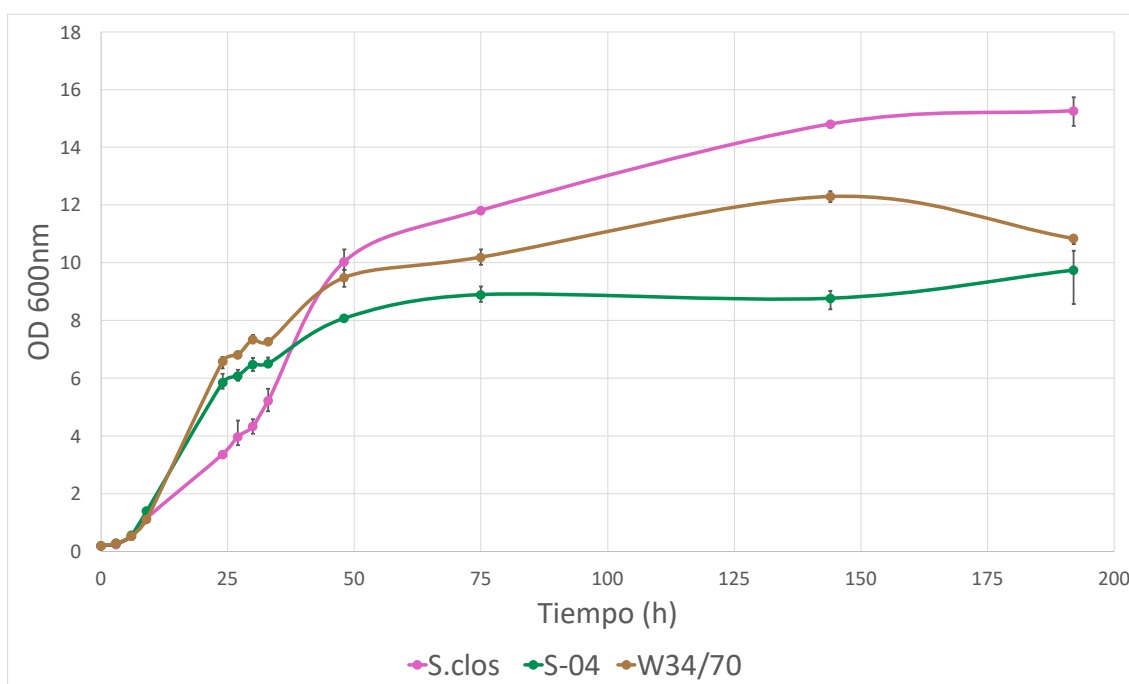


Figura 16. Crecimiento en maltosa como fuente de carbono de tres cepas: dos cepas de *S. cerevisiae*, *S. Clos* y *S-04*, y una cepa *S. pastorianus*, *W34/70*.

Al revelar los resultados en SDS-PAGE después de la inmunoprecipitación, observamos en las cepas cerveceras, un perfil de proteínas similar al visto en *S.Clos* en medio con maltosa (Figura 15a). Vemos una interacción de la melatonina con las proteínas desde las primeras horas (6h). Además, a diferencia de lo observado en las otras fuentes de carbono donde había unión de proteínas con la melatonina, la intensidad de la unión parece bastante homogénea a lo largo del tiempo, aunque se sigue viendo la mayor intensidad a las 30h (final de la fase exponencial) (Figura 17).

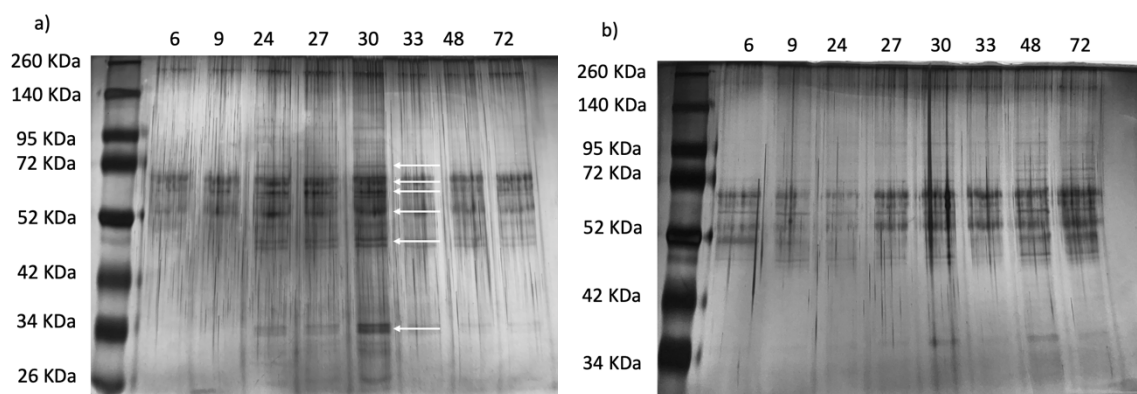


Figura 17. Proteínas unidas a melatonina durante el crecimiento de las levaduras cerveceras en medio maltosa, purificadas mediante un anticuerpo anti-melatonina (*antimelatonin rabbit IgG polyclonal*) y visualizadas en una electroforesis SDS-PAGE. a) W34/70 b) S-04. Marcadas con una flecha las proteínas mandadas a identificar.

Estos resultados demuestran que el comportamiento observado en S. Clos no sucede debido al estrés por crecer en un medio no óptimo, ya que en levaduras cerveceras se repite el comportamiento.

6.3 Identificación de proteínas

Algunas de las bandas se enviaron a identificar al servicio de Proteómica del Centro de Ciencias Ómicas (COS) de la URV-Eurecat, pero todavía no se han recibido los resultados (Figuras 10, 15b, 17a). Sin embargo, por comparación con las bandas ya identificadas en estudios previos podemos hacer una identificación tentativa (Figuras 18, 19, 20) (Morcillo-Parra et al., 2019; Morcillo-Parra, González, et al., 2020).

Los perfiles de bandas de los crecimientos presentan homología con geles de estudios anteriores. Interacciones de la melatonina con proteínas como la piruvato quinasa, el factor de elongación, la enolasa o la triosa fosfato deshidrogenasa 1,2,3 parecen observarse en todos los crecimientos. Sin embargo, otras interacciones como con la fosfoglicerato quinasa o la alcohol deshidrogenasa no. Estas diferencias en las interacciones y las distintas intensidades en estas podrían estar ligadas a la cepa utilizada o al medio de cultivo empleado.

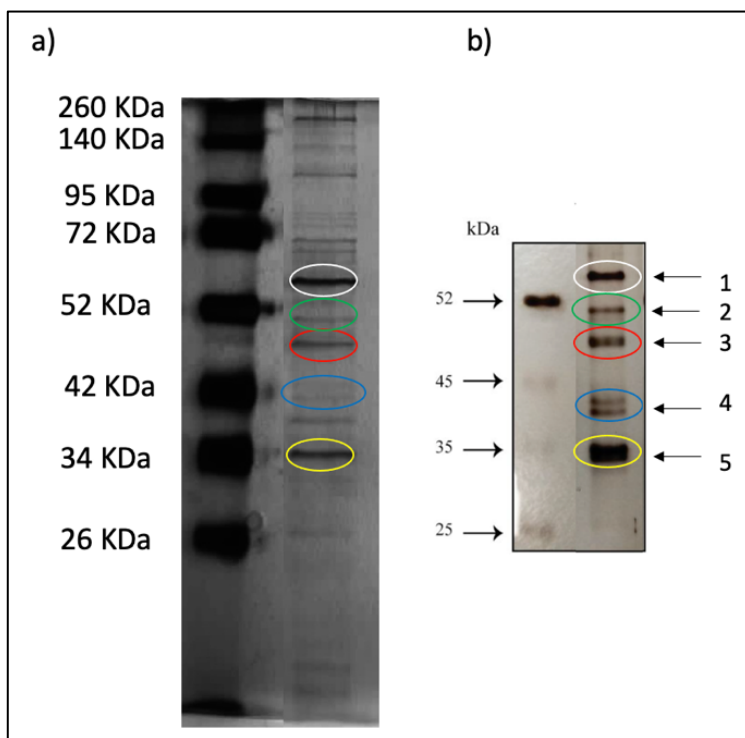


Figura 18. Comparación de bandas. a) *S. Clos* YPS (Figura 15b) b) QA23 mosto sintético. Purificadas mediante un anticuerpo anti-melatonina (antimelatonin rabbit IgG polyclonal) y visualizadas en una electroforesis SDS-PAGE. Las bandas marcadas con el mismo color representan posible homología. Las bandas marcadas son proteínas unidas a la melatonina: 1) piruvato quinasa 2) factor de elongación 3) enolasa 4) fructosa bifosfato aldosa y alcohol deshidrogenasa 5) triosa fosfato deshidrogenasa 1, 2 y 3 (Morcillo-Parra et al., 2019)

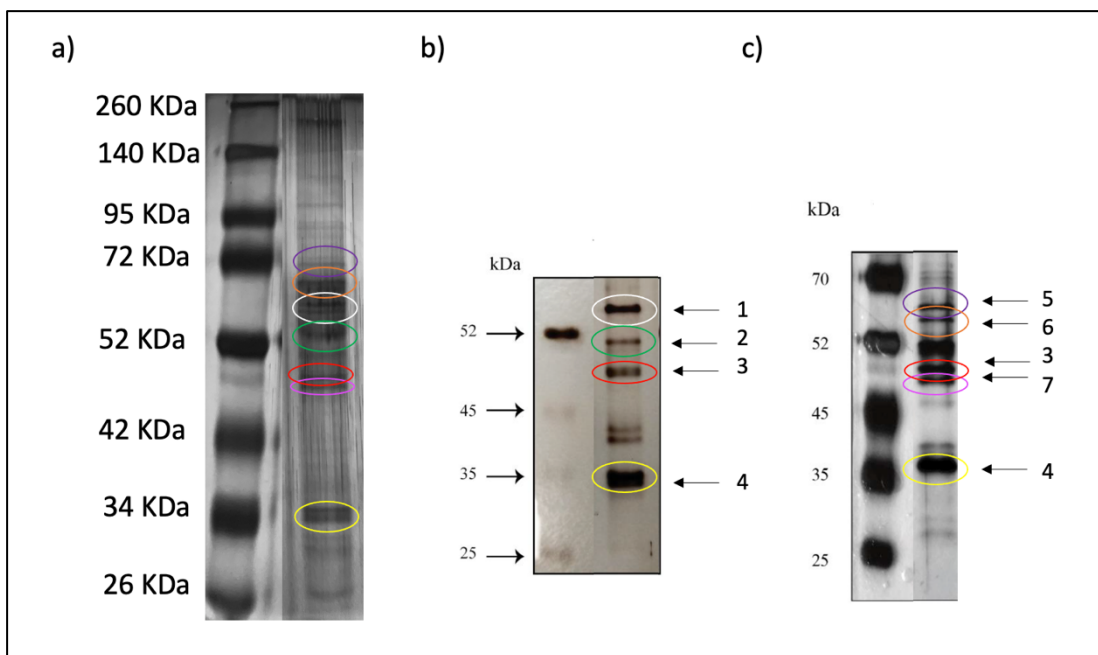


Figura 19. Comparación de bandas. a) W34/70 YPM (Figura 17b) b) QA23 mosto sintético c) *S. bacillaris* mosto sintético. Purificadas mediante un anticuerpo anti-melatonina (antimelatonin rabbit IgG polyclonal) y visualizadas en una electroforesis SDS-PAGE. Las bandas marcadas con el mismo color representan posible homología: 1. piruvato quinasa; 2. factor de elongación; 3. enolasa; 4. triosa fosfato deshidrogenasa 1, 2 y 3; 5. glucosa-6-fosfato; 6. piruvato descarboxilasa; 7. Fosfoglicerato quinasa. (Morcillo-Parra et al., 2019; Morcillo-Parra et al., 2020b)

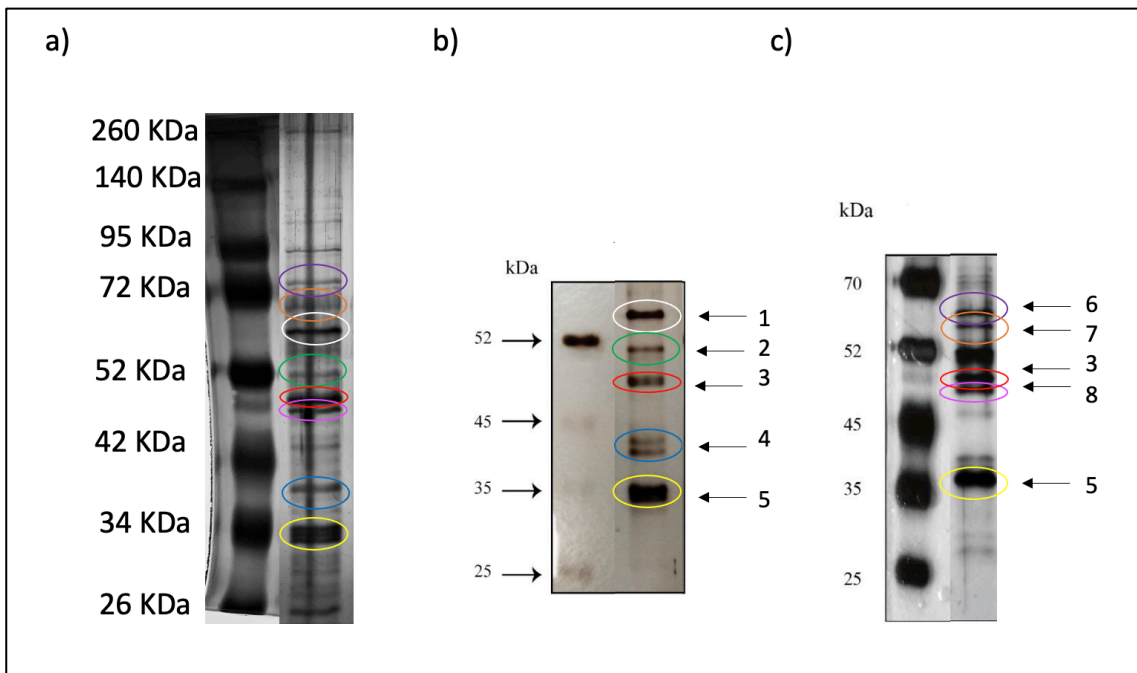


Figura 20. Comparación de bandas. a) *S. Clos mosto sintético* (Figura 10) b) *QA23 mosto sintético* c) *S. bacillaris mosto sintético*. Proteínas purificadas mediante un anticuerpo anti-melatonina (antimelatoninin rabbit IgG polyclonal) y visualizadas en una electroforesis SDS-PAGE. Las bandas marcadas con el mismo color representan posible homología: 1. piruvato quinasa; 2. factor de elongación; 3. enolasa; 4. fructosa bifosfato aldosa y alcohol deshidrogenasa; 5. triosa fosfato deshidrogenasa 1, 2 y 3; 6. glucosa-6-fosfato; 7. piruvato descarboxilasa; 8. fosfoglicerato quinasa. (Morcillo-Parra et al., 2019; Morcillo-Parra, González, et al., 2020b)

7. CONCLUSIONES

La unión de la melatonina con las proteínas glucolíticas durante la fermentación alcohólica está ligada a la fase de crecimiento en el que se encuentre la levadura, ya que esta unión se retrasa al realizar la fermentación a 16°C. Esta unión se inicia al final de la fase de latencia y aumenta su intensidad coincidiendo con el final de la fase exponencial e inicio de la fase de estacionaria.

Por otro lado, las interacciones entre la melatonina y las proteínas glucolíticas parecen estar ligada a la fuente de carbono, más específicamente a la glucosa, ya que sólo hemos observado unión cuando hay glucosa en el medio, en forma de monosacárido o disacárido. Adicionalmente, los crecimientos en maltosa han mostrado un perfil de unión algo diferente al de las otras fuentes de carbono estudiadas. Además, el perfil de bandas observadas suele ser similar en todos los crecimientos realizados, aunque existen pequeñas diferencias en cuanto a intensidad y aparición/ausencia de bandas dependiendo del medio y cepas utilizadas.

Sin embargo, todavía queda entender mejor el papel que desempeñan los complejos melatonina-proteínas glucolíticas durante el metabolismo fermentativo y el motivo por el que, durante el crecimiento, la melatonina se une con diferente intensidad a las proteínas glucolíticas. Analizar los distintos niveles de melatonina intra y extracelular, así como analizar los productos metabólicos derivados de los crecimientos en estos crecimientos podría ayudar a la mejorar la comprensión del estudio.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Anisimov, V. N., Popovich, I. G., Zabezhinski, M. A., Anisimov, S. V., Vesnushkin, G. M., & Vinogradova, I. A. (2006). Melatonin as antioxidant, geroprotector and anticarcinogen. *Biochimica et Biophysica Acta - Bioenergetics* (Vol. 1757, Issues 5,6).
- Arnao, M. B., & Hernández-Ruiz, J. (2015). Functions of melatonin in plants: a review. *Journal of Pineal Research*, 59(2).
- Axelrod, J., & Weissbach, H. (1960). Enzymatic O-methylation of N-acetylserotonin to melatonin. *Science*, 131(3409).
- Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J. M., Mas, A., & Rozès, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2).
- Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4(6).
- Bisquert, R., Muñoz-Calvo, S., & Guillamón, J. M. (2018). Protective role of intracellular Melatonin against oxidative stress and UV radiation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 9(FEB).
- Daulat, A. M., Maurice, P., Froment, C., Guillaume, J. L., Broussard, C., Monsarrat, B., Delagrangé, P., & Jocker, R. (2007). Purification and identification of G protein-coupled receptor protein complexes under native conditions. *Molecular and Cellular Proteomics*, 6(5).
- Dei Cas, M., Vigentini, I., Vitalini, S., Laganaro, A., Iriti, M., Paroni, R., & Foschino, R. (2021). Tryptophan derivatives by *saccharomyces cerevisiae* ec1118: Evaluation, optimization, and production in a soybean-based medium. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(1).
- Eghbal, M. A., Eftekhari, A., Ahmadian, E., Azarmi, Y., & Parvizpur, A. (2016). A Review of Biological and Pharmacological Actions of Melatonin: Oxidant and Prooxidant Properties. *Journal Pharma Reports*, 1.
- Farrugia, G., & Balzan, R. (2012). Oxidative stress and programmed cell death in yeast. *Frontiers in Oncology: Vol. 2 JUN*.

- Fernández-Cruz, E., Álvarez-Fernández, M. A., Valero, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2017). Melatonin and derived L-tryptophan metabolites produced during alcoholic fermentation by different wine yeast strains. *Food Chemistry*, 217.
- Gallardo-Fernández, M., Valls-Fonayet, J., Valero, E., Hornedo-Ortega, R., Richard, T., Troncoso, A. M., & Garcia-Parrilla, M. C. (2022). Isotopic labelling-based analysis elucidates biosynthesis pathways in *Saccharomyces cerevisiae* for Melatonin, Serotonin and Hydroxytyrosol formation. *Food Chemistry*, 374.
- Ganguly, S., Mummaneni, P., Steinbach, P. J., Klein, D. C., & Coon, S. L. (2001). Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* Homolog of the Melatonin Rhythm Enzyme Arylalkylamine N-Acetyltransferase (EC 2.3.1.87). *Journal of Biological Chemistry*, 276(50).
- Hardeland, R., & Poeggeler, B. (2003). Non-vertebrate melatonin. *Journal of Pineal Research* (Vol. 34, Issue 4).
- Kocadağlı, T., Yilmaz, C., & Gökmen, V. (2014). Determination of melatonin and its isomer in foods by liquid chromatography tandem mass spectrometry. *Food Chemistry*, 153.
- Lerner, A. B., Case, J. D., Takahashi, Y., Lee, T. H., & Mori, W. (1958). Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melanocytes. *Journal of the American Chemical Society* (Vol. 80, Issue 10).
- Mayo, J. C., Sainz, R. M., González Menéndez, P., Cepas, V., Tan, D. X., & Reiter, R. J. (2017). Melatonin and sirtuins: A “not-so unexpected” relationship. *Journal of Pineal Research* (Vol. 62, Issue 2).
- Megerian, M. F., Kim, J. S., Badreddine, J., Hong, S. H., Ponsky, L. E., Shin, J. II, & Ghayda, R. A. (2022). Melatonin and Prostate Cancer: Anti-tumor Roles and Therapeutic Application. *Aging and Disease*.
- Metabolism and Molecular Physiology of *Saccharomyces Cerevisiae*. (2004). *Metabolism and Molecular Physiology of Saccharomyces Cerevisiae*.
- Morcillo Parra, M. de los Á. (2019). Melatonin metabolism in yeast cells during alcoholic fermentation. *TDX (Tesis Doctorals En Xarxa)*.
- Morcillo-Parra, M. Á., Beltran, G., Mas, A., & Torija, M. J. (2020a). Effect of several nutrients and environmental conditions on intracellular melatonin synthesis in *saccharomyces cerevisiae*. *Microorganisms*, 8(6).

- Morcillo-Parra, M. Á., González, B., Beltran, G., Mas, A., & Torija, M. J. (2020b). Melatonin and glycolytic protein interactions are related to yeast fermentative capacity. *Food Microbiology*, *87*.
- Morcillo-Parra, M. Á., Valera, M. J., Beltran, G., Mas, A., & Torija, M. J. (2019). Glycolytic proteins interact with intracellular melatonin in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, *10*(OCT).
- Mot, A. I., Liddell, J. R., White, A. R., & Crouch, P. J. (2016). Circumventing the Crabtree Effect: A method to induce lactate consumption and increase oxidative phosphorylation in cell culture. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, *79*.
- Muñiz-Calvo, S., Bisquert, R., Fernández-Cruz, E., García-Parrilla, M. C., & Guillamón, J. M. (2019). Deciphering the melatonin metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* by the bioconversion of related metabolites. *Journal of Pineal Research*, *66*(3).
- Murch, S. J., & Erland, L. A. E. (2021). A Systematic Review of Melatonin in Plants: An Example of Evolution of Literature. In *Frontiers in Plant Science* (Vol. 12).
- Orlicka-Płocka, M., Gurda-Wozna, D., Fedoruk-Wyszomirska, A., & Wyszko, E. (2020). Circumventing the Crabtree effect: forcing oxidative phosphorylation (OXPHOS) via galactose medium increases sensitivity of HepG2 cells to the purine derivative kinetin riboside. *Apoptosis*, *25*(11–12).
- Paredes, S. D., Barriga, C., Reiter, R. J., & Rodríguez, A. B. (2009). Assessment of the potential role of tryptophan as the precursor of serotonin and melatonin for the aged sleep-wake cycle and immune function: *Streptopelia risoria* as a model. *International Journal of Tryptophan Research* (Vol. 2, Issue 1).
- Repova, K., Baka, T., Krajcirovicova, K., Stanko, P., Aziriova, S., Reiter, R. J., & Simko, F. (2022). Melatonin as a Potential Approach to Anxiety Treatment. In *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 23, Issue 24).
- Ribéreau-Gayon, P., Glories, Y., Maujean, A., & Dubourdieu, D. (2006). Handbook of Enology. In *Handbook of Enology* (Vol. 2). <https://doi.org/10.1002/0470010398>
- Rodríguez-Naranjo, M. I., Torija, M. J., Mas, A., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. D. C. (2012). Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *Journal of Pineal Research*, *53*(3).

- Romero, A., Ramos, E., De Los Ríos, C., Egea, J., Del Pino, J., & Reiter, R. J. (2014). A review of metal-catalyzed molecular damage: Protection by melatonin. *Journal of Pineal Research* (Vol. 56, Issue 4).
- San-Miguel, B., Fernández-Palanca, P., Mauriz, J. L., Tuñón, M. J., & González-Gallego, J. (2022). Beneficial effects of melatonin on liver fibrosis: A systematic review of current biological evidence. *Journal of Cellular Physiology* (Vol. 237, Issue 7).
- Sprenger, J., Hardeland, R., Fuhrberg, B., & Han, S. Z. (1999). Melatonin and other 5-methoxylated indoles in yeast: Presence in high concentrations and dependence on tryptophan availability. *Cytologia*, 64(2).
- Sunyer-Figueres, M., Vázquez, J., Mas, A., Torija, M. J., & Beltran, G. (2020). Transcriptomic insights into the effect of melatonin in *saccharomyces cerevisiae* in the presence and absence of oxidative stress. *Antioxidants*, 9(10).
- Tan, D. X., Hardeland, R., Back, K., Manchester, L. C., Alatorre-Jimenez, M. A., & Reiter, R. J. (2016). On the significance of an alternate pathway of melatonin synthesis via 5-methoxytryptamine: comparisons across species. In *Journal of Pineal Research*.
- Torija, M. J. (2002). Ecología de levaduras : Delección y adaptación a fermentaciones vínicas. *Tesis*.
- Torija, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J. M., Mas, A., & Rozès, N. (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1–2).
- Vázquez, J., González, B., Sempere, V., Mas, A., Torija, M. J., & Beltran, G. (2017). Melatonin reduces oxidative stress damage induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces cerevisiae*. *Frontiers in Microbiology*, 8(JUN).
- Vázquez, J., Grillitsch, K., Daum, G., Mas, A., Torija, M. J., & Beltran, G. (2018). Melatonin minimizes the impact of oxidative stress induced by hydrogen peroxide in *Saccharomyces* and Non-conventional yeast. *Frontiers in Microbiology*, 9(AUG).
- Wang, C., Yin, L. Y., Shi, X. Y., Xiao, H., Kang, K., Liu, X. Y., Zhan, J. C., & Huang, W. D. (2016). Effect of Cultivar, Temperature, and Environmental Conditions on the Dynamic Change of Melatonin in Mulberry Fruit Development and Wine Fermentation. *Journal of Food Science*, 81(4).

Weissbach, H., Redfield, B. G., & Axelrod, J. (1960). Biosynthesis of melatonin: enzymic conversion of serotonin to N-acetylserotonin. *BBA - Biochimica et Biophysica Acta*, 43(C).

9. AUTOEVALUACIÓN

La oportunidad que me ha ofrecido el grupo de Biotecnología Enológica, al poder realizar mi TFG en su equipo de investigación, me ha hecho aprender y adquirir nuevos conocimientos en el mundo del laboratorio.

Desde el primer momento que llegue al laboratorio, la confianza que han depositado en mi ha sido fundamental para poder sentirme cómodo en el lugar de trabajo y llevar a cabo las tareas de investigación lo mejor posible.

Además, considero que he podido ampliar todos los conocimientos adquiridos durante la carrera de Biotecnología.

Uno de los aspectos más enriquecedores para mí, ha sido poder decidir por mí mismo como actuar frente a cada uno de los problemas rutinarios que iban surgiendo en el laboratorio de forma satisfactoria.

Considero que mi actitud positiva, me ha ayudado a incorporarme al grupo junto con el resto de mis compañeros, creando así un buen entorno de trabajo.

Además, poder estar en contacto diariamente con mis supervisoras, ha sido muy importante para poder ir avanzando y enriqueciéndome de toda la parte experimental que iba obteniendo.

ANEXOS

Anexo 1: Medios de cultivo

Glucosa (YPD)

Reactivo	Concentración
Glucosa	20 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Peptona	20 g/L

Sacarosa (YPS)

Reactivo	Concentración
Sacarosa	20 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Peptona	20 g/L

Galactosa (YPGal)

Reactivo	Concentración
Galactosa	20 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Peptona	20 g/L

Maltosa (YPM)

Reactivo	Concentración
Maltosa	20 g/L
Extracto de levadura	10 g/L
Peptona	20 g/L

Nitrógeno Base (YNB)

Reactivo	Concentración
Glucosa	20 g/L
Base nitrogenada de levadura sin aminoácidos ni sulfato de amonio	1,7 g/L
(NH ₄) ₂ SO ₄	350 mM

Mosto Sintético (MS)

Reactivo	Concentración
Glucosa	100 g/L
Fructosa	100 g/L
Ácido Málico	5 g/L
Ácido Cítrico	0,5 g/L
Ácido Tartárico	3 g/L
KH ₂ SO ₄	0,75 g/L
K ₂ SO ₄	0,5 g/L
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,25 g/L
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,15 g/L
NaCl	0,2 g/L
NH ₄ Cl	300 mg/L
Oligoelementos*	10 mL/L (de stock preparado)
Vitaminas*	1 mL/L (de stock preparado)
Aminoácidos aromáticos (AAA)*	50 mL/L (de stock preparado)
Aminoácidos no aromáticos (AA)*	7,5 mL/L (de stock preparado)

- Oligoelementos

Reactivo	Concentración
MnSO₄·H₂O	100 g/L
ZnSO₄·7H₂O	100 g/L
CuSO₄·5H₂O	5 g/L
KI	0,5 g/L
CoCl₂·6H₂O	3 g/L
H₃BO₃	0,75 g/L
(NH₄)₆Mo₇O₂₄·4H₂O	0,5 g/L

- Vitaminas

Reactivo	Concentración
Myo-isonitol	2 g/L
Pantotenato de calcio	150 mg/L
Clorhidrato de tiamina	25 mg/L
Ácido nicotínico	200 mg/L
Piridoxina	25 mg/L
Biotina	3 mL (Stock de 100 mg/L)

- Aminoácidos aromáticos (AAA)

Reactivo	Concentración
Tirosina	1,95 g/L
Triptófano	17,5 g/L
Fenilalanina	3,77 g/L

- Aminoácidos no aromáticos (AA)

Reactivo	Concentración
Isoleucina	3,25 g/L
Ácido Aspártico	4,42 g/L
Ácido Glutámico	11,96 g/L
Arginina	36,79 g/L
Leucina	4,81 g/L
Treonina	7,54 g/L
Glicina	1,82 g/L
Glutamina	49,92 g/L
Alanina	14,56 g/L
Valina	4,42 g/L
Metionina	3,12 g/L
Serina	7,8 g/L
Histidina	3,38 g/L
Lisina	1,59 g/L
Cisteína	2,08 g/L
Prolina	59,93 g/L

Anexo 2: Purificación de proteínas

La purificación de proteínas se realizó con Pierce Crosslinking Magnetic IP/Co-IP Kit (Thermo científico, EE. UU.). El anticuerpo IgG de conejo contra la melatonina se adquirió de LifeSpan BioSciences (Seattle, WA, EE. UU.).

Reactivo	Concentración
Tampón de lisis	25 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% NP440, 5% glycerol, pH 7,4
20x Tampón de acoplamiento (diluido)	10 mM fosfato de sodio, 150 mM NaCl, pH 7,2
Substrato de disuccinimidilo (DSS)	2 mg
Tampón de neutralización	Proporcionado por el fabricante (pH 8,5)
Tampón de elución	Proporcionado por el fabricante (pH 2)

Unión del anticuerpo a perlas magnéticas de proteína A/G

1. Prepare 2 ml de 1x Tampón de Acoplamiento Modificado para cada inmunoprecipitación diluyendo 100 μ L de 20x Tampón de Acoplamiento y 100 μ L de Tampón de Lisis con 1,8 mL de agua MQ.
2. Prepare la solución de anticuerpos diluyendo 1:20 con 20x Tampón de Acoplamiento y Tampón de Lisis en para tener una concentración final de anticuerpo de 2-10 μ g. Para preparar 100 μ L de anticuerpo solución: mezcle 10 μ L de anticuerpo, 5 μ L de 20x de Tampón de Acoplamiento, 5 μ L de Tampón de Lisis y 80 μ L de agua MQ.
3. Agregue 25 μ L de perlas en un tubo de microcentrífuga y colóquelo en un soporte magnético para recolectar perlas durante 1 min. Deseche la solución de almacenamiento.
4. Agregue 500 μ L de 1x Tampón de Acoplamiento Modificado mezcle suavemente e incube 1 min a temperatura ambiente temperatura en una plataforma giratoria. Recoja las cuentas en un soporte magnético y deséchelas. el sobrenadante Repita este paso una vez.

5. Agregue 100 μL de solución de anticuerpos a las perlas, mezcle suavemente e incube en un rotatorio. plataforma durante 15 min (mínimo) a temperatura ambiente. Agitar suavemente las cuentas cada 5- 10 min durante la incubación.
6. Recoja las perlas con un soporte magnético y deseche el sobrenadante. Guardar el flujo continuo para verificar la unión del anticuerpo.
7. Agregue 100 μL de 1x Tampón de Acoplamiento Modificado y agite en el vórtex. Recoge las cuentas con un magnético. reposar y desechar el sobrenadante.
8. Agregue 300 μL de 1x Tampón de Acoplamiento Modificado y agite en vórtex. Recoge las cuentas con un magnético. reposar y desechar el sobrenadante. Repita este paso una vez.

Reticulación del anticuerpo

Si se omite el entrecruzamiento, el anticuerpo se eludirá junto con el antígeno durante los pasos de elución.

1. Prepare el DSS reticulante agregando 217 μL de DMSO a un solo tubo de DSS. El DSS Diluido 1:100 en DMSO para hacer DSS 0,25 mM.
2. Prepare la solución de reticulación: agregue 2,5 μL de 20x Tampón de Acoplamiento, 4 μL de 0,25 mM DSS y 43,5 μL de agua MQ.
3. Incube la reacción de reticulación durante 30 min a temperatura ambiente en un rotador. Vórtice las cuentas cada 10 minutos durante la incubación para garantizar que las cuentas permanezcan en suspensión.
4. Recoge las cuentas con un soporte magnético. Retire y guarde el flujo continuo para verificar entrecruzamiento de anticuerpos.
5. Agregue 100 μL de tampón de elución a las perlas y mezcle durante 5 min a temperatura ambiente en una plataforma giratoria para eliminar el anticuerpo no entrecruzado y extinguir el entrecruzamiento reacción. Recoja las perlas con un soporte magnético y deseche el sobrenadante.
6. Agregue 100 μL de tampón de elución a las perlas y agite en el vórtex. Recoge las cuentas con un magnético reposar y desechar el sobrenadante. Repita una vez.

7. Agregue 200 μL de tampón de lisis a las perlas y agite en el vórtex. Recoge las cuentas con un magnético, reposar y desechar el sobrenadante. Repita una vez.
8. Proceder a la inmunoprecipitación. Las perlas reticuladas con anticuerpos se pueden almacenar en 4°C .

Lisis de muestras de levadura

Para obtener extracto de células crudas para la purificación de perlas magnéticas:

1. Centrifugar a 7800 rpm durante 5 min.
2. Lave las células una vez suspendiendo el sedimento celular en agua MQ. Centrifugar a 10000 rpm para 5 minutos. Las muestras deben almacenarse a -20°C hasta el análisis de purificación.
3. Agregue 500 μL de tampón de lisis enfriado con hielo al sedimento celular y transféralo a un tubo nuevo con 500 μL de perlas de vidrio.
4. Rompa las células batiendo con perlas de vidrio durante 1 min en Mini BeadBeater-24 (bioSpec Productos, Bartlesville, OK, EE. UU.)
5. Incube 1 min en hielo.
6. Repita cinco veces (5 ciclos de agitación).
7. Centrifugar las células lisadas a 13000 rpm durante 10 min a 4°C .
8. Transfiera el sobrenadante a un tubo nuevo para determinar la concentración de proteína y inmunoprecipitación.

Inmunoprecipitación

1. Agregue la solución de lisado al tubo que contiene perlas magnéticas reticuladas e incube durante 1 h a temperatura ambiente o durante la noche a 4°C en un rotador.
2. Recoja las perlas con un soporte magnético, retire la muestra no unida y guárdela para análisis.
3. Agregue 500 μL de Tampón de Lisis al tubo y mezcle. Recoja las cuentas y deseche las flotante. Repita este paso una vez.

4. Agregue 500 μL de agua MQ al tubo y mezcle. Recoja las cuentas y deseche las flotante. Repita este paso una vez.
5. Agregue 50 μL de Tampón de Elución al tubo. Incubar durante 5 min a temperatura ambiente en un rotador Recoja las perlas y guarde el sobrenadante que contiene el antígeno objetivo. A neutralice el pH bajo, agregue 5 μL de tampón de neutralización por cada 50 μL de eludido. Repetir esta elución una vez.

Anexo 3: Métodos para trabajar con proteínas.

Preparación y ejecución de electroforesis en gel de poliacrilamida SDS (SDS-PAGE)

Las proteínas purificadas se separaron por su peso molecular mediante SDS-PAGE. Las proteínas eran fueron tratadas con SDS (dodecilsulfato de sodio), que las neutraliza y las recubre de carga negativa, SDS-PAGE se llevó a cabo en cámaras de electroforesis en gel (Bio-Rad Laboratories, Munich, Alemania).

Antes de ejecutar el gel, el extracto crudo de proteínas se mezcló con 2x Tampón de Carga y se incubó a 95°C durante 5 min. Luego, se cargó una cantidad igual de proteína en geles SDS-PAGE al 12%.

SDS-PAGE se preparó en un porcentaje de 5% y 12% de gel de apilamiento y resolución, respectivamente. Se vertió isopropanol (Panreac Applichem, Barcelona, España) sobre el gel de resolución para nivelar el borde del gel. Después de polimerizar el gel de resolución, se decantó el isopropanol y se mezclaron los componentes para el gel de apilamiento. Los geles SDS-PAGE funcionaron durante 2-3 horas a 100 V.

Reactivos para SDS-PAGE

Reactivo	Concentración
Persulfato de amonio (APS)	10% (p/v) en agua MQ
Acrilamida 37:5:1	Proporcionado por Sigma Aldrich (St. Louis, MO, EE. UU)
N, N, N', N'-Tetrametil etil diamina (TEMED)	Proporcionado por Bio-Rad Laboratories (Munich, Alemania)
Solución de stock (Resolving)	1,5 M Tris-HCl, pH 8,8
Solución de stock (Stacking)	0,5 M Tris-HCl, pH 6,8
SDS	10% (p/v) en agua MQ
Tampón de electroforesis (5x)	0,025 M Tris Base, 192 mM Glicina, 0,1% SDS
Tampón de muestra (5x)	300 nM Tris-HCl, 1% SDS, 50% glycerol, 0,05% azul de bromofenol

Composición de SDS-PAGE

Reactivo	Stacking gel (4mL)	Resolving gel (12mL)
Acrilamida	500 µL	3,6 mL
Solución de stock (Resolving)	-	3 mL
Solución de stock (Stacking)	1 mL	-
Agua MQ	2,5 mL	5,2 mL
SDS	40 µL	120 µL
TEMED	7 µL	6,5 µL
APS	40 µL	120 µL

Tinción SDS-PAGE

Después de correr, el gel SDS-PAGE se tiñó con plata (Pierce Silver Stain Kit, Thermo Scientific, Waltham, MA, EE. UU.).

1. Lavar el gel en agua MQ durante 5 min a temperatura ambiente. Repita este paso una vez.
2. Fijar el gel con Solución Fijadora (30 % (p/v) de etanol, 10 % (p/v) de ácido acético) durante 15 min a temperatura ambiente. Repita este paso una vez. El gel se puede mantener en la solución de fijación durante la noche sin afectar el rendimiento de la tinción.
3. Lavar el gel en etanol al 10 % durante 5 min a temperatura ambiente. Repita este paso una vez.
4. Lavar el gel en agua MQ durante 5 min a temperatura ambiente. Repita este paso una vez.
5. Prepare la Solución de Trabajo de Sensibilizador agregando 50 μ l de Sensibilizador en 25 ml de agua MQ.
6. Incube el gel en la Solución de Trabajo de Sensibilizador durante exactamente 1 min. Luego, lavar con dos cambios de agua MQ durante 1 min cada uno.
7. Prepare la Solución de Trabajo de Tinción agregando 500 μ l de Potenciador en 25 ml de Tinción.
8. Incube el gel en la Solución de Trabajo de Tinción durante un mínimo de 30 min.
9. Prepare la Solución de Trabajo de Revelador mezclando 50 μ L de Potenciador en 25 ml de Revelador.
10. Lave el gel con dos cambios de agua MQ durante 20 segundos cada uno.
11. Agregue la solución de trabajo del revelador e incube hasta que aparezcan las bandas de proteínas.
12. Cuando se alcance la intensidad de banda deseada, reemplace la Solución de revelador con Acético al 5 %. Ácido. Lave el gel brevemente, reemplácelo con solución fresca e incube durante 10 min.