



UNIVERSITAT
ROVIRA i VIRGILI



**IMPACTO DE LA DELECCIÓN DEL GEN *PYK2* EN EL
METABOLISMO DE *S. CEREVISIAE* LALVIN CLOS EN
CONDICIONES FERMENTATIVAS Y RESPIRATORIAS**

Aida García García

TRABAJO FINAL DE GRADO EN BIOTECNOLOGÍA

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

En cooperación: Grupo Biotecnología Enológica

Supervisora: Dr. María Jesús Torija Martínez

Fecha de convocatoria: septiembre 2025

Yo, Aida García García, con DNI 78592106W, soy concedora de la guía de prevención de plagio en la URV Prevención, detección y tratamiento del plagio en la docencia: guía para estudiantes (aprobada en julio 2017)

(<http://www.urv.cat/ca/vidacampus/serveis/crai/que-us-oferim/formacio-competencias-nucleares/plagio/>) y afirmo que este TFG no constituyen ninguna de las conductas consideradas como plagio por la URV.

Tarragona, 1 de septiembre de 2025.

Índice

Datos del Centro	5
Resumen	6
1. Introducción.....	7
1.1. <i>Saccharomyces cerevisiae</i> como organismo modelo.....	7
1.2. Metabolismo del carbono en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	8
1.3. Melatonina y función de PYK2 en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	13
2. Hipótesis y Objetivos	14
3. Materiales y Métodos	15
3.1. Cepas y condiciones de cultivo.....	15
3.2. Seguimiento del crecimiento y análisis del consumo de sustratos.....	16
3.3. Comprobación de la pureza y verificación genotípica.....	17
3.4. Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa.....	19
3.5. Análisis estadístico de la expresión génica	21
4. Resultados y Discusión.....	22
4.1. Análisis del crecimiento de las cepas en diferentes fuentes de carbono	22
4.2. Verificación genotípica de las cepas	27
4.3. Evaluación del efecto de la delección del gen <i>PYK2</i> en un fondo genético alternativo	29
4.4. Expresión relativa de genes clave en el metabolismo del carbono	32
5. Conclusiones	37
6. Bibliografía	38
7. Autoevaluación	44
8. Anexos	45
8.1. Protocolos	45

Datos del Centro

Este estudio se ha llevado a cabo en los laboratorios del grupo de investigación de Biotecnología Enológica de la Universitat Rovira i Virgili (URV), ubicados en el Campus Sescelades de Tarragona (Cataluña, España). El grupo forma parte del Departamento de Bioquímica y Biotecnología y está adscrito a la Facultad de Enología. Ha sido reconocido como grupo de investigación de calidad por la AGAUR (2021 SGR 00202) de la Generalitat de Catalunya. La responsable del grupo es la Dra. María Jesús Torija Martínez.

La actividad investigadora del grupo se centra en el estudio de los microorganismos implicados en los procesos enológicos y en sus aplicaciones biotecnológicas. Principalmente, se trabaja con levaduras (*Saccharomyces cerevisiae* y *no-Saccharomyces*) y bacterias lácticas (como *Oenococcus oeni*), responsables de las fermentaciones alcohólica y maloláctica, respectivamente.

Se analizan aspectos genéticos, fisiológicos y nutricionales de estos microorganismos, así como su diversidad y las interacciones entre cepas y especies, utilizando técnicas bioquímicas y moleculares avanzadas, incluyendo herramientas de biología de sistemas como la genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica. También se estudia la biodiversidad microbiana de entornos relacionados con la vinificación mediante tecnologías de secuenciación masiva.

Dentro de esta línea de investigación, mi trabajo se ha centrado en el estudio del metabolismo de *Saccharomyces cerevisiae* mediante el análisis comparativo de una cepa vínica control y una mutante con delección en el gen *PYK2*, generada mediante edición génica con la técnica CRISPR-Cas9. El objetivo ha sido evaluar cómo esta mutación afecta al crecimiento en distintas fuentes de carbono y a la expresión de genes clave implicados en la fermentación y la respiración.

Resumen

En este trabajo se caracterizó el efecto de la delección del gen *PYK2* en la cepa vínica *Saccharomyces cerevisiae* Lalvin Clos, con el objetivo de evaluar su influencia en el crecimiento y en la adaptación metabólica frente a distintas fuentes de carbono fermentables y no fermentables. Se compararon parámetros de crecimiento, consumo de sustratos y producción de metabolitos entre la cepa mutante $\Delta pyk2$ y la cepa control, además de analizar la expresión de genes clave implicados en vías fermentativas y respiratorias, como *CAT8*, *PDC2* y *CYC1*.

La cepa $\Delta pyk2$ mostró un crecimiento similar al de la cepa Lalvin Clos en medios con fuentes de carbono fermentables, pero fue incapaz de crecer en fuentes no fermentables ni de reutilizar el etanol generado tras la fermentación para el crecimiento diaúxico observado en la cepa parental. En cambio, al comparar con una cepa de laboratorio, tanto la cepa parental como su mutante $\Delta pyk2$ lograron crecer en fuentes no fermentables y consumir etanol.

Durante el proceso experimental se detectó la presencia de una mutación mitocondrial en la cepa mutante que, a diferencia de la delección de *PYK2*, la cual según la literatura no afecta el crecimiento en diferentes fuentes de carbono, sí provoca un cambio significativo en el crecimiento, especialmente en medios con fuentes respiratorias. La presencia de esta mutación inesperada limita la interpretación de los resultados obtenidos. Por ello, aunque se observaron diferencias en la capacidad metabólica y adaptativa entre el mutante $\Delta pyk2$ y la cepa parental, no fue posible establecer una relación causal concluyente entre dichas diferencias y la pérdida de función de *PYK2*.

Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones que permitan aislar y analizar con mayor precisión el papel específico de *PYK2* en el metabolismo de *S. cerevisiae*, especialmente en su interacción con el complejo glucolítico y la melatonina, elementos relevantes en la regulación metabólica celular.

Palabras clave: *S. cerevisiae*, *PYK2*, delección génica, metabolismo del carbono.

1. Introducción

1.1. Saccharomyces cerevisiae como organismo modelo

Saccharomyces cerevisiae es una levadura unicelular conocida como una valiosa herramienta para la investigación básica. Su ADN genómico nuclear está organizado en 16 cromosomas con un total de 12.068 kilobases (kb) (Botstein et al., 1997; Parapouli et al., 2020). El alto grado de conservación de muchos procesos celulares clave entre las células humanas y la levadura han establecido a *S. cerevisiae* como un organismo modelo en biología celular y molecular (Nielsen, 2019).

Además de su papel en investigación, *S. cerevisiae* es una especie con alto valor industrial. Es la fábrica celular preferida para la producción de numerosos productos alimenticios, entre los que se destaca la producción de pan, cerveza y vino (Que et al., 2024). La producción de vino es una práctica ancestral, con evidencias arqueológicas que datan al menos del 3150 a.C., como los restos encontrados en una vasija de vino de Egipto. Sin embargo, la asociación directa no fue hasta el siglo XIX, cuando Louis Pasteur demostró su papel en la fermentación alcohólica, y posteriormente, en 1890, cuando Müller-Thurgau propuso por primera vez la utilización de cultivos iniciadores para la fermentación controlada del vino (Parapouli et al., 2020).

La introducción de cultivos iniciadores revolucionó la industria vinícola y ha promovido la búsqueda de una mejora en la calidad del vino, al permitir una mayor reproducibilidad y control de las fermentaciones. Esta práctica ha fomentado la selección de cepas de *S. cerevisiae* para una mejora continua de la calidad del vino, debido a su influencia directa en la producción de metabolitos responsables del perfil sensorial y organoléptico del producto final (Parapouli et al., 2020). De forma simultánea, la ingeniería genética en *S. cerevisiae* se ha consolidado como una herramienta fundamental para el estudio del papel de genes específicos en procesos metabólicos relevantes. Estas aproximaciones permiten analizar como la modificación genética repercute sobre la síntesis de compuestos durante la fermentación. En este contexto, el estudio del metabolismo del carbono es fundamental por su relación entre el crecimiento celular y la transformación de distintas fuentes de carbono en productos de interés biotecnológico.

1.2. Metabolismo del carbono en *Saccharomyces cerevisiae*

La levadura *S. cerevisiae* es capaz de crecer consumiendo diferentes fuentes de carbono que se pueden clasificar entre fuentes de carbono fermentables y no fermentables. Las diferentes fuentes de carbono activan vías metabólicas específicas que condicionan el balance entre fermentación y respiración

1.2.1. Fuentes de carbono fermentables

Las levaduras pueden degradar los azúcares mediante dos vías metabólicas diferentes, la fermentación alcohólica y la respiración mitocondrial, cuya utilización depende principalmente de la disponibilidad de oxígeno y la concentración de glucosa en el medio. Ambas rutas comparten la glucólisis como etapa inicial, en la que la glucosa es transformada en piruvato. A partir de ahí, el piruvato puede ser convertido en etanol y CO₂ a través de la fermentación alcohólica, o bien oxidado completamente hasta CO₂ y H₂O mediante la respiración.

1.2.1.1. Metabolismo fermentativo

S. cerevisiae prefiere utilizar su metabolismo fermentativo en medios con alto contenido de glucosa, incluso en presencia de oxígeno, fenómeno conocido como efecto Crabtree positivo (Klein et al., 1998; Randez-Gil et al., 1997). Esto implica que, a altas concentraciones de azúcares fermentables, la respiración mitocondrial se reprime y la glucosa se convierte principalmente en etanol a través de la fermentación alcohólica. Esta represión de la respiración causada por la glucosa se trasmite a la célula mediante diferentes vías de señalización que coordinan actividades moleculares, muchas de ellas ejerciendo su efecto a nivel transcripcional (Kayikci & Nielsen, 2015).

Durante este proceso, la vía principal para la utilización de azúcares fermentables es la glucólisis, un proceso clave para la generación de piruvato y la obtención de energía celular (Figura 1). En dicha ruta, la glucosa es fosforilada a glucosa-6-fosfato, que posteriormente isomeriza a fructosa-6-fosfato. La fructosa-6-fosfato es fosforilada por la fosfofructoquinasa y, tras varias reacciones sucesivas, se produce el piruvato, metabolito central para vías fermentativas y respiratorias.

Dos isoformas de la enzima piruvato quinasa, codificadas por los genes *PYK1* y *PYK2* catalizan la conversión final de fosfoenolpiruvato a piruvato. *PYK1* es la principal isoforma expresada en condiciones de alta glucosa, mientras que *PYK2* presenta una menor actividad y está más relacionada con condiciones no fermentativas (Boles et al., 1997). El piruvato generado se convierte en acetaldehído por acción de la piruvato descarboxilasa (PDC), cuya isoforma principal está codificada por *PDC1*. La expresión de *PDC1* está regulada en parte por el factor de transcripción Pdc2p, codificado por *PDC2*, que es esencial para la expresión de genes fermentativos durante el crecimiento en azúcar (Hohmann, 1993a). Finalmente, el acetaldehído se reduce a etanol mediante la acción de la alcohol deshidrogenasa (ADH), cerrando la ruta fermentativa.

Como se muestra en la Figura 1, *S. cerevisiae* puede metabolizar diferentes azúcares, que tras distintas modificaciones se incorporan a la vía glucolítica para ser transformados en piruvato. Azúcares como la fructosa y la manosa son convertidas en fructosa-6-fosfato, que converge con la ruta principal de la glucosa para continuar su transformación. Por otro lado, en la vía metabólica de la galactosa, también conocida como vía Leloir, la galactosa debe ser convertida primero en un derivado de la glucosa para entrar en la vía glucolítica y, posteriormente, ser fermentada. Brevemente, la galactosa es convertida en glucosa-1-fosfato mediante la actuación de diferentes enzimas como la mutarotasa y la UDP-galactosa 4-epimerasa (ambas codificadas por *GAL10*), la galactoquinasa (*GAL1*) y la uridilil-transferasa (*GAL7*) (Sellick et al., 2008). La expresión de este grupo de genes está reprimida cuando se cultiva la levadura con fuentes de carbono como la glucosa o el glicerol, pero aumenta hasta unas 1000 veces cuando la galactosa es la principal fuente de carbono (Lohr et al., 1995). Una vez transformada, la glucosa-1-fosfato entra en la glucólisis para continuar el metabolismo fermentativo hasta la producción de etanol al igual que la glucosa.

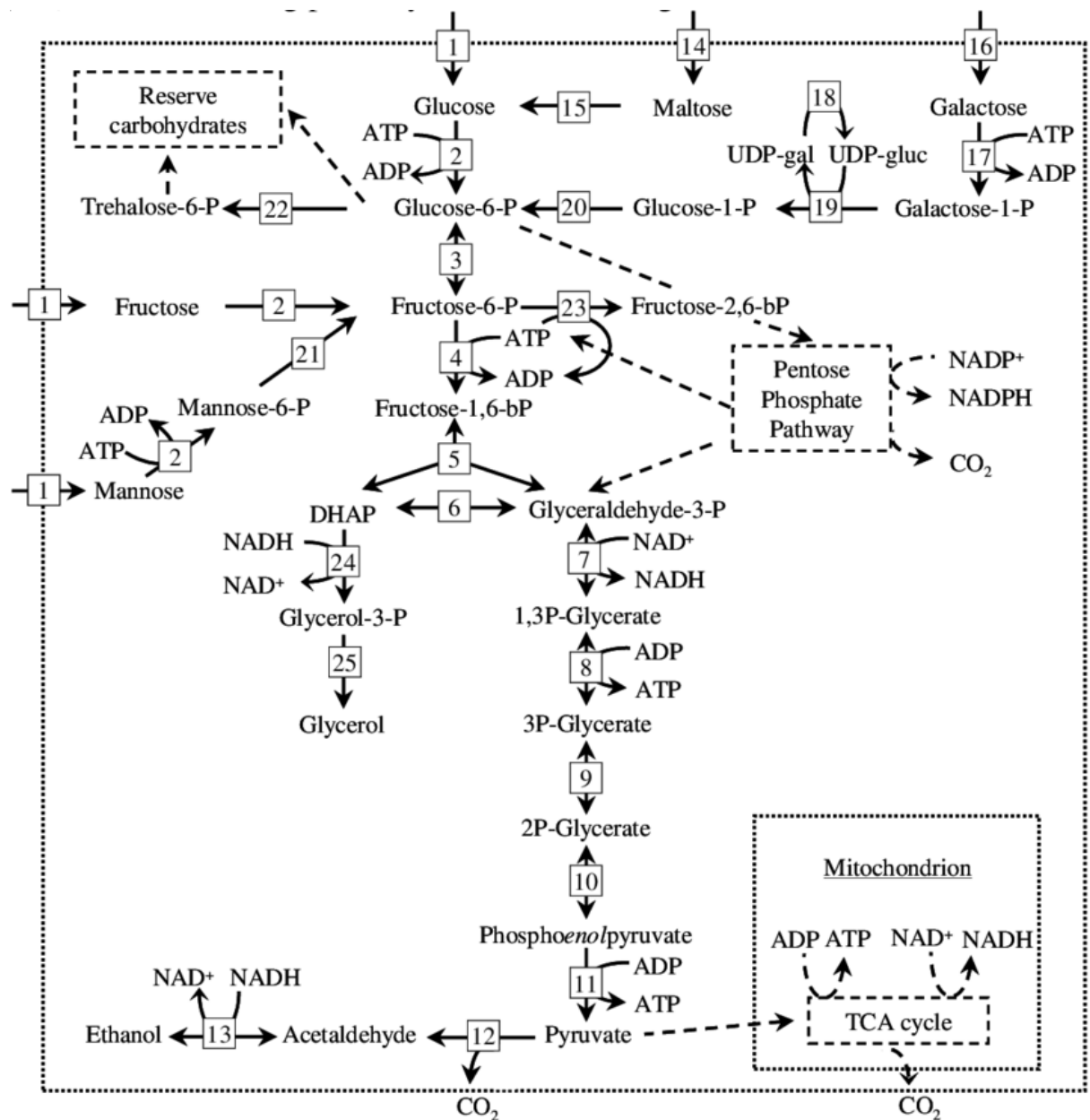


Figura 1. Conversión de azúcares a etanol en *Saccharomyces cerevisiae*. Se representan las principales enzimas y transportadores implicados en la transformación de glucosa y galactosa hasta la producción de etanol durante la fermentación. Leyenda: 1: transportador de hexosa; 2: hexoquinasa; 3: fosfoglucosa isomerasa; 4: fosfofructoquinasa; 5: fructosa-bisfosfato aldolasa; 6: triosa-fosfato isomerasa; 7: gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa; 8: fosfoglicerato quinasa; 9: fosfoglicerato mutasa; 10: enolasa; 11: piruvato quinasa; 12: piruvato descarboxilasa; 13: alcohol deshidrogenasa; 14: transportador maltosa-protón; 15: maltasa; 16: transportador de galactosa; 17: galactoquinasa; 18: UDP-glucosa 4-epimerasa; 19: galactosa-1-fosfato uridiltransferasa; 20: fosfoglucomutasa; 21: fosfomanosa isomerasa; 22: trehalosa-6-fosfato sintasa; 23: 6-fosfofructo-2-quinasa; 24: glicerol-3-fosfato deshidrogenasa; 25: glicerol-3-fosfatasa. DHAP: dihidroxiacetona fosfato; ciclo TCA: ciclo de ácido tricarbóxico. Extraído de Van Den Brink (2009).

1.2.1.2. Metabolismo respiratorio

Aunque *S. cerevisiae* prefiere la fermentación alcohólica, también puede metabolizar estos azúcares mediante respiración mitocondrial, oxidando el piruvato derivado de la glucólisis a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y la cadena de transporte de electrones, lo que permite obtener una mayor cantidad de energía en forma de ATP. Cuando la glucosa se encuentra en baja concentración y en condiciones aerobias, el piruvato generado en la glucólisis es oxidado completamente a CO₂ y agua. Esta flexibilidad metabólica permite a la levadura adaptarse a diferentes condiciones ambientales y optimizar la producción de energía.

1.2.2. Fuentes de carbono no fermentables

Además de su capacidad para metabolizar numerosas fuentes de carbono fermentables, *S. cerevisiae* también puede crecer utilizando fuentes de carbono no fermentables como el glicerol, el etanol o el acetato, especialmente en ausencia de glucosa (Turcotte et al., 2010). Este tipo de metabolismo requiere la activación de la respiración mitocondrial y la expresión de genes respiratorios y gluconeogénicos, ya que la obtención de energía se basa principalmente en la fosforilación oxidativa durante los procesos gluconeogénicos. Por ello, las cepas con deficiencias respiratorias no podrán crecer en las fuentes de carbono no fermentables (Hampsey, 1997).

La Figura 2 muestra la principal ruta para metabolizar el glicerol por *S. cerevisiae* a través de la vía L-glicerol-3-fosfato (L-G3P) (Xiberras et al., 2019). En esta ruta, el glicerol es convertido en glicerol-3-fosfato por la quinasa *GUT1*, y posteriormente, en dihidroxiacetona por la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa *GUT2*. Este producto puede incorporarse tanto a la vía glucolítica como a la gluconeogénesis (Pavlik et al., 1993).

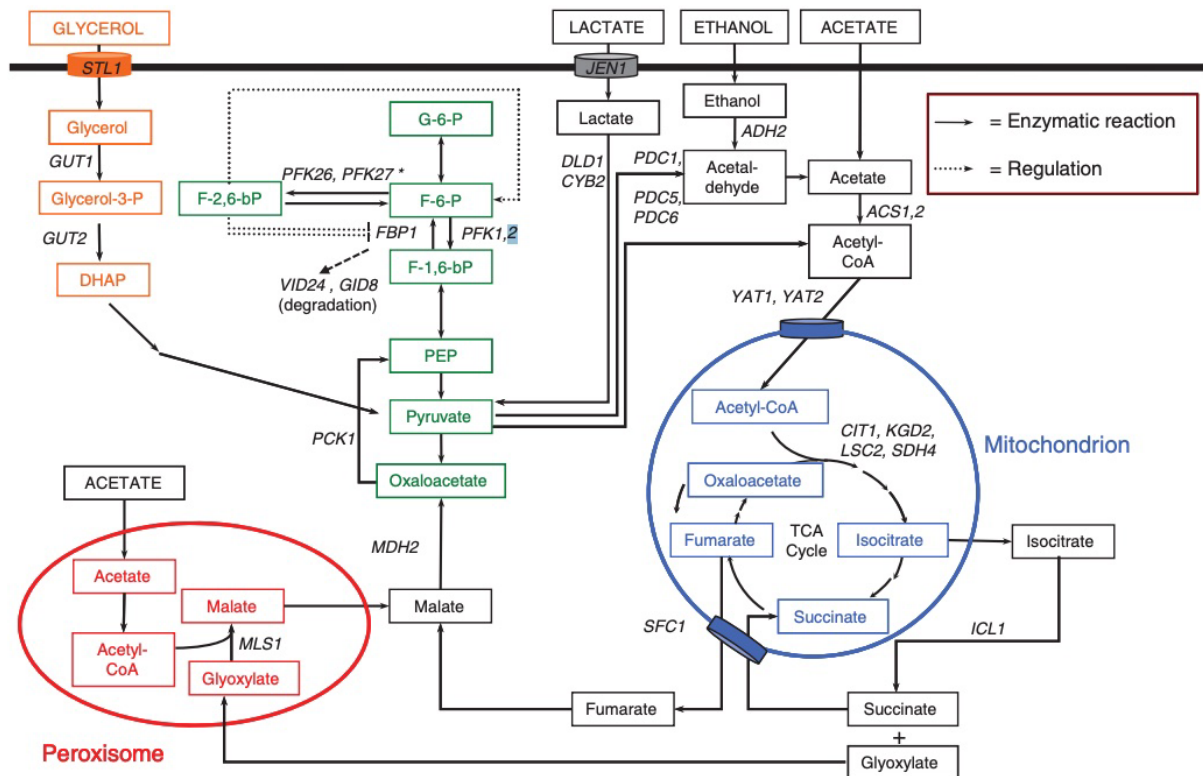


Figura 2. Rutas metabólicas y genes implicados en la utilización de fuentes de carbono no fermentables en *S. cerevisiae*. Se muestran esquemáticamente las principales rutas para la utilización de glicerol, etanol y acetato, así como los genes claves involucrados en estos procesos. Las flechas discontinúan presentan los pasos regulatorios. Extraído de Turcotte et al. (2010).

El metabolismo del etanol y el acetato es similar: el etanol se oxida a acetaldehído y posteriormente a acetato, mientras que el acetato se convierte en acetil-CoA, que entrará en el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) para completar su oxidación (Casal et al., 1996; Xiberras et al., 2019).

La regulación transcripcional de las vías implicadas en el metabolismo de fuentes de carbono no fermentables está en gran medida controlada por el factor de transcripción *CAT8* (Hedges et al., 1995). El gen *CAT8* codifica para una proteína del tipo zinc-finger cluster que media la desrepresión de numerosos genes en la transición entre las fuentes de carbono fermentativas a no fermentativas. *Cat8p* es esencial para la utilización de fuentes de carbono no fermentables y entre sus dianas regulatorias principales se encuentran genes implicados en la gluconeogénesis, la utilización del etanol y el ciclo del glioxilato (Haurie et al., 2001; Randez-Gil et al., 1997).

A altas concentraciones de glucosa, la expresión de *CAT8* se encuentra reprimida por el mecanismo de represión por glucosa (Kayikci & Nielsen, 2015). Sin embargo, cuando las concentraciones de glucosa disminuyen, esta presión es liberada, lo que

permite la activación de Cat8p y con ello, la expresión de genes clave para el metabolismo respiratorio. Por lo tanto, *CAT8* actúa como un regulador clave en la transición metabólica que permite a *S. cerevisiae* la utilización de fuentes de carbono no fermentables como el glicerol, el acetato y el etanol (Randez-Gil et al., 1997).

1.3. Melatonina y función de *PYK2* en *Saccharomyces cerevisiae*

La melatonina es un metabolito producido por *S. cerevisiae* durante el crecimiento y la fermentación alcohólica (Rodríguez-Naranjo et al., 2011). Esta indolamina se sintetiza a partir del triptófano y en levaduras, se ha asociado con funciones protectoras frente al estrés oxidativo y la radiación UV (Sunyer-Figueres et al., 2020; Vázquez et al., 2018). Además, recientemente también se ha demostrado que la melatonina ejerce un efecto protector frente al estrés causado por el etanol, un subproducto común de la fermentación alcohólica (Sunyer-Figueres et al., 2021). Su concentración a pesar de ser baja en bebidas fermentadas (pg-ng/mL), ha demostrado tener efectos bioactivos medibles tras su ingesta (Hornedo-Ortega et al., 2016)

A pesar de que la síntesis de la melatonina durante la fermentación ha sido confirmada, su papel funcional en las células de levadura, así como las señales que desencadenan su producción aún no se comprenden completamente (Fernández-Cruz et al., 2019; Morcillo-Parra et al., 2019; Rodríguez-Naranjo et al., 2012). Recientemente, se ha descrito el perfil de síntesis de la melatonina durante la fermentación alcohólica, observándose que ésta se produce principalmente durante la fase de latencia del crecimiento, desapareciendo rápidamente del medio intracelular y sin detectarse en el medio extracelular hasta la fase exponencial, donde se observa un pico, con un posible segundo pico en la fase estacionaria (Morcillo-Parra et al., 2019). Al estudiar lo que ocurría con la melatonina entre la detección intracelular y extracelular, se observó que la melatonina estaba interaccionando con un complejo proteico compuesto principalmente por enzimas de la vía glucolítica, como la piruvato quinasa (Pyk2p), enolasa (Eno1p, Eno2p), fructosa-1,6-bisfosfato aldolasa (Fba1p) y gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (Tdh1p, Tdh2p y Tdh3p) (Morcillo-Parra et al., 2019). Además, dicha interacción sólo se producía bajo condiciones fermentativas y exclusivamente en levaduras con alta capacidad fermentativa (Morcillo-Parra et al., 2020; 2025). Recientemente, se ha descrito que la

unión de la melatonina con el complejo proteico ocurre a través de Tdh2p, ya que la delección de este gen elimina dicha interacción (Martín-Esteban, 2025). Por tanto, estudiar el papel del resto de proteínas dentro del complejo resulta fundamental para comprender su organización y posible función. Adicionalmente, hace algunos años, Brandina et al. (2006) identificaron en *S. cerevisiae* un complejo glucolítico posiblemente asociado a la membrana mitocondrial, cuya función podría ser facilitar la entrada a la mitocondria de metabolitos como el piruvato.

Por todo ello, en este trabajo, se plantea estudiar el papel de *PYK2* en este complejo proteico, dado su papel en la regulación del metabolismo energético. El análisis mediante mutantes puede aportar información relevante sobre cómo la ausencia de esta isoforma afecta la señalización metabólica y la respuesta adaptativa de la levadura durante la fermentación y la utilización de diferentes fuentes de carbono. Para este estudio, se empleó la cepa vínica *S. cerevisiae* Lalvin Clos como cepa control, a partir de la cual se generó el mutante $\Delta pyk2$ mediante la técnica de edición génica CRISPR-Cas9. El análisis de este mutante permitió profundizar en el papel específico de *PYK2* en la adaptación metabólica y el crecimiento de *S. cerevisiae* bajo distintas condiciones nutricionales. Asimismo, se pretendía evaluar el impacto de la ausencia de Pyk2p sobre la composición y funcionalidad del complejo proteico asociado.

2. Hipótesis y Objetivos

La delección del gen *PYK2* altera la organización y funcionalidad del complejo glucolítico, lo que podría afectar su interacción con la melatonina y modificar la respuesta metabólica de la levadura durante la fermentación.

Con el fin de comprender cómo esta mutación afecta al metabolismo de *S. cerevisiae*, se plantean los siguientes objetivos:

1. Comparar el crecimiento de la cepa mutante $\Delta pyk2$ con la cepa control Lalvin Clos en medios con diferentes fuentes de carbono, tanto fermentables como no fermentables
2. Evaluar y cuantificar las diferencias en el consumo de sustratos y la producción de metabolitos durante el crecimiento en las distintas condiciones nutricionales.

3. Analizar la expresión de genes clave implicados en las vías metabólicas de fermentación y respiración, con el fin de identificar posibles alteraciones en la señalización y adaptación metabólica asociadas a la delección de *PYK2*.

3. Materiales y Métodos

3.1. Cepas y condiciones de cultivo

En este estudio se utilizó la cepa vínica comercial de *S. cerevisiae*, Lalvin Clos (Lallemand S.A, Canadá), como control, y una mutante derivada de esta con delección en el gen *PYK2*. Además, se trabajó con la cepa de laboratorio *BY4742* (Euroscarf) y su mutante correspondiente *BYΔpyk2* (Euroscarf).

La cepa Lalvin Clos fue seleccionada por el Grupo de Investigación en Biotecnología Enológica de la URV por su implantación y fiabilidad en condiciones enológicas exigentes. Pertenece a la especie *S. cerevisiae* y su velocidad de fermentación, rápida y regular, la convierte en una herramienta adecuada para el control de la fermentación alcohólica (Lallemand Oenology, 2025).

Por otro lado, la cepa *BY4742*, es una cepa de laboratorio derivada de la cepa de laboratorio *S. cerevisiae* S288C. Es auxótrofa para histidina, leucina, lisina y uracilo. Por ello, es ampliamente utilizada en estudios genéticos, ya que posee un fondo bien caracterizado y existe una gran disponibilidad de herramientas moleculares para su modificación genética.

Los cultivos se realizaron por triplicado en medio YP (1% (p/v) extracto de levadura y 2% (p/v) peptona (Panreac, Química SLU, Barcelona, España) con diferentes fuentes de carbono: 2% (p/v) glucosa (Panreac, Química SLU), 2% (p/v) galactosa (Sigma-Aldrich, Misuri, EEUU), 2% (p/v) acetato de sodio (Sigma-Aldrich), 1% (v/v) etanol (Panreac, Química SLU), 3% (v/v) glicerol (Sigma-Aldrich) y 1% (v/v) glicerol (Sigma-Aldrich). Para asegurar una adecuada oxigenación, se emplearon matraces bafleados de 500mL con un volumen de 200mL de cultivo y se incubaron a 22°C y 120 rpm, condiciones que favorecen el crecimiento óptimo y reproducible de las cepas estudiadas.

Antes de la inoculación, se realizaron precultivos en medio YPD (2% (p/v) glucosa) con incubación durante 2 días a 22°C. La inoculación se llevó a cabo a una concentración inicial de 2×10^6 células/mL.

3.2. Seguimiento del crecimiento y análisis del consumo de sustratos

Durante el crecimiento, se monitorizó la densidad óptica a 600 nm (OD₆₀₀ nm) a diferentes tiempos para elaborar las curvas de crecimiento de cada cepa en las distintas condiciones.

Por otro lado, se determinó el punto final de los crecimientos mediante el multianalizador Y15 de BioSystems (Barcelona, España), midiendo el consumo de la fuente de carbono utilizando kits enzimáticos específicos. Concretamente, se utilizaron kits de la marca BioSystems para la determinación de la glucosa (ref. 12800), glicerol (ref. 12812) y etanol (ref. 12847). Estos kits permiten la cuantificación de los metabolitos mediante métodos enzimáticos acoplados. Posteriormente, se analizó la producción de diferentes metabolitos mediante cromatografía líquida de alta resolución (HPLC).

El HPLC se empleó para evaluar el consumo de las diferentes fuentes de carbono (especialmente aquellas de las que no disponíamos kit enzimático para su determinación con el multianalizador Y15) y la producción de metabolitos en cada punto de la curva de crecimiento. El HPLC utilizado fue un Agilent 1100 (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania) según el protocolo descrito previamente por Quirós et al., (2010). El equipo HPLC estaba equipado con una columna Hi-Plex H (300mm x 7,7mm), ubicada en un compartimento de columna 1260 MCT (termostato multicolumna Infinity II) y conectado a un detector de longitud de onda múltiple (MWD) y un detector de índice de refracción 1260 Infinity II (Agilent Technologies, Waldbronn, Alemania). La fase móvil utilizada fue de H₂SO₄ 5mM con un caudal de 0,6 mL/min durante 30 minutos de ejecución. El volumen de inyección fue de 10 µL y previa a la inyección, las muestras fueron filtradas con filtros de 0,22 µm (Dominique Dutscher, Brumath, Francia). Las muestras fueron centrifugadas durante 2 minutos a 12.000 rpm, y congeladas a -20°C hasta su análisis. Esto permitió comparar la actividad metabólica de las cepas control y mutante en función del sustrato disponible.

3.3. Comprobación de la pureza y verificación genotípica

3.3.1. Control de pureza microbiológica

Con el objetivo de asegurar la validez de los resultados obtenidos se realizó la siembra de alícuotas de los cultivos en placas de medio YPD agar (YPD líquido con 1,7% (p/v) agar (Panreac, Química SLU, Barcelona, España)). Se sembraron 100 µL de diluciones seriadas de los cultivos en dos puntos del experimento; a las 48h (aproximadamente al final de la fase exponencial) y al final del crecimiento. Las placas se incubaron a 28°C durante 48-72 horas, con el fin de descartar posibles contaminaciones de origen bacteriano mediante la observación de las colonias crecidas.

3.3.2. Verificación genotípica por PCR

Para la detección genotípica, se extrajo ADN genómico de las cepas y se realizaron dos PCRs específicas. La extracción de ADN se realizó a partir de cultivos en medio YPD, siguiendo un protocolo basado en digestión enzimática de la pared celular con zimoliasa y posterior lisis con SDS. Se añadió acetato de potasio para precipitar las proteínas y se recuperó el ADN por precipitación con isopropanol, seguido de un lavado con etanol al 70%. Finalmente, el ADN se resuspendió en tampón de elución (Tris-EDTA). El protocolo detallado se encuentra en el Anexo 8.1.2 (Adaptado de Querol et al., 1992).

Para la comprobación de la cepa de *S. cerevisiae*, y descartar posibles contaminaciones con otras cepas de la misma especie, se amplificaron los elementos delta, técnica descrita por Legras & Karst (2003), con los primers delta 12 y 21. La composición del mix y el programa de PCR están descritos en la Tabla 1 y Figura 3a, respectivamente. Los productos de PCR fueron separados por electroforesis en gel 1,5% (p/v) de agarosa teñido con Green Safe (2,5µL por cada 100mL de gel) en tampón TBE 1X a 90V durante 90 minutos. Se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific, EE. UU) y el resultado del gel de agarosa se visualizó con un transiluminador de luz ultravioleta. Los perfiles obtenidos se compararon con el perfil de la cepa comercial Lalvin Clos.

Tabla 1. Composición de la mezcla de reacción de la PCR de los elementos delta.

Interdelta PCR								
Producto	Tampón NH ₄ 10X	MgCl ₂ (50μM)	Primers (10μM)	dNTPs (10μM)	BSA (20mg/mL)	Taq polimerasa (5U/μl)	ADN	H ₂ O
Volumen (μL)	2,5	1,25	5 total (direct+revers)	0,5	0,25	0,1	1	14,4

Por otro lado, se realizó una PCR específica para confirmar la presencia de la mutación $\Delta pyk2$ en las cepas, utilizando primers específicos (A: A/AAAGTCAATGAAAAGTTCTCCACAC y D: D/AACGTGGGAAAGAATTTTACTCAAT) para dicha delección (Giaever & Nislow, 2014). La composición del mastermix así como el programa de PCR se describen en la Tabla 2 y Figura 3b, respectivamente. La visualización de los productos fue similar a la anterior, empleando el marcador de peso molecular de 250bp (Invitrogen).

Tabla 2. Composición de la mezcla de reacción de la PCR mutantes.

PCR comprobación de mutantes							
Producto	Tampón NH ₄ 10X	MgCl ₂ (50μM)	Primers (10μM)	dNTPs (10μM)	ADN	Taq polimerasa (5U/μl)	H ₂ O
Volumen (μL)	5	3	2 total	0,5	1	0,5	37,5

De esta forma, el análisis de los productos de PCR mediante electroforesis en gel de agarosa permitió confirmar la identidad de la cepa de *S. cerevisiae* mediante el patrón característico de las regiones delta, así como la presencia o ausencia de del gen *PYK2* en las distintas cepas analizadas.

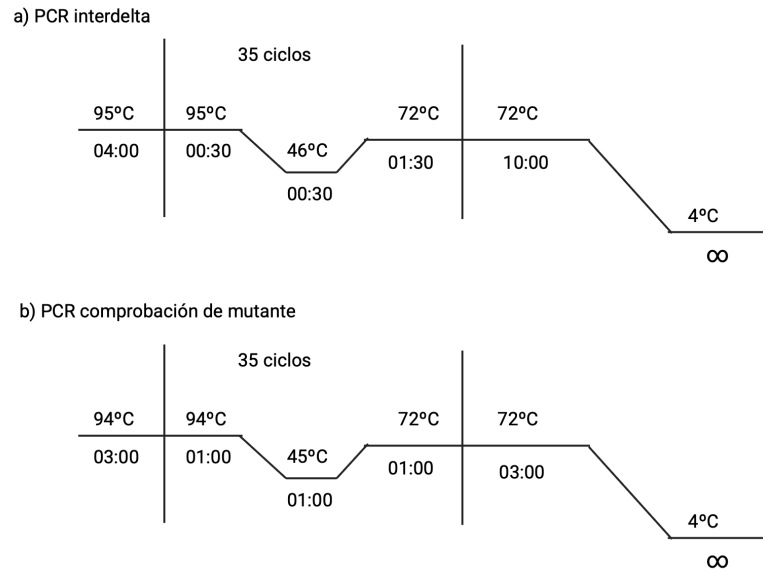


Figura 3. Programas de PCR. a) PCR elementos delta, b) PCR comprobación de los mutantes $\Delta pyk2$.

3.4. Análisis de la expresión génica por PCR cuantitativa

Para el estudio de la expresión génica de algunos genes de interés, se recogieron muestras de cultivo a distintos tiempos (6, 24, 30, 48, 72 y 144 horas) durante el crecimiento en medios con glucosa y galactosa. La cantidad de cultivo utilizada para obtener el pellet varió según la densidad celular (DO 600 nm), empleando aproximadamente 3,5 unidades de DO 600nm.

Las muestras se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y los pellets se congelaron rápidamente en nitrógeno líquido, para su posterior almacenamiento a -80°C hasta la extracción de ARN.

La extracción de ARN se realizó utilizando el kit GeneMatrix Universal RNA Purification Kit (Eurx Sp. z o.o, Gdańsk, Polonia), siguiendo el protocolo propuesto por el fabricante, descrito en el Anexo 8.1.2. La cantidad y calidad del ARN extraído se evaluó con un espectrofotómetro Nanodrop 1000TM (ThermoFischer Scientific, Massachusetts, EE.UU).

Para eliminar las posibles contaminaciones con ADN genómico, se adaptó el protocolo "Rigorous Dnase Treatment" del kit TURBO DNA-freeTM (Thermo Fisher Scientific) para volúmenes de 20 μL y una concentración aproximada de 320 ng/ μL

de ARN. Este tratamiento consiste en la digestión del ADN mediante una DNasa específica, seguida de la inactivación de la enzima mediante un reactivo que precipita y permite separar el ARN libre de ADN por centrifugación. El protocolo completo se detalla en el Anexo 8.1.3.

La retrotranscripción se llevó cabo con la enzima SuperScript II Reverse Transcriptase (Invitrogen), utilizando oligos dT (12-18 nucleótidos, Invitrogen). El protocolo, descrito en el Anexo 8.1.4, consistió en mezclar 12 μ l de ARN con 1 μ l de oligo dT, incubar a 70°C durante 5 minutos, seguido de un enfriamiento en hielo por 1 minuto. Posteriormente, se añadieron 4 μ l de tampón 5X, 1 μ l de dNTPs (10 μ M), 1 μ l DTT (0,1M) y se incubó a 42°C durante 5 minutos. Finalmente, se incorporó 1 μ l de la transcriptasa reversa y la mezcla se incubó a 42°C durante 50 minutos, seguida de una incubación a 70°C durante 15 minutos para inactivar la enzima. Además, se incluyó un control negativo sin transcriptasa reversa (no-RT) para cada muestra, con el fin de descartar la presencia de ADN genómico residual.

Por último, se realizó la qPCR por duplicado para cada muestra y controles negativos (sin cDNA y sin retrotranscripción). Las amplificaciones se llevaron a cabo en el equipo QuantStudio 5 Real-Time PCR System, 96 well, 0,2 mL, desktop (Thermo Fisher Scientific), utilizando el kit TB Green Premix Ex Taq II (Takara Bio Inc., Shiga, Japón), que emplea el colorante intercalante TB Green junto con Rox dye como colorante pasivo. Se analizaron los genes *CAT8*, *CYC1* y *PDC2*, utilizando como gen de referencia *ACT1* y *TAF10*.

Para el análisis de expresión génica, se utilizaron los valores de Ct (cycle threshold) obtenidos para cada gen diana y los genes de referencia. Se calculó el valor Δ Ct como la diferencia entre el Ct del gen de interés y el Ct del gen de referencia, y posteriormente el $\Delta\Delta$ Ct para comparar entre las condiciones experimentales frente al control a 6h. Los resultados de expresión relativa se obtuvieron mediante el método $2^{-\Delta\Delta$ Ct}. Las condiciones específicas de la qPCR así como los primers utilizados se describen en la Tabla 3, Tabla 4 y Figura 4.

Tabla 3. Composición de la mezcla de reacción de qPCR

qPCR análisis							
Producto	Primer directo (10µM)	Primer reverso (10µM)	ROX reference Dye (50X)	TB Green Premix Ex Taq II (2X)	ADN	H ₂ O	Total
Volumen (µL)	0,8	0,8	0,08	10	2	6,32	20

Tabla 4. Secuencia de los primers utilizados en la qPCR

Primers de qPCR		
Gen	Primer directo 5'→3'	Primer reverso 3'→5'
<i>ACT1</i>	TGGATTCCGGTGATGGTGTT	CGGCCAAATCGATTCTCAA
<i>TAF10</i>	ATATTCCAGGATCAGGTCTTCCGTAGC	GTAGTCTTCTCATTCTGTTGATGTTGTTGTTG
<i>CAT8</i>	AGCGATAAATTACTGAGGAAAG	CCGTTGATGTCTGTGGTC
<i>PDC2</i>	GACGAACAACACCCAAGATAC	CAGACAACAAAGCACCGAC
<i>CYC1</i>	GGTCAAGCTGAAGGGTATTCGT	CGTCCACAACACGTTTTTCT

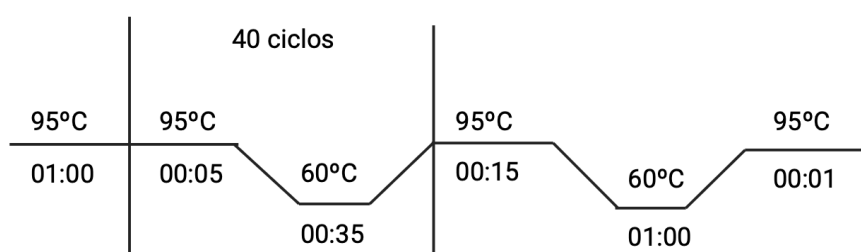


Figura 4. Programa de qPCR utilizado

3.5. Análisis estadístico de la expresión génica

Los valores de expresión relativa obtenidos mediante el método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ se transformaron a \log_{10} para facilitar la visualización y comparación de los datos. Para cada condición experimental se calcularon la media y la desviación estándar de las réplicas.

Se utilizó la prueba *t* de Student para muestras independientes para comparar los distintos tiempos respecto al punto de control a las 6 horas. Se consideraron diferencias estadísticamente significativas cuando $p < 0,05$.

4. Resultados y Discusión

4.1. Análisis del crecimiento de las cepas en diferentes fuentes de carbono

Para evaluar el impacto de la delección del gen *PYK2* en el metabolismo de la cepa vínica Lalvin Clos, se realizaron diferentes crecimientos con ambas cepas, la cepa comercial y su mutante $\Delta pyk2$ en medio rico (YP) con distintas fuentes de carbono: glucosa 2% (p/v), galactosa 2% (p/v), glicerol 1% y 3% (v/v) y etanol 1% (v/v).

En las condiciones de glucosa, tanto la cepa parental Lalvin Clos como su mutante $\Delta pyk2$ fueron capaces de crecer. Sin embargo, el mutante $\Delta pyk2$ presentó una OD máxima inferior, lo que sugiere que *PYK2* podría contribuir a una mayor eficiencia del metabolismo fermentativo, como se puede observar en la Figura 5.

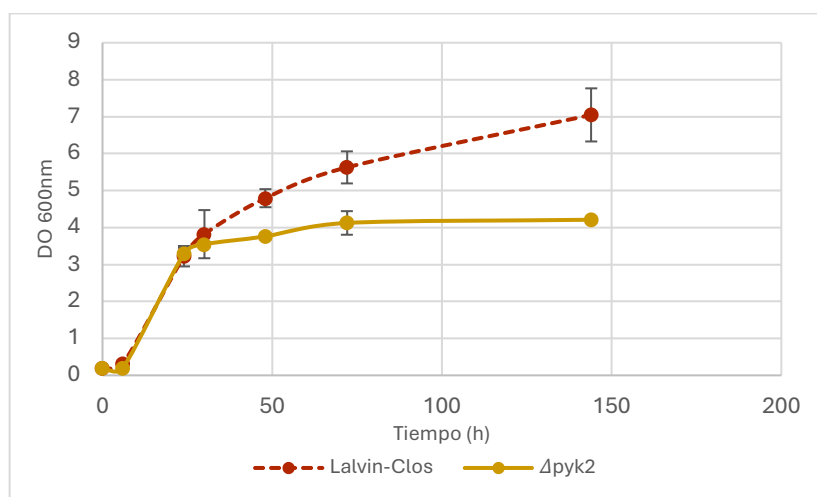


Figura 5. Crecimiento *S. cerevisiae* Lalvin Clos y su mutante $\Delta pyk2$ en glucosa al 2% (p/v). Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

En el caso de la galactosa, la cepa Lalvin Clos mostró un crecimiento marcado entre las 6 y 24 h, alcanzando un valor máximo de OD cercano a 8,2. En cambio, el mutante

$\Delta pyk2$ apenas mostró crecimiento en ese intervalo, manteniendo una fase de latencia de aproximadamente 24 h frente a las 4-8 h de la cepa Lalvin Clos. Además, el mutante alcanzó aproximadamente la mitad de la OD máxima de la cepa parental, con un valor de 4 (Figura 6). Estas diferencias temporales y en magnitud de crecimiento podrían estar influidas por la delección *PYK2*, pero no se ha encontrado literatura previa que describa este efecto.

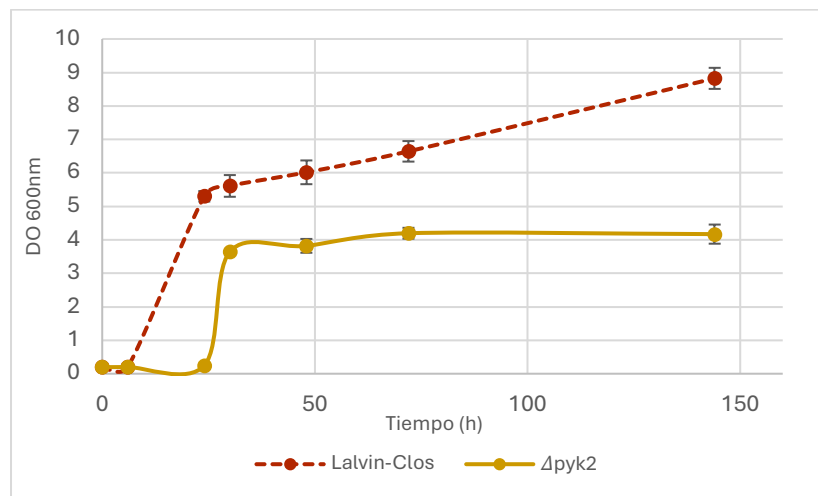


Figura 6. Crecimiento de *S. cerevisiae* Lalvin Clos y $\Delta pyk2$ en galactosa al 2% (p/v). Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

Para profundizar en las diferencias observadas entre ambas cepas, se analizó el medio de cultivo mediante HPLC con el fin de determinar el perfil de consumo de la fuente de carbono y producción de etanol. En los cultivos con glucosa al 2%, no se observaron diferencias significativas en el consumo de total de sustrato entre Lalvin Clos y su mutante (Figura 7A), a pesar de las distintas tasas de crecimiento observadas (Figura 5). Por el contrario, en los cultivos con galactosa, Lalvin Clos consume la totalidad del sustrato alrededor de 18 horas antes que la mutante $\Delta pyk2$ (Figura 8A), lo que pone de manifiesto la menor eficiencia en la utilización de galactosa por parte de la cepa mutante.

Además, se observó que Lalvin Clos es capaz de reutilizar el etanol producido durante la fermentación en condiciones aerobias (Figuras 7B y 8B), lo que le permite prolongar su fase de crecimiento, generando estas mayores tasas de crecimiento comentadas anteriormente. En contraste, el mutante $\Delta pyk2$ no consume el etanol generado (Figuras 7B y 8B), lo que sugiere una limitación funcional en el metabolismo respiratorio.

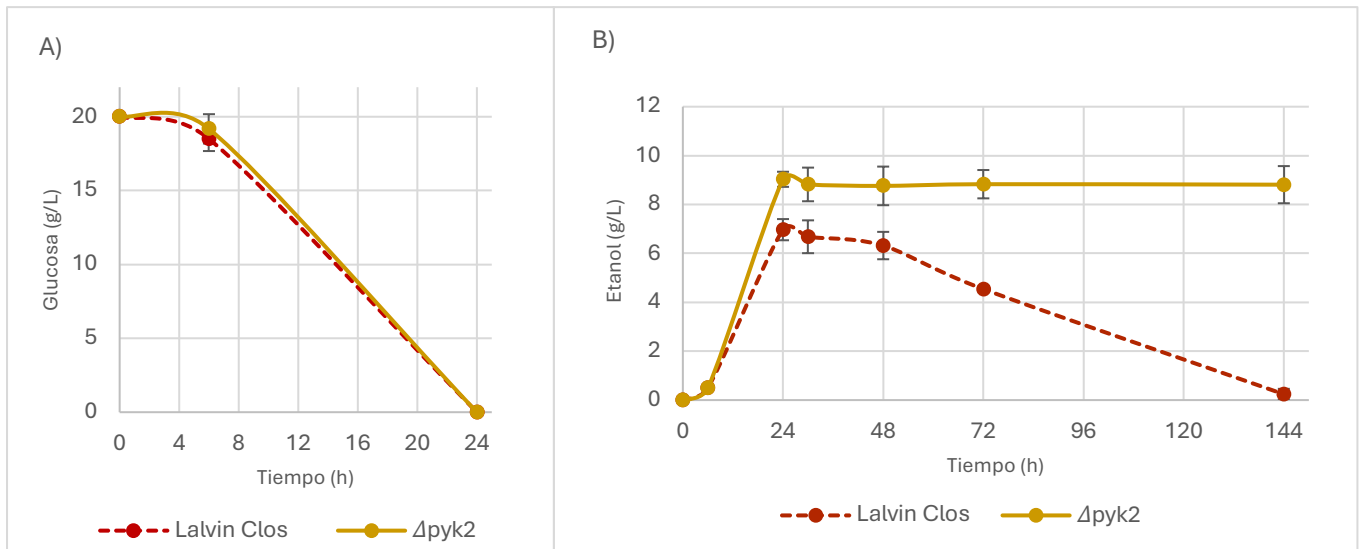


Figura 7. Comparativa de las cepas Lalvin Clos y su mutante $\Delta pyk2$ en medio glucosa al 2% (v/v). Consumo de la glucosa (A) y producción de etanol (B) a lo largo del tiempo. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

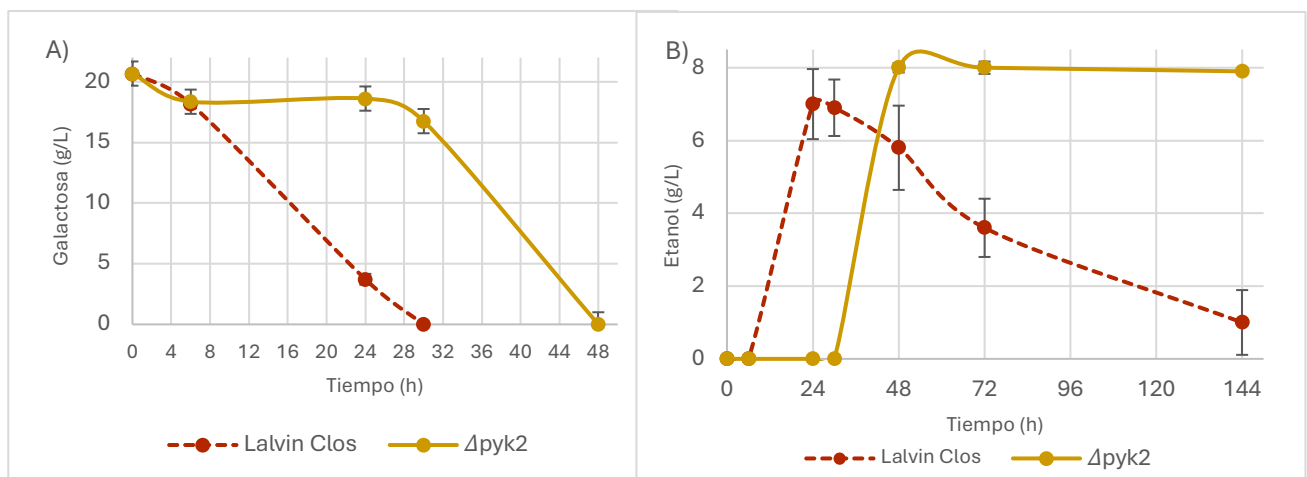


Figura 8. Comparativa de las cepas Lalvin Clos y su mutante $\Delta pyk2$ en medio galactosa al 2% (v/v). Consumo de la galactosa (A) y producción de etanol (B) a lo largo del tiempo. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

Para explorar el papel de *PYK2* en condiciones estrictamente respiratorias, se utilizaron fuentes de carbono no fermentables como el glicerol. Inicialmente, se utilizó un medio con 3% (v/v) de glicerol, y en esta condición, la cepa parental fue capaz de crecer lentamente, alcanzando la fase estacionaria alrededor de las 72h. Sin embargo, el mutante $\Delta pyk2$ no mostró ningún crecimiento como se puede observar en la Figura 9A. Además, como se puede ver en la Figura 9B, Lalvin Clos no fue capaz de agotar completamente el glicerol presente en el medio.

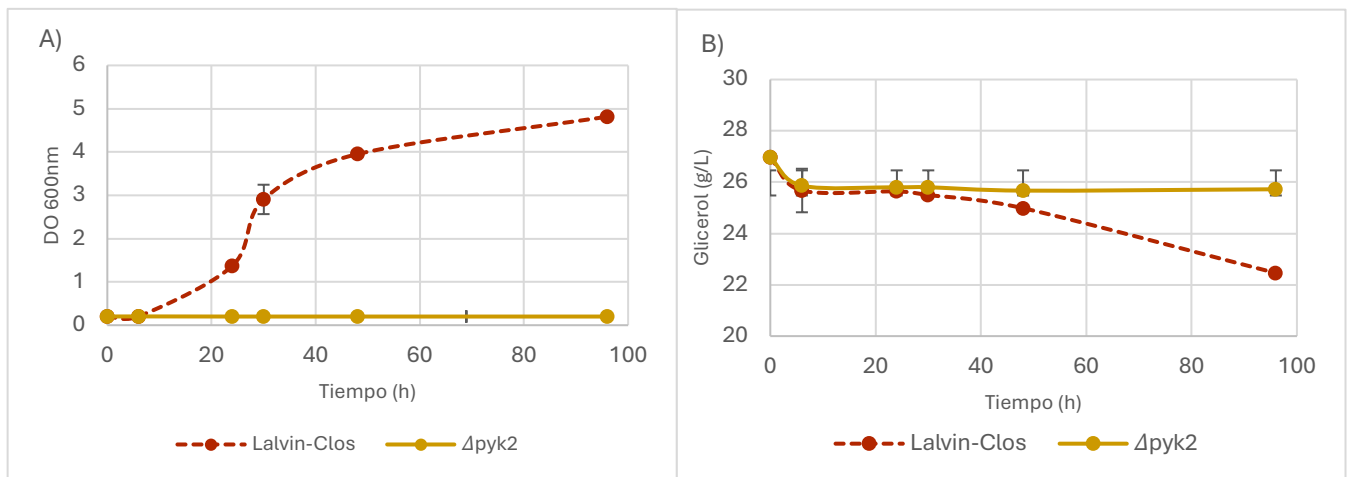


Figura 9. Comparativa de las cepas Lalvin Clos y su mutante $\Delta pyk2$ en medio glicerol al 3% (v/v). A) Crecimiento medido como OD 600 nm. B) Consumo del glicerol a lo largo del tiempo. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

Dado que no se observó un agotamiento total del sustrato en la condición anterior (glicerol 3% (v/v)), se realizaron nuevos cultivos utilizando glicerol al 1% para evaluar si una reducción en la concentración del sustrato podía alterar el comportamiento observado en la cepa mutante. No obstante, la cepa Lalvin Clos continuó mostrando un crecimiento típico de una fuente de carbono no fermentable, mientras que la mutante $\Delta pyk2$ mantuvo la ausencia de crecimiento. Este patrón se repite en medio con etanol al 1%, lo que sugiere una limitación en el metabolismo respiratorio del mutante. Las Figuras 10A y 11A muestran las curvas de crecimiento en estas condiciones, mientras que en las Figuras 10B y 11B se observa la falta de consumo de sustrato en la cepa mutante, en contraste con el consumo total en la cepa parental.

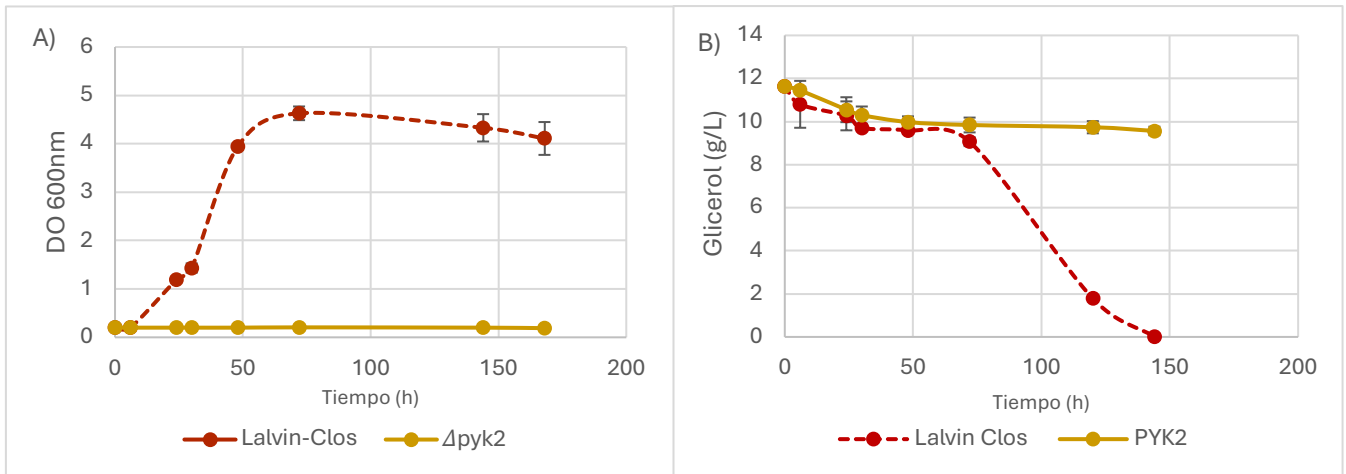


Figura 10. Comparativa de las cepas Lalvin Clos y su mutante $\Delta pyk2$ en medio glicerol al 1% (v/v). A) Crecimiento medido como OD 600 nm. B) Consumo del glicerol a lo largo del tiempo. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

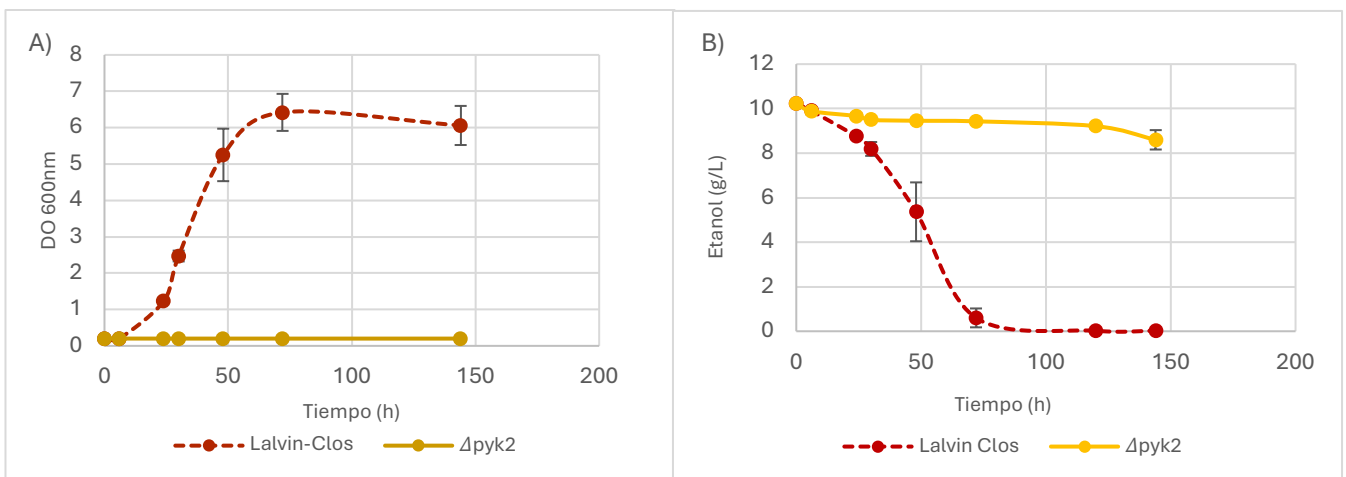


Figura 11. Comparativa de las cepas Lalvin Clos y su mutante $\Delta pyk2$ en medio etanol al 1% (v/v). A) Crecimiento medido como OD 600 nm. B) Consumo del etanol a lo largo del tiempo. Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

En conjunto, los resultados obtenidos con el mutante $\Delta pyk2$ no fueron los esperados, ya que, según la literatura, la delección de este gen no tiene alteración fenotípica aparente (Boles et al., 1997). Esto no concuerda con los resultados obtenidos en el mutante $\Delta pyk2$ en la cepa Lalvin Clos, el cual no es capaz de crecer en fuentes de carbono no fermentables.

4.2. Verificación genotípica de las cepas

Tras observar el comportamiento de la cepa mutante $\Delta pyk2$ en condiciones respiratorias, se procedió a confirmar la identidad de la cepa utilizada y la presencia de la deleción del gen *PYK2*, con el fin de descartar posibles errores en el manejo de las muestras.

En primer lugar, se realizó la extracción de ADN genómico de la cepa parental y mutante, seguida de un análisis por PCR de los elementos delta, una técnica ampliamente utilizada para la caracterización de cepas de *S. cerevisiae*. Los patrones obtenidos tras la electroforesis, aunque no muy claros, confirmaron que ambas cepas presentaban el mismo perfil de bandas, el correspondiente a la cepa vínica Lalvin Clos (Figura 12), confirmando que no existía contaminación por otras cepas.

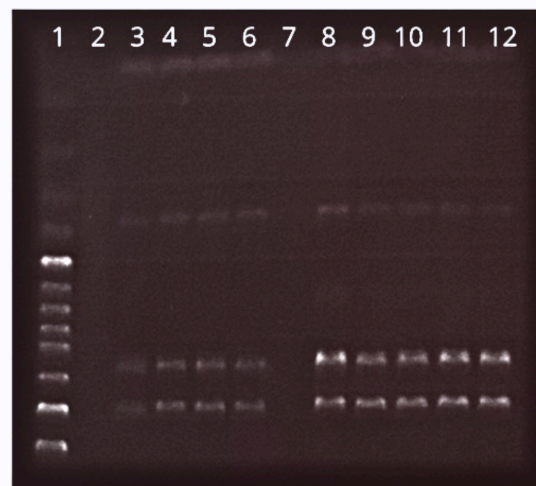


Figura 12. Análisis por PCR de los elementos delta para la confirmación de identidad genética de las cepas. Se muestran los perfiles de amplificación obtenidos para la cepa parental Lalvin Clos (carriles 3–6) y su cepa mutante $\Delta pyk2$ (carriles 8–12). Ambos patrones son idénticos, lo que confirma que derivan del mismo fondo genético. El carril 1 corresponde al marcador de peso molecular 100 bp, y los carriles 2 y 7 a controles negativos, sin ADN.

Por otro lado, para verificar la deleción del gen *PYK2* en la cepa mutante, se realizó una PCR con primers específicos sobre la región delecionada. En la Figura 13, se muestra el resultado de la amplificación tras una electroforesis en gel de agarosa al 1,7% (p/v). Los carriles 2 y 11 corresponden a la cepa parental Lalvin Clos, en los cuales se detecta una banda de mayor tamaño, correspondiente al alelo wild-type del gen *PYK2*. Por lo contrario, los carriles 3 al 10, correspondientes al mutante $\Delta pyk2$ muestran la presencia de una banda situada ligeramente por debajo de las parentales,

coherente con la eliminación de un fragmento de aproximadamente 173 pb. Estas diferencias confirman la existencia de una deleción específica en la región esperada del genoma, validando la identidad de la mutante empleada en los diferentes cultivos.

Aunque la diferencia de tamaño es pequeña y un gel con menor concentración de agarosa y una mayor migración podrían mejorar la resolución de las bandas, la separación observada es suficiente para distinguir los alelos, ya que ninguna banda de las muestras mutantes toca la línea de las parentales. En futuras repeticiones se debería optimizar estas condiciones para una mejor visualización.

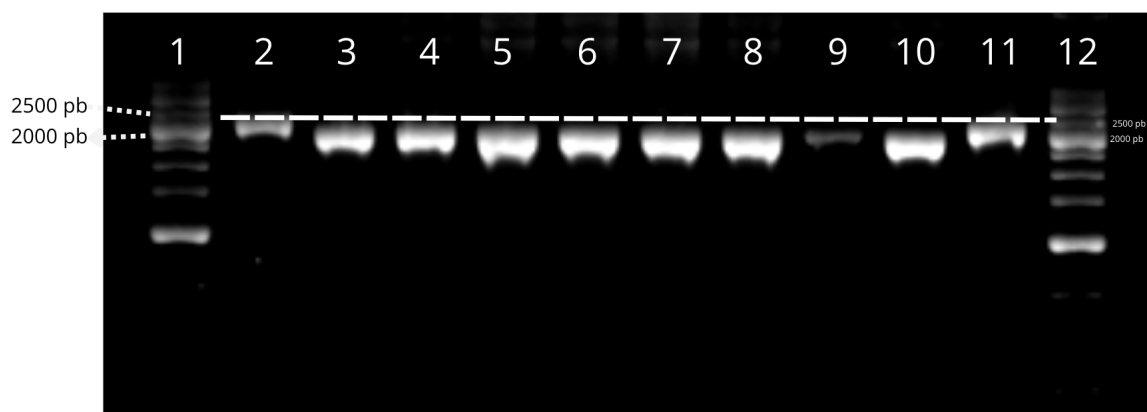


Figura 13. PCR de verificación de la deleción del gen *PYK2*. El gel contiene 12 carriles: el carril 1 y el carril 12 corresponden al marcador de peso molecular de 250pb. Los carriles 2 y 11 muestran la banda correspondiente a la cepa parental Lalvin Clos. Los carriles 3 al 10 contienen muestras independientes de la cepa mutante $\Delta pyk2$. La banda observada en la mutante aparece desplazada hacia abajo respecto a la parental, lo que coincidiría con la deleción de un fragmento de 173 pb.

Además, se contaba con la secuencia completa del genoma tanto de la cepa parental como de la cepa mutante, lo que permitió realizar un análisis comparativo detallado. Junto con la verificación mediante PCR, se revisaron los datos de la secuenciación de la cepa mutante confirmando la presencia de la deleción del gen *PYK2*. Sin embargo, al analizar el genoma de ambas cepas se detectó una deleción adicional no esperada, ya que la cepa mutante $\Delta pyk2$ también presentaba una deleción importante en el ADN mitocondrial. Esta deleción abarca aproximadamente 63 kb del ADN mitocondrial e implica la pérdida de varios genes esenciales para la respiración celular. Los genes ausentes son *COX1*, *COX2*, *COX3*, *ATP6*, *ATP8*, *ATP9* y *COB*, todos ellos implicados en el funcionamiento de los complejos III, IV y V de la cadena respiratoria mitocondrial (Franco et al., 2020; García-Villegas et al., 2017).

La eliminación de estos genes compromete la capacidad de la levadura para llevar a cabo una respiración funcional (Flores-Mireles et al., 2023; Yang et al., 2022), lo que permite explicar la ausencia de crecimiento observada en los cultivos con condiciones respiratorias. Por lo tanto, el fenotipo observado en el mutante $\Delta pyk2$ no puede atribuirse directamente a la deleción de *PYK2* sino a la alteración del genoma mitocondrial que afecta al metabolismo energético de la célula.

En la Figura 14 se muestra un esquema representativo del genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*, indicando la región eliminada y los genes afectados por la deleción presente en la levadura mutante.

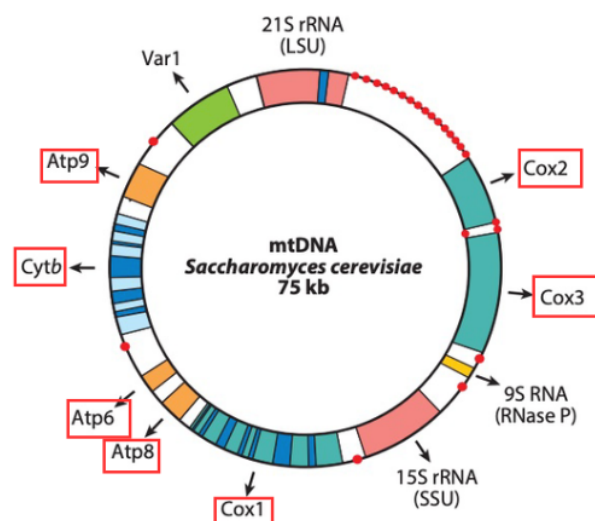


Figura 14. Esquema general del genoma mitocondrial de *S. cerevisiae*. La imagen representa la organización típica de un genoma mitocondrial completo (aproximadamente 75 kb). En el caso de Lalvin Clos, la cepa parental presenta un genoma mitocondrial de 83 kb, de los cuales, en la cepa mutante $\Delta pyk2$, se ha identificado una deleción de 63 kb. Los genes delecionados están indicados mediante recuadros rojos. Adaptado de Ott et al. (2016).

4.3. Evaluación del efecto de la deleción del gen *PYK2* en un fondo genético alternativo

Para contextualizar los efectos observados en la mutante $\Delta pyk2$ de la cepa única Lalvin Clos, se evaluó el crecimiento de la cepa de laboratorio BY4742 y su mutante $\Delta pyk2$ utilizando galactosa y acetato al 2% (p/v) y etanol y glicerol al 1% (v/v) como fuentes de carbono, en comparación con lo observado en la cepa Lalvin Clos y su mutante.

En galactosa, las cepas BY mostraron un crecimiento significativamente inferior, alcanzando una densidad óptica a 600 nm aproximadamente 3 unidades menor que la cepa Lalvin Clos (Figura 15). Además, ambas cepas parentales presentaron un crecimiento diaúxico, con una fase estacionaria transitoria entorno a las 24 horas, seguida de una nueva fase exponencial. Este segundo crecimiento coincide con la reutilización del etanol generado durante la fermentación de la galactosa, confirmado por el análisis del medio de cultivo por HPLC. Estos resultados sugieren que el metabolismo de la cepa Lalvin Clos es más eficiente en galactosa, en comparación con la cepa de laboratorio. Por otra parte, la mutante $\Delta pyk2$ tuvo una fase de latencia de aproximadamente 24 horas, alcanzando la fase estacionaria alrededor de las 48 horas, con una población máxima claramente inferior su cepa parental, resultados similares a los presentados en el primer apartado. Cabe destacar que, a diferencia de lo observado con el mutante $\Delta pyk2$ de la cepa Lalvin Clos, el mutante $\Delta pyk2$ de la cepa BY4742 no presenta diferencias apreciables en el crecimiento respecto a su cepa parental, lo que coincide con lo descrito por Boles et al. (1997), quienes demostraron que la delección de *PYK2* no provocaba ningún cambio de fenotipo en estas condiciones.

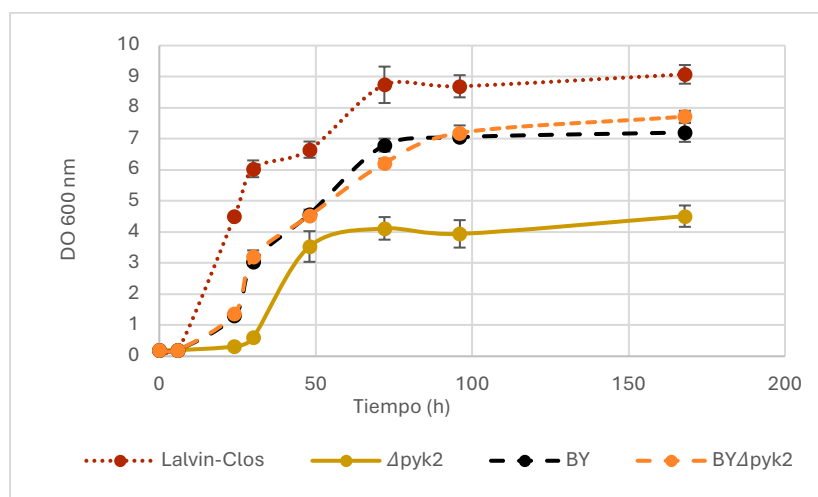


Figura 15. Crecimiento comparativo de *S. cerevisiae* Lalvin Clos, $\Delta pyk2$, BY4742 y BY $\Delta pyk2$ en galactosa al 2% (p/v). Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

En medio con acetato al 2% (p/v), tanto la cepa Lalvin Clos como las cepas BY4742 y BY $\Delta pyk2$ fueron capaces de crecer, presentando una reducción notable en su crecimiento total (OD), esperable por la fuente de carbono empleada (Figura 16). La

cepa Lalvin Clos mostró un mejor crecimiento que la cepa de laboratorio BY4742 con una fase de latencia más corta y una mayor densidad óptica final. Por otro lado, la cepa BY Δ pyk2 también fue capaz de crecer. En cambio, la cepa Δ pyk2 de Lalvin Clos no creció en este medio, lo que indica su incapacidad para utilizar el acetato como única fuente de carbono. Esta incapacidad puede atribuirse a que el metabolismo del acetato requiere una vía respiratoria funcional (Xiberras et al., 2019), lo que sugiere que la disfunción mitocondrial del mutante Δ pyk2 impide el uso de sustratos no fermentables.

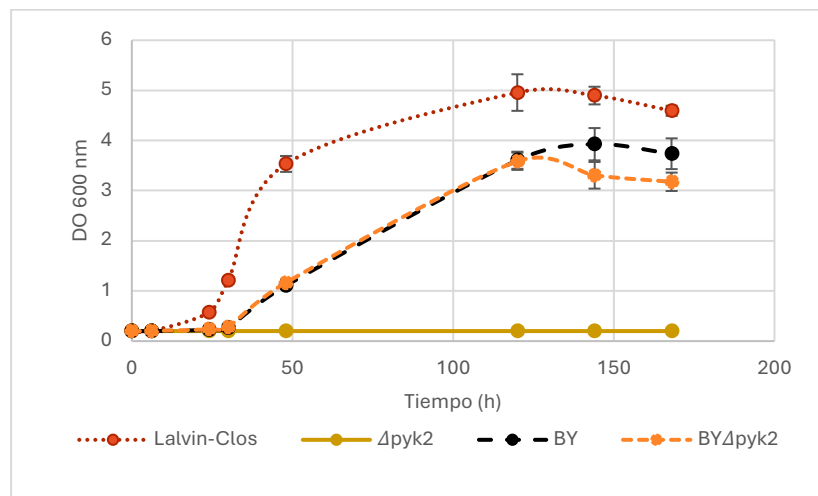


Figura 16. Crecimiento comparativo de *S. cerevisiae* Lalvin Clos, Δ pyk2, BY4742 y BY Δ pyk2 en acetato al 2% (p/v). Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

En las condiciones con glicerol y etanol al 1% (v/v), únicamente se evaluó el crecimiento de BY Δ pyk2. Debido a limitaciones temporales, no se dispuso de datos correspondientes a la cepa parental BY en estas condiciones. Sin embargo, la capacidad de crecimiento observada en BY Δ pyk2 en la figura 17 sugiere que la delección del gen *PYK2* no afectaba de forma significativa el metabolismo respiratorio en este fondo genético. Este comportamiento contrastaba con la ausencia total de crecimiento en Δ pyk2 bajo las mismas condiciones, lo que indica que el defecto respiratorio observado en esta última muy probablemente se debe a la alteración mitocondrial previamente identificada y no a la delección del gen *PYK2*.

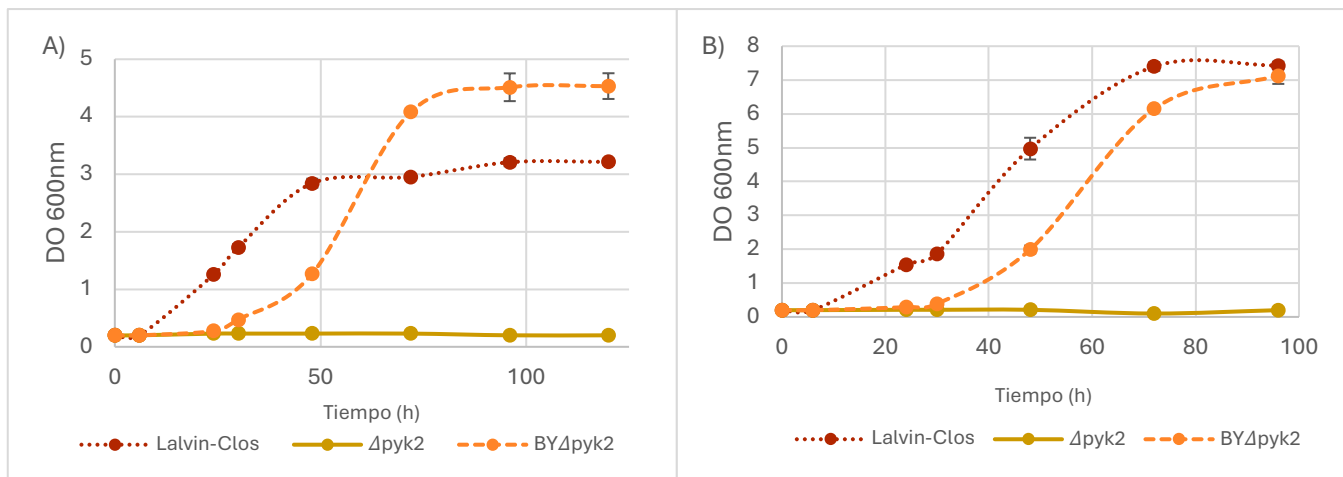


Figura 17. Crecimiento comparativo de *S. cerevisiae* Lalvin Clos, $\Delta pyk2$ y BY $\Delta pyk2$. A) Crecimiento en glicerol al 1% (v/v). B) Crecimiento en etanol al 1% (v/v). Datos expresados como promedio \pm desviación estándar de tres réplicas biológicas.

4.4. Expresión relativa de genes clave en el metabolismo del carbono

Con el fin de comprender las posibles diferencias en la regulación del metabolismo del carbono entre la cepa parental de Lalvin Clos y su mutante $\Delta pyk2$, se planteó el análisis de la expresión de genes clave implicados en vías fermentativas y respiratorias. Para ello, se analizaron los niveles relativos de expresión de los genes *CAT8*, *PDC2* y *CYC1* en cultivos de *S. cerevisiae* en medios con glucosa y galactosa al 2% (p/v). La normalización se realizó tomando como referencia los valores para cada gen a las 6 horas de crecimiento, utilizando el gen *TAF10* como gen de referencia debido a su menor variabilidad en comparación con el gen de la actina (*ACT1*).

En medio de glucosa, un sustrato que induce preferentemente el metabolismo fermentativo debido al efecto Crabtree, la expresión de *CAT8*, como se puede ver en la Figura 18, se activaba notablemente a las 24 y 30 horas. Esta activación coincidía con el agotamiento de la glucosa en el medio y la posterior transición diaúxica, momento en el que la levadura debía cambiar a un metabolismo respiratorio, utilizando fuentes de carbono como el etanol generado previamente. *CAT8* actúa como activador de la familia zinc cluster, necesario para la desrepresión de múltiples genes implicados en el metabolismo respiratorio (Hedges et al., 1995). Una vez activado el metabolismo respiratorio, la expresión de *CAT8* se reprimía, reflejando que su función se limita a la transición metabólica y no a una activación sostenida

durante la fase respiratoria como describen Haurie et al. (2001). De esta forma, Lalvin Clos presentaba una actividad de *CAT8* esperable en el cambio diaúxico que experimenta en su crecimiento en glucosa al 2%.

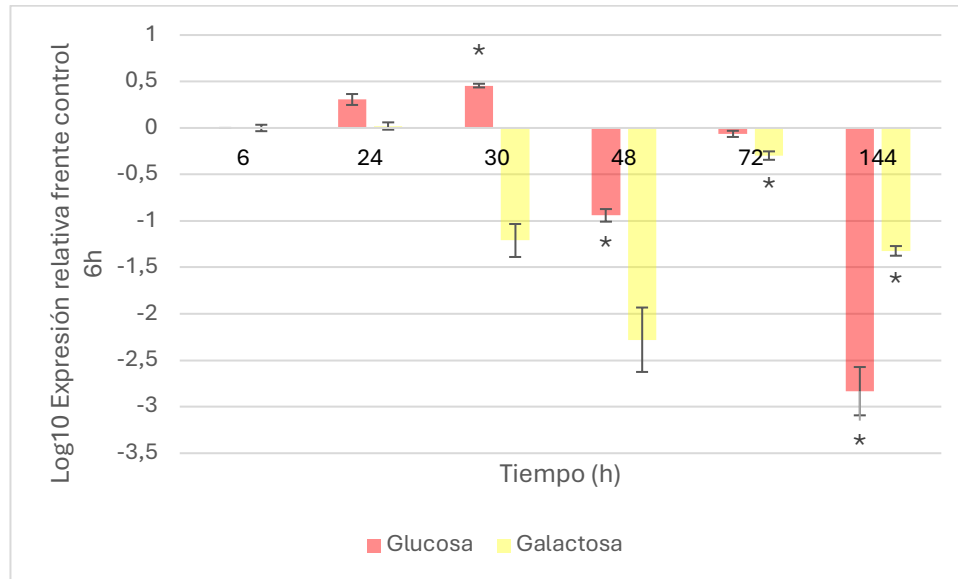


Figura 18. Expresión relativa del gen *CAT8* en la cepa *S. cerevisiae* Lalvin Clos (control) durante el crecimiento en medio con glucosa y galactosa al 2% (p/v). Los valores se representan como \log_{10} de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tomando como referencia el tiempo a 6 horas para cada condición. Las barras representan la media \pm desviación estándar de las réplicas independientes. Comparación estadística frente a 6h realizada test t de Student, $p < 0,05$ (*).

En medio con galactosa, que no ejerce una represión catabólica tan estricta como la glucosa, no era necesaria la activación de *CAT8* para la desrepresión típica del cambio diaúxico, puesto que la levadura puede mantener un metabolismo respiratorio más constante. Sin embargo, aunque *CAT8* no es esencial para la respiración en galactosa, su presencia mejora significativamente la eficiencia respiratoria (Fendt & Sauer, 2010). Por ello, la expresión de *CAT8* en galactosa fue más estable y reprimida en general, reflejando un papel adaptativo en el metabolismo respiratorio, sin la necesidad de una activación pronunciada como la que ocurría al agotarse la glucosa.

En el caso de *PDC2*, este gen codifica el factor de transcripción de la piruvato descarboxilasa, enzima responsable de la conversión del piruvato a acetaldehído durante la fermentación. En glucosa, se observó una expresión baja y reprimida en comparación con las 6 horas iniciales, lo que podía corresponderse con la activación de la respiración tras el agotamiento de la glucosa a las 24 horas. Este agotamiento provocó la desrepresión de genes previamente reprimidos por alta concentración de

glucosa y favoreció el cambio hacia un metabolismo más respiratorio, en el que utilizaba el etanol como fuente de carbono, como indican los resultados de la Figura 7B. Es probable que *PDC2* ya estuviera activado en las fases iniciales para inducir la expresión de la piruvato descarboxilasa, y que su represión posterior refleje la disminución de la fermentación tras el agotamiento del sustrato. Este comportamiento observable en la Figura 19, es coherente con un medio predominantemente fermentativo, en el que la regulación del *PDC2* es reprimida tras la fermentación.

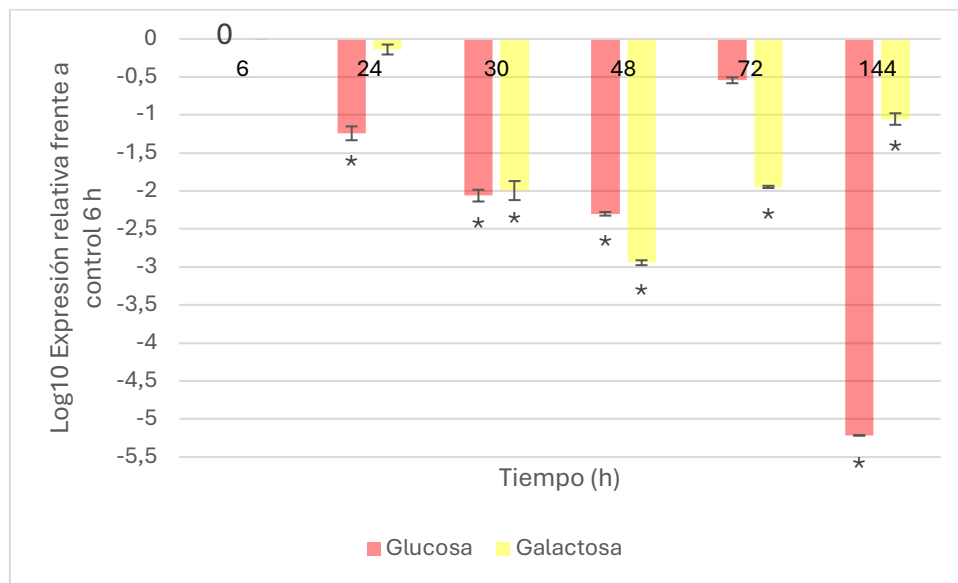


Figura 19. Expresión relativa del gen *PDC2* en la cepa *S. cerevisiae* Lalvin Clos (control) durante el crecimiento en medio con glucosa y galactosa al 2% (p/v). Los valores se representan como \log_{10} de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tomando como referencia el tiempo a 6 horas para cada condición. Las barras representan la media \pm desviación estándar de las réplicas independientes.

Por otro lado, en galactosa, la Figura 18 muestra una dinámica similar en la expresión relativa de *PDC2*, aunque la represión inicial fue menos pronunciada. Este patrón podría indicar que, aunque *PDC2* se encontraba reprimido respecto al valor inicial a las 6h, su menor represión en galactosa permitiría mantener cierta actividad fermentativa durante más tiempo. Esta expresión moderada puede reflejar una transición gradual hacia el metabolismo respiratorio, debido a una represión catabólica menos estricta que frente a la glucosa. Además, Hohmann (1993b) propuso que la regulación de *PDC2* puede incluir mecanismos de autorregulación que responden a la necesidad funcional de la enzima, lo que explica que su expresión se ajuste a la demanda metabólica. Así, *PDC2* podría actuar manteniendo un nivel

adaptativo para controlar la expresión de las isoformas de la piruvato descarboxilasa según las condiciones del medio.

En el caso de *CYC1*, gen que codifica la citocromo c, proteína mitocondrial esencial en la cadena respiratoria (Oechsner et al., 1992), se observaron patrones de expresión diferentes según la fuente de carbono. En medio con glucosa, un pico de expresión se detectó a las 24 horas, seguido de una fuerte represión en los siguientes puntos, como se puede observar en la Figura 20. Este patrón sugiere una represión de la respiración durante la fase de fermentación activa, coherente con la represión ejercida por la glucosa. El aumento de la expresión relativa a las 24 horas probablemente se debe a la eliminación de represión por glucosa, al disminuir significativamente, permitiendo así la activación de genes que inicialmente estaban reprimidos. Posteriormente, la expresión disminuyó y volvió a aumentar a las 72 horas, lo que podría estar relacionado con el inicio del consumo activo de etanol como fuente de carbono. Entre las 24 y 48 horas, la concentración de etanol se reduce en menos de 1g/L, mientras que entre las 48h y las 72 se reduce en al menos 2,5 g/L (Figura 7B), lo que indica un aumento de la actividad respiratoria mitocondrial, coherente con el repunte de *CYC1* observado. A las 144h, la expresión vuelve a descender, posiblemente por una menor disponibilidad de etanol y el inicio de procesos de muerte celular.

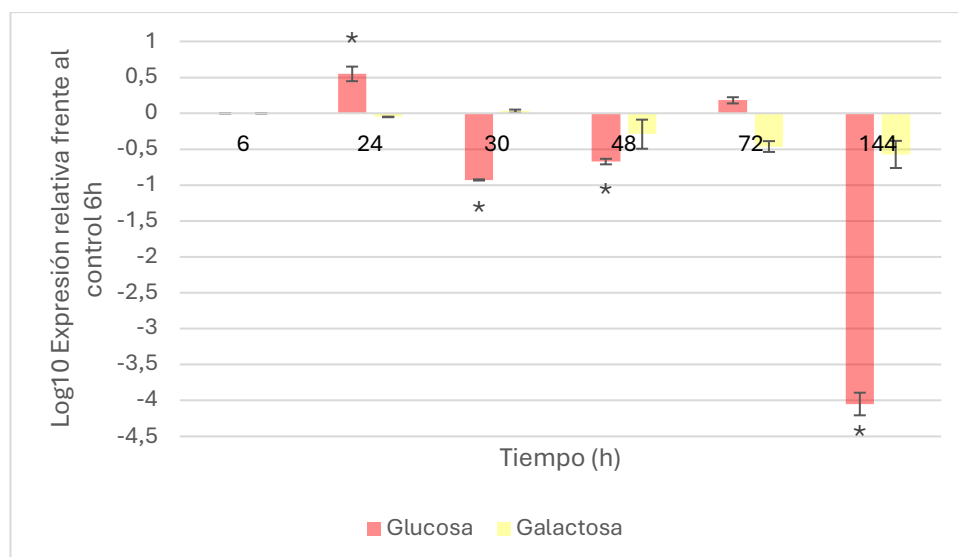


Figura 20. Expresión relativa del gen *CYC1* en la cepa *S. cerevisiae* Lalvin Clos (control) durante el crecimiento en medio con glucosa y galactosa al 2% (p/v). Los valores se representan como \log_{10} de $2^{-\Delta\Delta Ct}$, tomando como referencia el tiempo a 6 horas para cada condición. Las barras representan la media \pm desviación estándar de las réplicas independientes. Comparación estadística frente a 6h realizada test t de Student, $p < 0,05$ (*).

En la Figura 20, la expresión relativa de *CYC1* en medio con galactosa mostró una represión aparente respecto al tiempo inicial a las 6h. Sin embargo, los valores a las 24 y 30 horas también se mantuvieron bajos, lo que implicaba que durante las primeras horas la expresión de este gen se mantuvo prácticamente estable, con una represión notable que se acentuaba a partir de las 48 horas. Esta represión fue menos pronunciada que en glucosa, lo que sugiere que la galactosa ejerce un control catabólico menos estricto sobre los genes respiratorios. Por ello, la expresión de *CYC1* se mantuvo más estable a lo largo del tiempo. Este patrón era coherente con la represión de los genes respiratorios menos marcada, favoreciendo una transición más gradual entre fermentación y respiración. Además, al comparar la expresión a las 6 horas, se observaba que la expresión inicial de *CYC1* era mayor en galactosa que en glucosa, lo que indica que, en condiciones de galactosa, las células mantienen un nivel basal más alto de este gen respiratorio, probablemente para facilitar la función mitocondrial y el metabolismo respiratorio.

En conjunto, los resultados obtenidos para la cepa control *Lalvin Clos* muestran una regulación diferente de los genes *CAT8*, *PDC2* y *CYC1* en función de la fuente de carbono y del estado metabólico de las células. En glucosa se observaba una regulación más marcada asociada a la represión por glucosa y a la transición hacia el metabolismo respiratorio, mientras que, en galactosa la regulación fue más suave.

En el caso de la cepa con delección de *PYK2*, no se pudo obtener una cuantificación fiable de la expresión génica, debido a que los genes de referencia presentaron valores de ciclo umbral superiores a 32 ciclos. Esto sugiere una baja cantidad inicial de ARN mensajero o posibles problemas durante la retrotranscripción del ARN a cDNA. Como resultado, no fue posible obtener datos fiables para analizar la expresión de los genes *CAT8*, *PDC2* y *CYC1* en esta cepa bajo las condiciones estudiadas. Por ello, sería necesario optimizar tanto la extracción y calidad del ARN, como el proceso de retrotranscripción en futuros estudios para obtener resultados fiables y poderlos comparar con los obtenidos con la cepa parental.

Cabe destacar que esta cepa fue generada mediante la técnica CRISPR-Cas9, la cual permite realizar delecciones génicas específicas con alta precisión. Sin embargo, aunque se considera una herramienta fiable, pueden producirse efectos no deseados que pudieran alterar regiones adyacentes o elementos genéticos esenciales para la

viabilidad celular, como ocurrió en este caso. La mutación inducida con CRISPR-Cas9 provocó una delección mitocondrial no deseada, lo que comprometió el metabolismo y la integridad celular. Por lo tanto, aunque el objetivo era una delección dirigida a *PYK2*, en esta ocasión se produjo una alteración más extensa, que dio lugar a un fenotipo completamente inesperado.

Estos hallazgos reflejan no solo las dificultades técnicas derivadas del uso de cepas mutantes comprometidas a nivel metabólico, sino también la importancia de validar las construcciones obtenidas mediante la edición génica. Esta situación subraya la necesidad de realizar controles exhaustivos posteriores a la edición con CRISPR-Cas9, ya que, aunque es considerada herramienta de alta precisión, también puede tener consecuencias biológicas significativas.

5. Conclusiones

La cepa mutante $\Delta pyk2$ de Lalvin Clos no creció en medios respiratorios y mostró un menor crecimiento en fuentes de carbono fermentables en comparación con la cepa parental. En medio con glucosa, la cepa mutante alcanzó una población máxima inferior, a pesar de presentar un consumo de glucosa muy similar. En galactosa, se observó un crecimiento más lento y una menor densidad celular final. Además, la cepa $\Delta pyk2$ fue incapaz de consumir el etanol generado durante la fermentación, lo que sugiere una alteración en la transición hacia el metabolismo respiratorio.

Durante el estudio se detectó la presencia de una mutación mitocondrial en la cepa $\Delta pyk2$, que parece ser la causa de su incapacidad para crecer y metabolizar fuentes de carbono no fermentables. Este efecto no se observó en la mutante $\Delta pyk2$ de la cepa de laboratorio BY4742, que sí creció en fuentes respiratorias, lo que sugiere que los defectos observados en la cepa Lalvin Clos $\Delta pyk2$ no se deben exclusivamente a la delección de *PYK2*.

En conclusión, para evaluar con precisión el papel de *PYK2* en el metabolismo de *S. cerevisiae*, es necesario generar nuevas cepas sin mutaciones adicionales. Esto es clave para comprender su función en el complejo glucolítico y su posible relación con la melatonina.

6. Bibliografía

- Boles, E., Schulte, F., Miosga, T., Freidel, K., Schlüter, E., Zimmermann, F. K., Hollenberg, C. P., & Heinisch, J. J. (1997). Characterization of a glucose-repressed pyruvate kinase (Pyk2p) in *Saccharomyces cerevisiae* that is catalytically insensitive to fructose-1,6-bisphosphate. *Journal of Bacteriology*, *179*(9), 2987–2993. <https://doi.org/10.1128/jb.179.9.2987-2993.1997>
- Botstein, D., Chervitz, S. A., & Cherry, J. M. (1997). Yeast as a model organism. *Science*, *277*(5330), 1259–1260. <https://doi.org/10.1126/science.277.5330.1259>
- Brandina, I., Graham, J., Lemaitre-Guillier, C., Entelis, N., Krasheninnikov, I., Sweetlove, L., Tarassov, I., & Martin, R. P. (2006). Enolase takes part in a macromolecular complex associated to mitochondria in yeast. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1757*(9–10), 1217–1228. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.07.001>
- Casal, M., Cardoso, H., & Leao, C. (1996). Mechanisms regulating the transport of acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, *142*(6), 1385–1390. <https://doi.org/10.1099/13500872-142-6-1385>
- Fendt, S.-M., & Sauer, U. (2010). Transcriptional regulation of respiration in yeast metabolizing differently repressive carbon substrates. *BMC Systems Biology*, *4*, 12. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-4-12>
- Fernández-Cruz, E., Cerezo, A. B., Cantos-Villar, E., Troncoso, A. M., & García-Parrilla, M. C. (2019). Time course of <sc>|</sc>-tryptophan metabolites when fermenting natural grape musts: effect of inoculation treatments and cultivar on the occurrence of melatonin and related indolic compounds. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, *25*(1), 92–100. <https://doi.org/10.1111/ajgw.12369>
- Flores-Mireles, D., Camacho-Villasana, Y., Lutikurti, M., García-Guerrero, A. E., Lozano-Rosas, G., Chagoya, V., Gutiérrez-Cirlos, E. B., Brandt, U., Cabrera-Orefice, A., & Pérez-Martínez, X. (2023). The cytochrome *b* carboxyl terminal

- region is necessary for mitochondrial complex III assembly. *Life Science Alliance*, 6(7), e202201858. <https://doi.org/10.26508/lisa.202201858>
- Franco, L. V. R., Su, C. H., & Tzagoloff, A. (2020). Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase and cytochrome oxidase. *Biological Chemistry*, 401(6–7), 835–853. <https://doi.org/10.1515/hsz-2020-0112>
- García-Villegas, R., Camacho-Villasana, Y., Shingú-Vázquez, M. Á., Cabrera-Orefice, A., Uribe-Carvajal, S., Fox, T. D., & Pérez-Martínez, X. (2017). The Cox1 C-terminal domain is a central regulator of cytochrome c oxidase biogenesis in yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry*, 292(26), 10912–10925. <https://doi.org/10.1074/jbc.M116.773077>
- Giaever, G., & Nislow, C. (2014). The Yeast Deletion Collection: A Decade of Functional Genomics. *Genetics*, 197(2), 451–465. <https://doi.org/10.1534/genetics.114.161620>
- Hampsey, M. (1997). A Review of Phenotypes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 13(12), 1099–1133. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19970930\)13:12<1099::AID-YEA177>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19970930)13:12<1099::AID-YEA177>3.0.CO;2-7)
- Haurie, V., Perrot, M., Mini, T., Jenö, P., Sogliocco, F., & Boucherie, H. (2001). The Transcriptional Activator Cat8p Provides a Major Contribution to the Reprogramming of Carbon Metabolism during the Diauxic Shift in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 276(1), 76–85. <https://doi.org/10.1074/jbc.M008752200>
- Hedges, D., Proft, M., & Entian, K.-D. (1995). CAT8, a New Zinc Cluster-Encoding Gene Necessary for Derepression of Gluconeogenic Enzymes in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology*, 15(4), 1915–1922. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.4.1915>
- Hohmann, S. (1993a). Characterisation of PDC2, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 241–241(5–6), 657–666. <https://doi.org/10.1007/BF00279908>

- Hohmann, S. (1993b). Characterisation of PDC2, a gene necessary for high level expression of pyruvate decarboxylase structural genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and General Genetics MGG*, 241–241(5–6), 657–666. <https://doi.org/10.1007/BF00279908>
- Hornedo-Ortega, R., Cerezo, A. B., Troncoso, A. M., Garcia-Parrilla, M. C., & Mas, A. (2016). Melatonin and Other Tryptophan Metabolites Produced by Yeasts: Implications in Cardiovascular and Neurodegenerative Diseases. *Frontiers in Microbiology*, 6. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01565>
- Kayikci, Ö., & Nielsen, J. (2015). Glucose repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Research*, 15(6), fov068. <https://doi.org/10.1093/femsyr/fov068>
- Klein, C. J. L., Olsson, L., & Nielsen, J. (1998). Glucose control in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of MIG1 in metabolic functions. *Microbiology*, 144(1), 13–24. <https://doi.org/10.1099/00221287-144-1-13>
- Lallemant Oenology. (2025). *Lallemant Wine - Lalvin Clos™*.
- Legras, J.-L., & Karst, F. (2003). Optimisation of interdelta analysis for *Saccharomyces cerevisiae* strain characterisation. *FEMS Microbiology Letters*, 221(2), 249–255. [https://doi.org/10.1016/S0378-1097\(03\)00205-2](https://doi.org/10.1016/S0378-1097(03)00205-2)
- Lohr, D., Venkov, P., & Zlatanova, J. (1995). Transcriptional regulation in the yeast *GAL* gene family: a complex genetic network. *The FASEB Journal*, 9(9), 777–787. <https://doi.org/10.1096/fasebj.9.9.7601342>
- Morcillo-Parra, M. Á., González, B., Beltran, G., Mas, A., & Torija, M.-J. (2020). Melatonin and glycolytic protein interactions are related to yeast fermentative capacity. *Food Microbiology*, 87, 103398. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2019.103398>
- Morcillo-Parra, M. A., Martín-Esteban, S., Almellones, J., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M. J. (2025). Melatonin-protein interactions are dependent on yeast carbon metabolism. *Scientific Reports*, 15(1), 8947. <https://doi.org/10.1038/s41598-025-93440-4>

- 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*, 2424. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02424>
- Nielsen, J. (2019). Yeast Systems Biology: Model Organism and Cell Factory. *Biotechnology Journal*, *14*(9). <https://doi.org/10.1002/biot.201800421>
- Oechsner, U., Hermann, H., Zollner, A., Haid, A., & Bandlow, W. (1992). Expression of yeast cytochrome C1 is controlled at the transcriptional level by glucose, oxygen and haem. *Molecular and General Genetics MGG*, *232*(3), 447–459. <https://doi.org/10.1007/BF00266250>
- Ott, M., Amunts, A., & Brown, A. (2016). Organization and Regulation of Mitochondrial Protein Synthesis. *Annual Review of Biochemistry*, *85*(1), 77–101. <https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-060815-014334>
- Parapouli, M., Vasileiadis, A., Afendra, A.-S., & Hatziloukas, E. (2020). *Saccharomyces cerevisiae* and its industrial applications. *AIMS Microbiology*, *6*(1), 1–31. <https://doi.org/10.3934/microbiol.2020001>
- Pavlik, P., Simon, M., Schuster, T., & Ruis, H. (1993). The glycerol kinase (GUT1) gene of *Saccharomyces cerevisiae*: cloning and characterization. *Current Genetics*, *24*(1–2), 21–25. <https://doi.org/10.1007/BF00324660>
- Que, Z., Wang, S., Wei, M., Fang, Y., Ma, T., Wang, X., & Sun, X. (2024). The powerful function of *Saccharomyces cerevisiae* in food science and other fields: a critical review. *Food Innovation and Advances*, *3*(2), 167–180. <https://doi.org/10.48130/fia-0024-0016>
- Querol, A., Barrio, E., & Ramón, D. (1992). A Comparative Study of Different Methods of Yeast Strain Characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, *15*(3), 439–446. [https://doi.org/10.1016/S0723-2020\(11\)80219-5](https://doi.org/10.1016/S0723-2020(11)80219-5)
- Quirós, M., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., & Gonzalez, R. (2010). A new methodology to obtain wine yeast strains overproducing mannoproteins.

International Journal of Food Microbiology, 139(1–2), 9–14.
<https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.02.014>

- Randez-Gil, F., Bojunga, N., Proft, M., & Entian, K.-D. (1997). Glucose Derepression of Gluconeogenic Enzymes in *Saccharomyces cerevisiae* Correlates with Phosphorylation of the Gene Activator Cat8p. *Molecular and Cellular Biology*, 17(5), 2502–2510. <https://doi.org/10.1128/MCB.17.5.2502>
- Rodriguez-Naranjo, M. I., Gil-Izquierdo, A., Troncoso, A. M., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. C. (2011). Melatonin is synthesised by yeast during alcoholic fermentation in wines. *Food Chemistry*, 126(4), 1608–1613. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.12.038>
- Rodriguez-Naranjo, M. I., Torija, M. J., Mas, A., Cantos-Villar, E., & Garcia-Parrilla, M. del C. (2012). Production of melatonin by *Saccharomyces* strains under growth and fermentation conditions. *Journal of Pineal Research*, 53(3), 219–224. <https://doi.org/10.1111/j.1600-079X.2012.00990.x>
- Sellick, C. A., Campbell, R. N., & Reece, R. J. (2008). *Chapter 3 Galactose Metabolism in Yeast—Structure and Regulation of the Leloir Pathway Enzymes and the Genes Encoding Them* (pp. 111–150). [https://doi.org/10.1016/S1937-6448\(08\)01003-4](https://doi.org/10.1016/S1937-6448(08)01003-4)
- Sunyer-Figueres, M., Mas, A., Beltran, G., & Torija, M.-J. (2021). Protective Effects of Melatonin on *Saccharomyces cerevisiae* under Ethanol Stress. *Antioxidants*, 10(11), 1735. <https://doi.org/10.3390/antiox10111735>
- 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), 947. <https://doi.org/10.3390/antiox9100947>
- Turcotte, B., Liang, X. B., Robert, F., & Soontorngun, N. (2010). Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Research*, 10(1), 2–13. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2009.00555.x>

- Van Den Brink, J. (2009). *Dynamic response of Saccharomyces cerevisiae to fermentative growth conditions*.
<https://www.researchgate.net/publication/27343795>
- 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. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01933>
- Xiberras, J., Klein, M., & Nevoigt, E. (2019). Glycerol as a substrate for Saccharomyces cerevisiae based bioprocesses – Knowledge gaps regarding the central carbon catabolism of this ‘non-fermentable’ carbon source. *Biotechnology Advances*, 37(6), 107378. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.017>
- Yang, G., Zhao, T., Lu, S., Weng, J., & Zeng, X. (2022). T1121G Point Mutation in the Mitochondrial Gene COX1 Suppresses a Null Mutation in ATP23 Required for the Assembly of Yeast Mitochondrial ATP Synthase. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(4), 2327. <https://doi.org/10.3390/ijms23042327>

7. Autoevaluación

Al iniciar este Trabajo de Fin de Grado, mis expectativas principales eran consolidar y practicar de manera repetida técnicas básicas que ya había estudiado durante el grado. Además, deseaba conocer cómo se desarrolla el trabajo diario en un laboratorio de investigación y aprender nuevas metodologías aplicadas.

A lo largo del desarrollo de este trabajo, he adquirido nuevas habilidades como la interpretación de datos y el manejo de técnicas nuevas para mí como el HPLC, lo que me ha permitido profundizar el análisis del metabolismo de *S. cerevisiae*. También, he mejorado significativamente mi capacidad para buscar, seleccionar y utilizar literatura científica en la interpretación de mis resultados.

Asimismo, esta experiencia me ha enseñado la importancia de la organización y planificación para llevar a cabo un proyecto de investigación. El trabajo colaborativo con compañeros con más experiencia, así como la supervisión de mi tutora ha resultado imprescindible para la realización de las diferentes técnicas y la interpretación de los resultados, especialmente en situaciones en las que los datos obtenidos no eran los esperados.

En el ámbito personal, este TFG me ha ayudado a desarrollar habilidades como la paciencia y la gestión del tiempo preparándome tanto para el campo profesional como personal.

En definitiva, ha sido una experiencia enriquecedora que me ha permitido consolidar conocimientos, adquirir nuevas competencias y reflexionar sobre mi futuro profesional en el ámbito de la biotecnología.

8. Anexos

8.1. Protocolos

8.1.1. Protocolo de extracción de ADN de levaduras

(Adaptado de Querol et al., 1992)

1. Hacer crecer las células en un tubo con 1,5 mL de YPD a 28°C durante 12 horas (o el tiempo necesario para un buen crecimiento).
2. Centrifugar 2 minutos a 10000 rpm y eliminar el sobrenadante.
3. Lavar con 1,5 mL de agua destilada. Agitar bien con el vórtex.
4. Centrifugar 2 minutos a 10000 rpm y eliminar el sobrenadante.
5. Añadir 500 µL de Tampón 1 (D-Sorbitol 0,9M (Sigma-Aldrich, Steinheim, Alemania), EDTA 0,1M (Panreac, Barcelona, España), pH 7,5).
6. Añadir 30 µL de solución Zymolasa 20T (Seikagaku, Tokio, Japón). Incubar la suspensión final a 37°C durante 20 minutos.
7. Centrifugar 2 minutos a 10000 rpm y eliminar el sobrenadante.
8. Resuspender las células en 500 µL de Tampón 2 (Tris 50 mM (ŽUSB, Cleveland, EE.UU.) pH 7,4, EDTA 20 mM (Panreac)) Utilizar la pipeta no el vórtex.
9. Añadir 13 µL de SDS 10% (Sigma-Aldrich) y agitar con la mano.
10. Incubar 65°C durante 5 minutos.
11. Añadir 200 µL de acetato de potasio 5 M (Panreac) y agitar con la mano.
12. Incubar en hielo durante 5 minutos
13. Centrifugar en frío 10 minutos a 12000 rpm para que precipite bien el SDS (Sigma-Aldrich).
14. Transferir el sobrenadante en otro microtubo limpio, con cuidado de no tocar el precipitado blanco.
15. En este nuevo microtubo, añadir 700 µL de isopropanol (PanReac), agitar por inversión e incubar a temperatura ambiente 5 minutos.
16. Centrifugar 10 minutos a 12000 rpm y eliminar el sobrenadante.
17. Añadir 500 µL de etanol 70% (PanReac).
18. Centrifugar 5 minutos a 12000rpm y eliminar el sobrenadante.
19. Secar el pellet al vacío hasta que se vea transparente.

20. Resuspender el pellet en 20 µL de Tampón Elución (Tris 10 mM pH 7,4, EDTA 1 mM (PanReac) pH 8,0).

8.1.2. Protocolo de extracción de ARN de levaduras con Kit GeneMatrix Universal RNA Purification Kit (Eurx)

(Propuesto por GeneMatrix Inc. para kit Universal RNA purification (Eurx))

Nota previa al uso:

- La columna de ADN (color morado, incluida en el kit) tiene una capacidad de unión de 25 µg/columna, muestrear más de 25 µg de ADN puede provocar contaminación del eluido de ARN por ADN.
- La columna de ARN (color amarillo, incluida en el kit) tiene una capacidad de unión de 120 µg/columna.
- La proteinasa K se conserva a -20 °C.
- Añadir 50 µL de β-mercaptoetanol (B-ME, refrigerador a 4 °C) por cada 10 ml de tampón de extracción EN antes de usar y conservar durante un mes después de mezclar.
- Añadir 50 µL de AFR01 por cada 10 mL de tampón de extracción EN antes de usar y conservar durante tres meses después de mezclar.
- La biomasa máxima de la muestra es de 10⁹ células.

Parte I (Operar en hielo)

1. Añadir 25 µL de tampón EN a la columna de centrifugación de unión al ADN, manteniéndola a 25 °C.
2. Añadir 650 µL de tampón de extracción EN (preconfigurado y bien mezclado) a los pellets, mezclar bien y transferir a un BeadTubeDry (BTD, tubo blanco con microesferas de vidrio).
3. Incubar durante 5 min a 55 °C.
4. Triturar las células (agitar durante 1 min y luego enfriar en hielo durante 1 min), agitar 3 veces y centrifugar a temperatura ambiente durante 30 s, 5000 g.
5. Añadir 325 µL de tampón DLT al BeadTubeDry y mezclar invirtiendo varias veces.

6. Añadir 20 μL de proteinasa K al BeadTubeDry. Mezclar invirtiendo varias veces el tubo.
7. Incubar durante 30 min a 55 °C (invirtiendo el tubo varias veces cada 10 minutos).
8. Fijar el BeadTubeDry horizontalmente en un vortex utilizando un adaptador o un soporte para tubos. Agitar a máxima velocidad durante 1 min.
9. Centrifugar el BeadTubeDry durante 2 min a 12 000 $\times g$ y 4 °C, y transferir 600 μL de sobrenadante al tubo.
10. Añadir 300 μL de cloroformo y vortex durante 2 min.
11. Centrifugar a 12 000 $\times g$ durante 3 min a temperatura ambiente.
12. Retirar 450 μL de la fase superior a nuevo tubo.

Parte II (Extracción de ADN/ARN)

1. Añadir 225 μL de isopropanol al 100 % a la fase superior y mezclar mediante inversión múltiple.
2. Incubar durante 15 min a temperatura ambiente.
3. Centrifugar a 12 000 $\times g$ durante 15 min a temperatura ambiente y decantar el sobrenadante.
4. Suspender el pellet en 100 μL de agua libre de ARNasa y mezclar bien.
5. Añadir 200 μL de tampón DRP al pellet suspendido. Mezclar bien.
6. Añadir la mezcla a la columna de centrifugación de unión de ADN (tubo morado, de la Parte I, paso 2). Centrifugar a 11 000 $\times g$ y 4 °C durante 1 min.

Parte III (Purificación de ARN)

1. Añadir 300 μL de etanol 100% al líquido obtenido del paso 6 (parte 2) y mezclar bien.
2. Añadir la mezcla a la columna de centrifugación de unión de ARN (amarilla) colocada en un tubo de 1 ml; centrifugar durante 1 min a 11000 $\times g$ y 4 °C; retirar la columna de centrifugación, eliminar el sobrenadante y volver a colocarla en el tubo receptor.

3. Añadir 600 μL de tampón de lavado RBW y centrifugar a 11000 xg y 4 °C durante 1 min. Retirar la columna de centrifugación, eliminar el sobrenadante y volver a colocarla en el tubo receptor.
4. Centrifugar a 11000 xg y 4 °C durante 2 min adicionales para eliminar el tampón de lavado residual.
5. Colocar la columna de centrifugación en un tubo nuevo de 1,5 ml y añadir 40 μL de agua libre de ARNasa.
6. Centrifugar durante 2 min a 11000 xg y 4 °C.
7. Determinar la concentración con Nanodrop y almacenar a -80 °C.

8.1.3. Tratamiento con DNasa, DNA-free Kit (ThermoFischer Scientific)

Adaptado de DNA-free Kit; Rigorous Dnase treatment

1. Diluir la muestra a 320 ng de ácido nucleico/20 μL de muestra total, si es posible.
2. Añadir 2,5 μL volumen de Tampón 10X para DNasa I y mezclar suavemente.
3. Añadir 2 μL rDNasa I al ARN y mezclar suavemente.

(Opcional) El tratamiento con DNasa puede mejorarse realizando una incubación en dos pasos. Para ello, añadir la mitad de la cantidad de DNasa I a la muestra.

4. Incubar a 37 °C durante 30 minutos.

(Opcional) Si se realiza incubación en dos pasos, incubar a 37 °C durante 30 minutos, luego añadir la mitad restante de rDNasa I y continuar la incubación otros 30 minutos.

5. Resuspender el Reactivo de Inactivación de DNasa agitando o vortexeando el tubo antes de usarlo.

Nota: El Reactivo de Inactivación de DNasa puede volverse difícil de pipetear tras varios usos debido a la pérdida de fluido en los espacios intersticiales. Si esto ocurre, añadir un volumen de Agua libre de nucleasas (suministrada con el kit) equivalente a aproximadamente el 20–25% del volumen del reactivo restante y vortexear bien para formar una suspensión pipeteable.

6. Añadir 5 μL Reactivo de Inactivación de DNasa resuspendido y mezclar bien.
7. Incubar 2 minutos a temperatura ambiente, mezclando ocasionalmente.

Es importante mezclar el contenido del tubo 2–3 veces durante la incubación para mantener el reactivo en suspensión.

8. Centrifugar las muestras y transferir el sobrenadante que contiene el ARN a un tubo nuevo.
 - Centrifugar tubos de microcentrífuga a $10.000 \times g$ durante 1,5 minutos.
 - Centrifugar placas de 96 pocillos a $2000 \times g$ durante 5 minutos.

No alterar el precipitado del Reactivo de Inactivación de DNasa. Evitar introducir este reactivo en soluciones que se usen para reacciones enzimáticas posteriores, ya que puede secuestrar cationes divalentes y alterar las condiciones del tampón.

8.1.4. Retrotranscripción: SuperScript III

Reactivos de Invitrogen (ThermoFischer Scientific)

1. Añadir 13 uL de ARN 320 ng/uL en un eppendorf.
2. Añadir 1uL de oligo-dt 12-18 a la muestra (1ul de H₂O libre de Rnasas para el control)
3. Incubar durante 5 minutos a 70°C
4. Incubar durante 1 minuto en hielo
5. Añadir 4ul de tampón 5x PCR (Zn), 1ul de dNTPS (10uM) y 1 ul de DTT (0,1M).
6. Incubar durante 5 minutos a 42°C
7. Añadir 1 ul de Superscript II a la muestra (1 ul de H₂O libre de Rnasas para el control)
8. Incubar durante 50 minutos a 42°C
9. Incubar durante 15 minutos a 70°C