M01 - VARIACIONES DEL PERFIL METABOLÓMICO EN LEVADURAS DURANTE EL PROCESO DE SECADO Y REHIDRATACIÓN

López-Martínez G.[1], Borrull A.[1], Poblet M.[1], Rozès N.[1], Cordero-Otero R.[1]

[1]Universidad Rovira i Virgili, Departamento de Bioquímica y Biotecnología, Marcel·lí Domingo, 1, 43007, Tarragona, España

ricardo.cordero@urv.cat

RESUMEN:

En este estudio analizamos los metabolitos involucrados en la tolerancia al proceso de secado y rehidratación de tres especies de levadura con diferente tasa de viabilidad a este estrés pero genéticamente emparentadas, *Saccharomyces cerevisiae, Naumovia castellii* y *Saccharomyces mikatae*. En *S. mikatae*, la presencia de lisina o glutamina durante la rehidratación incrementa un 20% la tolerancia mientras que durante la deshidratación los niveles de ambos aminoácidos mostraron una reducción significativa.

Palabras clave: deshidratación y rehidratación, viabilidad, metabolómica, levaduras

1. Introducción

La levadura seca activa (LSA) es ampliamente utilizada en la industria alimentaria gracias a su estabilidad genética a temperatura ambiente, reduciéndose así los costes de transporte y almacenamiento. Sin embargo, la pérdida de viabilidad durante el secado y la rehidratación dificulta el desarrollo de un inóculo de calidad. En este estudio, identificamos los compuestos celulares involucrados en el secado/rehidratación de tres especies de levadura que difieren en su tolerancia a la deshidratación, *Saccharomyces cerevisiae*, *Naumovia castellii* y *Saccharomyces mikatae*, a pesar de su proximidad genética. *S. mikatae* pertenece al grupo *sensu stricto*, que incluye especies de levadura estrechamente emparentadas con *S. cerevisiae*; mientras que *N. castelli* pertenecen al grupo *sensu lato* que incluye especies heterogéneas que divergen de *S. cerevisiae* [2].

2. Material y métodos

Las tres especies de levadura, *Saccharomyces cerevisiae* (CECT-1477), *Naumovia castellii* (CECT- 11356) y *Saccharomyces mikatae* (CECT-11823), fueron sometidas al proceso de secado y rehidratación descrito anteriormente por Rodríguez-Porrata *et al.* [4]. La viabilidad celular fue determinada por citometría de flujo (citómetro CyFLow de Partec, Alemania) [4] mediante el uso del kit de determinación de viabilidad LIVE/DEAD (Life Technologies). Los datos fueron analizados posteriormente con el programa FloMax (Quantum Analysis, Alemania). Los efectos en la viabilidad celular por suplementación individual de lisina (1, 2, 5 y 10%), Na_2HPO_4 (2, 5 y 10%), y glutamina (2, 5 y 10%) fueron estudiados durante la rehidratación. La extracción de los metabolitos fue optimizada en base al método de Roessner *et al.* [5]. La rotura de las células en presencia de metanol-agua (1:1 v/v), ribitol (patrón interno) (Sigma, Suiza) y *glass beads* de 0,5 mm, y se llevó a cabo mediante el disruptor bead-

beater (BioSpec Products, EEUU) con cinco ciclos de 1min/beat-beater, seguido de 30s a 4ºC. El sobrenadante fue evaporado y las muestras derivatizadas en metoxiamina hidroclorídica en piridina (Sigma, Japón; Fluka, Índia) y N-metil-N-(trimetilsilil) trifluoroacetamida (Sigma, EEUU). La cromatografía de gases se llevó a cabo en base al sistema de GC-MS descrito por Borrull *et al.* [1] con los cambios descritos a continuación. La temperatura del inyector fue 200ºC. La temperatura del horno de la columna se inició a 80ºC durante 4 min y fue incrementándose primeramente a 200ºC a 5ºC/min y después a 300ºC a 25ºC/min, donde se mantuvo durante 7 min. El cuadrupolo del MSD y las temperaturas se mantuvieron a 180ºC y 280ºC respectivamente. Los datos analíticos del MSD fueron adquiridos por un escáner de ionización electrónica a 70 eV entre 35-650 uma después de un desfase de 4 min. Los valores analizados se expresaron en porcentajes relativos a $1x10^9$ CFU después del recuento de células viables antes del secado (AS) y después de rehidratación (DR). Los datos fueron posteriormente analizados estadísticamente mediante el test de Tukey y ANOVA usando el programa estadístico SPSS 20.0 con una significancia establecida a $P \leq 0,05$.

3. Resultados

Entre las tres especies de levaduras evaluadas, *S. cerevisiae* es la que presenta una mayor tasa de viabilidad (100%). Las viabilidades de las otras especies fueron relativas a la obtenida por *S. cerevisiae*, obteniéndose una tolerancia al secado y rehidratación de 60% y 40% en *N. castellii* y *S. mikatae*, respectivamente.

La cuantificación de los metabolitos identificados en el GC-MS para las tres especies de levaduras en las condiciones AS y DR mostraron diferencias en ácidos grasos, ácidos orgánicos y compuestos resultantes de la glicolisis (Fig. 1). Durante el proceso de estrés, el fosfato se incrementó en 1,5 veces en *N. castellii* (Fig. 1). Por el contrario, *S. mikatae* y *S. cerevisiae* disminuyeron el contenido de fosfato entre las dos condiciones entre un 70% y un 30%, respectivamente, observándose que estos valores no se correlacionan directamente con los valores de tolerancia a la deshidratación (Fig. 1). La retención citoplasmática de glicerol por parte de *S. cerevisiae* es la principal respuesta al estrés osmótico, homologable al que sufre la célula durante el secado [3]. La acumulación intracelular de este compuesto en *N. castellii* y *S. cerevisiae* durante la imposición al estrés se incrementó un 50%, mientras que *S. mikatae* se redujo en un 50%, pudiendo ser la razón de la baja viabilidad de esta especie (Fig. 1). La glicólisis es una vía utilizada para convertir la glucosa en piruvato mediante reacciones enzimáticas y posteriormente es convertido en acetil-CoA para iniciar el ciclo de Krebs. Alternativamente, el piruvato actúa como precursor de la síntesis de α-alanina [6], que se incrementó 3 veces en *N. castellii* y 2 veces en *S. cerevisiae* entre las dos condiciones evaluadas, mientras que disminuyó 2 veces en *S. mikatae* (Fig. 1). EL Acetil-CoA puede ser convertido también en ácido cítrico o lípidos y ácidos grasos, tales como el ácido palmitoléico, el cual durante la deshidratación se incrementó en *N. castellii* y *S. cerevisiae* mientras que disminuyó un 30% en *S. mikatae*. El ácido succínico muestra una variación significativa entre las condiciones AS y DR, cuyos niveles incrementaron en 9 y 2 veces en *N. castellii* y *S. cerevisiae* respectivamente, mientras que *S. mikatae* mantuvo el mismo nivel (Fig. 1). El ácido succínico puede ser convertido a oxaloacetato en el ciclo de Krebs para formar aspartato. La abundancia de ácido aspártico aumentó 13 veces durante la imposición al estrés en *N. castellii* y *S. cerevisiae* mientras que en *S. mikatae* solo lo hizo en 3,5 veces (Fig. 1). El intermediario del ciclo de Krebs 2-oxoglutarato puede ser transaminado a lisina y glutamato para la biosíntesis de otros aminoácidos, como la glutamina, prolina o arginina. Durante el estrés el nivel de lisina en *S. mikatae* disminuyó tres veces, mientras que en *N. castellii* y *S. cerevisiae* se incrementó

en 3 y 2 veces, respectivamente. La glutamina disminuyó 6 veces en *S. mikatae* y 3 veces en *S. cerevisiae* (fig. 1).

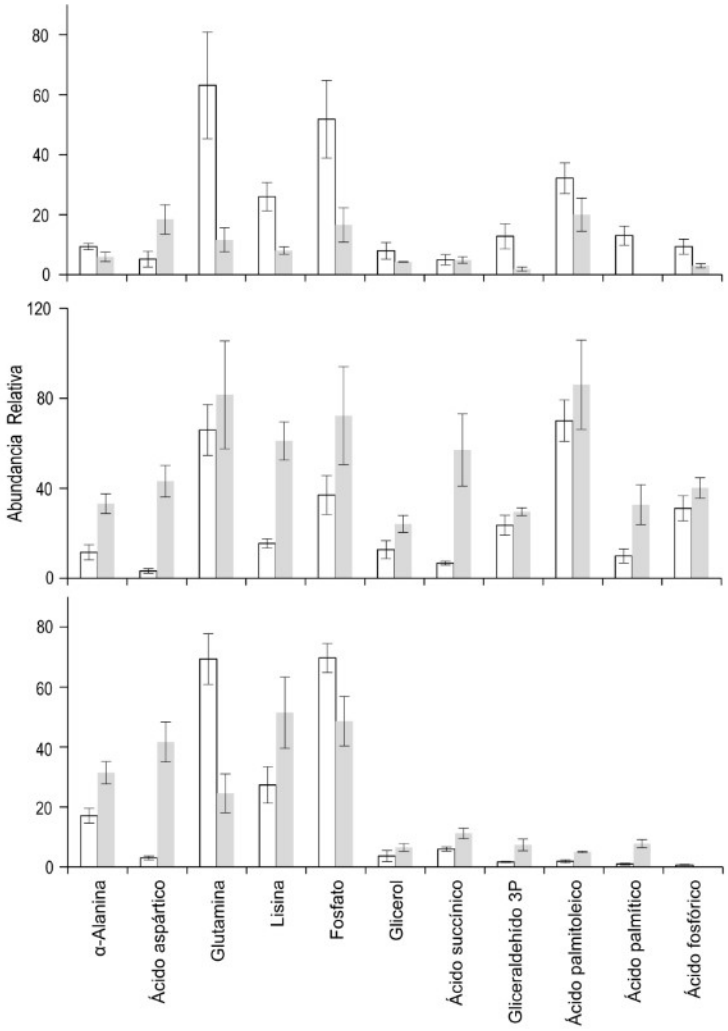


Figura 1. Abundancia relativa de los metabolitos intracelulares en AS (barras blancas) y DR (barras grises) para las tres especies evaluadas. Los valores representan el promedio de tres experimentos independientes ± DS.

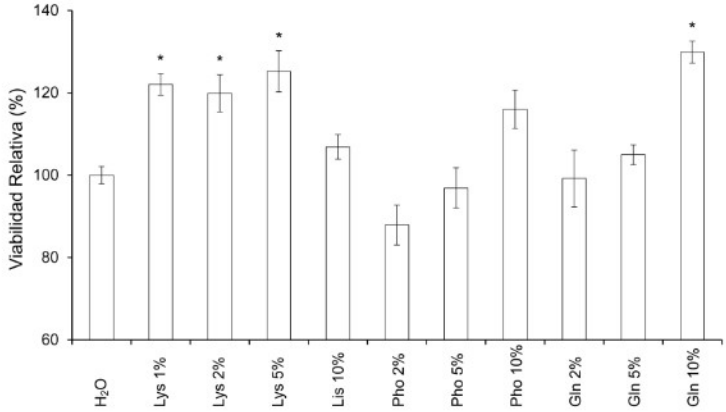


Figura 2. Efecto de la rehidratación en presencia de lisina (Lys), fosfato (Pho), o glutamina (Gln) en la viabilidad celular expresada en porcentaje. Los valores mostrados son el promedio de tres experimentos independientes ± DS. *Diferencia estadísticamente significativa ($P< 0.05$) al comparar con la condición H_2O.

Se evaluó la tolerancia a la deshidratación de la especie con menor viabilidad, *S. mikatae*, suplementado las células en la etapa de rehidratación con diferentes concentraciones de lisina, Na_2HPO_4 o glutamina. *S. mikatae* mostró un incremento de la viabilidad en presencia de 1, 2, y 5% de lisina o 10% de glutamina respecto a la rehidratación con agua (Fig. 2). Por el contrario, la suplementación de fosfato incrementó la mortalidad celular en un 30% respecto del control (dato no mostrado).

4. Conclusiones

La comparación del perfil metabólico de las tres cepas evaluadas en las condiciones AS y DR muestran una acumulación de ácido succínico y ácido fosfórico durante el estrés en *N. castellii* que explicaría la baja viabilidad (60%). Además, *N. castellii* junto con *S. cerevisiae* sugieren una actividad de la vía glicolítica y del ciclo de Krebs opuesta a *S. mikatae*, que mostró una reducción en los niveles de los metabolitos secundarios. La presencia de lisina o glutamina durante la rehidratación en *S. mikatae* tiene un efecto positivo en la recuperación de la actividad celular.

5. Bibliografía

1. Borrull, A., López-Martínez, G., Poblet, M., Cordero-Otero, R., Rozès, N. 2014. A simple method for the separation and quantification of neutral lipid species using GC-MS. *In European J. of Lipid Science and Technology*. 117, 274-280.
2. Muller, L. A., McCusker, J. H. 2009. A multispecies-based taxonomic microarray reveals interspecies hybridization and introgression in *Saccharomyces cerevisiae. In FEMS Yeast Res*. 9, 143-152.
3. Larsson, K., Ansell, R., Eriksson, P., Adler, L. 1993. A gene encoding snglycerol 3-phosphate dehydrogenase (NAD+) complements an osmosensitive mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *In Mol Microbiol.* 10, 1101-1111.
4. Rodriguez-Porrata, B., Carmona-Gutierrez, S., Reisenbichler, A., Bauer, M., Lopez, G., Escote, X., Mas, A., Madeo, F., Cordero-Otero, R. 2012. Sip18 hydrophilin prevents yeast cell death during desiccation stress. *In J Appl Microbiol* 112, 512-525.
5. Roessner, U., Wagner, C., Kopka, J., Trethewey, R., Willmitzer, L. 2000. Simultaneous analysis of metabolites in potato tuber by gas chromatography–mass spectrometry. *In Plant J*. 23, 131-142.
6. Pronk, J. T., Steensma, H. Y., van Dijken, J. P. 1996. Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *In Yeast*. 12, 1607-1633.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por los proyectos AGL2010-22001-C02-02 y AGL2012-40018-C02-01 del Gobierno de España concedidos a los profesores NR y RC, respectivamente. GL y AB agradecen a la Universidad Rovira i Virgili y la Generalitat de Catalunya por las becas predoctorales FI-DGR 1012, AGAUR y 2009BRDI/12/12, respectivamente.