



## Control genético de la floculación de *Saccharomyces cerevisiae* en proceso de fermentación industrial

LUIS C. DAMAS BUENROSTRO\*, BENITO PEREYRA ALFÉREZ\*



En la industria de fermentación alcohólica, la separación de las células de levadura del producto depende en gran medida de la capacidad de éstas para agregarse en cúmulos y sedimentar. Este fenómeno, llamado floculación, es espontáneo y simplifica las operaciones para clarificación del producto y recuperación de la levadura para reuso.<sup>1,2</sup> Sin embargo, existen diversas condiciones de proceso que afectan la calidad fisiológica de la levadura y que eventualmente se han asociado con fallas en el mecanismo de floculación. Entre éstas se encuentran algunas que actualmente son muy comunes en los procesos de producción: *a)* alta relación altura:diámetro del fermentador (que provoca mayor presión hidrostática); *b)* mayor concentración total de azúcares (que determina una mayor presión osmótica en el medio); *c)* el perfil de carbohidratos del medio (mayor relación glucosa:maltosa, que puede causar represión catabólica); *d)* almacenaje prolongado de la levadura (que expone a las células a un agota-

miento de nutrientes) y *e)* reuso seriado en fermentaciones subsecuentes.<sup>3</sup> Al no poder separar con facilidad las células, la industria tiene que recurrir al empleo de agentes floculantes (polímeros catiónicos, colágeno, etc.), centrifugas o filtros, lo cual incrementa los costos de producción. Además, la presencia de levadura en el medio provoca autólisis de la misma, por la exposición prolongada al etanol, y esto a su vez, lleva a la generación de aromas y sabores desagradables (diacetilo, compuestos de azufre, ácidos grasos, etc.).<sup>1</sup>

A nivel celular, la floculación consiste en la agregación asexual de las levaduras por un mecanismo de adhesión mediado por proteínas localizadas en la pared celular tipo lectinas (más propiamente llamadas zimolectinas).<sup>4,5</sup> Este proceso también puede involucrar la formación de interacciones hidrofóbicas y uniones inespecíficas débiles. Las zimolectinas reconocen residuos de manosa localizados en la pared de células adyacentes, generando uniones específicas mediante puentes de hidrógeno entre los aminoácidos y los residuos de manosa.<sup>2, 6</sup>

Los genes que codifican para las zimolectinas son llamados *FLO*. Éstos incluyen genes dominan-

□ El presente artículo está basado en la investigación "Control genético de la floculación de *Saccharomyces cerevisiae* en proceso de fermentación industrial", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2009 en la categoría de Ciencias Biológicas, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2009.

\* Instituto de Biotecnología. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

tes como *FLO1* (*FLO4*), *FLO2*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10*, *FLO11* y *Lg-FLO1*; y recesivos o semidominantes como *flo3*, *flo6*, *flo7*, *fsu1*, *fsu2* y *fsu3*.<sup>7</sup> *FLO11* es el miembro más divergente de la familia (similitud 37% identidad 26%) y a diferencia de las demás floculinas (excepto *FLO8*), no está localizado cerca del telómero, sino cerca del centrómero en el brazo derecho del cromosoma IX.<sup>8</sup> Se ha observado que la expresión del gen *FLO11* se incrementa más de diez veces hacia el final de la fermentación.<sup>9</sup> Sin embargo, poco se sabe de los elementos regulatorios de esta expresión en fermentaciones industriales, ya que la mayoría de los estudios provienen de cepas *Saccharomyces cerevisiae* a nivel laboratorio enfocados en *FLO1*.<sup>10,11</sup> En general, se sabe que los genes con actividad represora sobre *FLO11* son *NRG1*, *NRG2*, *SOK2*, *SFL1*, *VHS3* y *TUP1-SSN6*, mientras que activadores son *TEC1*, *FLO8*, *SWI-SNF*, *PHD1*, *MSN1* y *RME1*.<sup>12-18</sup>

Se han realizado análisis de microarreglos de ADN en *S. cerevisiae*, para conocer la expresión global durante la fermentación y su relación con la producción de compuestos volátiles (responsables del sabor y el aroma) y compuestos azufrados en mostos con bajo contenido nutricional o relación malta:adjuntos menor.<sup>9,19</sup> Otros se han enfocado a revelar los patrones de expresión globales en fermentaciones industriales, comparándolos con los primeros ensayos realizados en condiciones y con cepas de laboratorio.<sup>20-22</sup> A la fecha no se han reportado estudios que permitan dilucidar los mecanismos de expresión de la floculación, bajo condiciones de estrés como la presencia de glucosa, alta presión osmótica e hidrostática, senescencia o agotamiento de nutrientes en cepas de levaduras industriales.

En el presente trabajo reportamos el análisis de la expresión de los genes implicados en la floculación (estructurales o regulatorios) bajo estas condiciones de fermentación, mediante microarreglos de ADN y PCR cuantitativa para entender la manera del cómo estos factores de proceso industrial modulan la expresión de dichos

genes, lo que permitirá un manejo más racional de los procesos de fermentación.

## Materiales y métodos

**Cepas de levadura:** las cepas fueron proporcionadas por la Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma (CCM). Éstas fueron las cepas lager C820, C790, LAW, KJ8, BRY y J-2036; la cepa de panadería C7754. *S. diastaticus*, *S. willianus* y *S. pastorianus* fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville MD, USA).

**Fermentaciones:** las fermentaciones fueron realizadas por duplicado en probetas de 2 L usando mosto proporcionado por CCM. La densidad de extracto fue ajustada a 17 grados Plato (°P), excepto para los ensayos de estrés osmótico, donde además se usaron fermentaciones a 12°P, con una concentración inicial de oxígeno a 1 ppm/grado Plato y el inóculo a 1.2 X10<sup>6</sup> cel/mL por grado Plato. Las fermentaciones fueron incubadas siete días a 16°C. En los procesos se evaluaron las variables siguientes: restricción calórica (levadura fresca-incubada 22 h en agua); represión catabólica (glucosa:maltosa 1:10; 10:6); presión osmótica (12°P-17°P); presión hidrostática (10<sup>5</sup> kPa-10<sup>6</sup> kPa); edad generacional (1a-10a generación). Los datos entre paréntesis indican la condición normal y la de estrés, respectivamente. El perfil de azúcares se ajustó usando la enzima amiloglicosidasa Attenuzyme (Novozymes; Dittingen, Switzerland). De la levadura en suspensión al 3-5° día, se obtuvieron 5 mL, los cuales fueron procesados para extracción del ADN y ARN.

**Aislamiento de ADN y ARN:** las levaduras fueron lisadas a 65°C por 10 min en presencia de 10% SDS. El ADN genómico fue extraído con fenol:cloroformo (24:1) y precipitado con isopropanol.<sup>23</sup> El ADN fue resuspendido en buffer TE y tratado con 5 U of RNase One (Promega, Madison WI, US) a 37°C por 30 min. El ADN fue cuantificado y almacenado a -20°C hasta su uso. Para la extracción de ARN total, la concentración celular fue ajustada a 90 x 10<sup>6</sup> y se forma-

ron esferoplastos con 125 unidades de liticasa y el ARN fue obtenido con estuche High Pure de Roche (Indianápolis, USA) y guardado a  $-80^{\circ}\text{C}$ .

*Evaluación de floculación:* la medición de la floculación se realizó esencialmente como se ha reportado anteriormente,<sup>24</sup> o como se indica en el Manual de Métodos de la American Society of Brewing Chemists Yeast-11A (1999).<sup>25</sup>

*PCR punto final de genes FLO, ACT1 y ADH1:* diseñamos iniciadores para los genes *Lg-FLO1*, *FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10*, *FLO11*, *ACT1* y *ADH1* utilizando las secuencias reportadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2006) y el *Saccharomyces* Genome Database (SGD, 2006, <http://www.yeastgenome.org>). Para el diseño se utilizaron los programas Megalign y Gene Quest (ambos de DNASTAR Inc, v 4.05). Los iniciadores fueron analizados mediante alineamiento iniciador-iniciador y con la base de datos del NCBI usando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST),<sup>26</sup> y simulación de PCR *in silico* con ayuda de los programas Fast PCR 6.0 (Rusland Kalendar Univ. Helsinki, Finlandia) y Ampify 3.1. (Engels, Univ. Wisconsin US). La amplificación genética fue realizada bajo el siguiente esquema: 200 mM dNTPs, 1 mM de cada uno los iniciadores, 1X buffer verde, 10 ng de ADN blanco y 2.5 unidades de Taq ADN polimerasa (Go Taq. Promega) en un volumen total de reacción de 50 mL y colocados en un termociclador Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer Cetus Emeryville CA, US). Los parámetros de la PCR fueron:  $94^{\circ}\text{C}$  por 5 min, y luego 35 ciclos de 30 s a  $94^{\circ}\text{C}$ , 1 min a  $52^{\circ}\text{C}$  y 1 min a  $72^{\circ}\text{C}$ ; seguido por un paso final de extensión de 4 min a  $72^{\circ}\text{C}$ . Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa a 1.5% en TBE (Standard Low-mr. Bio Rad, Hercules CA, US) y teñidos con 5 mg/mL de bromuro de etidio. Los amplicones del tamaño esperado fueron separados por electroforesis preparativa y purificados usando el sistema Wizard SV Gel y PCR Clean-Up de Promega. La secuencia nucleotídica de los fragmentos purificados fue

determinada en el Instituto de Biotecnología de Universidad Nacional Autónoma de México, usando un secuenciador Perkin Elmer/Applied Biosystems modelo 3730.

*Análisis de expresión génica por PCR cuantitativa (qPCR):* del ARN aislado de las fermentaciones, se realizó la síntesis de ADNc a partir de los transcritos de *FLO8*, *FLO11*, *Lg-FLO1*, *ACT1* y *ADH1* mediante PCR reversa con el kit Reverse Transcription MMLV (Promega). Para la síntesis se empleó un termociclador Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer Cetus). El ADNc sintetizado se guardó a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su uso. La qPCR fue llevada a cabo en un LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics), empleando el programa LC 4.0 para los análisis y el kit LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science). Con el Software LC 4.0 se determinaron los  $C_p$  (crossing points, número de ciclo en el cual la fluorescencia supera el umbral predeterminado) de los amplicones, el cual es inversamente proporcional a la concentración inicial del ADNc presente en la muestra.

*Análisis de expresión global mediante microarreglos:* la preparación del ADNc a partir de los transcritos de todo el genoma de la levadura y su marcaje con Cy3 y Cy5 se hizo de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Kits Promega Z3604, Z3613 y Z3613). Los microarreglos YOMGW\_01 fueron proporcionados por el Dr. Jorge Ramírez, del Instituto de Fisiología Celular de la Universidad Nacional Autónoma de México. Los microarreglos fueron leídos con un escáner ScanArray 4000 (Packard Biochips, Billerica MA, USA) y las imágenes analizadas usando el programa Spotfinder (<http://www.tm4.org/spotfinder.html>), transformados en valores de intensidad relativa de fluorescencia, y guardados como archivos .txt. Los datos fueron posteriormente analizados con el programa genArise (<http://www.ifc.unam.mx/genarise>). Para esto se calculó la razón de expresión diferencial logarítmica y la intensidad global de cada spot. La razón logarítmica fue representada por el valor  $R = \log_2(\text{intensidad Cy5}) - \log_2$

(intensidad Cy3), y la intensidad global por el valor  $I = \log_{10}(\text{intensidad Cy5}) + \log_{10}(\text{intensidad Cy3})$  y determinado el «Z score», se tomaron como límite valores  $> 2$  desviaciones estándar que se consideraron como genes significativamente expresados de forma diferencial.<sup>35</sup> Los grupos de genes identificados con cambio significativo de expresión fueron posteriormente analizados mediante los programas FatiGO (<http://babelomics2.bioinfo.cipf.es>) y KEGG2 (<http://www.genome.jp>), a fin de identificar relaciones ontológicas significativas que permitieran determinar los procesos biológicos donde dichos genes tuvieran anotaciones registradas en las bases de datos.

## Resultados y discusión

*Impacto de las variables de estrés fisiológico en la floculación:* el efecto de las distintas variables de estrés sobre la floculación mostró diferencias significativas entre los tratamientos. El perfil de glucosa:maltosa de 10:6, contra el típico de 1:10, provocó un decremento significativo en la floculación de 29-42% para las cepas C790 y C820. Por otra parte, las levaduras de generaciones altas mostraron un incremento en la capacidad floculante de 23-100% respecto a la primera generación. La variación de las otras condiciones de estrés no tuvo un efecto significativo, determinado mediante la prueba T de Student ( $p < 0.05$ ).

La cepa de panadería C7754 resultó ser no floculante. Por otra parte, el grado real de fermentación se mantuvo arriba de 60%, lo cual indicó que los carbohidratos del mosto fueron fermentados sin mayor problema.<sup>3</sup> La cantidad de alcohol producida fue 4-6%, de acuerdo a lo esperado;<sup>32</sup> y el diacetilo permaneció en los niveles aceptados para fermentaciones lager (datos no mostrados).

De esta forma, estos resultados sugirieron que la capacidad de floculación y la fermentación son regulados por vías diferentes y por lo tanto ofrecen una oportunidad para conocer los factores específicamente relacionados con el control de la floculación, particularmente en las condiciones de estrés por alto contenido de glucosa y edad generacional. Sin embargo, el análisis de la expresión a nivel transcripcional por qPCR de proteínas claves para la fisiología celular en fermentación (b-actina y alcohol deshidrogenasa), demostró que aunque la condición de perfil de carbohidratos alto en glucosa no afectó la expresión génica de estos marcadores, la edad generacional sí tuvo impacto (dato no mostrado). Por esta razón, el mejor modelo de estudio de los factores regulatorios de la floculación lo ofrece precisamente la condición de alto nivel de glucosa y los análisis de expresión global se encaminaron a este modelo.

*Detección de genes FLO:* amplificamos exitosamente secuencias específicas de los 7 genes FLO dominantes (figura 1). La identidad de los

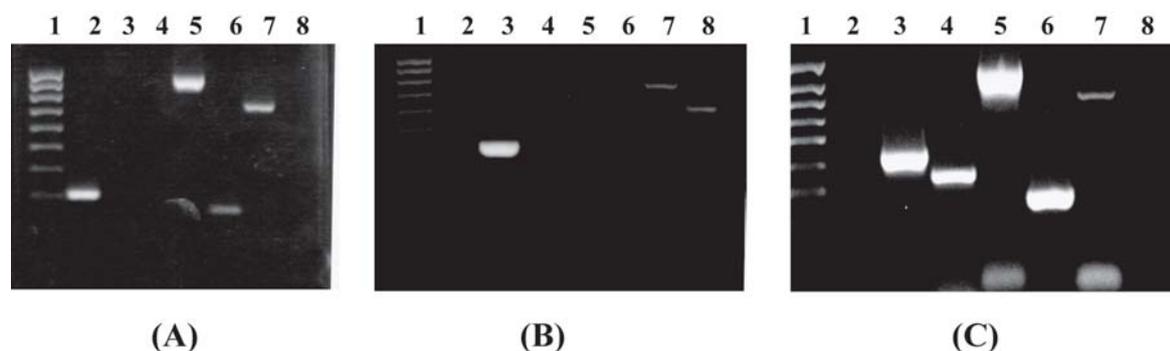


Fig. 1. Productos de PCR de los genes FLO de las cepas de levadura. (A) BRY (lager), (B) cepa C7754 (panadería), y (C) *S. diastaticus* (silvestre). Carriles: 1, marcador 100-1000 pb; 2, Lg-FLO (312 pb); 3, FLO5 (423 pb); 4, FLO9 (347 pb); 5, FLO8 (920 pb); 6, FLO10 (270 pb); 7, FLO11 (749 pb); 8, FLO1 (596 pb).

fragmentos amplificados fue confirmada mediante secuenciación de ADN. La distribución de los genes *FLO*, utilizando ADN genómico de levaduras lager, así como de cepas no cerveceras se muestra en la tabla I. *Lg-FLO1*, un gen relacionado al fenotipo NewFlo (sensible a glucosa y manosa) estuvo presente sólo en las levaduras lager. Por otra parte, todas las cepas lager probadas carecieron de *FLO5*. *FLO8*, un activador transcripcional de *FLO1* y *FLO11*,<sup>8,29</sup> estuvo presente en todas las cepas probadas, excepto en la levadura panadera. En relación a *FLO9*, los resultados concuerdan con aquéllos que han reportado la presencia de este gen en algunas cepas, pero no en todas.<sup>2</sup> Resultados similares fueron obtenidos con *FLO1* y *FLO10*, cuya distribución no tuvo aparentemente relación el fenotipo de floculación.

Un caso muy interesante fue *FLO11*, que estuvo presente en todas las cepas probadas, incluyendo las levaduras silvestres. Esto concuerda con reportes previos que señalan que *FLO11* parece estar ampliamente distribuido.<sup>8</sup> Los esfuerzos de la levadura por retener este gen, evidenciado por la prevalencia en todas las cepas probadas hasta la fecha sugieren otras posibles funciones desconocidas, lo que también se deduce del hecho de que *FLO11* está sujeto a múltiples cascadas de regulación por cinasas como las vías cAMP/PKA y MAPK.<sup>29</sup>

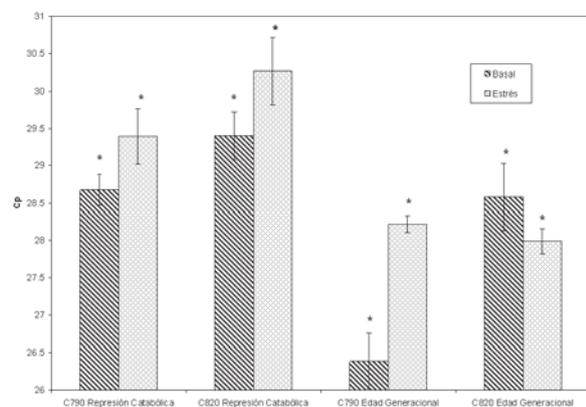


Fig. 2. Crossing points (Cp) del gen *Lg-FLO1* bajo condiciones de estrés fisiológico. Los asteriscos indican diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el estado basal y de estrés.

**Análisis de expresión de genes *FLO*:** para determinar si los genes *FLO* detectados en las cepas lager eran expresados diferencialmente en presencia de altos niveles de glucosa y edad generacional alta, se analizó la generación de transcritos de los genes *FLO8*, *FLO11* y *Lg-FLO1* por qPCR en las cepas C820 y C790, cultivadas en condiciones basales y de estrés. El efecto fue más notorio para el gen *Lg-FLO1*, ya que aunque en la condición basal se observaron niveles de expresión equivalentes entre las dos cepas, hubo un efecto negativo en ambas para la condición experimental de alta glucosa, más marcado en la cepa C820 (figura 2). Esto coincide con la observación de que el decremento en el porcentaje de floculación fue más acentuado en esta cepa (tabla I). Respecto a la edad generacional para el gen *Lg-FLO1*, claramente fue más sensible la cepa C790, disminuyendo la expresión significativamente. Es interesante notar que el valor de Cp fue menor en la cepa C820 para la condición experimental de edad generacional, indicando un nivel mayor de transcripción respecto al estado basal, lo que concuerda completamente con lo observado a nivel fenotípico, donde esta cepa mostró un dramático incremento mayor a 100% de su capacidad de floculación al alcanzar mayor edad generacional. El aumento en floculación en la cepa C790, aunque también fue observada, sólo fue del rango de

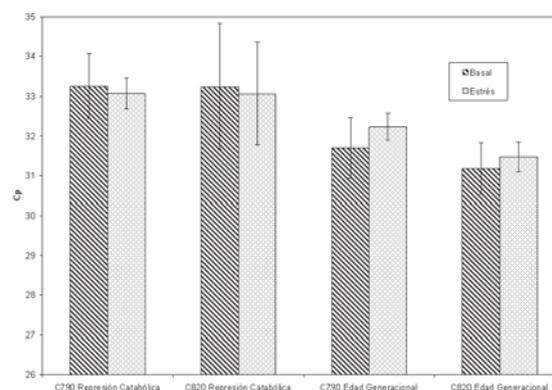


Fig. 3. Crossing points (Cp) del gen *FLO8* bajo condiciones de estrés fisiológico. Los asteriscos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el estado basal y de estrés.

Tabla I. Incidencia de genes FLO en cepas de levadura industriales y silvestres.

Cepa	FLO1	FLO5	FLO8	FLO9	FLO10	FLO11	Lg-FLO1	# Genes FLO	Floculación (mL)
Panadería C7754	+ <sup>a</sup>	+	- <sup>b</sup>	-	-	+	-	3	0.0
Lager C790	+	-	+	-	-	+	+	4	2.5
Lager BRY	-	-	+	-	+	+	+	4	3.8
Lager J-2036	-	-	+	+	+	+	+	5	3.6
Lager C820	+	-	+	-	+	+	+	5	4.5
Lager KJ8	-	-	+	+	+	+	+	5	5.5
Lager LAW	+	-	+	+	+	+	+	6	5.0
<i>S. diastaticus</i>	-	+	+	+	+	+	D <sup>c</sup>	6	NA <sup>d</sup>
<i>S. pastorianus</i>	+	+	+	-	-	+	-	4	NA
<i>S. willianus</i>	-	+	+	+	+	+	-	5	NA

Notas:

+<sup>a</sup>, presencia de fragmento amplificado con el tamaño esperado.-<sup>b</sup>, ausencia del fragmento amplificado.D<sup>c</sup>, amplificación débil del fragmento.NA<sup>d</sup>, No aplica.

23% y en esta última el Cp de *Lg-FLO1* no mostró incremento de transcripción. Como se mencionó previamente, esta condición experimental afectó negativamente la expresión génica de marcadores fisiológicos como  $\beta$ -actina y ADH1, por lo que es factible que el efecto observado no fuera específico para los genes de floculación.

Al observar los resultados para la expresión de *FLO8* (figura 3), es notable que en todos los casos los niveles de transcripción fueran similares, es decir, no hubo cambios con respecto al tratamiento ni entre cepas, además fueron los niveles más bajos de expresión de los tres genes estudiados. Esto pudiera ser por varias razones: por un lado está el hecho de que este gen expresa un activador transcripcional<sup>18</sup> que probablemente requiera niveles más bajos de transcripción. Otra posibilidad es que el transcrito tuviera un tiempo de vida corto. Por supuesto, la tercera posibilidad es que este gen no tenga un rol importante en la regulación de la transcripción en cepas industriales.

Se conoce muy bien el papel en la floculación del gen *FLO11* en muchas cepas de laboratorio,<sup>8,30</sup> sin embargo, en las cepas industriales analizadas aquí, hubo un efecto negativo en la expresión del *FLO11* no sólo para la condición de restricción

catabólica, como era de esperarse, sino también en la condición de edad generacional (figura 4), resultando más afectada la cepa C820, que paradójicamente mostró un aumento en su capacidad de floculación mayor a 100%. Esto indica que en las cepas industriales evaluadas, la expresión de este gen no estuvo correlacionada con el despliegue de la floculación. Evidentemente la presencia y expresión del gen *Lg-FLO1* estuvo asociada con la floculación en las cepas lager estudiadas, ya que la modulación de su expresión, determinada por qPCR, concordó con los datos observados a nivel fenotípico. La expresión de *FLO8* y *FLO11* no pudo ser relacionada con el despliegue de la floculación en las cepas estudiadas, por lo que la prevalencia de estos genes en cepas floculantes y no floculantes apunta a otras posibles funciones.

*Análisis de la expresión global:* en primer instancia, de un total de 6480 genes analizados, se observó una expresión significativamente modificada ( $Z < -2$  ó  $Z > +2$ ) por las condiciones ensayadas, de 2031 ORF. De éstos, 1434 fueron ORF no repetidos. Esto representa 25.6% del genoma de *S. cerevisiae*. De este porcentaje un 5.4% (302 genes) fue específicamente modificada su expresión paralelamente con la represión de la floculación.

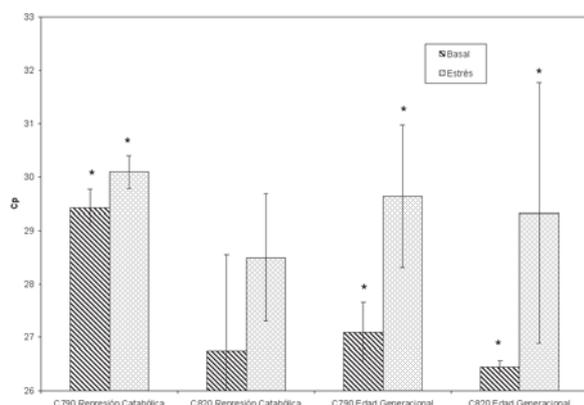


Fig. 4. Crossing points (Cp) del gen FLO11 bajo condiciones de estrés fisiológico. Los asteriscos indican diferencia significativa ( $p < 0.05$ ) entre el estado basal y de estrés.

De los 302 genes, 147 fueron inducidos y 155 reprimidos. Dentro de los procesos cuyos genes (tabla II) sufrieron inducción, destacan de manera significativa los relacionados al ciclo celular (once genes), silenciamiento de genes (8), estrés osmótico (7), biosíntesis de pared celular (5) y mantenimiento de telómeros (4). En particular, los genes de silenciamiento son de gran interés, ya que de los 8 que aumentaron su expresión, 7 (*ESC1*, *ESC4*, *HTZ1*, *HHT2*, *HHF1*, *HHF2* y *TAP60*) participan en el silenciamiento de genes subteloméricos, por modificación de la arquitectura de cromatina.<sup>31,32</sup> Las proteínas de estos genes interactúan con Sir4p, el cual a su vez es activado por Cdc28p, la principal cinasa reguladora del ciclo celular.<sup>33</sup> Aunque ambos genes no resultaron significativamente sobreexpresados, sus valores Z fueron positivos y mayores a 1. Es interesante notar que Cdc28p es activada por ciclinas,<sup>34</sup> y dos de estos genes (*CLB1* y *CLB2*) fueron activados también bajo estas circunstancias. Las ciclinas son a su vez activadas por la acción de *BCK2*, quien también fue sobreexpresado bajo estas condiciones. Es interesante notar que *BCK2* ha sido implicado en la respuesta a estrés osmótico, por lo que su activación pudiera disparar el inicio del ciclo celular en presencia de altas concentraciones de azúcares fermentables.<sup>34</sup> Adicionalmente,

*CDC28* es regulado negativamente por *SWE1*,<sup>35</sup> este gen resultó reprimido en los ensayos. Como resultante de estas acciones concertadas, un importante número de genes del ciclo celular también resultaron sobreexpresados.

La importancia de la sobreexpresión de genes silenciadores de zonas subteloméricas radica en que es ahí donde precisamente se localiza la mayoría de los genes de floculación, con excepción de *FLO8* y *FLO11*.<sup>29</sup> Como se mencionó anteriormente, la expresión de *Lg-FLO1*, determinada por qPCR, estuvo fuertemente relacionada con la modulación de la floculación en las cepas industriales, mientras que *FLO8* y *FLO11* no sufrieron alteración en su expresión en relación a la capacidad de flocular. *Lg-FLO1* reside en el locus que en las cepas de laboratorio corresponde a *FLO5* (YHR211W) en posición subtelomérica en el cromosoma VIII,<sup>36</sup> por lo que una regulación por silenciamiento de genes subteloméricos pudiera ser el mecanismo modulador de su expresión. En este sentido, en los ensayos de microarreglos, ocho genes subteloméricos (*MAL32*, *AAD14*, *FET4*, *YAR061W*, *YAR069C*, *YLR462W*, *YDR537C* y *YHR213W*) fueron regulados negativamente, además de *MATa*, gen que aunque no está localizado en regiones cercanas a telómeros, se sabe que es regulado por el mismo mecanismo de silenciamiento.<sup>32</sup> De esta forma los resultados sugieren evidentemente que *Lg-FLO1* es regulado por este mecanismo. La localización subtelomérica de estos genes de floculación hacía sospechar la participación de un mecanismo relacionado; ésta es la primera ocasión en que experimentalmente se observa una clara asociación entre ambos grupos de genes.

Otros dos grupos interesantes de genes que fueron activados son los asociados a estrés osmótico y biosíntesis de pared (tabla II). Ambos grupos están relacionados, ya que la detección de condiciones hipo o hiperosmóticas conduce, entre otras cosas, a la modificación de la pared celular.<sup>37</sup> En este caso, cinco genes de biosíntesis de pared fueron sobreexpresados y sólo uno reprimido, indi-

Tabla II. Genes regulatorios asociados a la expresión de la floculación.

Nombre común	Descripción	Procesos biológicos	Expresión
<i>CLB1</i>	Ciclina B, específica para G2/M	Ciclo celular	Inducida
<i>CLB2</i>	Ciclina B, específica para G2/M	Ciclo celular	Inducida
<i>SWE1</i>	Cinasa de especificidad dual, inhibe Cdc28p	Ciclo celular	Reprimida
<i>BCK2</i>	Supresor de mutaciones de PKC1, su sobreexpresión estimula transcripción de ciclina B	Estrés osmótico	Inducida
<i>MSN1</i>	Activador transcripcional involucrado en regulación de expresión invertasa y glucoamilasa, crecimiento invasivo y diferenciación pseudohifal ( <i>FLO11</i> ) y respuesta a estrés osmótico. Vía MAPK	Estrés osmótico	Inducida
<i>PKC1</i>	Protein cinasa C, con actividad choque hipotónico. Vía MAPK	Estrés osmótico	Reprimida
<i>PTC2</i>	Fosfoprotein fosfatasa tipo 2C, defosforila Hog1p y Cdc28p. Inactiva vía MAPK al finalizar estrés osmótico	Estrés osmótico	Inducida
<i>RGD2</i>	GTPasa proteína activadora para Cdc42p y Rho5p. Vía PKC1/MAPK	Estrés osmótico	Inducida
<i>SLG1/WSC1</i>	Sensor requerido para integridad de pared celular y respuesta a estrés hipoosmótico, vía señalización Ras, PKC1/ MAPK	Estrés osmótico	Inducida
<i>STE20</i>	Protein cinasa de la vía MAPK participa en respuesta a feromonas, choque osmótico, y falta de nutrientes	Estrés osmótico	Reprimida
<i>HIR1</i>	Regulador de transcripción de histonas, correpresor	Factores de transcripción	Reprimida
<i>SNF12</i>	Componente SWI/SNF activador global de transcripción, respuesta a estrés	Factores de transcripción	Reprimida
<i>ESC1</i>	Establece silenciamiento de cromatina en telómeros uniéndose a Sir4p	Silenciamiento de genes	Inducida
<i>ESC4</i>	Establece silenciamiento de cromatina, regula transposición	Silenciamiento de genes	Inducida
<i>HHF1</i>	Histona H4. Interactúa con Sir4p para silenciamiento de telómeros	Silenciamiento de genes	Inducida
<i>HHF2</i>	Histona H4. Interactúa con Sir4p para silenciamiento de telómeros	Silenciamiento de genes	Inducida
<i>HHT2</i>	Histona H3. Interactúa con Sir4p para silenciamiento de telómeros	Silenciamiento de genes	Inducida
<i>HTZ1</i>	Variante de histona H2AZ. Regula extensión de silenciamiento	Silenciamiento de genes	Inducida
<i>TAF60</i>	Factor transcripcional TFIID y subunidad SAGA, similar a histona H4	Silenciamiento de genes	Inducida

cando actividad en este rubro. Por otra parte, la actividad de los genes de estrés osmótico fue variada: siete genes fueron inducidos (*SLG1*, *RGD2*, *MSN1*, *HOR2*, *RHR2*, *PTC2* y *BCK2*), mientras que tres fueron reprimidos (*PKC1*, *STE20* y *SNF12*). Es interesante notar que Msn1p ha sido referido como un activador transcripcional de *FLO11*<sup>38</sup> y su actividad es necesaria para la expresión de la floculación en cepas de laboratorio; sin embargo, en el caso de las levaduras lager, la actividad de este gen no tuvo efecto positivo en la floculación, reforzando la idea de que existe un mecanismo diferente para el control de la expresi-

ón de *Lg-FLO1*. La vía PKC1/MAPK ha sido ampliamente referida como responsable de la regulación de la floculación en cepas de laboratorio. Los resultados contrastan notoriamente con esta observación en dos sentidos: 1) el principal efector transcripcional positivo de esta cascada, *MSN1*, estaba siendo sobreexpresado durante la fase en que la floculación estuvo reprimida, mientras que importantes activadores de la vía como *STE20* y *PKC1*<sup>39,40</sup> se encontraron reprimidos; 2) a diferencia de los demás genes, *FLO*, *FLO11* fue activado en la cepa panadera, independientemente de su incapacidad de floculación, lo que confir-

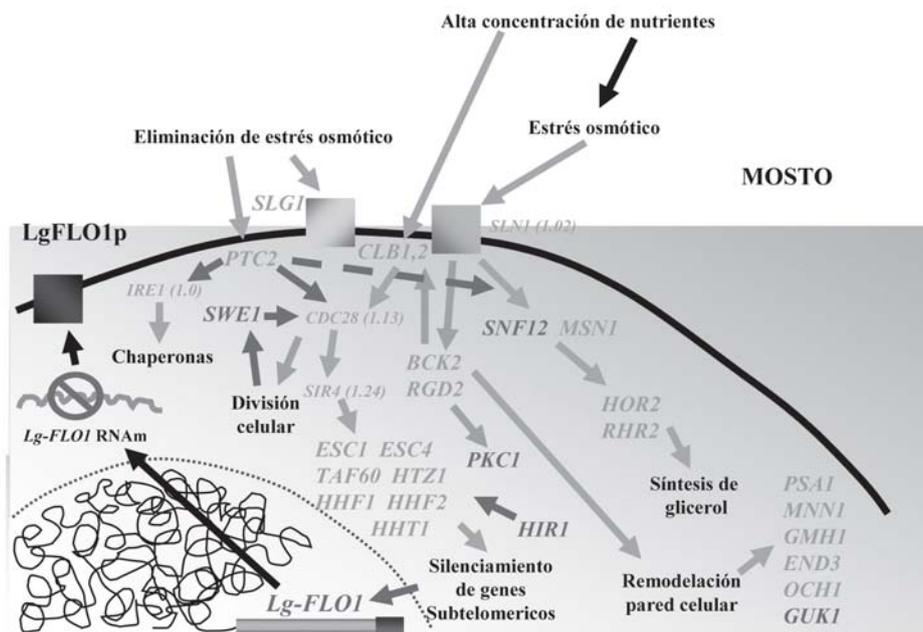


Fig. 5. Modelo del mecanismo de regulación de los genes de floculación en cepas industriales. El color verde en el nombre de los genes significa inducción, el rojo represión, en menor tamaño se presentan genes cuya expresión fue aumentada, pero el Z score fue menor a 2 (el número entre paréntesis indica el valor específico). El color de las flechas indica el efecto del producto del gen: verde activación, rojo inactivación.

ma que en las cepas *Saccharomyces cerevisiae* var. *cerevisiae* (cepas de laboratorio, de panadería, ale, etc.), el gen *FLO11* es activado en condiciones donde *MSN1* es activo,<sup>41</sup> pero esto es independiente del status de floculación. *FLO11* ha sido reportado participando en muchas otras actividades,<sup>42</sup> pero aparentemente en las cepas lager industriales su papel en la floculación es secundario. El hecho de que la supresión de la floculación no depende en primera instancia de la activación de la vía *PKC1*/*MAPK*, queda corroborado por el hecho de que no se observó diferencia en la floculación al fermentar mostos de 12°P y 17°P en las cepas industriales (tabla I). Sin embargo, dada la alta actividad de expresión de estos genes en los microarreglos, cabe la posibilidad de que la levadura coordine de alguna otra forma su expresión de floculación con la respuesta a estrés osmótico. Las claves parecen ser *PTC2* y *BCK2*. Es importante mencionar que la inducción de *PTC2* fue detectada al 5° día de fermentación, mientras que *BCK2* al 3<sup>er</sup> día (datos no mostrados); la primera

codifica para una enzima cinasa serina/treonina, y tiene un amplio espectro de acción regulando negativamente la acción de Hog1p, efector positivo de la expresión de los genes de respuesta a estrés y Cdc28p, el principal regulador del ciclo celular.<sup>43</sup> *BCK2* ya se mencionó anteriormente como un activador de la expresión de *CLB1* y *CLB2* (ciclinas B). *Ptc2p* y *Bck2p* responden a condiciones antagónicas de hiperosmolaridad. Mientras que *BCK2* es inducido por la detección de altos niveles de osmolaridad, la inducción de *PTC2* ocurre al momento de recibir la señal de disminución de estrés osmótico, por lo que su expresión es el paso inicial para la eliminación de la activación de Cdc28p sobre el sistema de silenciamiento de genes subteloméricos. Su sobreexpresión en los ensayos realizados podría indicar que la levadura ya no detecta condiciones de hiperosmolaridad en el entorno (lo que también implica disminución de nutrientes), y por lo tanto debe iniciar su proceso de floculación.

Tomando juntas todas las piezas de información obtenidas experimentalmente en los ensayos de microarreglos y qPCR, surge una imagen (figura 5) que lleva a un modelo coherente y altamente significativo de regulación de la floculación en cepas lager. La interpretación es la siguiente: al inicio de la fermentación, la alta presencia de nutrientes dispara la expresión de los genes que activan el ciclo celular, así como la respuesta a estrés osmótico, con la consecuente remodelación de la pared celular. *BCK2* es inducido respondiendo a la situación de hiperosmolaridad y activa la biosíntesis de ciclinas B. Éstas interactúan con Cdc28p, que a su vez activa la cascada de silenciamiento de genes subteloméricos, a los que pertenecen, entre otros, los genes de floculación, particularmente *Lg-FLO1*, el principal gen estructural de floculación en levaduras lager. Conforme avanza el consumo de nutrientes, el estrés osmótico es aliviado. En este momento, *PTC2* es inducido y su actividad reprime la respuesta a estrés osmótico y el ciclo celular. Como consecuencia de su efecto regulador negativo sobre Cdc28p, la actividad de silenciamiento de genes subteloméricos se ve relevada, por lo que la expresión de *Lg-FLO1* puede ser activada.

A nuestro conocimiento, éste es el primer trabajo que explora los aspectos reguladores de la floculación en cepas industriales y que reporta una clara relación entre ciclo celular, estrés osmótico, silenciamiento de genes y floculación. A nivel práctico, estos resultados proveen herramientas para entender el control del proceso de floculación y permiten discernir cuáles condiciones de fermentación tienen un impacto sobre la floculación en cepas industriales.

## Conclusiones

La distribución de genes *FLO* entre cepas diferentes de levaduras fue heterogénea, siendo más predominantes *FLO8* y *FLO11*, además de *Lg-FLO1* en levaduras lager industriales.

A nivel fenotípico, sólo la edad generacional y el perfil de carbohidratos tuvieron impacto significativo en la capacidad de floculación de las levaduras. El perfil de carbohidratos disminuyó la capacidad floculante mientras que la edad generacional la aumentó.

Sólo la expresión de *Lg-FLO1* se correlacionó con los cambios de floculación observados a nivel fenotípico en cepas industriales.

La represión de la floculación se correlacionó con diversos genes asociados a ciclo celular, silenciamiento de genes subteloméricos y estrés osmótico, lo que indica un mecanismo de control de la floculación concertado con otros eventos fisiológicos durante la fermentación.

## Resumen

La floculación es una característica muy importante de las cepas industriales de *Saccharomyces cerevisiae*, que facilita las operaciones de clarificación del producto y recuperación de levadura. Sin embargo se desconocen los genes que controlan la floculación bajo condiciones de operación industrial. En el presente trabajo se determinó el número y tipo de genes relacionados con la floculación (*FLO*) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de punto final, así como sus niveles de expresión en diferentes cepas de levaduras industriales, mediante PCR cuantitativa (qPCR), bajo condiciones de proceso que afectan la floculación (alta presión osmótica, presión hidrostática, represión catabólica, restricción calórica y edad generacional). Por otra parte se analizó la expresión global a nivel transcripcional por microarreglos de ADN. La capacidad floculante fue disminuida de forma específica por alto contenido de glucosa en el medio (represión catabólica); pero incrementada con la edad generacional. El contenido de genes *FLO* fue variable (de 3 a 6 genes por cepa), siendo más conservados los genes *Lg-FLO1*, *FLO8* y *FLO11*. En los resultados de qPCR se determinó que sólo la expresión de *Lg-FLO1* se correlacionó con la

floculación. Finalmente, el análisis de microarreglos reveló que la regulación de floculación esta sujeta principalmente a un mecanismo de silenciamiento epigenético por modificación de la arquitectura de la cromatina en genes subteloméricos.

**Palabras clave:** *Saccharomyces cerevisiae*, Genes *FLO*, Floculación, Microarreglos de ADN, Fermentación, PCR cuantitativa, Factores de estrés.

### Abstract

Flocculation is a very important characteristic of *Saccharomyces cerevisiae* industrial strains, which assists product separation and yeast harvesting. However, genes controlling flocculation under industrial operation are unknown. In this study, genes participating in flocculation (*FLO*) were identified via end point PCR, and their expression was studied by quantitative PCR (qPCR) under conditions that impact flocculation (osmotic and hydrostatic pressure, catabolic repression, caloric restriction and generational aging). Also, global expression analysis under these fermentation conditions was carried out by DNA microarray. Results showed that flocculation was diminished by catabolic repression; but it was increased by generational aging. The content of *FLO* genes was variable (3 to 6 genes by strain) being *Lg-FLO1*, *FLO8*, and *FLO11* the most conserved. In qPCR experiments, results showed that only the expression of *Lg-FLO1* was correlated with flocculation. Finally, DNA microarray analysis revealed that the genes related to regulation of flocculation were mainly those that participate in subtelomeric gene silencing via chromatin architecture remodeling.

**Keywords:** *Saccharomyces cerevisiae*, *FLO* genes, Flocculation, DNA microarrays, Fermentation, Quantitative PCR, Stress factors.

### Referencias

- 1 Verstrepn K.J., G. Derdelinckx, H. Verachtert, y F.R. Delvaux. 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol.* 61:197-205.
2. Speers R.A., M.A. Tung, T.D. Durance y G.G. Stewart. 1992. Biochemical aspects of yeast flocculation and its measurement: A Review. *J. Inst. Brew.* 98:293-300
3. Hardwick W.A. 1995. Handbook of Brewing. Marcel Dekker Inc. N.Y. USA.
4. Goldstein I.J., R.C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, N. Sharon. 1980. What should be called a lectin? *Nature*, 285: 66.
5. Speers R.A., K. Smart, R. Stewart y Y.-L. Jin. 1998. Zymolectins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Letter J. Inst. Brew.* 104:298.
6. Straver MG, Smit JW. Kijne. 1994. Purification and Partial Characterization of a flocculin from Brewers Yeast. *Amer. Soc. Microb.* 8: 2754-2758.
7. Dranginis A.M., J.M. Rauceo, J.E. Coronado y P.N. Lipke. 2007. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol. Molec. Rev.* 71: 282-294.
8. Lo W. y A.M. Dranginis. 1996. *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J. Bacteriol.* 178:7144-7151.
9. Kondo H., H. Yomo, T. Takatani, T. Izumi, H. Hatanaka, A. Fujita y N. Fukui. 2003. Gene expression analysis of brewing yeasts during beer fermentations using DNA microarray. *EBC Proc.* 2003.
10. Halme A., S. Bumgarner, C. Tyles, G.R. Fink. 2004. Genetic and Epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell*, 116: 405-415.
11. Rupp S., E. Summers, H. J. Lo, H. Madhani y G. F. Madhani. 1999. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the

- yeast *FLO11* gene. *EMBO J.* 18:1257-1269.
12. Gagliano M., D. Van Dyk, F. F. Bauer, M. G. Lambrechts e I. S. Pretorius. 1999. Divergent regulation of the evolutionarily closely related promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* *STA2* and *MUC1* genes. *J. Bacteriol.* 181:6497-6508
  13. Fleming A.B. y S. Pennings. 2001. Antagonistic remodeling by Swi-Snf and Tup-Ssn of an extensive chromatin region forms the background for *FLO1* gene regulation. *EMBO J.* 20: 5219-5231.
  14. Kim T.S., S. B. Lee y H. S. Kang. 2004. Glucose repression of *STA1* expression is mediated by the Nrg1 and Sfl1 repressors and the Srb8-11 complex. *Mol. Cel. Biol.* 24:7695-7706.
  15. Kim T.S., H. Y. Kim, J. H. Yoon, y H. S. Kang. 2004. Recruitment of the Swi/Snf complex by Ste12-Tec1 promotes Flo8-Mss11-mediated activation of *STA1* expression. *Mol. Cel. Biol.* 24:9542-9556.
  16. Ruiz A., I. Muñoz, R. Serrano, A. González, E. Simón, y J. Ariño. 2004. Functional Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* VHS3 Gene. A Regulatory Subunit of the Ppz1 Protein Phosphatase with Novel, Phosphatase-Unrelated Functions. *The Journal of Biological Chemistry.* 279: 34421-34430, 2004.
  17. Van Dyk D., I.S. Pretorius y F.F. Bauer. 2005. Mss11p is a central element of the regulatory network that controls *FLO11* expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 169: 91-106.
  18. Liu H., C. A. Styles y G. R. Fink. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FLO8*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* 144:967-978.
  19. Fujita A., N. Fukui, H. Kondo y Y. Kawasaki. 2002. Relationship between the flavor compounds formation and the gene expression profiles of brewing yeast. *ASBC Annual Meeting Proceedings.*
  20. Higgins V.J., A.D. Oliver, R.E. Day, I. J.W. Dawes y P.J. Rogers. 2001. Application of genome-wide transcriptional analysis to identify genetic markers useful in industrial fermentations. *EBC Proc.* 2001.
  21. Olesen K., T. Felding, C. Gjermansen y J. Hansen. 2002. The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during production-scale lager beer fermentation. *FEMS Yeast Res.* 2:563-573.
  22. James T.C., S. Campbell, D. Donnelly y U. Bond. 2003. Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions. *J. Appl. Microbiol.* 94:432-448.
  23. Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual.* 2nd ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
  24. Bidard, F., B. Blondin, S. Dequin, F. Vezinhet, y P. Barre. 1994. Cloning and analysis of a *FLO5* floculation gene from *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* 25:196-201.
  25. American Society of Brewing Chemists. 1999. *Methods of Analysis.* 8th ed. The Society, St. Paul, MN.
  26. Henegariu O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, P.H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23: 504-511.
  27. Gómez Mayén A.P., G. Corral Guillé, L. Riego Ruiz y G. Coello Coutiño. 2006. The GenArise Package. Instituto de Fisiología Celular UNAM. Mexico DF. pp. 1-27
  28. Heggart H.M., A. Margaritis, H. Pickington, R.J. Stewart, T.M. Dowhanick e I. Russell. 1999. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *MBAA Tec. Quart.* 36:383-406
  29. Teunissen A.W. y H.Y. Steensma. 1995. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast*, 11:1001-13.
  30. Douglas L.M., L. Li, Y. Yang, A.M. Dranginis. 2007. Expression and Characterization of the Flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevi-*

- siae* Mannoprotein with Homotypic Properties of Adhesion. *Euk. Cell*, 6: 2214-2221.
31. Aparicio O.M., B.L. Billington y D.E. Gottschling. 1991. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 66:1279-87.
  32. Andrusis E D., D.C. Zappulla, A. Ansari, S. Perrod, C.V. Laiosa, M.R. Gartenberg, y R. Sternglanz. 2002. Esc1, a Nuclear Periphery Protein Required for Sir4-Based Plasmid Anchoring and Partitioning. *Molecular and Cellular Biology*. 22: 8292-8301.
  33. Ubersax J.A., E.L. Woodbury, P.N. Quang, M. Paraz, J.D. Blethrow, K. Shah, K.M. Shokat y D.O. Morgan. 2003 Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425: 859-864.
  34. Mendenhall M.D., y A.E. Hodge. 1998. Regulation of Cdc28 Cyclin-Dependent Protein Kinase Activity during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. 62: 1191-1243.
  35. Booher R.N., R.J. Deshaies y M.W. Kirschner. 1993. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* *Wee1* and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J* 12: 3417-3426.
  36. Ogata T., M. Izumikawa, M. Miyoshi-Shikata, H. Tadami y Y. Kitagawa. 2008. Nitrogen source starvation induces expression of *LgFLO1* and flocculation of bottom-fermenting yeast. Proceedings of the World Brewing Congress 2008.
  37. Lodder A.L., T. K. Lee y R. Ballester. 1999. Characterization of the Wsc1 Protein, a Putative Receptor in the Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152: 1487-1499.
  38. Lambrechts M.G., F.F. Bauer, J. Marmurt, e I.S. Pretorius. 1996. Mucl, a mucin-like protein that is regulated by MsslO, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8419-8424.
  39. Levin D.E., B. Bowers, C.Y. Chen, Y. Kamada y M. Watanabe. 1994. Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* 40:229-39.
  40. Bardwell L. 2005. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 26:339-50.
  41. Rep M., V. Reiser, U. Gartner, J.M. Thevelein, S. Hohmann, G. Ammerer, y H. Ruis. 1999. Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p. *Molecular and Cellular Biology*. 19: 5474-5485.
  42. Guo B., C.A. Styles, Q. Feng, G.R. Fink. 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 12158-12163.
  43. Cheng A., K.E. Ross, P. Kaldis y M.J. Solomon. 1999. Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes & Dev.* 13: 2946-2957

Recibido: 16 de agosto de 2009

Aceptado: 10 de septiembre de 2009