

M11 - RUTAS METABÓLICAS IMPORTANTES EN LA FORMACIÓN DE VELO DE FLOR

Jaime Moreno-García¹, Juan Carlos Mauricio¹, Juan Moreno², Nieves López de Lerma², Rafael A. Peinado², Teresa García-Martínez¹

¹Universidad de Córdoba/Facultad de Ciencias, departamento de Microbiología, Edificio Severo Ochoa (C6), Planta baja, Campus Universitario de Rabanales, (Ctra. Madrid, Km 396, 14014, Córdoba, España)

²Universidad de Córdoba/Facultad de Ciencias, departamento de Química Agrícola y Edafología, Edificio Marie Curie (C3), Planta tercera, Campus Universitario de Rabanales, (Ctra. Madrid, Km 396, 14014, Córdoba, España)

mi2gamam@uco.es

RESUMEN:

La crianza biológica de los vinos tipo Sherry es un proceso que se caracteriza por la formación y mantenimiento sobre la superficie del vino de una película (biofilm) de levaduras llamada "velo de flor" que aporta el aroma y sabor característico de estos vinos. Para dilucidar las rutas metabólicas de relevancia en una condición típica de velo de flor, se han identificado enzimas sobreexpresadas de una levadura de flor mediante la técnica de fraccionamiento OFFGEL y detección LTQ Orbitrap XL MS. Como referencia se ha comparado con una condición sin formación de velo de flor. Los resultados indican una sobreexpresión de proteínas en formación de velo relacionadas con las rutas metabólicas del complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa, la cadena de transporte de electrones, el ciclo de los ácidos tricarbóxicos (TCA) y de glioxilato, la degradación de isoleucina y leucina, y la biosíntesis de folato, entre otras. Los resultados obtenidos podrían servir como una herramienta para desarrollar estrategias con objeto de mejorar la calidad de los vinos sometidos a procesos tales como la crianza biológica.

Palabras clave: velo de flor, *Saccharomyces cerevisiae*, proteínas, rutas metabólicas, OFFGEL, LC-MS/MS.

1. Introducción

Los vinos finos se elaboran mediante el proceso de crianza biológica, que básicamente consiste en el desarrollo y mantenimiento sobre la superficie del vino de una película de varios milímetros de espesor de levaduras de color marfil, conocidas como "velo de flor". Este tipo de crianza se lleva a cabo después de la fermentación del mosto de uva, cuando la levadura de flor es predominante en un medio donde los azúcares glucosa y fructosa se han consumido y el contenido en etanol es elevado [1].

El etanol ejerce sobre las levaduras un efecto tóxico, pero también puede ser utilizado como una fuente de carbono, dependiendo de la adaptación de las levaduras a las condiciones del medio. Los metabolitos excretados por las levaduras de flor, al consumir las fuentes de carbono remanentes de la fermentación previa, determinan la calidad organoléptica del vino fino obtenido [2].

En este estudio, se ha utilizado la técnica OFFGEL y el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap XL MS para el fraccionamiento e identificación, respectivamente, de las proteínas participantes en rutas metabólicas. Paralelamente, se han sometido a las mismas técnicas de análisis, las proteínas de células de levadura desarrolladas durante 12 horas en un medio pre-fermentativo, con objeto de usar la información obtenida como referencia para comparar con las proteínas en una y otra condición de cultivo. El objetivo de este trabajo es identificar las proteínas más abundantes y las rutas metabólicas en las que intervienen durante la formación de velo de flor.

2. Material y métodos

La cepa de levadura que se usó en este estudio fue *Saccharomyces cerevisiae* G1 (ATCC: MYA-2451). Se inocularon con 5×10^6 células/mL (células crecidas previamente en YPD) dos medios de cultivo diferentes: uno de referencia (CR) que contenía como fuente de carbono 17% glucosa (YNB con ácido glutámico como fuente de nitrógeno) y otro de formación de velo de flor (CVF) que contenía 10% etanol y 1% glicerol como fuente de carbono (YNB con ácido glutámico como fuente de nitrógeno). Las células se recogieron en fase exponencial en ambas condiciones, 12 horas y 29 días, respectivamente. Para el análisis proteómico se usó el fraccionador OFFGEL para su separación por punto isoeléctrico (pH 3-10) y el espectrómetro de masas LTQ Orbitrap para su identificación [3]. Con el fin de comparar la cantidad de proteínas detectadas en la misma condición y entre las dos condiciones, se ha realizado una cuantificación relativa utilizando el índice empAI o índice modificado de abundancia de proteínas de forma exponencial [4]. Tras la identificación y cuantificación, se seleccionaron las proteínas implicadas en las rutas metabólicas según la base de datos SGD (<http://www.yeastgenome.org/>).

3. Resultados

En este estudio se han identificado un total de 413 proteínas de levadura de flor bajo la condición de velo de flor (CVF) y 611 bajo la condición de referencia (CR). Tras aplicar un filtrado usando la base de datos SGD, se seleccionaron aquellas proteínas que están implicadas en rutas metabólicas para su posterior discusión, obteniendo así 114 proteínas en la CVF y 144 en la CR.

Entre las proteínas más abundantes en CVF se observó un mayor número, en comparación con la condición de referencia, de aquellas que participan en rutas como la del complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa, cadena de transporte de electrones, ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y de glioxilato, degradación de isoleucina y leucina, y la biosíntesis de folato (Fig. 1). Por otro lado, las rutas metabólicas con proteínas más sobreexpresadas en la CR fueron el sistema de glutatión-glutaredoxina, el sistema de tioredoxina, la ruta de asimilación del sulfato y la biosíntesis de histidina (Fig. 1).

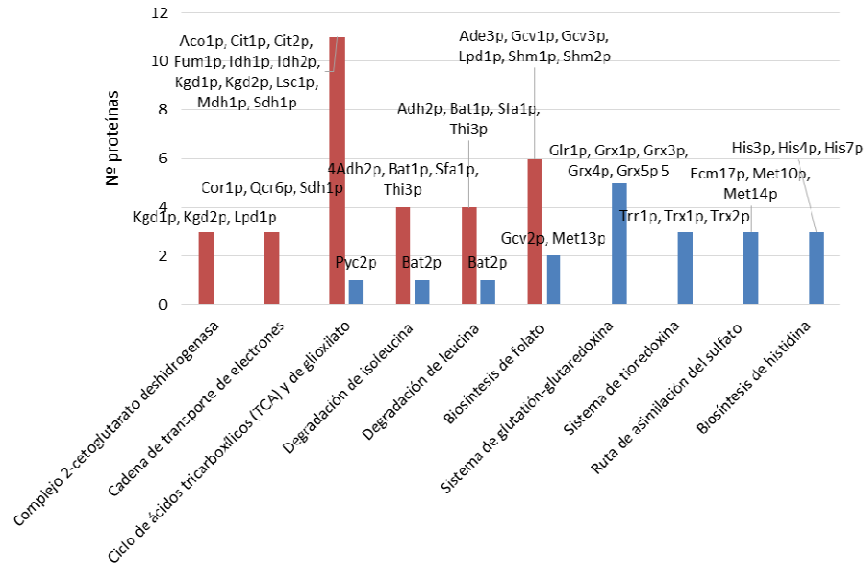


Figura 1. Rutas metabólicas de la levadura de flor bajo una condición de formación de velo de flor (CVF, rojo) y una condición de referencia (CR, azul) considerando sólo las proteínas más abundantes.

Las rutas del complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa y la cadena de transporte de electrones fueron aquéllas que en CVF presentaron mayor diferencia con respecto a CR. Ambas, agruparon 3 proteínas más abundantes (Kgd1p, Kgd2p y Lpd1p en el primer caso y Cor1p, Qcr6p y Sdh1p) mientras que en CR, ninguna proteína con esta función fue detectada con mayor abundancia. El complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa incluye 3 enzimas (las tres detectadas en CVF), éstas transforman los ácidos 2-oxo a los derivados de acil-CoA correspondientes y produce NADH y CO₂ en una reacción irreversible. En cuanto a la cadena de transporte de electrones, ésta constituye el paso final de la vía respiratoria, que está implicada en la síntesis de ATP, así como en el transporte de metabolitos a través de la membrana [5]. También relacionada con la respiración aerobia está el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y de glioxilato. En este estudio se han detectado 11 proteínas más abundantes en CVF y 1 en la condición de referencia. Estas rutas se pueden enmarcar en el contexto del metabolismo oxidativo que desarrollan las levadura de flor en condiciones de crianza biológica, a través del cual el etanol es oxidado y se producen subproductos responsables del sabor y aroma característicos del vino fino [2,6].

Además, un alto porcentaje de proteínas con más abundancia en CVF fueron agrupadas en dos rutas de degradación de aminoácidos y en la síntesis de folato. Estos aminoácidos fueron la isoleucina y la leucina. En ambos, su isómero L forma parte de los 22 aminoácidos proteínogénicos mientras que su isómero D se utiliza como fuente de carbono, nitrógeno, y de energía a través de la vía de Ehrlich que culmina en la reducción del aldehído para formar un alcohol de cadena larga o complejo, conocido como un alcohol fusel o aceite de fusel. Los alcoholes fusel son compuestos de sabor y aroma importantes en los productos alimenticios y bebidas fermentadas [7]. En cuanto al folato, o vitamina B₉, se identificaron 6 proteínas más abundantes bajo esta condición que están relacionadas con su síntesis. Este compuesto contiene propiedades saludables y se usa como aditivo alimenticio ya que el ser humano es incapaz de sintetizarlo [8, 9]. Futuros análisis metabólicos se requieren para detectar la posible presencia de esta molécula que hasta la fecha no ha sido descrita en los vinos finos.

4. Conclusiones

Como resultado de un análisis proteómico, se ha detectado un alto porcentaje de proteínas presentes en altas concentraciones en la condición de formación de velo de flor relacionadas con las rutas metabólicas del complejo 2-cetoglutarato deshidrogenasa, la cadena de transporte de electrones, el ciclo de los ácidos tricarboxílicos (TCA) y de glioxilato, la degradación de isoleucina y leucina, y la biosíntesis de folato, cuya presencia no ha sido descrita hasta la fecha en los vinos finos. Estos datos pueden servir como un recurso para el desarrollo de estrategias con objeto de mejorar la calidad de los vinos sometidos a procesos tales como la crianza biológica.

5. Bibliografía

1. Esteve-Zaroso, B., Peris-Toran, M. J., García-Maiquez, E., Uruburu, F.; Querol, A. 2001. Yeast population dynamics during the fermentation and biological ageing of sherry wines. *In: Appl Environ Microb.* 67, 2056–2061.
2. Peinado, R. A.; Mauricio, J. C. 2009. Biologically Aged Wines. *In: Wine Chemistry and Biochemistry.* Moreno-Arribas, M.V; Polo, M.C. (Eds.). Springer. ISBN: 978-0-387-741161-1. pp 81–103.
3. Moreno-García, J., García-Martínez, T., Moreno, J.; Mauricio, J.C. 2015. Proteins involved in flor yeast carbon metabolism under biofilm formation conditions. *In: Food Microbiol.* 46, 25-33.
4. Ishihama, Y., Oda, Y., Tabata, T., Sato, T., Nagasu, T., Rappsilber, J.; Mann, M., 2005. Exponentially modified protein abundance Index (emPAI) for estimation of absolute protein amount in proteomics by the number of sequenced peptides per protein. *In: Mol Cell Proteomics.* 4, 1265-1272.
5. Joseph-Horne, T., Hollomon, D. W.; Wood P. M. 2001. Fungal respiration: a fusion of standard and alternative components. *In: Biochim Biophys Acta.* 1504, 179-195.
6. Mauricio, J.C., Moreno, J.; Ortega, J.M., 1997. In vitro specific activities of alcohol and aldehyde dehydrogenases from two flor yeasts during controlled wine aging. *In: J Agric Food Chem.* 45, 1967-1971.
7. Lilly, M., Bauer, F. F., Styger, G., Lambrechts, M. G.; Pretorius, I. S. 2006. The effect of increased branched-chain amino acid transaminase activity in yeast on the production of higher alcohols and on the flavour profiles of wine and distillates. *In: FEMS Yeast Res.* 6, 726-743.
8. Botez, M. I. 1976. Folate deficiency and neurological disorders in adults. *In: Med. Hypotheses,* 2, 135-140.
9. Weinstein, S. J., Hartman, T. J., Stolzenberg-Solomon, R. Pietinen, P., Barrett, M. J., Taylor, P. R., Virtamo, J.; Albanes, D. 2003. Null association between prostate cancer and serum folate, vitamin B(6), vitamin B(12), and homocysteine. *In: Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 12, 1271-1272.

6. Agradecimientos

Este trabajo ha sido financiado por el Proyecto RTA2011-00020-C02-02 del Ministerio de Economía y Competitividad (MINECO-INIA-CCAA) y FEDER.