



MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN: 978-84-694-1240-4

Dipòsit Legal: T-321-2011

ADVERTIMENT. La consulta d'aquesta tesi queda condicionada a l'acceptació de les següents condicions d'ús: La difusió d'aquesta tesi per mitjà del servei TDX (www.tesisenxarxa.net) ha estat autoritzada pels titulars dels drets de propietat intel·lectual únicament per a usos privats emmarcats en activitats d'investigació i docència. No s'autoritza la seva reproducció amb finalitats de lucre ni la seva difusió i posada a disposició des d'un lloc aliè al servei TDX. No s'autoritza la presentació del seu contingut en una finestra o marc aliè a TDX (framing). Aquesta reserva de drets afecta tant al resum de presentació de la tesi com als seus continguts. En la utilització o cita de parts de la tesi és obligat indicar el nom de la persona autora.

ADVERTENCIA. La consulta de esta tesis queda condicionada a la aceptación de las siguientes condiciones de uso: La difusión de esta tesis por medio del servicio TDR (www.tesisenred.net) ha sido autorizada por los titulares de los derechos de propiedad intelectual únicamente para usos privados enmarcados en actividades de investigación y docencia. No se autoriza su reproducción con finalidades de lucro ni su difusión y puesta a disposición desde un sitio ajeno al servicio TDR. No se autoriza la presentación de su contenido en una ventana o marco ajeno a TDR (framing). Esta reserva de derechos afecta tanto al resumen de presentación de la tesis como a sus contenidos. En la utilización o cita de partes de la tesis es obligado indicar el nombre de la persona autora.

WARNING. On having consulted this thesis you're accepting the following use conditions: Spreading this thesis by the TDX (www.tesisenxarxa.net) service has been authorized by the titular of the intellectual property rights only for private uses placed in investigation and teaching activities. Reproduction with lucrative aims is not authorized neither its spreading and availability from a site foreign to the TDX service. Introducing its content in a window or frame foreign to the TDX service is not authorized (framing). This rights affect to the presentation summary of the thesis as well as to its contents. In the using or citation of parts of the thesis it's obliged to indicate the name of the author.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

Rosa Ana Chiva Tomás

**Mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en
la adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a las bajas
temperaturas de fermentación**

Tesis Doctoral

Dirigida por el Dr. José Manuel Guillamón Navarro

Dpt. De Bioquímica i Biotecnologia
Grupo de Biotecnología Enológica



UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

Tarragona

2010

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011



Dept. Bioquímica i Biotecnologia
FACULTAT D'ENOLOGÍA
C/ Marcel·li Domingo s/n
43007 Tarragona
Tel. 34-977558442
Fax. 94-977558232

HAGO CONSTAR que el presente trabajo, con título “**Mecanismos moleculares y bioquímicos implicados en la adaptación de *Saccharomyces cerevisiae* a las bajas temperaturas de fermentación**”, que presenta la **Srta Rosa Ana Chiva Tomás**, para optar al título de Doctora, ha sido realizado bajo mi dirección en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología de esta Universidad.

Valencia, 10 de Noviembre de 2010

El director de la tesis doctoral

Dr. Jose Manuel Guillamón Navarro

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

AGRADECIMIENTOS.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

Al final llegó el día, parecía imposible, pero lo ha hecho. En estos momentos que escribo las últimas palabras de esta Tesis miro hacia atrás y veo el tiempo que he invertido en ella y se que no renunciaría ni a un minuto. Pues esta tesis no es solo unos experimentos que me han hecho reír y llorar, o ambas cosas a la vez. Sino que es una historia de pequeños momentos que me han unido a personas increíbles a las que quiero agradecer haber estado ahí.

En primer lugar a mi director José Manuel Guillamón por apoyarme y confiar en mi incluso cuando yo dudaba de que lo podía lograr. Pero sobre todo por enseñarme, o intentarlo al menos, a que viese el vaso medio lleno cuando yo lo veía vacío.

A todos los profesores de la antigua y la nueva Facultad de Enología de Tarragona, por hacerme sentir como en casa. Especialmente a Albert Mas por transmitirme su pasión por la Enología, un campo desconocido para mi hasta entonces.

Quiero agradecer a Eladio Barrio y Amparo Querol, el ponerme en contacto con José Manuel y Albert, para poder realizar esta tesis, sin ellos no hubiese sido posible.

A mis antiguos compañeros de trastadas Tarraconenses, que hubiese hecho yo sin mi valenciano favorito en tierras extrañas, si Braulio es a ti, gracias por tu apoyo y por no tener ni un pelo en la lengua. A María Jesús, Gemma y Maite, por ser mis angelitos en el laboratorio, y mis diablillos fuera de él por supuesto!!! A Josep que me demostró que los de Reus no son tan malos, pero si un tanto histriónicos!! A Isa por hacerme compañía en la inmersión en el mundo de las fermentaciones. A Immeta, que continúes siempre así. A Esti, que llegó como un torbellino y me enseñó la importancia de las pequeñas cosas, pero sobre todo gracias por ser tan buena amiga.

Y como no, no puedo olvidarme de mis nuevos compañeros valencianos por acogerme tan bien en estos últimos años, a pesar de los sabotajes iniciales...En primer lugar quiero agradecer a mis chicas el estar siempre ahí; a María, mi lokita particular, no sabes el bien que me haces con tus mimitos, a Ali por ese puntito borde con el que quiere ocultar el gran corazón que tiene, y a Clara, generosa donde

las haya e increíble persona. Tampoco puedo dejar recordar al resto de compañeros del IATA, a Juanan, por ser un gran aglutinador, como se que continuará haciendo en Holanda. A Juan, por esas risas en los cafés, a Amparo y a Montse por dirigir como nadie nuestros actos sociales, a Meri por compartir esas malévolas ideas conmigo, a Ana por desplegar esa tranquilidad ante esta panda de locos, a Tronchoni, nuestro chico aventurero, a David por su ayuda y buenos consejos. A Jordi, por la paciencia que ha demostrado ante la legión femenina. A los chicos del Cavanilles: Laura, Peris, Noé y Sandi, por ser un soplo de aire fresco en el IATA. A Gloria por ejercer de madre adoptiva para todos nosotros. Por supuesto no puedo olvidarme de mi “pava” gemela Patri, que a pesar de que refunfuñe se que puedo contar con ella, y espero que sigamos corriendo grandes aventuras en el gran azul!!

Finalmente quiero agradecer a mi familia todo el apoyo y comprensión que me han dado en estos años. Se que para ellos ha sido difícil a veces entender mis decisiones pero eso no ha impedido que me dieran todas su fuerza y aliento.

¡MUCHAS GRACIAS!

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

I. ÍNDICE

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

I. ÍNDICE.	1
II. INTRODUCCIÓN.	9
1. LEVADURAS Y FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	11
1.1. Características generales de las levaduras.	11
1.1.1. <i>Morfología y organización celular.</i>	11
1.1.2. <i>Reproducción y ciclo celular de las levaduras.</i>	13
1.1.3. <i>Características genéticas de las levaduras: levaduras vínicas vs. levaduras de laboratorio.</i>	15
1.2. Fermentación alcohólica.	18
1.2.1. <i>Parámetros que afectan a la fermentación.</i>	21
1.2.1.1. <i>Deficiencias nutricionales.</i>	21
1.2.1.2. <i>Sustancias inhibidoras.</i>	22
1.2.1.3. <i>Prácticas enológicas en bodega.</i>	23
2. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE FERMENTACIÓN SOBRE LAS LEVADURAS VÍNICAS.	24
2.1. Efecto de la temperatura en la ecología y crecimiento de las levaduras.	25
2.2. La importancia del inóculo: levaduras criotolerantes.	26
2.3. Efecto de la temperatura sobre la cinética de fermentación.	27
2.4. Efecto de la temperatura en el metabolismo de las levaduras.	29
2.4.1. <i>Efecto de la temperaturas sobre la síntesis de etanol y otros productos secundarios.</i>	29
2.4.2. <i>Efecto de la temperaturas sobre los compuestos volátiles.</i>	30
2.5. Efecto de la temperatura sobre la fluidez y composición lipídica de la membrana plasmática.	31

3. RESPUESTAS DE LAS LEVADURAS AL ESTRÉS DURANTE LA FERMENTACIÓN A BAJA TEMPERATURA.	34
3.1. Respuesta general a estrés.	34
3.2. Respuesta a estrés térmico.	36
3.3. Respuestas a estrés durante la fermentación.	38
3.4. Inducción de genes por choque térmico de frío (“cold shock”).	39
3.4.1. <i>Genes inducidos por estrés.</i>	42
3.4.1.1. Genes marcadores de estrés general: <i>HSP12</i> , <i>HSP26</i> y <i>HSP104</i> .	42
3.4.1.2. Genes marcadores de estrés por choque térmico: <i>TIP1</i> y <i>TIR2</i> .	44
3.4.2. <i>Genes ribosomales: LOT2</i> y <i>NSR1</i> .	44
3.4.3. <i>Gen de ciclo celular: LTE1</i> .	45
3.4.4. <i>Gen de transporte de nutrientes: CSF1</i> .	45
3.4.5. <i>Gen con actividad chaperonina: TCP1</i> .	46
III. JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.	47
IV. MATERIALES Y MÉTODOS.	53
1. MATERIALES.	55
1.1. Cepas de levadura y de <i>E. coli</i> .	55
1.2. Plásmidos.	56
1.3. Oligonucleótidos.	57
2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.	64
2.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	64
2.1.1. <i>Crecimiento de E. coli.</i>	64
2.1.2. <i>Crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio.</i>	65
2.1.3. <i>Crecimiento de levaduras en condiciones de microvinificación.</i>	66

2.2. Obtención de ADN y ARN.	67
2.2.1. <i>Extracción de plásmidos de E. coli.</i>	67
2.2.2. <i>Extracción de ADN genómico de levaduras.</i>	68
2.2.3. <i>Extracción de ARN total de levaduras.</i>	68
2.2.4. <i>Extracción de plásmidos de levaduras.</i>	70
3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLÉICOS.	70
3.1. Protocolo de separación de esporas.	70
3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	71
3.3. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.	72
3.4. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR.	72
3.5. Construcción de plásmidos de sobreexpresión.	75
3.5.1. <i>Digestión.</i>	75
3.5.2. <i>Ligación.</i>	75
3.6. Transformación de microorganismos.	76
3.6.1. <i>Transformación de E. coli.</i>	76
3.6.1.1. Preparación de células electrocompetentes.	76
3.6.1.2. Transformación por electroporación.	76
3.6.1.3. Preparación de células termocompetentes.	77
3.6.1.4. Transformación por choque térmico.	77
3.6.2. <i>Transformación de S. cerevisiae.</i>	78
3.7. Eliminación de la resistencia a la genética.	78
4. TÉCNICAS ANALÍTICAS.	79
4.1. Medida de la vitalidad celular.	79
4.2. Tiempo de duplicación.	81
4.3. Representación de los ratios de vitalidad y tiempo de duplicación.	82
4.4. Medida de la capacidad fermentativa.	82
4.4.1. <i>Medida de la densidad del mosto.</i>	82

4.4.2. <i>Determinación de los azúcares presentes en el vino.</i>	83
4.4.3. <i>Cálculo de T5, T50 y T100, en la fermentación.</i>	83
4.5. Análisis estadísticos.	83
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	85
V.1. Construcción y caracterización de una cepa vínica haploide derivada de la levadura comercial QA23.	87
1. OBTENCIÓN DE CEPAS HAPLOIDES A PARTIR DE QA23.	93
1.1. <i>Eliminación de una copia del gen HO.</i>	95
1.2. <i>Esporulación.</i>	98
1.3. <i>Comprobación por PCR de la haploidía y determinación del signo sexual.</i>	100
2. ANÁLISIS DE VITALIDAD Y CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LOS HAPLOIDES VS. LA CEPA SALVAJE.	101
2.1 <i>Estudio de vitalidad.</i>	102
2.2 <i>Capacidad de crecimiento.</i>	104
2.3 <i>Capacidad fermentativa.</i>	105
3. ELIMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA GENETICINA.	105
4. DISCUSIÓN.	109
V.2. Estudio transcripcional de los genes seleccionados como esenciales en fermentación a baja temperatura.	113
1. FERMENTACIÓN A 13 Y A 25°C.	116
2. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE RT-PCR.	118

2.1. Genes con actividad transcripcional a lo largo de toda la fermentación (<i>LTE1</i> y <i>TCPI</i>).	119
2.2. Genes con actividad transcripcional durante la fase de latencia e inicio de la fase exponencial (<i>LOT2</i> y <i>NSR1</i>).	120
2.3. Genes con mayor actividad transcripcional durante la fase estacionaria (<i>HSP12</i>, <i>HSP26</i>, <i>TIP1</i> y <i>TIR2</i>).	121
2.4. Genes con mayor actividad transcripcional en la fermentación a baja temperatura (<i>CSF1</i> y <i>HSP104</i>).	124
3. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN <i>PGKI</i> DURANTE LA FERMENTACIÓN.	125
4. DISCUSIÓN.	127
V.3. Análisis de la dosis transcripcional mediante mutación y sobreexpresión de genes relacionados con el estrés a bajas temperaturas (<i>HSP12</i>, <i>HSP26</i>, <i>NSR1</i>, <i>TCP1</i>, <i>TIP1</i> y <i>TIR2</i>).	135
1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES SOBRE LA CEPA VÍNICA.	138
2. ANÁLISIS DE MUTANTES DE LABORATORIO Y DE LA CEPA VÍNICA.	140
2.1. Estudio de vitalidad.	140
2.2. Tiempo de duplicación.	142
2.3. Capacidad fermentativa.	143
3. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS SOBREENPRESANTES.	145
4. ANÁLISIS DE LOS SOBREENPRESANTES.	147
4.1. Expresión génica de las cepas sobreexpresantes.	147
4.2. Estudio de vitalidad.	148

4.3. Tiempo de duplicación.	149
4.4. Capacidad fermentativa.	150
5. DISCUSIÓN.	152
V.4. Análisis de la dosis transcripcional mediante mutación y sobreexpresión de genes relacionados con el estrés a bajas temperaturas (<i>CSF1</i>, <i>HSP104</i>, <i>LOT2</i> y <i>LTE1</i>).	161
1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES SOBRE LA CEPA VÍNICA.	163
2. ANÁLISIS DE MUTANTES DE LABORATORIO Y DE LA CEPA VÍNICA.	164
2.1. Estudio de vitalidad.	165
2.2. Tiempo de duplicación.	166
2.3. Capacidad fermentativa.	167
3. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS SOBREENPRESANTES.	170
4. ANÁLISIS DE LOS SOBREENPRESANTES.	172
4.1. Expresión génica de las cepas sobreexpresantes.	172
4.2. Estudio de vitalidad.	173
4.3. Tiempo de duplicación.	174
4.4. Capacidad fermentativa.	175
5. DISCUSIÓN.	177
VI. DISCUSIÓN GENERAL.	181
VII. CONCLUSIONES GENERALES.	193
VIII. LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.	197
IX. BIBLIOGRAFÍA.	205

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

II.

INTRODUCCIÓN.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

1. LEVADURAS Y FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.

La historia de la producción del vino está ligada a la civilización casi desde sus mismos inicios, los historiadores creen que el vino comenzó a producirse en el Cáucaso y Mesopotamia hacia el 9000 a C., pero fueron los romanos quienes difundieron su producción por todo el Mediterráneo. No fue hasta 1866 cuando Louis Pasteur demostró por primera vez que las levaduras eran las responsables. En 1890, Müller-Thurgau introdujo el concepto de inoculación de las fermentaciones vínicas con cultivos puros, aumentando la calidad y cantidad de la producción de los vinos. (Pretorius, 2000).

1.1. Características generales de las levaduras.

1.1.1. Morfología y organización celular.

Las levaduras son los eucariotas más simples que existen y tienen una gran diversidad respecto su tamaño, forma y color. Las células están formadas por: una envuelta celular y un citoplasma con diversos orgánulos característicos de las células eucariotas como son un núcleo rodeado de membrana, retículo endoplasmático liso y rugoso, aparato de Golgi, mitocondrias y vacuolas, entre otros (Figura I.1). Las envueltas que rodean la célula son, desde el exterior hacia el interior, la pared celular y la membrana plasmática, con el periplasma como espacio de separación entre las dos envueltas celulares. En *S. cerevisiae*, estas capas constituyen el 15 % del volumen total de la célula, cuyo papel principal es proporcionar una barrera con el exterior y controlar la permeabilidad.

La pared celular tiene un espesor entre 100 y 200 nm y constituye entre el 15 y el 25 % de la masa seca de la célula. Está formada por dos constituyentes principales: β -glucanos (50-75 %) y manoproteínas (25-50 %), que forman una red de microfibras. También aparece en la pared una pequeña cantidad de quitina (2-4 %) localizada principalmente en las cicatrices que quedan tras la gemación. La composición y

función de la pared varía a lo largo de la vida de la célula y en respuesta a factores ambientales. Su principal función es la de protección, pero también es el lugar donde ocurre el reconocimiento molecular, que determina su interacción con otras células como en el caso de unión sexual, floculación, el factor killer, etc.

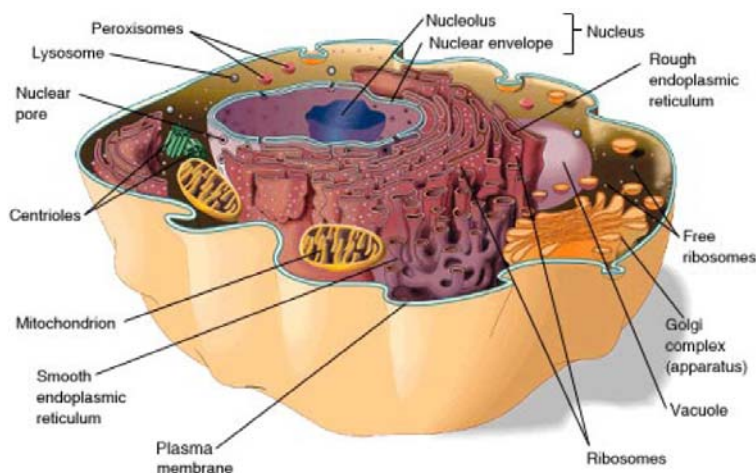


Figura I.1. Representación esquemática de la compartimentación celular de una levadura vínica.

El periplasma está formado principalmente por proteínas secretadas desde el citoplasma, incapaces de atravesar la pared, y ejercen una serie de funciones esenciales como la hidrolización de substratos que no pueden atravesar la membrana plasmática.

La membrana plasmática mide unos 7 nm de grosor, y constituye una barrera estable e hidrofóbica entre el citoplasma y el medio externo de la célula. Como ocurre con otras membranas, la membrana plasmática de las levaduras está formada principalmente por lípidos y proteínas. Esteroles (ergosterol y zimosterol) y fosfolípidos (principalmente fosfatidilcolina y fosfatidiletanolamina, y pequeñas proporciones de fosfatidilinositol, fosfatidilserina y fosfatidiltidilglicerol) son los principales componentes lipídicos. Las proteínas pueden ser de dos tipos: integrales,

que están fuertemente asociadas a la región no polar de la bicapa y periféricas unidas a las integrales. Las proteínas de la membrana tienen diversas funciones como son: de anclaje para el citoesqueleto, de transducción de señales, transporte de solutos (permeasas, canales, ATPasas), facilitadoras del transporte, etc.

Pero la principal función de la membrana celular es proveer a la célula de una permeabilidad selectiva, en definitiva controlar que entra y sale del citosol.

Entre las membranas plasmática y nuclear se sitúa el citoplasma formado por el citosol que es una solución tamponada, con un pH entre 5 y 6, que contiene enzimas solubles, carbohidratos de reserva y ribosomas. Los orgánulos que contiene están aislados del citosol por membranas.

1.1.2. Reproducción y ciclo celular de las levaduras.

Las levaduras se definen como hongos unicelulares que se reproducen predominantemente de forma asexual por gemación (solo el género *Schizosaccharomyces* se reproduce por fisión binaria). Las levaduras forman un complejo y heterogéneo grupo formado por tres clases de hongos, que se clasifican según su modo de reproducción: *Ascomycetes*, *Basidomycetes* y *Deuteromycetes* u hongos imperfectos. Estos últimos se caracterizan porque son incapaces de esporular en condiciones de laboratorio. Las levaduras que se pueden encontrar en las superficies de las uvas y en el vino son *Ascomycetes* y *Deuteromycetes*. Y al igual que ocurre con otros Ascomicetos, *S. cerevisiae* puede multiplicarse de forma asexual por división vegetativa mientras las condiciones del medio son óptimas, pudiendo entrar en un proceso de reproducción sexual o esporulación si éstas condiciones ambientales son adversas (carencia de nutrientes, bajo pH y temperatura, etc.).

En óptimas condiciones, *S. cerevisiae* puede duplicar su población cada 90 minutos. El ciclo de división celular en la multiplicación vegetativa consiste en cuatro fases: G₁ (periodo que precede a la síntesis de ADN), S (periodo donde se sintetiza el ADN), G₂ (periodo anterior a la mitosis), y M (donde ocurre la mitosis y la

citocinesis) (Figura I.2). El ciclo celular de la levadura *S. cerevisiae* se caracteriza por la formación de una gema cuando la célula entra en la fase S. Durante el resto del ciclo celular, esta gema crece hasta que la célula hija se ha formado completamente y se separa de la célula madre al final de la fase M. En contraste con otros eucariotas, la división de *S. cerevisiae* es un proceso asimétrico en el que la nueva célula formada es menor que la célula madre.

Bajo condiciones de limitación de nutrientes, las células diploides entran en meiosis, generando cuatro ascosporas haploides, dos ascosporas de signo sexual MAT α y dos MAT α , envueltas en un asca (Figura I.3). Cuando las ascosporas se liberan del asca y germinan pueden empezar a multiplicarse y generar una línea celular haploide.

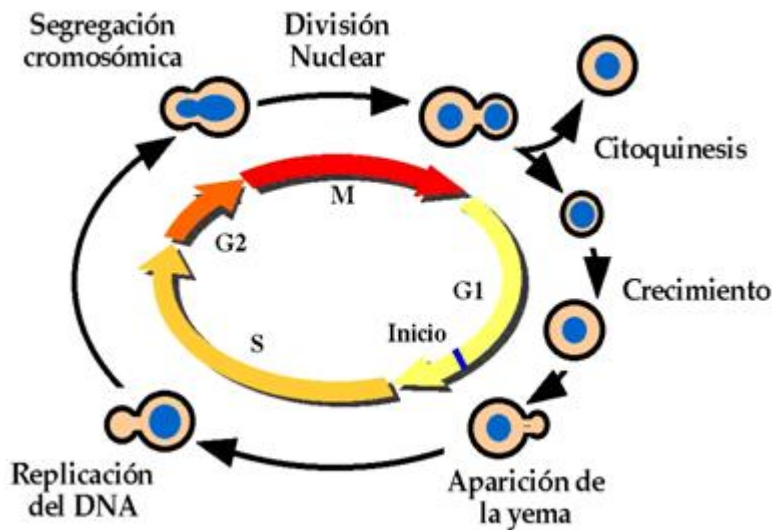


Figura I.2. Esquema del ciclo celular de la gemación de las levaduras.

Las cepas que pueden mantenerse estables como haploides durante algunas generaciones se denominan heterotáticas, y las cepas que pueden realizar un cambio sexual, por conversión génica, fusionar las células de diferente sexo y formar diploides se llaman homotáticas. Las levaduras vínicas no esporulan fácilmente, y cuando lo hacen con frecuencia presentan un porcentaje elevado de esporas no viables (Mortimer *et al.*, 1994; Codón *et al.*, 1995).

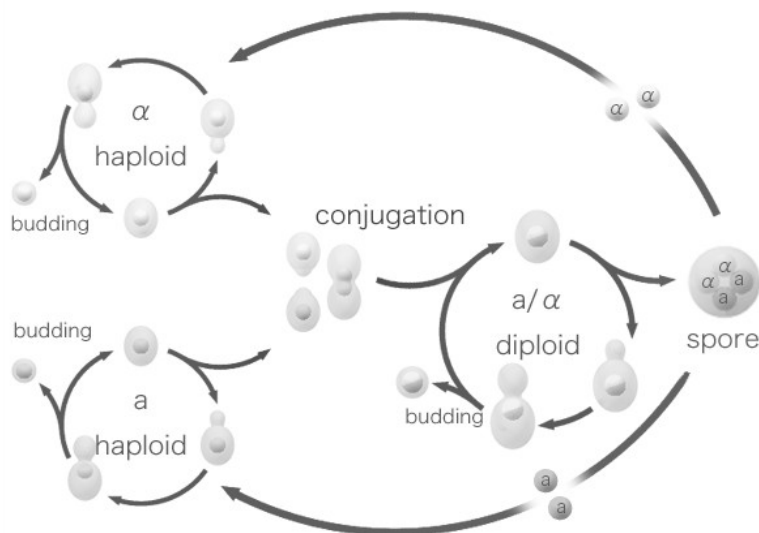


Figura I.3. Representación esquemática del ciclo reproductivo de las levaduras.

1.1.3. Características genéticas de las levaduras: levaduras vínicas vs. levaduras de laboratorio.

El genoma de *S. cerevisiae* es relativamente pequeño y compacto, con poco ADN repetitivo y algunos intrones (Pretorius, 2000). Las cepas haploides contienen aproximadamente entre 12 y 13 Mb de ADN nuclear distribuidos en 16 cromosomas lineales (con una longitud que varía entre 200 y 2200 kb). En 1996, se terminó la

secuenciación del genoma de *S. cerevisiae*, concretamente de la cepa de laboratorio S288C, determinándose que contiene aproximadamente unos 6000 genes (Goffeau *et al.*, 1996). Este fue un gran logro para la genética saber exactamente la localización y los genes que había en las levaduras. Sin embargo, la presencia de determinados genes puede variar según las cepas o la ecología de la cual han sido aisladas las levaduras, tal y como se ha demostrado con la secuenciación de cepas vínicas industriales de levaduras, este es el caso de las levaduras AWR11631 (haploide) y EC1118 (diploide) (Borneman *et al.*, 2008; Novo *et al.*, 2009). Con la secuenciación de estas cepas vínicas, se ha detectado una serie de genes que posee la cepa S288C y no las vínicas, concretamente 111 genes principalmente localizados en regiones subteloméricas. También se han encontrado 34 genes que están presentes en las levaduras vínicas y no en la de laboratorio, estando envueltos su mayoría en funciones claves para la vinificación como el transporte celular, respuesta a estrés o metabolismo de azúcares y nitrógeno (Novo *et al.*, 2009). Además, se han identificado dos regiones en la cepa EC1118 que tienen su origen en una transferencia horizontal de genes a partir de una cepa no perteneciente al género *Saccharomyces* como es *Zygosaccharomyces bailii*, presente en las vinificaciones, hecho no descrito hasta el momento (Novo *et al.*, 2009).

Todas las cepas de *S. cerevisiae* que se usan en los laboratorios descienden de aislados naturales. Pero cuando se comparan las levaduras usadas en bodega para la vinificación con las empleadas en el laboratorio, se encuentran importantes diferencias desde el punto de vista genético. La mayoría de cepas empleadas en el laboratorio son haploides o diploides y presentan longitudes cromosómicas definidas, mientras las cepas vínicas industriales son predominantemente diploides o aneuploides, y ocasionalmente poliploides (Bakalinsky y Show, 1990; Barre *et al.*, 1993). Además, muestran un alto nivel de polimorfismo en la longitud de los cromosomas (Bidenne *et al.*, 1992; Rachidi *et al.*, 2000), que determina una alta variabilidad en algunos rasgos industriales como son la capacidad de fermentación, la producción de metabolitos, tolerancia a estrés, capacidad de esporulación, etc., que están bajo un control multigénico y su origen molecular es todavía desconocido.

Esta diferencia también condiciona la posibilidad de manipulación genética de las levaduras vínicas, ya que para realizar una deleción génica es necesario eliminar al menos dos copias del gen. Por otro lado, la ploidía de las levaduras vínicas podría serles muy útil proporcionando ventaja para adaptarse al ambiente, o aumentando la dosis de algunos genes importantes para la fermentación (Salmon, 1997; Bakalisky y Show, 1990). El mayor grupo de genes encontrado en las levaduras vínicas en alto número o no estaban presentes en las de laboratorio, corresponden a transportadores, permeasas y genes implicados en la detoxificación celular (Dunn *et al.*, 2005). Esto es probablemente el resultado de una respuesta adaptativa a algunos estreses a los que se deben enfrentar durante la vinificación.

Por otro lado, las cepas de laboratorio contienen de forma artificial auxotrofias para algunos aminoácidos o bases nitrogenadas, mientras que las vínicas son protótrofas, no necesitando de ningún requerimiento en forma de aminoácidos o nucleótidos para su crecimiento. Esta es una diferencia importante en cuanto a la posibilidad de manipulación genética, ya que en el caso de las cepas de laboratorio es posible su transformación con plásmidos que restauren la prototrofia para alguno de sus requerimientos. Mientras en las vínicas se debe recurrir a la introducción previa de auxotrofias, o al uso de genes de resistencia a antibióticos, como la cicloheximida o la geneticina (Del Pozo *et al.*, 1991; Hadfield *et al.*, 1990).

Las levaduras de laboratorio y vínicas exhiben diferentes respuestas a cambios ambientales. Las levaduras de laboratorio han sido aisladas y propagadas como cultivos puros durante décadas (70 años para S288C) (Dunn *et al.*, 2005). Especialmente seleccionadas por su habilidad para crecer en condiciones de limitación de carbono, exhibiendo una alta eficiencia en el uso de fuentes de carbono, y una mayor tasa de captación de azúcares (Pizarro *et al.*, 2008). Por otro lado, las levaduras vínicas han sido seleccionadas por sus sucesivas adaptaciones a las condiciones limitantes de la vinificación.

Finalmente, las levaduras vínicas son mayoritariamente homotáticas (HO). Es decir, tras la esporulación, las células derivadas pueden cambiar de sexo, conjugar con otra célula de tipo sexual opuesto y formar una célula diploide y homocigota para todos

los genes, a excepción del locus MAT (“Mating type”) (Thornton y Eschenbruch, 1976). Mientras en las cepas heterotálicas (ho), el locus MAT es estable y las células permanecen como haploides hasta encontrar otra de tipo sexual opuesto con la que conjugar. Además, las cepas vínicas presentan una elevada tasa de heterocigosidad (Barre *et al.*, 1993; Codon *et al.*, 1995) y la capacidad de reorganizar sus cromosomas durante el crecimiento mitótico (Longo y Vézinhel, 1993; Puig *et al.*, 2000a), característica no observada en las cepas de laboratorio haploides. Esta alta capacidad de cambios genómicos hace que las levaduras vínicas no mantengan una uniformidad genética (Pretorius, 2000).

1.2. Fermentación alcohólica.

La fermentación alcohólica es la transformación de los azúcares del mosto (glucosa y fructosa) en etanol y CO₂. Este proceso es exclusivamente llevado a cabo por las levaduras. En los primeros días de fermentación, los géneros mayoritarios son *Hanseniaspora/Kloeckera*, *Candida* y en menor medida *Hansenula*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Metschnikowia* (Fleet y Heard, 1993; Fleet *et al.*, 1998). En los siguientes días de fermentación, las poblaciones de estas especies de menor poder fermentativo disminuyen progresivamente, siendo reemplazadas por la especie de mayor tolerancia al etanol, *S. cerevisiae*, considerada la principal especie del proceso (Torija *et al.*, 2001; Beltran *et al.*, 2002) (Figura I.4).

Tradicionalmente este proceso fermentativo se ha realizado de manera espontánea, es decir, mediante el desarrollo de las levaduras asociadas a las uvas y a la bodega. Sin embargo, la selección de cepas de *Saccharomyces* y su posterior comercialización como levaduras secas activas (LSA), ha permitido a los enólogos la utilización cada vendimia de las mismas cepas de levadura. Esto supuso un avance biotecnológico, que ha permitido un mayor control del proceso y una mejor estandarización en la calidad de los vinos año tras año. En la actualidad resulta difícil encontrar bodegas que sigan fermentando de manera espontánea con las levaduras indígenas de la uva.

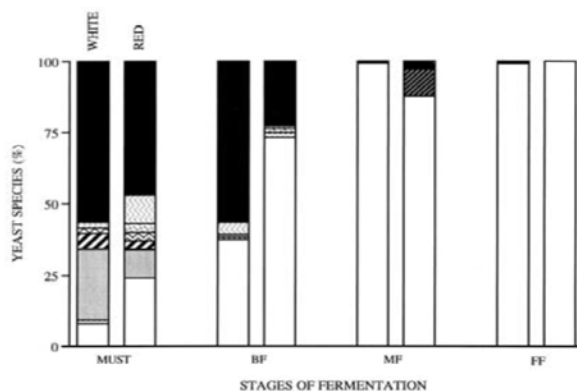


Figura I.4. Ecología de levaduras durante la fermentación espontánea de vino blanco y tinto. BF: Inicio de fermentación, MF: Mitad de fermentación, FF: Final de fermentación. Levaduras encontradas: *Saccharomyces*, *Candida stellata*, *Hanseniaspora uvarum*, *Candida colliculosa*, *Metschnikowia pulcherrima*, *Schizosaccharomyces* spp., *Zygosaccharomyces bailii*, *Kluyveromyces thermotolerans*, no identificadas (adaptado de Torija *et al.*, 2001).

La inoculación de levaduras seleccionadas reduce el número de cepas de *Saccharomyces* indígenas a favor de las iniciadoras. Esta reducción en la diversidad natural se observa también en las fermentaciones espontáneas en bodegas donde previamente se han inoculado levaduras comerciales (Constantí *et al.*, 1998; Beltran *et al.*, 2002). La inoculación de estos cultivos iniciadores disminuye la fase de latencia, minimiza la influencia de las levaduras salvajes por imposición de las cepas inoculadas, y asegura una rápida y completa fermentación del mosto, lo que permite una reproducibilidad en la producción del vino durante diferentes cosechas (Fleet y Heard, 1993). Sin embargo, esta reducción de la diversidad de levaduras también puede suponer una disminución en la complejidad organoléptica de los vinos. Diversos estudios han demostrado que determinadas cepas de no-*Saccharomyces*, como es el caso de *Hanseniaspora uvarum*, contribuyen a un mejor aroma y complejidad del vino, ya que producen elevadas cantidades de glicerol, ésteres y acetoina (Romano y Suzzi, 1996; Romano *et al.*, 1997a).

En la actualidad existe una demanda cada vez mayor de nuevas cepas de levaduras vínicas que no solo sean capaces de catalizar de manera eficiente y completa el paso

de azúcares a etanol, sino que además deben de poseer un abanico de otras propiedades deseables durante la vinificación como se recoge en la Tabla I.1. La importancia de estas características adicionales diferencia el tipo y estilo de vino que se quiere hacer y los requerimientos técnicos de la bodega.

Tabla I.1. Características enológicas importantes en la selección de levaduras vínicas (adaptada de Schuller y Casal, 2005).

CARACTERÍSTICA ENOLÓGICA	COMENTARIO	DESEABLE
Vigor fermentativo	Máxima cantidad de etanol (% v/v) producida a final de fermentación.	Elevada producción de etanol y tolerancia. Fermentación completa de los azúcares.
Velocidad de fermentación	Gramos de CO ₂ producidos durante las primeras 48 horas de fermentación.	Rápido inicio de la fermentación. Minimización de la fase de latencia.
Modo de crecimiento en cultivo líquido.	Crecimiento disperso o floculante. Velocidad de sedimentación.	Dispersión de las células durante crecimiento, pero sedimentación al final de fermentación.
Producción de espuma. Temperatura óptima de fermentación.	Termotolerancia y criotolerancia están relacionadas con propiedades enológicas.	Baja producción de espuma. Rango óptimo de temperatura de 18-28 °C. Capacidad de fermentar a bajas temperaturas.
Acidez volátil.	Debida principalmente a la producción de ácido acético.	No producir más de 100-400 mg L ⁻¹ en fermentación.
Producción o degradación de ácido málico.		Dependiente de las características del mosto.
Producción de glicerol.	Contribuye al dulzor y cuerpo de los vinos.	Producción entre 5-8 g L ⁻¹ .
Producción de acetaldehído.	Importante carácter en la selección de cepas para el envejecimiento de los vinos.	Deseable en vinos dulces, de Jerez u Oporto.
Ésteres, alcoholes superiores y otros compuestos volátiles.	Contribución positiva sobre el aroma del vino.	Metabolitos deseables que influyen sobre el aroma, dependientes de precursores presentes en el mosto.
Tolerancia y producción de SO₂.	Agente antioxidante y antimicrobiano.	Elevada capacidad fermentativa en presencia de SO ₂ . Baja producción.

Tabla I.1. (Continuación).

CARACTERÍSTICA ENOLÓGICA	COMENTARIO	DESEABLE
Producción de H₂S.	Afecta la calidad del vino. Muy bajo valor de detección.	No producción.
Resistencia al cobre.	Altas concentraciones pueden provocar paradas de fermentación.	Alta resistencia al cobre y capacidad de reducir su contenido.
Resistencia a estrés.	Estrés osmótico, ácido, oxidativo, térmico, etc. durante la fermentación.	Resistencia a diferentes tipos de estrés en una misma cepa.

1.2.1. Parámetros que afectan a la fermentación.

El principal objetivo de una fermentación en la bodega es que se produzca un consumo completo de los azúcares del mosto (menos de 2 g L⁻¹ de azúcares residuales en el medio), para evitar problemas posteriores de refermentaciones, crecimiento de microorganismos alterantes, aumento de acidez volátil, etc.

Sin embargo, no siempre se logra este objetivo, y se producen en cambio fermentaciones lentas o incluso paradas de fermentación que pueden ser muy perjudiciales para las bodegas. Los factores más destacables que pueden provocar estas paradas o fermentaciones lentas son principalmente por deficiencias nutricionales en el mosto, presencia de sustancias que inhiben a las levaduras y por determinadas prácticas enológicas. A continuación se resumen algunos de estos factores.

1.2.1.1. Deficiencias nutricionales.

El mosto de partida puede presentar diferentes limitaciones nutricionales que puedan provocar problemas durante la fermentación como es el caso de deficiencias en:

- Nitrógeno: En algunos casos las paradas o fermentaciones lentas parecen ser debidas a unos niveles insuficientes de nitrógeno asimilable por la levadura

(Ingledey y Kunkee, 1985; Salmon, 1989). El contenido en nitrógeno del mosto puede variar entre 60 y 2400 mg N L⁻¹ dependiendo de la variedad de la uva, región, maduración, etc. Se ha establecido que la cantidad mínima requerida para una fermentación normal está en torno a 120-140 mg N L⁻¹, aunque estas concentraciones dependen de las distintas cepas. El uso del nitrógeno está influido por la presencia de oxígeno y de la concentración de glucosa (Jiranek *et al.*, 1995). Una baja concentración inicial de nitrógeno limita el crecimiento y la formación de biomasa por parte de la levadura, dando lugar a un bajo nivel del catabolismo del azúcar en levaduras (Salmon, 1989; Bely *et al.*, 1990; Monteiro y Bisson, 1991).

- Oxígeno: El metabolismo de la levadura durante la fermentación depende del oxígeno disuelto en el medio, que es rápidamente consumido. Su disminución provoca una inhibición en la biosíntesis de ácidos grasos y esteroides, disminuyéndose así la biomasa producida y la glicólisis (Alexandre y Charpentier, 1995).
- Minerales y vitaminas: El ión magnesio es importante tanto para las funciones metabólicas como fisiológicas de las levaduras. Es necesario para llevar a cabo la glicólisis, ya que varios enzimas de la ruta requieren el magnesio para su actividad. Además, ayuda a mantener la integridad celular por la estabilización de los ácidos nucleicos, proteínas, polisacáridos y lípidos (Walker *et al.*, 1994). Algunas paradas de fermentación parecen estar relacionadas con una falta de vitaminas en el mosto (Ough *et al.*, 1989), aunque es poco común. La vitamina más estudiada es la tiamina cuyos rangos de concentración en el mosto están entre 150 y 750 µg L⁻¹. La tiamina se puede degradar en presencia de dióxido de azufre (SO₂), que es empleado habitualmente en bodega.

1.2.1.2. Sustancias inhibidoras.

Las sustancias inhibidoras principales durante la fermentación son el etanol, los ácidos grasos de cadena media y el ácido acético. El etanol inhibe el crecimiento y la

viabilidad celular de las levaduras, ya que provoca diferentes efectos negativos sobre la célula como son la inhibición de permeasas de aminoácidos y del sistema de transporte de glucosa (Mauricio y Salmon, 1992) y altera la permeabilidad y la organización de la membrana (Alexandre *et al.*, 1994a; 1994b). Los ácidos grasos de cadena media actúan como compuestos antimicrobianos, su actividad depende del pH, y actúan sobre la cadena de gradiente de protones (Viegas *et al.*, 1989). El modo de acción del ácido acético es similar al efecto de los ácidos grasos de cadena media. Dependiendo del pH extracelular el ácido acético entra en la célula por difusión donde se disocia. Se han dado dos posibles explicaciones de su mecanismo de inhibición: que modifica el pH citoplasmático (actuando así sobre los enzimas dependientes de pH) o que tiene una acción directa sobre el transporte o las actividades enzimáticas (Pampulha y Loureiro-Dias, 1990).

1.2.1.3. Prácticas enológicas en bodega.

Los sulfitos se usan habitualmente en bodega para prevenir la oxidación del mosto o del vino, y por su efecto antimicrobiano. Los sulfitos se añaden durante varias etapas de la fermentación, pero principalmente en el mosto antes de la fermentación para evitar el crecimiento de especies alterantes. Una alta concentración de SO₂ puede provocar paradas de fermentación, ya que puede entrar en la célula por difusión simple, y una vez en el interior, produce varios efectos que son letales para la célula: bajada del pH citosólico, inactivación de enzimas, una rápida disminución del nivel de ATP intracelular, degradación de cofactores y vitaminas, etc. (Romano y Suzzi, 1993; Bisson *et al.*, 1999; Ribéreau-Gayon *et al.*, 2004).

Otro proceso que se lleva a cabo habitualmente en bodega es la clarificación de los mostos, sobre todo en vinos blancos. Si este proceso de clarificación es muy intenso, provoca un descenso en el contenido de ácidos grasos, esteroides y macromoléculas disponibles en el mosto, frecuentemente relacionadas con las fermentaciones lentas. En las bodegas, otro factor que se controla durante la producción de vino es la temperatura, ya que los vinos blancos o rosados se fermentan entre 15 a 20 °C,

mientras los tintos lo hacen entre 22-28 °C. El principal efecto de los extremos de temperatura, tanto de la baja como de la alta, se produce en la membrana plasmática (Watson, 1987; Suutari *et al.*, 1990). La temperatura afecta a la fluidez de membrana y por tanto a todos los mecanismos de transporte. Las bajas temperaturas reducen la fluidez de membrana, e impiden los cambios conformacionales de los transportadores de membrana. Mientras que las altas temperaturas ejercen el efecto contrario, aumentando la fluidez, lo que puede provocar un aumento de la permeabilidad y una entrada incontrolada al interior celular de moléculas inhibitorias (Bisson, 1999). En ambos casos, la exposición a temperaturas extremas puede provocar una inhibición de la velocidad de fermentación, aumentando el riesgo de una parada. Dada la importancia de este parámetro dentro del contexto de esta tesis, dedicamos un apartado a mencionar la influencia de la temperatura de fermentación en el metabolismo y capacidad fermentativa de las levaduras.

2. EFECTO DE LA TEMPERATURA DE FERMENTACIÓN SOBRE LAS LEVADURAS VÍNICAS.

La temperatura a la que se lleva a cabo la fermentación es importante ya que afecta de forma directa al crecimiento de las levaduras, y por tanto a la duración de la fermentación, a la presencia de diferentes especies de levaduras en el mosto, y al metabolismo de las levaduras, que determina la composición química y organoléptica del vino (Fleet y Heard, 1993). Ante esta situación de estrés, la levadura para sobrevivir a estas condiciones hostiles pone en marcha toda una serie de mecanismos de adaptación.

Las vinificaciones en blanco o rosados se realizan en bodega a una temperatura entre los 15-20 °C. Sin embargo, se ha comprobado que fermentaciones a temperatura más baja (entre 10 y 12 °C) favorecen una mayor producción y retención de los aromas, aumentando la retención de terpenos, reduciéndose los alcoholes superiores y aumentando también la proporción de esterres de etilo y de acetato en el total de

compuestos volátiles (Killian y Ough, 1979, Kunkee, 1984; Lambrechts y Pretorius, 2000; Llauradó *et al.*, 2002; Torija *et al.*, 2003). Sin embargo, esta baja temperatura puede derivar en fermentaciones muy lentas, con problemas de imposición de *S. cerevisiae* frente al resto de levaduras no-*Saccharomyces* y posibles paradas de fermentación. De manera que sería deseable la disponibilidad de cepas que presentasen a la vez una buena capacidad de crecimiento y una elevada tasa fermentativa para estas temperaturas más bajas.

La aplicación de la baja temperatura queda limitada, como se menciona anteriormente, a fermentaciones de vinos blancos y rosados. En la elaboración de vino tinto se necesitan temperaturas más altas (entre 22-28 °C), ya que lo que se busca es un aumento en la extracción de los compuestos fenólicos de las pieles de las uvas que son los responsables del color. Esta extracción aumenta exponencialmente con el aumento de la temperatura.

2.1. Efecto de la temperatura en la ecología y crecimiento de las levaduras.

La temperatura de fermentación afecta directamente a la ecología microbiana del mosto y a las reacciones bioquímicas de las levaduras (Fleet y Heard, 1993). Algunos autores sugieren que algunas especies de no-*Saccharomyces*, como *Kloeckera apiculata* (*H. uvarum*) y *Candida stellata*, crecen mejor a bajas temperaturas que *Saccharomyces* (Sharf y Margalith, 1983; Heard y Fleet, 1985). Debido a que a estas temperaturas más bajas poseen una mayor tolerancia al etanol (Gao y Fleet, 1988). Recientemente, Goddard y cols. (2008) han demostrado que la mejor adaptación de *Saccharomyces* a la temperatura alta, producida durante la fermentación alcohólica, es un factor más importante que la tolerancia al etanol en la imposición de esta especie sobre las otras. Esta mayor competitividad de *Saccharomyces* se va perdiendo conforme reducimos la temperatura de fermentación.

A pesar de esta menor competitividad, la baja temperatura aumenta la viabilidad de las levaduras, disminuyendo a medida que la temperatura aumenta (Figura I.5)

(Torija *et al.*, 2003). A bajas temperaturas las poblaciones máximas permanecen constantes a lo largo de la fermentación alcohólica, y los viables no disminuyen como ocurre a altas temperaturas, especialmente a 35 °C (Lafon-Lafourcade, 1983; Torija *et al.*, 2003). Esto se debe al demostrado efecto sinérgico entre toxicidad de etanol y temperaturas elevadas. Ambos factores actúan fluidificando en exceso la membrana plasmática, que acaba por perder su capacidad de barrera selectiva entre el medio externo y el citoplasma (Alexandre *et al.*, 1994).

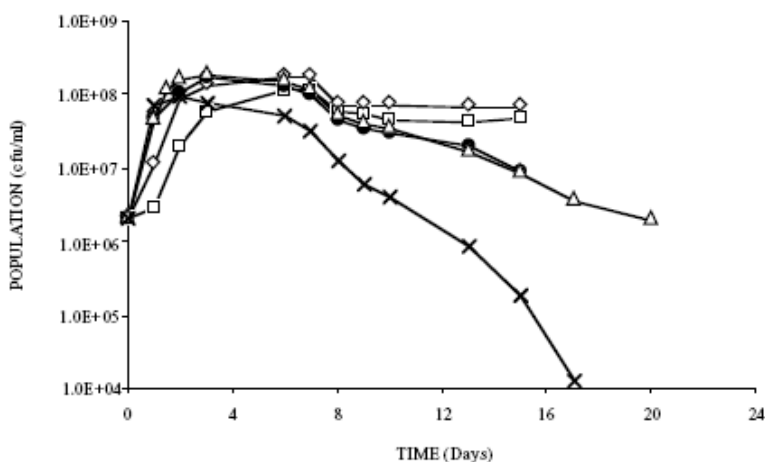


Figura I.5. Variación en el tamaño de las poblaciones durante la fermentación alcohólica según la temperatura: ◇ 15 °C, □ 20 °C, ● 25 °C, Δ 30 °C y X 35°C (adaptada de Torija *et al.*, 2003).

2.2. La importancia del inóculo: levaduras criotolerantes.

El uso de levadura seca activa (LSA) asegura un producto reproducible, reduce la fase de latencia de crecimiento y disminuye la presencia de cepas indígenas de no-*Saccharomyces*. Así, el uso de un buen iniciador de la fermentación es un factor

clave en las fermentaciones a bajas temperaturas donde las cepas de no-*Saccharomyces* pueden permanecer viables durante largos periodos de tiempo (Sharf y Margalith, 1983; Heard y Fleet, 1988).

La selección de levaduras capaces de fermentar a bajas temperaturas, llamadas criotolerantes, tiene un gran interés para la industria vitivinícola (Castellari *et al.*, 1994; Giudici *et al.*, 1998; Massoutier *et al.*, 1998). Entre estas levaduras criotolerantes destacan las cepas de *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* y los híbridos naturales entre esta especie y *S. cerevisiae*, de las que hay algunas cepas comerciales (González *et al.*, 2006). Se han encontrado caracteres muy interesantes en las levaduras criotolerantes como alta producción de glicerol y ácido succínico, baja producción de ácido acético y síntesis de ácido málico (Castellari *et al.*, 1994). Sin embargo, alguna de estas cepas criotolerantes mostraban una menor resistencia al etanol, produciéndose al final del proceso una ralentización de la fermentación, e incluso una parada fermentativa (Torija *et al.*, 2003).

2.3. Efecto de la temperatura sobre la cinética de fermentación.

La temperatura afecta directamente a la velocidad y al tiempo de fermentación. La duración de la fase de latencia y el retraso en el inicio de la fermentación disminuye a medida que aumenta la temperatura. Igualmente, la velocidad máxima de fermentación aumenta conforme aumenta la temperatura de fermentación (Figura I.6). Es evidente que la temperatura presenta un efecto determinante sobre las propiedades catalíticas de los enzimas y sobre las permeasas encargadas del transporte de nutrientes (Tai *et al.*, 2007). La reducción en la tasa de captación de azúcares en una levadura vínica era del 21 % a 15 °C respecto a 30 °C (Pizarro *et al.*, 2008).

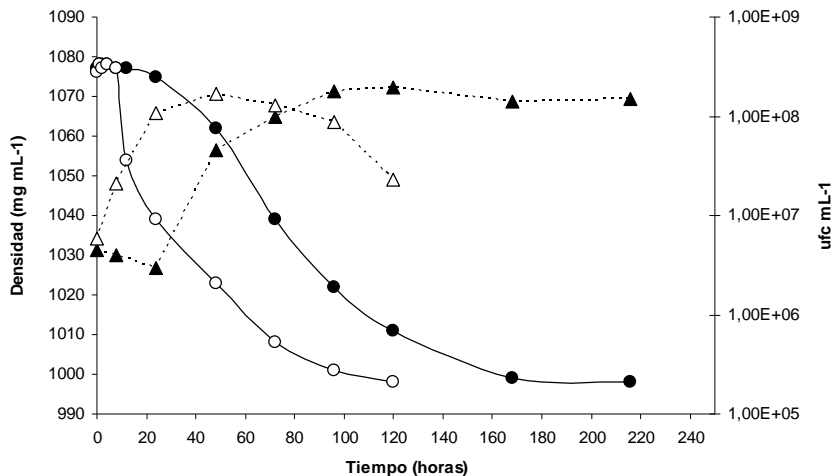


Figura I.6. Cinéticas de fermentación a 13 y a 25 °C medida como reducción de la densidad, a 13 °C (círculos rellenos) y a 25 °C (círculos vacíos), viabilidad celular (crecimiento en placas de YEPD), a 13 °C (triángulos rellenos) y a 25 °C (triángulos vacíos).

Todo ello se traduce en fermentaciones que tardan dos y tres veces más a 13 °C respecto a 25 °C (Beltran *et al.*, 2007). Sin embargo, como se mencionaba anteriormente, temperaturas por encima de los 30 °C pueden poner en peligro la viabilidad del cultivo, con un gran riesgo de parada de fermentación, como consecuencia de la toxicidad incrementada del etanol a esas temperaturas. Con respecto a la baja temperatura, el principal problema es la aclimatación o adaptación de las levaduras. Especialmente cuando el cultivo proviene de levadura seca activa, que ha sido rehidratada a 37 °C y es inoculada en un mosto refrigerado entre 10-15 °C. Esto produce una mortalidad importante del cultivo y un choque térmico que frena el crecimiento de la población en varios días (Beltran *et al.*, 2007; Salvado *et al.*, 2008). El retraso en el inicio de la fermentación alcohólica puede derivar en el crecimiento de bacterias acéticas y lácticas o de especies de no-*Saccharomyces* mejor adaptadas a las bajas temperaturas (Hierro *et al.*, 2006; Goddar *et al.*, 2008;

Andorra *et al.*, 2010). Desde este punto de vista, sería importante mejorar la aclimatación del inóculo a las condiciones de baja temperatura.

2.4. Efecto de la temperatura en el metabolismo de las levaduras.

La temperatura no afecta únicamente a la cinética de fermentación (velocidad y duración) sino también al metabolismo de las levaduras, el cual determina la composición química y calidad sensorial del vino (Fleet y Heard, 1993).

2.4.1. Efecto de la temperatura sobre la síntesis de etanol y otros productos secundarios.

La concentración final de alcohol disminuye a medida que la temperatura aumenta, esto se relaciona con una disminución del rendimiento de la producción de etanol y una reducción en el uso del sustrato (Casey y Ingledew, 1986). La posible causa de esta reducción es probablemente el incremento de productos de otras vías metabólicas como el glicerol, el ácido acético o acetaldehído. Sin embargo, estos productos secundarios por si solos no pueden explicar completamente porque se produce una reducción en el rendimiento de la producción de etanol con el aumento de temperatura (Torija *et al.*, 2003). La diferencia de etanol a diferentes temperaturas también puede relacionarse con la diferente producción de biomasa (Torija *et al.*, 2003). La temperatura alta produce una mayor cantidad de biomasa que puede suponer una disminución en otros productos como el etanol. Pizarro y cols. (2008) han demostrado que esta menor producción de biomasa a baja temperatura es consecuencia de un mayor contenido en proteínas y ARN, una disminución en el contenido en trehalosa y un metabolismo del nitrógeno alterado. En relación con esto último, estos mismos autores equiparan la situación de crecimiento a baja temperatura con la de crecimiento en carencia de fuente nitrogenada. Por último, también se debería tener en cuenta la mayor evaporación de etanol que se produce a temperaturas más altas.

2.4.2. Efecto de la temperatura sobre los compuestos volátiles.

El aroma del vino es una mezcla única de compuestos volátiles originados de las uvas (aromas primarios o varietales), productos secundarios producidos por levaduras y bacterias durante las fermentaciones vínica y maloláctica (aromas secundarios o fermentativos) y compuestos que aparecen durante el proceso de envejecimiento de los vinos (aromas terciarios o post-fermentativos) (Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers y Pretorius, 2005). La naturaleza y tipo de los compuestos volátiles sintetizados depende de múltiples factores, como el contenido en nitrógeno del mosto, la temperatura de fermentación y la cepa de levadura (Lambrechts y Pretorius, 2000; Lilly *et al.*, 2006).

Los compuestos volátiles sintetizados por las levaduras son alcoholes superiores y sus correspondientes ésteres de acetato, ácidos grasos volátiles de cadena media y larga y sus correspondientes ésteres de etilo, aldehídos, derivados de compuestos azufrados (mercaptanos y tioles), etc. (Stashenko *et al.*, 1992; Lambrechts y Pretorius, 2000; Delfini *et al.*, 2001).

Los alcoholes superiores pueden ser sintetizados tanto por intermediarios del metabolismo del azúcar (vía anabólica) donde intervienen como esqueletos carbonados en la síntesis de aminoácidos o por rutas catabólicas o de degradación de aminoácidos, especialmente los de cadena ramificada, conocida como la vía de Ehrlich (Figura I.7) (Boulton *et al.*, 1996; Dickinson *et al.*, 1997; Eden *et al.*, 2001). En general, los vinos blancos son producidos a menor temperatura que los tintos para preservar los caracteres o aromas de frescura y frutal. Se ha demostrado que fermentando a bajas temperaturas se obtienen altas concentraciones de ésteres, responsables de los caracteres frutales en el vino. Esto se debe a un aumento en la estabilidad de los compuestos volátiles, una disminución en la pérdida por evaporación, y un metabolismo diferencial en las levaduras debido a variaciones de la biosíntesis de ácidos grasos que modifican la membrana plasmática de la célula (Killian y Ough, 1979; Boulton *et al.*, 1996; Walter, 1998; Torija *et al.*, 2003).

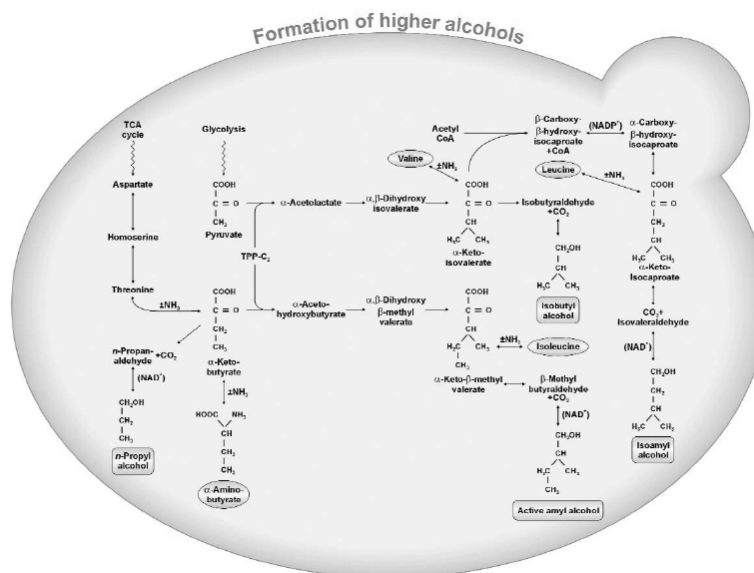


Figura I.7. Vías de síntesis de los alcoholes superiores (adaptada de Swiegers y Pretorius, 2005).

2.5. Efecto de la temperatura sobre la fluidez y composición lipídica de la membrana plasmática.

La membrana plasmática es el principal elemento de contacto entre la célula y su entorno, por lo que juega un papel esencial en la respuesta adaptativa de *S. cerevisiae* (Sajbidor, 1997). Así, pequeñas alteraciones de la membrana pueden causar cambios importantes en las actividades de muchas funciones esenciales que dependen de la membrana. Como es el transporte, la permeabilidad a los iones, etc., que pueden afectar a la viabilidad, capacidad de fermentación y tolerancia al etanol en las levaduras (Rozés *et al.*, 1988; Del Castillo, 1992). De hecho, las propiedades físicas de la membrana están claramente determinadas por la composición lipídica, siendo uno de los principales factores el grado de insaturación (Avery *et al.*, 1996).

Se ha determinado que variaciones en las condiciones ambientales inducen cambios en la composición de ácidos grasos de los fosfolípidos de membrana (Baleiras-Couto y Huis in't Veld, 1995). Estas alteraciones suelen reflejarse tanto en las proporciones relativas de algunos ácidos grasos como en la longitud media de cadena, que son necesarios para mantener una correcta fluidez de membrana. La temperatura de fermentación tiene también un importante efecto en la composición de ácidos grasos de membrana en los diferentes microorganismos. Generalmente, se observa un incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados a bajas temperaturas (Nordström y Laakso, 1992), aunque no en todas las especies de levaduras (Suutari *et al.*, 1990). Lo que si se ha establecido es que la mayoría de organismos regulan la composición de su membrana en respuesta a cambios en la temperatura ambiental para poder mantener una fluidez de membrana óptima y así una función celular normal (Swan y Watson, 1997). En un trabajo reciente de nuestro grupo (Beltran *et al.*, 2008) pudimos comprobar algunos de estos efectos durante fermentaciones industriales. Una baja temperatura de fermentación aumentó el grado de insaturación al principio de la fermentación y disminuyó la longitud de cadena conforme avanzaba el proceso. Las condiciones anaerobias impuestas durante el proceso impiden la insaturación de los ácidos grasos. Como alternativa, la célula sintetiza ácidos grasos de cadena media y corta, que disminuye la longitud de la cadena, aumentando la fluidez de la membrana (Beltran *et al.*, 2008). Una alternativa a la síntesis de estos ácidos grasos es su captación del medio de cultivo. En este mismo trabajo, se comparaba la composición en lípidos de la misma cepa crecida en un mosto sintético y en mosto natural, mucho más rico en lípidos, confirmándose la captación de ácido linoleico (C18:2) y fitoesteroles del mosto natural a las células de levadura. En el mosto, los ácidos grasos insaturados son los más abundantes (ácidos linoleico, oleico, linolénico y palmitoleico), y de los ácidos grasos saturados el más abundante es el ácido palmítico (Castela *et al.*, 1985). También los mostos naturales tienen bajos contenidos de esteroides, entre los cuales el principal fitoesterol es el β -sitosterol (Le Fur *et al.*, 1994). De igual manera, Redon y cols. (2009) han conseguido enriquecer la célula en ácido palmitoleico

mediante incubación de una levadura vínica en un medio de cultivo con exceso de este ácido. Este enriquecimiento mostró un aumento de la viabilidad y una reducción notable del tiempo de fermentación a baja temperatura (Tabla I.2).

Tabla I.2. Determinación de la viabilidad y velocidad fermentativa de las levaduras tras el crecimiento con YEPD suplementado con lípidos. T5, T50 y T100 representan el tiempo (horas) necesitado para fermentar el 5, el 50 y el 100 % de los azúcares de un mosto sintético, respectivamente (Redon *et al.*, 2009).

	Viabilidad (ufc mL⁻¹) ± SD (x10⁷)	T5 (h) ± SD	T50 (h) ± SD	T100 (h) ± SD
Control	4,60 ± 0,05	135,6 ± 3,6	196,0 ± 1,8	424,0 ± 13,9
+C12	4,78 ± 0,11	128,0 ± 3,7	182,8 ± 3,7*	408,0 ± 0,00
+C18:3	4,75 ± 0,11	128,2 ± 1,3	180,0 ± 3,2*	392,0 ± 13,9
+C16:1	5,41 ± 0,34*	116,0 ± 3,0*	162,8 ± 4,9*	320,0 ± 13,9*
+C18	2,33 ± 0,05*	142,4 ± 4,5	202,0 ± 1,8	454,0 ± 13,9*
+Ergosterol	2,14 ± 0,03*	127,6 ± 3,7	177,2 ± 1,8*	368,0 ± 13,9*

La cantidad de esteroides también tienen su importancia en el control de la fluidez (Hosono, 1992). Células con un mayor contenido en esteroides y, quizás lo que es más importante, con mayor ratio esteroides/fosfolípidos presentan una mejor capacidad fermentativa a bajas temperaturas (Redon *et al.*, 2009).

3. RESPUESTAS DE LAS LEVADURAS AL ESTRÉS DURANTE LA FERMENTACIÓN A BAJA TEMPERATURA.

3.1. Respuesta general a estrés.

Los organismos unicelulares están sujetos a una gran variedad de cambios en su medio ambiente como son: las fluctuaciones en la cantidad de nutrientes, acidez, osmolaridad y temperatura, además de la exposición a agentes tóxicos y a radiación. Las células han desarrollado respuestas programadas al estrés, que incluyen cambios rápidos en procesos metabólicos como fosforilación o degradación de proteínas, y a largo plazo afectan a cambios transcripcionales que se manifiestan en estados celulares alterados.

Las bases moleculares de la respuesta a algunos estreses han sido extensamente estudiadas en *S. cerevisiae* (Figura I.8). En respuesta a un variado número de estreses medioambientales como son: el estrés oxidativo, el pH, el choque térmico y osmótico y la falta de nutrientes, se activa la denominada respuesta general a estrés o GSR (“General Stress Response”) (Ruis y Schüller, 1995; Estruch, 2000). Esta respuesta general a estrés se encuentra conservada entre diferentes especies de levaduras tan alejadas filogenéticamente como *S. cerevisiae* y *Schizosaccharomyces pombe*. En *S. cerevisiae*, la inducción de los genes de respuesta a estrés, mediada por esta ruta, depende de la presencia en sus promotores de elementos cis-reguladores STRE (“Stress Responsive Element”, secuencia consenso CCCCT) y su capacidad de interacción con los factores trans-activadores Msn2p y Msn4p. La capacidad de Msn2p/Msn4p para activar la transcripción está ligada a su localización celular. Varios estudios indican que la ruta de la proteína quinasa dependiente de AMP cíclico (PKA) actúa directa e indirectamente sobre la localización subcelular de Msn2p/Msn4p (Garreau *et al.*, 2000). En condiciones de crecimiento exponencial en presencia de glucosa y en ausencia de estrés, se induce la producción de cAMP por la activación de la enzima adenilato ciclasa Cyr1p. El cAMP se une a la subunidad

reguladora Bcy1p de la PKA promoviendo la fosforilación de Msn2p que inhibe su translocación al núcleo (Görner *et al.*, 2002). En condiciones de estrés se reduce la actividad de la ruta cAMP-PKA, posibilitándose la translocación de Msn2p/Msn4p al núcleo y la expresión de genes de respuesta general a estrés. La respuesta general a estrés es un fenómeno transitorio y Msn2p es rápidamente degradado tras la respuesta (Bose *et al.*, 2005).

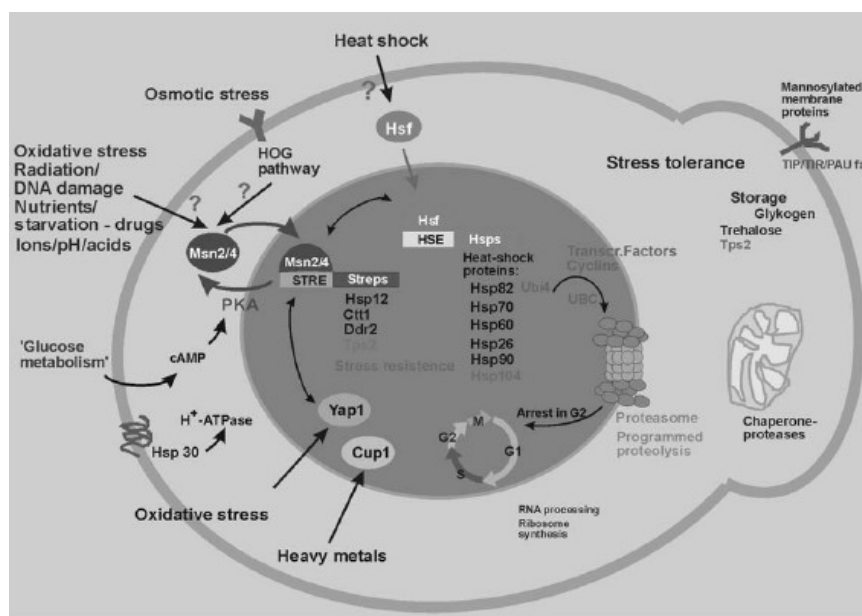


Figura I.8. Esquema de respuesta a estrés en levaduras.

Los perfiles transcripcionales del genoma muestran que en esta respuesta, alrededor de un 10 % del genoma está inducido o reprimido, esto se denomina respuesta a estrés ambiental, ESR (“Environmental Stress Response”) (Gasch *et al.*, 2000) o respuesta común ambiental, CER (“Common Environmental Response”) (Causton *et al.*, 2001). La inducción de genes ESR está envuelta en una gran variedad de funciones celulares como son el plegamiento y degradación de proteínas, transporte, y metabolismo de carbohidratos. Los genes que son reprimidos durante la ESR son

los relacionados con los procesos de crecimiento celular, incluyendo el metabolismo del ARN, biosíntesis de nucleótidos, secreción y funcionamiento de ribosomas. Este activación general es una de las razones por las que la exposición a un tipo de estrés confiere resistencia a otra forma de estrés diferente (Lindquist, 1986).

3.2. Respuesta a estrés térmico

Una de las vías específicas de respuesta a estrés más estudiada es la respuesta a choque térmico por calor o “heat shock response” (HSR) (Chatterjee *et al.*, 2000), mediado por los factores de transcripción de choque por calor (HSF) (Bienz y Pelhan, 1986; Morimoto *et al.*, 1996). Las dos familias de Hsp más conservadas y mejor caracterizadas son Hsp70 que incluye las familias Ssa y Ssb, y Hsp100. Estas proteínas actúan como carabinas moleculares manteniendo solubles otras proteínas parcialmente desnaturalizadas y facilitando su plegamiento correcto (Morano *et al.*, 1999). También pueden promover la proteólisis de proteínas inadecuadamente plegadas o desnaturalizadas y participar directamente en la regulación de la respuesta a estrés térmico, como es el caso de la familia Hsp70 (Estruch, 2000). La transcripción de genes que codifican proteínas Hsp depende de la presencia en sus promotores de elementos *cis* HSE (“Heat Shock Element”, secuencia repetitiva nGAAn) que son sitio de unión del factor activador de la transcripción Hsf1p, de elementos STRE dependientes de la ruta de respuesta general a estrés o de ambos elementos *cis* (Amorós y Estruch, 2001).

Sin embargo, mucho menos se conoce de la respuesta de la levadura frente a la baja temperatura. La mayoría de estudios con baja temperatura como condición de estrés han sido llevados a cabo en bacterias y plantas. Aunque en los últimos años está cambiando esta tendencia. La utilización de las levaduras en procesos industriales en los que la temperatura del proceso está muy por debajo de su temperatura fisiológica óptima (25-30 °C), o incluso a nivel de congelación en masas panaderas, está despertando gran interés en la respuesta molecular de *S. cerevisiae* a la baja temperatura, tanto desde el punto de vista básico como tecnológico.

En procariotas, se ha visto que la principal consecuencia del frío es la estabilización de las estructuras secundarias del ARN mensajero, concretamente la región 5' no traducida, que impide la unión de los ribosomas causando que no se produzca la traducción de las proteínas (Ermolenko y Makhatazde, 2002). En bacterias, se ha identificado un grupo de genes que codifica proteínas que se inducen específicamente por choque por frío, llamados CSPs (“Cold Shock Proteins”), aunque no son las únicas (Thieringer *et al.*, 1998). Estas proteínas están relacionadas con la transcripción, el transporte y el mantenimiento de la estructura de los ácidos nucleicos.

La levadura, tras una disminución brusca de la temperatura reacciona modificando su expresión génica, para poder adaptarse a estas nuevas condiciones (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004). Esta es una respuesta específica que depende tanto del gen como del tiempo de duración del estrés, y que provoca una regulación diferencial de ciertos genes debido a la alteración fisiológica que está sufriendo la levadura causada por la reducción del transporte a través de la membrana, la acumulación de proteínas mal plegadas y la reducción de la actividad enzimática (Zhang *et al.*, 2001; Sahara *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004). La respuesta transcripcional que se observa tras el choque por frío se ha dividido en dos respuestas: una temprana y una tardía. Durante la respuesta temprana al frío o ECR (“Early Cold Response”) se inducen los genes implicados en el metabolismo del ARN (previniendo la desestabilización de las estructuras secundarias del ARN para evitar la disminución de la eficiencia en la traducción de las proteínas) y en el metabolismo lipídico (estabilizando la fluidez de membrana), metabolismo de aminoácidos y genes asociados con el transporte. La respuesta tardía al frío o LCR (“Late Cold Response”), depende directamente de la respuesta general a estrés explicada anteriormente, incluyendo a los genes que codifican las proteínas HSP y los enzimas involucrados en el metabolismo de carbohidratos, principalmente en la glucólisis, y en el metabolismo de glucógeno y trehalosa (Schade *et al.*, 2004).

3.3. Respuestas a estrés durante la fermentación.

La capacidad de la levadura vínica a adaptarse a las condiciones de estrés que se dan en la fermentación es de vital importancia para poder llevarla a cabo. Se ha visto que existe una correlación directa entre la eficiencia de la fermentación y la resistencia al estrés, que es lo que le da a una cepa de levadura la capacidad de adaptarse eficientemente a los cambios ambientales y crecer en condiciones desfavorables (Ivorra *et al.*, 1999). La mayor parte de los problemas que se detectan en las vinificaciones, como las paradas de fermentación y la producción de aromas alterantes por parte de la levadura, están asociados con la incapacidad de las células a responder y adaptarse a condiciones estresantes (Attfield, 1997; Bisson, 1999). Incluso el análisis a la resistencia a estrés ha sido propuesto como criterio para la selección de levaduras vínicas para su uso en bodega (Zuzuarregui y del Olmo, 2004a; 2004b).

Durante la vinificación, las levaduras se ven sometidas a una serie de estreses simultáneos y secuenciales a lo largo de la fermentación. La limitación de nutrientes (Boer *et al.*, 2003), condiciones de anaerobiosis (Kwast *et al.*, 2002; Tai *et al.*, 2005), estrés a etanol (Alexandre *et al.*, 2001), estrés osmótico (Yale y Bohnert, 2001) y a bajas y altas temperaturas (Homma *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004; Pizarro *et al.*, 2008) serían los más destacables.

En las fermentaciones industriales, el primer paso de la vinificación es la rehidratación e inoculación de la levadura seca activa (LSA) en el mosto. Durante la rehidratación, la LSA debe adaptarse a un cambio drástico, el paso desde un medio con limitación en fuentes de carbono y oxidativo, que se usa para la producción industrial de levaduras (Degre, 1992), a un medio como es el mosto, con limitación de oxígeno, rico en azúcares y con una alta presión osmótica. Este cambio debería de estar acompañado de una respuesta a estrés causado por la alta osmolaridad del medio, pero se ha visto que esta no ocurre (Novo *et al.*, 2007; Rossignol *et al.*, 2006). En cambio lo que sí se ha determinado es la puesta en marcha de la maquinaria sintética de la célula (Novo *et al.*, 2007), que encaja con la

disponibilidad de fuentes de nitrógeno y carbono, una inducción de los genes de la vía glucolítica y una represión catabólica por carbono (Rossignol *et al.*, 2006), como resultado de la alta concentración de glucosa.

La fase exponencial de crecimiento se caracteriza por una inducción de los genes relacionados con la biogénesis de la pared y el aumento de las condiciones anaeróbicas del medio (Rossignol *et al.*, 2003). También se produce el agotamiento en el medio de las fuentes de nitrógeno lo que provoca la desrepresión por catabolito de nitrógeno (Beltran *et al.*, 2004).

En la fase estacionaria la respuesta a estrés se dispara, caracterizada por una inducción de ESR, y algunos genes de choque térmico (Rossignol *et al.*, 2003), debido al agotamiento de las fuentes de nitrógeno y al aumento de la concentración de etanol en el medio. Así los genes que se encuentran más expresados en esta fase son *HSP26*, *HSP42*, *HSP30*, *HSP78*, *HSP82*, *SSE2* y *TIP1*, cuyas proteínas están relacionadas con la respuesta estrés, y tienen diferentes funciones metabólicas, como de protección de pared o chaperona (Varela *et al.*, 2005). Esto indica que las levaduras están sujetas a condiciones extremas de estrés durante esta fase. Se ha observado que la acumulación de trehalosa está altamente correlacionada con la concentración de etanol de los cultivos (Varela *et al.*, 2004). También se observa la inducción de genes de la biosíntesis del ergosterol, genes de la prolina oxidasa y de otros genes relacionados con la cadena de transporte de electrones (Rossignol *et al.*, 2003; Varela *et al.*, 2005).

3.4. Inducción de genes por choque térmico de frío (“cold shock”).

Como se ha descrito anteriormente tras el choque por frío se pueden observar dos respuestas (ECR y LCR) en *S. cerevisiae* según la duración de este estrés. En los estudios previos de transcripción global revelan cambios en grupos de genes que se activan según el tiempo de acción del estrés. Se pueden dividir en genes marcadores de estrés por frío, que se activan inmediatamente tras el choque térmico, genes que se activan de 0-2 h tras el estímulo (correspondientes a ECR), y finalmente genes

que se están regulando tras una exposición más prolongada de 4-24 h (LCR) (Sahara *et al.*, 2002; Homma *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006). Entre los genes que se activan inmediatamente tras el choque térmico se encuentran genes que codifican para manoproteínas de la pared celular como los miembros de la familia *TIR* (Kowalski *et al.*, 1995; Cohen *et al.*, 2001; Abramova *et al.*, 2001) y las proteínas inducibles por choque de temperatura (*TIP1*), *TIR1/SRP1*, *TIR2* y *TIR4*, inducibles a 10, 4 e incluso a 0 °C (Sahara *et al.*, 2002; Homma *et al.*, 2003; Kandrór *et al.*, 2004; Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006; Panadero *et al.*, 2006). La familia de proteínas de la seripauperina, *PAU* (*PAU1*, *PAU2*, *PAU4*, *PAU5*, *PAU6* y *PAU7*), que poseen actividad de interacción entre los fosfolípidos (Zhu *et al.*, 2001). Otro gen que es esencial, y cuya transcripción es elevada por las bajas temperaturas, es *LTE1* (“Low Temperature Essential gene”). Este gen es necesario para la terminación de la fase M (mitosis) a bajas temperaturas, que es un complejo sistema de señalización compuesto por al menos 8 genes, *CDC5*, *CDC14*, *CDC15*, *DBF2*, *DBF20*, *LTE1*, *MOB1* y *TEM1* (Menssen *et al.*, 2001; Shou *et al.*, 1999). *CDC5* junto *TEM1* y *CDC15* son los genes que forman parte de la red de salida de mitosis en la levadura (Shirayama *et al.*, 1994).

También existen genes, como es el caso de *CSF1* (“Cold Sensitive Fermentation”), asociado con un sistema de transporte de nutrientes en la membrana plasmática, que no es esencial para crecer en condiciones normales (30 °C), pero sí a bajas temperaturas (Tokai *et al.*, 2000, Hollatz y Stambuk, 2003).

Durante la respuesta inicial al estrés (0-2 h) se activan genes de la síntesis de fosfolípidos, como *INO1* y *OPI3*, y de la desaturación de ácidos grasos (*OLE1*). Otros genes que se inducen durante este periodo son los relacionados con la transcripción, como helicasas del ARN (*DBP2*), subunidades de polimerasa de ARN (*RPA49*), proteínas implicadas en el procesado del ARN (*NSR1*), proteínas ribosomales (*LOT2*), entre otros. También hay una activación de un gran número de genes de proteínas ribosomales. De los 323 genes que se sobreexpresaban tras incubar las levaduras 2 h a 10 °C, 94 codificaban proteínas ribosomales (Sahara *et al.*, 2002).

Cuando el choque por frío dura más tiempo (4-24 h) a 10 °C (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004) y también a 4 °C (Homma *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2006), se observa una represión de los genes ribosomales y de los relacionados con la transcripción. En esta fase, hay una activación de los genes marcadores de estrés general. Los genes de la familia *HSP* se inducen durante esta etapa. *HSP12*, *HSP26*, *HSP42*, *HSP104*, *SSA4*, *SSE2* y *YRO2*, están sobreexpresados tras incubar las levaduras tanto a 10 °C (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004), 4 °C (Homma *et al.*, 2003; Murata *et al.*, 2006), 0 °C (Kandror *et al.*, 2004) y -80 °C (Odani *et al.*, 2003). Sin embargo, otros miembros de la familia *HSP* están reprimidos a 10 °C, como *HSP30*, *HSP60*, *HSP78*, *SSA1*, *SSA2*, etc. De forma que los diferentes miembros de la familia *HSP* están regulados de diferente forma, tanto en tiempo como en temperatura. Los genes relacionados con el metabolismo de reserva de carbohidratos tanto de glucógeno (*GLG1*, *GSY1*, *GLC3*, *GAC1*, *GPH1* y *GDB1*) como de trehalosa (*TPS1*, *TPS2* y *TSL1*), y los genes relacionados con la detoxificación de especies reactivas de oxígeno (ROS) y de defensa a estrés oxidativo, como una catalasa (*CTT1*), glutaredoxina (*TTR1*), tioredoxina (*PRX1*) y glutatión transferasa (*GTT2*), también se expresan durante esta fase.

Otros genes que se han visto activadas en el choque por frío son los que forman las chaperoninas para evitar plegamientos inespecíficos de proteínas, y que la maquinaria celular pueda continuar con su actividad. Este es el caso en *S. cerevisiae* de la chaperonina citoplasmática *CCT* ("Chaperonin Containing the T-complex polypeptide-1"), que está formada por 8 ó 9 diferentes subunidades. Esta chaperonina juega un papel primordial en la biogénesis y plegamiento de la tubulina y la actina, siendo esencial para la gemación (Ursic y Culberton, 1991; Nelson y Craig, 1992; Ursic *et al.*, 1994). Además, se ha determinado que Cctp es una proteína inducida por choque térmico en frío (Somer *et al.*, 2002). Dos de sus subunidades, $CCT\alpha$ (*TCP1*) y $CCT\beta$ (*PCT1*), se ha visto que aumentan su expresión tras 6 h después del choque térmico.

La mayoría de estos resultados se han obtenido a partir de estudios con choques térmicos en cepas de laboratorio, pero el presente trabajo quiere profundizar en

como reacciona la levadura no a choques térmicos puntuales, si no como se ve afectada una levadura comercial durante una fermentación en frío, que puede durar varias semanas. Pero centrándonos en una serie de genes específicos o descritos como de respuesta al crecimiento de la levadura a baja temperatura, y determinar como afecta su dosis génica. Para esta selección nos basamos en los genes descritos previamente en la bibliografía (Kondo *et al.*, 1991; Sahara *et al.*, 2002; Homma *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004; Varela *et al.*, 2005; Murata *et al.*, 2006), y en un estudio previo del grupo, donde se había analizado mediante la técnica de transcripción global por “microarrays” de ADN, la respuesta global de cómo se modifica la expresión del genoma durante una fermentación vínica industrial a bajas temperaturas (Beltran *et al.*, 2006). Los genes seleccionados en base a bibliografía y datos de los “microarrays” se han dividido en las siguientes categorías funcionales:

3.4.1. Genes inducidos por estrés.

3.4.1.1. Genes marcadores de estrés general: *HSP12*, *HSP26* y *HSP104*.

Se seleccionaron tres genes de la familia de las HSPs, como marcadores de estrés general. Estas proteínas juegan un efecto importante en la superación de los efectos negativos que provoca los cambios de temperatura en la célula. Sus patrones de expresión varían al igual que sus funciones moleculares.

El gen *HSP12* codifica para una proteína de pared (12 kDa) implicada en la organización y estructura de la pared de la levadura. La síntesis de Hsp12p se induce como respuesta a diferentes tipos de estrés: osmótico, oxidativo, térmico, por presencia de etanol, limitación de nutrientes o crecimiento en fuentes no fermentables de carbono, y agentes que afectan a la integridad de la pared celular (Stone *et al.*, 1990; Praekelt *et al.*, 1990; Varela *et al.*, 1995; García *et al.*, 2004). Se localiza también en la membrana plasmática, a la que protege durante el proceso de desecación y posterior rehidratación de la célula, y del estrés por etanol (Sales *et al.*, 2000). En la pared celular actúa dándole flexibilidad, textura

y modificando el contenido en polisacáridos de la pared, variando su permeabilidad (Motshwene *et al.*, 2004; Karreman *et al.*, 2007a). Se ha visto que los mutantes *Ahsp12* tienen disminuida la cantidad de β -glucanos, mananos y fosfopeptidomananos de la pared (Karreman *et al.*, 2007b). Para compensar la pérdida de flexibilidad presentan un aumento de la cantidad de quitina presente (Ram *et al.*, 1998). Otro efecto que se ha detectado es el aumento de la concentración de trehalosa intracelular para poder soportar mejor la desecación (Shamrock y Lindsey, 2008).

La mayor actividad de *HSP12* se produce durante la fase estacionaria de crecimiento (Santos-Rosa *et al.*, 2009), y fue el primer marcador seleccionado para analizar la resistencia a estrés de las cepas comerciales vínicas (Carrasco *et al.*, 2001).

HSP26 codifica una pequeña proteína de choque térmico con actividad chaperona, que previene la agregación de las proteínas. Hsp26p solo se encuentra en células que están sometidas a condiciones de estrés por: choque térmico, choque salino, parada del ciclo celular, falta de nitrógeno y carbono, estrés oxidativo, y bajo pH (Carmelo y Sa-Correia, 1997; Amoros y Estruch, 2001). Los *Ahsp26* son viables, pero disminuye su tolerancia al etanol (Yoshikawa *et al.*, 2008).

HSP104 codifica una chaperona de estrés general, que a diferencia de la mayoría de chaperonas que previenen la agregación de las proteínas, Hsp104p, junto a las co-chaperonas Ssa1p y Ydj1p, ayuda a la disgregación de las proteínas agregadas debido al estrés (Parsell *et al.*, 1994). La expresión de *HSP104* es muy baja en condiciones normales pero se induce en condiciones de estrés (Sanchez y Lindquist, 1990). Los mutantes *Ahsp104* en condiciones normales tienen un fenotipo igual al salvaje, pero cuando se someten a un estrés (calor, etanol o radiación), se observa una disminución en el ratio de supervivencia (Sanchez *et al.*, 1992; Boreham y Mitchel, 1994).

3.4.1.2. Genes marcadores de estrés por choque térmico: *TIP1* y *TIR2*.

En levaduras se han identificado varios genes inducidos fundamentalmente por frío. Para este trabajo se seleccionaron 2 de ellos: *TIP1* y *TIR2* (Kondo e Inouye, 1991; Lee *et al.*, 1992, Kondo e Inouye, 1992; Kowalski *et al.*, 1995).

TIP1 (“Temperature Inducible Protein”) y *TIR2* (“Temperature Inducible Response”) son genes pertenecientes a la familia Srp1p/Tip1p. Codifican proteínas constituyentes de la pared celular ricas en serina y alanina, envueltas en el mantenimiento de la integridad de la pared durante condiciones de choque térmico tanto por calor como por frío (Kondo e Inouye, 1991; Kowalski *et al.*, 1995). También se ha visto una inducción en condiciones anaeróbicas de crecimiento (Donzeau *et al.*, 1996; Abramova *et al.*, 2001) y a altas presiones (Abe, 2007). *TIP1* se transcribe al final de la fase M/ principios de la fase G1 del ciclo celular, justo antes de la citoquinesis de la gema (Caro *et al.*, 1998; Spellman *et al.*, 1998).

3.4.2. Genes ribosomales: *LOT2* y *NSRI*.

Tras la exposición a las bajas temperaturas, se forman estructuras secundarias en las moléculas de ARN y se produce la inactivación de los ribosomas, provocando una reducción en la eficiencia de la traducción. Para poder combatir esto, la célula aumenta tanto la expresión de los genes envueltos en la síntesis del ARN ribosomal como los relacionados en su procesamiento. Para testar que ocurre en la fermentación a bajas temperaturas con los genes ribosomales se seleccionaron: *NSRI* implicado en el procesamiento de ARNr, y *LOT2* cuya proteína forma parte del ribosoma 60S.

NSRI (“Nuclear Sequence Recognition”) codifica una proteína similar a una nucleolina de mamífero, que está relacionada con el procesamiento y biogénesis del ARN ribosomal (Kondo e Inouye, 1992). La sobreexpresión de Nsr1p es importante porque minimiza el retraso de la síntesis de ribosomas debido al

descenso de temperatura, y aumenta la capacidad de síntesis de proteínas. Las cepas *Ansr1* presentan un bajo crecimiento a bajas temperaturas, aumentando su fase de latencia después del choque térmico (Kondo *et al.*, 1992), indicando que *NSR1* es requerido para un normal procesamiento del pre-ARNr y el crecimiento celular en levaduras cuando las células se exponen a cambios bruscos de temperatura.

LOT2/RPL2B (“Low Temperature Response”) codifica una proteína que forma parte de la subunidad 60S de los ribosomas, y se ha determinado que se produce una sobreexpresión del gen a bajas temperaturas, pero su función y modo de regulación no se conocen con exactitud (Zhang *et al.*, 2001).

3.4.3. Gen de ciclo celular: *LTE1*.

LTE1 (“Low Temperature Essential”) fue descubierto originalmente como un locus esencial para crecer a 8 °C (Wichner *et al.*, 1987). Se ha determinado que codifica un factor de intercambio de nucleótidos de guanina, (GEF) (Keng *et al.*, 1994). *Lte1p* actúa como un regulador positivo de la GTPasa mitótica *Tem1p* (Molk *et al.*, 2004). *Tem1p* activa una proteína quinasa, *Cdc15p*, que a su vez evita la inhibición de la proteína fosfatasa *Cdc14p* por *Net1p*, provocando la salida de la mitosis (Shou *et al.*, 1999). Así, *LTE1* aumenta su expresión durante la mitosis en la cual actúa como un controlador esencial de la salida de la mitosis (Zhao *et al.*, 2007). La mutación de *LTE1* causa un retraso en la telofase a bajas temperaturas).

3.4.4. Gen de transporte de nutrientes: *CSF1*.

Kyogoku y Ouchi (1995) aislaron mutantes de levaduras de panadería que eran sensibles al frío durante la fermentación (*csf* “Cold Sensitive for Fermentation”). Estos mutantes veían reducida su capacidad fermentativa a temperaturas menores a 15 °C, pero a 25 °C recuperaban su capacidad.

Su función molecular todavía es desconocida, pero el gen *CSF1* se ha asociado a un nuevo sistema de transporte de nutrientes que está en la membrana plasmática y se requiere únicamente a bajas temperaturas (Tokai *et al.*, 2000). También se ha determinado que el mutante *csf1* aumenta la inhibición de la fermentación de glucosa y maltosa bajo estrés salino, lo que nos indica que *CSF1* está envuelto en la regulación de otros procesos fisiológicos, incluyendo homeostasis iónica (Hollatz y Stambuk, 2003).

3.4.5. Genes con actividad chaperonina: *TCPI*.

TCPI ("Tailless Complex Polypeptide I") fue inicialmente identificado en ratón, pero también se han encontrado genes homólogos en humanos, en *Drosophila melanogaster* y en *S. cerevisiae* (Ursic y Culbertson, 1991).

En levaduras se ha determinado que *TCPI* codifica para una subunidad alfa de la chaperonina CCT, cuya función es facilitar el plegamiento de proteínas en el citosol eucariota, principalmente interacciona en el plegamiento de tubulina y la actina (Yaffe *et al.*, 1992; Gao *et al.*, 1992; Ursic *et al.*, 1994). También se ha visto que es una proteína que se induce por choque térmico por frío (Sommer *et al.*, 2002).

En *S. cerevisiae*, *TCPI* es un gen esencial para la viabilidad celular, su delección total provoca inviabilidad. En el mutante letal condicional para este gen, *Atcp1-1*, se observan células con los microtúbulos anormalmente distribuidos y desorganizados, provocando patrones de gemación aberrantes, haciendo que las células sean multinucleadas o haploides (Ursic y Culbertson, 1991).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

III.

JUSTIFICACIÓN, HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

La industria enológica cada vez se basa más en el desarrollo y aplicación de procesos biotecnológicos novedosos, que permiten mejorar la calidad e innovar en nuevos productos, incluso se habla de diseñar vinos a la carta según los gustos o modas de los consumidores. Un proceso biotecnológico muy extendido es la fermentación en frío, sobre todo en el caso de los vinos blancos y rosados (15-20 °C). Con esta bajada de temperatura se consigue una mayor producción y retención de los aromas. El inconveniente principal de este tipo de fermentaciones son las posibles paradas o aumento en el tiempo de fermentación, lo que puede provocar grandes pérdidas económicas, debido a un crecimiento menor de la levadura, ya que no es su temperatura óptima.

Nuestro grupo de Biotecnología Enológica en el Departamento de Bioquímica y Biotecnología (Facultad de Enología, Universidad Rovira i Virgili, Tarragona), lleva tiempo estudiando los mecanismos de adaptación de la levadura vínica *S. cerevisiae* a la baja temperatura de fermentación. En este sentido se han analizado las diferencias de activación génica durante la fermentación a baja temperatura (Beltran *et al.*, 2006), diferencias en el proteoma (Salvadó *et al.*, 2008) y diferencias en metabolismo claves como los carbohidratos de reserva (Novo *et al.* 2003) y el metabolismo de lípidos (Beltran *et al.*, 2008; Redón *et al.*, 2009). Igualmente, desde un punto de vista práctico, se ha visto que la baja temperatura de fermentación, entre 10-12 °C, enriquece al vino desde un punto de vista organoléptico, ya que aumenta la retención de terpenos, reduce los alcoholes superiores y aumenta también la proporción de ésteres de etilo y de acetato en el total de compuestos volátiles (Llauradó *et al.*, 2002; Torija *et al.*, 2003). Otro problema, o quizás el principal, es la aclimatación de la levadura a estas bajas temperaturas. La levadura es rehidratada a partir de levadura seca activa (LSA) a 37 °C, y luego inoculada en un mosto refrigerado, que además de la temperatura se tiene que enfrentar a otros parámetros desfavorables como la alta concentración de azúcares en el medio, una presión osmótica elevada, bajo pH, etc. Todo esto provoca una alta mortalidad celular y una parada en el crecimiento, causada por la reestructuración metabólica a ese nuevo

ambiente, lo que desencadena largas fases de latencia (Novo *et al.*, 2007). Este periodo de no proliferación celular, es el que pueden aprovechar otras especies para crecer en el mosto, como bacterias acéticas, lácticas u otras especies de levaduras como no-*Saccharomyces*, que pueden alterar organolépticamente el vino (Hierro *et al.*, 2006; Andorra *et al.*, 2010). Una respuesta a este descenso de temperatura es la modificación de la membrana plasmática, aumentando la fluidificación de ésta, debido a un aumento de la insaturación de los ácidos grasos (Beltran *et al.*, 2008) o la captación de lípidos del medio, lo que disminuye el tiempo de fermentación (Redon *et al.*, 2009).

Todos estos trabajos de nuestro grupo constituyen los antecedentes al trabajo de esta tesis. Sin embargo, entre todos ellos, fue básico para la formulación de nuestra hipótesis de trabajo, el estudio de transcriptómica global durante las diferentes fases de una fermentación industrial en frío (Beltran *et al.*, 2006). Se encontraron genes pertenecientes a diferentes categorías funcionales, como genes de estrés, chaperonas o genes ribosomales, que parecían tener una estrecha relación con la fermentación a baja temperatura. Así, en el marco de este estudio, y en otros trabajos descritos en bibliografía, seleccionamos una serie de genes de *S. cerevisiae*, que parecían responder ante el frío.

Nuestra hipótesis de partida fue que podríamos ser capaces de mejorar la capacidad de crecimiento y la velocidad de fermentación de nuestra levadura vínica de referencia mediante la modificación transcripcional de algunos de estos genes. En el transcurso de este trabajo para confirmar la hipótesis se han abordado los siguientes objetivos:

- Obtención de un derivado haploide a partir de la levadura vínica comercial (QA23 de Lallemand) para su uso como modelo de levadura industrial a escala de laboratorio.

Para llevar a cabo este objetivo se diseñó un protocolo sencillo de obtención de derivados haploides vínicos, por eliminación del gen *HO*, y posterior esporulación de la cepa industrial QA23. Posteriormente se procedió al análisis de la capacidad de crecimiento, vitalidad y fermentación de las cepas haploides a bajas temperaturas. Entre todas las analizadas, seleccionamos aquella que presentaba unas características de crecimiento y cinética fermentativa similares a la cepa parental.

- Estudio de la regulación transcripcional de las levaduras vínicas como respuesta al estrés por frío durante la fermentación a 13 °C.

Para ello se realizó un análisis de la regulación transcripcional mediante RT-PCR, a lo largo de una fermentación en mosto sintético a 13 y 25 °C, de genes descritos en diversos trabajos bibliográficos como implicados en la respuesta al estrés por “cold shock”. El objetivo era determinar si la temperatura es la condición principal en la regulación de estos genes.

- Efecto de la dosis génica de los genes seleccionados sobre el crecimiento y la actividad fermentativa a bajas temperaturas.

Se construyeron mutantes y sobreexpresantes, mediante plásmidos multicopia, sobre el fondo genético de la cepa vínica haploide, construida en este trabajo. Se determinó la importancia de la dosis génica de los genes en análisis durante una fermentación en el laboratorio, con mosto sintético a 13 °C. El objetivo era comprobar si la eliminación o el aumento del número de copias génicas producía un fenotipo mejorado respecto a la cepa salvaje en cuanto a su capacidad fermentativa a baja temperatura.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

IV.

MATERIALES Y MÉTODOS.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

1. MATERIALES.

1.1. Cepas de levadura y de *E. coli*.

En este trabajo se han usado las siguientes cepas de *S. cerevisiae* que se muestran en la Tabla M.1. En ella se detalla el nombre de la cepa, el genotipo y su procedencia. En el estudio se han usado las cepas QA23 y BY4742 como modelos de levadura industrial y de laboratorio.

Tabla M.1. Listado de cepas de levaduras usadas en los estudios ya sean construidas en este trabajo o cedidas.

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
QA23	Cepa vínica	Lallemand S.A. (Toulouse)
<i>hoQA23</i>	QA23 <i>hoΔ::KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23</i>	QA23 <i>hoΔ::loxP</i>	Este trabajo
<i>hoQA23csf1</i>	QA23 <i>hoΔ csf1Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23hsp12</i>	QA23 <i>hoΔ hsp12Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23hsp26</i>	QA23 <i>hoΔ hsp26Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23hsp104</i>	QA23 <i>hoΔ hsp104Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23lte1</i>	QA23 <i>hoΔ lte1Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23lot2</i>	QA23 <i>hoΔ lot2Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23nsr1</i>	QA23 <i>hoΔ nsr1Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23tcp1</i>	QA23 <i>hoΔ tcp1Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23tip1</i>	QA23 <i>hoΔ tip1Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23tir2</i>	QA23 <i>hoΔ tir2Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23 leu2 kan^R</i>	QA23 <i>hoΔ leu2Δ:: KanMX4</i>	Este trabajo
<i>hoQA23 leu2</i>	QA23 <i>hoΔ leu2Δ::loxP</i>	Este trabajo
<i>hoQA23YEpl181</i>	<i>hoQA23 leu2Δ:: KanMX4</i> pYEplac181	Este trabajo
<i>hoQA23YHSP12</i>	QA23 <i>hoΔ leu2Δ:: KanMX4</i> pYEplac181-HSP12	Este trabajo
<i>holeu2YHSP26</i>	QA23 <i>hoΔ leu2Δ:: KanMX4</i> pYEplac181HSP26	Este trabajo
<i>hoQA23YNSR1</i>	QA23 <i>hoΔ leu2Δ:: KanMX4</i> pYEplac181NSR1	Este trabajo
<i>hoQA23YTCP1</i>	QA23 <i>hoΔ leu2Δ::</i> KanMX4pYEplac181TCP1	Este trabajo
<i>hoQA23YTIP1</i>	QA23 <i>hoΔ leu2Δ:: KanMX4</i> pYEplac181TIP1	Este trabajo

Tabla M.1. (continuación).

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
<i>hoQA23YTIR2</i>	QA23 <i>hoΔ leu2Δ:: KanMX4</i> pYEplac181 <i>TIR2</i>	Este trabajo
<i>hoQA23pGREG</i>	QA23 <i>hoΔ::loxP pGREG505</i>	Este trabajo
<i>hoQA23pCSF1</i>	QA23 <i>hoΔ::loxP pGREG505CSF1</i>	Este trabajo
<i>hoQA23pHSP104</i>	QA23 <i>hoΔ::loxP</i> pGREG505 <i>HSP104</i>	Este trabajo
<i>hoQA23pLOT2</i>	QA23 <i>hoΔ::loxP pGREG505LOT2</i>	Este trabajo
<i>hoQA23pLTE1</i>	QA23 <i>hoΔ::loxP pGREG505LTE1</i>	Este trabajo
BY4742	<i>MAT α; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0;</i> <i>ura3Δ0</i>	EUROSCARF
BY- <i>csf1</i>	BY4742 <i>csf1Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF
BY- <i>hsp12</i>	BY4742 <i>hsp12Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF
BY- <i>hsp26</i>	BY4742 <i>hsp26Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF
BY- <i>hsp104</i>	BY4742 <i>hsp104Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF
BY- <i>lte1</i>	BY4742 <i>lte1Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF
BY- <i>lot2</i>	BY4742 <i>lot2Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF
BY- <i>nsr1</i>	BY4742 <i>nsr1Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF
BY- <i>tcp1</i>	BY4742 <i>tcp1Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF
BY4- <i>tip1</i>	BY4742 <i>tip1Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF
BY- <i>tir2</i>	BY4742 <i>tir2Δ:: KanMX4</i>	EUROSCARF

En todos los experimentos de clonación se usó la cepa de *Escherichia coli* DH5α cuyo fenotipo es *supE44 ΔlacU169 (φ80lacZ ΔDM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1* (Hanahan, 1985).

1.2. Plásmidos.

Los plásmidos usados en este trabajo se detallan a continuación.

Tabla M.2. Listado de plásmidos usados en los estudios ya sean construidos en durante este trabajo o cedidos.

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	PROCEDENCIA
pUG6	Plásmido que contiene el marcador kanMX4 que da resistencia a la geneticina y flanqueado por los sitios loxP	Güldener <i>et al.</i> , 1996

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	PROCEDENCIA
YE _p 351-cre-cyh	Plásmido episomal que contiene el gen de la Cre recombinasa bajo el control del promotor <i>GAL1</i> y el marcador <i>cyh2</i> , que da resistencia a la cicloheximida.	Delneri <i>et al.</i> , 2000
YE _p 181	Plásmido episomal que contiene el gen marcador <i>LEU2</i>	Gietz y Sugino, 1988
YE _p HSP12	Plásmido YEplac181 con un inserto <i>Sall/SphI</i> de 1167 pb que contiene el gen <i>HSP12</i> con su promotor	Este trabajo
YE _p HSP26	Plásmido YEplac181 con un inserto <i>Sall/SphI</i> de 1736 pb que contiene el gen <i>HSP26</i> con su promotor	Este trabajo
YE _p NSR1	Plásmido YEplac181 con un inserto <i>Sall/SphI</i> de 1940 pb que contiene el gen <i>NSR1</i> con su promotor	Este trabajo
YE _p TCP1	Plásmido YEplac181 con un inserto <i>Sall/SphI</i> de 2434 pb que contiene el gen <i>TCP1</i> con su promotor	Este trabajo
YE _p TIP1	Plásmido YEplac181 con un inserto <i>Sall/SphI</i> de 1602 pb que contiene el gen <i>TIP1</i> con su promotor	Este trabajo
YE _p TIR2	Plásmido YEplac181 con un inserto <i>Sall/SphI</i> de 1420 pb que contiene el gen <i>TIR2</i> con su promotor	Este trabajo
pGREG505	Plásmido que contiene los sitios de recombinación <i>rec</i> bajo el control del promotor <i>GAL1</i> , con los marcadores <i>LEU2</i> y <i>KanMX4</i> que da resistencia a la geneticina	Jansen <i>et al.</i> , 2005
pCSF1	Plásmido pGREG505 con un inserto de 10394 pb que contiene el gen <i>CSF1</i> con su promotor	Este trabajo
pHSP104	Plásmido pGREG505 con un inserto de 3957 pb que contiene el gen <i>HSP104</i> con su promotor	Este trabajo
pLOT2	Plásmido pGREG505 con un inserto de 2309 pb que contiene el gen <i>LOT2</i> con su promotor	Este trabajo
pLTE1	Plásmido pGREG505 con un inserto de 5312 pb que contiene el gen <i>LTE1</i> con su promotor	Este trabajo

1.1. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos recogidos en la siguiente tabla, se usaron como cebadores en reacciones de PCR convencional y RT-PCR. Todos fueron adquiridos a la casa comercial Applied Biosystems (PE Biosystems Hispania S.L., Barcelona).

Tabla M.3. Listado de oligonucleótidos usados en el trabajo.

OLIGO-NUCLEÓTI DO	SECUENCIA	USO
HO-S1	AGACATCGCAAACGTCACGGCTAACTCTTA CGTTATGTGCGCAGATGGCTC <u>CGTACGCTGC</u> <u>AGGTCGACA</u>	Casete de delección del gen <i>HO</i>
HO-C2	ACTCTTATGAGCCCCGCGGACAGCATGAA ACTGTAAGATTCCGCCACATT <u>ACTAGTGG</u> <u>TCTGATATC</u>	Casete de delección del gen <i>HO</i>
HOc-F	GAGGTTTGCAGAAGCTTGTGTA	Comprobación de la delección <i>HO</i>
HOc-R	TTGGCGTATTTCTACTCCAGCAT	Comprobación de la delección <i>HO</i>
K2	GGGACAATTCAACGCGTCTG	Comprobación de la integración del casete KanMX4
K3	CCTCGACATCATCTGCCC	Comprobación de la integración del casete KanMX4
MAT	AGTCACATCAAGATCGGTTATGG	Comprobación signo sexual y haploidía
MATF	GCACGGAATATGGGACTACTTCG	Comprobación signo sexual y haploidía
MATa	ACTCCACTTCAAGTAAGAGTTTG	Comprobación signo sexual y haploidía
NSR1mF	CAGACAGGATTTACAGGCAGCTAAGTAA TAACGAATATGCTTGCTTAC <u>CCGTACGCTG</u> <u>CAGGTCGACA</u>	Casete de delección del gen <i>NSRI</i>
NSR1mR	CAAATAGAGATGGTGAATGAAAGGTTTAA GAATGTATCCTATTTACTTAC <u>ACTAGTGG</u> <u>TCTGATATC</u>	Casete de delección del gen <i>NSRI</i>
CSF1mF	TAGATTGGATTCTCACGGTAGTAGTATGTT TGACAATGATATTCTACATG <u>CGTACGCTGC</u> <u>AGGTCGACA</u>	Casete de delección del gen <i>CSFI</i>
CSF1mR	CATTATGAAGATGGAAGTGTATGTTACTTA TAGTGCCGATTAAGAACATA <u>ACTAGTGGAT</u> <u>CTGATATC</u>	Casete de delección del gen <i>CSFI</i>
LTE1mF	ATGGAAATATTTAGCCAGAA GATTACTAC CCGACTCCATCCTCAAATGTC <u>CGTACGCTGC</u> <u>AGGTCGACA</u>	Casete de delección del gen <i>LTEI</i>
LTE1mR	ATAGTTCATTAATCTCTTCTTGTTAATGT GCTAATATAAACACACATTA <u>ACTAGTGGAT</u> <u>CTGATATC</u>	Casete de delección del gen <i>LTEI</i>
LOT2mF	TTGTCATAAACTACCAAGAACCACAAAGT TATTGAACAATGGGTATGTC <u>CGTACGCTGCA</u> <u>GGTCGACA</u>	Casete de delección del gen <i>LOT2</i>

Tabla M.3. (continuación).

OLIGO- NUCLEÓTI DO	SECUENCIA	USO
LOT2mR	AAAGATTAATCTTGGGTCTTTTGAGAACCA CGTAGTAAACCGGTTCTTCTACTAGTGGAT <u>CTGATATC</u>	Casete de delección del gen <i>LOT2</i>
HSP26mF	ACAAATTAACATGTCATTTAACAGTCCATT TTTTGATTTCTTTGACAACACGTACGCTGC <u>AGGTCGACA</u>	Casete de delección del gen <i>HSP26</i>
HSP26mR	TTCTTGAGAGAAACCTCAATCTTCTTGAC GTGGTTCTTACCATCCTTCAACTAGTGGAT <u>CTGATATC</u>	Casete de delección del gen <i>HSP26</i>
TIP1mF	ATGTCCGTTCCAAGATTGCTTTCGTTTTAA GTGCCATTGCCTCTTTGGCCGTACGCTGCA <u>GGTCGACA</u>	Casete de delección del gen <i>TIP1</i>
TIP1mR	TAACAATAAAGCAGCTGCACCTGCAACAA CAGCACCGAAAGAGGCAGCGCACTAGTGG <u>ATCTGATATC</u>	Casete de delección del gen <i>TIP1</i>
TIR2mF	AGAAACATCTTTATAAAATCTTGGCCGGCC AAGATTCCCAAACGAGACTCCGTACGCTGC <u>AGGTCGACA</u>	Casete de delección del gen <i>TIR2</i>
TIR2mR	ACGGTAAATCATTTCCGTTTTCAAACGTA CACTACAGCCTCCAGTTGATACTAGTGGAT <u>CTGATATC</u>	Casete de delección del gen <i>TIR2</i>
HSP104mF	GCGTTATTCAGCATCATTGGAAGTGAAATG GACTGGATCGACGACAAGTTCGTACGCTGC <u>AGGTCGACA</u>	Casete de delección del gen <i>HSP104</i>
HSP104mR	ATTACTTCTTTAAACTTTAGTTATCAACGC CATATGTCCCAAATACAATACTAGTGGATC <u>TGATATC</u>	Casete de delección del gen <i>HSP104</i>
CSF1c-F	TAAAGTGAGAGGTTACGATGCGT	Comprobación de la delección <i>CSF1</i>
CSF1c-R	AATGATTAATATGGGTGGAAATGCT	Comprobación de la delección <i>CSF1</i>
LOT2c-F	ACCGCTACGAGTAATGTTGGATA	Comprobación de la delección <i>LOT2</i>
LOT2c-R	GAATGCACAGAACTCGTAGTATTTCC	Comprobación de la delección <i>LOT2</i>
LTE1c-F	AATATCATTTGGTATGGAGGGACC	Comprobación de la delección <i>LTE1</i>
LTE1c-R	GCAATATCTGCCTCTATACCAATCACT	Comprobación de la delección <i>LTE1</i>
HSP26c-F	CTCGTAACAGTAAGGTATTGCACTTA	Comprobación de la delección <i>HSP26</i>
HSP26c-R	CTTTCCCAGAAGTAGAAGTAGGCAAG	Comprobación de la delección <i>HSP26</i>
HSP104c-F	AATCCAAACTCCAAGGGCACAT	Comprobación de la delección <i>HSP104</i>

Tabla M.3. (continuación).

OLIGO- NUCLEÓTI DO	SECUENCIA	USO
HSP104c-R	GTAGTCATATATATGAGTCATATGAGTCGC	Comprobación de la delección <i>HSP104</i>
HSP12c-F	TGGCATCTGTTAAGGGGATA	Comprobación de la delección <i>HSP12</i>
HSP12c-R	AAACAGGTTGAAAAGACGCGA	Comprobación de la delección <i>HSP12</i>
TIR2c-F	TTGCAGAAGGAGTGCAGAGTT	Comprobación de la delección <i>TIR2</i>
TIR2c-R	TGTCGAAAATGTTTCGTTCCG	Comprobación de la delección <i>TIR2</i>
TIP1c-F	TGATTGTTCCGGGAAATGTG	Comprobación de la delección <i>TIP1</i>
TIP1c-R	AAGGAGAAAGACTCTTCGCTG	Comprobación de la delección <i>TIP1</i>
NSR1c-F	TAGCTGTTGCTGTCTGCACTT	Comprobación de la delección <i>NSR1</i>
NSR1c-R	CACAACGCCAAGCTTTTAT	Comprobación de la delección <i>NSR1</i>
CSF1rec1-F	<u>GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTC</u> <u>GACAGAGCGTGCATTACACCGTACAAT</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
CSF1rec5-F	<u>AACAAAAGCTGGAGCTCGTTTAAACGGCG</u> <u>CGCCGAGCGTGCATTACACCGTACAAT</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
CSF1rec2-R	<u>GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGG</u> <u>TCGACAATTGATACTATGGGTGGAAATGCT</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
LOT2rec1-F	<u>GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTC</u> <u>GACATCGTATCAGTGGAGGCGAGAG</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
LOT2rec5-F	<u>AACAAAAGCTGGAGCTCGTTTAAACGGCG</u> <u>CGCCTCGTATCAGTGGAGGCGAGAG</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
LOT2rec2-R	<u>GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGG</u> <u>TCGACTACAAGAACACGTGCCACGG</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
LTE1rec1-F	<u>GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTC</u> <u>GACATTCGTCCTATACGCCGGATTC</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
LTE1rec5-F	<u>AACAAAAGCTGGAGCTCGTTTAAACGGCG</u> <u>CGCCTTCGTCCTATACGCCGGATTC</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
LTE1rec2-R	<u>GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGG</u> <u>TCGACTCGTCGGACATATCCTCGTTG</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505

Tabla M.3. (continuación).

OLIGO- NUCLEÓTI DO	SECUENCIA	USO
HSP104rec1 -F	<u>GAATTCGATATCAAGCTTATCGATACCGTC</u> <u>GACAGTGGATGTTTCAGGACTAACGT</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
HSP104rec5 -F	<u>AACAAAAGCTGGAGCTCGTTTAAACGGCG</u> <u>CGCCGTGGATGTTTCAGGACTAACGT</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
HSP104rec2 -R	<u>GCGTGACATAACTAATTACATGACTCGAGG</u> <u>TCGACCGCTGTAACATTATATTGGCA</u>	Amplificación casete sobreexpresión en pGREG505
Rec5-F	<u>AACAAAAGCTGGAGCTCGTTTAAACGGCG</u> <u>CGCC</u>	Comprobación inserción en pGREG505
HSP12t-F	<u>CATGTAGTCGACTGGCTCTTGGGACAAGAC</u> TA	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
HSP12t-R	<u>ATTATCGCATGCAAGAAGCAACCGCCATGT</u> TTA	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
HSP26t-F	<u>CATGTAGTCGACGCACCGTTGAACCTGTAG</u> CTTA	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
HSP26t-R	<u>ATTATCGCATGCTCTTCGTCGAGGTTTAAC</u> GCTT	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
TCP1t-F	<u>CATGTAGTCGACTGCTGACGAAGAATCTTC</u> CTCA	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
TCP1t-R	<u>ATTATCGCATGCTTCATGGAATACACTCCG</u> CATT	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
TIR2t-F	<u>CATGTAGTCGACCAATCATATTTTCATGGCC</u> TCC	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
TIR2t-R	<u>ATTATCGCATGCTGTTTCGTTCCGCTTATGAT</u> TA	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
TIP1t-F	<u>CATGTAGTCGACGGCTTGCGATCCACATTG</u> ATA	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
TIP1t-R	<u>ATTATCGCATGCGTTGGCGATGCCCATATT</u> TAG	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
NSR1t-F	<u>CATGTAGTCGACCCTCATACGCAGAGAAGT</u> GT	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181

Tabla M.3. (continuación).

OLIGO-NUCLEÓTI DO	SECUENCIA	USO
NSR1t-R	<u>ATTATCGCATGCTTTGAGTATTTTCCAAGG</u> CCT	Amplificación casete sobreexpresión en YEplac181
TCP1q-F	GGTGCCAGGTTATGCTTTGAA	Determinación de la actividad transcripcional de <i>TCP1</i> por RT-PCR
TCP1q-R	CGGCGATACGTTTAGGCATT	Determinación de la actividad transcripcional de <i>TCP1</i> por RT-PCR
CSF1q-F	TTTAGCGACTACTGAGGCATGGT	Determinación de la actividad transcripcional de <i>CSF1</i> por RT-PCR
CSF1q-R	AATAGCGGTTACTAATTGCTCAGTTG	Determinación de la actividad transcripcional de <i>CSF1</i> por RT-PCR
LOT2q-F	GGTGCTGCCAAGTTGAGAACT	Determinación de la actividad transcripcional de <i>LOT2</i> por RT-PCR
LOT2q-R	TGGACAATTTGCTTAACGATACCA	Determinación de la actividad transcripcional de <i>LOT2</i> por RT-PCR
LTE1q-F	ACCACTGCAGGACATTCAGAA	Determinación de la actividad transcripcional de <i>LTE1</i> por RT-PCR
LTE1q-R	AAGTCGCCTGGTTCAATCAGA	Determinación de la actividad transcripcional de <i>LTE1</i> por RT-PCR
HSP12q-F	GGCAGACCAAGCTAGAGATTACATG	Determinación de la actividad transcripcional de <i>HSP12</i> por RT-PCR
HSP12q-R	AACATATTCGACGGCATCGTT	Determinación de la actividad transcripcional de <i>HSP12</i> por RT-PCR

Tabla M.3. (continuación).

OLIGO-NUCLEÓTI DO	SECUENCIA	USO
HSP26q-F	CTGGTGAAATTCCATCTACCTTGA	Determinación de la actividad transcripcional de <i>HSP26</i> por RT-PCR
HSP26q-R	TTACCAGAGCTGCTCTCCTTGAC	Determinación de la actividad transcripcional de <i>HSP26</i> por RT-PCR
HSP104q-F	TTCTGGATAGCGCCTTAGTCACT	Determinación de la actividad transcripcional de <i>HSP104</i> por RT-PCR
HSP104q-R	TGGCAATCTTCTATATGGCAAGTAA	Determinación de la actividad transcripcional de <i>HSP104</i> por RT-PCR
TIR2q-F	GTCAAGTTCAAGCCACTAGCACTGT	Determinación de la actividad transcripcional de <i>TIR2</i> por RT-PCR
TIR2q-R	CCATGACACCAGCACCCATA	Determinación de la actividad transcripcional de <i>TIR2</i> por RT-PCR
TIP1q-F	ATCCATCTGATGTCTTGAGTGTGTAT	Determinación de la actividad transcripcional de <i>TIP1</i> por RT-PCR
TIP1q-R	AGTGATAGCATCAAAGTCCAATTCAC	Determinación de la actividad transcripcional de <i>TIP1</i> por RT-PCR
NSR1q-F	TTCAATGCTGACAGAGACGCTATT	Determinación de la actividad transcripcional de <i>NSR1</i> por RT-PCR
NSR1q-R	GATACGGACGGAAACAACCTTCAC	Determinación de la actividad transcripcional de <i>NSR1</i> por RT-PCR
PGK1q-F	TTGGCTCCAGTTGCTAAGGA	Determinación de la actividad transcripcional de <i>PGK1</i> por RT-PCR

Tabla M.3. (continuación).

OLIGO- NUCLEÓTI DO	SECUENCIA	USO
PGK1q-R	GGACCGACACAGTCGTTCAAG	Determinación de la actividad transcripcional de <i>PGK1</i> por RT-PCR
ACT-F	TGGATTCCGGTGATGGTGT	Determinación de la actividad transcripcional de <i>ACT</i> por RT-PCR
ACT-R	CGGCCAAATCGATTCTCAA	Determinación de la actividad transcripcional de <i>ACT</i> por RT-PCR

Las secuencias subrayadas se corresponden con la zona homóloga del plásmido (pUG6, Yep181 o pGREG505), en el caso de la amplificación del fragmento de delección o de la construcción del sobreexpresante del gen correspondiente.

2. PREPARACIÓN DE MUESTRAS.

2.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

2.1.1. Crecimiento de *E. coli*.

En todas las construcciones de plásmidos se usó la cepa DH5 α de *E. coli*. Para crecer esta cepa se usaron los medios:

- Medio LB: 10 % de Triptona, 5 % de extracto de levadura y 10 % de NaCl.
- Medio SOB: 20 % de Triptona, 2,5 % de extracto de levadura y 0,5 % de NaCl.
- Medio SOC: Se usa para la recuperación de las células tras la electroporación y es medio SOB al cual se le añaden 10 mL de las siguientes soluciones: MgCl₂ 1 M, MgSO₄ 1 M y glucosa 2 M.

- Medio sólido en placas para seleccionar colonias con y sin inserto en el plásmido (azules sin inserto, blancas con inserto): se prepara medio LB-agar cuando se haya enfriado alrededor de 50 °C, se añade el antibiótico (normalmente ampicilina), adiciona el X-gal (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside) a concentración final 80 $\mu\text{g/mL}$ disuelto en dimethylformamide (DMF), y IPTG (isopropilo-1-thio- β -D-galactopyranoside) a concentración final de 20 mM.

Los medios de cultivo líquido eran igualmente utilizados en forma sólida en placas Petri mediante la adición de un 2 % de agar bacteriológico.

Para la selección de bacterias con resistencia a la ampicilina (Amp^R), los medios de cultivo eran suplementados con ampicilina a una concentración final de 50 mg L^{-1} .

Los cultivos en medio líquido se incubaron a 37 °C con una agitación de 200 rpm, y los sólidos se incubaron en estufa a 37 °C.

2.2.2. Crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio.

Los medios de cultivo usados para el crecimiento de las levaduras se describen a continuación:

- Medio rico (YEPD): extracto de levadura 1 % (p/v), bactopectona 2 % (p/v), glucosa 10 % (p/v).
- Medio rico YPGal: igual que el YEPD pero con galactosa al 2 % (p/v) en vez de glucosa.
- Medio mínimo (SD): medio YNB 0,17 % (p/v) sin amonio ni aminoácidos, sulfato amónico $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0,5 % (p/v) y glucosa al 2 % (p/v).
- Medio de esporulación (KAc): acetato potásico 1 % (p/v), extracto de levadura 0,1 % (p/v) y glucosa 0,05 % (p/v).

Las placas de medio sólido contenían además 2 % (p/v) de agar bacteriológico.

Para la selección de transformantes el medio correspondiente se suplementó con geneticina 200 mg L^{-1} o cicloheximida 2 mg L^{-1} .

Los cultivos se incubaron a $30 \text{ }^\circ\text{C}$ y en el caso de crecimiento en medio líquido se realizó una agitación a 200 rpm.

2.1.3. Crecimiento de levaduras en condiciones de microvinificación.

Para el crecimiento de las levaduras en condiciones de microvinificación se usó mosto sintético (Riou *et al.*, 1997) compuesto por:

Fuente de carbono: 100 g L^{-1} glucosa, 100 g L^{-1} fructosa.

Fuente de Nitrógeno: $0,46 \text{ g L}^{-1}$ de NH_4Cl y $13,09 \text{ ml}$ de una solución de aminoácidos ($1,5 \text{ g L}^{-1}$ de tirosina, $13,4 \text{ g L}^{-1}$ de triptófano, $2,5 \text{ g L}^{-1}$ de isoleucina, $3,4 \text{ g L}^{-1}$ de asparagina, $9,2 \text{ g L}^{-1}$ de ácido glutámico, $28,3 \text{ g L}^{-1}$ de arginina, $3,7 \text{ g L}^{-1}$ de leucina, $5,8 \text{ g L}^{-1}$ de treonina, $1,4 \text{ g L}^{-1}$ de glicina, $38,4 \text{ g L}^{-1}$ de glutamina, $11,2 \text{ g L}^{-1}$ de alanina, $3,4 \text{ g L}^{-1}$ de valina, $2,4 \text{ g L}^{-1}$ de metionina, $2,9 \text{ g L}^{-1}$ de fenilalanina, 6 g L^{-1} de serina, $2,6 \text{ g L}^{-1}$ de histidina, $1,3 \text{ g L}^{-1}$ de lisina, $1,6 \text{ g L}^{-1}$ de cisteína y $46,1 \text{ g L}^{-1}$ de prolina).

Ácidos: 5 g L^{-1} ácido málico, $0,5 \text{ g L}^{-1}$ ácido cítrico, 3 g L^{-1} ácido tartárico.

Minerales: $0,75 \text{ g L}^{-1}$ KH_2PO_4 , $0,5 \text{ g L}^{-1}$ K_2SO_4 , $0,25 \text{ g L}^{-1}$ $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $0,16 \text{ g L}^{-1}$ $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $0,2 \text{ g L}^{-1}$ NaCl .

Vitaminas: 10 mL de una solución madre 100 X (20 mg L^{-1} Myo-Inositol, $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ Pantotenato de Calcio, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ Tiamina, 2 mg L^{-1} Ácido Nicotínico, $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ Piridoxina, 3 mg L^{-1} Biotina).

Oligoelementos: 1 mL de una solución madre 1000X ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 4 mg L^{-1} $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1 mg L^{-1} $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 1 mg L^{-1} KI , $0,4 \text{ mg L}^{-1}$ $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 1 mg L^{-1} H_3BO_3 , 1 mg L^{-1} $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$).

El pH se ajustó a 3,3 y se esterilizó mediante filtración por filtro esterilizante de $0,22 \text{ } \mu\text{m}$ (Millipore, USA).

Las microvinificaciones se llevaron a cabo en botellas de 100 mL, con 60 ml de mosto sintético, con tapones de algodón que permitían el intercambio de gases, y una leve agitación (100 rpm).

El medio se inoculó con una densidad celular de 2×10^6 células mL^{-1} , a partir de precultivos en medio YEPD, YEPD con geneticina o SD según si las cepas llevaban o no plásmido al que había que mantenerle la presión selectiva.

Las fermentaciones se incubaron a 25 o 13 °C, según correspondía, con agitación leve de 100 rpm, hasta que los azúcares presentes eran menores a 2 g L^{-1} , momento en que se consideraba como finalizada la fermentación.

2.2. Obtención de ADN y ARN.

2.2.1. Extracción de plásmidos de E.coli.

Para la extracción de plásmidos se usó el método de la lisis alcalina, se inocularon cultivos de 3 mL en medio LB con ampicilina durante 14-18 horas a 37 °C y 200 rpm. Se centrifugaron 1,5 mL de cultivo a 12000 rpm durante 5 min. Se resuspendió el pellet con 100 μL de Tampón de lisis (0,050 M glucosa, 0,025 M de Tris.HCl pH 8.0 y 0,010 M de EDTA) una vez resuspendido se añade 200 μL de 0,2 M NaOH/1 % SDS y 150 μL de KAc 3 M pH 5,5 y se homogeniza por inversión. Tras centrifugar 15 min. a 12000 rpm a 4 °C se precipita el sobrenadante con 250 μL de isopropanol (-20 °C). Se centrifuga de nuevo 15 min. a 12000 rpm a 4 °C y se elimina el sobrenadante. Se lava el pellet con 500 μL de etanol 70% (-20 °C) y se centrifuga durante 5 min. a 12000 rpm a 4 °C y se deja secar el pellet al aire o con bomba de vacío. Finalmente se resuspende el pellet en 40 μL de TE.

La purificación de los plásmidos se realizó con el kit comercial High Pure Plasmid Isolation kit de Roche (Roche Diagnostics, Alemania) siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

2.2.2. Extracción de ADN genómico de levadura.

La obtención de ADN genómico de levaduras se llevó a cabo a partir de 5 ml de cultivo en medio YEPD siguiendo el método de aislamiento descrito por Querol y cols. (1992). Las levaduras se crecieron en 5 mL YEPD a 28 °C durante 16 horas y se recogieron por centrifugación. Se eliminó el sobrenadante y se lavaron las células con 1 mL de agua estéril. Se pasa la suspensión celular a un eppendorf y se centrifugó de nuevo y el sedimento se resuspendió en 0.5 mL del Tampón 1 (sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M pH 7,5). Se añaden 30 µL de Zimoliasa (Seikagaku Corporation, Japón) se mezcla con vortex y se incuba 30 min. a 37 °C. Se centrifuga 3 min. a 12000 rpm, se elimina el sobrenadante y los protoplastos se resuspenden en 0,5 mL del Tampón 2 (Tris 50 mM pH 7,4, EDTA 20mM). Se añade 13 µL de SDS 10 % y se incuba 5 min. a 65 °C, tras ese tiempo se añaden 0,2 mL de acetato potásico 5 M, mezclar por inversión del tubo e incubar 10 min. en hielo. Se centrifuga a 4 °C durante 15 min. a 14000 rpm para eliminar el SDS completamente y se pasa el sobrenadante a otro eppendorf. Al sobrenadante se le añade un volumen de isopropanol. Incubar a temperatura ambiente 10 minutos, se centrifuga de nuevo en frío y se elimina el sobrenadante. El precipitado se lava con etanol al 70 %, se centrifuga y se elimina el sobrenadante. Finalmente se seca al vacío y se resuspende en 50 µL de TE (Tris 10 mM, EDTA 1mM pH 8,0).

2.2.3 Extracción de ARN total de levadura.

Para la extracción de ARN se centrifugaron las células en frío, se lavaron con agua estéril, se eliminó el sobrenadante y los pellets se congelaron en nitrógeno líquido, posteriormente se guardaban las muestras a -80 °C o se procedía a continuación con la extracción del ARN total.

El protocolo seguido fue el descrito por Sierkstra y cols. (1992). Las células se descongelaron en hielo y se lavaron con 1 ml del tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM de LiCl y 0,1 mM EDTA). Tras centrifugar, se añadió

0,5 mL del Tampón de Vortex (100 mM LiCl, 10 mM de EDTA y 0,5 % de SDS, pH 7,4) y 1 g de perlas de vidrio (diámetro de 425-600 μm). Las células se rompieron alternando períodos de 30 s de agitación vigorosa en un agitador y 30 s en hielo. Tras la rotura, se añadió fenol/cloroformo/alcohol isoamílico (25:24:1 v/v/v), se centrifugó 5 min. a 10.000 rpm en frío, y se extrajo la fase acuosa. Este paso se repitió 2 ó 3 veces hasta que se observó limpia la interfase. Por último, la fase acuosa se mezcló con cloroformo/alcohol isoamílico (24:1 v/v), se centrifugó 5 min. a 10.000 rpm en frío, y se extrajo la fase acuosa. Para precipitar el ARN presente en la fase acuosa se añadió una solución de acetato de sodio 3 M (1/10 v/v) y 2,5 v de etanol absoluto. Se precipitó durante 15 min. a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Tras centrifugar 30 min. a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, el pellet se lavó con etanol 70 % y se resuspendió con agua destilada estéril.

Se realizó una purificación y eliminación de los restos de ADN genómico presente en la muestra con el High Pure ARN Isolation kit de Roche (Roche Diagnostics, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.

La concentración y pureza del ARN obtenido se determinó mediante el fluorímetro Qubit de Invitrogen (Invitrogen, USA) y el kit Quant-iTTM ARN Assay Kit 5-100 ng (Invitrogen, USA), además de por geles de 0,8 % de agarosa. Todas las soluciones usadas, a excepción del Tris-HCl, fueron tratadas con DEPC (Dietil pirocarbonato) para eliminar las posibles ARNasas contaminantes que existiesen, se añadió 50 μL de DEPC por cada 50 mL de solución, dejando actuar toda la noche, y posteriormente se autoclavó (20 min. a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$) para eliminar el DEPC.

El material de plástico y vidrio usado para la extracción de ARN fue tratado con la solución RNaseZap (Ambion, Canadá), que inactiva las ARNasas y posteriormente fue autoclavado.

2.2.4. Extracción de plásmidos de levaduras.

Para la extracción de los plásmidos de las levaduras se usó una modificación del protocolo descrito por Robzyk y Kassir (1992).

Se crecen las levaduras con el plásmido, en 5 mL del medio correspondiente, durante 16 h, posteriormente transferir 1,5 mL a un eppendorf y centrifugar durante 5 min. A 6000 rpm. Resuspender en 100 µL de tampón STET (8 % de sacarosa, 5 % de Triton X-100, 50 mM Tris-HCl, 50 mM de EDTA, pH 8). Añadir 0,2 g de bolitas de vidrio de 0,45 mm de diámetro y mezclar en el agitador mecánico “Mini-Beadbeater” (BioSpec Products, USA) durante 5 ciclos de 30 seg. De agitación y 30 seg. En hielo. Añadir después otros 100 µL de STET agitar y hervirlo en un baño durante 3 min., enfriar en hielo y centrifugar 10 min. A 12000 rpm a 4 °C.

Transferir el sobrenadante a otro eppendorf y añadir 50 µL de acetato amónico 7,5 M, incubar 1 h a -20 °C y centrifugar de nuevo. Añadir 100 µL de sobrenadante a 200 µL de etanol absoluto y precipitar 1h a -20 °C, centrifugar de nuevo, lavar el pellet con etanol 70 %. Secar el pellet en una bomba de vacío y resuspender en 20 µL de agua.

Usar 1-2 µL esta solución para transformar *E. coli*.

3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.

3.1. Protocolo de separación de esporas.

Se siembran las células (pueden provenir de cultivo líquido o de medio sólido) en placas con el medio de esporulación KAc, y se incuban a 30 °C hasta que se comprueba mediante observación al microscopio que han esporulado.

Para separar las esporas se usa el protocolo descrito por Dawes y Hardie (1974). Para ello con un asa de siembra se rasca la superficie crecida en la placa y las células recogidas se resuspenden en un eppendorf que contiene 1 mL de éter/H₂O (v/v) Se agita vigorosamente con un vortex durante 1 min. y se incuba 15 min. a temperatura ambiente. Se centrifuga 15 seg. a máxima velocidad y se elimina el sobrenadante con ayuda de una micropipeta. Finalmente, se resuspenden las células en agua y se siembran en el medio selectivo correspondiente (en nuestro caso era YEPD con geneticina). Se incuban a 30 °C en una estufa.

3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

La amplificación por PCR se utilizó para la síntesis de los fragmentos de delección y sobreexpresión de los genes, y para la comprobación de las delecciones.

Estas reacciones se llevaron a cabo en 25 µL o 50 µL de volumen final. La mezcla de reacción contenía 0,1-100 ng µL⁻¹ de ADN, 200 µM de dNTPs, 10 µM de oligonucleótidos, Tampón 1X y unidades 0.03 U µL⁻¹ de Taq polimerasa. Se usaron 3 Taq polimerasas, según se necesitaba una mayor especificidad en la PCR. En el caso de la construcción del fragmento de delección se usó la EcoTaq de Ecogen (Ecogen, España), y en el de la construcción de los fragmentos de sobreexpresión se usó la polimerasa, Expand Long High Fidelity de Roche (Roche Diagnostics, Alemania) que posee una menor tasa de errores durante la copia. Para amplificar los genes *CSFI* (10394 pb), *HSP104* (3957 pb), *LOT2* (2309 pb) y *LTE1* (5312 pb), al tener un mayor tamaño, se usó polimerasa PfuUltraTM II Fusion Hs ADN Polimerasa de Stratagene (Stratagene, USA). Las condiciones de PCR usadas fueron las que recomendaba el fabricante, variando la temperatura de hibridación según el par de oligonucleótidos usado.

3.3. Electroforesis de ADN y ARN en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de ADN y ARN se realizó en geles de agarosa con una concentración entre 0,8 y 1 % (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos. En la electroforesis y preparación de los geles se usó tampón TBE (1X) compuesto por (Trizma base 89 mM, ácido Bórico 89 mM, EDTA 2 mM, pH 8). Al gel se le añadió 1 μL de Bromuro de etidio por cada 25 mL de solución TBE (la concentración final de 0,4 $\mu\text{g mL}^{-1}$). Las muestras se mezclaron en tampón de carga (solución 10 x: azul de bromofenol 0.25 % (p/v), xilene cianol 0,025 % (p/v) y glicerol 30 %) y se cargaron en el gel- El voltaje usado fue entre 70-80 V durante 1-2 horas. La visualización del gel se realizaba mediante un transiluminador de luz UV, y la longitud de las bandas se determinaba por comparación con un marcador de ADN de peso molecular, que variaba según el tamaño esperado de las bandas.

3.4. Análisis de la expresión génica mediante RT-PCR.

El ARN total fue pasado a ADNc con la SuperscriptTM II Rnase H- Reverse Transcriptase (Invitrogen, USA) en GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystem, USA). La retrotranscripción se llevó a cabo en un volumen de reacción de 20 μL en el cual se añadían 0,8 μg de ARN total, 1 μL de Oligo (dT) 12-18 Primer (Invitrogen, USA). Siguiendo las instrucciones del fabricante, después de una desnaturalización a 70 °C durante 10 min., se añade 1 μL de la transcriptasa y se incubaba a 42 °C 50 min. Finalmente se inactivó la reacción a 70 °C 15 min.

Para realizar el análisis con la PCR cuantitativa primero se diseñaron los oligonucleótidos (ver Tabla M.3), para ello se buscaron las secuencias de los genes a analizar en la base de datos de GeneBank. Una vez obtenidas las secuencias, los oligonucleótidos fueron diseñados mediante el uso del programa Primer Express software (Applied Biosystems, USA). Todos los amplicones tenían una longitud entre 50 y 100 pb para asegurar la máxima eficiencia de reacción de PCR.

Para cada uno de los genes se realizó una curva estándar con ADN genómico de la levaduras. La extracción de ADN se realizó según el protocolo de Querol y cols. (1992). La concentración se cuantificó con el espectrofotómetro GeneQuant (Pharmacia, Canadá). Se realizaron diluciones seriadas 10^{-1} del ADN genómico en un rango de 400 hasta $4 \times 10^{-2} \text{ ng } \mu\text{L}^{-1}$ (que representa en la reacción de PCRq entre 2000 y $2 \times 10^{-1} \text{ ng}$ totales de ADN). Para cada concentración de ADN se obtiene una Ct correspondiente a partir de las cuales se puede construir una recta patrón diferente para cada pareja de cebadores utilizados (Figura M.1).

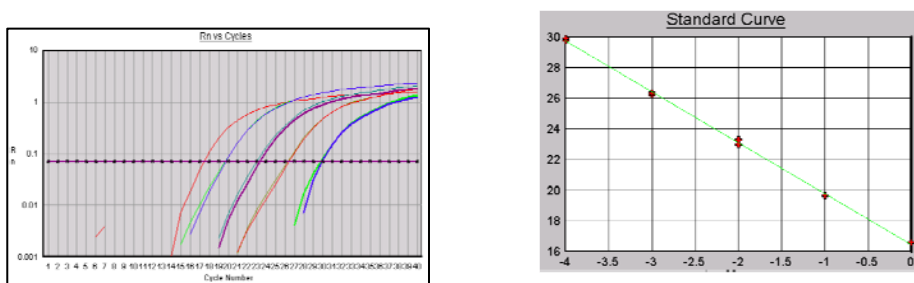


Figura M.1. Recta que se obtiene tras el análisis de la PCRq para el gen de la actina (ACT).

Las rectas estándar obtenidas para cada gen fueron las siguientes:

<i>ACT</i> :	$CT = -3,154785 \cdot \log Co + 24,377731$
<i>CSF1</i> :	$CT = -3,020421 \cdot \log Co + 26,493746$
<i>TIP1</i> :	$CT = -3,471842 \cdot \log Co + 28,124048$
<i>HSP12</i> :	$CT = -3,156875 \cdot \log Co + 26,693600$
<i>HSP26</i> :	$CT = -3,109647 \cdot \log Co + 26,278437$
<i>HSP104</i> :	$CT = -3,189703 \cdot \log Co + 27,342163$
<i>NSR1</i> :	$CT = -3,183183 \cdot \log Co + 26,927105$
<i>LTE1</i> :	$CT = -3,164605 \cdot \log Co + 25,600857$
<i>LOT2</i> :	$CT = -3,108070 \cdot \log Co + 23,646282$

$$TIR2: \quad CT = -3,014801 * \log Co + 27,687578$$

$$TCPI: \quad CT = -3,109802 * \log Co + 26,092686$$

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en placas ópticas de 96 pocillos (Applied Biosystems, USA), estos pocillos se dividen de forma que en cada reacción de PCR incluya la recta estándar para el gen de referencia (gen de la actina) y uno de los genes a analizar, los controles NAC (“No Amplification Control”) y NTC (“No Template Control”), y la muestra. En todos los casos se hace un triplicado de cada punto.

El volumen de reacción es de 25 μ l y contiene: 5 μ l de la muestra de ADNc diluido 1:5 después de la RT (procedente de 40 ng de ARN total), ADN genómico para las rectas estándar, o agua para el NTC, 0,3 μ M de cada oligonucleótido, 12,5 μ l SYBR Green Mix 2x (Applied Biosystems, USA), y se complementa con agua estéril.

Las reacciones de PCR se realizaron en PE Applied Biosystems 5700 (Applied Biosystems, USA), con el siguiente perfil térmico: 2 min. a 50 $^{\circ}$ C, 10 min. a 95 $^{\circ}$ C para activar la Taq polimerasa Gold, y 40 ciclos de 15 seg. a 95 $^{\circ}$ C y 2 min. a 60 $^{\circ}$ C.

El termociclador GeneAmp 5700 nos da la medida de la fluorescencia emitida por el SYBR Green ciclo a ciclo en cada reacción de PCR. Una vez finalizada la reacción a las muestras les asigna una Ct o ciclo umbral que representa el ciclo de PCR en el que el aumento de la fluorescencia sobre la línea base puede ser detectado por primera vez. El ciclo umbral debe estar localizado en la zona exponencial de la curva de amplificación de las muestras.

Para determinar la expresión relativa de los genes a estudio, se interpola en las rectas de calibración las Ct obtenidas en la PCR, tanto para la concentración de ADNc del gen de interés como del gen de referencia, y este valor nos indica los niveles de expresión relativa del gen de interés.

$$\text{Expresión génica} = \text{gen de interés/gen de referencia}$$

3.5. Construcción de plásmidos de sobreexpresión.

3.5.1. Digestión.

Las enzimas de restricción usadas en este trabajo fueron usadas siguiendo las instrucciones de las casas comerciales.

Las reacciones contenían 0,5-5 µg de ADN, 0,1 volúmenes del tampón de restricción correspondiente y 0,5-5 unidades de la enzima, en un volumen final de 10-50 µL completado con agua Milli-Q.

Las digestiones se llevaron a cabo incubando las reacciones durante 1-12 horas a la temperatura indicada por el fabricante.

3.5.2. Ligación.

Para establecer la cantidad de inserto a utilizar en la reacción de ligación, se utilizó la siguiente ecuación:

$$\frac{(\text{ng de vector} \times \text{Tamaño del inserto en pb})}{\text{Tamaño de vector en pb}} \times \text{I/V} = \text{ng de inserto}$$

Donde I/V es la relación Inserto/Vector. Se utilizó la relación 3:1 en el proceso de ligación, como recomendaba el fabricante de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche Applied Science, Alemania).

Se añadieron 0,1 volúmenes del tampón de ligación y 0,5 µL del enzima (1U µL⁻¹). Finalmente, la reacción se incubó 12 h a 4 °C, transcurrido este tiempo el producto de la ligación se transformó en la cepa DH5α de *E. coli*.

3.6. Transformación de microorganismos.

3.6.1 Transformación de *E. coli*.

3.6.1.1. Preparación de células electro-competentes.

Mediante este procedimiento se preparan las células de *E. coli* para alcanzar un estado de “competencia” que permita introducir varias copias de un vector plasmídico y de una alta eficiencia de transformación (Dower *et al.*, 1988).

Se inoculan 200 mL de medio LB, en un matraz de 1 L, con 1 mL de un cultivo crecido a 37 °C, 200 rpm durante 16 h. Se incuban a 37 °C y 200 rpm hasta que llegue a una DO_{600nm} de 0,5. Una vez crecidos se enfrían los cultivos en hielo durante 15 min. Se transfieren a tubos de 50 mL y por centrifugación, 10 min. a 5000 g y 4 °C se recogen las células y se lavan dos veces con 50 mL de agua MilliQ fría y una con glicerol 10 % frío, centrifugando en cada caso 10 min. a 5000 g y 4 °C.

Estimar el volumen de pellet y resuspender en el mismo volumen de glicerol 10 % frío, y hacer alícuotas de 45 µL de células. Congelar en nitrógeno líquido y guardar a -80 °C.

3.6.1.2. Transformación por electroporación.

Para llevar a acabo la transformación de *E. coli* por electroporación se siguió el método de Dower y cols. (1988). Se mezclan 2-3 µL de la ligación con 45 µL de células electrocompetentes descongeladas en hielo. Se transfiere esta mezcla a la cubeta de electroporación previamente enfriada en hielo, teniendo especial cuidado en que la mezcla esté en contacto con las dos láminas de metal, evitando la formación de burbujas. Las condiciones de electroporación fueron de un pulso de 1700 V en el Electroporador 2510 (Eppendorf AG, Alemania), la duración del

paso ideal es de alrededor de 4 milisegundos para obtener una buena eficiencia de transformación.

Añadir a la cubeta 500 μL de medio SOC, mezclar bien para recoger las células y transferirlas a un eppendorf, recuperar las células 45 min. a 37 °C. Transcurrido este tiempo plaquean en el medio selectivo adecuado.

3.6.1.3. Preparación de células termocompetentes.

La preparación de las células termocompetentes se llevó a cabo mediante una modificación del protocolo Hanahan (1983).

Se inoculan 100 mL de medio Psi (0,5 % de extracto de levadura, 2 % de triptona, 0,5 % de sulfato de magnesio, pH 7,6) con 1 mL de cultivo de 16 h. Se incuba a 37 °C y a 200 rpm hasta una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,48.

Incubar en hielo durante 15 min. y centrifugar 5000 g durante 5 min. a 4 °C, descartar el sobrenadante y resuspender con 0,4 volúmenes del tampón Tfb I (30 mM de acetato de potasio, 100 mM de cloruro de rubidio, 10 mM de cloruro de calcio, 50 mM de cloruro de manganeso, 15 % v/v de glicerol, pH 5,8 ajustado con ácido acético), e incubar en hielo durante 15 min. Centrifugar, descartar el sobrenadante y resuspender las células en 0,04 volúmenes de Tfb II (10 mM de MOPS, 75 mM de cloruro de calcio, 10 mM de cloruro de rubidio, 15 % v/v de glicerol, ajustado a pH 6,5 con hidróxido de sodio diluido). Incubar en hielo 15 min.

Las células se pueden usar inmediatamente o alíquotar y congelar en nitrógeno líquido y guardar a -80 °C.

3.6.1.4. Transformación por choque térmico.

Descongelar las células termocompetentes en hielo, añadir entre 1 y 10 μL de la mezcla de ligación en cada tubo que tiene 200 μL de células. Incubar 30 min. en hielo, a continuación hacer un choque térmico a 42 °C durante 90 seg. Incubar a

temperatura ambiente durante 10 min., añadir 0,8 mL de medio LB y dejar recuperar durante 1 hora a 37 °C con agitación suave (50 -60 rpm).

A continuación plaquear 100-200 µL en medio LB con el antibiótico adecuado, e incubar las placas a 37 °C 16-18 horas.

3.6.2. Transformación de *S. cerevisiae*.

Para la transformación de las levaduras se usó el protocolo de Gietz y cols. (2002), que permite transformar tanto con plásmidos, como con fragmentos de ADN lineales, como los fragmentos de delección.

Se inoculan 50 mL de YEPD con 5×10^6 cel mL⁻¹ (DO_{600nm} = 0,2) con un cultivo previo de 16 h, se incuban a 30 °C y 200 rpm, hasta que se alcanza una DO 0,8-1 (2×10^7 cel mL⁻¹). Una vez ha alcanzado la DO, centrifugar 5 mL, a 5000 rpm durante 5 min., lavar el pellet con agua estéril, y volver a centrifugar. Desechar el sobrenadante y resuspender en 100 µL de LiAc 0,1 M, pasarlo a un eppendorf, centrifugar a máxima velocidad durante 15 seg. y eliminar el sobrenadante. Añadir 40 µL de LiAc 0,1 M, resuspender y añadir a las células la mezcla (240 µL de PEG 50 %, 36 µL de LiAc 1 M, 50 µL de ADN carrier 2 mg mL⁻¹ previamente hervido 10 min. y 34 µL del plásmido o producto de PCR). Mezclar bien con un vortex, e incubar 30 min. a 30 °C y 30 min. a 42 °C. Una vez realizado el choque térmico, centrifugar 30 seg. a 7000 rpm, lavar las células con agua destilada, centrifugar y eliminar el sobrenadante. Resuspender las células en YEPD, y dejar recuperar de 2 horas a 30 °C, una vez transcurrido el tiempo, sembrar en placas con medio selectivo, e incubarlas a 30 °C durante 2-4 días.

3.7. Eliminación de la resistencia a la geneticina.

Para eliminar la resistencia (flanqueada por dos secuencias *loxP*) introducida en el genoma de la levadura, en este caso geneticina primero se transforma la levadura

con el plásmido Yep351-cre-cyh (Delnieri *et al.*, 2000). Este plásmido tiene insertado el gen de la Cre recombinasa bajo el control del promotor GAL1 y un marcador de selección que es la cicloheximida (cyh^R).

Así, usando el protocolo de transformación explicado anteriormente se recuperan las colonias resistentes a cyh^R . Se inocula 50 mL de medio mínimo con $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ a una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,2, a partir de un cultivo crecido en este mismo medio durante 16 h. Se incuba a 30°C con agitación hasta que alcance una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ de 0,8. Centrifugar 5 min. a 12000 rpm, y eliminar sobrenadante. Lavar las células con 12 mL de agua estéril. Centrifugar de nuevo, eliminar sobrenadante y lavar las células con 12 mL de YPGal. Centrifugar y resuspender las células en 50 mL de YPGal. Incubar a 30°C durante 5-7 h, para que se active la cre recombinasa y haga saltar la resistencia. Una vez transcurrido el tiempo sembrar en placas de YEPD, una vez crecidas se realiza una réplica en placa de YEPD con geneticina, para comprobar que ya no son resistentes.

4. TÉCNICAS ANALÍTICAS.

4.1 Medida de la vitalidad celular.

Para determinar la vitalidad celular se usó un aparato cuyo nombre comercial es BacTrac 4300 (SY-LAB Instruments, Austria). Este aparato se basa en la medición de las variaciones de la impedancia eléctrica experimentada por una solución líquida (Owens *et al.*, 1989; Ribeiro *et al.*, 2003).

La impedancia se define como la resistencia al paso de la corriente alterna a través de un material conductor. La conductancia de un medio de cultivo, está en función de la resistencia y ésta depende de la cantidad de iones en disolución (Hartman *et al.*, 1992).



Figura M.2. Fotografía del BacTrac de SY-LAB.

La curva típica de medida de la impedancia puede dividirse en tres fases: fase de adaptación, exponencial y estacionaria. El rango central, definido por el punto de inflexión después de la fase de adaptación y previo a la exponencial es el importante para esta tecnología de medida (Ribeiro *et al.*, 2003). El cambio de impedancia se detecta con una solución de hidróxido de potasio que reacciona con el CO_2 producido por el metabolismo de la levadura. La solución de 0,2 % de KOH hay que prepararla cada vez, ya que puede saturarse con la reacción con el CO_2 del ambiente. Las células, procedentes de un cultivo en fase estacionaria, son inoculadas con una $\text{DO}_{600\text{nm}}$ 0,05 en un vial de plástico estéril en 5 mL de YEPD, este se introduce, abierto para que el CO_2 difunda, en otro vial que contiene 2 mL de la solución de KOH. Se colocan las muestras en el BacTrac, donde se incuban a la temperatura deseada (13 y 25 °C). Se monitoriza el valor de la impedancia cada 10 min., con lo que se obtiene una curva en la que se representa la disminución del porcentaje de impedancia con el tiempo (Figura M.3). Para poder comparar las cepas se determina un valor umbral, que represente el porcentaje de disminución de impedancia, a la temperatura analizada (Rodríguez-Porrata *et al.*, 2008).

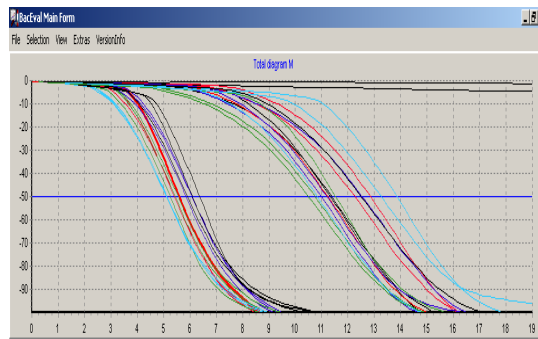


Figura M.3. Representación de la gráfica obtenida tras la medida de la disminución de la impedancia de la muestra en Bac-Trac. En este caso el ciclo umbral para las muestras está fijado en el 50 %.

4.2. Tiempo de duplicación.

El crecimiento de un microorganismo en un medio de cultivo puede ser descrito por la siguiente ecuación:

$$dx/dt = \mu \cdot x$$

$$\mu = (dx/dt)/x$$

Donde dx/dt es la tasa de crecimiento del microorganismo, siendo: x la DO_{600nm} del cultivo, t el tiempo transcurrido de crecimiento y μ es una constante de proporcionalidad denominada tasa o velocidad específica de crecimiento.

Cuando el cultivo se encuentra en fase exponencial se cumple:

$$x = x_0 \cdot e^{\mu t}$$

Durante el crecimiento microbiano, la tasa específica de crecimiento se puede obtener calculando el valor del tiempo de duplicación de la población microbiana (td). Así:

$$\mu = \ln 2 / td$$

El tiempo de duplicación se determina gráficamente y corresponde al intervalo de tiempo necesario para que x sea igual a $2 x_0$.

La tasa específica de crecimiento se determina calculando la recta de regresión logarítmica de los valores de DO frente al tiempo, el valor de la pendiente corresponde a la tasa específica de crecimiento. Una pendiente mayor significa un tiempo de duplicación más alto, así la célula se divide más rápidamente.

4.3. Representación de los ratios de vitalidad y tiempo de duplicación.

Para representar los datos de vitalidad y crecimiento mediante el tiempo de duplicación, respecto la cepa control se usó la siguiente fórmula:

$$X = (\text{Cepa problema}) / (\text{Cepa control}) - 1$$

Los datos están en horas. Así, si se obtienen valores negativos significa que la cepa problema tarda menos horas en alcanzar el umbral fijado en el caso del cálculo de la vitalidad o que el tiempo que tarda en duplicarse es menor que la cepa control.

4.4. Medida de la capacidad fermentativa.

4.4.1. Medida de la densidad del mosto.

La medición de la densidad del mosto se realizó mediante el densitómetro Densito 30PX (Mettler Toledo, Suiza).

El seguimiento de la densidad nos permite seguir de forma indirecta la fermentación, ya que va disminuyendo a medida que avanza la fermentación. La densidad del mosto está normalmente entre 1070 y 1120 g L⁻¹ y la del vino oscila entre 990 y 998 g L⁻¹. Este descenso de la densidad se debe al consumo del azúcar por parte de las levaduras y su transformación en etanol (de menor densidad que el agua).

4.4.2. Determinación de los azúcares presentes en el vino.

De manera un tanto arbitraria, en la industria enológica, una fermentación se considera acabada cuando hay menos de 2 g L^{-1} de azúcares presentes. Nosotros hemos seguido este criterio con las fermentaciones realizadas en el laboratorio. La concentración de azúcares residuales se determinó mediante el kit enzimático de D-Glucosa/D-Fructosa (Roche Diagnostics, Alemania).

4.4.3. Cálculo de T5, T50 y T100, en la fermentación.

El cálculo del consumo del 5, 50 y 100 % de los azúcares en el mosto se realizó mediante el ajuste de una curva de mínimos cuadrados, sobre los datos de disminución de densidad durante la fermentación, para cada uno de los triplicados (Figura M.4). Se usó el programa Sigmaplot para realizar los cálculos y representaciones (Systa Software Inc. USA). Posteriormente se aplicó la fórmula para determinar estos valores T5, T50 y T100 y se realizó la media entre los triplicado. Para finalizar se analizaron estadísticamente para determinar su significancia.

4.5. Análisis estadísticos.

Los datos fueron tratados estadísticamente usando el paquete estadístico SPSS 13. Las diferencias entre las cepas modificadas y la cepa control se analizaron con un ANOVA. El nivel estadístico de significancia usado en todos los casos fue $P \leq 0,05$.

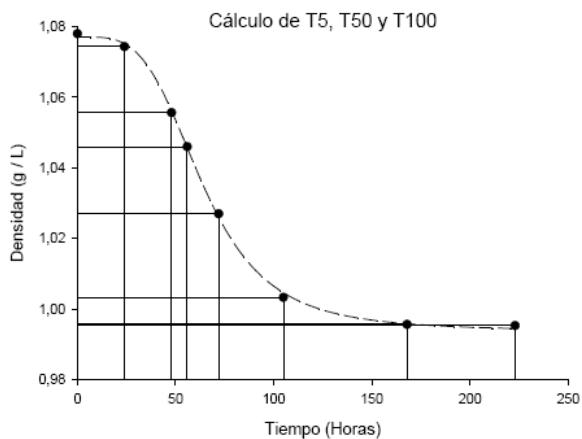


Figura M.4. Ajuste por mínimos cuadrados sobre los puntos de disminución de densidad tomados a lo largo de una fermentación.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

V.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

V. 1.

**Construcción y caracterización de una cepa vínica
haploide derivada de la levadura comercial QA23.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

La levadura *S. cerevisiae* se usa como modelo eucariota de estudio debido a sus características, ya que es unicelular, fácilmente cultivable en laboratorio y rápida en su crecimiento. Normalmente se usan cepas de laboratorio, que en su inicio fueron seleccionadas de ambientes naturales y se adaptaron fácilmente a las condiciones de crecimiento en el laboratorio. Esto contribuyó a que la cepa S288C de *S. cerevisiae* fuera el primer organismo eucariota en tener secuenciado su genoma. Mayoritariamente, en los estudios llevados a cabo en los laboratorios, se usan cepas haploides estables, cuando lo habitual en la naturaleza es que las cepas de *S. cerevisiae* sean diploides, poliploides o aneuploides (Bradbury *et al.*, 2006; Cubillos *et al.*, 2009). Estas cepas haploides de laboratorio también se cruzan fácilmente y contienen marcadores de selección basados en auxotrofías. Así, mediante técnicas clásicas y de genética recombinante se han caracterizado sus procesos metabólicos, su base genética y su regulación. La mayor ploidía de las cepas industriales complica más la caracterización genética y la utilización de estas técnicas de análisis genético.

La alternativa de uso de las cepas de laboratorio como modelo de las cepas industriales no siempre es adecuada, debido a las diferentes propiedades entre ambos grupos (Hansen *et al.*, 1996; Henschke, 1997). Si se comparan las cepas de laboratorio con las cepas industriales, como las levaduras vínicas, existen diferencias genéticas importantes, ya que mientras las cepas industriales fueron aisladas por su capacidad fermentativa en ambientes estresantes (bajo pH, una concentración limitada de nutrientes, altas concentraciones de etanol y con fluctuaciones de temperatura), las cepas de laboratorio fueron seleccionadas por su rápido y abundante crecimiento en los medios ricos de laboratorio, y a temperaturas óptimas (Mortimer y Johnston, 1986).

De hecho, la comparación de genomas entre las cepas industriales y de laboratorio nos puede ayudar a identificar “loci” genómicos importantes para llegar a comprender los fenotipos industriales que existen y como regularlos. Recientemente se han secuenciado los genomas de las levaduras vínicas, AWRI1631 (haploide) y EC1118 (diploide) (Borneman *et al.*, 2008; Novo *et al.*, 2009), y han dado ciertas

sorpresas al compararlas con la cepa de laboratorio S288C. Las levaduras vínicas presentan aproximadamente un 0,6 % de sus genomas diferentes del de la levadura de laboratorio. Además, en la S288C existen genes no presentes en la EC1118, la mayoría de regiones subteloméricas. Por otra parte, en las cepas vínicas se han encontrado secuencias nuevas, no presentes en la de laboratorio, y se ha determinado que algunas de estas secuencias han sido incorporadas mediante transferencia horizontal a partir de otra especie de *Saccharomyces* como es el caso de *S. paradoxus* (Liti *et al.*, 2006), e incluso de cepas de no-*Saccharomyces* como de *Zygosaccharomyces bailii* (Novo *et al.*, 2009). *Z. bailii* es una de las principales levaduras contaminantes en vino, resiste altas concentraciones de azúcares y etanol, además de pH bajos. Esta alta resistencia le permite permanecer durante el proceso de fermentación junto a *S. cerevisiae*. Esta proximidad puede haber favorecido la transferencia de genes entre las dos especies. Este es el caso del gen *MPRI* de *S. cerevisiae*, implicado en la tolerancia al estrés por etanol y frío, que no se encuentra presente en la secuencia de la cepa de laboratorio S288C pero si en cepas vínicas como Σ 1278b y EC1118, y del que se postula haber sido transferido desde *Z. bailii* (Borneman *et al.*, 2008; Novo *et al.*, 2009).

Estas diferencias genómicas ya fueron puestas de manifiesto hace algunos años en la comparación, mediante transcripción global, entre una levadura vínica y una de laboratorio (Cavaliere *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2001). La levadura vínica mostraba una mayor actividad de genes del transporte de azúcares y amonio, genes glucolíticos, de resistencia al sulfito o genes de estrés. Aunque las diferencias de expresión de algunos de estos genes se justificaba por cambios en su secuencia, en muchos casos estas diferencias se deben a cambios en los elementos *trans* implicados en la regulación del gen, como pueden ser los factores de transcripción (Wang *et al.*, 2007). Estas diferencias entre las levaduras vínicas y las de laboratorio también han sido puestas de manifiesto mediante el uso de la técnica de hibridación genómica comparativa mediante microarrays (α CGH) (Dunn *et al.*, 2005; Carreto *et al.*, 2008). Esta técnica consiste en hibridar el ADN genómico de dos cepas y comparar las diferencias en el número de genes presentes en ambos genomas. Entre

las diferencias detectadas por esta técnica se encuentran genes que codifican transportadores de azúcares (genes *HXT*), transportadores de metales (*CUPI*, genes *ENA*), resistencia a drogas y detoxificación.

Cuando las cepas están en estado haploide, como es el caso de la mayoría de las cepas de laboratorio, se pueden seleccionar o introducir genes fácilmente y estudiar los cambios que se puedan producir en el fenotipo. La existencia de múltiples copias del mismo gen en las cepas industriales enmascara y dificulta las modificaciones genéticas tanto basadas en la eliminación de un gen como en la sobreexpresión del mismo.

No solo la ploidía dificulta este tipo de experimentos, sino también el homotalismo, característica mayoritaria en las cepas industriales. Aunque las cepas homotálicas puedan ser inducidas a esporular y se obtengan esporas haploides de cada uno de los tipos sexuales (α y a), es muy difícil mantener a estas esporas en forma haploide una vez germinan. La espora germinada empieza a dividirse por gemación. Tras la primera gemación, la célula madre entra en un programa de inversión de su signo sexual. Este sistema permite la existencia de células haploides a y α provenientes de una espora de un signo sexual concreto, y permite la autodiploidización entre ellas para formar células diploides estables.

En este proceso de inversión de signo sexual existe un gen clave que es el gen *HO*. El gen *HO* codifica una endonucleasa responsable del cambio de tipo sexual o “mating type” de la levadura (término usado para diferenciar individuos que son sexualmente compatibles). El signo sexual de la levadura está determinado por la información que se expresa en el *locus MAT*. A las secuencias que se encuentran dentro del *locus MAT* se les denomina “ideomorfos” y no “alelos” ya que son secuencias muy diferentes que, sin embargo, ocupan el mismo *locus* en el genoma (Metzenberg y Glass, 1990). Además del *locus MAT* que determina el signo sexual activo de la levadura, existen dos loci HML (α) y HMR (a), transcripcionalmente silenciados y localizados en el cromosoma III situados a ambos lados del *locus MAT*. HML en el telómero izquierdo y HMR en el derecho, que codifican

respectivamente copias de reserva de los genes *MATa* y *MAT α* (Nasmyth, 1982; Herskowitz, 1988). *HO* inicia el cambio mediante el reconocimiento y unión a una secuencia de 24 pares de bases provocando una rotura en el ADN de doble cadena. La secuencia en *MAT* es reemplazada por la copia de la nueva secuencia desde *HML* o *HMR* (Figura 1.1).

La expresión y la interconversión del tipo sexual ocurre exclusivamente en las células haploides madre al final de la fase G1 del ciclo celular. Las cepas salvajes de *S. cerevisiae* presentan al menos una copia del gen *HO* activo y son homotáticas, al contrario de la mayoría de las cepas de laboratorio usadas que presentan el alelo *ho* no funcional y son heterotáticas.

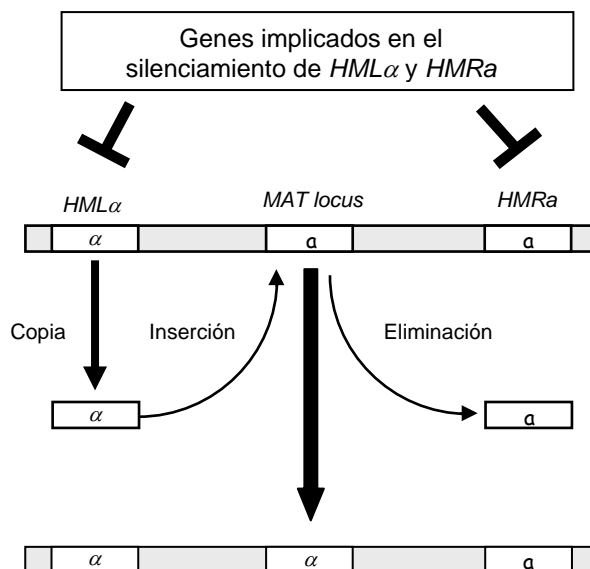


Figura 1.1. Esquema del mecanismo por el que la levadura puede cambiar su signo sexual o "mating type". La endonucleasa codificada por el gen *HO* corta y elimina el determinante sexual que está en el locus *MAT* (en este caso *a*) y es sustituido por la copia codificada por las secuencias *HML* (α) produciéndose el cambio del signo sexual.

Existen casos descritos en la bibliografía de cepas haploides heterotáticas estables derivadas de cepas vínicas homotáticas. Algunas de estas cepas son mutantes naturales para el gen *HO* (Michnick *et al.*, 1997). En otros casos, se ha introducido un alelo *ho* no funcional por metodologías de hibridación de esporas (Bakalinsky *et al.*, 1990), o se ha reemplazado el gen *HO* por un gen de resistencia (Tamai *et al.*, 2001). Estas estrategias tenían una serie de inconvenientes como es el añadir a las cepas haploides largas secuencias que no pertenecían a la levadura, incluyendo genes que conferían resistencia a antibióticos. Hasta que Walker y cols. (2003 y 2005), diseñaron una estrategia para obtener haploides de una cepa vínica sin que quedaran secuencias extrañas en la levadura, incluyendo la eliminación de los marcadores de selección. Se basaron en la técnica descrita por Güldener y cols. (1996), que consiste en sustituir por recombinación homóloga una de las copias de un determinado gen por un fragmento de delección. Este contiene la resistencia a geneticina (codificado por el gen *KanMX4*), flanqueado por unas secuencias repetidas (*loxP*) y por unas colas (largos fragmentos específicos con la secuencia del gen de interés), que son las que hibridan con el gen, produciéndose la recombinación. Las secuencias repetidas *loxP* permiten que se produzca una recombinación entre ellas y una posterior eliminación de la resistencia.

Por tanto, para poder usar cepas industriales en estudios de análisis funcional y evitar los problemas debidos a poliploidías y homotalismo se planteó el objetivo de obtener una cepa haploide a partir de una cepa vínica comercial, que nos facilite el posterior trabajo de construcción de cepas mutantes y sobreexpresantes en una cepa con una constitución genética similar a la cepa industrial. Entre los diferentes derivados haploides obtenidos, será seleccionada aquella cepa que presente unas características en la cinética fermentativa similares a la cepa industrial.

1. OBTENCIÓN DE CEPAS HAPLOIDES A PARTIR DE QA23.

La levadura vínica comercial seleccionada para el trabajo fue la cepa QA23 de *S. cerevisiae* (Lallemand, S.A, Canadá) de uso habitual en las bodegas debido a su

robustez durante la fermentación, y que era nuestra cepa industrial modelo en el laboratorio. En estudios previos nuestro laboratorio, se determinó mediante citometría de flujo la ploidía de la cepa QA23. La técnica consiste en marcar la célula con yoduro de propidio (PI), este fluorocromo se intercala estequiométricamente entre los ácidos nucleicos de doble cadena produciendo un aumento de su fluorescencia, así se obtiene una señal que se usa para cuantificar la cantidad de ADN de una célula (previa digestión del ARN), pudiéndose relacionar de forma directa la cantidad de ADN de una levadura con la ploidía que presenta, comparando la señal que se obtiene en las cepas control, ya sean haploide o diploide, con la de la levadura problema. En este caso se analizaron dos cepas problema, RV1 y QA23. Se tiñeron con PI y se cuantificaron las señales en un citómetro de flujo, junto dos cepas control, una diploide y otra haploide. Tras el análisis de las señales de fluorescencia de nuestras cepas y las control se obtuvo como resultado que tanto la cepa RV1 como la QA23 eran diploides (Figura 1.2), ya que su señal era dos veces la intensidad de la cepa haploide y coincidía con la de la cepa diploide.

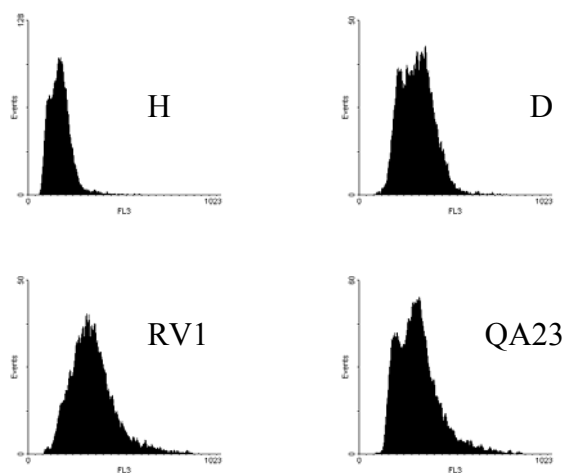


Figura 1.2. Determinación por citometría de flujo, mediante tinción con yoduro de propidio, la ploidía de las cepas vínicas RV1 y QA23, siendo las cepas control H (cepa haploide) y D (cepa diploide).

1.1. Eliminación de una copia del gen *HO*.

Para llevar a cabo la eliminación del gen se usó el método descrito por Güldener y cols. (1996). Este método consiste en la eliminación de una determinada región del genoma mediante la inserción de un fragmento de ADN (normalmente amplificado por PCR) por recombinación homóloga (Figura 1.3).

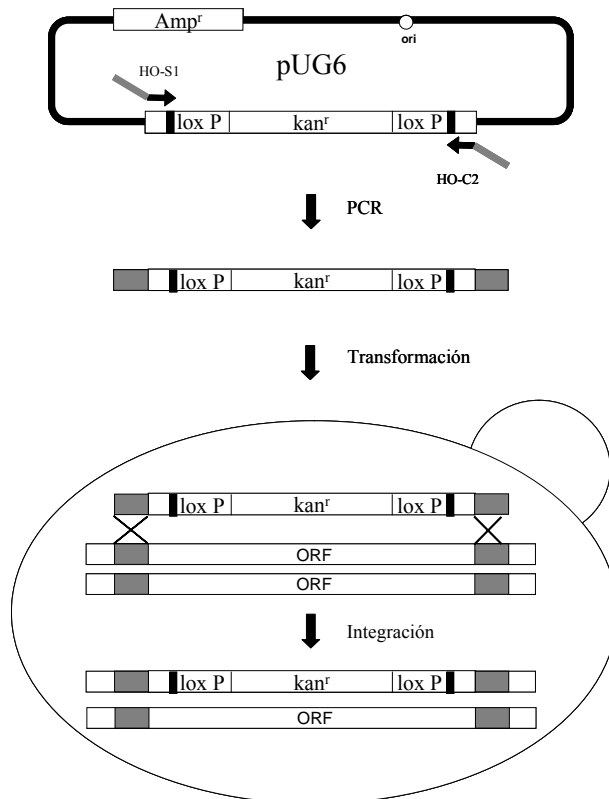


Figura 1.3. Eliminación del gen *HO* mediante la construcción de un fragmento de delección *loxP-KanMX4-loxP*. Se usaron dos oligonucleótidos (HO-S1 y HO-C2) para amplificar el fragmento de delección, desde el plásmido pUG6, con secuencias homólogas al gen *HO* (zonas en gris). Al transformar la levadura, el producto de PCR recombina con el gen y se produce la integración del marcador en el lugar del gen (adaptada de Güldener *et al.*, 1996).

En primer lugar se procedió a amplificar el fragmento de delección por PCR, integrado en el plásmido pUG6. Este fragmento está formado por el gen que codifica en levaduras la resistencia para el antibiótico geneticina (*kan^R* o KanMX4), flanqueado en ambos extremos con las secuencias directas *loxP*. Las secuencias *loxP* están formadas por 34 pb, que consisten en 8 pb situadas entre dos secuencias repetidas invertidas de 13 pb (5' ATAACTTCGTATA atgtatgc TATACGAAGTTAT 3'), y son sitios de recombinación específicos de la proteína Cre ("Cyclization Recombination"), que es una recombinasa específica de ADN. Cuando las células expresan la proteína Cre se produce un evento de recombinación entre los sitios *loxP* y la posterior eliminación de la secuencia que está entre ellos, en este caso *kan^R*.

Se usaron los oligonucleótidos HO-S1 y HO-C2 que son homólogos a las secuencias flanqueantes a los sitios *loxP* en el plásmido pUG6 (ver Material y Métodos). Además de esta secuencia homóloga al pUG6 (unos 20 nucleótidos), estos oligonucleótidos se completan con colas en el extremo 5' de 50 pb homólogas a las secuencias 5' y 3' de la secuencia codificante del gen *HO*. Por tanto, el producto de PCR presenta unas zonas homólogas al gen en cuestión que, una vez introducido en el interior celular, lleva a cabo un proceso de recombinación y sustitución de una de las copias del gen *HO*.

La ORF de *HO* se elimina en su totalidad, ya que las secuencias homólogas se han diseñado al inicio y final de la secuencia codificante. La selección de los transformantes se llevó a cabo en YEPD con geneticina. La comprobación de la correcta inserción del fragmento se realizó mediante una PCR con los oligonucleótidos HOc-F y HOc-R sobre varias colonias (Figura 1.4). Sin embargo, debido a que el fragmento de delección y la copia salvaje del gen *HO* presentan un tamaño muy similar (únicamente 10 pb de diferencia), se utilizó otra comprobación alternativa. Esta consistió en el producto de PCR obtenido con la combinación del oligonucleótido HOc-F con el oligonucleótido K2 que hibrida a 359 pb del extremo 5' del gen *KanMX4*. Este producto de PCR presenta 612 pb y únicamente se puede producir cuando el casete de delección haya reemplazado al gen *HO*

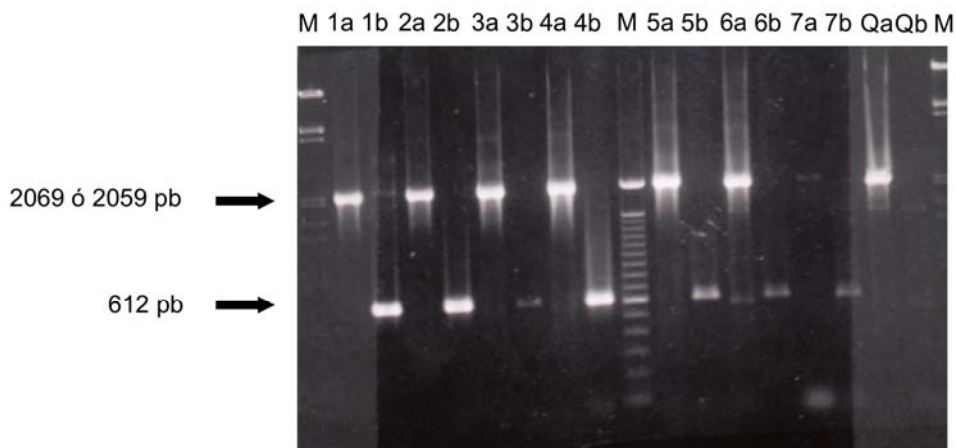


Figura 1.4. Gel de comprobación de la inserción del fragmento de delección en una de las copias de *HO*. Los números se corresponden con las diferentes colonias, y la Q es la cepa salvaje QA23. Las letras se corresponden con la combinación de oligonucleótidos usada (a: HOc-F y HOc-R; b: HOc-F y K2). Las longitudes esperadas para la combinación a son 2059 pb para el inserto y 2069 pb para la copia del gen *HO*. Para la combinación b la longitud es de 612 pb en el caso de que este presente el inserto de delección. M se corresponde con el marcador de peso molecular III de Roche (0.12 - 21.2 kb) (Roche Diagnostics, Alemania).

Aunque con la amplificación usando el segundo par de oligonucleótidos se obtuvo una banda de la longitud esperada, para estar totalmente seguros se procedió a digerir el producto de PCR obtenido con HOc-F/HOc-R con el enzima de restricción *Hind* III (Roche Diagnostics, Alemania). Con este enzima se podía diferenciar entre las bandas que procedían del gen salvaje o de la integración del fragmento de eliminación (Figura 1.5).

Tras la digestión con *Hind* III se comprobó que en las cepas *hoQA23-1*, *hoQA23-2*, *hoQA23-3* y *hoQA23-4* se había eliminado una de las copias del gen *HO*, mientras la otra continuaba intacta, ya que en el gel se pueden ver tres bandas, la mayor (2059 pb) se corresponde a la copia salvaje, y las otras dos (1269 y 791 pb) como resultado de la digestión de la copia mutada. Sin embargo, las cepas *hoQA23-5*, *hoQA23-6*, *hoQA23-7* y *hoQA23-8* al igual que la cepa comercial QA23 solo presentan la

banda mayor, lo que sugiere que no se ha eliminado ninguna copia de *HO*. En este caso sospechamos que el fragmento se había insertado pero en otro lugar inespecífico del genoma, puesto que es resistente a la geneticina.

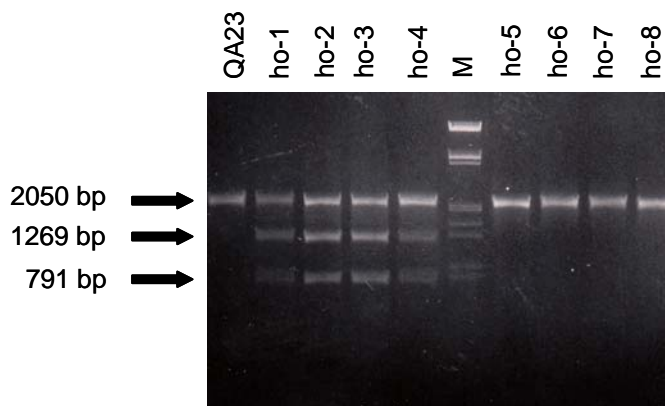


Figura 1.5. Digestión con *Hind* III del producto de PCR (HOc-F y HOc-R), las bandas que se esperan son en el caso de la copia salvaje 2050 + 20 pb, y en el caso del inserto son 1269 + 791 + 20 pb. M se corresponde con el marcador de peso molecular III de Roche (0.12 - 21.2 kb) (Roche Diagnostics, Alemania).

1.2. Esporulación.

Se hicieron esporular las 4 colonias que habían reemplazado una copia del gen *HO* por el inserto de resistencia a la geneticina. Para conseguir la esporulación, se crecieron en placas de acetato potásico (KAc), y tras 5 días de incubación a 30 °C se comprobó por microscopio que la mayoría de células habían esporulado, por lo que se procedió a la separación de las esporas con el tratamiento con dietil eter (Dawes y Hardie, 1974). El dietil eter elimina todas las células vegetativas presentes y deja únicamente las esporas, que gracias a la gruesa pared que las recubre poseen una mayor resistencia a este producto. Tras el tratamiento, se sembraron las esporas en placas con medio selectivo YEPD con geneticina. De esta manera, únicamente

aquellas esporas que tienen la copia del gen de resistencia a geneticina y, por tanto, sin la copia del gen *HO*, serían capaces de crecer en este medio. Estas esporas *Δho* deberían ser incapaces de autodiploidizar y, como consecuencia, mantenerse en forma haploide de manera estable

En el caso de las cepas *hoQA23-1* y *hoQA23-3* obtuvimos una gran cantidad de esporas resistentes a la geneticina. Por el contrario, en las cepas *hoQA23-2* y *hoQA23-4* prácticamente no obtuvimos esporas que fuesen resistentes. En estudios posteriores que hemos realizado con esta cepa vínica, hemos comprobado que la viabilidad de las esporas varía del 25 al 50 %. La probabilidad de obtener la viabilidad de las 4 esporas provenientes de la misma asca es muy baja. En la mayoría de las ascas no se recuperan más de 1 ó 2 esporas viables. Como se menciona anteriormente, esta cepa vínica debe presentar un alto grado de heterocigosis para muchos genes, con la presencia de copias deletéreas que impiden la viabilidad de la espora cuando se encuentran como copia única. Entre las colonias resistentes se seleccionaron al azar 15 colonias y se comprobó, mediante PCR con oligonucleótidos específicos y digestión de la banda, la correcta inserción del fragmento tal como se describe anteriormente. Todas las colonias analizadas daban los tamaños esperables tras la digestión. En la Figura 1.6 se muestra el resultado de 8 colonias digeridas.

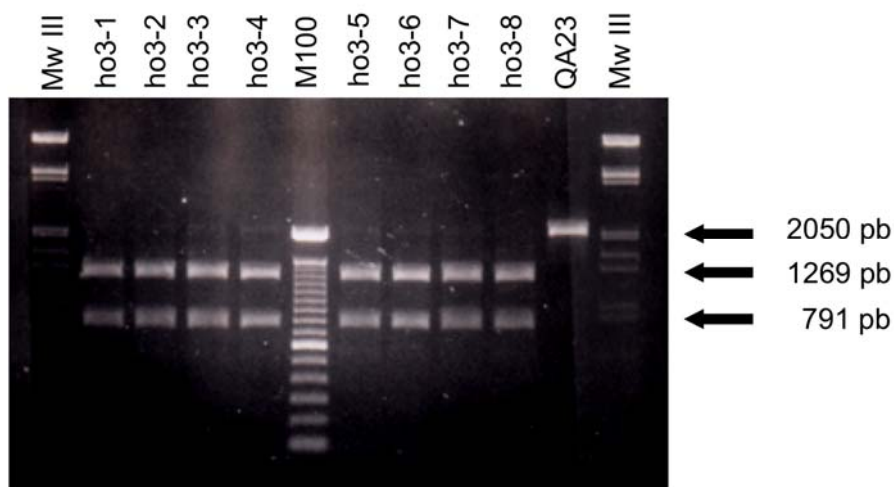


Figura 1.6. Comprobación de la inserción del fragmento de delección en el gen *HO* en los esporulados recuperados de la cepa *hoQA23-3*. Se realizó una PCR de los esporulados, a partir de ADN, con los primers específicos (HOc-F/R), y posteriormente una digestión del fragmento con la enzima *Hind* III. Las bandas esperadas son, en el caso de la copia salvaje 2050 + 20 pb, y en el caso de la inserción del casete 1269 + 791 + 20 pb. M100 se corresponde con el marcador de peso molecular de 100 pb de Invitrogen. Mw III es el marcador III de Roche (Roche Diagnostics, Alemania).

1.3. Comprobación por PCR de la haploidía y determinación del signo sexual.

Una vez llevada a cabo la eliminación del gen *HO*, comprobamos que efectivamente se trataba de cepas haploides mediante la determinación del signo sexual. Para ello se usaron los oligonucleótidos MAT, MAT α y MAT α , descritos por Huxley y cols. (1990), con los cuales se puede determinar si las cepas son haploides o diploides, y entre las cepas haploides si son de signo sexual a o α . En las cepas a, (presentan la copia del gen MAT α) se esperaba una banda de 544 pb, en las cepas α (presentan la copia MAT) una de 404 pb y en el caso de diploide presentaría ambas bandas.

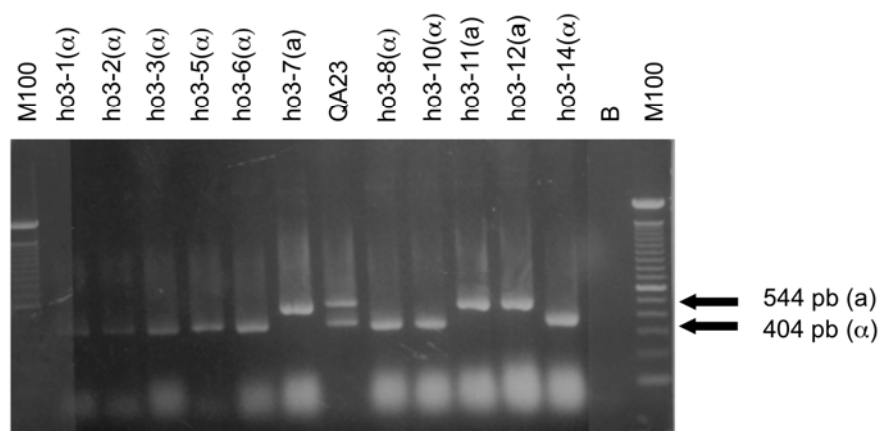


Figura 1.7. Determinación de la haploidía y del signo sexual de los mutantes mediante PCR. M100 es el marcador de 100 pb de Invitrogen y B se corresponde con el control negativo. Al lado de la cepa, entre paréntesis, se especifica el signo sexual que le corresponde a cada una de las cepas.

Así se determinó que todas las colonias seleccionadas eran haploides ya que solo presentaban una de las bandas. Como control se utilizó la cepa vínica original QA23 que presentaba ambas (Figura 1.7). Se obtuvieron haploides de ambos signos sexuales (*hoQA23-3.1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 10, 14* y *15* son *MATα*, y *hoQA23-3.7, 11, 12* y *13* son *MATa*). De forma que si en algún momento se necesitaba recuperar el diploide, se podría realizar sin ningún problema mediante cruzamiento de cepas de signo sexual contrario.

2. ANÁLISIS DE VITALIDAD Y CAPACIDAD FERMENTATIVA DE LOS HAPLOIDES VS. LA CEPA SALVAJE.

El siguiente paso consistía en elegir entre las 14 cepas haploides seleccionadas aquella que mostrase un comportamiento más parecido con la cepa vínica original

QA23. Las cepas haploides pueden presentar diferencias importantes respecto a la cepa parental, como consecuencia de la presencia de alelos menos eficaces para el proceso de la fermentación alcohólica (Ramírez *et al.*, 1999; Gimeno-Alcañiz y Matallana, 2001). En este caso nos interesaba comprobar que la cepa haploide presentaba un comportamiento fermentativo similar a la cepa parental. Para ello se ensayaron tres aspectos muy concretos de estas cepas haploides: la vitalidad celular, la cinética fermentativa y el crecimiento. Estas características se comparaban siempre con la cepa parental QA23. También eran ensayadas a dos temperaturas: a una temperatura óptima de crecimiento (25 °C) y a baja temperatura (13 °C) puesto que en el resto del trabajo nos interesaba la capacidad fermentativa en frío.

2.1. Estudio de la vitalidad.

En esta ocasión, entendemos vitalidad celular como la capacidad de producir CO₂ de esas células en presencia de azúcares fermentables. Un método muy sencillo de analizar esta vitalidad es mediante el aparato denominado “BacTrac” que nos mide la modificación de la impedancia de una solución de KOH donde se disuelve el CO₂ producido por el cultivo celular a evaluar (Rodríguez-Porrata *et al.*, 2008). Mediante este método, se analizó la vitalidad tanto de los haploides como de la cepa salvaje a las dos temperaturas, 13 y 25 °C (Figura 1.8).

De forma arbitraria, decidimos determinar el tiempo que cada cepa tardaba en producir una disminución del 20 % de la impedancia del medio. Para una mejor comprensión de los valores obtenidos, éstos se han normalizado respecto a la cepa control QA23, a la cual se le ha dado un valor de 0. Las cepas que presentan un valor relativo negativo significa que necesitan menos tiempo que la cepa control en reducir la impedancia del medio, es decir, que producen más CO₂ en menos tiempo y, por tanto, presentan una mayor vitalidad. Como era de esperar, ninguna de las cepas haploides presentaban una vitalidad mejorada respecto a la cepa parental QA23, siendo las diferencias mayores a la temperatura de 13 °C.

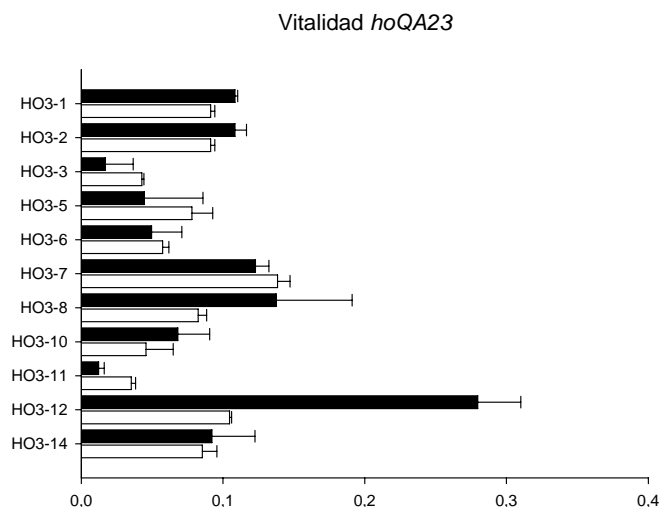


Figura 1.8. Vitalidad de las cepas haploides obtenidas tanto a 13 (barras blancas) como a 25 °C (barras negras) mediante BacTrac. Los datos son relativos a la cepa salvaje QA23, a la cual se le ha dado el valor 1 que se corresponde con un valor de 25,38 horas para 13 °C y de 6,79 horas para 25 °C, así valores mayores a 1 representan un mayor tiempo que la cepa control en llegar a una disminución del 20 % de impedancia en el medio.

En las cepas *hoQA23* se observa que hay algunas, como es el caso de *hoQA23-3.3*, *hoQA23-3.6* y *hoQA23-3.11*, cuyo comportamiento es similar a la cepa salvaje en ambas temperaturas. Sin embargo, otras cepas presentaban un pésimo comportamiento respecto el control. Este es el caso de las cepas *hoQA23-3.12*, cuya vitalidad se ve muy afectada, especialmente a 13 °C. Se realizó un análisis estadístico (t-student) para determinar aquellas que tenían una vitalidad similar a la de la cepa salvaje. A 25 °C, la cepa QA23 tiene un comportamiento diferente a todas las cepas haploides, sin embargo a 13 °C el tiempo que tarda en llegar al nivel umbral no es significativamente diferente a las cepas que *hoQA23-3.3*, 5,6 y 11 (con un p-valor > 0,05).

2.2. Capacidad de crecimiento.

Para determinar la capacidad de crecimiento de las cepas obtenidas se realizaron goteos en placas de YEPD que se incubaron a 25 y 13 °C (Figura 1.9). A 25 °C todas las cepas, a excepción de *hoQA23-3.5*, crecieron igual que la QA23, que se usó como control. A 13 °C, las cepas *hoQA23-3.5* y *hoQA23-3.12* fueron las más afectadas por la bajada de la temperatura, en el resto de cepas no hay diferencias claras respecto la cepa salvaje QA23.

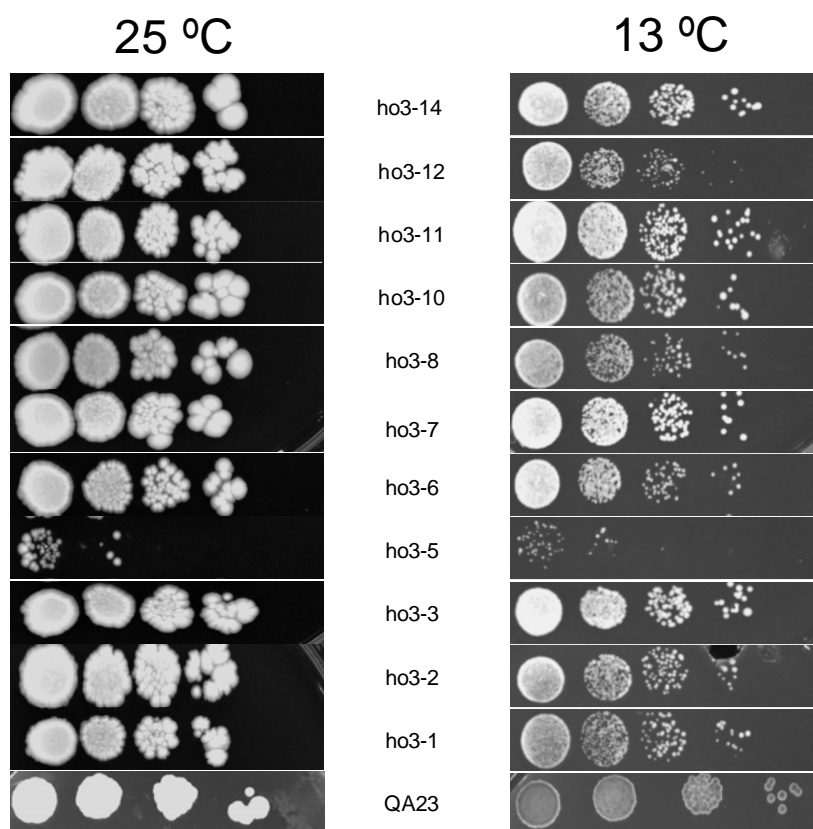


Figura 1.9. Goteos de las cepas haploides sobre una placa de YEPD, se siembran poblaciones de 10^5 , 10^4 , 10^3 y 10^2 cél mL⁻¹ a partir de un cultivo crecido en YEPD durante toda la noche. Incubación a 13 y 25 °C.

Así, en base a la vitalidad y viabilidad celular, se seleccionaron las cepas *hoQA23-3.3* (*MAT α*), *hoQA23-3.6* (*MAT α*) y *hoQA23-3.11* (*MAT α*), para continuar con los análisis, ya que se comportaban de la misma forma que la cepa salvaje, y no se habían visto afectadas negativamente por el proceso de esporulación y formación de haploides.

2.3. Capacidad fermentativa.

Se realizaron microvinificaciones en el laboratorio con las cepas *hoQA23-3.3*, *hoQA23-3.6*, *hoQA23-3.11* y QA23, en fermentadores con 60 mL de mosto sintético a 13 y a 25 °C. Se inocularon 2×10^6 células mL⁻¹ a partir de un cultivo crecido toda la noche en YEPD. La fermentación se siguió por densidad y se determinó el final de fermentación mediante un kit de azúcares, considerándose finalizada cuando los azúcares residuales eran menores a 2 g L⁻¹.

En las fermentaciones realizadas a 25 °C no se encontraron diferencias entre la cepa control y las haploides, finalizando todas ellas tras 82 horas de fermentación. En la fermentación llevada a cabo a 13 °C, QA23, *hoQA23-3.3* y *hoQA23-3.6* acabaron tras 10 días de fermentación, mientras *hoQA23-3.11* acabó 2 días después (Figura 1.10). Esta cepa además presentaba un arranque de fermentación más lento que las otras cepas haploides.

Así seleccionamos las cepas *hoQA23-3.3* y *hoQA23-3.6* para continuar con el experimento, ya que ambas presentaban un comportamiento prácticamente idéntico a la cepa parental respecto al crecimiento y capacidad fermentativa.

3. ELIMINACIÓN DE LA RESISTENCIA A LA GENETICINA.

El objetivo de construir una cepa haploide residía en la posibilidad de ser utilizada posteriormente para construir cepas mutantes y sobreexpresantes en determinados genes. En ese sentido, la resistencia a geneticina es uno de los marcadores de selección más utilizados en este tipo de construcciones. Por tanto, resultaba deseable

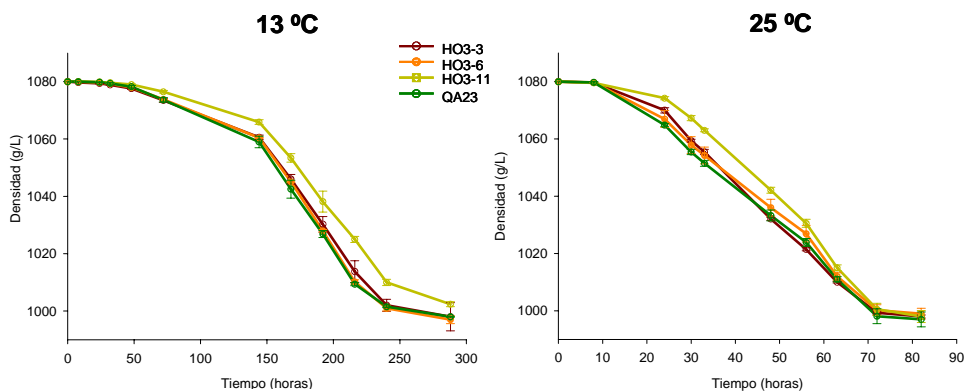


Figura 1.10. Cinética de fermentación de un mosto sintético a 13 y a 25 °C de las cepas haploides *hoQA23-3.3*, *hoQA23-3.6* y *hoQA23-3.11*, y la cepa QA23.

poder eliminar de la cepa haploide esta resistencia. Como se mencionó anteriormente, la presencia de las regiones *loxP* en el inserto permite la recombinación entre ellas y la eliminación de la secuencia que flanquean, en este caso el gen *KanMX4* (codifica para la resistencia a geneticina, *kan^R*). Sin embargo, para llevar a cabo esta recombinación entre las secuencias flanqueantes *loxP*, es necesario la inducción de la Cre recombinasa del bacteriófago P1. La Cre recombinasa está codificada en el plásmido YEp351-cre-cyh (Delnieri *et al.*, 2000) (Figura 1.11), que debe ser clonado en las cepas donde se quiere eliminar el gen flanqueado por las secuencias *loxP*. El plásmido también codifica para el gen de resistencia a la cicloheximida, para poder seleccionar las células transformadas con dicho plásmido.

Esta recombinasa media de manera eficiente la recombinación entre las secuencias *loxP* dando como resultado la escisión del gen marcador (Güldener *et al.*, 1996) (Figura 1.12). En el plásmido, el gen de la Cre recombinasa está bajo el promotor del gen *GAL1* de la β -galactosidasa. Por tanto, es necesaria la adición de galactosa en el medio para inducir la síntesis de la recombinasa.

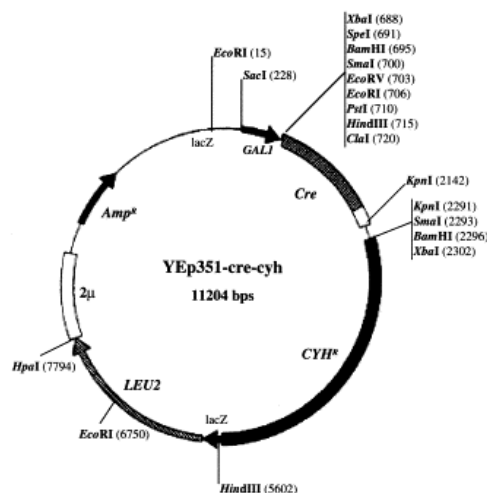


Figura 1.11. Mapa del plásmido YEp351-cre-cyh, conteniendo la Cre recombinasa bajo el control del promotor *GAL1* y con el marcador de selección de la cicloheximida (*CYH^R*) (Delneri *et al.*, 2000).

Se transformaron las cepas *hoQA23-3.6* y *hoQA23-3.11* con el plásmido YEp351-cre-cyh, comprobándose su captación por parte de las levaduras creciéndolas en medio YEPD con cicloheximida. Una vez obtenidas las colonias resistentes se crecieron en YPG, de forma que al crecerlas en galactosa se indujo la expresión de la Cre recombinasa y se eliminó el marcador de selección *kan^R*. Esta eliminación se comprobó en primer término creciendo las células en medio YEPD sólido y posteriormente se hizo una réplica de la placa en YEPD con geneticina. De forma que las levaduras que crecían en YEPD y no en YEPD con el antibiótico eran en las que se había eliminado el marcador de selección. En nuestro caso solo en la cepa *hoQA23-3.6* fue en la que se obtuvieron colonias a las que se había eliminado el marcador de selección integrado en genoma.

La pérdida del marcador *kan^R* también se comprobó por PCR con los mismos oligonucleótidos de comprobación utilizados anteriormente (HOC-F y HOC-R).

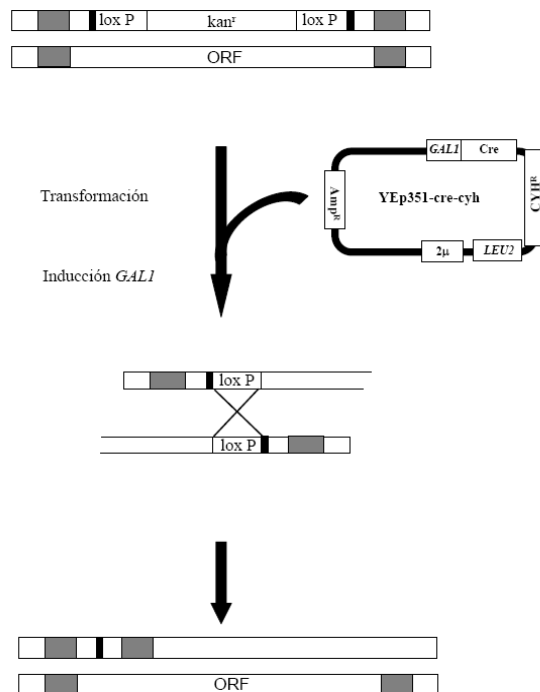


Figura 1.12. Eliminación del marcador de resistencia *kan^R* integrado en el genoma. La inducción del promotor *GAL1* al ser crecida la célula en galactosa, activa la expresión de la Cre recombinasa, que provoca una recombinación entre los sitios *loxP* y el corte de la zona donde está presente el marcador quedando la levadura libre de la resistencia.

Recordemos que la presencia del inserto producía bandas de 2059 pb. En el caso de haberse escindido la región flanqueada por las secuencias *loxP*, el amplicón pasaba a tener un tamaño de 513 pb. La copia salvaje del gen *HO* producía un tamaño muy similar al del inserto (2069 pb). Como se puede ver en la figura 1.13, tanto la cepa salvaje como la cepa haploide presentan las bandas correspondientes al gen *HO* y al inserto respectivamente, mientras que las cepas recuperadas tras el proceso de eliminación del gen de resistencia a genética presentan la banda con el tamaño

esperado. De forma que se ha obtenido una cepa haploide sin resistencia a antibióticos.

4. DISCUSIÓN.

En el presente estudio se ha obtenido mediante una estrategia sencilla y rápida, uniendo técnicas clásicas y de biología molecular, una cepa haploide derivada de una cepa vínica industrial (QA23). La estrategia usada está basada en la descrita por Walter y cols. (2003), pero se ha simplificado. Ya que en vez de tener que construir el fragmento de eliminación con varias PCR y digestiones para añadir en los extremos la secuencias repetidas (para eliminar después la resistencia), en este trabajo, con el uso de una única PCR, mediante oligonucleótidos específicos, se amplifica la construcción *loxP-KanMX4-loxP* presente en el plásmido pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) y se le añaden las colas que hibridarán con el gen a eliminar.

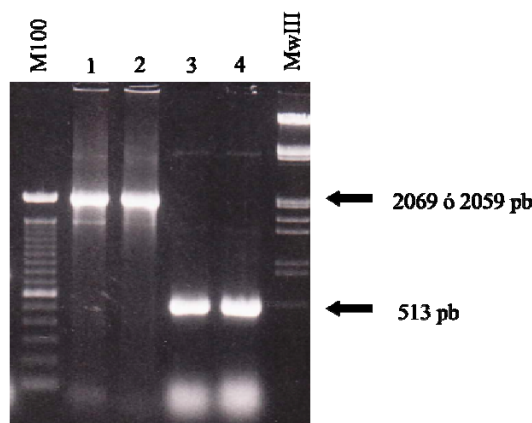


Figura 1.13. Comprobación de la pérdida de *kan^R*. Las carreras del gel se corresponden con 1: cepa vínica QA23, 2: cepa *hoQA23-3.6 kan^R*, 3 y 4: colonias recuperadas tras la inducción del salto de la resistencia. Las bandas esperadas son de 2069 pb con la copia salvaje, 2059 pb con la inserción y de 513 pb si se ha eliminado la resistencia.

Así, directamente se transforma la levadura con el fragmento obtenido por PCR. También se ha aumentado la eficiencia de la eliminación de las secuencias foráneas introducidas, como el marcador de selección, mediante el uso de la Cre recombinasa (Güldener *et al.*, 1996; Delnieri *et al.*, 2000), dejando únicamente en el genoma una de las secuencias *loxP* que flanqueaban la resistencia. Siendo además esta estrategia adecuada para poder usar el mismo marcador de selección en la eliminación de diferentes genes por la posibilidad de eliminarlo del genoma de una forma sencilla.

El proceso de esporulación puede causar la aparición de fenotipos deletéreos recesivos, ocultos fenotípicamente gracias a la heterocigosidad del genoma, o la pérdida de alelos ventajosos adquiridos durante la evolución, como es en el caso de la adaptación de las levaduras a las condiciones de vinificación, causando una pérdida en el vigor de la fermentación (Gimeno-Alcañiz y Matallana, 2001). Pero en otros trabajos se ha visto el caso contrario, que aumentar la homocigosidad tras varios pases de esporulación y posterior diploidización, puede aumentar la presencia de alelos mejor adaptados y aumentar el vigor fermentativo (Ramírez *et al.*, 1999; Marullo *et al.*, 2004; Zara *et al.*, 2008). En nuestro caso no hemos visto una mejora de la capacidad fermentativa, pero sí que algunos segregantes obtenidos habían empeorado su comportamiento respecto la cepa parental. Además, una característica fenotípica de nuestros mutantes es que las células son más pequeñas que las de la cepa parental, de forma que el menor tamaño de las células puede causar una disminución de la eficiencia de fermentación y por ello, no hemos encontrado posibles segregantes que mejoren los resultados de la cepa parental. Sin embargo, si hemos encontrado derivados haploides que tienen un comportamiento muy similar en la vitalidad, viabilidad o crecimiento y en la capacidad fermentativa.

Finalmente el derivado haploide seleccionado fue el *hoQA23-3.6*. Esta cepa, que mantiene las características fermentativas similares al parental, lo convierte en un buen modelo de cepa industrial aplicada a la investigación enológica, ya que será más fácil de manipular en estudios genómicos debido a la presencia de una única copia de su genoma. Además, como el método de transformación permite una posterior eliminación de todo el ADN foráneo o heterólogo, convierte a esta cepa en

potencialmente utilizable por la industria si en posteriores estudios se encontrasen características aplicables en bodega.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

V. 2.
**Estudio transcripcional de los genes seleccionados en
fermentación a baja temperatura.**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

Las células de levadura se ven sometidas a varios tipos de estrés a medida que las condiciones del medio cambian, ya sea en situaciones naturales como en procesos industriales (Attfield, 1997; Bauer y Pretorius, 2000). Tanto el daño provocado como la respuesta de la levadura al mismo, depende del tipo y grado del estrés y del estado de desarrollo de la levadura en el momento en que ocurre el estímulo. Sin embargo, en general, las condiciones adversas a las que se enfrenta este organismo afectan principalmente a las estructuras celulares, como las membranas, y a las diferentes macromoléculas, especialmente lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, las cuales sufren modificaciones estructurales que dañan su función.

Para hacer frente a estas situaciones desfavorables, la levadura responde rápidamente sintetizando moléculas que le permiten atenuar o reparar el daño causado por el estrés (Cavaliere *et al.*, 2000; Backhus *et al.*, 2001; Rossignol *et al.*, 2003). Entre las moléculas mejor caracterizadas en esta respuesta están las llamadas “proteínas de estrés”. Aunque los mecanismos de regulación post-transcripcionales pueden jugar un papel importante en la regulación de la respuesta al estrés, las investigaciones han estado principalmente dirigidas al nivel transcripcional. Su estudio ha evidenciado que la respuesta a nivel transcripcional es importante para la supervivencia celular y ha llevado a la descripción de varias vías de transducción de señales y factores de transcripción involucrados en esta respuesta.

La mayoría de estos resultados se han obtenido a partir de estudios con choques térmicos en cepas de laboratorio. Pero el presente trabajo quiere profundizar en como reacciona la levadura no a choques térmicos puntuales, si no como se ve afectada una levadura comercial durante una fermentación en frío, que puede durar varias semanas. Para ello nos vamos a centrar en una serie de genes específicos, descritos en las levaduras como de respuesta a la baja temperatura, y determinar cómo se modifica su actividad transcripcional. Para esta selección nos basamos en los genes descritos previamente en la bibliografía (Kondo *et al.*, 1991; Sahara *et al.*, 2002; Homma *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004; Varela *et al.*, 2005; Murata *et al.*, 2006), y en un estudio previo del grupo, donde se había analizado mediante la técnica de transcripción global por “microarrays” de ADN, la respuesta global de la

expresión del genoma durante una fermentación vínica industrial a bajas temperaturas (Beltran *et al.*, 2006). Los genes seleccionados en base a bibliografía y datos de los “microarrays” se han dividido en las siguientes categorías funcionales:

- Genes de respuesta a diferentes tipos de estrés: *HSP12*, *HSP26* y *HSP104*.
- Manoproteínas inducidas por choque térmico: *TIP1* y *TIR2*.
- Genes ribosomales: *LOT2* y *NSR1*.
- Gen de ciclo celular, esencial a baja temperatura: *LTE1*.
- Gen implicado en el transporte de nutrientes a bajas temperaturas: *CSF1*
- Chaperona citoplasmática esencial: *TCPI*.

Todos han sido descritos como importantes o esenciales para las levaduras cuando se produce un “cold shock” o cuando tienen que crecer en condiciones de bajas temperaturas (ver Introducción). Así, en este capítulo, se pretende estudiar en primer lugar si su regulación transcripcional depende del estrés motivado por el descenso de la temperatura o si en cambio existen otros factores que determinan su transcripción, como podría ser la presencia de nutrientes, la fase del crecimiento celular, etc. Además, nuestro objetivo es comprobar en que fase de la fermentación alcohólica presentan una mayor actividad, y por tanto, son más necesitados para el mantenimiento de la homeóstasis celular.

1. FERMENTACIÓN A 13 Y 25 °C.

Se realizaron fermentaciones por triplicado a 13 y 25 °C en el laboratorio con 450 mL de mosto sintético. Se inocularon 2×10^6 células mL⁻¹ de la levadura comercial QA23, a partir de un cultivo crecido toda la noche (o/n) en YEPD.

Durante las fermentaciones se siguieron dos parámetros: la cinética fermentativa (entendida como la disminución de la densidad del medio a lo largo del tiempo) y la población mediante el seguimiento en placa (ufc mL⁻¹).

Se consideraron finalizadas las fermentaciones cuando la cantidad de azúcares residuales presentes en el vino fue menor a 2 g L^{-1} .

Como era de esperar, la duración de las fermentaciones fue diferente en ambas temperaturas. Mientras que la fermentación a 25 °C duró 120 horas, se necesitaron un total de 288 h a 13 °C (Figura 2.1).

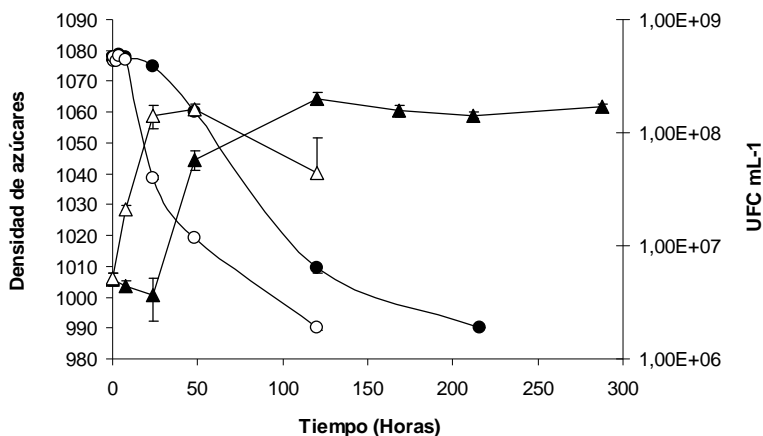


Figura 2.1. Cinética fermentativa a 13 °C (círculos rellenos) y a 25 °C (círculos vacíos) medida como reducción de la densidad. Recuento de poblaciones a 13 °C (triángulos rellenos) y a 25 °C (triángulos vacíos) determinado mediante crecimiento en placas de YEPD.

En cuanto al crecimiento, la inoculación a 13 °C produce claramente una disminución de la población, que en este caso llega hasta cerca de la mitad (en torno al 40 %), durante las primeras horas. Esto tiene como consecuencia también una fase de latencia más larga y un periodo mayor para alcanzar la población máxima respecto a la fermentación a 25 °C (alrededor de las 100 horas). A 25 °C no se produce esta mortalidad inicial y alcanza su población máxima a las 24-48 horas. En ambos casos este máximo de población llegó a ser de $1-2 \times 10^8 \text{ ufc mL}^{-1}$. En la fermentación a 13 °C mantuvieron la vitalidad hasta el final de la fermentación,

mientras que a 25 °C la viabilidad cayó hasta 4×10^7 células mL⁻¹ en las últimas fases de la fermentación.

2. ANÁLISIS TRANSCRIPCIONAL MEDIANTE RT-PCR.

Se recogieron muestras celulares a lo largo de la fermentación, para tener representadas las diferentes fases de la misma (latencia, exponencial y estacionaria). Los puntos escogidos para el análisis fueron a 0, 0,5 (30 min.), 1, 2, 4, 8, 24, 48, 120, 168, 216 y 288 horas (las tres últimas muestras solo se tomaron a 13 °C puesto que a 25 °C ya había terminado la fermentación). De estas muestras, se realizó la extracción y purificación del ARNm total, y se pasó a ADNc (ver Material y Métodos).

Las diferentes cantidades de ARN mensajero inicial se determinaron mediante PCR cuantitativa a tiempo real (RT-PCR), para todos los genes seleccionados, en todos los puntos y a las dos temperaturas de fermentación. En el análisis se usaron los oligonucleótidos específicos diseñados para cada uno de los genes (Material y Métodos), y se comprobó que no daban señales inespecíficas. Se usó el gen de la actina (*ACT1*), como gen de expresión constitutiva (“*housekeeping gene*”) o control interno de la reacción.

Todos los datos se normalizaron respecto el tiempo 0 (T0) que se corresponde con el momento de la inoculación en el mosto, con las células procedentes de un cultivo crecido en YEPD durante 16 horas (o/n).

Tras el análisis de la actividad transcripcional se observó que no todos los genes parecen estar regulados específicamente por frío, a pesar de que están descritos como importantes a bajas temperaturas, sino que la regulación de la mayoría viene principalmente determinada por la fase de crecimiento en la que se encuentran. Así agrupamos los genes en cuatro categorías según el perfil de transcripción observado, y son las siguientes:

- Genes con una actividad transcripcional similar a lo largo de toda la fermentación.
- Genes con mayor actividad transcripcional durante la fase de latencia.
- Genes con mayor actividad transcripcional durante la fase estacionaria.
- Genes con mayor actividad transcripcional durante la fermentación a baja temperatura.

Hemos de recordar, que la actividad transcripcional está siempre referida a la actividad existente en las células previa a su inoculación. De manera que valores por encima de 1 son las veces que está más activo un determinado gen con respecto a ese punto.

2.1. Genes con una actividad transcripcional similar a lo largo de toda la fermentación (*LTE1* y *TCPI*).

Los genes *LTE1* y *TCPI* (Figura 2.2) presentan una fuerte inducción en las primeras horas de la fermentación alcohólica, coincidiendo con el inicio del crecimiento celular. Esta inducción es más rápida en la fermentación a 25 °C (máxima expresión a la media y una hora de la inoculación), puesto que el inicio del crecimiento es más rápido. El retraso en la inducción en la fermentación a baja temperatura ocurre para un buen número de genes. La mortalidad producida tras la inoculación y la fase de latencia más larga explicaría esta inducción retrasada en los genes cuya actividad viene marcada por el crecimiento celular, como parece ser el caso de estos dos genes. Bajo este criterio, consideraríamos que un gen está regulado por la baja temperatura cuando mostrase una mayor actividad en la condición de fermentación a 13 °C. Esto, en cierta forma, ocurría para estos genes durante la fase estacionaria y fases finales de la fermentación, donde muestra una mayor inducción en la fermentación a baja temperatura. Por tanto, aunque es evidente la inducción como consecuencia del inicio del crecimiento, es posible que el estrés producido como consecuencia de la baja temperatura también actúe como inductor de la actividad de estos genes.

También, esta mayor actividad en fases de no proliferación celular puede estar relacionada con la mayor viabilidad del cultivo a 13 °C y porque la entrada en estacionaria es más tardía. En el caso de *LTE1* (cuyas siglas en inglés significan “Low Temperature Essential) es fácil entender que si se trata de una proteína de ciclo celular, su actividad se induzca con el crecimiento, pero además, es posible que su función sea más importante a baja temperatura. Esta función se ha relacionado con la salida de la fase M (mitosis) del ciclo celular a baja temperatura. Por tanto, se podría considerar que es activada por el crecimiento celular pero la baja temperatura también regula su inducción.

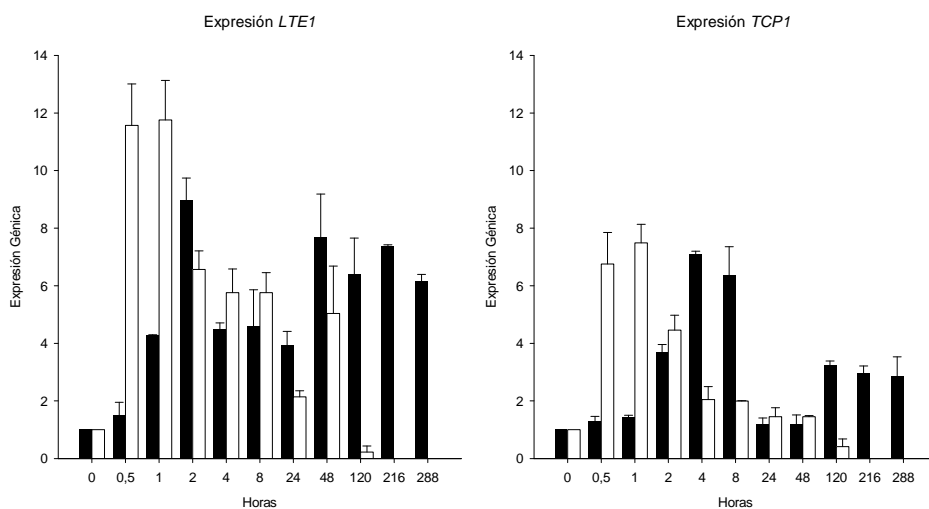


Figura 2.2. Expresión de *LTE1* y *TCPI*, las barras negras se corresponden a la expresión a 13 °C y las blancas a 25 °C. Los datos de expresión están normalizados con la expresión que se tenía en el momento de la inoculación (T0), y a este valor le hemos dado el valor de 1.

2.2. Genes con mayor actividad transcripcional durante la fase de latencia e inicio de la fase exponencial (*LOT2* y *NSRI*).

En realidad estos genes presentan un patrón transcripcional muy parecido a los anteriores genes en el sentido de que el máximo de actividad transcripcional lo presentan en las primeras horas de fermentación, con un retraso en esta inducción

para la fermentación a baja temperatura (Figura 2.3). Sin embargo, a diferencia de los anteriores que presentaban una actividad transcripcional importante durante todo el proceso, ambos genes son reprimidos tras la fase exponencial de crecimiento y entrada en fase estacionaria. Otra diferencia respecto a los anteriores es el grado de inducción de estos genes que es muy elevado. En el caso de *LOT2* el máximo de expresión a 25 °C sucede transcurrida una hora tras la inoculación, expresándose 35 veces respecto el valor T0. Mientras que el valor máximo a 13 °C se da tras 4 horas y es de 20 veces el valor inicial. En cuanto a la expresión de *NSRI*, el máximo de expresión a 25 °C se da a los 30 min. tras la inoculación, llegando a un aumento de 180 veces respecto al valor inicial. En el caso de la fermentación a 13 °C, el máximo es a las 2 horas, aumentando 200 veces su expresión inicial. Tras ese pico la expresión disminuye, en el caso de 25 °C rápidamente hasta unas 40 veces el valor inicial y se mantiene hasta las 48 horas. En el caso de la expresión a 13 °C este descenso es más progresivo llegando a unas 25 veces el valor inicial hasta las 120 horas. A pesar de que *NSRI* presenta una actividad transcripcional muy ligada al inicio del crecimiento celular, es cierto que el máximo de inducción se produce a baja temperatura y en muchos puntos presenta una mayor actividad transcripcional a 13 °C. Por tanto, es posible que este gen sea más necesario para salir de la fase de latencia a baja temperatura que a una temperatura óptima. Estos valores de inducción tan elevados convierten a este gen en un candidato ideal para utilizar su promotor en la sobreexpresión de determinados genes a baja temperatura.

2.3. Genes con mayor actividad transcripcional durante la fase estacionaria (*HSP12*, *HSP26*, *TIP1* y *TIR2*).

Un patrón completamente diferente es el que observamos para este grupo de genes. *HSP12*, *HSP26*, *TIP1* y *TIR2* presentan el máximo de su expresión durante la fase estacionaria a ambas temperaturas de fermentación (Figura 2.4). El patrón se podría describir como una represión de estos genes (o falta de inducción) tras la inoculación y una inducción al entrar en fase estacionaria. Obviamente esta

inducción se produce mucho antes en la fermentación a 25 °C, puesto que también entra mucho antes en la fase estacionaria.

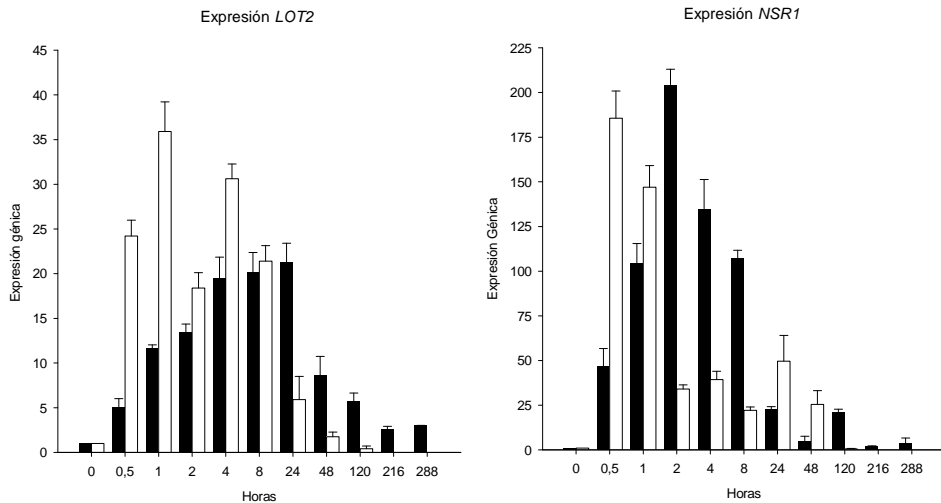


Figura 2.3. Expresión de *LOT2* y *NSR1*, las barras negras se corresponden a la expresión a 13 °C y las blancas a 25 °C. Los datos de expresión están normalizados con la expresión que se tenía en el momento de la inoculación (T0), y a este valor le hemos dado el valor de 1.

En el caso de los genes *HSP12* y *HSP26* tanto a 13 como a 25 °C, se observa una disminución paulatina de la expresión hasta las 24-48 horas donde vuelve a aumentar de nuevo hasta el final de fermentación alcanzando el valor inicial. Coincidiendo con el momento en el que las levaduras están en fase estacionaria, ya que las células T0 provienen de un cultivo en fase estacionaria.

En *TIP1* se observa a las 24 h a 25 °C un pico de expresión que llega a 3,5 veces para luego disminuir hasta los valores iniciales, al igual que a 13 °C, pero un poco más retrasado.

El gen *TIR2* mantiene su nivel de expresión inicial hasta las 24 h en la fermentación de 25 °C, donde llega a una expresión de 10 veces más, y a 13 °C, el máximo de expresión es de 24 veces y se da a las 120 horas, para luego retornar al valor inicial.

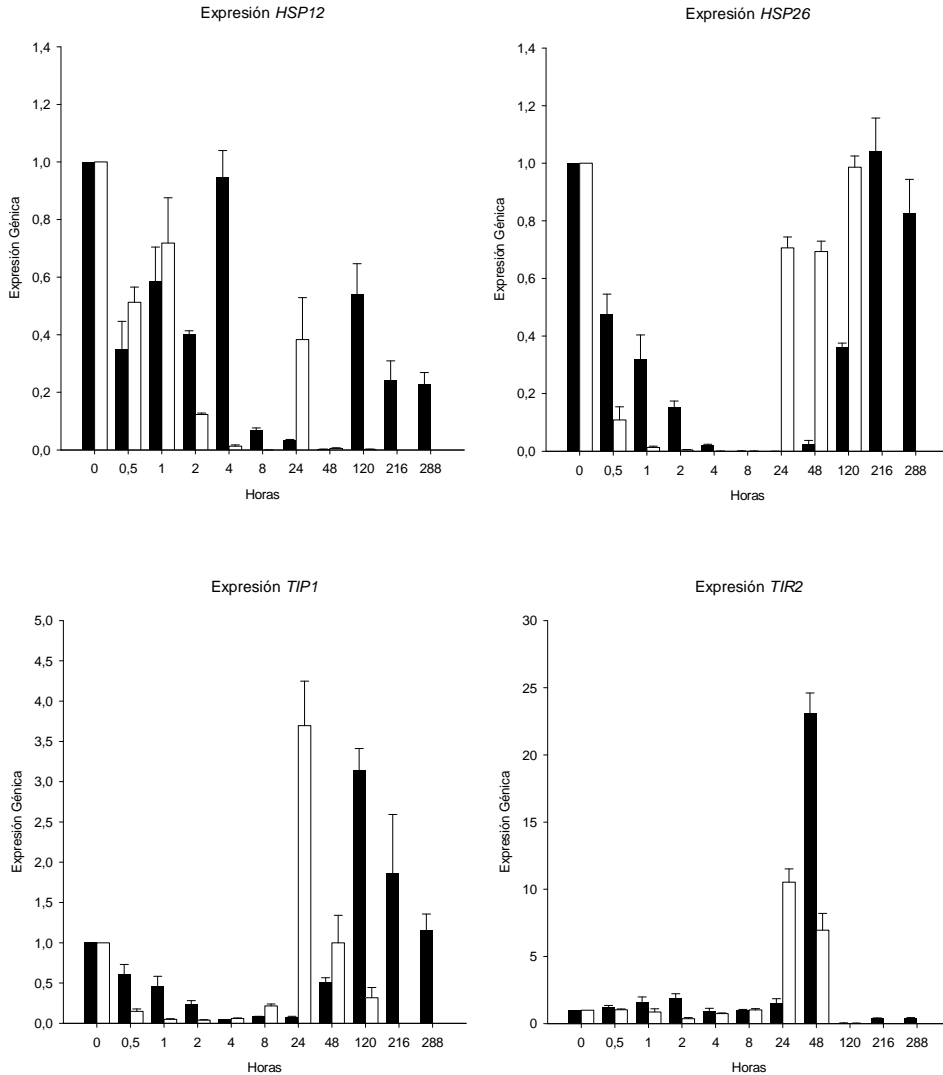


Figura 2.4. Expresión *HSP12*, *HSP26*, *TIP1* y *TIR2*, las barras negras se corresponden a la expresión a 13 °C y las blancas a 25 °C. Los datos de expresión están normalizados con la expresión que se tenía en el momento de la inoculación (T0), y a este valor le hemos dado el valor de 1.

Lo que nos indica que la expresión de este gen está marcado por el momento de entrada en fase estacionaria, para inmediatamente después volver a niveles de

actividad mucho menores. De nuevo, y como se menciona anteriormente, a pesar de que el patrón de expresión génica puede ser fácilmente relacionado con las fases de crecimiento celular, encontramos que para la mayoría de estos genes el máximo de inducción se produce en la fermentación a baja temperatura. De manera que aunque estén regulados por el crecimiento, se podría pensar que la baja temperatura también se suma a esta regulación.

2.4. Genes con mayor actividad transcripcional en la fermentación a baja temperatura (*CSF1* Y *HSP104*).

De todos los genes analizados, solo *CSF1* y *HSP104* no presentan un patrón transcripcional que encaje con una activación en las fases de crecimiento exponencial y/o estacionaria. Además, en la mayoría de puntos analizados presentan una mayor actividad a baja que a temperatura óptima. Por tanto, se podrían adscribir a la categoría de genes regulados por la temperatura (Figura 2.5).

En *CSF1* se observa una inhibición de la expresión en ambas fermentaciones respecto el valor a T₀. A 25 °C la expresión se recupera al nivel inicial durante las 24-48 horas, que se corresponde con fin de la fase exponencial e inicio de la fase estacionaria, para luego disminuir de nuevo a final de fermentación. En el caso de la fermentación a 13 °C también hay una disminución de la expresión durante las primeras horas hasta el punto de 120 horas donde se produce el máximo de expresión de 4,5 veces respecto T₀, que posteriormente disminuye hasta los valores iniciales. En las dos fermentaciones se puede considerar que el máximo de expresión se produce con la entrada en fase estacionaria, pero esta expresión siempre es superior a 13 °C.

Con el gen *HSP104* se produce un aumento de expresión durante las primeras horas de la fermentación (1-2 horas), para luego disminuir su expresión durante el resto de las fermentaciones. En este caso, al contrario que los demás genes, es la expresión en la fermentación de 13 °C la que se adelanta en el tiempo, y además llega a valores más altos, 10 veces más que el punto T₀, mientras que la expresión a 25 °C es de tan

solo 5 veces Este gen ha sido descrito como inducido por choque térmico a altas temperaturas (Gasch *et al.*, 2000), pero es evidente de estos resultados que también es activado por el choque térmico a bajas temperaturas.

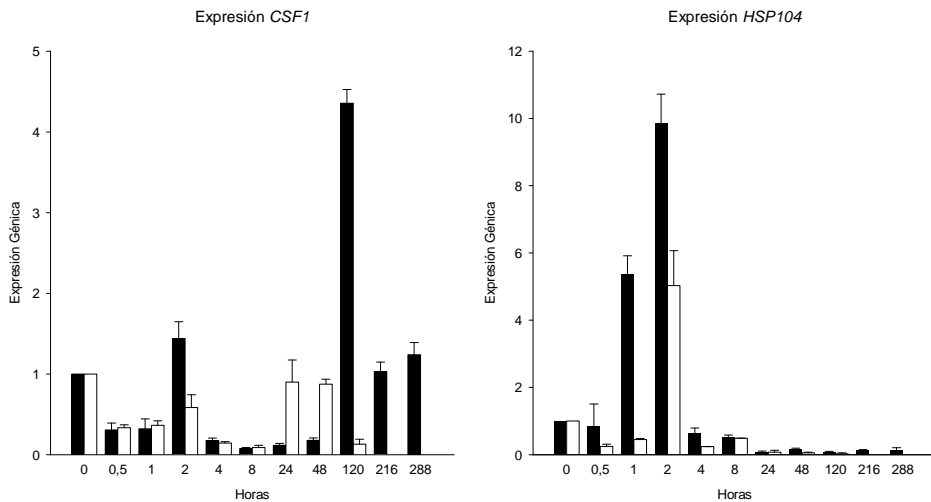


Figura 2.5. Expresión de *CSF1* y *HSP104*, las barras negras se corresponden a la expresión a 13 °C y las blancas a 25 °C. Los datos de expresión están normalizados con la expresión que se tenía en el momento de la inoculación (T0), y a este valor le hemos dado el valor de 1.

3. CARACTERIZACIÓN DE LA EXPRESIÓN DEL GEN *PGKI* DURANTE LA FERMENTACIÓN.

Un promotor muy utilizado en la sobreexpresión de determinadas proteínas es el perteneciente al gen *PGKI*, que codifica para el gen de la glucólisis 3-fosfoglicerato quinasa. Este gen está descrito que muestra una actividad transcripcional fuerte a lo largo del crecimiento en presencia de una fuente de carbono fermentable, como es la glucosa (Piper *et al.*, 1986; Moore *et al.*, 1991; Coulon *et al.*, 2006). Lo que se pretendía era determinar si este era un buen promotor durante la fermentación en

general y a bajas temperaturas en particular, para posibles estudios de cambios de promotor durante crecimiento a baja temperatura.

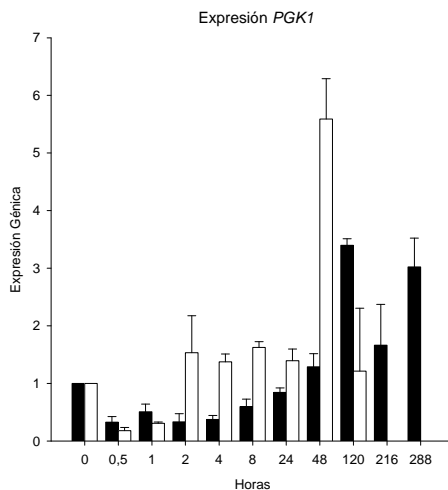


Figura 2.6. Expresión de *PGK1*, las barras negras se corresponden a la expresión a 13 °C y las blancas a 25 °C. Los datos de expresión están normalizados con la expresión que se tenía en el momento de la inoculación (T0), y a este valor le hemos dado el valor de 1.

Se analizó su actividad transcripcional en los mismos puntos y condiciones que los genes de importancia al estrés por frío. Como se puede observar en la Figura 2.6, la expresión de *PGK1* inicialmente se inhibe, para luego aumentar a lo largo de la fermentación. En ambas temperaturas la recuperación de la expresión inicial coincide con el fin de la fase de latencia y toda la fase exponencial. En el caso de 25 °C ocurre a partir de las 2 h hasta las 48 h y a 13 °C a partir de las 24-48 h. El máximo de expresión se alcanza a 25 °C que es de 5,5 veces a las 48 h, cuando ya está en fase estacionaria. En el caso de la fermentación a 13 °C el máximo de expresión alcanzado es de 3,4 veces a las 120 h y se mantiene alta hasta el final de la fermentación coincidiendo con la mayor viabilidad de las células a 13 °C.

4. DISCUSIÓN.

En este trabajo se realizó un estudio transcriptómico de 10 genes, previamente descritos como regulados o importantes en la adaptación al frío, durante la fermentación alcohólica a dos temperaturas. El principal objetivo de este estudio era determinar los momentos de la fermentación en que presentaban una mayor actividad y, por tanto, las fases del proceso en que la proteína codificada por estos genes es más necesaria. Pero a la vez, también queríamos comprobar si es el estrés por frío la principal causa de su regulación.

Nuestros resultados sugieren que la regulación de la mayor parte de estos genes no es específica por la baja temperatura sino por la fase de crecimiento celular. Las diferencias de expresión entre las dos temperaturas vienen más marcadas por el retraso en el crecimiento de la condición a baja temperatura que por la temperatura en si misma. Por ello se dividieron los genes según su patrón de expresión.

En primer lugar, encontramos el caso de *LTE1* y *TCPI1*. Ambos están descritos como genes importantes durante el ciclo celular, principalmente en la gemación. *Lte1p* forma parte de la red de salida de la mitosis (MEN) en las levaduras en gemación, y se ha descrito como esencial para que ocurra este paso a bajas temperaturas (Molk *et al.*, 2004). Sin embargo, en condiciones normales, aunque no es esencial para la mitosis, *LTE1* se expresa a lo largo de todo el ciclo celular. Su localización en la gema, parece estar regulada por sus interacciones con Ras2p que es una proteína de la familia RAS, implicada en la respuesta general a estrés, concretamente en la vía de cAMP-PKA (Yoshida *et al.*, 2003). Beltran y cols. (2006) determinaron en su estudio de chips que *LTE1* estaba más expresado a 13 que a 25 °C durante la mitad y final de la fermentación. En este estudio también detectamos una mayor actividad génica a 13 °C respecto a 25 °C en las últimas fases de la fermentación. Sin embargo, la inducción fuerte de este gen se produce, para ambas temperaturas, al inicio de la fermentación alcohólica, demostrándose la importancia de este gen para superar la fase de latencia o adaptación y comenzar el crecimiento celular. La mayor

actividad de este gen en la fermentación a 13 °C podría estar relacionada con la alta viabilidad celular observada para las células que crecen a baja temperatura.

TCPI es un polipéptido que forma la subunidad alfa de la chaperona citosólica *CCTI*, y la función de esta chaperona es mediar en el correcto plegamiento de la actina y la tubulina del citoesqueleto (Yaffe *et al.*, 1992; Ursic *et al.*, 1994), de forma que estas proteínas sean funcionales. Además, es esencial para la viabilidad celular y para el crecimiento en frío (Ursic y Culbertson, 1991; Somer *et al.*, 2002). También se ha sugerido a *CCTI* un papel en el ciclo celular, concretamente en la fase G1/S (Yokota *et al.*, 1999; Camasses *et al.*, 2003; Grantham *et al.*, 2006; Stirling *et al.*, 2007). Nuestros resultados si que muestran este aumento durante las primeras horas, pero se da en ambas fermentaciones, no solo en la de frío, y además la expresión continúa a lo largo de la fermentación.

Una de las respuestas iniciales y más importantes a la baja temperatura es un aumento del metabolismo ribosomal, para compensar la disminución de la transcripción y traducción debido a la disminución de la temperatura (Sahara *et al.*, 2002; Beltran *et al.*, 2006). Esta respuesta es la que se ha visto en los genes *LOT2* que codifica la proteína L2, componente de la sub-unidad grande del ribosoma 60 S y *NSRI*, que codifica una proteína de importancia vital en el procesamiento del ARNr. Ambos genes han sido descritos como inducibles por frío (Zhang *et al.*, 2001; Kondo e Inouye, 1992). La respuesta de *LOT2* por la baja temperatura ha sido descrita como rápida tras la exposición al estrés por frío e independiente de la fase de crecimiento en la que esté la levadura (Zhang *et al.*, 2001). Sin embargo, en este estudio, nuestros resultados no confirman una respuesta directamente relacionada con el frío, sino más bien dependiente de la fase de crecimiento, ya que a ambas temperaturas presenta una respuesta inicial en la fase de latencia para luego disminuir. Es cierto que en las fases finales de la fermentación se observa una mayor actividad génica de *LOT2* en la fermentación en frío. Sin embargo, esta respuesta podría estar relacionada con la mayor viabilidad del cultivo a 13 °C que necesita mantener una mayor tasa traduccional y, por tanto, un mayor número de ribosomas activos.

En cuanto al gen *NSR1*, se ha descrito un aumento de la expresión durante las fases tempranas de crecimiento tras la exposición a la baja temperatura, seguida de una represión (Sahara *et al.*, 2002). De nuevo, nuestros datos muestran un aumento muy importante de la expresión tras la inoculación en el mosto sintético, pero a ambas temperaturas. Este gen también parece estar mayoritariamente inducido por el inicio del crecimiento o la fase de adaptación de las levaduras a un nuevo medio. Previamente ya se ha demostrado que la mutación de *NSR1*, aunque no es un gen esencial, provoca un crecimiento muy lento en condiciones óptimas, sobre todo en la fase de latencia (Kondo e Inouye, 1992), lo que puede explicar porque su expresión es importante a ambas temperaturas. Aunque de nuevo no es descartable una absoluta independencia de la temperatura en su regulación génica. Como en el caso de *LOT2*, hay muchas fases de la fermentación en que la actividad transcripcional es muy superior en la fermentación a baja temperatura. Estas diferencias pueden ser consecuencia del desfase de crecimiento entre los dos cultivos o como resultado de una mayor inducción de la actividad génica debido al estrés generado por la baja temperatura. Para poder diferenciar entre ambos efectos sería recomendable realizar cultivos en continuo a las dos temperaturas y con la misma velocidad de crecimiento. Este tipo de cultivos permite un control perfecto de la tasa de crecimiento y aislarla de otras condiciones del cultivo (Tai *et al.*, 2007).

HSP12 y *HSP26* forman parte de la familia de HSPs (“Heat Shock Protein”). Ambos genes son chaperonas que interactúan y estabilizan las proteínas para prevenir su agregación y precipitación provocada tras la exposición a diferentes tipos de estrés (alta osmolaridad, estrés oxidativo, choque térmico, presencia de etanol, limitación de nutrientes, fuentes de carbono no fermentables o agentes que afectan la integridad de la pared celular). Hsp12p se ha demostrado que está presente en la pared celular (Sales *et al.*, 2000) y su función es evitar la pérdida de plasticidad en la pared tras la exposición a diferentes tipos de estrés (Motshwene *et al.*, 2004). Karreman y cols. (2007a) han postulado que Hsp12p es la encargada de controlar los cambios de flexibilidad de la pared celular. *HSP12* está inducido por muchos tipos de estrés, incluido la entrada en fase estacionaria, que es justo lo que se detecta en este

estudio. En realidad la máxima actividad génica la detectamos en el tiempo cero. Este punto se corresponde con un estado en fase estacionaria de las células tras haber crecido en YEPD durante una noche. Una vez estas células son inoculadas en el mosto, se produce una represión, que es máxima con el inicio del crecimiento celular. La recuperación de la actividad, especialmente a baja temperatura, se produce en las últimas fases de la fermentación. Solo hay un punto que no responde a este patrón y es una recuperación de la actividad a las 4 horas en la fermentación a 13 °C. Curiosamente, en un estudio sobre la evolución del proteoma tras inocular esta misma levadura vínica en un mosto, con un diseño experimental similar al de este trabajo, Salvadó y cols. (2008) observan una mayor concentración de la proteína Hsp12p justo a las cuatro horas de la inoculación en la fermentación a 13 °C respecto a la de 25 °C. Por tanto, esta inducción sí que puede ser una respuesta directamente relacionada con la temperatura y no con la entrada en fase estacionaria. En el caso de *HSP26* todavía es más evidente el patrón descrito de represión tras la inoculación y activación a la entrada en fase estacionaria. Esta activación coincidente con la parada del crecimiento celular ya ha sido descrita previamente (Susek y Lindquist, 1989; Bentley *et al.*, 1992).

Los genes *TIP1* y *TIR2* son manoproteínas que forman parte de la pared celular. Su función es el mantenimiento de la integridad de la pared bajo condiciones de estrés. Kondo e Inouye (1991) describieron una inducción de *TIP1* de 6 a 8 veces tras cambiar la temperatura de crecimiento de 30 a 10 °C. Sorprendentemente este gen también mostraba una inducción tras un choque por calor. La inducción de *TIR2* ha sido igualmente descrita para el choque tanto por calor como por frío (Kowalski *et al.*, 1995). Nuestro estudio de dinámica de activación génica de *TIP1* a lo largo de la fermentación alcohólica presenta, al igual que *HSP12* y *HSP26*, una disminución de la actividad génica durante el crecimiento celular y una activación durante la fase de no proliferación o estacionaria. *TIR2*, aunque presenta un patrón que también podría encuadrarse en los de inducción en fase estacionaria, presenta un perfil transcripcional un poco diferente. En primer lugar, presenta la misma actividad durante la fase de crecimiento que previo a la inoculación. Es decir, no detectamos

la represión típica de los genes anteriores. Además muestra una inducción muy puntual, coincidiendo con la entrada en fase estacionaria, y vuelve a reprimirse en el resto de puntos analizados. Esta inducción puntual es muy superior a baja temperatura que a temperatura óptima. Por tanto, de nuevo podríamos hablar de una coregulación entre fase de crecimiento y temperatura.

Esta regulación de la actividad génica, más directamente relacionada con la temperatura e independiente de la fase de crecimiento, solo parece observarse en el caso de los genes *CSF1* y *HSP104*. Además cada uno de estos genes se ha visto inducido en fases diferentes, *CSF1* en la fase estacionaria y *HSP104* durante la fase de latencia e inicio del crecimiento.

CSF1 es una proteína con 4 dominios transmembrana y una masa molecular de 338 kDa. Se ha detectado en mitocondrias purificadas, por lo que se le supone un origen mitocondrial (Reinders *et al.*, 2006), y se ha descrito como relacionada con el transporte de nutrientes a bajas temperaturas y esencial para crecimiento celular a bajas temperaturas (Tokai *et al.*, 2000; Hollatz and Stambuk, 2003). Sin embargo, la función concreta no se sabe con exactitud todavía. En este estudio se observa una respuesta a las bajas temperaturas, pero tardía, ya que ocurre en las fases finales de la fermentación, como la estacionaria, quizá debido a que en esta fase los nutrientes del medio han disminuido y están en situación limitante, lo que provoca su activación. En cambio durante las primeras horas del choque térmico la expresión disminuye respecto T₀, a ambas temperaturas, indicando una represión del gen *CSF1* quizá causada por el cambio de medio a uno más complejo, e inicio de la fase de latencia. En los últimos puntos analizados de la fermentación a 13 °C también se observa una disminución de la expresión, probablemente porque a pesar de que las células todavía son viables, ya no están metabólicamente activas, y usan sus reservas, y no necesita captar nutrientes.

HSP104 es igualmente una chaperona perteneciente a la familia de las HSPs, que se activa durante procesos de estrés en las levaduras, como por calor, etanol, oxidativo y radiación (Sanchez *et al.*, 1990). Su función es disociar los agregados de proteínas acumulados en el citosol formados durante estos periodos de estrés (Parsell *et al.*,

1994b; Lindquist y Kim, 1996). La concentración de Hsp104p es baja en condiciones normales, pero aumenta al exponer a la célula a un estrés (Parsell *et al.*, 1994b; Lindquist y Kim, 1996), y la proteína sale del núcleo al citoplasma (Tkach y Glover, 2008). Sanchez y cols. (1990) habían determinado un aumento de la expresión en la fase estacionaria y en las esporas, sin embargo en este estudio únicamente vemos una activación durante las primeras fases del choque térmico por frío. En otros estudios realizados en crecimiento a baja temperatura no se veía una sobreexpresión (Homma *et al.*, 2003). No hay que olvidar, que el inóculo usado proviene de un crecimiento en fase estacionaria y a 25 °C, y se le somete a un cambio brusco de temperatura, que afecta al metabolismo de las levaduras, que tiene que adaptarse con rapidez a las nuevas condiciones estresantes, tanto de temperatura, como osmótica. Así que *HSP104* parece estar relacionado con un mecanismo rápido de respuesta ante la aparición de un estrés brusco.

Así, tras el análisis transcriptómico solo hemos encontrado dos genes que tienen una respuesta mayoritariamente inducida por el frío (*HSP104* y *CSF1*). El resto, en las condiciones analizadas, parecen depender más de la fase de crecimiento para su regulación, aunque también se intuye una posible inducción como consecuencia de la temperatura, que provocaría niveles de cambios transcripcional más bruscos en la fermentación a baja temperatura. Además de conocer la posible inducción de estos genes por la baja temperatura, los resultados obtenidos nos permiten conocer en que fase de la fermentación la actividad de este gen resulta crucial para el crecimiento y la actividad fermentativa. Otro aspecto interesante de los resultados obtenidos es que tenemos determinados toda una serie de genes con una importante tasa de actividad transcripcional a baja temperatura. Esto puede ser interesante desde el punto de vista biotecnológico para la sobreexpresión de determinadas proteínas a baja temperatura mediante la utilización de algunos de los promotores de este gen. Además podemos determinar el momento óptimo de la sobreexpresión mediante el análisis de estos perfiles transcripcionales. Uno de los promotores más utilizado en la sobreexpresión de proteínas es el perteneciente al gen *PGK1*, debido a su fuerte actividad transcripcional en presencia de una fuente de carbono fermentable (Piper *et al.*,

1986; Moore *et al.*, 1991). Cuando se determinó su actividad durante fermentación y ambas temperaturas, la expresión alcanzada no era muy elevada además de que se concentraba durante la fase logarítmica de las levaduras. En el caso de las fermentaciones en frío uno de los momentos más críticos es la fase de latencia, ya que las células se están aclimatando al estrés y sufren una serie de cambios metabólicos para poder adaptarse. Así sería interesante tener un promotor fuerte y con una expresión elevada para poder analizar los efectos de diferentes genes en esa fase. En este caso el promotor *PGK1* no sería el más adecuado. Sin embargo en este estudio hemos encontrado genes que se sobreexpresan en las diferentes fases de crecimiento, por lo que sus promotores serían más adecuados, pudiendo elegir cuando poder expresar el gen de interés. Casos a destacar para usar sus promotores son *LTE1*, en el caso que quisiésemos que el gen se expresase durante toda la fermentación. *LOT2* y *NSR1* presentan su máxima expresión durante la fase de latencia y además en el caso de *NSR1* su expresión es muy fuerte.

Nuestro siguiente objetivo, para corroborar los datos obtenidos en este estudio transcripcional, fue determinar como afecta la dosis génica de cada uno de estos genes durante la fermentación y el papel que pueden tener en la fermentación en frío. Para ello, en los siguientes capítulos describiremos la construcción de cepas mutantes y sobreexpresantes en estos genes seleccionados y el efecto de la dosis génica sobre el crecimiento y la actividad fermentativa.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

V. 3.

Análisis de la dosis transcripcional mediante mutación y sobreexpresión de genes relacionados con el estrés a bajas temperaturas (*HSP12*, *HSP26*, *NSR1*, *TCP1*, *TIP1* y *TIR2*).

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

Como se ha demostrado en el capítulo anterior, no todos los genes descritos como esenciales a bajas temperaturas tienen una regulación específica por este estrés, si no que dependen en muchas ocasiones del estado fisiológico de las levaduras, entendido como la fase de crecimiento en la que se encuentran. Sin embargo, esto no impide a la levadura actuar de forma eficaz ante este estrés, ya que, como se ha determinado en muchos estudios, la respuesta desencadenada ante un estrés puede preparar a las células para responder más eficazmente ante otro muy diferente. Por ello hay genes de respuesta general a estrés, cuya expresión puede producirse por diferentes estreses.

En este capítulo, una vez caracterizado el tipo de regulación que tienen los genes seleccionados, vamos a proceder a determinar cual es el efecto de su dosis génica a lo largo de una fermentación a bajas temperaturas (13 °C) y otra control a temperatura óptima (25 °C). Para ello vamos a construir sobre el fondo genético de la levadura haploide vínica, descrita su construcción en el primer capítulo de esta tesis, cepas mutantes y sobreexpresantes de los mismos genes que se ha estudiado su regulación transcripcional en el capítulo 2. En este capítulo 3 se describen los resultados obtenidos con los genes *HSP12*, *HSP26*, *NSR1*, *TCP1*, *TIP1* y *TIR2*, y en el siguiente capítulo los genes *CSF1*, *HSP104*, *LOT2* y *LTE1*. El motivo de esta división fue puramente metodológico. Inicialmente se seleccionó el plásmido episomal multicopia YEplac181 para realizar la sobreexpresión de los genes, debido a que los plásmidos YEpl son comúnmente usados para sobreexpresión de genes en las levaduras. Estos plásmidos presentan el origen de replicación del plásmido natural de *Saccharomyces* 2 μ m, que permite autoreplicarse, y presentar un alto número de copias, entre 50 y 100 por célula. Estos plásmido suelen llevar como marcador selectivo o bien el gen *LEU2* o el gen *URA3*, que permite la complementación de cepas auxótrofas en dichos genes. En este caso, el plásmido YEplac181 porta el gen *LEU2*, que permitiría la complementación en la cepa vínica haploide *hoQA23leu2*, seleccionando a los transformantes en un medio mínimo sin leucina. La *hoQA23leu2* se construyó para poder sobreexpresar los genes con el mismo fondo genético que los mutantes mediando la complementación por leucina.

El gen *LEU2* se eliminó con la misma técnica usada en la mutación del gen *HO* (Gietz *et al.*, 2002), con el paso previo de hacer saltar la resistencia a *kan^R* para poder usar este mismo marcador de selección al eliminar el fragmento.

Sin embargo, durante la construcción de los plásmidos para la sobreexpresión de todos estos genes, tuvimos problemas con los genes *CSF1*, *HSP104*, *LOT2* y *LTE1*, para los cuales no se obtenían correctamente las construcciones. Esto podría deberse al tamaño del inserto o a la baja eficiencia en la digestión y ligación. Para solucionar este problema técnico, decidimos utilizar un plásmido alternativo, el pGREG505 (Jansen *et al.*, 2005). En este caso se sigue una estrategia diferente a la construcción del plásmido episomal YEplac181. La levadura se transforma con el plásmido linealizado y con un producto de PCR del gen de interés, que presenta en sus extremos unas secuencias de fácil recombinación homóloga con los extremos del plásmido pGREG505. Una vez ambos fragmentos se encuentran en el interior de la célula, se produce una recombinación homóloga “*in vivo*”. Así se pueden clonar los genes sin la necesidad del paso de restricción y ligación que puede provocar una baja eficiencia en la obtención de los plásmidos de interés.

En este capítulo, nos centramos en el estudio de la dosis génica de los genes *HSP12*, *HSP26*, *NSR1*, *TCPI*, *TIP1* y *TIR2*. Estos genes están implicados en diferentes funciones: *HSP12*, *TIP1* y *TIR2* son genes que codifican proteínas de la pared celular y están envueltos en el mantenimiento de la integridad de la pared durante condiciones de choque térmico tanto por calor como por frío. *HSP26* y *TCPI* tienen una función de chaperona y actúan previniendo la agregación de las proteínas debido a choque térmico. Tcplp es la responsable del correcto plegamiento de la tubulina y la actina y los mutantes $\Delta tcpl$ no son viables. Nsr1p es una proteína ribosomal relacionada con el procesamiento y biogénesis de los ARN ribosomales.

1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES SOBRE LA CEPA VÍNICA.

Se procedió a la mutación de los genes sobre la cepa haploide de la levadura vínica a excepción del gen *TCPI*, ya que su eliminación provoca la inviabilidad de la célula.

Las mutaciones se realizaron sobre la levadura haploide a la que se había eliminado previamente el marcador de selección *kan^R*.

Se usó para la obtención de los mutantes la técnica descrita por Gietz y cols. (2002), usada en este trabajo previamente para la construcción de la levadura haploide (*hoQA23*). Para la amplificación del fragmento de delección a partir del plásmido pUG6 se usaron los oligonucleótidos diseñados específicamente para la mutación de los genes (HSP12mF y R, HSP26mF y R, NSR1mF y R, TIP1mF y R y TIR2mF y R) (Ver tabla M.3 en Material y Métodos). El fragmento de delección fue utilizado para transformar la levadura vínica. Las colonias recuperadas con la resistencia a la *kan^R* se comprobaron por PCR que habían perdido el gen, mediante el uso de los oligonucleótidos de comprobación (Figura 3.1).

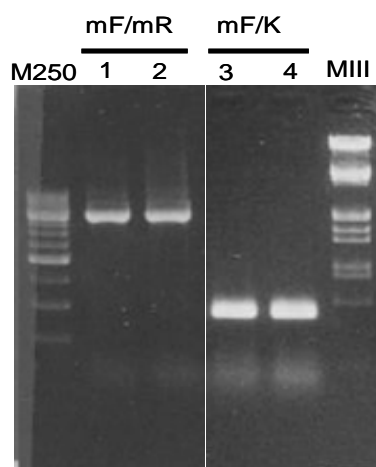


Figura 3.1. Comprobación de la mutación del gen *TIR2* en la cepa vínica. Se usaron dos juegos de oligonucleótidos: mF y mR son ambos externos al fragmento insertado y el tamaño esperado es de 1954 pb. Con el otro par de oligonucleótidos se repite mF pero como reverso tenemos a K que se une en el interior de la resistencia a la geneticina (*kan^R*), el tamaño esperado es 446 pb. Los marcadores de peso molecular usados son Marker 250 (0,25 -3,09 kb) y el Marker III (125 - 21.220 pb) de Roche (Roche Diagnostics, Alemania).

Una vez obtenidos los mutantes de estos genes de estrés se procedió a estudiar su comportamiento en crecimiento y fermentación.

2. ANÁLISIS DE MUTANTES DE LABORATORIO Y DE LA CEPA VÍNICA.

Se analizó el crecimiento, la vitalidad y la capacidad fermentativa de los mutantes construidos sobre la cepa vínica haploide y se comparó con los mutantes construidos sobre la cepa de laboratorio BY4742 (Colección Euroscarf). El objetivo era determinar como afectaba la ausencia de estos genes frente a un estrés por frío, y comparar si las respuestas entre la cepa vínica y la de laboratorio son similares.

2.1. Estudio de vitalidad.

Se analizó la vitalidad de los mutantes, tanto de la cepa de laboratorio como de la vínica, mediante la técnica de modificación de la impedancia y haciendo uso del aparato comercial BacTrac (Material y Métodos).

Cultivos de las diferentes cepas mutantes eran inoculados en YPD para determinar su capacidad gasificante o de producción de CO₂. Para ello, se monitorizaba el descenso de impedancia en una solución de KOH donde se disolvía el CO₂ producido. Para poder comparar la vitalidad de las diferentes cepas mutantes, se estableció como valor umbral el tiempo que tardaba cada cepa en disminuir el 20 % de la impedancia inicial (M20%). Este valor coincide con el máximo de actividad fermentativa (Rodríguez-Porrata *et al.*, 2008). Los valores obtenidos para las distintas cepas se normalizaron con el tiempo obtenido para la cepa control correspondiente (*hoQA23* o BY4742), al que se le daba el valor de cero. Así, valores negativos indican menos tiempo que la control y valores positivos reflejan más tiempo en alcanzar este umbral de disminución del 20 % (p.e. *hoQA23hsp12* da un valor de -0,2 lo que significa que tarda 20% menos de tiempo que *hoQA23* en disminuir la impedancia) (Figura 3.2).

Se puede observar en primer lugar un comportamiento diferente entre los mutantes de la cepa vínica y la de laboratorio para el mismo gen. En el caso de los mutantes de la cepa vínica encontramos que *hoQA23hsp12* y *hoQA23tir2*, son los únicos que se comportan de forma diferente a la cepa control. En este caso seguimos sin observar un efecto marcado por la temperatura, ya que la falta de estos genes mejora significativamente la vitalidad a ambas temperaturas. Sin embargo, en la cepa de laboratorio, el único mutante que se comporta de forma diferente a la cepa salvaje es *BY4742tir2*, que a diferencia de lo ocurrido con la cepa vínica, ve afectada negativamente su vitalidad a 13 °C. El resto de mutaciones parecen no tener un efecto diferencial de vitalidad sobre la levadura.

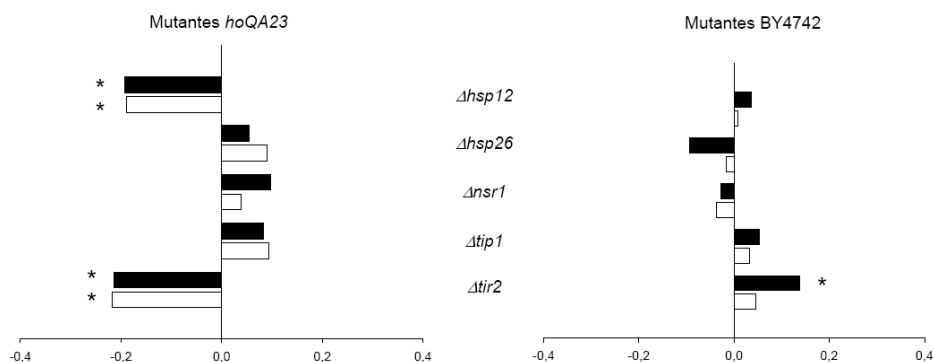


Figura 3.2. Efecto sobre la vitalidad de las mutaciones en ambas cepas, vínica y de laboratorio, a temperaturas de 13 y 25 °C (barras negras y blancas respectivamente). Los datos están representado como los ratios respecto la cepa salvaje, el tiempo 0 representa el tiempo que tardan las células de la cepa control (*hoQA23* o *BY4742*) en disminuir la impedancia en un 20%. Los valores absolutos en horas de las cepas control son: 21,42 y 6,23 h para la cepa *hoQA23*, y de 24,1 y 5,99 h para *BY4742* a 13 y 25 °C respectivamente. * Resultados con diferencias estadísticamente significativas (P-valor $\leq 0,05$).

2.2. Tiempo de duplicación.

Para calcular el tiempo de duplicación o generación de cada uno de los mutantes, se crecieron las cepas en mosto sintético, a 13 y 25 °C, se midió el valor de DO_{600nm} periódicamente a lo largo del crecimiento. Se determinaron los tiempos donde las cepas estaban en fase logarítmica y se obtuvo la recta de la máxima pendiente y con ella se calculó el tiempo que tardaban en duplicarse en el momento de mayor crecimiento. El valor 0 representa el valor de la cepa control, y las barras indican el ratio (o el porcentaje si multiplicamos el valor por 100) de tiempo que reducen o aumentan el tiempo de duplicación respecto el control (Figura 3.3).

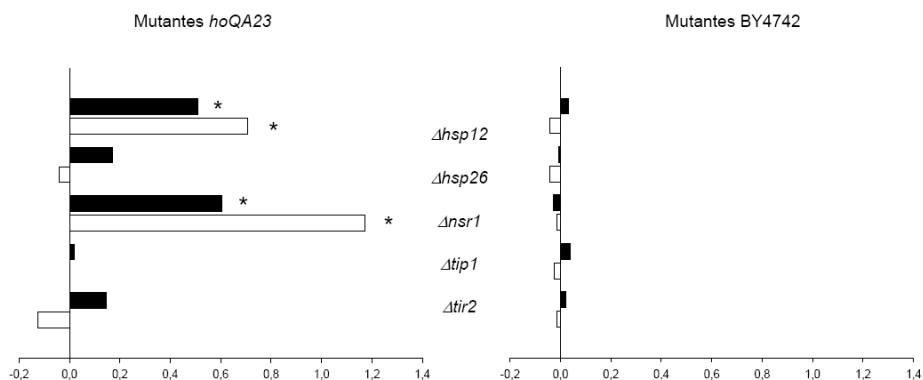


Figura 3.3. Tiempo de duplicación para mutantes de ambas cepas, v́nica y de laboratorio, a ambas temperaturas 13 y 25 °C (barras negras y blancas respectivamente). Los datos representan los ratios de tiempo que aumentan o disminuyen al duplicarse respecto la cepa salvaje, a la que se ha dado valor 0. Los valores absolutos en horas de las cepas control son: 16,95 y 4,05 h para la cepa *hoQA23*, y de 26,06 y 7,75 h para *BY4742* a 13 y 25 °C respectivamente. * Resultados con diferencias estadísticamente significativas (P-valor $\leq 0,05$).

De nuevo se observa una diferencia entre el comportamiento de los mutantes de las dos cepas. En el caso de los mutantes para la BY4742 no se encuentran diferencias significativas entre la cepa control y los mutantes. En el caso de los mutantes de la levadura vínica si encontramos dos mutantes, *hoQA23hsp12* y *hoQA23nsr1*, que ven aumentados su tiempo de duplicación a ambas temperaturas, aunque a 25 °C ambos parecen estar más afectados en su crecimiento.

2.3. Capacidad fermentativa.

Se procedió a analizar la capacidad fermentativa de los mutantes procedentes de la levadura vínica, en condiciones de microvinificación en laboratorio, con mosto sintético a 13 y 25 °C. En este caso se descartó analizar, como en los puntos anteriores, la capacidad fermentativa de los mutantes derivados de la cepa de laboratorio porque la cepa BY4742 ya presenta una pobre capacidad fermentativa.

A lo largo de las fermentaciones se realizó el seguimiento de la reducción de la densidad del mosto (medida indirecta del consumo de azúcares), análisis de azúcares reductores (para confirmar que estaba finalizada la fermentación) y crecimiento de la población mediante viables en placa (Figura 3.4).

A pesar de que no se observó diferencias significativas entre las diferentes cepas mutantes con respecto a la cepa control en el tiempo total de fermentación a 25 °C (aproximadamente 165 horas), si había cepas que presentaban un inicio más rápido de la fermentación (Tabla 3.1). Este es el caso de los mutantes para *HSP12*, *NSR1* y *TIP1* a temperatura óptima. En las fermentaciones a baja temperatura no se observó cepas con menor fase de latencia o un inicio más rápido. Si que se observó lo contrario. Algunos mutantes que presentaban un inicio más lento de la fermentación. Este es el caso de los mutantes para los genes *HSP26* y *TIP1* en la fermentación a baja temperatura. Este mutante *hoQA23hsp26* también se veía afectado en su cinética fermentativa a 25 °C. Además los mutantes para *HSP12* y *TIP1* terminaron más tarde la fermentación a 13 °C que la cepa control, encontrando así otro patrón

de afectación de la mutación *hoQA23hsp12* que estaba afectado a final de fermentación únicamente. Ocurriendo el caso contrario con el mutante para *NSR1*,

que la velocidad de consumo de azúcares aumentó durante la fase estacionaria acabando antes.

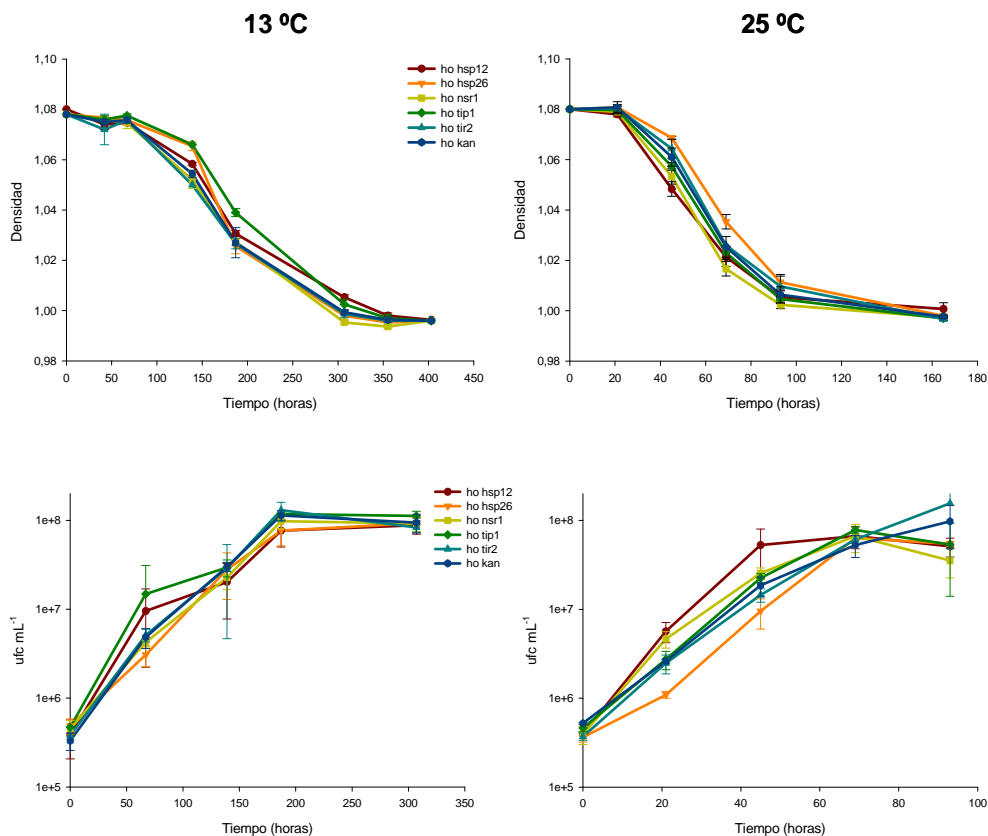


Figura 3.4. Seguimiento de la disminución de la densidad del medio y poblaciones (determinado como crecimiento en placas de YEPD) durante las fermentaciones a 13 °C y a 25 °C de los mutantes de la cepa vínica.

En general, las pequeñas diferencias observadas en el inicio de la fermentación también se correspondían con diferencias similares en el inicio del crecimiento. Así el mutante *hoQA23hsp12* mostraba una menor fase de latencia o un inicio de

crecimiento más rápido que la cepa control a ambas temperaturas, mientras que el mutante *hoQA23hsp26* presentaba una mayor fase de latencia y menor velocidad de crecimiento. El resultado de mayor crecimiento del mutante del gen *HSP12* contrasta con los datos obtenidos del tiempo de duplicación donde este mutante crecía más lento (mayor tiempo de duplicación) que la cepa control. La única explicación de estos resultados contradictorios es que el tiempo de duplicación se realizó mediante medidas de la DO_{600} y durante la fermentación el crecimiento se siguió mediante cultivo en placa. Hemos observado que algunos de estos mutantes reducen su tamaño considerablemente respecto a la cepa control, de manera que para el mismo número de células cabría esperar una menor medida de DO_{600} .

Tabla 3.1. Tiempo en horas que tardan las cepas mutantes en consumir el 5 % (T5), 50 % (T50) y el 100 % (T100) de los azúcares presentes en el mosto sintético durante la fermentación.

	13°C			25°C		
	T5	T50	T100	T5	T50	T100
<i>hoQA23hsp12</i>	65,3 ± 3,8	177,1 ± 1,1	399,9 ± 2,5*	23,9 ± 0,6*	52,2 ± 2,0*	164,4 ± 3,5
<i>hoQA23hsp26</i>	98,4 ± 2,0*	174,0 ± 2,4	313,3 ± 5,2	36,7 ± 1,0	66,7 ± 1,7*	164,0 ± 6,5
<i>hoQA23nsr1</i>	59,0 ± 2,9	166,1 ± 2,6	313,3 ± 3,4*	28,4 ± 0,9*	52,9 ± 2,4*	163,7 ± 1,0
<i>hoQA23tip1</i>	90,5 ± 2,5*	190,5 ± 1,6*	382,6 ± 7,0*	29,0 ± 0,7*	56,7 ± 3,7	157,9 ± 2,4
<i>hoQA23tir2</i>	60,6 ± 2,7	166,8 ± 2,4	346,3 ± 3,2	32,9 ± 2,2	61,2 ± 2,3	163,7 ± 5,4
<i>hoQA23</i>	59,0 ± 5,7	170,2 ± 3,7	353,4 ± 5,7	36,4 ± 0,8	60,0 ± 1,9	162,1 ± 2,0

*Diferencias estadísticamente significativas (P-valor ≤ 0,05).

3. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS SOBREEXPRESANTES.

Se procedió a la construcción de los sobreexpresantes, se amplificaron los genes por PCR con los oligonucleótidos específicos para cada uno de ellos (ver Tabla M.3 de Material y Métodos). En el amplificado se incluía el promotor y el terminador propio de cada gen, de forma que su expresión estaría regulada por su promotor. Se introdujeron en el plásmido YEplac181, que es un plásmido episomal multicopia,

que lleva la resistencia a ampicilina y el gen *LEU2*, que nos sirve para complementar con nuestra cepa control que iba a ser *hoQA23leu2*, que se construyó previamente en este trabajo (Figura 3.5).

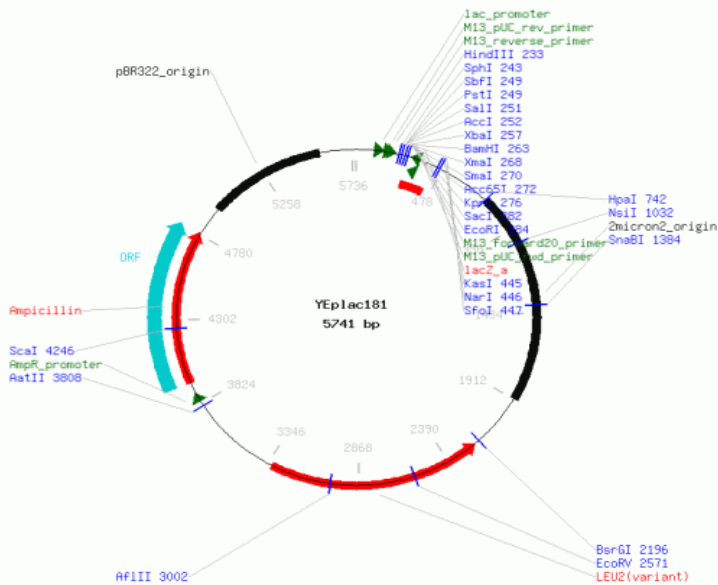


Figura 3.5. Esquema del plásmido multicopia YEplac181 (Gietz *et al.*, 1993).

Previamente habíamos construido una cepa auxótrofa para leucina (*hoQA23leu2*), de forma que únicamente las cepas transformadas con el plásmido serían capaces de crecer en un medio con ausencia de leucina. Así, se construyeron 7 cepas (ver Material y Métodos), 6 de ellas con los plásmidos portando el gen de interés y una en la que se introdujo el plásmido YEplac181 vacío que se usó como control.

Para comprobar los sobreexpresantes se realizaba la digestión de los plásmidos extraídos de la levaduras, previo paso de amplificación por *E. coli*. Se usaban dos enzimas de restricción *Sal I* y *Sph I* (Roche Diagnostics, Alemania), que separaban el fragmento insertado en el plásmido del fragmento de expresión. Un ejemplo de esta comprobación se observa en la Figura 3.6.

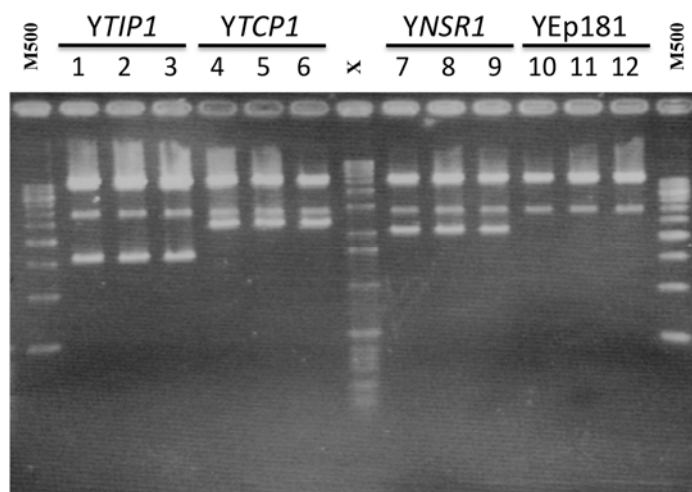


Figura 3.6. Gel de comprobación de la construcción de los sobreexpresantes. Las bandas corresponden con la digestión del plásmido con las enzimas *SaI*I y *Sph* I. Se analizaron 3 muestras por cada plásmido. Los fragmentos esperados son: para YTIP1 5791 y 1602 pb, YTCP1 5791 y 2434, YNSR1 5791 y 2120 pb y para YEp181 5791 pb. La banda de 3000 pb que está presente en todas las carreras se corresponde con el plásmido sin digerir. Los marcadores usados son el Marker X (0,07-12,2 kb) y el ladder 500 (0,5-5 kb) (Roche Diagnostics, Alemania).

4. ANÁLISIS DE LOS SOBREEXPRESANTES.

4.1 Expresión génica de las cepas sobreexpresantes.

Para comprobar el funcionamiento de la construcción de las cepas con el plásmido de sobreexpresión, se analizó su expresión génica mediante la PCRq tras un crecimiento de 18 horas en medio mínimo a 25 °C. Se determinaron estas condiciones ya que de la información disponible del capítulo 2, conocíamos que a este tiempo se producía una expresión alta en la mayoría de los genes. En la figura 3.7 se muestran los valores de expresión relativos a la cepa control (YEp181). Se observa un aumento de expresión importante respecto a la cepa control en todos los

casos, siendo más destacables el caso de los sobreexpresantes para los genes *HSP12*, *NSR1* y *TIR2*.

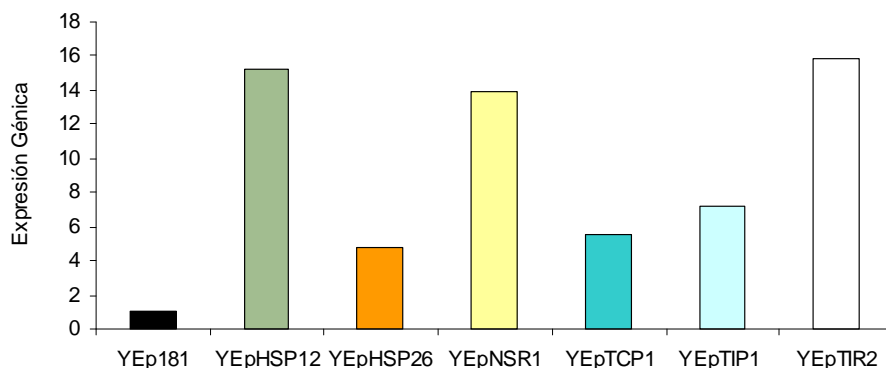


Figura 3.7. Determinación del nivel de expresión de los sobreexpresantes mediante PCRq. Los datos de expresión están normalizados con la expresión que tiene la cepa *hoQA23leu2YEpl81*, y a este valor le hemos dado el valor de 1.

4.2 Estudio vitalidad.

Se analizó la vitalidad de los sobreexpresantes mediante el BacTrac (Material y Métodos). No se encontró ningún gen que al aumentar su número de copias mejorara la vitalidad respecto a la cepa control. Pero si que había cepas sobreexpresantes que empeoraban su vitalidad, como fue el caso de *HSP26* a ambas temperaturas, *HSP12* a 25 °C y *NSR1* y *TIP1* a 13 °C (Figura 3.8). Así, la sobreexpresión de estos genes retrasa la producción de CO₂ en las primeras horas de fermentación, o lo que se puede interpretar como una mayor fase de latencia o adaptación al medio.

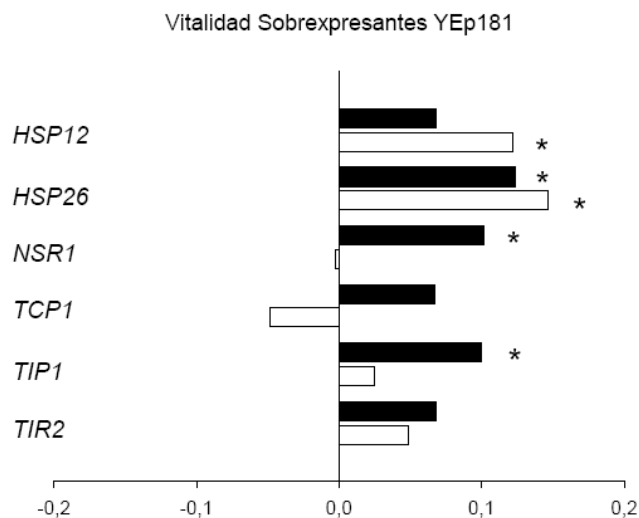


Figura 3.8. Datos de vitalidad para los sobreexpresantes, a ambas temperaturas 13 y 25 °C (barras negras y blancas respectivamente). Los datos están representado como las ratios respecto la cepa *hoQA23leu2*YEp181, el valor 0 representa el tiempo que tardan las células de la cepa control en disminuir la impedancia en un 20%. Valores positivos son cepas con peor vitalidad, valores negativos representan cepas con mejor vitalidad. Los valores absolutos en horas de la cepa control son de 16,90 h para 13 °C y de 4,20 h a 25 °C. * Resultados con diferencias estadísticamente significativas (P-valor $\leq 0,05$).

4.3. Tiempo de duplicación.

Se calculó el tiempo de duplicación de los sobreexpresantes y de la cepa control. Se crecieron a 13 y a 25 °C en mosto sintético, y mediante el seguimiento de la DO_{600nm} se determinó la recta de máxima pendiente y se determinó el tiempo que tardaba en duplicarse en el momento de mayor crecimiento.

Como se puede observar en la Figura 3.9, algunos sobreexpresantes mejoran su capacidad de crecimiento respecto al control. Es el caso de los genes *HSP12* y *TIR2* que aumentan su capacidad de crecimiento a ambas temperaturas, especialmente en

el caso de *TIR2* a 25 °C. El aumento de copias de los genes *NSR1* y *TIP1* también mejora la capacidad de crecimiento a 25 °C, mientras que a esta temperatura, la sobreexpresión de *HSP26* ve afectada negativamente su crecimiento a 25 °C.

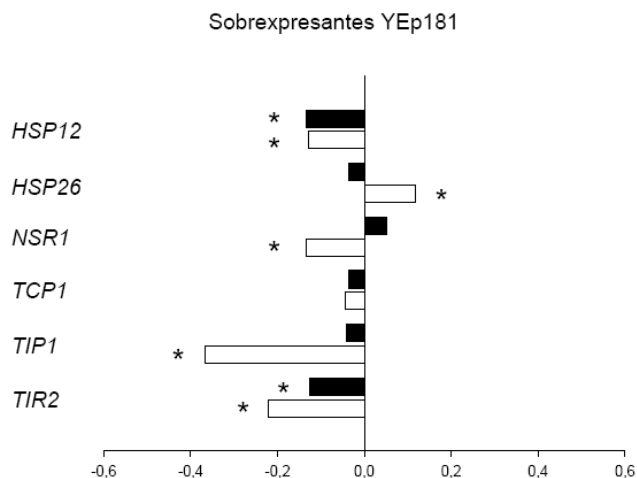


Figura 3.9. Datos de tiempo de duplicación para los sobreexpresantes, a 13 y 25 °C (barras negras y blancas respectivamente). Los datos representan el ratio de tiempo que aumentan o disminuyen al duplicarse respecto la cepa control (*hoQA23leu2Yep181*), a la que se ha dado valor 0. Valores positivos son cepas con mayor tiempo de duplicación (crecimiento más lento), valores negativos representan cepas con menor tiempo de duplicación. El tiempo de duplicación obtenido para la cepa control es de 20,88 h a 13°C y 4,89 h para 25°C. * Resultados con diferencias estadísticamente significativas (P -valor $\leq 0,05$).

4.4. Capacidad fermentativa.

Para determinar la capacidad fermentativa de los sobreexpresantes se crecieron las cepas durante 16-18 h en medio mínimo (para evitar pérdida de plásmido) a 25 °C. Un total de 2 millones de células mL^{-1} de este precultivo se inocularon en 60 mL de mosto sintético sin leucina (para evitar la pérdida del plásmido), y se fermentó a 13 y a 25 °C. La fermentación se siguió mediante la medida de disminución de densidad del mosto, azúcares y crecimiento en placas de medio mínimo (Figura 3.10).

En este caso, se observa que prácticamente todas las cepas sobreexpresantes presentan un mejor inicio de la fermentación que la cepa control en la fermentación a 13 °C (Tabla 3.2 y Figura 3.10). Especialmente destacable es la disminución significativa de la fase de latencia que se produce en las cepas sobreexpresantes para *TIP1*, *NSR1* y *TIR2*. Estas diferencias son más evidentes en los puntos correspondientes a las 144 y 192 h. Además, en algunos sobreexpresantes, este inicio más rápido de la fermentación correlaciona con un crecimiento más rápido, determinado por viables en placa (Figura 3.10). Este es el caso de la cepa *hoQA23leu2YTIR2*, que muestra un significativo incremento en su población a lo largo de la fermentación y, lo que puede ser más determinante, una menor pérdida de vitalidad tras la inoculación. Es habitual en las fermentaciones a baja temperatura que en las primeras horas se produzca una pérdida importante de la población viable como consecuencia del choque térmico, que en algunos casos puede representar hasta el 90 % de la población inoculada.

Tabla 3.2. Tiempo en horas que tardan las cepas sobreexpresantes en consumir el 5 % (T5), 50 % (T50) y el 100 % (T100) de los azúcares presentes en el mosto sintético durante la fermentación.

	13°C			25°C		
	T5	T50	T100	T5	T50	T100
YHSP12	79,4 ± 2,6*	188,4 ± 5,6	296,7 ± 4,0*	25,7 ± 1,1	65,7 ± 1,6*	143,3 ± 9,5*
YHSP26	84,4 ± 2,2*	179,3 ± 1,8*	326,9 ± 2,6*	25,7 ± 1,1	65,3 ± 0,9*	149,8 ± 3,4*
YNSR1	67,5 ± 3,2*	161,7 ± 2,4*	339,6 ± 2,3*	25,7 ± 2,3	65,7 ± 1,6*	145,5 ± 2,9*
YTCP1	78,1 ± 2,6*	178,6 ± 1,7*	316,4 ± 4,1*	26,6 ± 1,2	71,0 ± 3,2	215,6 ± 4,7
YTIP1	75,9 ± 4,1*	157,5 ± 2,1*	297,4 ± 3,0*	24,0 ± 3,1	71,0 ± 2,9	209,1 ± 6,4*
YTIR2	69,6 ± 2,3*	174,4 ± 4,2*	339,6 ± 2,3*	28,3 ± 1,1*	64,4 ± 1,4*	207,7 ± 9,2*
Y181	90,0 ± 1,8	187,0 ± 3,1	333,3 ± 2,9	24,8 ± 1,9	71,9 ± 2,5	221,7 ± 1,3

*Diferencias estadísticamente significativas (P-valor ≤ 0,05).

A 25 °C los sobreexpresantes para *TIR2*, *HSP12*, *HSP26* y *NSR1* mejoran la velocidad de consumo de azúcares a mitad de fermentación (T50) respecto el

control. Además, que *hoQA23leu2YHSP12*, *YHSP26* y *YNSR1* acaban antes la fermentación.

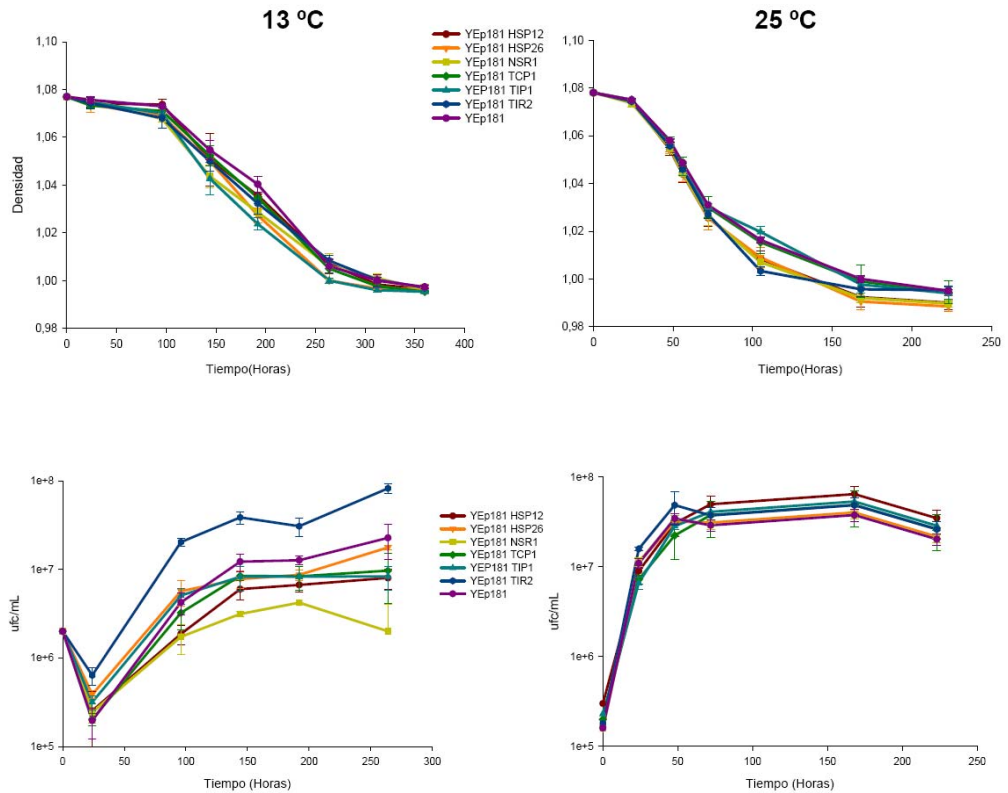


Figura 3.10. Seguimiento de la disminución de la densidad del medio y poblaciones (determinado como crecimiento en placas de YEPD) durante las fermentaciones a 13 °C y a 25 °C de los sobreexpresantes de la cepa vínica.

5. DISCUSIÓN.

En este trabajo se ha determinado la importancia de la ausencia y el aumento del número de copias de los genes *HSP12*, *HSP26*, *NSR1*, *TCP1*, *TIP1* y *TIR2* sobre la vitalidad, crecimiento y fermentación de las levaduras. La disponibilidad de la colección de mutantes construidos sobre la cepa de laboratorio BY4742 (Euroscarf),

nos ha permitido comparar los mutantes construidos por nosotros en el fondo genético de una levadura vínica con estos mutantes de la cepa de laboratorio.

Esta comparación entre ambas cepas ha demostrado la importancia de tener un modelo de levadura industrial fácilmente manipulable en el laboratorio y no tener que depender de las levaduras típicas de laboratorio. Al analizarse la vitalidad y crecimiento de los mutantes de la cepa *hoQA23* y de BY4742 se han encontrado claras diferencias entre la cepa industrial y la de laboratorio. Únicamente observamos un mutante en el fondo genético de la cepa de laboratorio que mostrase diferencias de vitalidad respecto a la cepa salvaje BY4742.

Esto puede ser debido a que la vitalidad mide el inicio de producción de CO₂ una vez las levaduras han sido inoculadas. Como la cepa BY4742 no se caracteriza por ser una buena levadura fermentativa, probablemente sea más difícil encontrar diferencias cuando alguno de sus genes ha sido eliminado. Las levaduras de laboratorio han sido aisladas en condiciones totalmente diferentes a los procesos industriales y se han adaptado a las condiciones de crecimiento en el laboratorio, lo que no las hace idóneas para trabajar con modelos industriales (Pizarro *et al.*, 2008).

En primer lugar nos hemos centrado en dos características de las levaduras para determinar el efecto de los genes seleccionados: la vitalidad y la capacidad de crecimiento de las células. La vitalidad la debemos entender como la predisposición de un cultivo a producir CO₂, y por tanto a fermentar azúcares, de manera independiente del crecimiento. En la determinación de esta vitalidad se comparaba la producción de CO₂ por parte de los distintos mutantes (normalizados en el mismo tamaño de inóculo) durante un tiempo en que no se producía crecimiento. Así, la vitalidad de las células es esencial en el momento de la rehidratación e inoculación del mosto, ya que la célula es introducida en un medio hostil, con una gran cantidad de azúcares, pH bajo, y en el caso de vinificaciones en blanco a una baja temperatura. Previamente, en otros trabajos de nuestro grupo, se ha relacionado mayor vitalidad de las células inoculadas con mejor inicio de la fermentación y mayor viabilidad del cultivo en condiciones difíciles, como son las fermentaciones a baja temperatura (Novo *et al.*, 2007; Rodríguez-Porrata *et al.*, 2008). Parece lógica

la correlación entre vitalidad y viabilidad, pero no siempre tiene porque ser así. Una célula puede tener una menor vitalidad inicial, debido a que no está preparada metabólicamente a la nueva situación, y luego tener una viabilidad alta a lo largo del tiempo cuando ha logrado adaptarse a las nuevas condiciones. O al contrario, tener su metabolismo activo para enfrentarse a la situación de estrés, pero ser incapaz de crecer o tener una viabilidad baja.

En este estudio, no siempre hemos visto una correlación directa entre vitalidad y crecimiento (medido como tiempo de duplicación). Si que suele haber mejor correlación entre vitalidad y capacidad fermentativa. De igual manera que no siempre se observó una correlación indirecta entre el mutante y el sobreexpresante. En ocasiones, tanto el mutante como el sobreexpresante mejoran o empeoran para alguno de los parámetros estudiados.

Uno de los genes que presenta mejor vitalidad tanto la cepa mutante como la sobreexpresante es *HSP12*. Respecto al crecimiento si presenta diferente comportamiento, como era de esperar. La cepa mutante aumenta el tiempo de duplicación mientras que la cepa sobreexpresante mejora el crecimiento (disminuye el tiempo de duplicación). Sin embargo, este comportamiento no tenía nada que ver con la temperatura, puesto que mostraba el mismo fenotipo a ambas temperaturas. Además, en lo que respecta a la cinética fermentativa, únicamente se observó un inicio más rápido de la fermentación para la cepa mutante a temperatura óptima. Hsp12p se localiza tanto en la membrana plasmática, protegiendo las membranas de la desecación (Sales *et al.*, 2000), como en el citoplasma y pared celular, aumentando la tolerancia a las altas presiones (Motshwene *et al.*, 2004). Esta proteína es masivamente inducida en situaciones múltiples de estrés como exposición a altas y bajas temperaturas, estrés osmótico, oxidativo o altas concentraciones de etanol (Pacheco *et al.*, 2009). Murata y cols. (2006) mostraron una elevada inducción de la expresión del gen cuando las células eran incubadas a 4 °C. Por tanto, resulta curioso que la eliminación de un gen tan crucial en la resistencia a muchos tipos de estreses produzca una mejor vitalidad celular. Recientemente, Pacheco y cols. (2009) estudiaron el fenotipo de una cepa mutante y

otra sobreexpresante en este gen frente a la resistencia a congelación. Estos autores ya observaron un aumento de la resistencia a la congelación de un mutante de *HSP12* al igual que Shamrock y Lindsey (2008) habían observado un aumento en la resistencia a la desecación. Este mutante se caracterizaba por acumular una mayor cantidad de trehalosa, y demostraron que Hsp12p tiene un papel intercambiable con la trehalosa en la resistencia al estrés. Así, puede explicarse que su vitalidad se vea aumentada a ambas temperaturas, ya que al acumular una mayor cantidad de trehalosa, la célula está mejor preparada para responder al estrés. Sin embargo, por alguna razón, esta proteína es necesaria para tener un correcto crecimiento e incluso su acumulación en el sobreexpresante permite mejorar este parámetro. Una posible explicación podría estar relacionada con ese papel alternativo que juega esta proteína respecto a la trehalosa. Es bien sabido que una falta de movilización de la trehalosa intracelular una vez desaparece el estrés, se traduce en un menor crecimiento (Garre y Matallana, 2009b). Su capacidad de interactuar con membranas y proteínas, además de proteger, puede estar bloqueando actividades enzimáticas (Sebollela *et al.*, 2004) o impidiendo el acceso de las chaperonas a proteínas desnaturalizadas y/o agregadas (Singer y Lindquist, 1998a). Por tanto, mayor acumulación de Hsp12p disminuiría la trehalosa intracelular y facilitaría un mejor tránsito de la fase de latencia a la fase de crecimiento. El otro gen que también codifica una proteína de “Heat-Shock” estudiado en este capítulo y que se inducía por frío, tal como *HSP12* y *HSP104* (Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006), es *HSP26*. Este gen codifica para una pequeña chaperonina cuya función principal es evitar la agregación de proteínas. La formación de estos agregados de proteínas se ha estudiado ampliamente en situaciones de choque térmico por la alta temperatura (Franzman *et al.*, 2005; Panaretou y Zhai, 2008), pero poco se sabe sobre la formación de estos agregados durante la baja temperatura. A pesar de su inducción tanto por la alta como por la baja temperatura, nosotros no observamos en el capítulo anterior una regulación clara por la baja temperatura, mientras que era evidente su inducción por el cese del crecimiento celular, condición que comparten la mayoría de proteínas relacionadas con el estrés celular, y reguladas por el principal factor transcripcional de esta

respuesta general a estrés Msn2/Msn4. El mutante $\Delta hsp26$ de nuestra levadura vínica no mostraba diferencias significativas respecto a la vitalidad o la velocidad de crecimiento. Petko y Lindquist (1986) ya comentaron lo sorprendente que resultaba que, a pesar de la enorme inducción que se producía por la temperatura, el mutante no presentara un efecto detectable en el crecimiento a varias temperaturas. Sin embargo, nosotros sí detectamos una fase de latencia mayor que la cepa control en las fermentaciones a ambas temperaturas. Es probable que esta proteína sea clave en el paso de células en fase de no crecimiento o estacionaria, como son las células inoculadas, a células en crecimiento o fase exponencial. La eliminación de proteínas agregadas o producidas durante la fase estacionaria podría ser crucial para el inicio del crecimiento, de manera similar a lo que ocurre a la trehalosa. En concordancia con esto, la sobreexpresión de esta proteína producía una cinética fermentativa mejorada respecto a la cepa control. En cualquier caso, la mayoría de los efectos mencionados eran idénticos a ambas temperaturas, con lo que es descartable la idea de que esta proteína le aporta una ventaja adaptativa a la célula exclusivamente a baja temperatura.

Esto es algo similar a lo que ocurría con la cepa mutante y sobreexpresante de *NSRI*. Este gen codifica una proteína nucleolar requerida para el procesamiento del ARN ribosomal y la biogénesis de los ribosomas. Son numerosos los estudios de transcripción global que muestran al grupo de proteínas ribosomales (tanto estructurales como de biogénesis) como las mayormente inducidas durante el inicio del crecimiento celular (Homma *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004; Beltran *et al.*, 2006; Tai *et al.*, 2007). Por tanto, un mutante en este gen debería verse afectado su crecimiento, tal como observamos en este trabajo. Sin embargo, y a pesar que se había descrito como especialmente crucial su función a baja temperatura (Kondo *et al.*, 1992b), nosotros no observamos diferencias entre las dos temperaturas estudiadas. Incluso el tiempo de duplicación del mutante todavía aumentaba más a temperatura óptima.

A pesar de que a veces resulta un razonamiento excesivamente reduccionista pensar que el sobreexpresante va a mostrar un efecto contrario al del mutante, en este caso

así ocurría. El sobreexpresante mejoraba su crecimiento a temperatura óptima. Sin embargo, lo que puede resultar más interesante desde un punto de vista aplicado, la sobreexpresión de este gen mejoraba significativamente la cinética fermentativa, mostrando en algunas fases de la misma una densidad del mosto mucho menor que la cepa control.

Los genes *TIP1* y *TIR2* codifican para dos manoproteínas de pared que, junto con *TIR1*, han sido descritos en numerosos trabajos como inducidos por frío y en condiciones de anaerobiosis (Sahara *et al.*, 2002, Homma *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006; Panadero *et al.*, 2006; Abe y Minegishi, 2008). Más allá de la función estructural que puedan tener como manoproteínas de pared, no se les ha asignado ninguna otra actividad. Únicamente en el caso de Tip1p se le relaciona con una posible actividad lipasa (Horsted *et al.*, 1998). Sin embargo, Kondo e Inouye (1991) no observaron ningún efecto ni en el crecimiento ni en la viabilidad de un mutante $\Delta tip1$ después de haber sido las células expuestas a temperaturas de congelación. Nuestros resultados avalan estas observaciones previas puesto que no observamos diferencias ni en la vitalidad ni en la velocidad de crecimiento para los mutantes $\Delta tip1$ y $\Delta tir2$. Sin embargo, en el caso de las cepas sobreexpresantes de ambos genes si detectamos diferencias respecto a la salvaje. El sobreexpresante de *TIR2* presentaba un menor tiempo de duplicación a ambas temperaturas. Este menor tiempo de duplicación se traducía en una menor pérdida de viabilidad cuando esta cepa era inoculada en el mosto, y una población máxima significativamente superior a la de la cepa control en la fermentación a baja temperatura. Por último, las cepas sobreexpresantes de ambos genes mostraban un inicio de la fermentación más rápido, con un menor tiempo de fase de latencia, igualmente en la fermentación a baja temperatura. De manera que podemos concluir que la eliminación individual de uno de estos genes no presenta un fenotipo especialmente afectado por la baja temperatura o con una capacidad fermentativa modificada. Es posible que las tres manoproteínas de pared presenten mecanismos compensatorios ante la falta de una de ellas. Para confirmar esta hipótesis, sería interesante construir dobles y triples mutantes en los tres genes (*TIP1*, *TIR1* y *TIR2*) y comprobar si obtenemos así una

cepa que presente un fenotipo afectado por la baja temperatura. Sin embargo, la sobreexpresión de estos genes (al menos de *TIP1* y *TIR2*) mejoraba claramente el inicio de la fermentación. Como ya se ha mencionado, uno de los problemas más importantes de la implementación de las fermentaciones a baja temperatura en bodega es el tiempo que tarda la levadura vínica *S. cerevisiae* en empezar las fermentaciones. Esto puede provocar crecimientos excesivos de levaduras no-*Saccharomyces* o bacterias que pueden alterar la composición organoléptica del vino. Estas fases de latencia tan dilatadas se atribuyen por un lado a una pérdida de viabilidad importante del inóculo, como se puede observar en las fermentaciones anteriores, y por una necesidad de adaptación a la condición de estrés, previa a la fase de crecimiento. La acumulación de ambas proteínas en la pared celular parece disminuir la mortandad inicial (al menos para Tir2p) y una más rápida adaptación al medio y mejor crecimiento.

En resumen, se pueden obtener algunas conclusiones claras de este estudio. En primer lugar, en contra de lo esperado, la mayoría de los mutantes no presentaron un fenotipo muy afectado tanto para el crecimiento o la cinética fermentativa. Hemos de recordar que hemos construido mutantes simples y que la falta de uno de estos genes puede ser compensada por una mayor expresión de alguno de los genes homólogos o de función similar. Este puede ser el caso de los mutantes de proteínas Hsp o de las manoproteínas de pared (Tip1p y Tir2p). Si que se veía muy afectado el crecimiento en el caso del mutante $\Delta nsr1$, entendiéndose que su función de biogénesis de ribosomas no es completamente compensada por otros genes. Por el contrario, el aumento de las proteínas codificadas por estos genes como consecuencia de la sobreexpresión sí que producía efectos beneficiosos en muchos casos, bien sobre el crecimiento, la cinética fermentativa o ambos.

Otra conclusión que viene a corroborar los resultados del capítulo 2, es que estas mejorías en los parámetros medidos de los sobreexpresantes o mutantes no fueron claramente exclusivas de la baja temperatura, y se manifestaban igualmente a temperatura óptima como restrictiva. Nuestros resultados del capítulo anterior mostraban que su inducción venía más marcada por la fase de crecimiento del

cultivo que por la temperatura. Es cierto que muchos de estos genes han sido descritos como inducidos por la baja temperatura, pero la mayoría de estos trabajos consistían en someter al cultivo a un choque térmico (bien por frío o por calor) y seguir el efecto de este estrés sobre la transcripción. Obviamente el estrés térmico tiene como consecuencia una parada del crecimiento, de manera que es lógico ver una inducción de estos genes, pero más relacionado con una parada del ciclo celular que con una defensa frente al estrés. Para evitar este problema, Tai y cols. (2007) proponían, para conocer mejor los mecanismos de adaptación a la baja temperatura, la comparación transcripcional de células creciendo en cultivos continuos a temperatura óptima y baja, pero con la misma tasa de crecimiento. De esta manera se elimina el efecto de velocidad de crecimiento sobre la transcripción global de la célula. En estas condiciones observaron que al comparar sus resultados en continuo con resultados de estudios en batch (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006), únicamente el grupo de los genes del metabolismo lipídico tenía activada su transcripción a baja temperatura en ambos tipos de estudio. También encontraron una disminución de la expresión de los genes *HSP26* y *HSP42* que codifican chaperonas, al contrario que ocurría en los trabajos en batch. Esto lo explican porque un cambio rápido de temperatura puede aparecer una acumulación de proteínas mal plegadas. Sin embargo, en el caso de cultivos celulares aclimatados tras un tiempo de exposición al estrés, el efecto de la baja temperatura ya no es tan problemático.

Desde un punto de vista aplicado, la sobreexpresión de los genes estudiados producía una mejor cinética fermentativa en alguna fase de la misma. Aunque esto no se traducía en menor tiempo global para la finalización de la fermentación. Especialmente interesante es la disminución de la fase de latencia y, por tanto, un inicio más rápido del proceso fermentativo.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

V. 4

**Análisis de la dosis transcripcional mediante mutación
y sobreexpresión de genes relacionados con el estrés a
bajas temperaturas
(*CSF1*, *HSP104*, *LOT2* y *LTE1*).**

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

En este capítulo vamos a continuar con el estudio del efecto de la dosis génica sobre los genes de estrés, en este caso nos vamos a centrar en los genes *CSF1*, *HSP104*, *LOT2* y *LTE1*. Estos genes, como ya se ha comentado anteriormente, han sido relacionados con el estrés por frío en diferentes actividades metabólicas. *CSF1* (“Cold Shock Factor”) codifica una proteína de gran tamaño situada en la membrana plasmática, y se relaciona con un nuevo mecanismo de transporte de nutrientes a bajas temperaturas (Tokai *et al.*, 2000). Hsp104p es una chaperona que actúa restableciendo la solubilidad y actividad de proteínas inactivadas por diferentes tipos de estrés (Sanchez y Lindquist, 1990; Parsell *et al.*, 1994; Bósl *et al.*, 2006). *LOT2* (“LOW Temperature”) está implicado en el procesamiento del ARN ribosomal (Zhang *et al.*, 2001), y uno de los mecanismos descritos es que el frío interfiere en la correcta función del metabolismo de los ribosomas y *LTE1* (“Low Temperature Essential”) es un gen de ciclo celular, implicado en la salida de la mitosis (Shou *et al.*, 1999; Zhao *et al.*, 2007), y que a bajas temperaturas su mutación provoca un retraso en el crecimiento (Shirayama *et al.*, 1994). Así todos estos genes se seleccionaron porque podrían ser claves para lograr una mejor adaptación de la levadura a procesos fermentativos llevados a cabo a temperaturas subóptimas y un aumento en la velocidad de fermentación.

El objetivo de este capítulo es determinar el efecto de la dosis génica de estos genes durante una fermentación vínica en frío. Al igual que en el capítulo anterior se construyeron cepas mutantes y sobreexpresantes sobre la cepa *hoQA23* y se evaluaron sus capacidades de crecimiento, vitalidad y cinética fermentativa.

1. CONSTRUCCIÓN DE MUTANTES SOBRE LA CEPA VÍNICA.

Se construyeron los mutantes para los genes *CSF1*, *HSP104*, *LOT2* y *LTE1* sobre la levadura vínica *hoQA23*, tal y como se describe en Material y Métodos. La comprobación se realizó mediante PCR con los oligonucleótidos diseñados específicamente para este fin. Determinando la correcta inserción de la resistencia a

la geneticina (*kan^R*). En la Figura 4.1 podemos ver un ejemplo de esta comprobación.

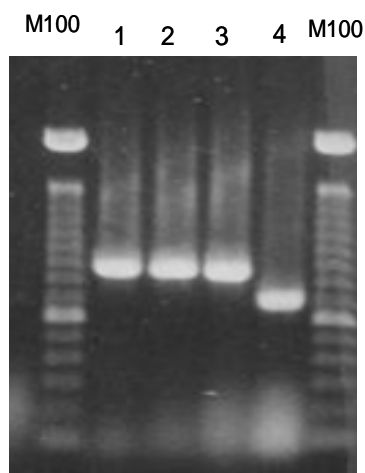


Figura 4.1. Gel de comprobación de los mutantes para *LTE1* y *CSF1*. Las bandas corresponden al producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos cF/K1. cF hibrida en el genoma de la levadura antes de la inserción de la resistencia, y K1 hibrida en el interior de la resistencia. Siendo los tamaños esperados de 874 pb para *hoQA23lte1* y de 720 pb para *hoQA23csf1*. Las carreras 1-3 son *hoQA23lte1* y la 4 *hoQA23csf1*. M100 se corresponde con el Marcador de 100 pb de Invitrogen.

2. ANÁLISIS DE MUTANTES DE LABORATORIO Y DE LA CEPA VÍNICA.

La disponibilidad de la colección de mutantes construidos sobre la cepa de laboratorio BY4742 (Colección Euroscarf) nos permitió comparar con la respuesta obtenida con la levadura vínica. El objetivo era determinar cómo afectaba la ausencia de los genes frente un estrés por frío, y comparar si las respuestas entre la cepa vínica y la de laboratorio eran similares.

2.1. Estudio de vitalidad.

Se analizó la vitalidad de los mutantes mediante el BacTrac (Material y Métodos), tanto de los mutantes de laboratorio como de los de la levadura vínica.

Se usaron cultivos crecidos en YEPD durante 16-18 horas, que estaban ya en fase estacionaria, y se inocularon con una DO_{600} de 0,05. El ciclo umbral se estableció en una disminución del 20 % de impedancia en el medio, y se determinó el tiempo que tardaba cada uno de los mutantes en llegar a este ciclo umbral. Los datos se presentan como ratio del tiempo que tarda el mutante en llegar a la mencionada disminución de impedancia respecto el salvaje (valor 0) (Figura 4.2). Valores positivos implican más tiempo que la cepa salvaje en alcanzar el umbral seleccionado y, por tanto, menor vitalidad (debido a una menor producción de CO_2). Así, un valor de 0,5 supone un 50 % más de tiempo que la cepa salvaje. En consecuencia, valores negativos indican una mayor vitalidad celular, ya que la impedancia disminuye en menor tiempo.

Se observa un comportamiento diferente en la vitalidad según el fondo genético de los mutantes del mismo gen. Así los resultados parecen ser cepa dependientes.

Así, mientras que la mutación de los genes *CSF1* y *LTE1* afecta muy negativamente sobre la vitalidad de los mutantes construidos sobre BY4742, especialmente a 13 °C, en la cepa vínica no se observa este comportamiento. Más bien al contrario ya que *hoQA23lte1* es una cepa que mejora la vitalidad. La cepa vínica más afectada es *hoQA23hsp104*, mientras que esta misma mutación en la cepa de laboratorio produce una leve mejoría de la vitalidad a 25 °C, al igual que la *BYlot2* que mejora a la temperatura control.

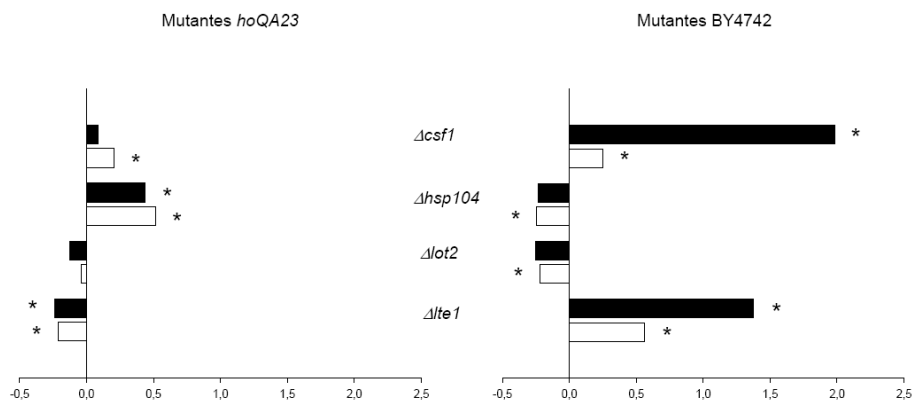


Figura 4.2. Datos de vitalidad para mutantes de ambas cepas, vínica y de laboratorio, a 13 y 25 °C (barras negras y blancas respectivamente). Los datos están representado como las ratios respecto la cepa salvaje, el tiempo 0 representa el tiempo que tardan las células de la cepa control (*hoQA23* o *BY4742*) en disminuir la impedancia en un 20 %. Los valores absolutos en horas de las cepas control son: 21,42 y 6,23 h para la cepa *hoQA23*, y de 24,1 y 5,99 h para *BY4742* a 13 y 25 °C respectivamente. * Resultados con diferencias estadísticamente significativas (P-valor \leq 0,05).

2.2. Tiempo de duplicación.

El siguiente parámetro a analizar en los mutantes fue el tiempo de duplicación. De nuevo podemos ver respuestas diferentes en el crecimiento de los mutantes de las dos cepas (Figura 4.3). Curiosamente el mutante en *CSFI* afectaba claramente al crecimiento en ambas cepas pero a diferente temperatura. Mientras la cepa vínica mostraba un mayor tiempo de duplicación en la temperatura control, la levadura de laboratorio presentaba muy afectado el crecimiento a baja temperatura. En el caso de *LOT2*, su mutación mostraba una respuesta diferente en ambos fondos genéticos. En la cepa vínica mostraba peor crecimiento a 25 °C (no se veía afectada a baja temperatura) mientras que mejoraba significativamente su crecimiento a ambas temperaturas en el caso de la levadura de laboratorio. Por último, la mutación en el gen *LTE1* si que afectaba al crecimiento en ambos fondos genéticos, e

independientemente de la temperatura de análisis, aunque con mayor intensidad en la levadura de laboratorio. La delección del gen *HSP104* no mostró efecto significativo en el tiempo de duplicación de ambas cepas.

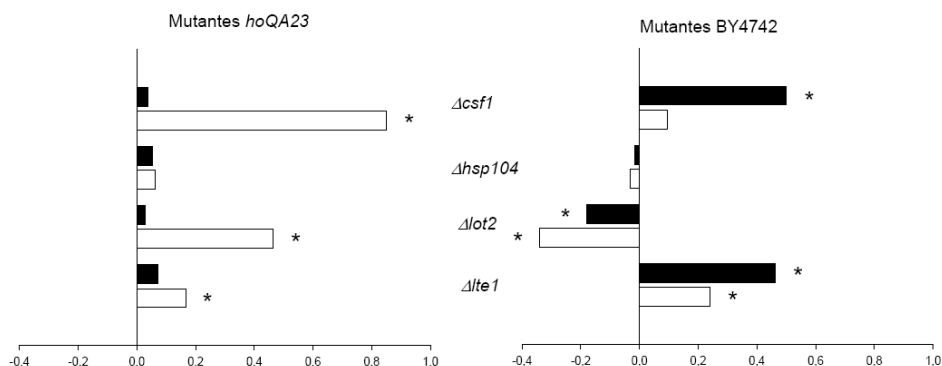


Figura 4.3. Datos tiempo de duplicación para mutantes de ambas cepas, vínica y de laboratorio, a 13 y 25 °C (barras negras y blancas respectivamente). Los datos representan el ratio de tiempo que aumenta o disminuye al duplicarse respecto la cepa salvaje, a la que se ha dado valor 0. Los valores absolutos en horas de las cepas control son: 16,95 y 4,05 h para cepa *hoQA23*, y de 26,06 y 7,75 h para BY4742 a 13 y 25 °C respectivamente. * Resultados con diferencias estadísticamente significativas (P-valor $\leq 0,05$).

2.3. Capacidad fermentativa.

Se analizó la capacidad fermentativa en mosto sintético a 13 y 25 °C, únicamente de los mutantes construidos sobre la cepa vínica debido a que la cepa vínica no tiene una buena capacidad fermentativa. Los parámetros analizados fueron la disminución de densidad del medio, que nos da la idea del consumo de azúcares y de la velocidad de fermentación, y el recuento de viables en placa para determinar la viabilidad de las células durante las diferentes etapas de fermentación (Figura 4.4). También se calculó el tiempo que tardaban las cepas en consumir el 5 % (T5), 50 % (T50) y el 100 % (T100) de los azúcares presentes en el mosto, a partir de la grafica de

disminución de la densidad, para poder determinar en que fase de crecimiento las levaduras se ven más afectadas por la mutación (Tabla 4.1).

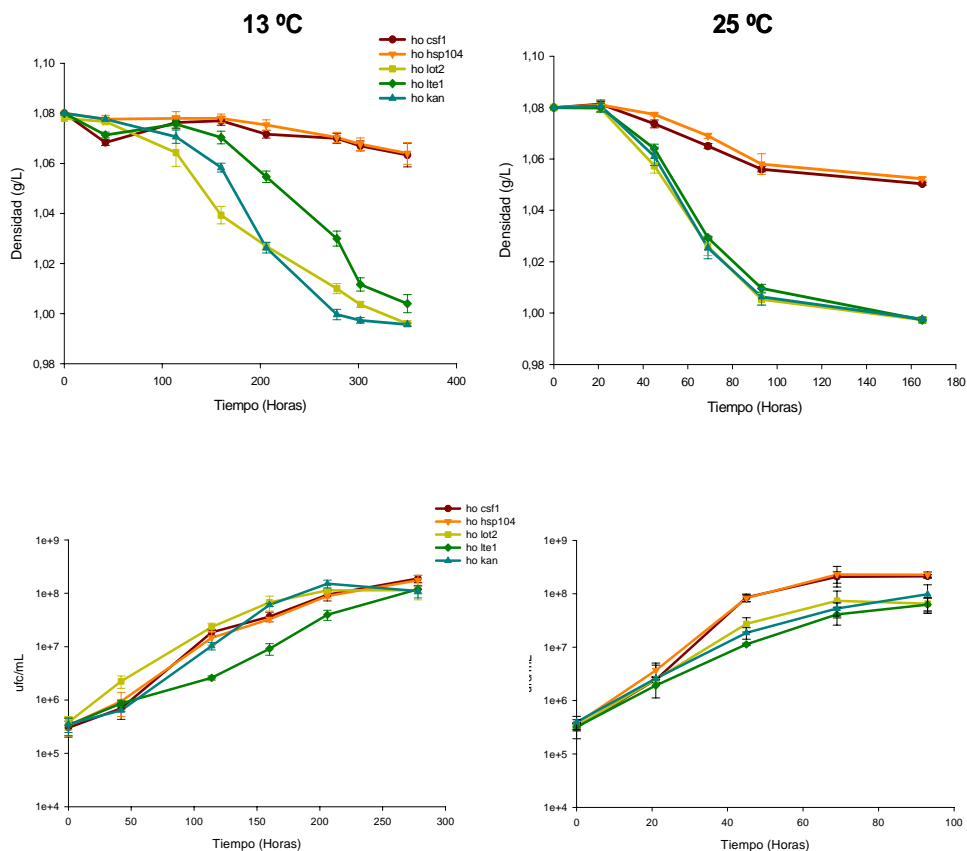


Figura 4.4. Seguimiento de la disminución de la densidad del medio y poblaciones (determinado como crecimiento en placas de YEPD) durante las fermentaciones a 13 °C y a 25 °C de los mutantes de la cepa vínica (—●— *CSF1*, —▼— *HSP104*, —■— *LOT2*, —◆— *LTE1*, —▲— *hoQA23*).

Los mutantes para *CSF1* y *HSP104* son los que están más afectados en su capacidad fermentativa, ya que no acaban la fermentación en ninguna de las dos temperaturas, especialmente a 13 °C, donde prácticamente no se observa un consumo de azúcares en el medio. Sin embargo, resulta sorprendente que, a pesar de no fermentar bien,

son estas dos cepas mutadas las que alcanzan un mayor número de viables a 25 °C y un tamaño poblacional similar a la cepa control a 13 °C. En el caso del mutante para *LTE1* la cinética fermentativa únicamente se ve afectada a baja temperatura. Así, observamos la necesidad de tiempos significativamente superiores para consumir el 5 y 50 % de los azúcares (Tabla 4.1). Sin embargo, la falta del gen parece afectar especialmente a las primeras fases de la fermentación alcohólica porque al final, aunque presentando un mayor tiempo de finalización de la fermentación, estas diferencias no eran significativas respecto a la cepa control. Esta cinética fermentativa más lenta correlaciona perfectamente con un crecimiento más lento. El número de viables es inferior en todos los puntos analizados respecto a la cepa control en la fermentación a baja temperatura. Estas diferencias en la cinética fermentativa y velocidad de crecimiento no se observó durante la fermentación a 25 °C. En el caso de la mutación del gen *LOT2*, la fermentación a 13 °C también se ve afectada pero positivamente, ya que tiene un inicio más rápido que la cepa control, consumiendo antes el 5 y el 50 % de los azúcares del mosto, que coincide con un adelanto en el crecimiento de esta cepa que acorta la fase de latencia de la levadura, aunque finalmente no hay diferencias significativas en el tiempo total de fermentación.

Tabla 4.1. Tiempo en horas que tardan las cepas mutantes en consumir el 5 % (T5), 50 % (T50) y el 100% (T100) de los azúcares presentes en el mosto sintético durante la fermentación.

	13°C			25°C		
	T5	T50	T100	T5	T50	T100
<i>hoQA23csf1</i>	150,4 ± 8,6*	-	-	40,9 ± 3,7*	-	-
<i>hoQA23hsp104</i>	203,0 ± 10,3*	-	-	52,5 ± 3,3*	-	-
<i>hoQA23lot2</i>	56,1 ± 3,1*	170,9 ± 2,7*	343,9 ± 4,1	29,3 ± 1,4	58,3 ± 2,5	144,1 ± 3,1
<i>hoQA23lte1</i>	119,0 ± 6,2*	247,5 ± 5,2*	-	32,2 ± 2,7	63,7 ± 3,2	159,8 ± 3,3
<i>hoQA23</i>	71,7 ± 2,4	188,0 ± 3,1	306,9 ± 4,9	31,9 ± 3,1	59,3 ± 2,1	158,0 ± 4,4

*Diferencias estadísticamente significativas (P-valor ≤ 0,05).

3. CONSTRUCCIÓN DE CEPAS SOBREEXPRESANTES.

Tras la caracterización de los mutantes se pasó al análisis de los sobreexpresantes para estos mismos genes. Como en el capítulo anterior, la sobreexpresión se realizó mediante clonaje o inserción del gen de interés en un plásmido multicopia. Sin embargo, en este caso, y por las razones ya explicadas, se utilizó el plásmido pGREG505 (Figura 4.5).

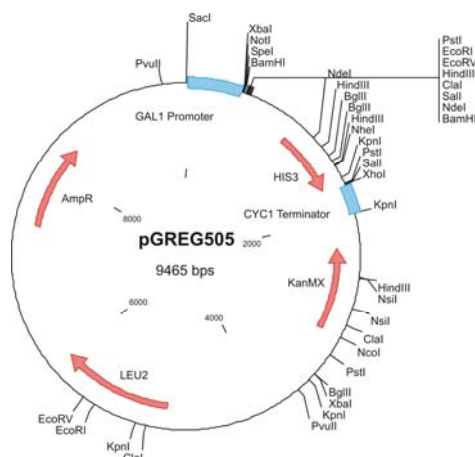


Figura 4.5. Esquema del plásmido pGREG505 (Jansen *et al.*, 2005).

Este vector está basado en la serie de plásmidos pRS. Contiene el marcador de selección *kan^R*, además del gen *LEU2* para realizar complementación por auxotrofia (Jansen *et al.*, 2005). El pGREG ha sido usado como una forma rápida para introducir genes de interés mediante recombinación homóloga “*in vivo*” bajo el promotor de expresión de la galactosa, ya que el vector posee regiones de recombinación (zonas rec) que si se añaden a los fragmentos de PCR, permiten la clonación de genes sin necesidad de un paso previo de restricción y ligación, que puede provocar una disminución de la eficiencia en la transformación. Esto, como ya se explicó en el capítulo anterior, es lo que nos ocurrió al intentar clonar estos genes en el plásmido YEplac181. Como en el anterior capítulo, independientemente del plásmido utilizado, los genes se clonaron con su propia región promotora y

terminadora, para que la expresión estuviese regulada con la misma fuerza que en el caso de la cepa salvaje.

El plásmido se seleccionó por complementación con el gen *LEU2* del plásmido, ya que la cepa salvaje usada era la *hoQA23leu2*.

La comprobación de las cepas sobreexpresantes se realizó mediante la extracción del plásmido de la levadura y su posterior clonaje en *E.coli*. El producto obtenido se digirió con dos enzimas de restricción y se comprobó que las bandas correspondían con los tamaños esperados. Un ejemplo de comprobación se puede ver en la Figura 4.6.

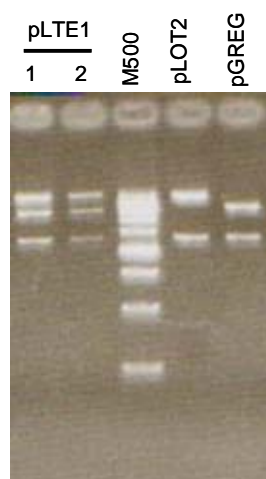


Figura 4.6. Comprobación de la correcta construcción de los plásmidos pLTE1 (Carreras 1 y 2) y pLOT2, mediante la digestión de dichos plásmidos. Los enzimas usados son *Eco* RV y *Sal* I (Roche Diagnostics, Alemania). Los fragmentos esperados son de 6997, 2320 y 1706 pb para pLTE1, 5700 y 2320 pb para pLOT2, y 3421 y 2320 pb para pGREG. M500 se corresponde con el Ladder 500 (0.5-5 kb) (Roche Diagnostics, Alemania).

4. ANÁLISIS DE LOS SOBREENPRESANTES.

Para caracterizar estas cepas sobreexpresantes se procedió en primer lugar a comprobar su sobreexpresión por PCRq y una vez confirmadas, a testar su vitalidad, capacidad de crecimiento, mediante la determinación del tiempo de duplicación, y su capacidad fermentativa en condiciones de microvinificación en el laboratorio, para ver el posible efecto del aumento de la dosis génica de estos genes.

4.1. Expresión génica de las cepas sobreexpresantes.

La comprobación de la sobreexpresión se realizó mediante la determinación de la expresión génica por PCRq tras un crecimiento de 24 horas en medio mínimo a 25 °C. Se observó que todas las cepas estaban sobreexpresando los genes aunque a diferente nivel. La cepa *hoQA23pCSF1* es la que presentaba una mayor sobreexpresión, puesto que mostraba 5,2 veces más actividad que la cepa control (*hoQA23pGREG*) (Figura 4.7). La cepa *hoQA23pLTE1* aumentaba su expresión 3,8 veces, y en menor medida, las cepas *hoQA23pHSP104* y *hoQA23pLOT2* no llegaban al doble de actividad, tan solo 1,6 veces más.

En general la sobreexpresión mediante este plásmido presentaba menores diferencias con la cepa control que lo observado para el plásmido YEplac181 en el capítulo anterior. Esto puede deberse a que este plásmido mantenga un menor número de copias intracelulares por presentar una menor tasa de replicación que el YEplac181. También ha de tenerse en cuenta que estos genes, dieron problemas para su clonación en el plásmido YEplac181 y que nosotros lo achacábamos a un mayor tamaño de los mismos. Este mayor tamaño contribuiría a un menor número de copias por célula. Sin embargo, resulta curioso el bajo nivel de expresión de los genes *HSP104* y *LOT2*. Aunque consideramos que hay una explicación lógica si tenemos en cuenta su actividad transcripcional analizada en el capítulo 2. Ambos genes presentan su máximo de inducción durante la fase de latencia, de manera que a las 24 horas están fuertemente reprimidos a 25 °C. Hay que recordar que todos los

genes están clonados con su propio promotor y, por tanto, sometidos a la misma regulación que la copia salvaje. Esta represión en el punto analizado explicaría las pocas diferencias entre la cepa control y las cepas sobreexpresantes.

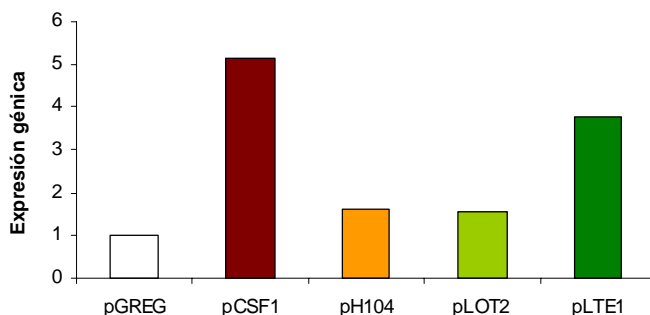


Figura 4.7. Determinación del nivel de expresión de los sobreexpresantes mediante PCRq. Los datos de expresión están normalizados respecto a la cepa *hoQA23pGREG*, a la que le hemos dado el valor de 1.

4.2. Estudio vitalidad

El estudio de vitalidad se realizó mediante el BacTrac en las mismas condiciones que para las cepa mutantes.

Con la sobreexpresión de los genes se observaron efectos muy diferentes según los genes. Las cepas sobreexpresantes para *HSP104* y *LOT2* presentaban una mejoría significativa de la vitalidad a 13 °C respecto la cepa control (Figura 4.8). En el caso de *hoQA23pCSF1*, el aumento del número de copias afectó negativamente a la vitalidad a 25 °C y no mostraba diferencias a baja temperatura. Por último, la sobreexpresión de *LTE1* no tuvo un efecto sobre la vitalidad a cualquiera de las dos temperaturas ensayadas.

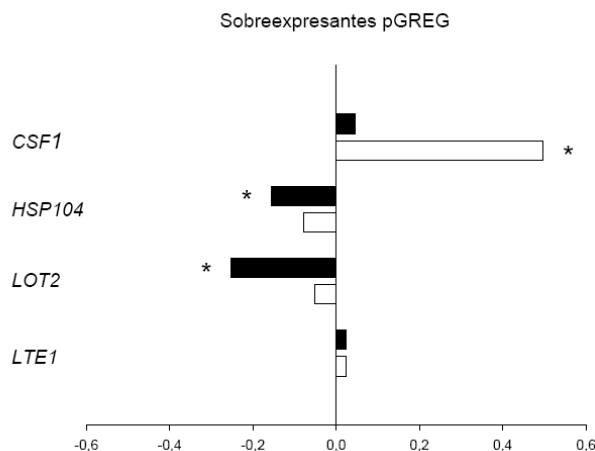


Figura 4.8. Datos de vitalidad para los sobreexpresantes, a 13 y 25 °C (barras negras y blancas respectivamente). Los datos están representado como las ratios respecto la cepa hoQA23leu2pGREG. El valor 0 representa el tiempo que tardan las células de la cepa control en disminuir la impedancia en un 20 %. Valores positivos y negativos representan cepas con peor y mejor vitalidad respectivamente. Los valores absolutos en horas de la cepa control son de 16,44 h para 13 °C y de 4,02 h a 25 °C. * Resultados con diferencias estadísticamente significativas (P-valor $\leq 0,05$).

4.3. Tiempo de duplicación.

En el cálculo del tiempo de duplicación hubo diferencias importantes según la temperatura de análisis. A 25 °C el efecto de la sobreexpresión fue negativo para todas las cepas, tal y como se observa en la Figura 4.9, aumentando significativamente el tiempo que tardaban en duplicarse. A 13 °C, en cambio, la sobreexpresión de *CSF1* y *LOT2* dio como resultado un aumento significativo en la velocidad de crecimiento, aunque no muy importante. Las cepas hoQA23pHSP104 y hoQA23pLTE1 presentaban un efecto negativo respecto al crecimiento y tardaron más tiempo en duplicarse que la cepa control.

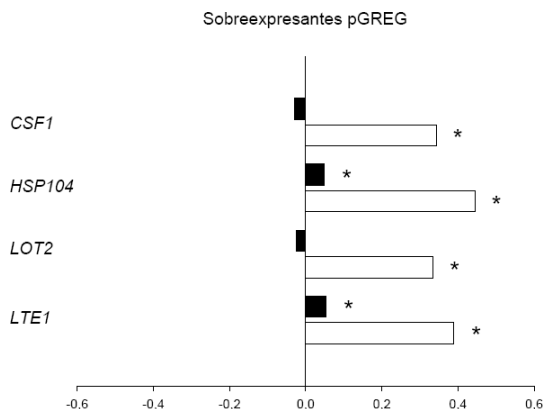


Figura 4.9. Tiempo de duplicación para los sobreexpresantes a 13 y 25 °C (barras negras y blancas respectivamente). Los datos representan el porcentaje de tiempo que aumentan o disminuyen al duplicarse respecto la cepa control (*hoQA23pGREG*), a la que se le ha dado valor 0. Valores positivos son cepas con mayor tiempo de duplicación (crecimiento más lento). Valores negativos representan cepas con menor tiempo de duplicación. El tiempo de duplicación obtenido para la cepa control es de 12,44 h a 13°C y 3,63 h para 25 °C. * Resultados con diferencias estadísticamente significativas (P-valor $\leq 0,05$).

4.4. Capacidad fermentativa.

Para determinar la capacidad fermentativa de los sobreexpresantes se creció un cultivo durante 16-18 h en medio SD a 25 °C. De este precultivo se inocularon 2 millones de células por mL en 60 mL de mosto sintético, y se fermentó a 13 y a 25 °C. La fermentación se siguió mediante la medida de disminución de densidad, azúcares y crecimiento en placas.

La sobreexpresión de los genes *CSF1* y *HSP104* produce una mejoría significativa en la velocidad de fermentación a 13 °C en las primeras fases del proceso (Tabla 4.2 y Figura 4.10). Estas cepas sobreexpresantes mostraban un acortamiento de la fase de latencia y, por tanto, una mayor adaptación a las condiciones del medio, lo que

les permite empezar a crecer y fermentar antes que el resto de cepas. Las mayores diferencias con respecto a la cepa salvaje se presentan en inicio y mitad de la fermentación ya que consumen con una mayor rapidez el 5 y el 50 % de azúcares en la fermentación en frío (Tabla 4.2). Este efecto sobre la fermentación está directamente relacionado con poblaciones viables más altas y alcanzadas en menor tiempo. Aunque la mayor velocidad de crecimiento y fermentativa de la cepa *hoQA23pCSF1* era más evidente en la fermentación a baja temperatura, esta mejoría respecto a la cepa control se observaba igualmente en la fermentación a 25 °C. No ocurría así para la cepa *hoQA23pHSP104*, ya que a 25 °C no presenta diferencias significativas ni en crecimiento ni en la cinética fermentativa respecto a la cepa control, siendo así el único gen que es dependiente de la temperatura de fermentación. La mayor expresión de los genes *LOT2* y *LTE1* provoca un ligero retraso en la fermentación, pudiendo ser debido a un crecimiento más tardío, sobre todo en el caso de *hoQA23pLTE1*.

Tabla 4.2. Tiempo expresado en horas que tardan las cepas sobreexpresantes en consumir el 5 % (T5), 50 % (T50) y el 100 % (T100) de los azúcares presentes en el mosto sintético durante la fermentación.

	13°C			25°C		
	T5	T50	T100	T5	T50	T100
pCSF1	154,4 ± 5,9*	246,2 ± 4,4*	379,8 ± 3,2	29,7 ± 4,0*	54,4 ± 2,2*	117,3 ± 0,6
pHSP104	179,1 ± 6,1*	258,2 ± 5,1*	376,0 ± 2,4	41,3 ± 2,9	64,5 ± 3,2	116,9 ± 2,0
pLOT2	230,5 ± 3,6*	319,3 ± 5,2*	379,8 ± 5,1	50,0 ± 1,1*	80,2 ± 3,1*	117,3 ± 1,5
pLTE1	224,6 ± 3,9*	308,8 ± 1,5*	379,8 ± 4,1	47,5 ± 1,3*	82,3 ± 1,5*	117,1 ± 2,0
pGREG	200,7 ± 4,0	292,5 ± 3,6	379,8 ± 2,0	43,3 ± 0,9	70,1 ± 0,6	117,3 ± 1,9

*Diferencias estadísticamente significativas (P-valor ≤ 0,05).

A pesar de esta mayor velocidad en el consumo de azúcares en muchas de las fases del proceso, el final de la fermentación (entendido como una presencia de azúcares residuales menor de 2 g L⁻¹) es prácticamente el mismo entre estas cepas y la cepa control.

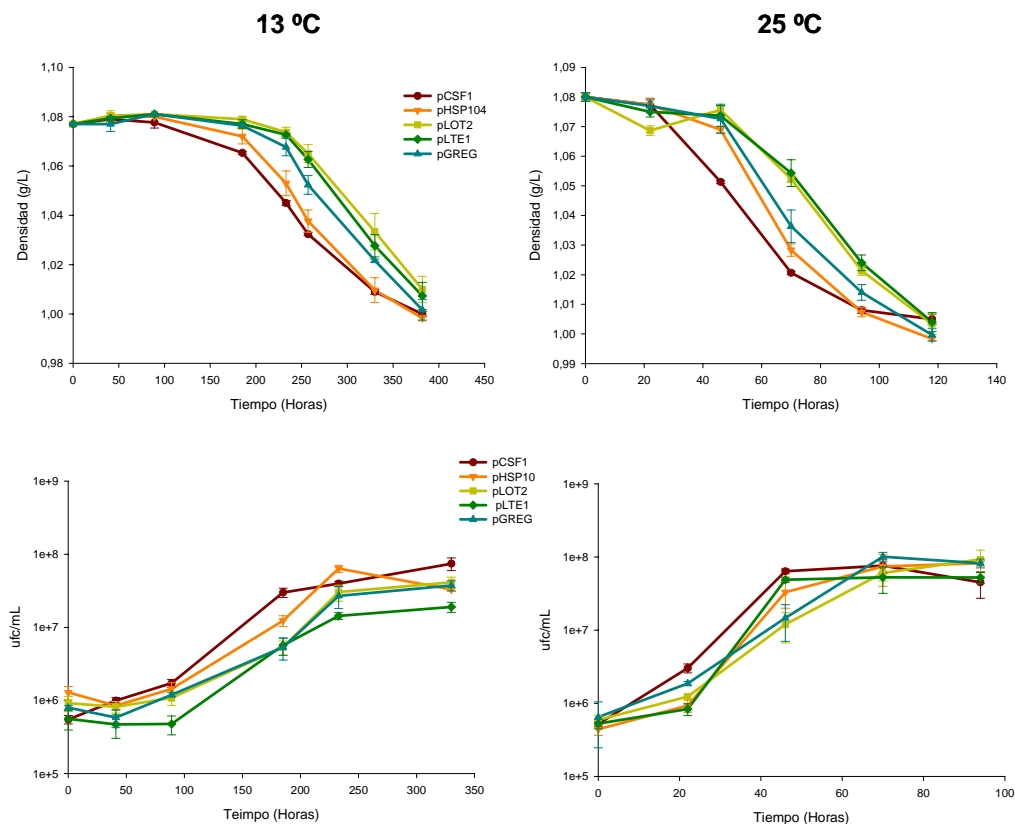


Figura 4.10. Seguimiento de la disminución de la densidad del medio, y poblaciones (determinado como crecimiento en placas de YEPD) durante las fermentaciones a 13 °C y a 25 °C de los sobreexpresantes de la cepa vínica (—●— *CSF1*, —▼— *HSP104*, —■— *LOT2*, —◆— *LTE1*, —▲— *pGREG*).

5. DISCUSIÓN.

En la determinación de la vitalidad, crecimiento y capacidad fermentativa de las cepas se han observado efectos diferentes según el gen y la dosis génica. En el caso del gen *LOT2*, cuya proteína forma parte del ribosoma 60S y está descrito como inducible al choque térmico por frío (Zhang *et al.*, 2001), su sobreexpresión afecta positivamente a la vitalidad y al crecimiento a bajas temperaturas, pero a nivel fermentativo el efecto es el contrario y provoca un retraso en la fermentación a

ambas temperaturas. Otra característica que se ha visto en este trabajo es que la mutación mejora el inicio de fermentación a 13 °C. Sin embargo Zhang y cols. (2001) habían descrito una sensibilidad al frío en este mutante. Además la mejora que observamos es justamente durante las primeras 24 horas donde habíamos visto una mayor expresión de *LOT2*.

LTE1 codifica para una proteína descrita como esencial a bajas temperaturas. *Lte1p* actúa como un regulador de la GTPasa mitótica *Tem1p*, cuya expresión está activa durante la mitosis y actúa como un controlador esencial de la mitosis (Molk *et al.*, 2004; Jensen *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2006). Nosotros hemos determinado que en el mutante se produce un retraso en la fermentación, debido sobre todo a que las células tienen una fase de latencia más larga y un crecimiento más lento, que podría deberse a esta dificultad de terminar la división celular. Sin embargo, la sobreexpresión del gen no favorece un crecimiento más rápido. Esto podría deberse a que la localización de *Lte1p* juega un papel importante en el control del ciclo celular. Así, *Lte1p* está distribuido a lo largo de la célula en la fase G1 y pasa a la gema durante la fase S. Pero justo antes de la citoquinesis, *Lte1p* pasa de la gema al citoplasma, esto crea un gradiente que activa a *Tem1p* (Pereira *et al.*, 2000; Seshan *et al.*, 2002). Sin embargo, al sobreexpresar *LTE1* quizá no se consigue este gradiente o sería más lento por lo que la división celular se retrasaría provocando una fermentación más lenta. Aunque este efecto no es dependiente de la baja temperatura puesto que el efecto más acusado sobre el crecimiento (tiempo de duplicación) se produce a la temperatura control.

En definitiva, para este gen, una alteración de la dosis génica de la cepa salvaje (mutante y sobreexpresante), tiene como consecuencia un empeoramiento tanto de la velocidad de crecimiento como de la actividad fermentativa. Además, esta pérdida de eficiencia respecto a la cepa salvaje es independiente de la temperatura, a pesar de haber sido descrito como esencial a baja temperatura. Como se ha mencionado, se trata de una proteína de ciclo celular que actúa regulando la salida de la fase de mitosis. La red de salida de mitosis es un sistema de señalización muy elaborado en el cual intervienen hasta 8 genes esenciales para la célula. Por tanto, es fácilmente

explicable que este sistema, tan vital para el desarrollo celular, esté finamente regulado, y que alteraciones de la concentración de proteínas implicadas en su regulación tenga consecuencias negativas para la fisiología y metabolismo celular.

CSFI se asocia a un nuevo sistema de transporte esencial a bajas temperaturas y que no es esencial bajo condiciones normales de crecimiento (Tokai *et al.*, 2000; Hollatz y Stambuk, 2003). En realidad no hay mucha más información sobre este gen, sin embargo, esta descripción previa del gen es consecuente con la pérdida de capacidad fermentativa del mutante, aunque el efecto no se limita únicamente a 13 °C, sino también a 25 °C. Esta proteína tiene un tamaño aproximado de 338 KDa y un total de 2958 aminoácidos. Es, por tanto, una proteína de gran tamaño, cuya ausencia pudiese provocar una desestabilización de la membrana plasmática, provocando la disminución tan importante de la vitalidad y de crecimiento a 25 °C. También se ha visto que la mutación de *CSFI* provoca una deficiencia en la homeostasis de protones, afectando al potencial de membrana, y a la tolerancia a la sal (Hollatz y Stambuk, 2003), que sería otra causa por la que la célula fuese menos eficaz en la fermentación. La sobreexpresión de *CSFI* si mejora la fermentación, sobre todo en las fases de latencia y exponencial de crecimiento donde el consumo de azúcares es más rápido que en la cepa control. Esto coincide con el pico de máxima expresión que se veía en el capítulo 2. La mejora fermentativa se puede ver a las dos temperaturas. Así, la activación de este mecanismo de transporte no se daría únicamente en frío, como estaba descrito hasta ahora, si no que sería importante a ambas temperaturas. Esta sobreexpresión también produce un crecimiento más rápido durante la fermentación, que es especialmente significativo a baja temperatura.

La eliminación de *HSP104* es el que provoca un mayor efecto sobre la vitalidad, crecimiento y velocidad fermentativa. Además, este gen si muestra un efecto más marcado a 13 °C. Sánchez y cols. (1993) ya describieron que las cepas mutantes para *HSP104* tienen comprometida la capacidad de sobrevivir y mantener la viabilidad tanto a altas como a bajas temperaturas a largo término. Hsp104p actúa renaturalizando las proteínas agregadas y acumuladas en el citosol celular tras el

estrés (Parsell *et al.*, 1994). Sánchez y cols. (1993) determinaron que Hsp104p y Hsp70p están estrechamente relacionadas, y que la falta de una puede suplirse con la otra cuando bajas condiciones de estrés. Pero en el caso de mantener el estrés durante un largo periodo, como es el caso de la fermentación, parece no ser suficiente para mantener la vitalidad celular y acabar las fermentaciones. En el capítulo 2 ya era uno de los genes candidatos a estar regulado más fuertemente por frío, y con esta mejora en la fermentación a bajas temperaturas se ha corroborado que es un gen importante en la adaptación a esta temperatura subóptima. Atendiendo a los datos de expresión génica del capítulo 2 y a las características fenotípicas observadas en este capítulo, es un gen importante durante la fase de latencia o adaptación de las células, puesto que se induce durante las primeras horas tras el estrés. Uno de los efectos descritos como consecuencia de la baja temperatura de crecimiento es el mal plegamiento o desnaturalización de proteínas (Al-Fagee y Smales, 2006). Hsp104p tendría la capacidad de recuperar, reciclar o activar dichas proteínas, produciendo una activación metabólica, lo que hace que se acorte la fase de latencia y haya un inicio de fermentación más rápido. Por tanto, desde un punto de vista aplicado, sería interesante integrar de manera estable y sobreexpresar esta proteína en esa fase concreta del crecimiento. Esto podría mejorar el inicio de las fermentaciones cuando se utiliza una temperatura comprometida para el crecimiento celular.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

VI.

DISCUSIÓN GENERAL.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

Tras el desarrollo reciente de diferentes procesos industriales que se llevan a cabo en frío, como es el caso de la conservación de productos, congelados o refrigerados, fermentaciones a bajas temperaturas, etc., ha aumentado el interés en como les afecta a los microorganismos este descenso de temperatura y cuales son sus mecanismos de adaptación ante estas condiciones. Las levaduras, y más concretamente *S. cerevisiae*, como organismo modelo eucariota y como responsable de importantes procesos biotecnológicos, como es la producción de productos panaderos, cerveza o vino, no ha quedado al margen. Así, cada vez han ido apareciendo más trabajos que intentan explicar o poner orden en el complejo mecanismo de la regulación metabólica por el descenso de temperatura.

Se ha determinado que las levaduras tras una disminución de la temperatura del medio reaccionan rápidamente ante el estrés modificando su expresión génica (Sahara *et al.*, 2002; Schade *et al.*, 2004). El descenso de temperatura provoca una serie de problemas fisiológicos como es la rigidificación de la membrana, provocando deficiencias en el transporte, las proteínas no se pliegan correctamente, lo que provoca su pérdida de función, además de que todo el mecanismo enzimático se ve reducido (Zhang *et al.*, 2001; Sahara *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004). Toda la regulación implica una gran cantidad de genes expresándose e inhibiéndose. Principalmente los genes que más se activan en una primera respuesta son genes del metabolismo del ARN, metabolismo lipídico, de aminoácidos y de transporte. Posteriormente se activa una respuesta tardía al frío, que es similar a la respuesta general de estrés, en la que se activan genes que codifican proteínas HSP, metabolismo de carbohidratos, y de glucógeno y trehalosa (Schade *et al.*, 2004). A pesar de que hay una gran cantidad de genes implicados en la respuesta al frío, se han descrito genes importantes o esenciales para la supervivencia de la levadura en estas condiciones tan hostiles. Entre todos estos, seleccionamos 10 genes que habíamos visto en un trabajo previo en nuestro grupo. Estos genes se caracterizaban por mostrar una inducción importante durante una fermentación a 13 °C y en comparación con el mismo mosto fermentado a 25 °C (Beltran *et al.*, 2006). La

mayoría de estos genes también cumplían la condición de haber sido descritos previamente en la bibliografía como de respuesta o adaptación al frío. Entre los genes seleccionados, intentamos que pertenecieran a las diferentes categorías funcionales que se había determinado que se modificaban notablemente ante la respuesta por frío. Así, seleccionamos genes de respuesta a estrés general, como *HSP12*, implicado en la integridad de la pared celular (Stone *et al.*, 1990; Praeckelt *et al.*, 1990; Varela *et al.*, 1995; García *et al.*, 2004). *HSP26* y *HSP104* que actúan como chaperonas, evitando la pérdida de función de las proteínas desnaturalizadas (Carmelo y Sa-Correia, 1997; Amoros y Estruch, 2001; Parsell *et al.*, 1994). Otra chaperona importante en el correcto plegamiento de la tubulina y de la actina es CCT, de la cual forma parte la proteína Tcplp, que se ha determinado como esencial para la levadura (Yaffe *et al.*, 1992; Ursic *et al.*, 1994; Somer *et al.*, 2002). *TIP1* y *TIR2* son genes que han estado identificados como inducidos fundamentalmente por frío, y actúan estabilizando la pared celular (Kondo e Inouye, 1991; Lee *et al.*, 1992; Kondo e Inouye, 1992; Kowalski *et al.*, 1995). Cuando hay un descenso de temperatura, una de las categorías funcionales que más aumentan su expresión son los genes relacionados con el metabolismo ribosomal. Así seleccionamos dos de ellos, *LOT2*, cuya proteína forma parte del ribosoma 60 S, y *NSR1*, que está relacionada con el procesamiento y biogénesis del ARN ribosomal (Zhang *et al.*, 2001; Kondo e Inouye, 1992). Finalmente se seleccionaron dos genes que están descritos como esenciales para crecer en frío como son *LTE1*, que actúa como regulador de la salida de mitosis a bajas temperaturas (Wichner *et al.*, 1987; Molk *et al.*, 2004; Zhao *et al.*, 2007), y *CSF1*, cuya función no está clara, pero se relaciona con un mecanismo de transporte de nutrientes a bajas temperaturas (Hollatz y Stambuk, 2003).

Tras la selección de los genes a estudiar, nuestro primer objetivo era comprobar si realmente estos genes tienen una regulación específica y exclusiva por la baja temperatura. Para ello, se realizó un estudio transcripcional de su expresión a lo largo de una fermentación a 13 °C. En contra de nuestras expectativas iniciales, la

mayoría de estos genes no mostraban una activación/represión marcada por la temperatura. Más bien, el principal regulador de su expresión es la fase de crecimiento celular en la que se encuentran. Había genes que se expresaban más durante la fase de latencia, otros durante el crecimiento exponencial y un buen número, especialmente los relacionados con el estrés celular, que se activaban cuando la levadura dejaba de crecer (fase estacionaria). Es cierto que algunos de ellos mostraban una mayor inducción en determinados puntos de la fermentación a baja temperatura. Sin embargo, los únicos genes que si respondían específicamente y con una mayor expresión a la baja temperatura eran *CSF1* y *HSP104*. Esta discrepancia con los resultados obtenidos en otros trabajos, puede deberse a que la mayoría de los estudios existentes de respuesta a las bajas temperaturas han sido realizados por choques térmicos por frío a corto plazo (Sahara *et al.*, 2002; Homma *et al.*, 2003; Schade *et al.*, 2004; Murata *et al.*, 2006). Este choque, además de causar una respuesta al frío, o a un estrés, provoca una parada de crecimiento en la levadura. Por lo que las respuestas que se están observando no son exclusivas de la baja temperatura, y es difícil separar la causa que provoca una alta transcripción de un gen, si es por el frío o por la parada de crecimiento.

En nuestros resultados, aparte de ver las consecuencias de este choque térmico, también se ha estudiado a largo plazo que ocurre con su expresión, como se adapta la levadura a crecer y fermentar durante una vinificación. Si bien es cierto que tampoco hemos podido separar completamente la respuesta específica de la levadura a las bajas temperatura de fermentación, de la que tiene según el momento del ciclo celular en la que se encuentra. Además, a medida que se produce la vinificación, van apareciendo otros estreses, como es el etanol, la limitación de nutrientes, etc. Para evitar este solapamiento entre la regulación por temperatura y por fase de crecimiento, Tai y cols. (2007) estudiaron la respuesta transcriptómica de un cultivo en continuo a diferente temperatura pero a la misma tasa de dilución (y por tanto, la misma tasa de crecimiento). En los cultivos en continuo, al contrario que en los cultivos en batch, se puede controlar el rango de crecimiento independientemente de

otras condiciones. Tras comparar los resultados de su trabajo con los estudios previos en batch encontraron que en el cultivo en continuo había muchos menos genes expresándose. No se observaban las respuestas tempranas (ECR) y tardía (LCR) (Schade *et al.*, 2004). Además, los únicos genes que coincidían en ambos tipos de crecimiento, era un grupo de genes del metabolismo de lípidos, consistente con el hecho de que la levadura tiene que adaptar la membrana ante la rigidificación provocada por el crecimiento en frío (Torija *et al.*, 2003; Beltran *et al.*, 2006). Un estudio en continuo sería una buena forma de comprobar en mosto si la regulación que se observa, viene principalmente determinada por la temperatura, por la fase de crecimiento o por ambas cosas a la vez. Como se menciona anteriormente, si que algunos de estos genes presentan puntos concretos de la fermentación donde su actividad génica es mayor a baja temperatura, comparando la misma fase de crecimiento. Por tanto, es posible, que si la temperatura no es el factor exclusivo en la activación de algunos de estos genes, si contribuya a una mayor inducción en determinadas fases de la fermentación alcohólica.

Uno de nuestros principales objetivos era poder aplicar posteriormente nuestros resultados en la industria enológica, para ello decidimos realizar todo el estudio sobre el fondo genético de una cepa industrial (QA23) y no sobre una de laboratorio. Existen numerosos trabajos en los que se pone de manifiesto que no siempre el uso de las levaduras de laboratorio como modelo para estudiar las cepas industriales es buena elección, debido a que existen diferentes propiedades entre ambos grupos (Hansen *et al.*, 1996; Henschke, 1997), expresión diferencial en determinados rutas metabólicas (Cavaliere *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2001), e incluso recientemente se han encontrado genes presentes en una de las cepas que no aparecen en la otra (Borneman *et al.*, 2008; Novo *et al.*, 2009). Todas estas diferencias pueden venir determinadas por una diversificación en los mecanismos de respuesta de las levaduras según el ambiente donde se encuentran. Por este motivo se construyó en este trabajo la levadura haploide *hoQA23*, que posee un comportamiento similar a la cepa salvaje, y la ventaja de facilitar posibles futuras actuaciones en el genoma de la

levadura de manera sencilla, y así usarla como un buen modelo en el laboratorio de cepa industrial. A pesar de que la esporulación, tal como se ha descrito, puede conllevar la pérdida de algunas de las actitudes enológicas que presentase la cepa parental, en este caso conseguimos un derivado haploide que presentaba un crecimiento y una velocidad fermentativa muy similar a la levadura comercial QA23 de la que provenía.

Una forma sencilla de comprobar el efecto que tiene un determinado gen, en el conjunto de la respuesta de la levadura, es modificar la dosis génica de la cepa parental. Esto fue lo que se pretendió con la construcción de cepas mutantes y sobreexpresantes para todos los genes. Lo primero que encontramos era que la mayoría de los mutantes no estaban tan afectados en vitalidad, crecimiento y fermentación como esperábamos. En algunos de estos genes el efecto nulo de sus mutaciones ya estaba descrito como en el caso de *HSP26*, *TIP1* y *TIR2* (Petko y Lindquist, 1986; Kondo e Inouye, 1991). El caso que más nos sorprendió fue que no hubiese un efecto notable en la mutación de *NSR1*, ya que en el estudio de regulación transcripcional encontramos que tenía una alta expresión, independiente de la temperatura, pero que parecía ser un gen importante en el metabolismo ribosomal. Otras mutaciones si provocaban un efecto sobre las levaduras, pero de dos tipos. En algunos casos, sorprendentemente, presentaba un efecto positivo mientras que otros presentaban efectos muy negativos en los parámetros estudiados. En el primer grupo se encontraban las mutaciones de los genes *HSP12* y *LOT2*. Ya se había descrito que la mutación de *HSP12* mejoraba la respuesta de las levaduras ante la resistencia a la desecación y a la congelación (Shamrock y Lindsey, 2008; Pacheco *et al.*, 2009). Hsp12p parece jugar un papel intercambiable con la trehalosa. Así, su delección podría estar aumentando la cantidad de trehalosa intracelular, protegiendo la célula ante el estrés, lo que favorece una mayor vitalidad celular y una mejor capacidad de fermentación. En el caso del mutante para *LOT2* también hay una mejora inicial en la capacidad fermentativa, pero únicamente en frío, que coincide con la fase donde tenía una mayor expresión transcripcional.

Por el contrario, la mutación para los genes *LTE1*, *CSF1* y *HSP104* producía efectos muy negativos en vitalidad, crecimiento o velocidad fermentativa. El mutante $\Delta lte1$ parece afectar de manera importante al crecimiento, aumentando la fase de latencia. *CSF1* y *HSP104* son los genes que más afectan al crecimiento de la levadura, especialmente a baja temperatura. Su velocidad fermentativa también se ve muy comprometida, aunque aquí el efecto temperatura no es tan claro, a pesar que habíamos visto que su regulación transcripcional era más fuerte cuando se sometían al frío.

En el caso de las cepas sobreexpresantes hay diferentes comportamientos. Encontramos dos genes, como *LOT2* y *LTE1*, cuya sobreexpresión provoca un efecto negativo sobre la cinética fermentativa. A pesar que el aumento de *Lot2p* mejora tanto la vitalidad como el crecimiento a bajas temperaturas, su capacidad fermentativa disminuye. Se ha determinado en este trabajo que es un gen regulado por la fase de crecimiento, concretamente su mayor inducción se produce durante la fase de latencia e inicio de la fase exponencial, y es justamente durante estas fases donde se observa la mejoría, a nivel de vitalidad y crecimiento. Sin embargo, esta mejora no se refleja en un aumento de la capacidad fermentativa. Así, a pesar de estar descrito que los genes ribosomales son los primeros en aumentar su expresión cuando se produce un choque térmico por frío, un aumento de expresión, por lo menos en este gen, no parece tener un gran efecto a nivel fermentativo.

LTE1 parece ser un gen que tiene una regulación muy importante a nivel celular, ya que tanto su mutación, como su sobreexpresión afecta negativamente al crecimiento, alargando los tiempos de fermentación. El efecto es independiente de la temperatura, lo que corrobora que su expresión no dependía de la temperatura.

El resto de genes sobreexpresados tienen un efecto positivo sobre la levadura. Este es el caso para *NSRI*, que produce una mejora en la capacidad fermentativa, mayor a 25 °C. Así, a pesar de tener una gran expresión, el aumento de la cantidad de este gen favorecía su capacidad fermentativa, al contrario que ocurriría con el otro gen ribosomal *LOT2*. A pesar de esta mejoría no se puede hablar de que es exclusiva de

la baja temperatura puesto que igualmente se producía a la temperatura control. Dos de los genes pertenecientes a la familia HSP, como son *HSP12* y *HSP26*, también presentaron una mejora debido a la sobreexpresión. Son dos chaperonas que se activan ante diferentes tipos de estrés y no solo por la temperatura. Esto se corrobora en nuestro trabajo tanto por el estudio de transcripción, donde se observaba una activación debido a la entrada en la fase estacionaria, como en la fermentación de los sobreexpresantes, ya que hay un consumo más rápido de los azúcares en ambas condiciones de temperatura. Además, el aumento de la dosis de *HSP12* favorece la velocidad de crecimiento de la cepa, especialmente en la fermentación a 13 °C, donde alcanza un tamaño poblacional mayor. Esto puede deberse a que el aumento de la concentración de Hsp12p en la célula, puede estar disminuyendo la concentración de trehalosa intracelular, debido al efecto complementario que hay entre las dos, lo que facilitaría una transición más rápida de la fase de latencia a la fase de crecimiento. Además aumenta mucho la viabilidad de las células respecto a la cepa control en la fermentación a baja temperatura. Así, *HSP12* es un gen muy interesante en futuros estudios encaminados a reducir la fase de latencia en fermentaciones en frío, que es donde se suceden la mayoría de problemas. Una estrategia sería el aumento de la expresión mediante un cambio de promotor que presente un nivel de expresión más fuerte. También interesante es saber la forma en que se complementa con la trehalosa y comprobar si la sobreexpresión de este gen afecta a la regulación de los genes de síntesis o degradación de la trehalosa intracelular.

La sobreexpresión de *CSFI* también mejora la fermentación, pero independientemente de la temperatura. Así, su posible papel como transportador de nutrientes no sería esencial únicamente a bajas temperaturas. Las fases donde más se observa la mejoría en la fermentación es en las fases de latencia y exponencial de crecimiento, que es justamente donde habíamos determinado que presentaba una mayor actividad transcripcional.

Los genes cuya sobreexpresión produce una mejoría en la fermentación a baja temperatura son: *TIP1*, *TIR2*, *TCP1* y *HSP104*. En el caso de *TIP1* y *TIR2*, está descrito que su función es muy importante en el mantenimiento e integridad de la pared celular bajo condiciones de anaerobiosis o por frío. En el caso de su mutante parecía no tener efecto, posiblemente porque otras manoproteínas compensen la pérdida de uno de estos genes. Una forma de corroborarlo sería construyendo dobles y triples mutantes (junto *TIR1*). Sin embargo, los sobreexpresantes mejoraban claramente el inicio de fermentación debido a una disminución en la fase de latencia a 13 °C. Todo esto a pesar que nosotros habíamos determinado que su regulación estaba más condicionada por la entrada en la fase estacionaria que por frío.

TCP1 es un gen esencial para la levadura, forma parte de una chaperona, y se encarga del correcto plegamiento de la actina y la tubulina. En el trabajo de regulación de la transcripción determinamos que mostraba una expresión bastante constante durante toda la fermentación e independientemente de la temperatura. Sin embargo, un aumento de expresión del gen, produce una mejora en la fermentación a 13 °C, pero no en la fermentación control. Así es un gen que si parece ser importante especialmente a bajas temperaturas.

Hsp104p es una chaperona que se activa bajo diferentes tipos de estrés, cuya función es disociar los agregados de proteínas, y devolverles la función. Se determinó que era uno de los pocos genes que parecían estar regulados por la temperatura, pero durante un corto periodo de tiempo. Forma parte de un mecanismo rápido de respuesta tras un estrés. Sin embargo, según nuestros resultados es un gen muy importante para la célula, ya que su mutación produce una pérdida en la vitalidad, crecimiento y capacidad fermentativa, llegando incluso a provocar una parada de la fermentación. El efecto se observa a ambas temperaturas, pero el nivel de afectación es mayor a 13 °C. Al sobreexpresarse, el comportamiento cambia y mejora la fermentación en frío y no a temperatura control, reduciendo su fase de latencia y así el inicio de fermentación es más rápido. A falta de comprobación, el mecanismo por el que produce una mejora en el crecimiento y en la velocidad de fermentación

podría ser la recuperación de las proteínas desnaturalizadas por el frío, haciendo que haya más proteínas metabólicamente activas.

A lo largo del desarrollo de este trabajo se han encontrado genes que pueden ser potencialmente interesantes para la industria vitivinícola. Somos conscientes de que todavía queda mucho por hacer para entender como la dosis génica afecta al comportamiento fermentativo, y como poder regularla, para finalmente en un futuro lograr una cepa comercial genéticamente modificada (GRAS) que pueda ser capaz de fermentar a bajas temperaturas minimizando los problemas. La aparición de cada vez más técnicas, basadas en el “self-cloning” o el “delitto perfetto” (Coulon *et al.*, 2006; Storici *et al.*, 2001), que permiten modificar genéticamente la levadura con material genético de ella misma, y sin dejar secuencias extrañas insertadas en el genoma, son el camino a seguir para una posible transferencia a bodega.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

VII.

CONCLUSIONES GENERALES.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

Las conclusiones generales que se deducen de este trabajo se describen a continuación:

I. La levadura de laboratorio BY4742 mostró una respuesta diferente a la regulación génica y a la eliminación de algunos de los genes estudiados respecto a la levadura industrial. Por tanto, en este caso, no parece un buen modelo para el estudio de procesos industriales.

II. Se ha obtenido una cepa de laboratorio derivada de una cepa industrial vínica que se comporta en fermentación de forma similar a la levadura salvaje, demostrándose ser una buena levadura para modelizar los procesos industriales vínicos en el laboratorio.

III. Tras el análisis transcriptómico de los principales genes descritos como esenciales durante el crecimiento a la baja temperatura solo hemos encontrado dos genes, *CSF1* y *HSP104*, cuya regulación está inducida como respuesta al frío. El resto presentan una dependencia mayor para su regulación a la fase de crecimiento en la que están, aunque en el caso de *TIP1* y *TIR2* se intuye una posible inducción como consecuencia de la temperatura.

IV. Un aumento del número de copias de los genes *TIP1*, *TIR2*, *CSF1* y *HSP104* provocan un efecto positivo en la velocidad de fermentación a bajas temperaturas. La modificación transcripcional de estos genes en levaduras industriales puede ser de utilidad en un futuro para mejorar las fermentaciones a baja temperatura en la industria enológica.

Conclusiones generales

V. Tanto la sobreexpresión como la eliminación del gen del ciclo celular *LTE1* provoca un efecto negativo en el crecimiento celular. Esto indica una transcripción muy regulada como corresponde a un gen con una función importante dentro del ciclo celular de la levadura.

VI. A pesar de que se ha descrito que los genes ribosomales son importantes durante el crecimiento en frío, los mutantes en los genes *LOT2* y *NSRI* no presentaron un fenotipo muy afectado en su crecimiento a baja temperatura.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

VIII.

LISTADO DE FIGURAS Y TABLAS.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

INTRODUCCIÓN

Figura I.1. Representación esquemática de la compartimentación celular de una levadura vínica.	12
Figura I.2. Esquema del ciclo celular de la gemación de las levaduras.	14
Figura I.3. Representación esquemática del ciclo reproductivo de las levaduras.	15
Figura I.4. Ecología de levaduras durante la fermentación espontánea de vino blanco y tinto.	19
Figura I.5. Variación en el tamaño de las poblaciones durante la fermentación alcohólica según la temperatura.	26
Figura I.6. Cinéticas de fermentación a 13 y a 25 °C medida como reducción de la densidad y viabilidad celular.	28
Figura I.7. Vías de síntesis de los alcoholes superiores.	31
Figura I.8. Esquema de respuesta a estrés en levaduras.	
Tabla I.1. Características enológicas importantes en la selección de levaduras vínicas.	20
Tabla I.2. Determinación de la viabilidad y velocidad fermentativa de las levaduras tras el crecimiento con YEPD suplementado con diferentes lípidos.	33

MATERIAL Y MÉTODOS.

Figura M.1. Recta que se obtiene tras el análisis de la PCRq para el gen de la actina (<i>ACT</i>).	73
Figura M.2. Fotografía del BacTrac de SY-LAB.	80
Figura M.3. Representación de la gráfica obtenida tras la medida de la disminución de la impedancia de la muestra en BacTrac.	
Figura M.4. Ajuste por mínimos cuadrados sobre los puntos de disminución de densidad tomados a lo largo de una fermentación.	84
Tabla M.1. Listado de cepas de levaduras usadas en los estudios ya sean construidas en este trabajo o cedidas.	55

Tabla M.2. Listado de plásmidos usados en los estudios ya sean construidos en durante este trabajo o cedidos.	56
Tabla M.3. Listado de oligonucleótidos usados en el trabajo.	58
CAPÍTULO 1.	
Figura 1.1. Esquema del mecanismo por el que la levadura puede cambiar su signo sexual o “mating type”.	92
Figura 1.2. Determinación por citometría de flujo, mediante tinción con yoduro de propidio, la ploidía de las cepas vínicas RV1 y QA23.	94
Figura 1.3. Eliminación del gen <i>HO</i> mediante la construcción de un fragmento de delección <i>loxP-KanMX4-loxP</i> .	95
Figura 1.4. Gel de comprobación de la inserción del fragmento de delección en una de las copias de <i>HO</i> .	97
Figura 1.5. Comprobación de la inserción del fragmento de delección mediante digestión con <i>Hind</i> III del producto de PCR (HOc-F y HOc-R).	98
Figura 1.6. Comprobación de la inserción del fragmento de delección en el gen <i>HO</i> en los esporulados recuperados de la cepa <i>hoQA23-3</i> .	100
Figura 1.7. Determinación de la haploidía y del signo sexual de los mutantes mediante PCR.	101
Figura 1.8. Vitalidad de las cepas haploides obtenidas tanto a 13 como a 25 °C mediante BacTrac. Los datos son relativos a la cepa salvaje QA23.	103
Figura 1.9. Goteos de las cepas haploides sobre una placa de YEPD.	104
Figura 1.10. Cinética de fermentación de un mosto sintético a 13 y a 25 °C de las cepas haploides <i>hoQA23-3.3</i> , <i>hoQA23-3.6</i> y <i>hoQA23-3.11</i> , y la cepa QA23.	106
Figura 1.11. Mapa del plásmido YEp351-cre-cyh, conteniendo la Cre recombinasa bajo el control del promotor <i>GAL1</i> y con el marcador de selección de la cicloheximida (CYH ^R).	107
Figura 1.12. Eliminación del marcador de resistencia <i>kan^R</i> integrado en el genoma.	108

Figura 1.13. Comprobación de la pérdida de *kan^R* de la cepa vínica haploide. 109

CAPITULO 2.

Figura 2.1. Cinética fermentativa a 13 °C y a 25 °C medida como reducción de la densidad, y recuento de las poblaciones mediante crecimiento en placas de YEED. 117

Figura 2.2. Determinación de la expresión de *LTE1* y *TCP1* mediante PCRq. 120

Figura 2.3. Determinación de la expresión de *LOT2* y *NSR1* mediante PCRq. 122

Figura 2.4. Determinación de la expresión de *HSP12*, *HSP26*, *TIP1* y *TIR2* mediante PCRq. 123

Figura 2.5. Determinación de la expresión de *CSF1* y *HSP104* mediante PCRq. 125

Figura 2.6. Determinación de la expresión de *PGK1* mediante PCRq. 126

CAPITULO 3.

Figura 3.1. Comprobación de la mutación del gen *TIR2* en la cepa vínica. Se usaron dos juegos de oligonucleótidos: mF /mR y mF/K . 139

Figura 3.2. Efecto sobre la vitalidad de las mutaciones de los genes *HSP12*, *HSP26*, *NSR1*, *TIP1* y *TIR2* en ambas cepas, vínica y de laboratorio, a temperaturas de 13 y 25 °C. 141

Figura 3.3. Tiempo de duplicación para los mutantes de los genes *HSP12*, *HSP26*, *NSR1*, *TIP1* y *TIR2* de ambas cepas, vínica y de laboratorio, a ambas temperaturas 13 y 25 °C. 142

Figura 3.4. Seguimiento de la disminución de la densidad del medio y poblaciones (determinado como crecimiento en placas de YEED) durante las fermentaciones a 13 °C y a 25 °C de los mutantes para los genes *HSP12*, *HSP26*, *NSR1*, *TIP1* y *TIR2* de la cepa vínica. 144

Figura 3.5. Esquema del plásmido multicopia YEplac181. 146

Figura 3.6. Gel de comprobación de la construcción de los sobreexpresantes *hoQA23leu2YTIP1* y *hoQA23leu2YTCP1*. 147

Figura 3.7. Determinación del nivel de expresión de los sobreexpresantes para <i>HSP12</i> , <i>HSP26</i> , <i>NSR1</i> , <i>TCPI1</i> , <i>TIP1</i> y <i>TIR2</i> construidos el plásmido YEplac181 multicopia mediante PCRq.	148
Figura 3.8. Datos de vitalidad de los sobreexpresantes para <i>HSP12</i> , <i>HSP26</i> , <i>NSR1</i> , <i>TCPI1</i> , <i>TIP1</i> y <i>TIR2</i> , a ambas temperaturas 13 y 25 °C.	149
Figura 3.9. Datos de tiempo de duplicación de los sobreexpresantes para <i>HSP12</i> , <i>HSP26</i> , <i>NSR1</i> , <i>TCPI1</i> , <i>TIP1</i> y <i>TIR2</i> , a ambas temperaturas 13 y 25 °C.	150
Figura 3.10. Seguimiento de la disminución de la densidad del medio y poblaciones durante las fermentaciones a 13 °C y a 25 °C de los sobreexpresantes de la cepa vínica.	152
Tabla 3.1. Tiempo en horas que tardan las cepas mutantes para los genes <i>HSP12</i> , <i>HSP26</i> , <i>NSR1</i> , <i>TIP1</i> y <i>TIR2</i> , en consumir el 5 % (T5), 50 % (T50) y el 100 % (T100) de los azúcares presentes en el mosto sintético durante la fermentación.	145
Tabla 3.2. Tiempo en horas que tardan las cepas sobreexpresantes para <i>HSP12</i> , <i>HSP26</i> , <i>NSR1</i> , <i>TCPI1</i> , <i>TIP1</i> y <i>TIR2</i> , en consumir el 5 % (T5), 50 % (T50) y el 100 % (T100) de los azúcares presentes en el mosto sintético durante la fermentación.	151
CAPITULO 4.	
Figura 4.1. Gel de comprobación de los mutantes para <i>LTE1</i> y <i>CSF1</i> .	164
Figura 4.2. Datos de vitalidad para los mutantes <i>CSF1</i> , <i>HSP104</i> , <i>LOT2</i> y <i>LTE1</i> de ambas cepas, vínica y de laboratorio, a 13 y 25 °C.	166
Figura 4.3. Datos tiempo de duplicación para los mutantes <i>CSF1</i> , <i>HSP104</i> , <i>LOT2</i> y <i>LTE1</i> de ambas cepas, vínica y de laboratorio, a 13 y 25 °C.	167
Figura 4.4. Seguimiento de la disminución de la densidad del medio y poblaciones (determinado como crecimiento en placas de YEPD) durante las fermentaciones a 13 °C y a 25 °C de los mutantes para <i>CSF1</i> , <i>HSP104</i> , <i>LOT2</i> y <i>LTE1</i> de la cepa vínica.	168
Figura 4.5. Esquema del plásmido pGREG505.	170

Figura 4.6. Comprobación de la correcta construcción de los plásmidos de sobreexpresión pLTE1 y pLOT2, mediante la digestión con <i>EcoRV</i> y <i>SalI</i> .	171
Figura 4.7. Determinación del nivel de expresión de los sobreexpresantes para los genes <i>CSF1</i> , <i>HSP104</i> , <i>LOT2</i> y <i>LTE1</i> mediante PCRq.	173
Figura 4.8. Datos de vitalidad para los sobreexpresantes <i>hoQA23leu2pCSF1</i> , <i>pHSP104</i> , <i>pLOT2</i> y <i>pLTE1</i> , a 13 y 25 °C.	174
Figura 4.9. Tiempo de duplicación para los sobreexpresantes <i>hoQA23leu2pCSF1</i> , <i>pHSP104</i> , <i>pLOT2</i> y <i>pLTE1</i> , a 13 y 25 °C.	179
Figura 4.10. Seguimiento de la disminución de la densidad del medio, y poblaciones (determinado como crecimiento en placas de YEPD) durante las fermentaciones a 13 °C y a 25 °C de los sobreexpresantes <i>hoQA23leu2pCSF1</i> , <i>pHSP104</i> , <i>pLOT2</i> y <i>pLTE1</i> de la cepa vínica.	177
Tabla 4.1. Tiempo en horas que tardan las cepas mutantes, para <i>CSF1</i> , <i>HSP104</i> , <i>LOT2</i> y <i>LTE1</i> , en consumir el 5 % (T5), 50 % (T50) y el 100 % (T100) de los azúcares presentes en el mosto sintético durante la fermentación.	169
Tabla 4.2. Tiempo expresado en horas que tardan las cepas sobreexpresantes <i>hoQA23leu2pCSF1</i> , <i>pHSP104</i> , <i>pLOT2</i> y <i>pLTE1</i> , en consumir el 5 % (T5), 50 % (T50) y el 100 % (T100) de los azúcares presentes en el mosto sintético durante la fermentación.	176

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

IX.

BIBLIOGRAFÍA.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011

Abe, F. (2007). Induction of *DAN/TIR* yeast cell wall mannoprotein genes in response to high hydrostatic pressure and low temperature. *FEBS Letters*, 581(25), 4993-4998.

Abe, F., & Minegishi, H. (2008). Global screening of genes essential for growth in high-pressure and cold environments: Searching for basic adaptive strategies using a yeast deletion library. *Genetics*, 178(2), 851-872.

Abramova, N. E., Cohen, B. D., Sertil, O., Kapoor, R., Davies, K. J. A., & Lowry, C. V. (2001). Regulatory mechanisms controlling expression of the *DAN/TIR* mannoprotein genes during anaerobic remodeling of the cell wall in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 157(3), 1169-1177.

Alexandre, H., Rousseaux, I., & Charpentier, C. (1994). Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 20(2), 173-183.

Alexandre, H., Rousseaux, I., & Charpentier, C. (1994). Relationship between ethanol tolerance, lipid composition and plasm membrane fluidity in *Saccharomyces cerevisiae* and *Kloeckera apiculata*. *FEMS Microbiology Letters*, 124(1), 17-22.

Alexandre H & Charpentier. (1995). Influence of fermentation medium aeration on cell lipid composition on fatty acids and acetic acid production by *Saccharomyces cerevisiae*. *Sci Aliments* 15: 579-592.

Alexandre, H., Ansanay-Galeote, V., Dequin, S., & Blondin, B. (2001). Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 498(1), 98-103.

Al-Fageeh, M. B., & Smales, C. M. (2006). Control and regulation of the cellular responses to cold shock: The responses in yeast and mammalian systems. *Biochemical Journal*, 397(2), 247-259.

Amorós, M., & Estruch, F. (2001). Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes *HSP26* and *HSP104* in a gene- and stress type-dependent manner. *Molecular Microbiology*, 39(6), 1523-1532.

Andorrà, I., Berradre, M., Rozès, N., Mas, A., Guillamón, J. M., & Esteve-Zarzoso, B. (2010). Effect of pure and mixed cultures of the main wine yeast species on grape must fermentations. *European Food Research and Technology*, 231(2), 215-224.

Attfield, P. V. (1997). Stress tolerance: The key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnology*, 15(13), 1351-1357.

Avery, S. V., Howlett, N. G., & Radice, S. (1996). Copper toxicity towards *Saccharomyces cerevisiae*: Dependence on plasma membrane fatty acid composition. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(11), 3960-3966.

Backhus, L. E., DeRisi, J., Brown, P. O., & Bisson, L. F. (2001). Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen

conditions. *FEMS Yeast Research*, 1(2), 111-125.

Bakalinsky, A. T., & Snow, R. (1990). Conversion of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* to heterothallism. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(4), 849-857.

Baleiras-Couto, M. M., & Huis in 't Veld, J.H.J. (1995). Influence of ethanol and temperature on the cellular fatty acid composition of *Zygosaccharomyces bailii* spoilage yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 78(3), 327-334.

Barre, P., Vezinhet, F., Dequin, S., & Blondin, B. (1993). Genetic improvement of wine yeasts. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 421-447.

Bauer, F. F., & Pretorius I. S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* 21, 27-51.

Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., et al. (2002). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: A six year follow-up study. *Systematic and Applied Microbiology*, 25(2), 287-293.

Beltran, G., Novo, M., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 4(6), 625-632.

Beltran, G., Novo, M., Leberre, V., Sokol, S., Labourdette, D., Guillamon, J. M., Mas, A., François, J., & Rozes, N. (2006). Integration of transcriptomic and metabolic analyses for understanding the global responses of low-temperature winemaking fermentations. *FEMS Yeast Research*, 6(8), 1167-1183.

Beltran, G., Rozès, N., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2007). Effect of low-temperature fermentation on yeast nitrogen metabolism. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(6), 809-815.

Beltran, G., Novo, M., Guillamón, J. M., Mas, A., & Rozès, N. (2008). Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *International Journal of Food Microbiology*, 121(2), 169-177.

Bely, M., Sablayrolles, J. -, & Barre, P. (1990). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 70(4), 246-252.

Bentley, N. J., Fitch, I. T., & Tuite, M. F. (1992). The small heat-shock protein Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* assembles into a high molecular weight aggregate. *Yeast*, 8(2), 95-106.

Bidenne, C., Blondin, B., Dequin, S., & Vezinhet, F. (1992). Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 22(1), 1-7.

Bienz, M., & Pelham, H. R. B. (1986). Heat shock regulatory elements function as an

inducible enhancer in the *Xenopus HSP70* gene and when linked to a heterologous promoter. *Cell*, 45(5), 753-760.

Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture*, 50(1), 107-119.

Boer, V. M., De Winde, J. H., Pronk, J. T., & Piper, M. D. W. (2003). The genome-wide transcriptional responses of *Saccharomyces cerevisiae* grown on glucose in aerobic chemostat cultures limited for carbon, nitrogen, phosphorus, or sulfur. *Journal of Biological Chemistry*, 278(5), 3265-3274.

Boreham, D. R., & Mitchel, R. E. J. (1994). Regulation of heat and radiation stress responses in yeast by hsp-104. *Radiation Research*, 137(2), 190-195.

Borneman, A. R., Forgan, A. H., Pretorius, I. S., & Chambers, P. J. (2008). Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1185-1195.

Bose, S., Dutko, J. A., & Zitomer, R. S. (2005). Genetic factors that regulate the attenuation of the general stress response of yeast. *Genetics*, 169(3), 1215-1226.

Bösl, B., Grimminger, V., & Walter, S. (2006). The molecular chaperone Hsp104-A molecular machine for protein disaggregation. *Journal of Structural Biology*, 156(1), 139-148.

Boulton, R. B., V. L. Singleton, *et al.* (1996). Principles and Practices of Wine Making. 604 pp. Chapman Hall, New York.

Bradbury, J. E., Richards, K. D., Niederer, H. A., Lee, S. A., Rod Dunbar, P., & Gardner, R. C. (2006). A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 89(1), 27-38.

Camasses, A., Bogdanova, A., Shevchenko, A., & Zachariae, W. (2003). The CCT chaperonin promotes activation of the anaphase-promoting complex through the generation of functional Cdc20. *Molecular Cell*, 12(1), 87-100.

Carmelo, V., & Sá-Correia, I. (1997). *HSP26* gene transcription is strongly induced during *Saccharomyces cerevisiae* growth at low pH. *FEMS Microbiology Letters*, 149(1), 85-88.

Caro, L. H. P., Smits, G. J., Van Egmond, P., Chapman, J. W., & Klis, F. M. (1998). Transcription of multiple cell wall protein-encoding genes in *Saccharomyces cerevisiae* is differentially regulated during the cell cycle. *FEMS Microbiology Letters*, 161(2), 345-349.

Carrasco, P., Querol, A., & Del Olmo, M. (2001). Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains. *Archives of Microbiology*, 175(6), 450-457.

Carreto, L., Eiriz, M. F., Gomes, A. C., Pereira, P. M., Schuller, D., & Santos, M. A. S. (2008). Comparative genomics of wild type yeast strains unveils important genome diversity. *BMC Genomics*, 9

Bibliografía

- Casey, G. P., & Ingledew, W. M. (1986). Ethanol tolerance in yeasts. *Critical Reviews in Microbiology*, 13(3), 219-280.
- Castela, P. M., Mesías, J. L., & Maynar, J. L. (1985). Changes in contents of total, polar and neutral lipids in Macabeo grapes during development, 5, 587-597.
- Castellari, L., Ferruzzi, M., Magrini, A., Giudici, P., Passarelli, P., & Zambonelli, C. (1994). Unbalanced wine fermentation by cryotolerant vs. non-cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis*, 33(1), 49-52.
- Causton, H. C., Ren, B., Sang Seok Koh, Harbison, C. T., Kanin, E., Jennings, E. G., et al. (2001). Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 12(2), 323-337.
- Cavaliere, D., Townsend, J. P., & Hartl, D. L. (2000). Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 97(22), 12369-12374.
- Chatterjee, M. T., Khalawan, S. A., & Curran, B. P. G. (2000). Cellular lipid composition influences stress activation of the yeast general stress response element (STRE). *Microbiology*, 146(4), 877-884.
- Codon, A. C., Gasent-Ramirez, J. M., & Benitez, T. (1995). Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 630-638.
- Cohen, B. D., Sertil, O., Abramova, N. E., Davies, K. J. A., & Lowry, C. V. (2001). Induction and repression of *DANI* and the family of anaerobic mannoprotein genes in *Saccharomyces cerevisiae* occurs through a complex array of regulatory sites. *Nucleic Acids Research*, 29(3), 799-808.
- Constantí, M., Poblet, M., Arola, L., Mas, A., & Guillamón, J. M. (1998). Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation in a newly established winery. *American Journal of Enology and Viticulture*, 48(3), 339-344.
- Cubillos, F. A., Vásquez, C., Faugeron, S., Ganga, A., & Martínez, C. (2009). Self-fertilization is the main sexual reproduction mechanism in native wine yeast populations. *FEMS Microbiology Ecology*, 67(1), 162-170.
- Coulon, J., Husnik, J. I., Inglis, D. L., Van Der Merwe, G. K., Lonvaud, A., Erasmus, D. J., et al. (2006). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57(2), 113-124.
- Dawes, I. W., & Hardie, I. D. (1974). Selective killing of vegetative cells in sporulated yeast cultures by exposure to diethyl ether. *Molecular and General Genetics*, 131(4).

Degre, R. (1983). Selection and commercial cultivation of wine yeast. In: G.H. Fleet, Editor, *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic Publishers, Switzerland, pp. 421-447.

Del Castillo Agudo, L. (1992). Lipid content of *Saccharomyces cerevisiae* strains with different degrees of ethanol tolerance. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 37(5), 647-651.

Del Pozo, L., Abarca, D., Claros, M. G., & Jimenez, A. (1991). Cycloheximide resistance as a yeast cloning marker. *Current Genetics*, 19(5), 353-358.

Delfini, C., Cocito, C., Bonino, M., Schellino, R., Gaia, P., & Baiocchi, C. (2001). Definitive evidence for the actual contribution of yeast in the transformation of neutral precursors of grape aromas. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49(11), 5397-5408.

Delneri, D., Tomlin, G. C., Wixon, J. L., Hutter, A., Sefton, M., Louis, E. J., et al. (2000). Exploring redundancy in the yeast genome: An improved strategy for use of the cre-loxP system. *Gene*, 252(1-2), 127-135.

Dickinson, J. R., Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J., et al. (1997). A ^{13}C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 272(43), 26871-26878.

Donzeau, M., Bourdineaud, J., & Lauquin, G. J. (1996). Regulation by low temperatures and anaerobiosis of a yeast gene specifying a putative GPI-anchored plasma membrane. *Molecular Microbiology*, 20(2), 449-459.

Dower, W. J., Miller, J. F., & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 16(13), 6127-6145.

Dunn, B., Levine, R. P., & Sherlock, G. (2005). Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics*, 6

Eden, A., Van Nedervele, L., Drukker, M., Benvenisty, N., & Debourg, A. (2001). Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3), 296-300.

Ermolenko, D. N., & Makhatadze, G. I. (2002). Bacterial cold-shock proteins. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 59(11), 1902-1913.

Estruch, F. (2000). Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiology Reviews*, 24(4), 469-486.

Fleet, G. H., & Heard, G. M. (1993). Yeasts: Growth during fermentation. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 27-54.

Bibliografía

- Fleet, G. H. (1998). Yeasts - what reactions and interactions really occur in natural habitats. *Food Technology and Biotechnology*, 36(4), 285-289.
- Franzmann, T. M., Wühr, M., Richter, K., Walter, S., & Buchner, J. (2005). The activation mechanism of Hsp26 does not require dissociation of the oligomer. *Journal of Molecular Biology*, 350(5), 1083-1093.
- Gao, C., & Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the ethanol tolerance of the wine yeasts, *Saccharomyces cerevisiae*, *Candida stellata* and *Kloeckera apiculata*. *J. Appl. Bacteriol.*, 65, 405-409.
- Gao, Y., Thomas, J. O., Chow, R. L., Lee, G. -, & Cowan, N. J. (1992). A cytoplasmic chaperonin that catalyzes β -actin folding. *Cell*, 69(6), 1043-1050.
- García, R., Bermejo, C., Grau, C., Pérez, R., Rodríguez-Peña, J. M., Francois, J., et al. (2004). The global transcriptional response to transient cell wall damage in *Saccharomyces cerevisiae* and its regulation by the cell integrity signaling pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 279(15), 15183-15195.
- Garre, E., & Matallana, E. (2009). The three trehalases Nth1p, Nth2p and Ath1p participate in the mobilization of intracellular trehalose required for recovery from saline stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 155(9), 3092-3099.
- Garreau, H., Hasan, R. N., Renault, G., Estruch, F., Boy-Marcotte, E., & Jacquet, M. (2000). Hyperphosphorylation of Msn2p and Msn4p in response to heat shock and the diauxic shift is inhibited by cAMP in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology*, 146(9), 2113-2120.
- Gasch, A. P., Spellman, P. T., Kao, C. M., Carmel-Harel, O., Eisen, M. B., Storz, G., et al. (2000). Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Molecular Biology of the Cell*, 11(12), 4241-4257.
- Gietz, R. D., & Sugino, A. (1988). New yeast-*Escherichia coli* shuttle vectors constructed with in vitro mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, 74(2), 527-534.
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (1994). High efficiency transformation with lithium acetate. *Molecular Genetics of Yeast: Practical Approaches*, , 121-134.
- Gietz, R. D., & Woods, R. A. (2002). Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods in molecular biology*, 185, 471 - 486.
- Gimeno-Alcañiz, J. V., & Matallana, E. (2001). Performance of industrial strains of *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation is affected by manipulation strategies based on sporulation. *Systematic and Applied Microbiology*, 24(4), 639-644.
- Giudici, P., Caggia, C., Pulvirenti, A., & Rainieri, S. (1998). Karyotyping of *Saccharomyces* strains with different temperature profiles. *Journal of Applied Microbiology*, 84(5), 811-819.

Goddard, M. R. (2008). Quantifying the complexities of *Saccharomyces cerevisiae*'s ecosystem engineering via fermentation. *Ecology*, 89(8), 2077-2082.

Goffeau, A., Barrell, G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., et al. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274(5287), 546-567.

González, S. S., Barrio, E., Gafner, J., & Querol, A. (2006). Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Research*, 6(8), 1221-1234.

Görner, W., Durchschlag, E., Wolf, J., Brown, E. L., Ammerer, G., Ruis, H., et al. (2002). Acute glucose starvation activates the nuclear localization signal of a stress-specific yeast transcription factor. *EMBO Journal*, 21(1-2), 135-144.

Grantham, J., Brackley, K. I., & Willison, K. R. (2006). Substantial CCT activity is required for cell cycle progression and cytoskeletal organization in mammalian cells. *Experimental Cell Research*, 312(12), 2309-2324.

Güldenr, U., Heck, S., Fiedler, T., Beinhauer, J., & Hegemann, J. H. (1996). A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research*, 24(13), 2519-2524.

Hadfield, C., Jordan, B. E., Mount, R. C., Pretorius, G. H. J., & Burak, E. (1990). G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics*, 18(4), 303-313.

Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4), 557-580.

Hansen, J., & Kjølland-Brandt, M. C. (1996). Modification of biochemical pathways in industrial yeasts. *Journal of Biotechnology*, 49(1-3), 1-12.

Hartman, P.A.; Swaminathan, B.; Curiale, M.S., Firstenberg-Eden, R., Sharpe, A.N., Cox, N.A., Fung, D.Y.C. & Goldschmidt, M.C. (1992). Rapid methods and automation. En: *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*. Editores: Vanderzant, C.; Splittstoesser, D.F. 3th ed. American Public Health Association (APHA), Washington. pp: 665-746.

Hauser, N. C., Fellenberg, K., Gil, R., Bastuck, S., Hoheisel, J. D., & Pérez-Ortín, J. E. (2001). Whole genome analysis of a wine yeast strain. *Comparative and Functional Genomics*, 2(2), 69-79.

Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1985). Growth of natural yeast flora during the fermentation of inoculated wines. *Applied and Environmental Microbiology*, 50(3), 727-728.

Heard, G. M., & Fleet, G. H. (1988). The effects of temperature and pH on the growth of yeast species during the fermentation of grape juice. *J. Appl. Bacteriol.*, 65, 23-28.

Bibliografía

Henschke, P.A. (1997) Stuck fermentation: Causes, prevention and cure. In: 'Advances in juice clarification and yeast inoculation'. Eds. M. Allen, P. Leske and G. Baldwin, Proceedings of the ASVO oenology seminar, Melbourne, Victoria (Australian Society of Viticulture and Oenology: Adelaide, SA) pp. 30-38, 41.

Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews*, 52(4), 536-553.

Hierro, N., Esteve-Zarzoso, B., González, Á, Mas, A., & Guillamón, J. M. (2006). Real-time quantitative PCR (QPCR) and reverse transcription-QPCR for detection and enumeration of total yeasts in wine. *Applied and Environmental Microbiology*, 72(11), 7148-7155.

Hollatz, C., & Stambuk, B. U. (2003). Regulation of *Saccharomyces cerevisiae* maltose fermentation by cold temperature and *CSF1*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 34(SUPPL. 1), 99-101.

Homma, T., Iwahashi, H., & Komatsu, Y. (2003). Yeast gene expression during growth at low temperature. *Cryobiology*, 46(3), 230-237.

Horsted, M. W., Dey, E. S., Holmberg, S., & Kielland-Brandt, M. C. (1998). A novel esterase from *Saccharomyces carlsbergensis*, a possible function for the yeast *TIP1* gene. *Yeast*, 14(9), 793-803.

Hosono, K. (1992). Effect of salt stress on lipid composition and membrane fluidity of the salt-tolerant yeast *Zygosaccharomyces rouxii*. *Journal of General Microbiology*, 138(1), 91-96.

Huxley, C., Green, E. D., & Dunham, I. (1990). Rapid assessment of *S. cerevisiae* mating type by PCR. *Trends in Genetics*, 6(8), 236.

Ingledeew, W. M. (1985). Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *American Journal of Enology and Viticulture*, 36, 65-76.

Ingledeew, W. M., & Kunkee, R. E. (1985). Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. *Am.J.Enol.Vitic.*, 36, 65-76.

Ivorra, C., Pérez-Ortín, J. E., & Del Olmo, M. (1999). An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study. *Biotechnology and Bioengineering*, 64(6), 698-708.

Jansen, G., Wu, C., Schade, B., Thomas, D. Y., & Whiteway, M. (2005). Drag&Drop cloning in yeast. *Gene*, 344, 43-51.

Jensen, S., Johnson, A. L., Johnston, L. H., & Segal, M. (2004). Temporal coupling of spindle disassembly and cytokinesis is disrupted by deletion of *LTE1* in budding yeast. *Cell Cycle*, 3(6), 817-822.

Jiranek, V., Langridge, P., & Henschke, P. A. (1995). Regulation of hydrogen sulfide

liberation in wine-producing *Saccharomyces cerevisiae* strains by assimilable nitrogen. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 461-467.

Kandror, O., Bretschneider, N., Kreydin, E., Cavalieri, D., & Goldberg, A. L. (2004). Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones. *Molecular Cell*, 13(6), 771-781.

Karreman, R. J., Dague, E., Gaboriaud, F., Quilès, F., Duval, J. F. L., & Lindsey, G. G. (2007a). The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Biochimica Et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics*, 1774(1), 131-137.

Karreman, R. J., & Lindsey, G. G. (2007b). Modulation of congo-red-induced aberrations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by the general stress response protein Hsp12p. *Canadian Journal of Microbiology*, 53(11), 1203-1210.

Keng, T., Clark, M. W., Storms, R. K., Fortin, N., Zhong, W., Ouellette, B. F. F., et al. (1994). *LTE1* of *Saccharomyces cerevisiae* is a 1435 codon open reading frame that has sequence similarities to guanine nucleotide releasing factors. *Yeast*, 10(7), 953-958.

Killian, E., & Ough, C. S. (1979). Fermentation esters - formation and retention as affected by fermentation temperature. *Am.J.Enol.Vitic.*, 30(4), 301-305.

Kondo, K., & Inouye, M. (1991). *TIP1*, a cold shock-inducible gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 266(26), 17537-17544.

Kondo, K., & Inouye, M. (1992). Yeast *NSR1* protein that has structural similarity to mammalian nucleolin is involved in pre-rRNA processing. *Journal of Biological Chemistry*, 267(23), 16252-16258.

Kondo, K., Kowalski, L. R. Z., & Inouye, M. (1992). Cold shock induction of yeast *NSR1* protein and its role in pre-rRNA processing. *Journal of Biological Chemistry*, 267(23), 16259-16265.

Kowalski, L. R. Z., Kondo, K., & Inouye, M. (1995). Cold-shock induction of a family of *TIP1*-related proteins associated with the membrane in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular Microbiology*, 15(2), 341-353.

Kunkee, R. E. (1984). Selection and modification of yeasts and lactic acid bacteria for wine fermentation. *Food Microbiology*, 1(4), 315-332.

Kwast, K. E., Lai, L. -, Menda, N., James III, D. T., Aref, S., & Burke, P. V. (2002). Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: Functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *Journal of Bacteriology*, 184(1), 250-265.

Kyogoku, Y., & Ouchi, K. (1995). Isolation of a cold-sensitive fermentation mutant of a baker's yeast strain and its use in a refrigerated dough process. *Applied and Environmental Microbiology*, 61(2), 639-642.

Lafon-Lafourcade, S. (1983). Wine and brandy. *Biotechnology*, 5, 81-163.

Lambrechts, M. G., & Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma - A review. *S.Afr.J.Enol.Vitic.*, 21(SPEC. ISSUE), 97-129.

Le Fur, Y., Hory, C., Bard, M. H., & Olsson, A. (1994). Evolution of phytosterols in chardonnay grape berry skins during last stages of ripening. *Vitis*, 33(3), 127-131.

Lee, W. -, Zabetakis, D., & Melese, T. (1992). *NSRI* is required for pre-rRNA processing and for the proper maintenance of steady-state levels of ribosomal subunits. *Molecular and Cellular Biology*, 12(9), 3865-3871.

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. *FEMS Yeast Research*, 6(5), 726-743.

Lindquist, S. (1986). The heat-shock response. *Annual Review of Biochemistry*, VOL. 55, 1151-1191.

Lindquist, S., & Kim, G. (1996). Heat-shock protein 104 expression is sufficient for thermotolerance in yeast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 93(11), 5301-5306.

Liti, G., Barton, D. B. H., & Louis, E. J. (2006). Sequence diversity, reproductive isolation and species concepts in *Saccharomyces*. *Genetics*, 174(2), 839-850.

Llauradó, J., Rozès, N., Bobet, R., Mas, A., & Constantí, M. (2002). Low temperature alcoholic fermentations in high sugar concentration grape musts. *Journal of Food Science*, 67(1), 268-273.

Longo, E., & Vezinhet, F. (1993). Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(1), 322-326.

Marullo, P., Bely, M., Masneuf-Pomarede, I., Aigle, M., & Dubourdieu, D. (2004). Inheritable nature of enological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 711-719.

Massoutier, C., Alexandre, H., Feuillat, M., & Charpentier, C. (1998). Isolation and characterization of cryotolerant *Saccharomyces* strains. *Vitis*, 37(1), 55-59.

Mauricio, J. C., & Salmon, J. M. (1992). Apparent loss of sugar transport activity in *Saccharomyces cerevisiae* may mainly account for maximum ethanol production during alcoholic fermentation. *Biotechnology Letters*, 14(7), 577-582.

- Menssen, R., Neutzner, A., & Seufert, W. (2001). Asymmetric spindle pole localization of yeast Cdc15 kinase links mitotic exit and cytokinesis. *Current Biology*, 11(5), 345-350.
- Metzenberg, R. L., & Glass, N. L. (1990). Mating type and mating strategies in *Neurospora*. *BioEssays*, 12(2), 53-59.
- Michnick, S., Roustan, J. -, Remize, F., Barre, P., & Dequin, S. (1997). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, 13(9), 783-793.
- Molk, J. N., Schuyler, S. C., Liu, J. Y., Evans, J. G., Salmon, E. D., Pellman, D., et al. (2004). The differential roles of budding yeast Tem1p, Cdc15p, and Bub2p protein dynamics in mitotic exit. *Molecular Biology of the Cell*, 15(4), 1519-1532.
- Monteiro, F. F., & Bisson, L. F. (1991). Biological assay of nitrogen content of grape juice and prediction of sluggish fermentations. *Am. J. Enol. Vitic.*, 42, 47-57.
- Moore, P. A., Sogliocco, F. A., Wood, R. M. C., & Brown, A. J. P. (1991). Yeast glycolytic mRNAs are differentially regulated. *Molecular and Cellular Biology*, 11(10), 5330-5337.
- Morano, K. A., & Thiele, D. J. (1999). Heat shock factor function and regulation in response to cellular stress, growth, and differentiation signals. *Gene Expression*, 7(4-6), 271-282.
- Morimoto, R. I., Kroeger, P. E., & Cotto, J. J. (1996). The transcriptional regulation of heat shock genes: A plethora of heat shock factors and regulatory conditions. *EXS*, 77, 139-163.
- Mortimer, R. K., & Johnston, J. R. (1986). Genealogy of principal strains of the yeast genetic stock center. *Genetics*, 113(1), 35-43.
- Mortimer, R. K., Romano, P., Suzzi, G., & Polsinelli, M. (1994). Genome renewal: A new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* derived from natural fermentation of grape musts. *Yeast*, 10(12), 1543-1552.
- Motshwene, P., Karreman, R., Kgari, G., Brandt, W., & Lindsey, G. (2004). LEA (late embryonic abundant)-like protein hsp 12 (heat-shock protein 12) is present in the cell wall and enhances the barotolerance of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical Journal*, 377(3), 769-774.
- Murata, Y., Homma, T., Kitagawa, E., Momose, Y., Sato, M. S., Odani, M., et al. (2006). Genome-wide expression analysis of yeast response during exposure to 4°C. *Extremophiles*, 10(2), 117-128.
- Nasmyth, K. A. (1982). Molecular genetics of yeast mating type. *Annual Review of Genetics*, 16, 439-500.
- Nelson, R. J., & Craig, E. A. (1992). TCP1 - molecular chaperonin of the cytoplasm? *Current Biology*, 2(9), 486-489.

Bibliografía

- Nordstrom, K. M., & Laakso, S. V. (1992). Effect of growth temperature on fatty acid composition of ten thermus strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(5), 1656-1660.
- Novo, M., Beltran, G., Rozes, N., Guillamon, J. M., Sokol, S., Leberre, V., et al. (2007). Early transcriptional response of wine yeast after rehydration: Osmotic shock and metabolic activation. *FEMS Yeast Research*, 7(2), 304-316.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J. L., Wincker, P., Casaregola, S., & Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 106(38), 16333-16338.
- Odani, M., Komatsu, Y., Oka, S., & Iwahashi, H. (2003). Screening of genes that respond to cryopreservation stress using yeast DNA microarray. *Cryobiology*, 47(2), 155-164.
- Ough, C. S., Davenport, M., & Joseph, K. (1989). Effects of certain vitamins on growth and fermentation rate of several commercial active dry wine yeasts. *Am. J. Enol. Vitic.*, 40, 208-213.
- Owens, J.D., Thomas, D.S., Thompson, P.S., Timmerman, J.W., (1989). Indirect conductimetry: a novel approach to the conductimetric enumeration of microbial population. *Letters in Applied Microbiology* 9, 245-249.
- Pampulha, M. E., & Loureiro-Dias, M. C. (1990). Activity of glycolytic enzymes of *Saccharomyces cerevisiae* in the presence of acetic acid. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 34(3), 375-380.
- Panadero, J., Pallotti, C., Rodríguez-Vargas, S., Randez-Gil, F., & Prieto, J. A. (2006). A downshift in temperature activates the high osmolarity glycerol (HOG) pathway, which determines freeze tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 281(8), 4638-4645.
- Panaretou, B., & Zhai, C. (2008). The heat shock proteins: Their roles as multi-component machines for protein folding. *Fungal Biology Reviews*, 22(3-4), 110-119.
- Parsell, D. A., Kowal, A. S., Singer, M. A., & Lindquist, S. (1994b). Protein disaggregation mediated by heat shock protein Hsp104. *Nature*, 372(6505), 475-478.
- Pereira, G., Höfken, T., Grindlay, J., Manson, C., & Schiebel, E. (2000). The Bub2p spindle checkpoint links nuclear migration with mitotic exit. *Molecular Cell*, 6(1), 1-10.
- Piper, P. W., Curran, B., & Davies, M. W. (1986). Transcription of the phosphoglycerate kinase gene of *Saccharomyces cerevisiae* increases when fermentative cultures are stressed by heat-shock. *European Journal of Biochemistry*, 161(3), 525-531.

Pizarro, F. J., Jewett, M. C., Nielsen, J., & Agosin, E. (2008). Growth temperature exerts differential physiological and transcriptional responses in laboratory and wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(20), 6358-6368.

Praekelt, U. M., & Meacock, P. A. (1990). *HSP12*, a new small heat shock gene of *Saccharomyces cerevisiae*: Analysis of structure, regulation and function. *Molecular and General Genetics*, 223(1), 97-106.

Pretorius, I. S. (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: Novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast*, 16(8), 675-729.

Puig, S., Querol, A., Barrio, E., & Pérez-Ortín, J. E. (2000). Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 66(5), 2057-2061.

Querol, A., Barrio, E., Huerta, T., & Ramon, D. (1992). Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 58(9), 2948-2953.

Rachidi, N., Barre, P., & Blondin, B. (2000). Examination of the transcriptional specificity of an enological yeast. A pilot experiment on the chromosome-III right arm. *Current Genetics*, 37(1), 1-11.

Ram, A. F. J., Kapteyn, J. C., Montijn, R. C., Caro, L. H. P., Douwes, J. E., Baginsky, W., et al. (1998). Loss of the plasma membrane-bound protein Gas1p in *Saccharomyces cerevisiae* results in the release of β 1,3-glucan into the medium and induces a compensation mechanism to ensure cell wall integrity. *Journal of Bacteriology*, 180(6), 1418-1424.

Ramírez, M., Regodón, J. A., Pérez, F., & Rebollo, J. E. (1999). Wine yeast fermentation vigor may be improved by elimination of recessive growth-retarding alleles. *Biotechnology and Bioengineering*, 65(2), 212-218.

Redón, M., Guillamón, J. M., Mas, A., & Rozès, N. (2009). Effect of lipid supplementation upon *Saccharomyces cerevisiae* lipid composition and fermentation performance at low temperature. *European Food Research and Technology*, 228(5), 833-840.

Reinders, J., Zahedi, R. P., Pfanner, N., Meisinger, C., & Sickmann, A. (2006). Toward the complete yeast mitochondrial proteome: Multidimensional separation techniques for mitochondrial proteomics. *Journal of Proteome Research*, 5(7), 1543-1554.

Ribeiro, T., Romestant, G., Depoortere, J., Pauss, A., (2003). Development, validation and applications of a new laboratory-scale indirect impedancemeter for rapid microbial control. *Applied Microbiology and Biotechnology* 63, 35-41.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., Lonvaud, A., (2004). *Traité d'oenologie. Microbiologie du vin et vinifications (5e édition)* Editions La Vigne. Dunod, Paris.

Riou, C., Nicaud, J., Barre, P., & Gaillardin, C. (1997). Stationary-phase gene expression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Yeast*, 13(10), 903-915.

- Robzyk, K., & Kassir, Y. (1992). A simple and highly efficient procedure for rescuing autonomous plasmids from yeast. *Nucleic Acids Research*, 20(14), 3790.
- Rodríguez-Porrata, B., Novo, M., Guillamón, J., Rozès, N., Mas, A., & Otero, R. C. (2008). Vitality enhancement of the rehydrated active dry wine yeast. *International Journal of Food Microbiology*, 126(1-2), 116-122.
- Romano, P., & Suzzi, G. (1993). Higher alcohol and acetoin production by *Zygosaccharomyces* wine yeasts. *Journal of Applied Bacteriology*, 75(6), 541-545.
- Romano, P., & Suzzi, G. (1996). Origin and production of acetoin during wine yeast fermentation. *Applied and Environmental Microbiology*, 62(2), 309-315.
- Romano, P., Suzzi, G., Comi, G., Zironi, R., & Maifreni, M. (1997). Glycerol and other fermentation products of apiculate wine yeasts. *Journal of Applied Microbiology*, 82(5), 615-618.
- Rose, M.D., Winston, F., Hieter, P. (1990) Methods in yeast genetics. A laboratory manual. *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, N.Y.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., & Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast*, 20(16), 1369-1385.
- Rossignol, T., Postaire, O., Storaï, J., & Blondin, B. (2006). Analysis of the genomic response of a wine yeast to rehydration and inoculation. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 71(5), 699-712.
- Rozes, N., Larue, F., & Ribereau-Gayon, P. (1988). Effect of a variation of grape must temperature on the fermentative ability and the neutral lipid content of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology Letters*, 10(11), 821-824.
- Ruis, H., & Schuller, C. (1995). Stress signaling in yeast. *BioEssays*, 17(11), 959-965.
- Sahara, T., Goda, T., & Ohgiya, S. (2002). Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 277(51), 50015-50021.
- Sajbidor, J. (1997). Effect of some environmental factors on the content and composition of microbial membrane lipids. *Critical Reviews in Biotechnology*, 17(2), 87-103.
- Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E., & Lindsey, G. (2000). The LEA-like protein *HSP12* in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica Et Biophysica Acta - Biomembranes*, 1463(2), 267-278.
- Salmon, J. M. (1989). Effect of sugar transport inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on sluggish and stuck enological fermentations. *Applied and Environmental Microbiology*, 55(4), 953-958.

Salmon, J. M. (1997). Enological fermentation kinetics of an isogenic ploidy series derived from an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 83(3), 253-260.

Salvadó, Z., Chiva, R., Rodríguez-Vargas, S., Rández-Gil, F., Mas, A., & Guillamón, J. M. (2008). Proteomic evolution of a wine yeast during the first hours of fermentation. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1137-1146.

Sanchez, Y., & Lindquist, S. L. (1990). *HSP104* required for induced thermotolerance. *Science*, 248(4959), 1112-1115.

Sanchez, Y., Taulien, J., Borkovich, K. A., & Lindquist, S. (1992). Hsp104 is required for tolerance to many forms of stress. *EMBO Journal*, 11(6), 2357-2364.

Sanchez, Y., Parsell, D. A., Taulien, J., Vogel, J. L., Craig, E. A., & Lindquist, S. (1993). Genetic evidence for a functional relationship between Hsp104 and Hsp70. *Journal of Bacteriology*, 175(20), 6484-6491.

Santos-Rosa, H., Kirmizis, A., Nelson, C., Bartke, T., Saksouk, N., Cote, J., et al. (2009). Histone H3 tail clipping regulates gene expression. *Nature Structural and Molecular Biology*, 16(1), 17-22.

Sebollela, A., Louzada, P. R., Sola-Penna, M., Sarone-Williams, V., Coelho-Sampaio, T., & Ferreira, S. T. (2004). Inhibition of yeast glutathione reductase by trehalose: Possible implications in yeast survival and recovery from stress. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 36(5), 900-908.

Schade, B., Jansen, G., Whiteway, M., Entian, K. D., & Thomas, D. Y. (2004). Cold adaptation in budding yeast. *Molecular Biology of the Cell*, 15(12), 5492-5502.

Seshan, A., Bardin, A. J., & Amon, A. (2002). Control of Lte1 localization by cell polarity determinants and Cdc14. *Current Biology*, 12(24), 2098-2110.

Shamrock, V. J., & Lindsey, G. G. (2008). A compensatory increase in trehalose synthesis in response to desiccation stress in *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking the heat shock protein Hsp12p. *Canadian Journal of Microbiology*, 54(7), 559-568

Sharf, R., & Margalith, P. (1983). The effect of temperature on spontaneous wine fermentation. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology*, 17(5), 311-313.

Shirayama, M., Matsui, Y., & Toh-E, A. (1994). The yeast *TEM1* gene, which encodes a GTP-binding protein, is involved in termination of M phase. *Molecular and Cellular Biology*, 14(11), 7476-7482.

Shirayama, M., Matsui, Y., Tanaka, K., & Toh-e, A. (1994). Isolation of a *CDC25* family gene, *MSI2/LTE1*, as a multicopy suppressor of *ira1*. *Yeast*, 10(4), 451-461.

Bibliografía

- Shou, W., Seol, J. H., Shevchenko, A., Baskerville, C., Moazed, D., Susan Chen, Z. W., et al. (1999). Exit from mitosis is triggered by Tem1-dependent release of the protein phosphatase Cdc14 from nucleolar RENT complex. *Cell*, 97(2), 233-244.
- Schuller, D., & Casal, M. (2005). The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 68(3), 292-304.
- Sierkstra, L. N., Verbakel, J. M. A., & Verrips, C. T. (1992). Analysis of transcription and translation of glycolytic enzymes in glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 138(12).
- Somer, L., Shmulman, O., Dror, T., Hashmueli, S., & Kashi, Y. (2002). The eukaryote chaperonin CCT is a cold shock protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Stress and Chaperones*, 7(1), 47-54.
- Spellman, P. T., Sherlock, G., Zhang, M. Q., Iyer, V. R., Anders, K., Eisen, M. B., et al. (1998). Comprehensive identification of cell cycle-regulated genes of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* by microarray hybridization. *Molecular Biology of the Cell*, 9(12), 3273-3297.
- Stashenko, H., Macku, C., & Shibamoto, T. (1992). Monitoring volatile chemicals formed from must during yeast fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 40(11), 2257-2259.
- Stirling, P. C., Srayko, M., Takhar, K. S., Pozniakovsky, A., Hyman, A. A., & Leroux, M. R. (2007). Functional interaction between phosphatidylcholine-binding protein 2 and cytosolic chaperonin is essential for cytoskeletal protein function and cell cycle progression. *Molecular Biology of the Cell*, 18(6), 2336-2345.
- Stone, R. L., Matarese, V., Magee, B. B., Magee, P. T., & Bernlohr, D. A. (1990). Cloning, sequencing and chromosomal assignment of a gene from *Saccharomyces cerevisiae* which is negatively regulated by glucose and positively by lipids. *Gene*, 96(2), 171-176.
- Storici, F., Lewis, L. K., & Resnick, M. A. (2001). In vivo site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nature Biotechnology*, 19(8), 773-776.
- Susek, R. E., & Lindquist, S. L. (1989). Hsp26 of *Saccharomyces cerevisiae* is related to the superfamily of small heat shock proteins but is without a demonstrable function. *Molecular and Cellular Biology*, 9(11), 5265-5271.
- Suutari, M., Liukkonen, K., & Laakso, S. (1990). Temperature adaptation in yeasts: The role of fatty acids. *Journal of General Microbiology*, 136(8), 1469-1474.
- Swan, T. M., & Watson, K. (1997). Membrane fatty acid composition and membrane fluidity as parameters of stress tolerance in yeast. *Canadian Journal of Microbiology*, 43(1), 70-77.
- Swiegers, J. H., & Pretorius, I. S. (2005). Yeast modulation of wine flavour. *Advances in Applied Microbiology*, 57, 131-175.

Tai, S. L., Boer, V. M., Daran-Lapujade, P., Walsh, M. C., De Winde, J. H., Daran, J., *et al.* (2005). Two-dimensional transcriptome analysis in chemostat cultures: Combinatorial effects of oxygen availability and macronutrient limitation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biological Chemistry*, 280(1), 437-447.

Tai, S. L., Daran-Lapujade, P., Luttk, M. A. H., Walsh, M. C., Diderich, J. A., Krijger, G. C., *et al.* (2007a). Control of the glycolytic flux in *Saccharomyces cerevisiae* grown at low temperature: A multi-level analysis in anaerobic chemostat cultures. *Journal of Biological Chemistry*, 282(14), 10243-10251.

Tai, S. L., Daran-Lapujade, P., Walsh, M. C., Pronk, J. T., & Daran, J. (2007b). Acclimation of *Saccharomyces cerevisiae* to low temperature: A chemostat-based transcriptome analysis. *Molecular Biology of the Cell*, 18(12), 5100-5112.

Tamai, Y., Tanaka, K., Kaneko, Y., & Harashima, S. (2001). *HO* gene polymorphism in saccharomyces industrial yeasts and application of novel *HO* genes to convert homothallism to heterothallism in combination with the mating-type detection cassette. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 55(3), 333-340.

Thieringer, H. A., Jones, P. G., & Inouye, M. (1998). Cold shock and adaptation. *BioEssays*, 20(1), 49-57.

Thornton, R. J., & Eschenbruch, R. (1976). Homothallism in wine yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 42(4), 503-509.

Tkach, J. M., & Glover, J. R. (2008). Nucleocytoplasmic trafficking of the molecular chaperone Hsp104 in unstressed and heat-shocked cells. *Traffic*, 9(1), 39-56.

Tokai, M., Kawasaki, H., Kikuchi, Y., & Ouchi, K. (2000). Cloning and characterization of the *CSFI* gene of *Saccharomyces cerevisiae*, which is required for nutrient uptake at low temperature. *Journal of Bacteriology*, 182(10), 2865-2868.

Toriya, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2001). Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 79(3-4), 345-352.

Toriya, M. J., Beltran, G., Novo, M., Poblet, M., Guillamón, J. M., Mas, A., *et al.* (2003). Effects of fermentation temperature and *Saccharomyces* species on the cell fatty acid composition and presence of volatile compounds in wine. *International Journal of Food Microbiology*, 85(1-2), 127-136.

Toriya, M. J., Rozès, N., Poblet, M., Guillamón, J. M., & Mas, A. (2003). Effects of fermentation temperature on the strain population of *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology*, 80(1), 47-53.

- Ursic, D., & Culbertson, M. R. (1991). The yeast homolog to mouse *Tcp-1* affects microtubule-mediated processes. *Molecular and Cellular Biology*, 11(5), 2629-2640.
- Ursic, D., Sedbrook, J. C., Himmel, K. L., & Culbertson, M. R. (1994). The essential yeast *Tcp1* protein affects actin and microtubules. *Molecular Biology of the Cell*, 5(10), 1065-1080.
- Varela, J. C. S., Praekelt, U. M., Meacock, P. A., Planta, R. J., & Mager, W. H. (1995). The *Saccharomyces cerevisiae* *HSP12* gene is activated by the high- osmolarity glycerol pathway and negatively regulated by protein kinase A. *Molecular and Cellular Biology*, 15(11), 6232-6245.
- Varela, C., Pizarro, F., & Agosin, E. (2004). Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Applied and Environmental Microbiology*, 70(6),
- Varela, C., Cárdenas, J., Melo, F., & Agosin, E. (2005). Quantitative analysis of wine yeast gene expression profiles under winemaking conditions. *Yeast*, 22(5), 369-383.
- Viegas, C.,A., Rosa, M.,F., Sa-Correia,. & Novais, J.,M. (1989). Inhibition of yeast growth by octanoic and decanoic acids produced during ethanolic fermentation. *Applied and Environmental Micro- biology* 55, 21-28.
- Walker, G. M., Birch, R. M., Chandrasena, G., & Maynard, A. I. (1994). Roles of magnesium in yeast fermentation. *Institution of Chemical Engineers Symposium*, 1-3.
- Walker, M. E., Gardner, J. M., Vystavelova, A., McBryde, C., Lopes, M. D. B., & Jiranek, V. (2003). Application of the reuseable, KanMX selectable marker to industrial yeast: Construction and evaluation of heterothallic wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*, possessing minimal foreign DNA sequences. *FEMS Yeast Research*, 4(3), 339-347.
- Walker, M., Vystavelova, A., Pedler, S., Eglinton, J., & Jiranek, V. (2005). PCR-based gene disruption and recombinatory marker excision to produce modified industrial *Saccharomyces cerevisiae* without added sequences. *Journal of Microbiological Methods*, 63(2), 193-204.
- Wang, D., Sung, H. -, Wang, T. -, Huang, C. -, Yang, P., Chang, T., *et al.* (2007). Expression evolution in yeast genes of single-input modules is mainly due to changes in trans-acting factors. *Genome Research*, 17(8), 1161-1169.
- Watson, P. F., & Morris, G. J. (1987). Cold shock injury in animal cells. *Symposia of the Society for Experimental Biology*, 41, 311-340.
- Wickner, R. B., Koh, T. J., Crowley, J. C., O'Neil, J., & Kaback, D. B. (1987). Molecular cloning of chromosome I DNA from *Saccharomyces cerevisiae*: Isolation of the *MAK16* gene and analysis of an adjacent gene essential for growth at low temperatures. *Yeast (Chichester, England)*, 3(1), 51-57.
- Yaffe, M. B., Farr, G. W., Miklos, D., Horwich, A. L., Sternlicht, M. L., & Sternlicht, H. (1992). TCP1 complex is a molecular chaperone in tubulin biogenesis. *Nature*, 358(6383),

245-248.

Yale, J., & Bohnert, H. J. (2001). Transcript expression in *Saccharomyces cerevisiae* at high salinity. *Journal of Biological Chemistry*, 276(19), 15996-16007.

Yokota, S., Yanagi, H., Yura, T., & Kubota, H. (1999). Cytosolic chaperonin is up-regulated during cell growth. Preferential expression and binding to tubulin at G1/S transition through early S phase. *Journal of Biological Chemistry*, 274(52), 37070-37078.

Yoshida, S., Ichihashi, R., & Toh-e, A. (2003). Ras recruits mitotic exit regulator Lte1 to the bud cortex in budding yeast. *Journal of Cell Biology*, 161(5), 889-897.

Yoshikawa, K., Furusawa, C., Hirasawa, T., & Shimizu, H. (2008). Genome-wide analysis of the effects of location and number of stress response elements on gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 106(5), 507-510.

Zara, G., Mannazzu, I., Sanna, M. L., Orro, D., Farris, G. A., & Budroni, M. (2008). Exploitation of the semi-homothallic life cycle of *Saccharomyces cerevisiae* for the development of breeding strategies. *FEMS Yeast Research*, 8(7), 1147-1154.

Zhang, L., Ohta, A., Horiuchi, H., Takagi, M., & Imai, R. (2001). Multiple mechanisms regulate expression of low temperature responsive (*LOT*) genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 283(2), 531-535.

Zhang, L., Onda, K., Imai, R., Fukuda, R., Horiuchi, H., & Ohta, A. (2003). Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 307(2), 308-314.

Zhao, X., Chang, A. Y., Toh-e, A., & Arvan, P. (2007). A role for Lte1p (a low temperature essential protein involved in mitosis) in proprotein processing in the yeast secretory pathway. *Journal of Biological Chemistry*, 282(3), 1670-1678.

Zhu, H., Bilgin, M., Bangham, R., Hall, D., Casamayor, A., Bertone, P., et al. (2001). Global analysis of protein activities using proteome chips. *Science*, 293(5537), 2101-2105.

Zuzuarregui, A., & Del Olmo, M. (2004a). Expression of stress response genes in wine strains with different fermentative behavior. *FEMS Yeast Research*, 4(7), 699-710.

Zuzuarregui, A., & del Olmo, M. (2004b). Analyses of stress resistance under laboratory conditions constitute a suitable criterion for wine yeast selection. *Antonie Van Leeuwenhoek, International Journal of General and Molecular Microbiology*, 85(4), 271-280.

UNIVERSITAT ROVIRA I VIRGILI

MECANISMOS MOLECULARES Y BIOQUÍMICOS IMPLICADOS EN LA ADAPTACIÓN DE SACCHAROMYCES
CEREVISIAE A LAS BAJAS TEMPERATURAS DE FERMENTACIÓN

Rosa Ana Chiva Tomás

ISBN:978-84-694-1240-4/DL:T-321-2011