

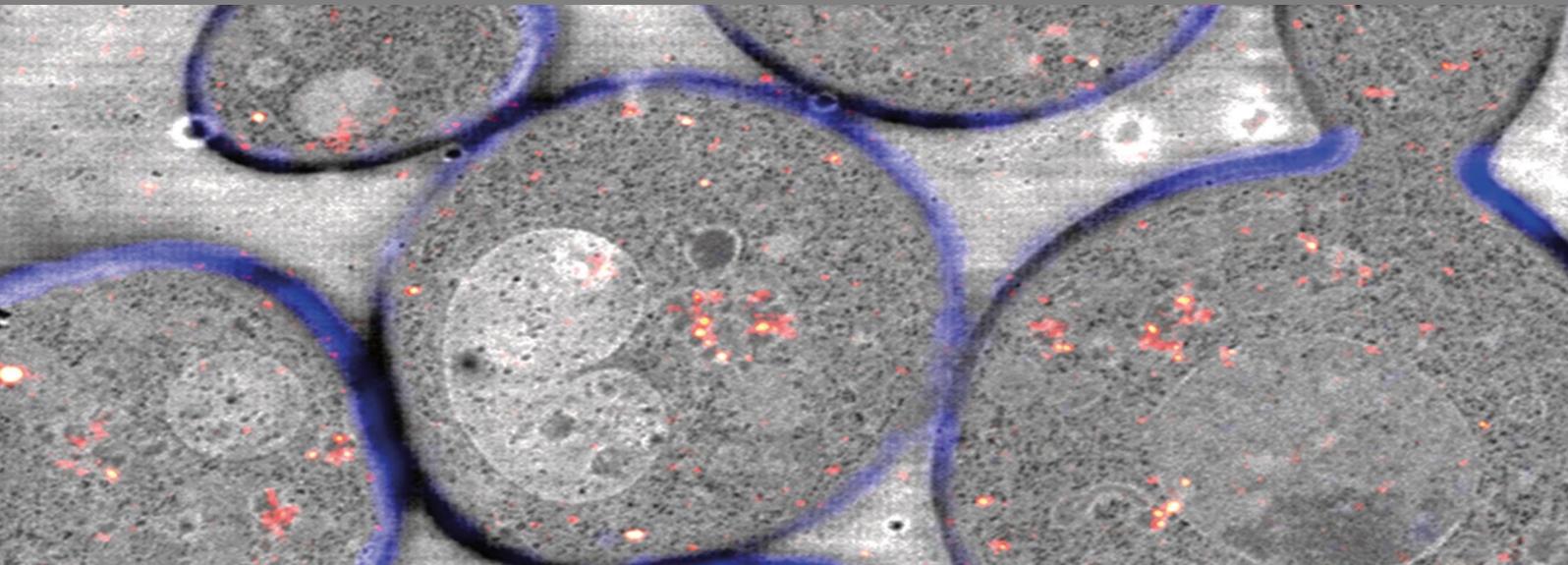


UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Instituto Universitario de
Ingeniería de Alimentos
para el Desarrollo

EVOLUCIÓN GENÓMICA POR DISEÑO MOLECULAR DE LEVADURAS INDUSTRIALES



TESIS DOCTORAL

Presentada por: Daniele Sani

Dirigida por: Dr. Alfonso Navarro Marzal
Dr. Ramón Serrano Salom

Valencia - Septiembre 2013

AGRADECIMIENTOS

Finalmente ci siamo!!

Por fin ya está!!

De esta forma acababan los agradecimientos de mi Proyecto Final de Carrera en Italia. Ya estaba todo decidido, acababa la carrera en Julio y en Septiembre empezaba mi aventura en Valencia. Objetivo: borrar de un golpe los 1.800 Km de distancia que me separaban de Maria. Claro de solo de amor no se puede vivir!! Había que buscar cómo vivir!

Así empezaba mi otra emocionante aventura que, la verdad, pensaba que iba a ser más sencilla y corta, y que ha necesitado de la ayuda de muchas personas a las que quiero expresar mis agradecimientos:

- A mis Directores de Tesis, Dr. Alfonso Navarro y Dr. Ramón Serrano, por su apoyo y consejos, así como por haberme empujado estos últimos meses en la redacción de esta Tesis Doctoral.
- A Pedro Fito, por ser mi tutor y por darme la posibilidad de integrarme en su equipo del IU-IAD.
- A Rosa Bernabeu y a Ignacio Eguiluz de la empresa Heineken España, por su disponibilidad y por haberme ayudado en la realización de algunos experimentos.
- A mis compañeros del IBMCP, por la posibilidad de trabajar en sus instalaciones como uno más y por sus consejos en los seminarios del lunes.
- A Isa, perdona si te copio..., por ser una excelente compañera de laboratorio y una mejor amiga, y a Carlos, en cualquier lugar del mundo en el que se encuentre, siempre dispuesto a echar una mano.
- A mi familia, por apoyarme y ayudarme (gracias Davide y Michi) desde la distancia.
- A Marta, por dormir mucho por la noche y permitir al papá seguir en la redacción de la Tesis. Gracias también a los iaios para haberla educado y cuidado tan bien cuando mamá y papá, por sus obligaciones, no podían.
- A Maria, sin ella esta Tesis nunca habría empezado... y tampoco habría acabado! Gracias por el apoyo, los ánimos, la comprensión, la ayuda técnica y mucho, mucho más.

Esta Tesis ha sido posible gracias a la concesión de una Beca FPU (Formación Profesorado Universitario) del Ministerio de Educación y Ciencia.

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se propone una alternativa a la coyuntura actual de rechazo social frente al uso de OMG en la industria agroalimentaria, mediante la demostración y el desarrollo de un nuevo concepto sobre el uso de las técnicas de biología molecular en la obtención de levaduras modificadas genéticamente, el concepto de Evolución Genómica por Diseño Molecular. La idea básica de este nuevo concepto es simple y se basa en imitar a la propia naturaleza en su constante evolución, pero acelerando y dirigiendo el proceso evolutivo con el objeto de seleccionar en un corto periodo de tiempo aquellos cambios genéticos que específicamente hayamos diseñado a escala molecular. Las levaduras no son una entidad invariable en el tiempo, al contrario, como todos los organismos vivos evolucionan a lo largo de las sucesivas generaciones. Mediante esta nueva metodología que hemos desarrollado, se consigue acelerar el proceso evolutivo, pues las modificaciones genéticas que hemos introducido se podrían haber efectuado espontáneamente por la levadura en su entorno natural como consecuencia de procesos de recombinación, duplicación o eliminación de elementos genéticos a lo largo de su ciclo reproductivo, aunque indudablemente se habrían perdido sin la presencia de determinadas condiciones de selección y, dada la baja probabilidad de que esos eventos ocurrieran, habrían necesitado de un inmenso periodo de tiempo.

Se ha demostrado el concepto de Evolución Genómica por Diseño Molecular, mediante la construcción e integración cromosómica de un casete de selección basado en la sobreexpresión del gen *YAPI*, que da origen a un marcador dominante que confiere resistencia a diversos compuestos tóxicos para las levaduras, tales como la cicloheximida y la cerulenina. Para el desarrollo de dicho casete de selección nos hemos impuesto y respetado las siguientes condiciones:

- 1) Utilización de la capacidad de recombinación homóloga de las levaduras del género *Saccharomyces*.
- 2) Utilización de material genético procedente exclusivamente de la propia cepa de levadura a evolucionar.
- 3) El material genético no ha de sufrir ningún paso intermedio de clonaje o expresión en otros sistemas biológicos.

Una vez cumplidas todas estas condiciones, las cepas resultantes no deberían responder a la definición oficial de organismos modificados genéticamente de la Unión Europea: “organismos en los que su material genético ha sido alterado de una manera que no sucede de forma natural mediante los procesos de reproducción sexual y/o

recombinación natural”. Para alcanzar el objetivo fundamental del proyecto, hemos trabajado inicialmente con un sistema modelo más sencillo, como es el caso de una cepa de una levadura de laboratorio y, a continuación, hemos abordado la misma aproximación experimental pero trabajando con una levadura que se emplea en la producción industrial de cerveza tipo “lager”. La metodología experimental que se ha empleado ha consistido en obtener, sólo mediante reacciones de PCR, una construcción que, posteriormente a su inserción cromosómica mediante recombinación homóloga, pone al gen *YAPI* bajo el control de un promotor fuerte de un gen de la ruta de la glicólisis, el promotor del gen *PGKI*. Se determinó si la sobreexpresión del gen *YAPI* en la cepa de levadura cervecera evolucionada, era capaz de disminuir la aparición espontánea de mutantes deficientes en respiración (“petites”) durante la fermentación del mosto cervecero. La continuada reutilización industrial de la levadura cervecera está asociada con un incremento en la frecuencia de la aparición de “petites”, con el consiguiente efecto negativo sobre el proceso fermentativo. Según los resultados obtenidos, la cepa evolucionada, presenta claramente una menor formación de “petites” durante su reutilización a lo largo de 10 microfermentaciones sucesivas, con respecto a la cepa parental.

Una vez demostrada la viabilidad del concepto de Evolución Genómica por Diseño Molecular, el paso siguiente consistió en la aplicación de dicha metodología al desarrollo de levaduras con mejores características de interés industrial. Se han diseñado reorganizaciones cromosómicas sobre 3 tipos de levaduras industriales:

- a) Una levadura de producción de cerveza tipo “lager” evolucionada para dar lugar a una baja producción de diacetilo, y en la que el fenotipo buscado se ha obtenido mediante la sobreexpresión del gen *ILV5*, que codifica para una isomerorreductasa que convierte el α -acetolactato en α - β -dihidroxiacetoato. De esta forma, se evita la acumulación de α -acetolactato en la cerveza y se acorta sensiblemente el proceso de maduración al haberse reducido la producción de diacetilo. La cepa evolucionada consigue disminuir en más de 10 días con respecto a la cepa parental el tiempo necesario para que la concentración de diacetilo esté al nivel que la práctica industrial considera aceptable para dar por finalizado el proceso de “lagering”.
- b) Una levadura en la que se ha aumentado notablemente su actividad pectinolítica, lo que presenta aplicaciones para su uso en el procesado industrial de material vegetal rico en pectina; y en la que el fenotipo buscado se ha obtenido mediante la sobreexpresión del gen *PGUI* que codifica para una endopoligalacturonasa. Se obtuvieron dos nuevas

variantes de la cepa parental, una conteniendo el casete de selección y otra en la que dicho casete se eliminó mediante un proceso denominado “pop out”, permitiendo de esta forma la reutilización de dicho casete en sucesivos diseños de reordenación genómica sobre la misma cepa. Ambas variantes presentan un notable incremento de la actividad hidrolítica sobre la pectina sin perjuicio de su producción de etanol ni de su capacidad fermentativa.

c) Una levadura vínica comercial que se ha evolucionado en busca de una mejor tolerancia frente a bajas temperaturas. Se ha intentado obtener el fenotipo deseado mediante inactivación del gen *INP51* que codifica una enzima inositol polifosfato 5-fosfatasa, implicada en la homeostasis del inositol 4, 5-difosfato, cuya pérdida de función provoca la acumulación de dicho metabolito y, según se ha descrito en la literatura, un aumento de la tolerancia al frío.

Se han obtenido nuevas cepas en las que se ha inactivado bien una copia del gen *INP51* de la cepa industrial, bien ambas copias. Sin embargo, y contrariamente a lo descrito para la cepas de laboratorio, la inactivación del gen *INP51* no aumenta la capacidad de crecimiento frente a bajas temperaturas de la cepa industrial evolucionada.

Todos estos ejemplos de aplicación de la metodología desarrollada demuestran la utilidad del concepto de Evolución Genómica por Diseño Molecular en la mejora de las cepas de levaduras industriales del género *Saccharomyces*.

RESUM

En aquesta tesi doctoral, es proposa una alternativa a la conjuntura actual de rebuig social enfront de l'ús d'OMG en la indústria agroalimentària, mitjançant la demostració i el desenvolupament d'un nou concepte sobre l'ús de les tècniques de biologia molecular en l'obtenció de llevats modificats genèticament, el concepte d'evolució Genòmica mitjançant Disseny Molecular. La idea bàsica d'aquest nou concepte és simple i es basa en imitar la pròpia naturalesa en la seva constant evolució, però accelerant i dirigint el procés evolutiu per tal de seleccionar en un curt període de temps aquells canvis genètics que específicament hàgim dissenyat a escala molecular. Els llevats no són una entitat invariable en el temps, al contrari, com tots els organismes vius evolucionen amb el temps. Mitjançant aquesta nova metodologia que hem desenvolupat, s'aconsegueix accelerar el procés evolutiu, ja que les modificacions genètiques que hem introduït es podrien haver efectuat espontàniament pel llevat en el seu entorn natural com a conseqüència de processos de recombinació, duplicació o eliminació d'elements genètics al llarg del seu cicle reproductiu, encara que indubtablement s'haurien perdut sense la presència de determinades condicions de selecció i, atesa la baixa probabilitat que aquests esdeveniments ocorreguessin, haurien necessitat d'un immens període de temps.

S'ha demostrat el concepte d'evolució Genòmica a partir del Disseny Molecular, mitjançant la construcció i integració cromosòmica d'un cassat de selecció basat en la sobreexpressió del gen *YAPI*, que dóna origen a un marcador dominant, que confereix resistència a diversos compostos tòxics per als llevats, com ara cicloheximida i cerulenina. Per al desenvolupament d'aquest cassat de selecció ens hem imposat i respectat les següents condicions:

- 1) Utilització de la capacitat de recombinació homòloga dels llevats del gènere *Saccharomyces*.
- 2) Utilització de material genètic procedent exclusivament de la pròpia soca de llevat a evolucionar.
- 3) El material genètic no ha de patir cap pas intermedi de clonatge o expressió en altres sistemes biològics.

Una vegada complertes totes aquestes condicions, les soques resultants no haurien de respondre a la definició oficial de organismes modificats genèticament de la Unió Europea: "Organismes en els que el seu material genètic ha estat alterat d'una manera que no succeeix de manera natural mitjançant els processos de reproducció sexual i / o

recombinació natural". Per assolir l'objectiu fonamental del projecte, hem treballat inicialment amb un sistema model més senzill, com és el cas de una soca d'un llevat de laboratori, i a continuació hem abordat aquesta aproximació experimental però treballant amb un llevat que s'empra en la producció industrial de cervesa tipus "lager". La metodologia experimental que s'ha dissenyat ha consistit en obtenir, només mitjançant reaccions de PCR, una construcció que, posteriorment a la seva inserció cromosòmica mitjançant recombinació homòloga, posa al gen *YAPI* sota el control d'un promotor fort d'un gen de la ruta de la glicòlisi, el promotor del gen *PGKI*. Es va determinar si la sobreexpressió del gen *YAPI* la soca cervesera evolucionada, era capaç de disminuir l'aparició espontània de mutants deficients en respiració ("Petites") durant la fermentació del most cerveser. La continuada reutilització industrial del llevat cervesera està associada amb un increment en la freqüència de l'aparició de "Petites", amb el consegüent efecte negatiu sobre el procés de fermentació. Segons els resultats obtinguts, la soca evolucionada, presenta clarament una menor formació de "Petites" durant la seva reutilització al llarg de 10 microfermentacions successives, pel que fa a la soca parental.

Quan s'ha demostrat el concepte d'evolució Genòmica mitjançant Disseny Molecular, el pas següent va consistir en l'aplicació d'aquesta metodologia al desenvolupament de llevats amb característiques d'interès industrial. S'han dissenyat reorganitzacions cromosòmiques sobre 3 tipus de llevats industrials:

a) Un llevat de producció de cervesa tipus lager evolucionada per donar lloc a una baixa producció de diacetil y en la que el fenotip buscat s'ha obtingut mitjançant la sobreexpressió del gen *ILV5* que codifica per a una isomerorreductasa que converteix el α -acetolactato en α - β -dihidroxi valerato. D'aquesta manera, s'evita l'acumulació de α -acetolactato a la cervesa i s'escurça sensiblement el procés de maduració en haver reduït la producció de diacetil. La soca evolucionada aconseguix disminuir en més de 10 dies respecte a la soca parental el temps necessari perquè la concentració de diacetil estigui al nivell que la pràctica industrial considera acceptable per donar per finalitzat el procés de "lagering".

b) Un llevat amb alta activitat pectinolítica el que presenta aplicacions per al seu ús en el processat industrial de material vegetal ric en pectina i en la que el fenotip buscat s'ha obtingut mitjançant la sobreexpressió del gen *PGUI* que codifica per a una endopoligalacturonasa. Es van obtenir dues noves variants de la soca parental, una contenint el casset de selecció i una altra en què aquest casset es va eliminar mitjançant

un procés anomenat "pop out", permetent d'aquesta manera la reutilització d'aquest casset en successius dissenys de reordenació genòmica sobre la mateixa soca. Ambdues variants presenten un notable increment de l'activitat hidrolítica sobre la pectina sense perjudici de la seva producció d'etanol i de la ni de la seva capacitat fermentativa.

c) Un llevat vínic comercial que s'ha evolucionat a la recerca d'una millor tolerància davant baixes temperatures. S'ha intentat obtenir el fenotip desitjat mitjançant inactivació del gen *INP51* que codifica un enzim inositol polifosfat 5-fosfatasa, implicat en l'homeòstasi del inositol 4, 5-difosfat, la pèrdua de funció provoca l'acumulació d'aquest metabòlit i, segons s'ha descrit en la literatura, un augment de la tolerància al fred.

S'han obtingut noves soques en què s'ha inactivat bé una còpia del gen *INP51* de la soca industrial, bé totes dues còpies. No obstant això, i contràriament al descrit per a les soques de laboratori, la inactivació del gen *INP51* no augmenta la capacitat de creixement davant baixes temperatures de la soca industrial evolucionada.

Tots aquests exemples d'aplicació de la metodologia desenvolupada, demostren la utilitat del concepte d'evolució Genòmica mitjançant Disseny Molecular a la millora de les soques de llevats industrials del gènere *Saccharomyces*.

SUMMARY

This doctoral thesis, by proving and developing a new concept on the use of molecular biology techniques for the production of genetically modified yeast, the concept of Genomic Evolution assisted by Molecular Design, proposes an alternative to the current situation of social rejection against the use of GMOs in the food industry. The basic idea of this new concept is simple. It is based on mimicking nature in its constant evolution, but hastening and directing the evolutionary process in order to select, in a short period of time, those genetic changes that we have specifically designed at molecular scale. Yeasts are not an invariable-in-time entity. On the contrary, like all living organisms, evolve over time. The new methodology we have developed can speed up the evolutionary process, since we have introduced genetic modifications that could have been made spontaneously by yeasts in their natural environment as a result of genetic elements recombination, duplication or deletion processes along of their reproductive cycle. However, these changes would have been lost without the presence of certain selection conditions and, given the low probability of these events, it would have required an immense period of time.

The concept of Genomic Evolution assisted by Molecular Design has been proved by the construction and chromosomal integration of a selection cassette based on *YAPI* gene overexpression, which gives rise to a dominant marker conferring the yeast with resistance to various toxic compounds such as cycloheximide and cerulenin. For the development of the selection cassette the following conditions have been imposed and respected:

- 1) Use of the homologous recombination ability of *Saccharomyces* genus yeast.
- 2) Use of genetic material exclusively of the own yeast strain that we're going to evolve.
- 3) The genetic material can't pass through any intermediate process of cloning or expression in other biological systems.

With all these conditions fulfilled, the resulting strains should not fit in the European official definition of GMO: "organisms in which the genetic material (DNA) has been altered in a way that does not occur naturally by mating and/or natural recombination".

To prove this concept we have first worked with a laboratory yeast strain as a model to follow with the same experimental approach but working with an industrial yeast used in the production of lager beer. The experimental methodology consisted in obtaining, only through PCR reactions, a construction which, subsequent to its chromosomal insertion by homologous recombination, will replace the original promoter of the gene

YAPI by a strong promoter, *PGK1*, whose gene is involved in the glycolysis path. It was determined whether overexpression of *YAPI* gene in the beer strain evolved was able to decrease the presence of spontaneous respiration-deficient mutants ("petites") during the fermentation of beer wort. The continued industrial reuse of brewing yeast is associated with an increase in frequency of appearance of "petites", with consequent negative effect on the fermentation process. According to our results, the evolved strain clearly showed a decrease in the "petites" formation during 10 successive microfermentations with respect to the parental strain.

Once the feasibility of the concept of Genomic Evolution assisted by Molecular Design has been proven, the next step was the application of the methodology of this concept to the development of yeast with industrial interest. Chromosomal reorganization over 3 different industrial yeasts has been designed:

a) A lager beer yeast evolved to achieve low production of diacetyl. Its phenotype was obtained by overexpression of *ILV5* gene, that encodes for a reductoisomerase converting the α -acetolactate into β -dihydroxyvalerate. This helps to prevent the α -acetolactate accumulation in worts and significantly reduces the maturation process because of the reduction in diacetyl production. In the evolved strain the lagering time is reduced in more than 10 days with respect to the wild one.

b) An industrial yeast with high pectinolytic activity for its use in the industrial processing of pectin rich materials. This phenotype was obtained by overexpression of *PGUI* gene that encodes for an endopolygalacturonase. We have obtained 2 new variants of the wild type strain, one containing the selection cassette and the other one in which the selection cassette was removed by a process called "pop out" allowing the re-use of this cassette in a new genomic reorganizations of the same strain.

Both evolved strains show a remarkable increase in the hydrolytic activity over pectin with respect to the wild type strain, not affecting its ability for the production of ethanol or its fermentative capacity.

c) A wine yeast evolved seeking for a better tolerance to low temperatures. We have tried to obtain the desired phenotype by inactivation of the gene *INP51* that encodes for an inositol polyphosphate 5-phosphatase, involved in phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis. This function lost in the enzyme induces the accumulation of the metabolite and, according to literature, confer cold-resistance properties to the phenotype.

We have obtained new strains; a transformant which has one copy of *INP51* gene inactivated and another transformant which has two copies of the same gene inactivated. Nevertheless, contrary to what happen with the parental strains, the gene inactivation does not increase the cold resistance of the evolved strain.

All the applications of the developed methodology described above show the advantages of using the concept of Genomic Evolution assisted by Molecular Design in order to improve the performance of industrial yeast strains of the *Saccharomyces* genus.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL

• ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
• ABREVIATURAS	9
• INTRODUCCIÓN	
1. Levadura y fermentación alcohólica.....	13
1.1. Civilización y levaduras	13
1.2. La levadura como sistema modelo	16
1.3. Características genéticas de las cepas de levaduras industriales	17
1.4. Mejora genética de levaduras industriales.....	20
1.4.1. Selección natural de cepas de levaduras industriales con características de interés	20
1.4.2. Métodos de mejora pertenecientes a la genética clásica.....	21
1.4.3. Técnicas de ingeniería genética.....	21
1.4.4. Problemas en la manipulación genética de las cepas de levaduras industriales.....	25
1.5. Cepas de levaduras modificadas genéticamente de interés industrial	26
2. Problemática de la comercialización de las levaduras modificadas genéticamente.....	27
2.1. Normativa concerniente a los organismos modificados genéticamente empleados en alimentación.....	28
2.2. Actitud de los consumidores hacia los OMG	38
2.3. Principales justificaciones de rechazo de los microorganismos modificados genéticamente	40
2.3.1. Riesgos ambientales por la introducción de microorganismos MG en el medio ambiente.....	40
2.3.2. Transferencia de genes bacterianos desde los microorganismos MG a los hongos y bacterias patógenas.....	42
2.3.3. Efecto tóxico y alergénico que puede provocar la expresión del nuevo material genético insertado.....	43
2.4. Estrategias para soslayar el rechazo hacia las levaduras modificadas genéticamente	44

3. Evolución de las levaduras.....	47
3.1. La duplicación total del genoma como sistema de diferenciación y evolución en la levadura.....	47
3.2. Las levaduras se adaptan al entorno que les rodea	50
3.3. Evolución de cepas de levaduras industriales.....	52
● MATERIALES Y MÉTODOS	
1. Reactivos y material biológico	63
1.1. Reactivos	63
1.2. Cepas de levadura.....	63
1.3. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	64
1.4. Plásmidos.....	65
2. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y de conservación de los microorganismos.....	65
2.1. Medios de cultivo de levaduras	65
2.2. Medios de cultivo de bacterias	69
2.3. Conservación de las cepas utilizadas.....	70
3. Técnicas de biología molecular.....	70
3.1. Obtención y purificación de ADN genómico de levadura	70
3.2. Obtención de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	70
3.3. Construcción del plásmido pYPGE15+YAP1.....	71
3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): generalidades.....	74
3.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa.....	78
3.6. Aislamiento de ADN a partir de geles de agarosa.....	80
3.7. Cuantificación de ADN	82
3.8. Secuenciación y análisis de las secuencias.....	82
3.9. Eliminación del casete de selección	82
4. Técnicas de transformación de microorganismos	83
4.1. Transformación de levaduras	83
4.2. Transformación de <i>E. coli</i>	84
5. Otras técnicas utilizadas	84
5.1. Determinación cualitativa de la actividad endopoligalacturonasa	84

5.2. Determinación del contenido en azúcares fermentables en el licor obtenido de residuos de cítricos	85
5.3. Determinación del grado alcohólico.....	86
5.4. Determinación de los grados Brix	86
5.5. Determinación de la frecuencia de aparición de mutantes deficientes en respiración	87
5.6. Determinación de diacetilo.....	88
5.7. Bioensayo de crecimiento en frío	89

● **RESULTADOS**

1. Construcción del casete de selección.....	93
1.1. Secuenciación de las zonas de interés en el genoma de la cepa S1.....	94
1.2. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$	95
1.3. Transformación de W303-1A y S1 con $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$	98
1.4. Secuenciación de los transformantes.....	104
1.5. La sobreexpresión del gen <i>YAP1</i> disminuye la aparición de mutantes petites.....	104
2. Desarrollo de una levadura industrial con alta actividad pectinolítica.....	105
2.1. Selección de una cepa de levadura industrial con un buen rendimiento en alcohol y elevada actividad endopoligalacturonasa.....	106
2.2. Secuenciación de las zonas de interés en el genoma de la cepa CECT 1926	108
2.3. Diseños y estrategia de las reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{GEPO-PGU1}$	109
2.4. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{GE-PGU1}$	115
2.5. Transformación de W303-1A y CECT 1926 con $F_{GE-PGU1}$ y $F_{GEPO-PGU1}$	118
2.6. Eliminación del casete de selección en un transformante de la cepa CECT 1926.....	119
2.7. Secuenciación de los transformantes obtenidos por integración de los distintos fragmentos conteniendo el gen <i>PGU1</i>	121

2.8. Análisis fenotípico de los transformantes obtenidos por integración de los distintos fragmentos conteniendo el gen <i>PGUI</i>	123
3. Desarrollo de una levadura industrial de elaboración de cerveza tipo lager con baja producción de diacetilo	124
3.1. Secuenciación de las zonas de interés en el genoma de la cepa S1	125
3.2. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEPO-ILV5}}$	126
3.3. Transformación de W303-1A y S1 con $F_{\text{GEPO-ILV5}}$	131
3.4. Eliminación del casete de selección en la cepa S1-PI6	132
3.5. Secuenciación de los transformantes obtenidos con el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$	134
3.6. La sobreexpresión del gen <i>ILV5</i> en la cepa S1-PI6 disminuye la producción de diacetilo	134
4. Desarrollo de una levadura vínica con mayor capacidad de crecimiento a bajas temperaturas	137
4.1. Secuenciación de las zonas de interés en el genoma de la cepa M69	137
4.2. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEPO-INP51}}$	138
4.3. Transformación de W303-1A y M69 con $F_{\text{GEPO-INP51}}$	141
4.4. Secuenciación de los transformantes obtenidos con el fragmento $F_{\text{GEPO-INP51}}$	143
4.5. La inactivación de <i>INP51</i> no incrementa la resistencia al frío en cepas industriales.....	144
• DISCUSIÓN	
1. Construcción del cassette de selección y de los fragmentos de integración	150
2. La sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> disminuye la aparición de mutantes petites	165
3. La sobreexpresión del gen <i>PGUI</i> permite la degradación de la pectina en las moléculas de ácido galacturónico que la componen	167
4. La sobreexpresión del gen <i>ILV5</i> permite disminuir la duración del proceso de “lagering”o maduración en la producción de cerveza	173

5. La inactivación de <i>INP51</i> no incrementa la resistencia al frío en cepas industriales	177
• CONCLUSIONES	181
• BIBLIOGRAFÍA	185
• ANEXO: Reactivos químicos	213

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

ÍNDICE FIGURAS

Figura 1. Recolección y producción de vino en el antiguo Egipto (1400 a. C.). Pintura presente en una tumba tebana de la XVII dinastía.	14
Figura 2. La opinión pública sobre la relación riesgos/beneficios de los alimentos modificados genéticamente.	39
Figura 3. Representación esquemática de los fenómenos que han contribuido a la formación de los genomas de las levaduras modernas.	48
Figura 4. <i>S. cerevisiae</i> var. <i>diastaticus</i> : un ejemplo de evolución molecular.	51
Figura 5. Diagrama de las reacciones de PCR para la construcción del fragmento denominado $F_{PYAPI-PPGKI-YAPI}$	94
Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos para la construcción del casete de selección.	98
Figura 7. Influencia de la concentración de acetato de litio en la mezclas de transformación sobre la frecuencia de transformación de la cepa S1.	101
Figura 8. A- Comprobación por PCR de la correcta integración de $F_{PYAPI-PPGKI-YAPI}$ en los transformantes obtenidos. B- Representación esquemática de los fragmentos que confirman la integración de $F_{PYAPI-PPGKI-YAPI}$ en el locus <i>YAPI</i>	102
Figura 9. Aparición de mutantes deficientes en respiración en las cepas S1 y S1-3T a lo largo de 10 fermentaciones sucesivas.	105
Figura 10. Determinación de la actividad endopoligalacturonasa en placas conteniendo medio YPA.	107
Figura 11. Diagrama de las reacciones de PCR realizadas para la obtención del fragmento denominado $F_{GEPO-PGU1}$	110
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos en las distintas reacciones de amplificación y de fusión realizadas a lo largo de la construcción del fragmento de integración $F_{GEPO-PGU1}$	114
Figura 13. Diagrama de las reacciones de PCR efectuadas para la obtención del fragmento denominado $F_{GE-PGU1}$	115
Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos a lo largo de la construcción de $F_{GE-PGU1}$	117

Figura 15 Comprobación mediante PCR de la correcta integración del fragmento $F_{GE-PGU1}$ en la cepa W303-1A.....	120
Figura 16. Diagrama del proceso de integración de $F_{GEPO-PGU1}$ en el ADN genómico de la cepa CECT 1926 y de la posterior eliminación del casete de selección.....	121
Figura 17. Determinación de las secuencias de los transformantes obtenidos a partir de la cepa CECT 1926.....	122
Figura 18. Determinación del aumento de la actividad PG en las cepas evolucionadas.	123
Figura 19. Valor de las áreas de los halos de hidrólisis de ácido poligalacturónico para cada cepa considerada.	124
Figura 20. Representación esquemática de la formación y eliminación del diacetilo por la levadura cervecera.	125
Figura 21. Diagrama de las reacciones de PCR llevadas a cabo para la obtención del fragmento denominado $F_{GEPO-ILV5}$	126
Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos a lo largo de la construcción de $F_{GEPO-ILV5}$	130
Figura 23. Comprobación mediante PCR de la correcta integración de $F_{GEPO-ILV5}$ en la cepa S1-PI6.....	132
Figura 24. Diagrama del proceso de integración de $F_{GEPO-ILV5}$ en el ADN genómico de la cepa S1 y de la posterior eliminación del casete de selección.....	133
Figura 25. Comprobación de la eliminación del casete de selección en la cepa S1-PI6PO.	133
Figura 26. Evolución de la concentración de diacetilo durante la fermentación y el período de guarda de un mosto industrial inoculado con las cepas S1 y S1-PI6.....	135
Figura 27. Evolución del °Bx (A), pH (B), y grado alcohólico (C) durante la fermentación de un mosto industrial inoculado con las cepas S1 y S1-PI6.	136
Figura 28. Diagrama de las reacciones de PCR llevadas a cabo para la obtención del fragmento denominado $F_{GEPO-INP51}$	138
Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos a lo largo de la construcción de $F_{GEPO-INP51}$	142
Figura 30. Comprobación mediante PCR de la correcta integración del fragmento $F_{GEPO-INP51}$ en la cepa M69.....	143

Figura 31. Comparación del crecimiento a 30 °C (condiciones control) y a 8 °C o 10 °C entre la cepa W303-1A y WDINP6. 145

Figura 32. Comparación del crecimiento a 30 °C (condiciones control) y 6 °C entre las cepas M69, M69DI1 y M69DI6. 146

Figura 33. Diagrama que representa las 2 estrategias de integración por recombinación homóloga mediante la técnica denominada “gene targeting”. 152

Figura 34. Diagrama de las reacciones de PCR usadas para la obtención del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ (segundo diseño). 154

Figura 35. Esquema de las posibles alternativas de diseño para la obtención del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ 157

Figura 36. Diagramas que detallan la secuencia de fragmentos a amplificar o fusionar en cada una de las 3 posibles estrategias de diseño para la obtención del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ 159

ÍNDICE TABLAS

Tabla 1. Breve descripción de las primeras investigaciones sobre levaduras.	16
Tabla 2. Breve descripción de los principales objetivos de mejora genética de las levaduras industriales utilizadas para la producción de vino, cerveza, pan y algunos ejemplos de manipulaciones genéticas realizadas.	29
Tabla 3. Breve descripción de algunas manipulaciones genéticas realizadas en levaduras industriales mediante técnicas de “self-cloning”	46
Tabla 4. Cepas de levadura utilizadas en esta Tesis.	64
Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo.	65
Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados en esta Tesis.	73
Tabla 7. Condiciones de las reacciones de amplificación por PCR de los fragmentos utilizados en las distintas construcciones realizadas.	78
Tabla 8. Condiciones de las reacciones de amplificación por PCR de los fragmentos integrados en los genomas de sus correspondientes cepas, y cebadores empleados posteriormente para la secuenciación de dichos fragmentos.	79
Tabla 9. Condiciones de las reacciones de PCR utilizadas para comprobar la correcta integración de los fragmentos en el ADN genómico de las cepas industriales así como la posterior eliminación del casete de selección.	81
Tabla 10. Resistencia de las cepas a cerulenina y cicloheximida y medios de selección utilizados.	84
Tabla 11. Frecuencia de transformación de W303-1A usando el plásmido pYPGE15+YAP1 o el fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ y diversas formas de selección.	99
Tabla 12. Cambios en la secuencia integrada en los transformantes con respecto a la secuencia original de $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$	103
Tabla 13. Grado alcohólico y frecuencia de transformación que presentan las 7 cepas de levaduras seleccionadas por su alta actividad PG.	108
Tabla 14. Cambios en las secuencias de PPGU1, <i>PGU1</i> y PTDH3 que presenta la cepa CECT 1926 con respecto a las secuencias depositadas en SGD.	109
Tabla 15. Frecuencias de transformación de las cepas W303-1A y CECT 1926 con el plásmido pYPGE15+YAP1 y los fragmentos $F_{GE-PGU1}$ y $F_{GEPO-PGU1}$	119

Tabla 16. Frecuencias de transformación de las cepas W303-1A y S1 con el plásmido pYPGE15+YAP1 y el fragmento F _{GEPO-ILV5}	131
Tabla 17. Transformantes secuenciados y cambios en la secuencia integrada tras la transformación de las cepas W303-1A y S1 con el fragmento F _{GEPO-ILV5}	134
Tabla 18. Frecuencias de transformación de las cepas W303-1A y M69 con el plásmido pYPGE15+YAP1 y el fragmento F _{GEPO-INP51}	142
Tabla 19. Transformantes secuenciados y cambios en la secuencia integrada tras la transformación de las cepas W303-1A y M69 con el fragmento F _{GEPO-INP51}	144

ABREVIATURAS

ABREVIATURAS

A	Adenina
cAMP	Adenosín mono fosfato cíclico
ADH	Alcohol deshidrogenasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Al-DH	Aldehido deshidrogenasa
ATP	Adenosín trifosfato
C	Citosina
Chr.	Chromosome/ Cromosoma
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CGH	Comparative Genomic Hybridization
dNTPs	Desoxirribonucleótidos trifosfato
EE. UU.	Estados Unidos
EDTA	Àcido etilendiaminotetraacético
EFSA	European Food Safety Authority
EUROSCARF	EUROpean <i>Saccharomyces Cerevisiae</i> ARchive for Functional analysis
FAO	Food and Agriculture Organization
FDA	Food and Drug Administratrion
FT	Frecuencia de Transformación
G	Guanina
GRAS	Generally Recognised As Safe
gTME	global Transcription Machinery Engineering
HGT	Horizontal Gene Transfer
ICV	Institut Coopérative du Vin
L	Litros
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani para bacterias
LiAc	Acetato de litio
mM	Millimolar
M	Molar
Min	Minutos
ml	Mililitros
mm	Millímetros
µg	Microgramos
µl	Microlitros
mM	Milimolar
MG	Modificado genéticamente
MIPS-CYGD	Munich Information center for Protein Sequences - Comprehensive Yeast Genome Database
MMG	Microorganismo Modificado Genéticamente
N	Normal
NAD ⁺	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma oxidada)
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleótido (forma reducida)
nm	Nanómetros
OMG	Organismo Modificado Genéticamente
ORF	Open Reading Frame
pb	Par de bases
PCR	Polymerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
PEG	Polietilenglicol

PG	Endopoligalacturonasa
PKA	Proteína quinasa dependiente de cAMP
PROPHECY	PROfiling of PHENotypic Characteristics in Yeast
p/v	Peso/volumen
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
rRNA	RNA ribosomal
ROS	Reactive Oxygen Species
r.p.m.	Revoluciones por minuto
RUP	Regulated Ubiquitin/Proteasome
SD	Medio mínimo sintético definido para levaduras
SDPA	Medio mínimo sintético con ácido poligalacturónico
SDS	Dodecil sulfato sódico
SGD	<i>Saccharomyces</i> Genome Database
SOB	Medio para la preparación de células competentes de <i>E. coli</i>
SOC	Medio para la recuperación de las bacterias transformadas
ss carrier	ADN monocatenario de alto peso molecular
T	Timina
TAE	Tris-Acetato-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tampón Tris- Borato-EDTA
gTME	global Transcription Machinery Engineering
Tris	Tris (hidroximetil) aminometano
Trp	Triptofano
TTC	Cloruro de 2, 3,5 Trifeniltetrazolium
UFC	Unidades formadoras de colonias
UV	Ultravioleta
v/v	Volumen/volumen
YNB	Yeast Nitrogen base
YPA	Medio complejo con ácido poligalacturónico
YPD	Yeast extract Peptone Dextrose
YPD	Yeast proteome database
YPDT	Yeast extract Peptone Dextrose Tryptofane
YPG	Yeast extract Peptone Glycerol
WGD	Whole Genome Duplication
WHO	World Health Organization

INTRODUCCIÓN

1. Levadura y fermentación alcohólica

Durante millares de años las levaduras del género *Saccharomyces* han sido utilizadas habitualmente por el hombre para la producción de alimentos fermentados tales como el pan, el vino, la cerveza, el sake, etc. Fue a mitad del s. XIX cuando Pasteur consiguió demostrar su importancia en la producción de alimentos fermentados, al transformar azúcares sencillos en dióxido de carbono y etanol. A partir de este descubrimiento, el conocimiento sobre la bioquímica, la biología y la genética de las levaduras del género *Saccharomyces* ha sufrido un inmenso progreso, avances que han ido desde la aplicación de las técnicas de ingeniería genética cuando se desarrolló un eficaz sistema de transformación para dichas levaduras (Hinnen *et al.*, 1978), hasta la secuenciación completa de su genoma (Goffeau *et al.*, 1996; Goffeau, 2000), su establecimiento como sistema eucariota modelo por antonomasia y el desarrollo de numerosas cepas modificadas genéticamente con fines y aplicaciones biotecnológicas. Sin embargo, hasta la fecha, y pese a los numerosos ejemplos descritos en la bibliografía (Dixon, 2000; Pretorius, 2000; Dequin, 2001; Cebollero *et al.*, 2007), sólo dos levaduras modificadas genéticamente y de interés en la industria agro-alimentaria están siendo comercializadas en Norte America (Coulon *et al.*, 2006; Husnik *et al.*, 2006), aunque no se dispone de datos acerca de su utilización, Las razones de esta situación residen, fundamentalmente, en el drástico y vehemente rechazo por parte de los consumidores, y de muy diversas organizaciones de carácter ecologista, medioambiental, social y político, a adquirir alimentos que contengan o hayan sido fabricados a partir de un organismo modificado genéticamente (OMG).

1.1. Civilización y levaduras

A lo largo de la historia, las levaduras han permanecido asociadas al desarrollo y progreso de distintas civilizaciones: en todo el mundo, diferentes culturas con un diverso grado de desarrollo descubrieron como elaborar productos fermentados a partir de materias primas que sirvieron como fuentes de azúcares presentes en su hábitat (McGovern, 2003). Según Charlie Bamforth, Profesor de Ciencia de la Cerveza en la Fundación Anheuser-Bush de la Universidad Davis de California (EE.UU.), la civilización moderna tiene sus orígenes en el procesamiento de la cebada, ya que la necesidad de cultivar y almacenar este cereal para su posterior procesamiento fue la

causa que impulsó a nuestros antepasados a instalarse en pequeñas comunidades, en vez de seguir con la vida nómada (Bamforth, 2009).

Se han encontrado evidencias de la producción de una bebida fermentada en China en el 7.000 a. C. (McGovern *et al.*, 2004), y los historiadores creen que el vino empezó a producirse en el Cáucaso y en Mesopotamia hace unos 8.000 años (Robinson, 1994), mientras que es notorio que hace unos 6.000 años los sumerios producían vino y cerveza (Michel *et al.*, 1992 y 1993; McGovern *et al.*, 1995). En particular, la utilización de la fermentación alcohólica se reconoce por la mención que se hace en unas tablillas de arcilla con lenguaje cuneiforme sobre la preparación de una bebida estimulante que llamaban “sikaru” y cuya antigüedad se remonta a 4.000 años a. C. Los egipcios, recogiendo los métodos sumerios, elaboraron una cerveza que bautizaron con el nombre de “zythum” (cerveza, traducido literalmente como vino de cebada), descubrieron la malta y añadieron azafrán, miel, jengibre y comino con objeto de proporcionarle aroma y color. Según Delwen Samuel, la cerveza y el pan eran la base de la dieta de los antiguos egipcios: “todos, desde el faraón hasta el campesino beben cerveza y comen pan y una comida no sería completa sin estos dos alimentos” (Samuel, 2001). Existen muchas evidencias que muestran que los egipcios conocían los efectos de las levaduras y cómo estas eran aplicadas a la elaboración del pan y la cerveza (Samuel, 1996).



Figura 1. Recolección y producción de vino en el antiguo Egipto (1400 a. C.). Pintura presente en una tumba tebana de la XVII dinastía.

Desde Oriente Medio, la tecnología de la fermentación se extendió por los países de la cuenca oriental del Mediterráneo y, sucesivamente, a toda Europa. Entre los romanos y los griegos el vino era considerado el producto de excelencia, mientras los pueblos del norte de Europa festejaban con cerveza las fiestas familiares, las solemnidades religiosas y los triunfos sobre sus enemigos.

En estas épocas remotas, el arte de producir bebidas alcohólicas tenía un aura de misterio y a la vez de magia, y se consideraba necesaria una intervención divina para la producción de dichos alimentos. En la civilización egipcia, Osiris, dios de la resurrección, de la vegetación y de la agricultura, enseñó al hombre el cultivo de la vid y el arte de fabricar el vino y la cerveza; en la civilización griega, el vino era considerado como un don de los dioses y todos los mitos concuerdan en atribuir a Dioniso, el más joven hijo de Zeus, la introducción del cultivo de la vid entre los hombres; la Biblia (Génesis 9, 20-27) nos dice que Noé fue el primer cultivador de la vid; en el imperio romano existía el culto de Bacco, dios del vino, de la vendimia y de los vicios. Ciertamente, los productos fermentados eran un misterio ya que se descubrió de forma casual su elaboración y se desconocía la existencia de microorganismos como levaduras y bacterias lácticas capaces de realizar el proceso de fermentación. Es muy probable que el primer hinchamiento de la masa de pan surgiera casualmente, a partir de una mezcla de agua y harina dejada más tiempo del normal a temperatura ambiente antes de la cocción, fermentada por la acción de la levadura presente en la harina. De igual modo, cabe suponer que los orígenes del vino y de la cerveza radicasen en zumo de uva o gachas (especie de papilla a base de cereales y agua) que no se consumieron de inmediato.

En la Edad Media la elaboración de cerveza era una cotidiana tarea doméstica, normalmente realizada por las mujeres, aunque su producción siguió siendo un misterio. Sólo en monasterios y abadías, debido al elevado número de comensales, se producía en volúmenes apreciables. En esta época, las bebidas alcohólicas tenían una importante función sanitaria ya que debido a su elevado contenido en etanol y bajo pH, evitaban la proliferación de microorganismos patógenos mejorando la calidad del agua. Sólo con la llegada de la Revolución Industrial se empezó a producir cerveza de forma comercial a gran escala, gracias a la introducción de tecnologías que permitían la producción masiva y al urbanismo que concentraba mucha gente en la misma ciudad (Boulton y Quain, 2001). En un principio las cervecerías cubrían las necesidades de la comunidad local y, posteriormente, el desarrollo de eficientes sistemas de transporte permitió una ulterior expansión. En este período la fermentación seguía siendo un misterio, pero por poco tiempo ya que a finales de la primera mitad del s. XIX, algunos investigadores consideraron que la presencia de un organismo vivo era responsable del fenómeno fermentativo (en la Tabla 1 se resumen las primeras investigaciones sobre levaduras) y en 1857, después de tres años de estudio, Pasteur publicó su “Mémoire sur la

fermentation alcoolique” donde recopilaba unos resultados que demostraban el papel de las levaduras como artífices de la transformación de los azúcares en etanol y dióxido de carbono (Pasteur, 1857).

<p>1680, Antoine Van Leeuwenhoek realizó las primeras observaciones al microscopio de células de levaduras presentes en un mosto en fermentación.</p>
<p>1837, tres investigadores, C. Cagniard Latour, Th. Schwann y F. Kützing, consideraron, trabajando independientemente, que la levadura que aparece durante la fermentación alcohólica era una planta microscópica, y que la conversión de los azúcares en alcohol etílico y dióxido de carbono, característicos de la fermentación alcohólica, era una función fisiológica de la célula de levadura (Cagniard Latour, 1837). El mismo año Schwann llamó a la levadura “zuckerpilz” (hongo del azúcar) (Schwann, 1837).</p>
<p>1838, J. Meyen tradujo la palabra “zuckerpilz” en latín confiriendo al microorganismo su nombre biológico <i>Saccharomyces</i>. Además, llamó al microorganismo <i>S. pomorum</i>, <i>vini</i> o <i>cerevisiae</i> según fuera aislado de zumo de manzana fermentado, vino o cerveza (Meyen, 1838). No obstante, la teoría de que organismos vivos eran los responsables del proceso de fermentación alcohólica encontró fuerte resistencia por parte de eminentes químicos como Liebig.</p>
<p>1857, L. Pasteur demostró definitivamente el papel esencial de las levaduras en la fermentación alcohólica (Pasteur, 1857).</p>
<p>1883, E. C. Hansen desarrolló técnicas para la obtención de cultivos puros de levadura y aisló la primera cepa cervecera en la cervecería danesa Carlsberg, que denominó “Carlsberg Yeast Number 1” (Hansen, 1883).</p>
<p>1890, Muller-Thurgau obtuvo el primer cultivo puro de una levadura vínica.</p>
<p>1908, E. C. Hansen denominó <i>Saccharomyces carlbergensis</i> a la primera cepa cervecera aislada en 1883 en reconocimiento a su diferencia con las levaduras tipo Ale utilizadas en la elaboración tradicional de cerveza en Bélgica, Alemania y Gran Bretaña (Hansen, 1908).</p>

Tabla 1. Breve descripción de las primeras investigaciones sobre levaduras.

1.2. La levadura como sistema modelo

A partir de los resultados de Pasteur, nuestro conocimiento y comprensión acerca de las levaduras del género *Saccharomyces* han aumentado hasta tal punto que hoy la levadura *Saccharomyces cerevisiae* se ha convertido en el microorganismo eucariota más utilizado como sistema modelo en multitud de estudios bioquímicos, genéticos y de biología molecular y celular (Sherman, 2002). Son muchas las ventajas que ofrece este

microorganismo: su facilidad de cultivo, su carácter unicelular, un ciclo de reproducción conocido, un sistema genético bien caracterizado, la existencia de un eficaz procedimiento de transformación, la presencia de numerosas cepas mutantes auxotróficas, la disponibilidad de la secuencia completa de su genoma (Goffeau *et al.*, 1996; Goffeau, 2000) y la caracterización de más del 74% del total de sus genes (Peña-Castillo y Hughes, 2007).

Actualmente, existen en Internet diversas bases de datos, como *Saccharomyces* Genome Database (SGD; <http://www.yeastgenome.org/>) (Cherry *et al.*, 1998; Ball *et al.*, 2001), The Comprehensive Yeast Genome Database (CYGD; <http://mips.gsf.de/genre/nog/yeast>) (Güldener *et al.*, 2005) Munich Information Center for Protein Sequences (MIPS; <http://mips.gsf.de/>) (Mewes *et al.*, 2006), Yeast Proteome Database (YPD; <http://www.proteome.com/>) (Hodges *et al.*, 1998), European *Saccharomyces Cerevisiae* Archive for Functional Analysis (EUROSCARF; <http://web.uni-frankfurt.de/fb15/mikro/euroscarf/index.html>), Profiling of Phenotypic Characteristics in Yeast (PROPHECY; <http://prophecy.lundberg.gu.se/>) (Fernandez Ricaud *et al.*, 2007), etc., que recopilan abundante información sobre *S. cerevisiae*, de muy diversos campos como genómica, transcriptómica, proteómica, metabolómica, etc. Además de todas las ventajas expuestas anteriormente, hay que añadir que la levadura *S. cerevisiae* es un microorganismo seguro desde el punto de vista alimentario, ya que posee el estatus “GRAS” (del inglés, Generally Recognised As Safe) otorgado por la FDA (Food and Drug Administration, EE. UU.).

1.3. Características genéticas de las cepas de levaduras industriales

Teniendo en cuenta la actual nomenclatura taxonómica, prácticamente todas las cepas de levaduras industriales utilizadas para la elaboración de pan, vino, cerveza y sake pertenecen a especies del complejo *Saccharomyces* “*sensu stricto*”. Las cepas panaderas así como muchas cepas vnicas y la casi totalidad de cepas para la producción de cerveza tipo Ale han sido catalogadas como *Saccharomyces cerevisiae*. Por lo tanto, su información genética debe de presentar un alto grado de similitud con las cepas de laboratorio y para el análisis y la ingeniería genética de estas cepas se pueden utilizar las numerosas bases de datos presente en la Web que recopilan mucha información sobre *Saccharomyces cerevisiae*. Sin embargo, recientemente varias investigaciones han

demostrado que cepas catalogadas como *S. cerevisiae* en realidad eran híbridos entre dos o más especies (Hittinger 2013). Algunas cepas vínicas mal identificadas como *S. cerevisiae*, han sido descritas como híbridos de *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii* (Borneman *et al.*, 2012; González *et al.*, 2006). Además, estos mismos autores, han encontrado en cepas vínicas un triple híbrido de *S. bayanus* var. *uvarum* con *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*. También cepas para la producción de cerveza tipo Ale parecen ser híbridos (Rainieri *et al.*, 2006). González *et al.* (2008) han demostrado, mediante el análisis del polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP, del inglés Restriction Fragment Length Polymorphism) de varias zonas del genoma amplificadas por PCR, que cepas de levaduras aisladas en botellas de cerveza trapista y anteriormente catalogadas como *S. cerevisiae*, son en realidad un nuevo tipo de híbridos entre *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*. Estas cepas híbridas conservan muchos genes de *S. kudriavzevii* que permiten una mayor adaptación de dichas cepas a las bajas temperaturas en las que se realiza el proceso fermentativo (Peris *et al.*, 2012).

La situación es diferente para algunas cepas vínicas, para las cepas de producción de sidra, así como para las cepas cerveceras utilizadas para la producción de cerveza tipo lager. Algunas cepas vínicas pertenecen a las especies *S. bayanus* o *S. uvarum*, mientras que las cepas lager originariamente denominada por Hansen como *S. carlsbergensis*, pertenecen a la especie *S. pastorianus*. Tanto *S. bayanus* como *S. pastorianus* contienen cepas diversas, con diferentes características genéticas y metabólicas, que pueden tener un origen híbrido.

Basándose en datos moleculares y genéticos, las cepas de *Saccharomyces bayanus* han sido divididas en dos grupos (Naumov, 2000; Nguyen y Gaillardin, 1997; Nguyen *et al.*, 2000): *S. bayanus* var. *bayanus* (que incluye la cepa tipo CBS 380) que contiene una mezcla de cultivos híbridos y *S. bayanus* var. *uvarum* (comúnmente referido como *S. uvarum*) que contiene cultivos no híbridos con características fenotípicas y genotípicas homogéneas. Nguyen *et al.* (2000) demostraron que la cepa tipo CBS 380 era en realidad un híbrido natural de *S. cerevisiae* con *S. bayanus* var. *uvarum*. Varios híbridos de *S. cerevisiae* con *S. bayanus* var. *uvarum* han sido aislados en Italia, Francia, Hungría y España (Masneuf *et al.*, 1998; Antunovics *et al.*, 2005; Demuyter *et al.*, 2004; Le Jeune *et al.*, 2007; González *et al.*, 2006), sin embargo apenas han sido caracterizados y serían necesarios estudios similares a los realizados para *S. pastorianus* para entender su composición genética y sus orígenes.

Varios estudios genéticos han revelado que *S. pastorianus* es un híbrido natural entre 2 o más especies diferentes (Rainieri *et al.*, 2006; Caesar *et al.*, 2007; Smart, 2007; Dunn y Sherlock, 2008). A pesar de los numerosos estudios genéticos realizados, hasta hace muy poco tiempo se conocía sólo a uno de los progenitores: *S. cerevisiae*, quien le confiere al híbrido su extraordinaria capacidad fermentativa. La otra mitad, responsable de aportar la capacidad de crecimiento a bajas temperaturas, ha sido hasta hace poco, un misterio. Numerosos estudios identificaban a *S. bayanus* y *S. bayanus* var. *uvarum*, que como es sabido son más tolerantes al frío que *S. cerevisiae*, como las cepas que han contribuido a la formación del genoma alotetraploide de *S. pastorianus*, aunque también consideraban posible la existencia de una especie desconocida característica de las cepas lager (Casaregola *et al.*, 2001; Hornsey, 2003; Kodama *et al.*, 2005; Naumova *et al.*, 2005; Rainieri *et al.*, 2006). El análisis de la secuencia del genoma de algunas cepas cerveceras (Kodama *et al.*, 2005; Nakao *et al.*, 2009) confirma la naturaleza híbrida de las cepas cerveceras y que *S. cerevisiae*, y probablemente, *S. bayanus* han contribuido a la formación del genoma de *S. pastorianus*, pues la secuencia de los genes procedentes de cromosomas homólogos con *S. cerevisiae* muestra un 99% de analogía con la secuencia publicada en la base de datos SGD, mientras que en el caso de los genes procedente de cromosomas homeólogos con *S. cerevisiae*, se observa una analogía comprendida entre el 93-99% con la secuencia publicada de *S. bayanus*.

Recientemente parece que se ha desvelado el misterio que rodeaba esta cepa híbrida. Libkind *et al.* (2011) aislaron en los fríos bosques de la Patagonia Argentina una cepa que, posteriormente, descubrieron que parece ser una nueva especie de levadura. Al secuenciar su genoma completo, pudieron comprobar que se trataba del donante desconocido de *S. pastorianus*, ya que su ADN muestra un 99,5% de analogía con el genoma lager de *S. pastorianus*. Los investigadores denominaron a esta nueva levadura como *S. eubayanus* debido a su similitud con *S. bayanus*. Aún queda por demostrar cómo se originó el híbrido, si *S. eubayanus* estuvo o está presente en Europa o si vino transportada por uno de los primeros transatlánticos que unían América con Europa. Lo que sí que está claro es que *S. eubayanus* no es una especie característica sólo de *S. pastorianus*, sino que contribuye también a formar el genoma híbrido de algunas cepas de *S. bayanus* (Pengelly y Wheals, 2013).

1.4. Mejora genética de levaduras industriales

La mejora genética de cepas de levaduras industriales se ha logrado principalmente a través de tres metodologías: selección natural, técnicas tradicionales de genética (cruzamiento, mutagénesis, fusión de esferoplastos, “rare mating” y citoducción) y técnicas de ingeniería genética. A continuación se explican brevemente cada una de estas tres metodologías junto con las dificultades que se encuentran en su aplicación a la mejora genética de las levaduras industriales.

1.4.1. Selección natural de cepas de levaduras industriales con características de interés

Tradicionalmente la producción de vino, cerveza y pan era un proceso espontáneo llevado a cabo por la microflora presente sin un control microbiológico determinado. Hasta la década de los años setenta del pasado siglo, el único proceso de mejora genética al que la levadura se había visto sometida había sido puramente empírico, habiéndose seleccionado aquellas variantes naturales que realizaban mejor la fermentación o que tenían determinadas características, como mayor producción de aromas, mejor crecimiento sobre determinados substratos o bajo ciertas condiciones de elaboración, etc. Al obrar así, aunque de forma inconsciente, el hombre ha realizado mejora genética de las levaduras utilizadas para la elaboración de los productos fermentados y, hoy en día, es evidente que el genoma actual de dichas levaduras es el resultado de una fuerte presión de selección ejercitada durante millones de generaciones (Querol *et al.*, 2003; Sicard y Legras, 2011). A partir de los estudios de Hansen, ha sido habitual el uso de cultivos puros de levaduras como iniciadores de la etapa de fermentación en diferentes procesos industriales, y muchas compañías han seleccionado su propia levadura con el fin de garantizar y mejorar la calidad de sus productos. De esta manera se han seleccionado cepas que presentan características de interés industrial, pero es difícil encontrar en la naturaleza cepas que presenten varias de ellas simultáneamente. Una alternativa a la selección de cepas de levadura completamente nuevas, consiste en la mejora genética de las cepas que ya han sido seleccionadas previamente y que están incluso en uso, con el fin de, conservando las propiedades iniciales por las que han sido seleccionadas, alterar sólo la característica de interés.

1.4.2. Métodos de mejora pertenecientes a la genética clásica

La primera aproximación a la mejora genética de cepas de levaduras ha sido el cruzamiento de cepas parentales poseedoras de características ventajosas y la selección de la descendencia con el fenotipo buscado. Esta aproximación produce alta diversidad genética y puede ser utilizada para combinar genotipos y características deseables en una sola cepa (Attfield y Bell, 2003). Además, los microorganismos obtenidos con esta tecnología no responden a la definición de OMG. Su limitación es que sólo es aplicable a cepas de levaduras que puedan producir una cierta cantidad de esporas viables. Debido a la compleja estructura genética de las cepas de levaduras industriales (ver el apartado 1.3.), el cruzamiento de dichas cepas así como un análisis directo de las tétradas y el aislamiento de las mutaciones recesivas muchas veces no ha sido posible.

Por lo tanto, se han desarrollado métodos alternativos (pertenecientes a la denominada genética clásica), como la mutagénesis al azar seguida de una laboriosa selección de cepas y la hibridación en sus distintas variantes (“rare mating”, fusión de protoplastos, la citoducción, etc.) (Dequin, 2001). Estos métodos son lentos y pocos específicos ya que la mejora de ciertos aspectos puede ir acompañada del detrimento de otros. Otro inconveniente es que estos procedimientos dan lugar a un gran número de células viables, de las cuales sólo una proporción muy baja tendrá mejorado el carácter deseado y además pueden ser portadoras de cambios o mutaciones inadecuadas desde el punto de vista industrial. Además, los mutantes o las cepas obtenidas en los cruzamientos pueden ser genéticamente inestables, dando lugar a la pérdida del carácter seleccionado o de otras propiedades de interés industrial, por lo que la estabilidad genética es uno de los rasgos más importantes que hay que verificar en las cepas obtenidas. En el caso de la conjugación sexual hay que considerar que al combinar genomas muy diferentes (como también ocurre en el caso de la fusión de protoplastos), es difícil predecir las consecuencias de la combinación y puede ser necesario llevar a cabo varios retrocruzamientos para recuperar las características de interés de alguna de las cepas de partida.

1.4.3. Técnicas de ingeniería genética

Desde hace unos años los investigadores disponen de las técnicas de la ingeniería genética, que permiten introducir modificaciones específicas y dirigidas hacia un aspecto concreto de interés; además, también permiten introducir genes heterólogos

ofreciendo un gran abanico de posibilidades. La gran ventaja de esta tecnología es que permite la manipulación específica de un fragmento genético en concreto sin la acumulación de mutaciones no deseadas. El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante ha permitido la mejora de las cepas de levaduras industriales mediante técnicas de ingeniería metabólica. Se define la ingeniería metabólica como la modificación o la introducción de nuevas reacciones bioquímicas para la mejora específica de propiedades celulares mediante la tecnología del ADN recombinante (Bailey, 1991). La ingeniería metabólica se emplea para mejorar rendimientos de formación de productos, reestructurar o crear nuevas rutas metabólicas, extender el intervalo de sustratos metabolizables, obtener productos nuevos en la célula huésped, dirigir o reducir el flujo hacia una ramificación deseada, etc. En general, las etapas en la mejora de una vía metabólica pueden resumirse en dos: 1) análisis del metabolismo celular con el fin de identificar las rutas metabólicas más prometedoras cuya alteración confiere a la cepa de levadura modificada características de interés industrial; 2) identificación del tipo de modificación genética más apropiado para obtener el fenotipo deseado.

Bailey *et al.* (2002) han introducido además el concepto de “Ingeniería Metabólica Inversa”, definida como “la elucidación de una estrategia de ingeniería metabólica que pasa por las siguientes etapas: primero la identificación, construcción o cálculo de un fenotipo deseado; luego, la determinación de los factores ambientales o genéticos que le confieren dicho fenotipo; y por último, la introducción del fenotipo sobre otra cepa u organismo por manipulación ambiental o genética dirigida.” La selección del fenotipo deseado es el primer paso de la ingeniería metabólica inversa. El fenotipo deseado puede originarse naturalmente o puede ser obtenido mediante ingeniería evolutiva, es decir aplicando una determinada presión de selección a un cultivo celular en continua fase de crecimiento exponencial hasta obtener el fenotipo buscado (Sauer y Schlattner, 2004). El segundo paso es la identificación de las bases genéticas que expliquen las diferencias entre las cepas con un fenotipo deseable y la cepa que se quiere modificar. Este paso comporta el más grande desafío de la ingeniería metabólica inversa, sin embargo métodos transcriptómicos, proteómicos y metabolómicos que monitorizan la expresión génica global han facilitado dicha identificación. El último paso consiste en la utilización de la ingeniería genética (generalmente mediante la sobreexpresión, la introducción, o la eliminación de los genes identificados mediante los métodos ómicos) para obtener el fenotipo deseado.

La aplicación de las técnicas de ingeniería genética ha conducido a numerosos éxitos en la mejora de cepas de levaduras industriales (ver apartado 1.5.), sin embargo, la explotación comercial de estas herramientas biotecnológicas empleadas en la mejora genética de levaduras industriales en el campo de la alimentación ha sido prácticamente nula. Curiosamente, en los últimos años se ha despertado el interés del sector productivo por los métodos de mejora pertenecientes a la genética clásica, como alternativa a algunos éxitos de la ingeniería genética, pero tratando de evitar sus contrapartidas negativas desde el punto de vista normativo y comercial. Cordente *et al.* (2009), usando una técnica de mutación perteneciente a la genética clásica (resuspensión de las células de levadura en un tampón fosfato conteniendo metanosulfonato de etilo, compuesto químico con propiedades mutagénicas), aislaron mutantes de una cepa vínica que producen significativamente menores cantidades de H₂S con respecto a la cepa parental. Coloretti *et al.* (2005) obtuvieron unos nuevos híbridos con características deseables para la producción de vinos espumosos, mediante cruce de cepas floculentas de *S. cerevisiae* con cepas no floculentas de *S. uvarum*. Blieck *et al.* (2007) aislaron variantes de CMBS33, cepa de levadura para la producción de cerveza tipo lager, con mejor capacidad de fermentación de mostos de alta concentración (en inglés, “high gravity”) en extracto seco primitivo. Para la obtención de dichas variantes, sometieron un cultivo de la cepa parental a tratamiento con radiación ultravioleta y, a continuación, se realizó una selección de las cepas mutantes obtenidas, mediante sucesivas fermentaciones de mostos de elevado extracto seco primitivo. Teunissen *et al.* (2002) consiguieron mejorar la tolerancia a congelación de una cepa panadera. Para ello, en primer lugar sometieron un cultivo de la levadura panadera al efecto de la radiación ultravioleta. Sucesivamente inocularon y fermentaron una masa panaria con las células supervivientes a la luz ultravioleta y, finalmente, seleccionaron los mutantes mediante 200 ciclos de congelamiento y descongelación. Kutyna *et al.* (2012) seleccionaron cepas de levadura vínica en presencia de sulfito y a pH alcalino. De esta forma consiguieron aislar un mutante con alta producción de glicerol y mayor resistencia a sulfito.

Mención a parte merece la ingeniería de la maquinaria de transcripción, gTME (de las siglas en inglés “global Transcription Machinery Engineering”), donde es posible alterar las propiedades de la levadura por manipulación de los factores de transcripción (Alper *et al.*, 2006; Lam *et al.*, 2010). Esta metodología se basa en la introducción de mutaciones al azar en uno o más factores de transcripción, induciendo de tal forma cambios en la expresión de los genes que se encuentran bajo su regulación. Después de

la selección de clones con fenotipo mejorado, se pueden identificar los genes mutados responsables de las nuevas características. A diferencia de técnicas como la mutagénesis al azar, la gTME permite la identificación de las mutaciones y, por tanto, la modificación genética responsable del fenotipo mejorado se puede transferir fácilmente a otras cepas de levadura.

Estos últimos años, gracias a las nuevas técnicas que han dado lugar al acceso a miles de datos, al mayor poder computacional y a los nuevos algoritmos, está cambiando la forma de investigar de muchos científicos. De hecho, alrededor del año 2000, se ha desarrollado una nueva disciplina denominada Biología de Sistemas capaz de integrar en su seno a expertos procedentes de áreas como la biología, la informática, la física o las matemáticas.

La Biología de Sistemas consiste en el estudio de un organismo o sistema biológico, visto como un sistema integrado e interrelacionado de genes, proteínas y reacciones bioquímicas que dan lugar a procesos biológicos. En lugar de analizar los componentes individuales de un organismo, los biólogos de sistemas se centran en todos los componentes y sus interacciones como parte de un único sistema, que serán las responsables de la biología del organismo. Mediante las técnicas experimentales se generan gran cantidad de datos de tipo biológico que se transforman en conocimiento mediante el empleo de diferentes tecnologías computacionales basadas en el desarrollo de algoritmos. El objetivo final es realizar modelos matemáticos, que permitan predecir el comportamiento de sistemas biológicos complejos y, en último término, modificar o incluso diseñar estos sistemas en base a determinadas necesidades.

Como se ha comentado en el apartado 1.2. de este capítulo, son muchos los datos que disponemos actualmente sobre *S. cerevisiae* gracias al uso de las herramientas experimentales que aporta la ingeniería metabólica. Sin embargo, hoy en día se recopilan sólo unos pocos ejemplos de cómo la Biología de Sistemas ha tenido efecto sobre la ingeniería metabólica y la industria biotecnológica (Nielsen y Jewett, 2007). En un futuro, cuando se hayan desarrollado modelos matemáticos más avanzados y algoritmos bioinformáticos hechos a medida para la ingeniería metabólica, la biología de sistemas permitirá realizar análisis de la complejidad celular y la optimización de las rutas metabólicas gracias a que, mediante sus herramientas computacionales y teóricas, posibilita la elaboración de cálculos de los componentes implicados en las rutas, la modelización de las relaciones que existen entre dichos componentes, el diseño de representaciones matemáticas de la ruta metabólica, el conocimiento de las propiedades

del sistema y su comparación con los datos experimentales del proceso celular (Deckwer *et al.*, 2006).

1.4.4. Problemas en la manipulación genética de las cepas de levaduras industriales

Para mejorar las características de interés industrial de una determinada cepa de levadura, generalmente se aplican primero las técnicas de ingeniería genética a una cepa de laboratorio y posteriormente se vuelven a aplicar a la cepa que se quiere mejorar. Esto es debido a que es mucho más sencilla la manipulación genética de una cepa de laboratorio con respecto a una cepa de levadura industrial. Las cepas de laboratorio son segregantes meióticos de cepas de levaduras industriales. Dichas cepas de laboratorio presentan unas determinadas características: son normalmente isogénicas, son diploides o haploides del tipo de conjugación sexual “*a*” o “*α*”, presentan capacidad de esporulación cuando son diploides y son portadoras de diversas mutaciones auxotróficas, como por ejemplo: *leu2*, *ura3*, *his3*, *trp1*, etc. Por otro lado, las cepas de levaduras industriales son prototofas, genéticamente diversas, normalmente son diploides o poliploides e incluso aneuploides o aloaneuploides, con baja o ninguna capacidad para esporular, y las cepas que lo hacen presentan una baja tasa de viabilidad de esporas; además, casi todas las cepas son homotálicas y los segregantes meióticos diploidizan rápidamente. Por lo tanto, los sistemas de manipulación genética desarrollados para las levaduras de laboratorio, difícilmente son directamente aplicables a las levaduras industriales, y se conocen muchos casos donde una determinada técnica de ingeniería genética funciona bien en una cepa de laboratorio pero no en una cepa de levadura industrial (Hammond, 1995; Nevoigt *et al.*, 2002). Además, los transformantes de levaduras de laboratorio normalmente se seleccionan por complementación de alguna de sus auxotrofías mientras que las levaduras industriales, debido a su prototofía, raramente se pueden seleccionar con dichos marcadores ya que sería necesario un proceso largo y laborioso para la obtención de mutantes auxótrofos (Akada, 2002). Puig *et al.* (1998), por ejemplo, construyeron un derivado auxótrofo para uridina a partir de una levadura industrial, pero el procedimiento es demasiado costoso para que se pueda aplicar de manera rutinaria a cualquier otra cepa industrial que se pretenda transformar. Para dichas cepas, se recurre normalmente a marcadores dominantes de transformación. Este tipo de marcadores son normalmente genes cuya expresión permite aumentar la

resistencia de la cepa a antibióticos u otros agentes antimicrobianos, sin necesidad de que la cepa que se transforma tenga previamente ningún gen defectuoso. Otra posibilidad es el uso de genes que permitan la utilización de sustratos como el almidón o la melibiosa que muchas cepas de *S. cerevisiae* no pueden utilizar.

Otro inconveniente de las levaduras industriales es su baja frecuencia de transformación, aunque con ligeras modificaciones de los métodos de transformación disponibles para las cepas de laboratorio, tales como la formación de esferoplastos (Spencer *et al.*, 1993), el tratamiento con sales de litio (Gietz y Woods, 2002) y la biobalística (Johnston y De Vit, 1996), varios grupos de investigación han conseguido obtener transformantes de dichas cepas.

1.5. Cepas de levaduras modificadas genéticamente de interés industrial

Los enormes avances registrados en los últimos años en el campo de la biología molecular y la ingeniería genética y la abrumadora cantidad de información de la que disponemos acerca de *S. cerevisiae*, han permitido la utilización de este microorganismo en muchísimas aplicaciones industriales, que van desde la tradicional producción de alimentos fermentados, hasta las más recientes aplicaciones en la producción de bioetanol, proteínas y enzimas para la industria farmacéutica y alimentaria y la producción de importantes compuestos bioquímicos (como glicerol, propanediol, ácidos orgánicos, etc.) para las industrias farmacéutica y química. En todas estas aplicaciones se han utilizado técnicas de ingeniería genética para obtener una levadura mejorada genéticamente (o transgénica) que permitiera obtener un producto cualitativa o cuantitativamente mejor, o incluso la producción de nuevos compuestos y la introducción de nuevas rutas metabólicas ausentes en las cepas salvajes. Mientras que hay muchas cepas de levaduras modificadas genéticamente (MG) que se están utilizando en la producción de bioetanol, proteínas, compuestos químicos e incluso en la producción de enzimas y aditivos utilizados en la producción de alimentos (Walker, 1998), hasta la fecha sólo hay dos levaduras vínicas MG que se están comercializando, aunque sólo en el mercado norteamericano, y de las cuales se desconoce si realmente alguna bodega las está utilizando a escala industrial. Estas dos levaduras, que han sido reconocidas como GRAS por EE. UU., son capaces respectivamente de realizar la fermentación maloláctica sin afectar a la fermentación alcohólica (Husnik *et al.*, 2006) y reducir la

formación de etilcarbamato en el vino (Coulon *et al.*, 2006). Con anterioridad, otras levaduras MG habían sido aprobadas por las autoridades competentes para su utilización en la industria alimentaria (Osinga *et al.*, 1988; Perry y Meaden, 1988), sin embargo, ninguna de estas se ha empleado para la producción industrial y comercialización de ningún alimento o bebida (Dequin, 2001). Las razones de esta situación residen, fundamentalmente, en el drástico y vehemente rechazo por parte de los consumidores, y de muy diversas organizaciones de carácter ecologista, medioambiental, social y político, a adquirir alimentos que contengan o hayan sido fabricados a partir de un organismo modificado genéticamente. Hay que subrayar que esta situación se verifica principalmente en Europa, ya que en otros estados como EE. UU. los alimentos transgénicos son aceptados. Como se explicará en el capítulo 2 de la Introducción de esta Tesis, el rechazo europeo no tiene base científica y responde a la falta de información y a información falsa de grupo radicales. Debido a esta situación, los equipos de investigación de las grandes empresas del sector alimentario, y especialmente las europeas, han abandonado las técnicas de ingeniería genética como alternativa viable para el desarrollo de nuevos productos o procesos. Actualmente, el consumidor no está preparado para aceptar este tipo de levaduras en la elaboración de bebidas y alimentos, a pesar de los innegables beneficios que aportarían a nivel organoléptico, de proceso e incluso económico, por lo que su uso se limita exclusivamente al ámbito del laboratorio.

En la Tabla 2 se describe brevemente las principales manipulaciones genéticas que se han realizado, mediante técnicas de ingeniería genética, en levaduras industriales para la producción de pan, vino y cerveza. Como se puede observar en la misma, hay muchas modificaciones genéticas de gran utilidad, que sólo están esperando el “vía libre” de las legislaciones y, sobre todo, de la opinión pública, para poder ser utilizadas por las respectivas industrias alimentarias.

2. Problemática de la comercialización de las levaduras modificadas genéticamente

Como se ha descrito en el capítulo anterior, son numerosas las cepas de levadura MG con características de interés industrial descritas en la bibliografía, sin embargo hasta la fecha sólo dos están siendo comercializadas. Las razones de esta situación se deben atribuir, fundamentalmente, a una legislación particularmente estricta (sobre todo la

europea) en materia de aprobación y etiquetado de los OMG y, en mayor medida, al rechazo por parte de los consumidores europeos a adquirir alimentos que contengan o hayan sido fabricados a partir de un organismo modificado genéticamente. Por cuanto concierne las levaduras MG, las principales justificaciones de rechazo son la posible transferencia de genes desde dichas levaduras a los hongos y bacterias patógenas, los efectos tóxicos y alergénicos que pueda causar la expresión del nuevo material genético insertado y los posibles riesgos ambientales debidos a la introducción de estos nuevos microorganismos en el ecosistema. Para intentar desbloquear la utilización industrial de las levaduras MG en las empresas alimentarias, se han desarrollado en estos últimos años técnicas alternativas que intentan eliminar las justificaciones de rechazo de los consumidores hacia este tipo de microorganismos.

2.1. Normativa concerniente a los organismos modificados genéticamente empleados en alimentación

En el ámbito internacional, la Comisión del Codex Alimentarius ha establecido unos principios para la valoración de la seguridad de los alimentos modificados genéticamente (ver en http://www.who.int/foodsafety/biotech/codex_taskforce/en) y el Protocolo de Cartagena sobre Bioseguridad resume los principios para la valoración ambiental de los organismos vivos modificados (ver en <http://www.biodiv.org/biosafety/default.aspx>). Sin embargo, hay enormes diferencias entre países en cómo los OMG son aprobados, clasificados y etiquetados.

La legislación europea es particularmente estricta en este campo. La primera directiva dirigida a aproximar las disposiciones legales, reglamentarias y administrativas de los Estados Miembros a la hora de proceder a la liberación intencional en el medio ambiente de OMG, data de 1990 (Directiva 90/220/CEE). Según los procedimientos presentes en esta directiva se autorizaron 17 OMG diferentes para su liberación intencional en el medio ambiente, tanto para fines experimentales como comerciales. En 1997, se hizo operativo el Reglamento Europeo EC nº 258/97 (EC, 1997) sobre alimentos nuevos e ingredientes nuevos que incluye los alimentos que contengan o estén compuestos por OMG, o que se hayan producido a partir de OMG o contengan ingredientes producidos a partir de estos organismos. Con esta normativa, una serie de productos procedentes de OMG pero sin contenerlos pudieron ser comercializados en el mercado europeo.

Objetivo	Fundamento	Manipulación genética	Comentarios	Referencias
Objetivos comunes a cepas industriales				
Aumento de la resistencia al estrés	Las levaduras industriales son expuestas a diferentes estreses medio-ambientales que afectan a su viabilidad y vitalidad.	<ul style="list-style-type: none"> - Sobreexpresión de <i>MSN2</i> (codifica un factor de transcripción que regula la expresión de varios genes en condiciones de estrés) en cepa panadera. - Expresión de la proteína QM de tomate (regula contenido intracelular de prolina) en <i>S. cerevisiae</i>. - Clonación y expresión de <i>GSH1</i> (codifica γ-glutamylcistein-sintetasa) en <i>S. cerevisiae</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - Mejora de la capacidad fermentativa de la cepa recombinante. Posible aplicación a masas congeladas por su mayor resistencia a ciclos de congelación y descongelación. - Incremento del contenido en prolina (protege células de levaduras de estrés oxidativo, congelación, etanol) en presencia de H_2O_2. - Incremento de la concentración intracelular de glutatión 1,5 veces. 	<p>Sasano <i>et al.</i>, 2012</p> <p>Chen <i>et al.</i>, 2006</p> <p>Fan <i>et al.</i>, 2004</p>
Objetivos comunes a cepas vínicas y cerveceras				
Floculación	<p>Importante para la separación de las levaduras del mosto fermentado.</p> <p>Tiene que empezar al inicio de la fase estacionaria o al final de la fermentación.</p> <p>Transcurre por interacción proteína-azúcar presentes en la pared celular.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Expresión de <i>FLO1</i> (codifica proteína de la pared celular) bajo control del promotor de <i>ADH1</i> en cepa cervecera no floculante. - Expresión de <i>FLO1</i> bajo control del promotor de <i>HSP30</i> (se activa al final de la fermentación). - Expresión de <i>FLO1</i>, <i>FLO5</i> o <i>FLO11</i> (codifican proteínas de la pared celular) bajo control del promotor de <i>HSP30</i> o de <i>ADH2</i> en 2 cepas vínicas. 	<ul style="list-style-type: none"> - La floculación empieza demasiado pronto al haber utilizado un promotor de un gen muy expresado durante la fermentación. - Fermentación y floculación correcta en cepa de laboratorio, falta estudio en cepa industrial. - Muchas diferencias en la expresión de los genes entre las 2 cepas vínicas y con el fenotipo obtenido en una cepa de laboratorio. Necesaria optimización específica para cada cepa industrial. 	<p>Watari <i>et al.</i>, 1994</p> <p>Verstrepen <i>et al.</i>, 2001</p> <p>Govender <i>et al.</i>, 2010</p>
Sobreproducción de ésteres de acetato	<p>Confieren un importante aroma a las bebidas alcohólicas, en particular el acetato de isoamilo.</p> <p>Son producidos por alcohol acetyl transferasas de las células de levadura durante la fermentación.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sobreexpresión de <i>ATF1</i> y <i>ATF2</i> en cepas cerveceras. - Sobreexpresión de <i>ATF1</i>, <i>ATF2</i> y <i>EHT1</i> (codifican para la producción de ésteres), e <i>IAH1</i> (codifica para la degradación de ésteres) en cepa vínica. 	<ul style="list-style-type: none"> - Incremento de ésteres de acetato. Incremento de ésteres no deseados, como el etil acetato. - Describen el efecto de cada gen analizado sobre la producción de varios compuestos aromáticos con el objetivo del desarrollo futuro de una cepa vínica con producción de ésteres optimizada. 	<p>Verstrepen <i>et al.</i>, 2003</p> <p>Lilly <i>et al.</i>, 2006</p>
Tabla 2. Breve descripción de los principales objetivos de mejora genética de las levaduras industriales utilizadas para la producción de vino, cerveza, pan y algunos ejemplos de manipulaciones genéticas realizadas.				

Objetivo	Fundamento	Manipulación genética	Comentarios	Referencias
Reducción del contenido en etanol	En aumento la demanda de bebidas alcohólicas de bajo contenido en etanol.	<ul style="list-style-type: none"> - Expresión de glucosa oxidasa (convierte glucosa en gluconolactona) de <i>Aspergillus niger</i> en <i>S. cerevisiae</i>. - Expresión de <i>noxE</i> (codifica NADH oxidasa) de <i>Lactococcus lactis</i> en cepa vínica de <i>S. cerevisiae</i>. 	<ul style="list-style-type: none"> - El contenido en etanol de un vino Chardonnay es reducido del 11,9% (v/v) al 10,1% (v/v). - En condiciones de microoxigenación, reducción del 15% del rendimiento en etanol. Deficiencias de crecimiento durante la fermentación. 	<p>Malherbe <i>et al.</i>, 2003</p> <p>Heux <i>et al.</i>, 2006</p>
Sobreproducción de glicerol	<p>Confiere positivas notas sensoriales a las bebidas alcohólicas.</p> <p>Reduce el contenido en etanol de las bebidas alcohólicas.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Sobreexpresión de <i>GPD1</i> (codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa) en cepa vínica. - Sobreexpresión de <i>GPD1</i> en cepa cervecera. - Sobreexpresión de <i>GPD2</i> por el promotor de <i>ADHI</i> y eliminación de <i>ALD6</i> en cepa vínica. 	<ul style="list-style-type: none"> - De 2 a 3 veces más del contenido en glicerol. Disminución del contenido en etanol. Alta producción de compuestos no deseados, en particular el acetato. - Mayor contenido en glicerol y menor contenido en etanol. Mayor producción de diacetilo. - Disminución del contenido en ácido acético, mayor contenido de glicerol y menor grado alcohólico. 	<p>Micknik <i>et al.</i>, 1997; Remize <i>et al.</i>, 1999</p> <p>Nevoigt y Stal, 1996</p> <p>Eglinton <i>et al.</i>, 2002</p>
Eliminación de etilcarbamato	<p>Sustancia cancerígena que se forma por reacción química entre etanol y urea en bebidas fermentadas.</p> <p>La urea se forma por degradación de arginina mediante enzima arginasa.</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Disrupción de <i>CARI</i> (codifica para arginasa) en cepa producción de sake. - Sobreexpresión de <i>DURI,2</i> (codifica ATP-urea amidoliasa, que degrada urea). 	<ul style="list-style-type: none"> - Disminución de etilcarbamato. No aplicable a las cepas vínicas por reducir el nitrógeno asimilable por la levadura en el mosto. - Reducción de etilcarbamato en 89,1%. 	<p>Kitamoto <i>et al.</i>, 1991</p> <p>Coulon <i>et al.</i>, 2006</p>
Aumento del contenido en sulfito (SO ₂)	Es un antioxidante y un compuesto clave para la estabilidad de las bebidas alcohólicas.	<ul style="list-style-type: none"> - Sobreexpresión de <i>SSU1</i> (codifica bomba que expulsa sulfito al exterior de la célula) en cepa de <i>S. pastorianus</i>. - Sobreexpresión de <i>HOM3</i> (codifica enzima implicada en biosíntesis de homoserina) y de <i>MET14</i>. - Inactivación de <i>MET10</i> (codifica para una sulfito reductasa) en cepa cervecera. 	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento de 10 veces de la producción de sulfito sin producir interferencias graves con el metabolismo de aminoácidos azufrados. La sobreexpresión de <i>SSU1</i> previene la reducción del sulfito a H₂S. - Aumento de la producción de SO₂ y disminución de la producción de H₂S. - Acumulación de sulfito en el medio de cultivo. Mayor estabilidad el aroma y sabor de la cerveza. Sin producción de H₂S (ver siguiente objetivo). 	<p>Donalies y Stahl, 2002</p> <p>Yoshida <i>et al.</i>, 2008</p> <p>Hansen y Kielland-Brandt, 1996</p>

Tabla 2. (Continuación)

Objetivo	Fundamento	Manipulación genética	Comentarios	Referencias
Reducción del contenido en H ₂ S	Es un compuesto indeseable producido por el metabolismo del sulfato por la levadura. En la producción de la cerveza disminuye su concentración durante el proceso de maduración.	- Sobreexpresión de <i>MET25</i> (codifica <i>o</i> -acetilhomoserina y <i>o</i> -acetilserina sulfidrilasa) en cepa cervecera. - Sobreexpresión de <i>NHS5</i> (codifica cistationina-β-sintasa) en cepa cervecera. - Eliminación de <i>MET2</i> (codifica una sulfito reductasa) en cepa cervecera.	- Disminución de 10 veces de la acumulación de H ₂ S. - Disminución de la acumulación de H ₂ S sin afectar a la fermentación. - Reducción de la producción de H ₂ S y mayor acumulación de SO ₂ .	Omura <i>et al.</i> , 1995 Tezuka <i>et al.</i> , 1992 Hansen y Kielland-Brandt, 1996
Propiedades antimicrobianas	Para evitar que una levadura salvaje sea predominante. Para evitar contaminación bacteriana en el mosto.	- Expresión de toxina killer K1 en levadura vínica productora de toxina K2. - Expresión de <i>pedA</i> de <i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>lcaB</i> de <i>Leuconostoc carnosum</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	- La mayoría de las cepas vínicas producen toxina killer K2 y son sensibles a la toxina K1. - Presencia de toxinas biológicamente activas en el medio de cultivo. Necesarias otras toxinas para garantizar la estabilidad total de los vinos.	Boone <i>et al.</i> , 1990 Schoeman <i>et al.</i> , 1999; Du Toit y Pretorius, 2000
Objetivos específicos para levaduras vínicas				
Incremento del contenido en proteínas de la pared celular	Son compuestos que previenen la formación de turbidez en el vino.	- Eliminación de <i>KNR4</i> (codifica para una proteína importante para la formación de la pared celular) en 2 cepas vínicas. - Sobreexpresión de <i>HPF1</i> y <i>HPF2</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	- Incremento del contenido en mannoproteínas y mejor estabilidad del vino. Pérdida de capacidad fermentativa, en particular en una de las 2 cepas. - La sobreexpresión de <i>HPF2</i> reduce sustancialmente la turbidez del vino.	Gonzalez-Ramos <i>et al.</i> , 2008 Brown <i>et al.</i> , 2007
Fermentación Maloláctica	Importante para la reducción biológica de los ácidos y la estabilidad de las características organolépticas del vino. El escaso desarrollo de bacterias lácticas puede provocar una escasa degradación del malato.	- Sobreexpresión de <i>mleS</i> (codifica enzima maloláctica) de <i>Oenococcus oeni</i> y <i>mae1</i> (codifica malato permeasa) de <i>Schizosaccharomyces pombe</i> en cepa vínica.	- Degradación de 5,5 g/l de malato en 9 días de fermentación en mosto Chardonnay sin afectar a la fermentación alcohólica. Previene la formación de aminas biógenas nocivas.	Husnik <i>et al.</i> , 2006
Producción de ácidos	Importante un correcto balance entre azúcares y acidez. Los mostos no siempre son suficientemente ácidos.	- Expresión de <i>LDH</i> (codifica lactato deshidrogenasa), de <i>Lactobacillus casei</i> en cepa vínica.	- Adecuada acidificación del mosto. Ligera disminución del contenido en etanol.	Dequin <i>et al.</i> , 1999

Tabla 2. (Continuación)

Objetivo	Fundamento	Manipulación genética	Comentarios	Referencias
Incremento del contenido en monoterpenos	Son compuestos que afectan significativamente al aroma y sabor del vino. <i>S. cerevisiae</i> no es capaz de producir monoterpenos de forma eficaz.	- Expresión de <i>LIS</i> (codifica S-linalool sintasa) de la planta <i>Clarkia breweri</i> en <i>S. cerevisiae</i> . - Expresión de <i>rhaA</i> (codifica α -L-ramnosidasa) de <i>Aspergillus aculeatus</i> en una cepa vínica.	- En condiciones de microvinificación aumento del linalool excretado por encima del umbral de percepción humana. - En condiciones de microvinificación y utilizando a la vez otra cepa MG que expresa una β -glucosidasa, aumento del linalool.	Herrero <i>et al.</i> , 2008 Manzanares <i>et al.</i> , 2003
Disminución del contenido en ácido acético	Su concentración en el vino debe de estar por debajo de 0,8 g/l. Por su composición genética, la levadura puede producir demasiado de este compuesto.	- Eliminación de <i>ALD6</i> (codifica aldehído deshidrogenasa) en una cepa vínica.	- Reducción de 2 veces en la producción de acetato durante la fermentación. Ligero incremento de glicerol, succinato y 2,3 butanodiol.	Remize <i>et al.</i> , 2000
Incremento de la degradación de polisacáridos	Las pectinasas, glucanasas y xilanasas facilitan la filtración y clarificación de vinos, la extracción de compuestos del grano de uva y mejoran color, aroma y sabor del vino.	- Sobreexpresión de <i>PGU1</i> (codifica endopoligalacturonasa) en cepa vínica. - Expresión de <i>egl1</i> (codifica endoglucanasa) de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> en <i>S. cerevisiae</i> . - Expresión de <i>PGU1</i> en 5 cepas vínicas que carecen de actividad endopoligalacturonasa.	- Mejorada la extracción del mosto, filtración y clarificación de vinos. - Mejora del aroma varietal de un vino blanco. - Expresión de la actividad endopoligalacturonasa en 3 de las 5 cepas. Pequeño cambio en el perfil aromático de los vinos obtenidos.	Fernández-González <i>et al.</i> , 2005 Pérez-González <i>et al.</i> , 1993 Van Wyk y Divol, 2010
Aceleración del proceso de autólisis	Principal fuente de moléculas que contribuyen a la calidad de los vinos espumosos.	-Eliminación de <i>BCY1</i> (codifica subunidad reguladora PKA dependiente de cAMP) en <i>S. cerevisiae</i> .	- Incremento de la velocidad de autólisis.	Tabera <i>et al.</i> , 2006
Aumento del contenido en resveratrol	Compuesto polifenólico del vino con efecto cardiosaludable, antitumoral y antienvjecimiento.	- Expresión en <i>S. cerevisiae</i> de <i>4CL216</i> (codifica resveratrol sintasa) de álamo y <i>vst1</i> (codifica coenzima A ligasa) de vid. - Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen de 4-cumarato:coenzima A ligasa de <i>Nicotiana tabacum</i> y del gen de la estilbeno sintasa de <i>Vitis vinifera</i> .	Producción de resveratrol por <i>S. cerevisiae</i> .	Becker <i>et al.</i> , 2003 Beekwilder <i>et al.</i> , 2006

Tabla 2. (Continuación)

Objetivo	Fundamento	Manipulación genética	Comentarios	Referencias
Incremento del contenido en tioles	Son compuestos azufrados que, en su concentración óptima, confieren un positivo aroma y sabor afrutado al vino.	- Sobreexpresión de <i>tnaA</i> (codifica triptofanasa con fuerte actividad cisteína-β-liasa) de <i>Escherichia coli</i> en cepa vínica.	- Incremento superior a 25 veces en la producción de 4-mercapto-4-metilpenta-2-ona y 3-mercapto-1-hexanol en medio sintético. Intenso aroma afrutado en vino.	Swiengers <i>et al.</i> , 2007
Objetivos específicos para levaduras cerveceras				
Eliminación del diacetilo	Confiere un aroma a mantequilla (no deseado en cerveza). Producto intermedio de la ruta de biosíntesis de la valina. Su concentración disminuye en el proceso de maduración.	- Sobreexpresión de <i>ILV3</i> e <i>ILV5</i> (codifican enzimas de la ruta biosintética de valina). - Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del gen de la α-acetolactato decarboxilasa de <i>Acetobacter aceti</i> ssp. <i>xylinum</i> . - Sobreexpresión de <i>ilv5p-Δ46</i> (mutante de <i>ILV5</i> con últimos 46 residuos eliminados).	- Disminución del contenido en diacetilo sin comprometer la síntesis de valina. - Obtención de cerveza con elevada reducción del contenido en diacetilo en experiencias piloto. - <i>ilv5p-Δ46</i> enzima funciona sólo en el citosol. Disminución del contenido en diacetilo sin alterar la producción de ácidos orgánicos y compuestos aromáticos.	Villa <i>et al.</i> , 1995 Yamano <i>et al.</i> , 1995 Omura, 2008
Degradación de β-glucanos	Su presencia comporta mayor viscosidad, menor filtrabilidad y formación de turbidez en la cerveza.	- Expresión de <i>EG1</i> (codifica β-glucanasa) de <i>Trichoderma reesei</i> en cepa cerveceras.	- Reducción de la viscosidad de la cerveza. Debido al uso de malta modificada y a la mejora en el proceso de filtración, ya no se requiere la presencia de actividad β-glucanasa en levadura.	Enari <i>et al.</i> , 1987 Lee y Bamforth, 2009
Disminución del sabor a cerveza oxidada	El oxígeno reacciona con moléculas orgánicas de la cerveza resultando en cambios del perfil aromático (debido principalmente a la acumulación de compuestos carbonílicos).	- Sobreexpresión de <i>GSH1</i> , enzima clave en la síntesis de glutatión (previene oxidación).	- Aumento en el contenido de glutatión en el mosto cerveceras.	Wang <i>et al.</i> , 2007;
Mejora de la estabilidad de la espuma	Importante factor de calidad. La proteinasa A de levadura es nociva para la estabilidad de la espuma.	- Disrupción gen <i>PEP4</i> (codifica para proteinasa A) en una cepa cerveceras.	- Disminución de la actividad proteinasa y mejora de la estabilidad de la espuma.	Wang <i>et al.</i> , 2007; Liu <i>et al.</i> , 2009;
Aumento de la fermentación de maltosa y maltotriosa	Son los dos azúcares fermentables más abundantes en el mosto cerveceras. La maltotriosa es utilizada sólo a finales de fermentación y en distinta proporción según las cepas.	- Sobreexpresión de <i>MTT1</i> (transportador de maltotriosa) en cepa de levadura para la producción de cerveza tipo lager.	- Aumento de la incorporación de maltotriosa.	Dietvorst <i>et al.</i> , 2005

Tabla 2. (Continuación)

Objetivo	Fundamento	Manipulación genética	Comentarios	Referencias
Fermentación de dextrinas	Azúcares no fermentables por cepas cerveceras. Su degradación es importante para la producción de cervezas de bajo contenido calórico.	- Disrupción de <i>ILV2</i> (codifica α -acetohidroxiácido sintasa), por integración de <i>LSD1</i> (codifica dextranasa) de <i>Lipomyces starkeyi</i> . - Sobreexpresión de amiloglicosidasa de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> . - Sobreexpresión de <i>STA2</i> de <i>S. diastaticus</i> (codifica para glucoamilasa extracelular).	- Disminución de la formación de diacetilo y del contenido de azúcar (20-25%). - Degradación de las dextrinas. Enzima termolábil, evita el endulzamiento de la cerveza durante la maduración. - Aumento del contenido alcohólico 1% (v/v) y disminución del contenido energético.	Zhang <i>et al.</i> , 2008 Lancashire <i>et al.</i> , 1989 Vakeria <i>et al.</i> , 1996
Objetivos específicos para levaduras panaderas				
Aumento de la resistencia a congelación-descongelación	<i>S. cerevisiae</i> sufre daños durante los procesos de congelación y descongelación. Este fenómeno comporta la pérdida de la capacidad para hinchar correctamente la masa panadera.	- Expresión en <i>S. cerevisiae</i> del péptido GS-5 (péptido anticongelante) de <i>Myxocephalus aeneus</i> , pez que vive en zonas polares. - Expresión en <i>S. cerevisiae</i> de <i>FAD2-1</i> y <i>FAD2-3</i> (codifican a oleato $\Delta 12$ -desaturasa) de <i>Helianthus annuus</i> . - Sobreexpresión de <i>CRZ1</i> (codifica un factor de transcripción dependiente de calcineurina que activa la transcripción de genes relacionados con el estrés). - Sobreexpresión aquaporinas <i>AQY1</i> y <i>AQY2</i> en una cepa panadera. - Eliminación de <i>POG1</i> (codifica para un factor de transcripción implicado en la regulación del ciclo celular).	- Aumento de la resistencia a congelación y de la producción de CO ₂ . - Aumento de la fluidez de la membrana y con ello mejora de la tolerancia a la congelación. - Aumento de la resistencia a congelación y salinidad. Aumento capacidad de levantamiento en masas dulces. - Aumento de salida de agua de la célula durante la congelación. Se previene daño celular provocado por cristales de hielo. - Incremento de la capacidad de fermentación en masas ácidas después de ciclos de congelación y descongelación.	Panadero <i>et al.</i> , 2005 Rodríguez-Vargas <i>et al.</i> , 2007 Panadero <i>et al.</i> , 2007 Tanghe <i>et al.</i> , 2002 Sasano <i>et al.</i> , 2013
Aumento de la utilización de la maltosa	Indispensable para un buen hinchamiento de la masa panadera. La maltasa y maltosa permeasa son reprimidas a bajas concentraciones de azúcares sencillos.	- Cambio del promotor de maltosa permeasa y maltasa por otro que no sufre represión por catabolito.	- Aumenta hinchamiento de la masa panadera.	Osinga <i>et al.</i> , 1988

Tabla 2. (Continuación)

Objetivo	Fundamento	Manipulación genética	Comentarios	Referencias
Utilización del almidón	Es el principal carbohidrato presente en las masas panaderas. <i>S. cerevisiae</i> no es capaz de hidrolizar el almidón.	- Expresión de <i>GAM1</i> (codifica una amiloglucosidasa) y <i>AMY1</i> (codifica una amilasa) de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en <i>S. cerevisiae</i> .	- Levadura panadera capaz de utilizar el almidón.	Hollenberg y Strasser, 1990
Incremento de la capacidad fermentativa	Se define como la tasa de producción de CO ₂ y etanol en anaerobiosis. En el hinchamiento de la masa panaria es importante que la levadura fermente los azúcares a CO ₂ y etanol con mínimo incremento de biomasa.	- Sobreexpresión de <i>HAP4</i> y eliminación de <i>HXK2</i> (reguladores de la ruta glicolítica) en <i>S. cerevisiae</i> .	- Ninguna diferencia significativa con respecto a la cepa control en la sobreexpresión de <i>HAP4</i> . En la eliminación de <i>HXK2</i> y con maltosa como fuente de carbono, incremento de 2 veces de la capacidad fermentativa.	Schuurmans <i>et al.</i> , 2007
Utilización de la melibiosa	Las melazas, materia prima para la producción de levadura panadera, contienen rafinosa, hidrolizada a fructosa y melibiosa por la levadura. <i>S. cerevisiae</i> no utiliza la melibiosa (no posee enzima α -galactosidasa).	- Expresión en <i>S. cerevisiae</i> de <i>MEL1</i> (codifica para α -galactosidasa) de cepa utilizada para la producción de cerveza tipo lager.	- Mayor rendimiento (8%) en biomasa de levadura, sin perjuicio de la tasa de crecimiento.	Gasent-Ramirez <i>et al.</i> , 1995

Tabla 2. (Continuación)

Estos productos han sido sometidos a un proceso de autorización simplificado basado en el principio de equivalencia substancial: han sido autorizados aquellos productos para los cuales era posible demostrar que no había ninguna diferencia desde el punto de vista nutricional, organoléptico y toxicológico con respecto a los mismos productos obtenidos mediante métodos convencionales. Debido al creciente rechazo por parte de la opinión pública y de diversas organizaciones políticas y medioambientales hacia los OMG, desde 1997 muchos estados miembros comenzaron a rechazar la autorización al uso de OMG, apelando a la así llamada cláusula de salvaguardia, y en 1998 muchos estados votaron a favor de un bloqueo de las autorizaciones de OMG a nivel europeo hasta que no fuera garantizado el derecho de elección de los ciudadanos mediante apropiadas normas de etiquetado y una revisión de la normativa a la luz del principio de precaución.

Es ese el clima en el que se redactaron las nuevas normativas que actualmente regulan los organismos modificados genéticamente: la directiva 2001/18/EC (EC, 2001) sobre liberación intencional en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente, que reescribe las normas para la aprobación de los OMG, y los Reglamentos 1829/2003/EC (EC, 2003a), 1830/2003/EC (EC, 2003b) y 65/2004/EC (EC, 2004) que, respectivamente, definen las normas para la autorización, el etiquetado y la trazabilidad del producto.

El Reglamento 1829/2003 describe las informaciones necesarias para quien quiera comercializar un producto OMG. El solicitante tiene que demostrar que los alimentos no deberán:

- (1) tener efectos negativos sobre la salud humana, la sanidad animal o el medio ambiente;
- (2) inducir a error al consumidor;
- (3) diferenciarse de los alimentos que están destinados a sustituir de tal manera que su consumo normal resulte desventajoso, desde el punto de vista nutricional, para los consumidores.

Dichos productos tienen que ser controlados antes de su comercialización, por lo tanto, la solicitud de autorización tiene que ir acompañada con un expediente técnico completo, que presente informaciones detalladas sobre el resultado de las investigaciones con el fin de evaluar el impacto de los OMG sobre la salud humana y animal y sobre el medioambiente. A continuación, el producto es sometido al largo procedimiento de aprobación por parte de la Autoridad Europea de Seguridad

Alimentaria (EFSA, del inglés European Food Safety Agency), de la Comisión Europea y de los Estados Miembros. El etiquetado es siempre obligatorio cuando se tiene constancia que el alimento contenga o esté compuesto por OMG o se haya producido a partir de OMG o contengan ingredientes producidos a partir de estos organismos. En consecuencia, el etiquetado es obligatorio aunque el ADN recombinante o la proteína correspondiente no estén presentes en el producto final. Además, el etiquetado es obligatorio cuando más del 0,9% de un alimento contenga o esté compuesto por OMG, aunque éstos se hayan introducido por contaminación ocasional, fortuita o inevitable. En el caso que los alimentos presenten, bien accidentalmente o porque sea técnicamente inevitable, trazas de OMG a un nivel inferior al 0,9%, los operadores deberán poder proporcionar pruebas a las autoridades competentes que les demuestren de manera satisfactoria que han adoptado las medidas apropiadas para evitar la presencia de dicho material. En base a los Reglamentos nº 1830/2003 (EC, 2003b) y 65/2004 (EC, 2004), los OMG y los productos derivados de éstos, tienen que ser sometidos a un plan de trazabilidad durante todas las etapas, desde la producción hasta la comercialización, para facilitar una eventual retirada de los productos, si esto fuera necesario.

A diferencia de la estricta legislación europea, los reglamentos americanos no prevén el etiquetado obligatorio de los OMG, porque no son considerados significativamente diferentes de los demás alimentos, o simplemente porque no dan mayores problemas de seguridad con respecto a los alimentos procedentes de las tradicionales técnicas de cruzamiento (Federal Register of May 29, 1992 57 FR 22984). La normativa general de etiquetado de los alimentos se aplica también a los alimentos que proceden de las aplicaciones de la Biotecnología. La etiqueta debe revelar todos los “hechos materiales de un alimento”, por ejemplo, en el caso de un alimento MG, si éste es significativamente distinto de su correspondiente natural, si tiene propiedades naturales significativamente diferentes o si contiene un potencial compuesto alergénico. Las levaduras en EE.UU. son consideradas como agentes de proceso y por tanto los vinos que por ejemplo se han producido mediante el uso de alguna de las 2 levaduras MG que actualmente se están comercializando (ver capítulo 1.5.), no necesitan en su etiquetado de ninguna declaración que advierta al consumidor de su uso. Por eso se desconoce el efectivo uso de estas levaduras en la producción de vino pues por evidentes motivos las empresas productoras de vino prefieren no mencionarlo.

En general, los reglamentos en otras partes del mundo se sitúan entre los de EE. UU. y los de la Unión Europea. La legislación canadiense se parece a la de EE. UU., mientras

que Australia, Nueva Zelanda, Japón y China requieren del etiquetado de los alimentos MG, pero los reglamentos sobre el uso de OMG son menos restrictivos que las actuales directrices Europeas.

2.2. Actitud de los consumidores hacia los OMG

La encuesta Eurobarometer sobre Biotecnología, iniciada a principio de los años noventa, es una de las más importantes encuestas sobre la opinión pública (en términos de número de personas entrevistadas) que controla los cambios de la actitud de los consumidores hacia la Biotecnología en los diferentes países europeos. La encuesta del 2005 (Gaskell *et al.*, 2006) sobre 25.000 personas europeas (aproximadamente 1.000 para cada estado europeo), ha evidenciado una actitud muy positiva hacia las nuevas tecnologías y la ciencia, sin embargo, mientras que había un apoyo casi total a la aplicación de las técnicas biotecnológicas en el área médica e industrial, había un rechazo general a la producción de alimentos MG. La gran mayoría de los europeos (73%) cree que los alimentos MG no deberían ser fomentados ya que dichos alimentos son vistos como inútiles, moralmente inaceptables y como un riesgo para la sociedad. La última encuesta sobre biotecnología del 2010 realizada a consumidores de los 27 estados miembros más Croacia, Islandia, Noruega, Suiza y Turquía (Gaskell *et al.*, 2010), vuelve a confirmar los resultados obtenidos 5 años antes (un 77% de europeos están en contra de los alimentos MG), sugiriendo un sustancial hermetismo de la opinión pública hacia los alimentos MG. Los principales argumentos que esgrimen los opositores a los productos alimentarios en cuyos ingredientes o proceso de fabricación se haga uso de organismos modificados genéticamente, son: la alteración en la calidad nutricional de las comidas, su potencial toxicidad, su posible papel en la diseminación en los ecosistemas de la resistencia a determinados antibióticos, su potencial efecto alergénico o cancerígeno, preocupaciones religiosas y culturales y también el miedo a lo desconocido (Uzogara, 2000; Lack 2002). Ninguno de estos argumentos tiene base científica y, en gran parte, se basan en la falta de formación científica tanto de los consumidores como de los medios de comunicación.

Las condiciones favorables para la posible compra de productos MGs son que aporten compuestos beneficiosos para la salud, que disminuyan los niveles de residuos de pesticidas y que reduzcan el impacto medioambiental (aunque los economistas afirman que el precio también es un factor importante). Como se puede observar en la Figura 2,

las opiniones de los consumidores hacia las modificaciones genéticas dependen de muchos factores. En lo que concierne a los alimentos MG, los beneficios son vistos como marginales o abstractos, es este el caso de la cerveza, las fresas o el salmón. Cualquier modificación que afecte a los animales o al hombre comporta grandes preocupaciones éticas, mientras que las aplicaciones médicas en el campo farmacéutico o en el campo de las enfermedades hereditarias son las mejor consideradas (Frewer *et al.*, 1997; Frewer, 2003).

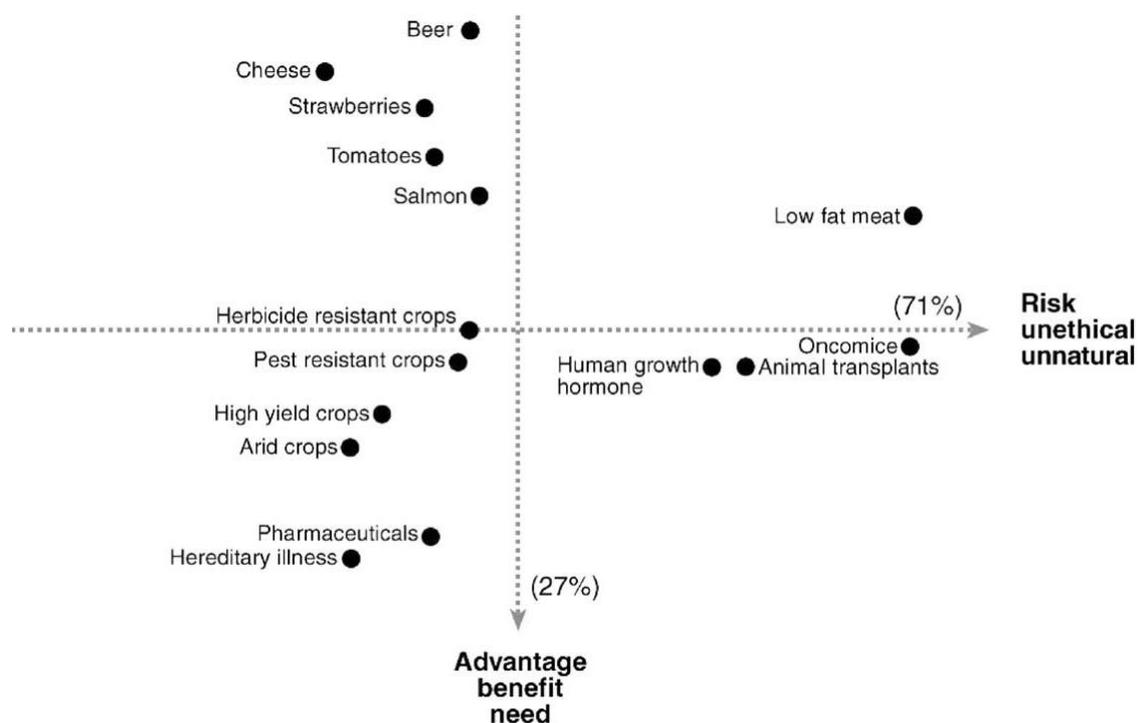


Figura 2. La opinión pública sobre la relación riesgos/beneficios de los alimentos modificados genéticamente (Frewer, 2003).

Probablemente, la causa de la percepción negativa y del rechazo que existe entre la población hacia los organismos transgénicos provenga de la falta de una correcta y suficiente información al consumidor cuando éstos comenzaron a desarrollarse. La intoxicación informativa realizada por organizaciones como Greenpeace y por los partidos verdes, han sido fundamentales para generar el actual estado de opinión en Europa. De hecho, mientras que procesos como la evolución adaptativa donde, por ejemplo, las cepas de levadura son continuamente y repetidamente cultivadas bajo una determinada combinación de condiciones, para luego seleccionar las cepas resistentes o mejor adaptadas a dichas condiciones, o las técnicas procedentes de la genética clásica, como la mutagénesis o la hibridación, han sido aceptadas por el consumidor a pesar de

que se desconozcan los cambios efectuados en el genoma (probablemente por ignorancia del fundamento teórico que subyace a su aplicación, o simplemente porque técnicas similares han sido utilizadas por el hombre durante millares de años en la agricultura), es sorprendente que no pase lo mismo con las técnicas de ingeniería genética donde se conocen con exactitud las modificaciones realizadas sobre el material genético.

2.3. Principales justificaciones de rechazo de los microorganismos modificados genéticamente

En lo que se refiere a los microorganismos modificados genéticamente (MMG) en particular, las principales justificaciones de rechazo son la posible transferencia de genes bacterianos (como los que confieren resistencia a determinadas drogas o antibióticos) desde los MMG a los hongos y bacterias patógenas, los efectos tóxicos y alérgicos que pueda causar la expresión del nuevo material genético insertado y los posibles riesgos ambientales debidos a la introducción de estos nuevos microorganismos en el ecosistema (Jonas *et al.*, 2001).

2.3.1. Riesgos ambientales por la introducción de microorganismos MG en el medio ambiente

La valoración de la viabilidad de las levaduras MG en los ambientes naturales resulta crucial, porque dichas levaduras pueden ser liberadas accidental o intencionadamente en el ecosistema natural. Por lo tanto, es importante proporcionar a los consumidores informaciones precisas acerca del comportamiento de las levaduras MG en el medioambiente y su potencial impacto sobre la microflora natural, para así favorecer que los consumidores acepten más fácilmente las técnicas de la ingeniería genética en la producción de alimentos fermentados. Hasta la fecha se han realizado pocas pruebas (principalmente utilizando levaduras comerciales) para evaluar el impacto potencial de las levaduras MGs sobre la microflora natural, sin embargo todas parecen confirmar que dichas levaduras no se implantan sistemáticamente en el medioambiente y que no dominan a la microflora natural (Bauer *et al.*, 2003; Cordero-Bueso *et al.*, 2011; Fujimura *et al.*, 1994; Schuller y Casal, 2005; Valero *et al.*, 2007).

Ando *et al.* (2005) analizaron la tasa de supervivencia y la presencia del material genético en un ambiente natural simulado, de una cepa de levadura panadera modificada genéticamente (inactivación del gen *ATH1*, que codifica para una trealasa y cuya eliminación permite la acumulación de trealosa, mejorando de esta forma la tolerancia a la congelación) con respecto a la cepa original. Descubrieron que había un comportamiento prácticamente igual entre las cepas MG y la cepa salvaje, concluyendo que la eliminación del gen *ATH1* no favorece la supervivencia en el ecosistema ni de células viables ni del fragmento de ADN implicado.

Schoeman *et al.* (2009) estudiaron el comportamiento de una cepa vínica de *S. cerevisiae*, denominada VIN13, y de una variante suya MG (expresión de *LKAI*, que codifica para una α -amilasa, de *Lipomyces kononenkoae*) en 3 diferentes hábitats. Demostraron que no habían diferencias significativas en el comportamiento de estas 2 levaduras y concluyeron que la modificación genética insertada no confería ninguna ventaja selectiva a la cepa MG con respecto a la cepa salvaje. Además, sugirieron que se podría utilizar el proceso empleado como método para la evaluación del riesgo asociado a la liberación de levaduras MG en el medio ambiente.

Bauer *et al.* (2003) evaluaron el comportamiento de levaduras MG en el interior de poblaciones microbianas de una determinada bodega y de un viñedo en un invernadero. Utilizando una levadura vínica comercial, construyeron cepas MG que contenían genes heterólogos que codificaban para una α -amilasa (*LKAI*), una endo- β -1,4-glucanasa (*end1*), una xilanasa (*XIN4*) y una pectato liasa (*peh1*). Descubrieron que: (1) no había una diferencia significativa en el ambiente entre la presencia de las levaduras modificadas o de las levaduras comerciales parentales, tampoco para las levaduras MG que se creía que pudieran tener una ventaja selectiva (excretaban glucanasas y pectinasas); (2) en general, la población microbiana sobre las plantas que habían rociadas era muy similar a la de las vides no tratadas, concluyendo que el equilibrio ecológico de la flora de un viñedo en un sistema confinado no se ve influenciado ni por las levaduras comerciales ni por las levaduras MG; (3) no habían diferencias significativas en las cepas implicadas en la fermentación de micro-vinificaciones espontáneas.

2.3.2. Transferencia de genes bacterianos desde los microorganismos MG a los hongos y bacterias patógenas

La transferencia horizontal de genes (HGT, del inglés Horizontal Gene Transfer) consiste en la transmisión del genoma o parte de éste de un organismo a otro que no forma parte de su descendencia. La transferencia se produce mediante el paso de material genético a través de los límites celulares del donador mediante sistemas de transmisión, como son en bacterias la conjugación, la transducción y la transformación, seguida de la incorporación estable de dicho material en el genoma del organismo receptor mediante mecanismos de recombinación. La HGT es muy importante como fuente de variación genética y puede ocurrir entre especies alejadas filogenéticamente, lo cual permite la formación de genomas extraordinariamente heterogéneos y dinámicos. La comparación de tres cepas de *Escherichia coli* ha revelado que sólo el 39% del genoma está conservado, mientras que la parte restante difiere principalmente como consecuencia del HGT (Welch *et al.*, 2002). La HGT ha sido el principal factor de propagación de la resistencia a antibióticos entre las bacterias patógenas en los últimos 50 años, así como de la aparición de un aumento en la virulencia de bacterias y virus (Derbise *et al.*, 2007; Mild *et al.*, 2007). En consecuencia, desde la aparición de los primeros OMG, surgieron temores en relación con una posible transferencia horizontal del material genético que había sido introducido en los OMG, así como sobre los potenciales efectos perjudiciales que dicha transferencia puede tener sobre la salud humana y el medio ambiente, ya que la inserción de ADN foráneo en las variedades transgénicas puede hacerse (y en la mayoría de los casos se hace) mediante la inserción de genes marcadores que confieren resistencia a antibióticos. Por ejemplo, la transmisión a un patógeno de dichos genes con resistencia a antibióticos, podría comprometer las terapias en humanos y animales (Bennet *et al.*, 2004), y la transmisión de un gen viral a un virus no homólogo podría dar como resultado la aparición de una enfermedad emergente (Falk y Bruening, 1994). En realidad, varios estudios confirman que la transferencia de genes con resistencia a antibióticos desde las plantas MG a las bacterias, son fenómenos muy raros y, en el caso que dichos fenómenos ocurriesen, los peligros para la salud humana y el medio ambiente serían insignificantes (Bennett *et al.*, 2004; Kees, 2008). Además, hay que considerar que los marcadores de resistencia a antibióticos están ya presentes y diseminados en la naturaleza, ya que han sido obtenidos de elementos génicos altamente móviles presentes en las bacterias, donde han

evolucionado y se han difundido como consecuencia del abuso en la utilización y del mal uso de los antibióticos en medicina y en los piensos para animales.

En lo que concierne a los microorganismos MG, la probabilidad de que se produzca la transferencia de genes que confieren resistencia a antibióticos a otros organismos, sigue siendo baja, aunque es más probable que en el caso de las plantas MG. Por lo tanto, aunque la mayoría de los autores concuerdan en la baja probabilidad de riesgos que para la salud humana entrañan este tipo de modificaciones genéticas, también consideran que ya que la HGT es posible en determinadas condiciones y que los genes insertados podrían conferir una ventaja selectiva a las cepas receptoras con consecuencias imprevisibles, sería recomendable evitar en los MMG la presencia de genes de resistencia a antibióticos, así como de secuencias genéticas procedentes de bacterias que puedan facilitar la propagación del ADN recombinante (Stewart *et al.*, 2000; Dale *et al.*, 2002; Gaugitsch, 2002). En las recomendaciones elaboradas por el Codex Alimentarius (Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2004) se indica que, para la selección de MMG, deben usarse tecnologías alternativas que hayan demostrado ser inocuas y que no dependan de genes marcadores de resistencia a antibióticos en los microorganismos viables presentes en los alimentos. En general, el uso de genes marcadores de resistencia a antibióticos para la construcción de cepas intermedias no debería presentar peligros significativos que impidieran la utilización de las cepas finales en la producción de alimentos, siempre y cuando los genes marcadores de resistencia a antibióticos se hayan eliminado de la última construcción y/o de la cepa definitiva.

2.3.3. Efecto tóxico y alergénico que puede provocar la expresión del nuevo material génico insertado

Una de las principales cuestiones en la valoración de la seguridad de los alimentos MG es su potencial tóxico y alergénico. Las modificaciones genéticas pueden afectar al potencial alergénico de un determinado microorganismo en dos formas: mediante la introducción de genes foráneos que codifican para proteínas tóxicas o alergénicas no producidas anteriormente por la cepa sin modificar, o mediante el cambio del nivel de expresión o de la naturaleza de proteínas alergénicas intrínsecas. Actualmente existe una rigurosa valoración (basada en las recomendaciones elaboradas por el Codex Alimentarius) del potencial alergénico de las proteínas expresadas en los alimentos transgénicos y de los alimentos elaborados con la ayuda de microorganismos

transgénicos (Joint FAO/WHO Food Standards Programme, 2004) y, hasta la fecha, dicha estrategia ha funcionado bien, ya que se ha evitado la introducción de potenciales proteínas alergénicas en alimentos destinados al consumo humano. Según el Codex Alimentarius, la evaluación de la posible toxicidad de las proteínas debe centrarse principalmente en la semejanza de la secuencia de aminoácidos entre la proteína examinada y toxinas proteicas conocidas, así como en la degradación de dicha proteína en modelos representativos apropiados de los sistemas gástrico e intestinal.

2.4. Estrategias para soslayar el rechazo hacia las levaduras modificadas genéticamente

Para evitar estas reticencias hacia los MMG y para intentar desbloquear la utilización industrial de las levaduras modificadas genéticamente en las empresas alimentarias, se han desarrollado en estos últimos años técnicas alternativas que intentan eliminar las principales justificaciones de rechazo de los consumidores hacia estos tipos de microorganismos, como el miedo a la transferencia de genes desde las levaduras MG a los hongos y bacterias patógenas y la producción de proteínas tóxicas o alergénicas por parte de la levaduras recombinantes. Las estrategias que se están utilizando para aumentar la aceptación de las levaduras MG, se basan en la eliminación de los casetes de selección basados en la resistencia a antibióticos o a compuestos tóxicos y, especialmente, en el uso de técnicas de “self cloning” o autoclonación.

La correcta definición de “self-cloning” se puede encontrar en la Directiva 98/81/EC del Consejo Europeo, relativa a la utilización confinada de microorganismos modificados genéticamente, que define dicho concepto como: “Autoclonación, consistente en la extracción de secuencias de ácido nucleico de una célula de un organismo, que puede ir o no seguida de la re inserción total o parcial de dicho ácido nucleico (o de un equivalente sintético) - con o sin fases enzimáticas o mecánicas previas - en células de la misma especie o de una especie que presente características filogenéticas muy similares, que puedan intercambiar material genético por procesos fisiológicos naturales, siempre que sea improbable que el microorganismo resultante sea patógeno para las personas, los animales o los vegetales. La autoclonación puede incluir el empleo de vectores recombinantes en relación con los cuales se disponga de una larga historia de utilización segura en los microorganismos correspondientes.”

El principio de esta técnica es simple: si no se introduce en la levadura ADN foráneo, es decir, procedente de otro sistema biológico, no debería de haber miedo a la transferencia de genes desde la levadura MG a los hongos y bacterias patógenas, ni tampoco a la producción de proteínas tóxicas o alergénicas por parte de la levadura recombinante.

Es discutible si, bajo el procedimiento de valoración del riesgo, las levaduras obtenidas mediante “self-cloning” deberían ser equiparadas a los microorganismos alterados genéticamente que no necesitan ningún tipo de control, como por ejemplo los obtenidos mediante procesos de mutagénesis (Sybesma *et al.*, 2006). De hecho, cuando la contención no está asegurada, la legislación Europea no distingue las cepas obtenidas mediante “self-cloning” de las obtenidas mediante la expresión de genes heterólogos.

Al contrario, la legislación Japonesa no considera que los microorganismos desarrollados mediante la técnica del “self-cloning” tengan que ser tratados como OMG, pues dicha técnica se considera similar a otros fenómenos que ocurren naturalmente como la recombinación genética, la eliminación y amplificación de genes, etc. Por lo tanto, las levaduras obtenidas mediante esta metodología no tienen que estar sometidas a las estrictas normas que regulan la comercialización de los OMG (Hino, 2002).

En general, se cree que las levaduras obtenidas mediante “self-cloning” tienen un mayor potencial comercial con respecto a las levaduras transgénicas. De hecho, varios grupos de investigación, sobre todo japoneses, se están esforzando en desarrollar nuevas estrategias de “self-cloning”. En la Tabla 3 se resume brevemente algunos ejemplos de manipulaciones genéticas realizadas mediante técnicas de “self-cloning”, haciendo especial hincapié en unos requisitos deseables para aumentar la aceptación del consumidor hacia estas nuevas cepas de levadura.

Hasta la fecha, ninguna de estas levaduras mejoradas genéticamente mediante técnicas de autoclonación se está comercializando para la producción de alimentos o bebidas alcohólicas. Probablemente, una nueva estrategia dentro de las metodologías de “self-cloning” que demuestre que las modificaciones genéticas introducidas en las levaduras MG podrían haber ocurrido en naturaleza sin la intervención humana, podría ayudar a superar el rechazo de estas nuevas tecnologías en la producción de nuevos alimentos.

Manipulación genética realizada	Ausencia de marcador dominante	Ningún paso a través de otro sistema biológico y/o vector de clonación	Ningún cambio en la secuencia integrada	Misma especie	Misma cepa	Referencia
Eliminación de <i>PUT1</i> (codifica para una prolina oxidasa) y sustitución de <i>PRO1</i> (codifica para enzima responsable de síntesis de prolina) con un alelo mutado que causa sobreproducción de prolina. Mejora de la resistencia al estrés producido por el etanol.	SI	NO	NO	SI	SI	Takagi <i>et al.</i> , 2007
Integración de <i>GPD1</i> (codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogena) y <i>CUP1</i> (codifica para una metal-tioneina) en el locus de <i>ALD6</i> (codifica aldehído dehidrogenasa) e integración de <i>GSH1</i> (codifica y-glutamylcistein-sintetasa) y de <i>CUP1</i> en el locus de <i>ILV2</i> . Obtención de una levadura vínica con alta producción de glicerol y glutatión.	NO ²	NO	? ¹	SI	NO	Hao <i>et al.</i> , 2012
Sobreexpresión de <i>SSU1</i> en cepa cervecera. Aumento de la producción de SO ₂ y disminución de la producción de H ₂ S.	NO ²	NO	SI	SI	NO	Iijima y Ogata, 2010
Mutación de glicina a serina en el codón 1.250 de <i>FAS2</i> (codifica para una sintasa de ácidos grasos) que confiere resistencia a cerulenina y mayor producción de etil caproato en una cepa para la producción de sake.	SI	NO	NO	SI	SI	Aritomi <i>et al.</i> , 2004
Sobreexpresión de <i>ATF1</i> (codifica alcohol acetiltransferasa) para mejorar el perfil aromático del sake.	SI	NO	? ¹	SI	SI	Hirosawa <i>et al.</i> , 2004
Expresión de <i>SWA2</i> (codifica para una α -amilasa) de <i>Schwanniomyces occidentalis</i> en una cepa panadera de <i>S. cerevisiae</i> .	NO ²	NO	? ¹	NO	NO	Marín <i>et al.</i> , 2001
Sobreexpresión de <i>PGU1</i> (codifica para una endopoligalacturonasa) en una cepa enológica de <i>S. cerevisiae</i> .	NO ²	NO	? ¹	SI	SI	Fernández-González <i>et al.</i> , 2005
Integración de <i>GAI</i> (codifica para una glucoamilasa) de <i>Saccharomycopsis fibuligera</i> en el locus de <i>PEP4</i> (codifica para una proteinasa A). Obtención de una cepa cervecera con mejor estabilidad de la espuma y menor contenido calórico.	SI	NO	? ¹	NO	NO	Liu <i>et al.</i> , 2009

Tabla 3. Breve descripción de algunas manipulaciones genéticas realizadas en levaduras industriales mediante técnicas de “self-cloning”. 1. No se especifica si se han introducido cambios en la secuencia, pero es muy probable como consecuencia de la introducción de secuencias de corte para los enzimas de restricción. 2. En estos casos, el marcador dominante se basa en la expresión o eliminación de genes de la misma levadura que, por lo tanto, sigue siendo manipulada mediante técnicas de “self-cloning”.

3. Evolución de las levaduras

Como hemos visto en los apartados anteriores, en la opinión pública existe un rechazo general hacia la modificación de las levaduras industriales mediante técnicas de ingeniería genética. Sin embargo, las levaduras no son una entidad invariable en el tiempo, al contrario, como todos los organismos vivos evolucionan con el tiempo. El genoma de la levadura es una estructura dinámica, que ha sufrido innumerables cambios durante su evolución, aunque todavía se esté investigando sobre cuáles son los mecanismos moleculares responsables de dicha evolución. Se pueden deducir dichos mecanismos mediante la comparación de los genomas actuales de especies de levadura de parentesco cercano.

La secuenciación del genoma de *Saccharomyces cerevisiae* (Goffeau *et al.*, 1996), junto con el proyecto Génolevures, en el que se han determinado hasta la fecha las secuencias genómicas completas de 9 especies y las secuencias genómicas parciales de otras 9 especies de levaduras pertenecientes a la clase de los hongos hemiascomicetos (Dujon *et al.*, 2004; Martin *et al.*, 2011; Sherman *et al.*, 2004; Sherman *et al.*, 2009), y el proyecto *Saccharomyces* Genome Resequencing Project en el que se ha secuenciado el genoma de varias cepas de *S. cerevisiae* y *S. paradoxus*, han proporcionado valiosos instrumentos para el estudio filogenético de la evolución de las levaduras.

A día de hoy se cree que el genoma actual de las levaduras modernas procede de un antiguo fenómeno de duplicación de su genoma o parte del mismo. Además, fenómenos como las duplicaciones subteloméricas aumentaron ulteriormente el número de copias de determinados genes. La aneuploidía es otro mecanismo de aumento o pérdida de cromosomas, y reorganizaciones del genoma como inversiones y translocaciones han sido frecuentes en la historia evolutiva. También la HGT ha podido haber ocurrido, aunque sea bastante raro, en levaduras. Los genes duplicados han seguido diferentes destinos, como la acumulación de mutaciones, que llevan a la aparición de nuevas funciones o a la inactivación de dichos genes duplicados, y a la eliminación de gran parte de ellos. En la Figura 3 se representa esquemáticamente los fenómenos que han contribuido a la formación de los genomas de las levaduras actuales. Este proceso no se ha detenido, sino que las levaduras continúan evolucionando con el fin de utilizar completamente el potencial nutritivo de los diferentes ambientes o nichos ecológicos que les rodean.

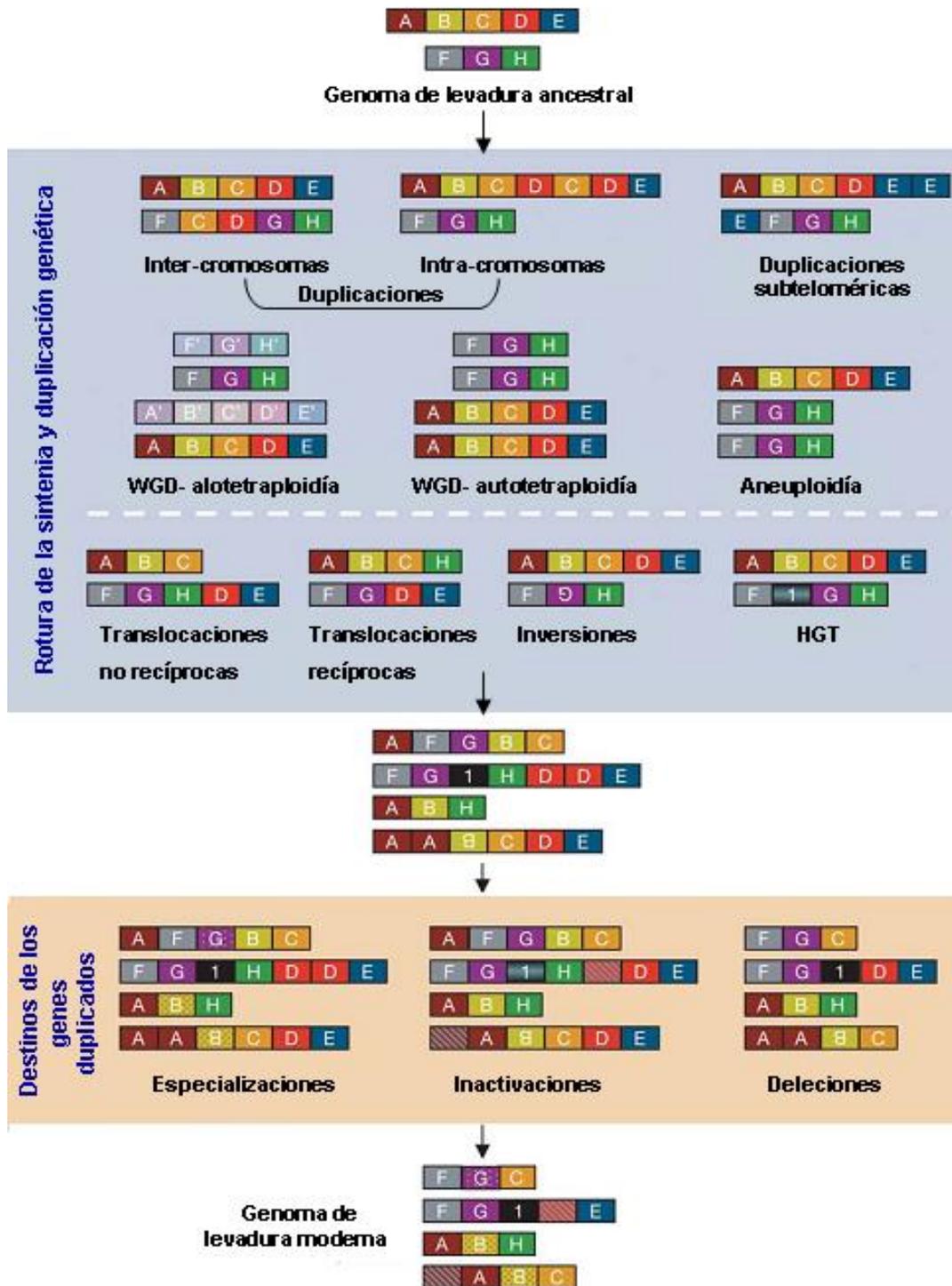


Figura 3. Representación esquemática de los fenómenos que han contribuido a la formación de los genomas de las levaduras modernas (Liti *et al.*, 2005).

3.1. La duplicación total del genoma como sistema de diferenciación y evolución en la levadura

Wolfe y Shields (1997) sugirieron una hipótesis revolucionaria sobre el origen del genoma actual de las cepas de *S. cerevisiae*. Propusieron que el genoma actual de *S. cerevisiae* se originó a partir de un antiguo fenómeno de duplicación de todo el genoma (WGD, del inglés Whole Genome Duplication) y una posterior evolución caracterizada por la pérdida de parte de los genes duplicados y por algunas reorganizaciones cromosómicas. Este fenómeno podría explicar el alto grado de redundancia que muestra el genoma de *S. cerevisiae* que consta de repeticiones de genes casi o totalmente idénticos, casos de genes que presentan homología parcial y tienen funciones iguales o distintas y, finalmente, duplicaciones de regiones enteras de cromosomas donde los genes están dispuestos normalmente en el mismo orden y orientación en los dos cromosomas. Una serie de continuas duplicaciones de pequeñas regiones o de cromosomas enteros podría dar como resultado una configuración del genoma similar a la postulada por Wolfe y Shields (Llorente *et al.*, 2000). Sin embargo, la hipótesis del WGD ha sido confirmada por otros trabajos (Wong *et al.*, 2002; Langkjaer *et al.*, 2003; Kellis *et al.*, 2004; Dietrich *et al.*, 2004; Cliften *et al.*, 2006).

La duplicación de genes es un conocido método de evolución para la adquisición de nuevas funciones sin perder las antiguas, ya que los genes duplicados proporcionan materia prima genética para la aparición de nuevas funciones a través de las fuerzas de la mutación y de la selección natural (Magadum *et al.*, 2013), permitiendo la adaptación de la levadura a nuevos entornos.

Sorprendentemente, en varios estudios se ha observado que en casi la totalidad de los genes duplicados, un paralogo ha evolucionado por lo menos un 50% más rápido que el otro, obteniendo una función completamente diferente con respecto al gen original (Kellis *et al.*, 2004; Byrne y Wolfe 2007; Replansky *et al.*, 2008). Por lo tanto, mientras que uno de los paralogos mantiene la función ancestral, el otro es libre de evolucionar de forma más rápida. Este fenómeno habría sido de gran importancia, ya que se cree que es el responsable de muchas características de las levaduras actuales, como la capacidad de crecer en presencia o ausencia de oxígeno (Kwast *et al.*, 2002), o el transporte de la glucosa al interior de la célula mediante sistemas de alta o baja afinidad (Geladé *et al.*, 2003).

3.2. Las levaduras se adaptan al entorno que les rodea

El genoma de la levadura está sujeto a numerosos procesos dinámicos, que constan de duplicaciones, eliminaciones, reorganizaciones, mutaciones y conversiones de genes (Liti *et al.*, 2005). Langkjaer *et al.* (2000) han demostrado, comparando fragmentos de ADN genómico de 3 especies del género *Saccharomyces* con la secuencia depositada en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae*, que los distintos cromosomas han sido fuertemente reorganizados durante su historia evolutiva y que inserciones o eliminaciones de un sólo gen o su duplicación, han jugado un papel significativo en la evolución de los cromosomas de levadura. Estas reorganizaciones génicas pueden haber sido provocadas como respuesta a situaciones de estrés continuadas y permiten la adaptación de las cepas de levadura a su nuevo entorno (Colson *et al.*, 2004). De hecho, en dichas condiciones la evolución microbiana acumula mutaciones consecutivas que le confieren mejoras en sus capacidades (Dykhuizen *et al.*, 1983).

Adams *et al.* (1992) sometieron a una cepa de laboratorio a crecimiento mitótico en un medio con cantidades limitantes de fosfato inorgánico, hasta completar de 700 a 1000 generaciones. Demostraron que la adaptación a este medio subóptimo fue acompañada por duplicaciones de amplias porciones del genoma, además de detectar a más baja frecuencia eliminaciones y otros tipos de eventos que conducen a la aparición de nuevos polimorfismos cromosómicos. Dunham *et al.* (2002) sometieron a una cepa a un período de crecimiento de 500 generaciones con limitaciones de la fuente de carbono (glucosa). Utilizando la técnica de Hibridación Genómica Comparativa, o CGH (del inglés, Comparative Genomic Hybridization) que utiliza la tecnología de las micromatrices de ADN, pudieron observar como algunos de los cambios cromosómicos se debían a amplificaciones en los transportadores de hexosas. El mismo grupo de investigación, utilizando varias técnicas basadas en las micromatrices de ADN, ha conseguido caracterizar los cambios genéticos resultantes de la adaptación de 24 cepas haploides y diploides de *S. cerevisiae* sometidas a un crecimiento durante 200 generaciones con limitaciones de glucosa, sulfato y fosfato. Observaron que las duplicaciones y eliminaciones de genes, las mutaciones puntuales y las amplias reorganizaciones cromosómicas eran las responsables de la adaptación de las cepas a las mencionadas condiciones limitantes.

Además encontraron que las cepas que se adaptaban a la limitación de sulfato poseían casi únicamente mutaciones en genes que codifican para transportadores de sulfato,

mientras que las mutaciones presentes en las cepas adaptadas a la limitación de glucosa y fosfato eran de las más variadas (Gresham *et al.*, 2008).

Un ejemplo muy claro de evolución adaptativa es el caso de *Saccharomyces diastaticus*, un contaminante habitual de los procesos industriales de fabricación de cerveza, que posee una glucoamilasa extracelular que le permite crecer en presencia de almidón y dextrinas residuales como única fuente de carbono (ver Figura 4). Las cepas amilolíticas de *Saccharomyces* son clasificadas en la moderna taxonomía como *Saccharomyces cerevisiae* o *Saccharomyces cerevisiae* var. *diastaticus*, pues no son consideradas como especies separadas de *Saccharomyces cerevisiae*. La glucoamilasa extracelular que posee, puede ser codificada por cualquiera de los tres miembros de la familia multigénica denominada *STA*: *STA1* (en el cromosoma IV), *STA2* (en el cromosoma II), o *STA3* (en el cromosoma XIV). Los genes *STA* no están presentes en la mayoría de las cepas de *S. cerevisiae*, pero están relacionados con 2 genes que sí están presentes en todas las cepas de *S. cerevisiae*: *SGA1* y *FLO11*. De hecho, la parte final de los genes *STA*, que codifica para la porción de la proteína con actividad amilásica, es homóloga a *SGA1* que codifica para una glucoamilasa intracelular específica del proceso de esporulación.

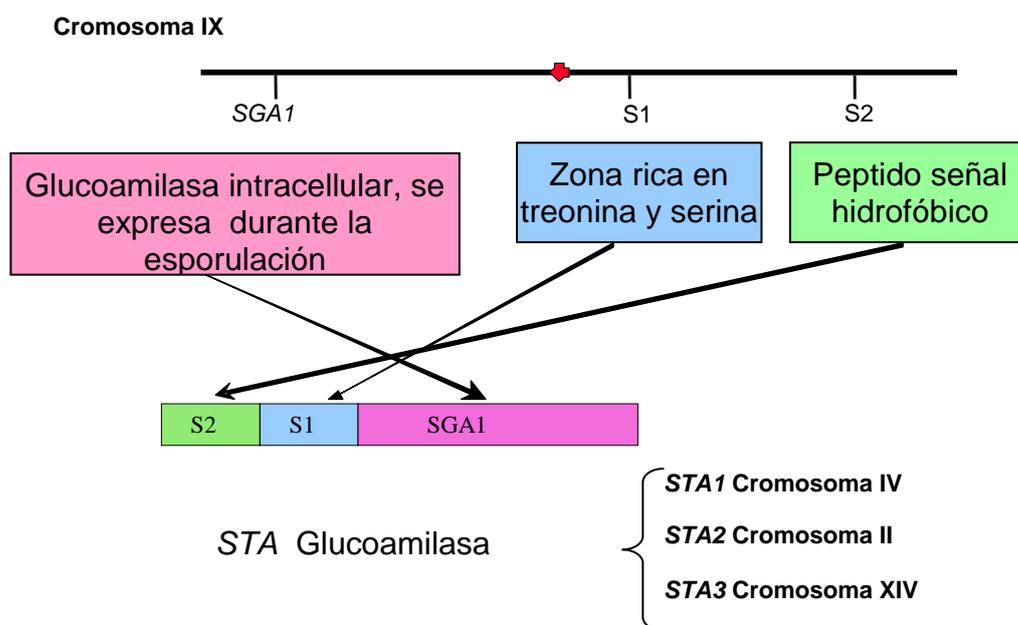


Figura 4. *S. cerevisiae* var. *diastaticus*: un ejemplo de evolución molecular.

Además, los genes *STA* presentan homología con otras dos regiones del gen *FLO11*, denominadas S1 y S2, y el promotor de los genes *STA* es también homólogo al promotor del gen *FLO11*. La fuerte homología entre los genes *STA* presentes en *S. diastaticus* y los genes *SGAI* y *FLO11* de *S. cerevisiae*, llevaron a Yamashita *et al.* (1987) a proponer que los genes *STA* proceden de un proceso de recombinación entre *SGAI* y las regiones S2 y S1, que dio origen a un gen ancestral *STA* que posteriormente, y tras sucesivas traslocaciones cromosómicas, fue transferido a tres diferentes *loci* cromosómicos. Los genes *STA* pueden conferir una ventaja competitiva a las cepas que los poseen por cuanto permiten utilizar el almidón después que las otras fuentes de carbono se hayan agotado.

3.3. Evolución de cepas de levaduras industriales

Las cepas de levaduras industriales están continuamente expuestas a diferentes condiciones medioambientales que afectan a su viabilidad y vitalidad. Estas incluyen altas presiones osmóticas e hidrostáticas por el alto contenido en azúcares de los mostos o extractos a fermentar y las considerables alturas de los tanques de fermentación, respectivamente, altas concentraciones de alcohol, limitación de nutrientes, anaerobiosis, fluctuaciones en la temperatura, o el uso de compuestos antimicrobianos como el dióxido de azufre, etc. (Bauer y Pretorius, 2000). Cuando se las expone a condiciones lejanas a las fisiológicamente ideales como las experimentadas durante la fermentación, las levaduras exhiben una compleja estrategia de respuesta al estrés que consta de alteraciones en la transcripción y en la traducción, el acúmulo de moléculas protectoras frente al estrés y la activación de funciones reparadoras (Attfield, 1997; Brosnan *et al.*, 2000; Carrasco *et al.*, 2001). La eficiencia de estos procesos en una determinada cepa de levadura determina su supervivencia y su capacidad de rendir conforme a los parámetros comerciales del proceso industrial. El genoma de las cepas de *S. pastorianus*, caracterizado por ser alotetraploide, parece conferir un alto grado de tolerancia a los estreses experimentados durante la producción de cerveza. En efecto, mientras las cepas de *S. pastorianus* realizan eficazmente la fermentación en presencia de los distintos tipos de estrés antes mencionados, las cepas haploides de *S. cerevisiae* y de *S. eubayanus* no fermentan o difícilmente lo hacen en dichas condiciones. Por lo tanto, la formación de cepas híbridas es un posible mecanismo de evolución y adaptación de las levaduras. Además, estos híbridos adquieren propiedades de las cepas

parentales que la componen, por ejemplo, la tolerancia a altas concentraciones de glucosa y alcohol de *S. cerevisiae*, la tolerancia a bajas temperaturas de *S. paradoxus* o la más alta producción de compuestos aromáticos de *S. bayanus* (Masneuf *et al.*, 1998). Las cepas de levaduras industriales como *S. cerevisiae*, *S. pastorianus* y *S. bayanus* son organismos altamente especializados que han evolucionado para utilizar completamente el potencial nutritivo de los diferentes ambientes o nichos ecológicos que les han sido proporcionados por la actividad humana. Este proceso de adaptación podría ser el responsable de las específicas características genéticas de las levaduras industriales, en particular la presencia de cromosomas altamente polimórficos. Se habla de polimorfismos cromosómicos cuando dos cepas de la misma especie o dos clones de la misma cepa presentan diferencias de tamaño y/o número de bandas cromosomales en sus cariotipos. Se ha demostrado que los genomas aloploidos, característicos de las cepas industriales, están en continua evolución y pueden albergar una tasa más alta de cambios evolutivos con respecto a las cepas haploides o diploides de las cuales proceden, aumentando las posibilidades de evolución adaptativa (Querol y Bond, 2009). Como confirmación de lo dicho, se ha descrito que cepas tetraploides de *S. cerevisiae* muestran un aumento de 400 veces en la pérdida de cromosomas con respecto a cepas diploides isogénicas (Andalis *et al.*, 2004). Un reciente estudio sobre diversos clones aislados a partir de una cepa de *S. pastorianus* que primeramente había sido mutagenizada, después expuesta a altas temperaturas y finalmente sometida a crecimiento bajo altas concentraciones de maltosa (22%), ha revelado que a lo largo de dicho proceso se han desarrollado reorganizaciones, eliminaciones y amplificaciones de genes, algunas de las cuales son específicas para cada clon (James *et al.*, 2008). En el mismo estudio se demostró que las cepas de *S. pastorianus* muestran un alto grado de plasticidad genómica y que experimentan cambios genéticos como respuesta a estreses ambientales. Sin embargo, los autores del estudio no observaron reorganizaciones genéticas durante un único proceso de fermentación del mosto, concluyendo que es necesario un proceso de continua selección en condiciones de estrés para obtener reorganizaciones estables. Aunque dichas reorganizaciones genéticas son un mecanismo de adaptación de la levadura a un medio hostil, muchas veces no son deseables industrialmente. Uno de los mecanismos responsables de la aparición de polimorfismos cromosómicos es el de inestabilidad cariotípica, que se basa en reorganizaciones cromosómicas que dan como resultado la aparición de diferentes polimorfismos cromosómicos entre clones de una misma cepa o entre sus derivados

meióticos. Estos polimorfismos son consecuencia, en muchos casos, de una adaptación al medio industrial y se originan, normalmente, mediante recombinación homóloga no alélica entre secuencias repetidas a lo largo del genoma (Querol *et al.*, 2003). Este fenómeno es muy importante industrialmente, dado que una cepa con inestabilidad cariotípica no siempre garantiza la reproducibilidad de las características del producto final (Gasent-Ramirez *et al.*, 1999).

Algunas reorganizaciones cromosómicas quedan establecidas en una determinada cepa a lo largo del tiempo como resultado de una fuerte presión del medio de crecimiento industrial. Este es el caso detallado por Guijo *et al.* (1997), que encontraron polisomías del cromosoma XIII en levaduras vínicas de producción del vino de jerez. Este cromosoma contiene los genes *ADH2* y *ADH3* (que codifican para sendas alcohol deshidrogenasas), que están implicados en los procesos oxidativos del etanol durante el envejecimiento de estos vinos, por lo que el incremento detectado en el número de copias de dichos genes, posiblemente mejoraba las características industriales de la cepa. Codón *et al.* (1998) describieron una amplificación del gen *SUC2* en cepas panaderas, concluyendo que es un mecanismo adaptativo el que confiere un mejor comportamiento industrial a dichas cepas. Asimismo, podría parecer sorprendente que los genes implicados en el transporte de azufre (*SUL1-2*) y amoníaco (*MEP2*) (Cavalieri *et al.*, 2000), o en resistencia a sulfito (*SSU1*) (Hauser *et al.*, 2001), se sobreexpresen en cepas vínicas. Sin embargo, Pérez-Ortín *et al.* (2002) han descrito una translocación recíproca entre los cromosomas VIII y XVI, dando como resultado el alelo *SSU1-R* (el gen *SSU1* codifica para una bomba de sulfito localizada en la membrana plasmática y su sobreexpresión confiere resistencia a sulfito). En este alelo, el gen *SSU1* está regulado por el promotor fuerte del gen *EMC34* confiriendo una ventaja selectiva a la cepa en cuestión dadas las altas concentraciones de SO₂ que se emplean en la elaboración del vino. El mismo grupo de investigación demostró, además, que dicha translocación está presente sólo en cepas vínicas, sugiriendo que el uso de dióxido de azufre en la producción de vino a lo largo de los siglos podría haber favorecido su selección.

Mortimer *et al.* (1994) formularon el modelo del “Genome Renewal” como mecanismo alternativo a los procesos de recombinación mitótica. Este modelo describe como una cepa diploide que acumule mutaciones sucesivas puede llegar a esporular, y luego sus segregantes meióticos al desdoblarse bajo condiciones de crecimiento vegetativo, diploidizar y formar nuevos clones que pueden imponerse al resto si durante el proceso han adquirido alguna ventaja selectiva.

Además de las reorganizaciones cromosómicas, otros fenómenos han contribuido a la adaptación de las levaduras industriales a las severas condiciones ambientales a las cuales están sometidas. El análisis de las secuencias del genoma de varias cepas de levaduras de diferentes orígenes ha mostrado que el polimorfismo de nucleótido simple podría ser la principal fuente de variación del fenotipo (Liti *et al.*, 2009; Shacherer *et al.*, 2009). Borneman *et al.* (2008) secuenciaron el genoma de una cepa vínica y compararon la secuencia obtenida con la secuencia de la cepa de laboratorio S288c. Observaron que mientras había la conservación de parte de la secuencia, habían varias regiones que mostraban un elevado número de cambios en forma de polimorfismo de nucleótido simple y en el número y localización de los elementos Ty. Además encontraron regiones de ADN específicas de la cepa secuenciada. Postularon que los cambios encontrados eran los responsables de la diversificación y la especialización de las cepas vínicas, aunque es necesaria la secuenciación de más cepas de *S. cerevisiae* para identificar aquellas variaciones genéticas que son más determinantes en la separación fenotípica entre las cepas vínicas y las otras cepas de *S. cerevisiae*.

Aunque sea bastante raro, la HGT puede haber contribuido a la evolución de las cepas de levadura industrial. Novo *et al.* (2009), comparando la secuencia genética de la cepa vínica EC1118 con la secuencia de la cepa de referencia S288c, observaron que la cepa vínica posee 3 regiones del genoma características que la hacen diferenciar fuertemente de otras cepas de *S. cerevisiae*. Una de estas 3 regiones, que incluyen 34 genes implicados en funciones claves en la fermentación del mosto a vino, procede de una especie cercana al género *Saccharomyces*, mientras que las otras 2 regiones tienen un origen distinto. En particular identificaron a *Zygosaccharomyces bailii*, un contaminante habitual de las fermentaciones vínicas, como una de las especies donantes. Concluyeron que el genoma de las levaduras vínicas está sujeto a una constante renovación a través de la aportación de genes exógenos procedentes principalmente de especies presentes en el proceso fermentativo.

OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN

El presente trabajo surge sobre la premisa que el desarrollo y la aplicación de la biotecnología en el campo agroalimentario va a contribuir decisivamente en la implantación y mejora de la calidad de las nuevas generaciones de los alimentos que consumiremos. Este enfoque no sólo es coherente con las líneas prioritarias marcadas por los organismos nacionales y europeos que definen las políticas de investigación (ver http://ec.europa.eu/languages/news/pdf/fp7-factsheets_es.pdf), sino que refleja las cada vez mayores implicaciones sociales y económicas que la aplicación de la biotecnología y la bioingeniería tienen y tendrán en un ámbito de tanta trascendencia como es el campo de la alimentación humana.

Mediante esta Tesis Doctoral se intenta demostrar y desarrollar un nuevo concepto sobre el uso de las técnicas de biología molecular en la obtención de levaduras con determinadas características de interés industrial, proporcionando un enfoque alternativo para soslayar las conocidas reticencias que pesan sobre los OMG y frenan su aplicación en la tecnología de alimentos. La idea básica es simple y se basa en imitar a la propia naturaleza en su constante evolución, pero acelerando y dirigiendo el proceso evolutivo con el objeto de seleccionar en un corto periodo de tiempo aquellos cambios genéticos que específicamente hayamos diseñado a escala molecular.

Así pues, el objetivo fundamental del proyecto se centra en el desarrollo de una metodología, que utiliza un conjunto de reacciones de PCR, encadenadas en una secuencia determinada, con el objetivo de fusionar en el tubo de ensayo, mediante un diseño adecuado de los cebadores de las reacciones de PCR, diversos elementos génicos (promotores, secuencias señal, pautas de lectura abierta, marcadores dominantes, secuencias de integración, etc.) procedentes de la misma levadura que se va a evolucionar, reorganizándolos de manera que sus niveles de expresión, localización celular o regulación respondan a un determinado cambio genético que específicamente hayamos diseñado a escala molecular. Por lo tanto, dicho cambio genético se podría haber efectuado espontáneamente por la levadura en su entorno natural en presencia de determinadas condiciones de selección, pero mediante esta metodología lo que se consigue es acelerar el proceso evolutivo. La demostración de esta novedosa metodología se ha realizado mediante la construcción e integración cromosómica de un casete de selección que contenga un gen marcador dominante, fácilmente seleccionable y procedente del genoma de la propia cepa de levadura industrial a evolucionar. En concreto, nos proponemos obtener, sólo mediante reacciones de PCR, una construcción que, posteriormente a su inserción cromosómica mediante recombinación homóloga,

sustituirá al promotor original del gen *YAP1* por un promotor fuerte de un gen de la ruta de la glicólisis, el promotor del gen *PGK1*.

Una vez alcanzado dicho objetivo primordial, se utilizará la misma metodología para abordar como segundo objetivo el desarrollo de nuevas estirpes de levaduras industriales con mejoras en determinadas características que resulten relevantes o de interés en los procesos en que se empleen. En concreto se plantea el desarrollo de 3 tipos de levadura: una levadura de producción de cerveza tipo lager con baja producción de diacetilo; una levadura industrial con alta actividad pectinolítica para su uso en la producción de bioetanol a partir de residuos cítricos; una levadura vínica con una mejor tolerancia frente a bajas temperaturas. Así, por construcción e integración cromosómica en las cepas industriales, de fragmentos de fusión obtenidos a partir de diversos elementos génicos se modificarán los niveles de expresión de determinados genes responsables del fenotipo que se quiera modificar.

Las técnicas de ingeniería genética basadas en las reacciones de fusión de fragmentos de ADN mediante PCR, han sido amplia y muy recientemente descritas en la bibliografía y empleadas en el análisis funcional del genoma de *Saccharomyces cerevisiae*. No obstante, su aplicación al desarrollo de nuevas cepas de levaduras industriales es completamente original y *a priori* claramente viable.

**MATERIALES
MÉTODOS**

Y

1. Reactivos y material biológico

1.1. Reactivos

Los reactivos y kits específicos de biología molecular se encuentran descritos junto con cada una de las técnicas o protocolos en los que se utilizan, mientras que los reactivos químicos generales se detallan en el Anexo 1.

1.2. Cepas de levadura

Las cepas de levadura utilizadas se encuentran descritas en la Tabla 4, que se presenta a continuación.

Cepa	Descripción/Genotipo	Referencia
W303-1A	Levadura de laboratorio <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, MATa {<i>leu2-3,112</i>, <i>trp1-1</i>, <i>can1-100</i>, <i>ura3-1</i>, <i>ade2-1</i>, <i>his3-11,15</i>}[<i>PHI⁺</i>] <i>GAL SUC2 mal0</i>	Thomas y Rothstein, 1989.
WT-410	Cepa W303-1A donde se ha sustituido el promotor del gen <i>YAPI</i> por el promotor del gen <i>PGK1</i> .	Este trabajo
WPI8	Cepa W303-1A que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> y donde se ha sustituido el promotor del gen <i>ILV5</i> por el promotor del gen <i>PGK1</i> .	Este trabajo
WTP6	Cepa W303-1A que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> y donde se ha sustituido el promotor del gen <i>PGUI</i> por el promotor del gen <i>TDH3</i> .	Este trabajo
WPP45	Cepa W303-1A que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> y donde se ha sustituido el promotor del gen <i>PGUI</i> por el promotor del gen <i>PGK1</i> .	Este trabajo
WDINP6	Cepa W303-1A donde se ha inactivado el gen <i>INP51</i> mediante inserción en la ORF del mismo de un marcador dominante basado en la sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> .	Este trabajo

Tabla 4. Cepas de levadura utilizadas en esta Tesis. Las nuevas levaduras, bien de laboratorio o industriales procedentes de una misma cepa parental (indicadas en negrita) se agrupan dentro de un mismo marco coloreado.

Cepa	Descripción/Genotipo	Referencia
S1	Levadura industrial <i>Saccharomyces pastorianus</i> empleada para la fabricación de cerveza tipo lager.	Villa <i>et al.</i>, 1995
S1-3T	Cepa S1 donde se ha sustituido una copia del promotor del gen <i>YAPI</i> por el promotor del gen <i>PGK1</i> .	Este trabajo
S1-PI6	Cepa S1 que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> y donde se ha sustituido una copia el promotor del gen <i>ILV5</i> por el promotor del gen <i>PGK1</i> .	Este trabajo
S1-PI6PO	Cepa S1 donde se ha sustituido una copia del promotor del gen <i>ILV5</i> por el promotor del gen <i>PGK1</i> .	Este trabajo
M69	Levadura industrial <i>Saccharomyces cerevisiae</i>, empleada para la fabricación de vinos blancos.	Lalvin M69, Lallemand
M69-DI1	Cepa M69 donde se ha inactivado una copia del gen <i>INP51</i> mediante inserción en la ORF del mismo de un marcador dominante basado en la sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> .	Este trabajo
M69-DI6	Cepa M69 donde se han inactivado dos copias del gen <i>INP51</i> mediante inserción en la ORF del mismo de un marcador dominante basado en la sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> .	Este trabajo
CECT 1926	Levadura industrial <i>Saccharomyces bayanus</i>, Saccardo (1895), aislada de Coca-Cola contaminada.	NCYC 686
1926-TP6	Cepa 1926 que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> y donde se ha sustituido una copia del promotor del gen <i>PGU1</i> por el promotor del gen <i>TDH3</i> .	Este trabajo
1926-12T	Cepa 1926 que contiene un marcador dominante de selección basado en la sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> y donde se ha sustituido una copia del promotor del gen <i>PGU1</i> por el promotor del gen <i>PGK1</i> .	Este trabajo
1926-12T4PO	Cepa 1926 donde se ha sustituido una copia del promotor del gen <i>PGU1</i> por el promotor del gen <i>PGK1</i> .	Este trabajo

Tabla 4. (Continuación)

1.3. Cepas de *Escherichia coli*

Se utilizó la cepa de *Escherichia coli* DH5 α (*supE44* Δ *lacU169* (ϕ 80*lacZ* Δ M15) *hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1relA1*) (Hanahan, 1983) como huésped para la realización de los clonajes que se presentan en esta Tesis.

1.4. Plásmidos

La relación de plásmidos utilizados o construidos en este trabajo se describe en la Tabla 5:

Plásmido	Descripción	Referencia
pYPGE15	Vector episomal de expresión en levadura capaz de replicarse en <i>E. coli</i> . Contiene el marcador auxotrófico para levadura <i>URA3</i> , el gen <i>bla</i> que confiere resistencia a ampicilina en <i>E. coli</i> y el promotor del gen <i>PGK1</i> justo antes del polylinker.	Brunelli y Pall, 1993.
pYPGE15+YAP1	Plásmido pYPGE15 con un inserto <i>SmaI</i> de 2046 pb que contiene el gen <i>YAP1</i> bajo control del promotor del gen <i>PGK1</i> .	Este trabajo

Tabla 5. Plásmidos utilizados en este trabajo

2. Medios de cultivo, condiciones de crecimiento y de conservación de los microorganismos

A continuación, se presenta un listado de los diferentes medios de cultivo utilizados, así como las cantidades necesarias en gramos para preparar un litro de cada uno de dichos medios y, entre paréntesis, la concentración (en porcentaje peso/volumen) de cada componente en la mezcla final (Burke et al., 2000).

Para la preparación de medio líquido no se añadió agar a la mezcla de componentes.

2.1. Medios de cultivo de levaduras

Los cultivos de levaduras se incubaron a 30 °C. Los medios líquidos se mantuvieron en agitación a 200 r.p.m. en un agitador orbital “C25 Incubator Shaker” (New Brunswick Scientific, EE. UU.). Los medios de cultivo utilizados fueron:

- Medio YPD (Yeast extract Peptone Dextrose): este es un medio de uso rutinario que aporta todos los nutrientes necesarios para que la levadura crezca. Su composición es la siguiente:

Extracto de levadura	10 g	(1%, p/v)
Peptona	20 g	(2%, p/v)
Glucosa	20 g	(2%, p/v)
Agar bacteriológico	20 g	(2%, p/v)
H ₂ O bidestilada	c.s.p.	1 l

- Medio rico con drogas: Para medir la resistencia a cicloheximida y cerulenina de las cepas salvajes y de los transformantes se han utilizado placas de YPD con diversas concentraciones de dichas drogas. Para la preparación de los medios de cultivo selectivos, las drogas han sido añadidas siempre después de la esterilización de dichos medios. Las soluciones stock de dichas drogas han sido preparadas de la siguiente forma: cicloheximida 10 mg/ml en etanol y cerulenina 5 mg/ml en etanol. Ambas disoluciones se conservan en el congelador a -20 °C.
- Medio rico con triptófano (YPDT): Se trata del medio YPD ya descrito anteriormente pero ajustando a un volumen final de 750 ml a los que, una vez esterilizados, se añadieron 250 ml de una solución de triptófano de 8 mg/ml preesterilizada mediante un sistema de filtración modelo “MF75” (0,45 µm de tamaño de poro) de la marca Nalgene® Labware (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). La cantidad final de triptófano añadido al medio fue del 0,2% (p/v).
- Medio rico con fosfato 10 mM: Se prepara del mismo modo que el YPD, sólo que ajustando a un volumen final de 900 ml para, tras un ciclo de autoclave, adicionar 100 ml de una solución de tampón fosfato sódico a pH 5,8 y de concentración 100 mM, previamente esterilizado, con lo que la cantidad final de fosfato añadida al medio es de 10 mM.
- Medio rico con triptófano 0,2% (p/v) y fosfato 10 mM: Se trata de medio YPD al que se le adicionó triptófano como en el medio YPDT y fosfato como en el medio anterior.
- Medio Mínimo (SD): Este medio se compone de base nitrogenada para la levadura (YNB, del inglés Yeast Nitrogen Base) sin aminoácidos y con sulfato amónico, suplementado con glucosa. El medio SD tiene muy poca capacidad tamponante y, aunque el pH inicial se encuentra alrededor de 5,5, el pH del medio va cayendo a lo largo del crecimiento. Por tanto, para obtener un crecimiento óptimo es aconsejable tamponarlo mediante la adición de un tampón ácido succínico-Tris 0,5 M pH 5,5 (59 g de ácido succínico en 1L de agua y se ajusta el pH a 5,5 con Tris), que se añade hasta una concentración final de 50 mM. A este medio mínimo se le añadieron los requerimientos auxotróficos propios de la cepa W303, excepto el aminoácido uracilo, cuya auxotrofia queda complementada por la presencia del plásmido pYPGE15. El medio resultante se denomina SD-Ura. La adenina y los aminoácidos leucina e histidina fueron esterilizados mediante un ciclo de autoclave, mientras que

el triptófano fue preesterilizado por filtración. Para la preparación de este medio, en primer lugar se autoclavó el agua junto con el agar, en la siguiente proporción:

Agar bacteriológico	20 g	(2%, p/v)
H ₂ O bidestilada	640 ml	

Una vez esterilizado se añadieron las siguientes soluciones preesterilizadas:

Glucosa 20%, p/v	100 ml	(2%, p/v)
YNB 7% sin aminoácidos y con sulfato amónico	100 ml	(0,7%, p/v)
Tampón Ácido Succínico- Tris 0,5 M pH 5,5	100 ml	
Adenina sulfato 0,2%, p/v	10 ml	(0,002%, p/v)
Histidina 0,2%, p/v	10 ml	(0,002%, p/v)
Leucina 1%, p/v	10 ml	(0,01%, p/v)
Triptófano 0,2%, p/v	10 ml	(0,002%, p/v)

- Medio YPG (Yeast extract Peptone Glycerol): Este es un medio complejo que contiene una fuente de carbono no fermentable (glicerol) que no permite el crecimiento de levaduras con deficiencia respiratoria. Su composición es la siguiente:

Extracto de levadura	10 g	(1%, p/v)
Peptona	20 g	(2%, p/v)
Glicerol	30 ml	(3%, v/v)
Agar bacteriológico	20 g	(2%, p/v)
H ₂ O bidestilada	c.s.p. 1 l	

- Medio definido con ácido poligalacturónico 2% (p/v) (YPA): Este medio se utilizó para la determinación en placa de la actividad endopoligalacturonasa de cepas de levaduras industriales.

Para la preparación de este medio, en primer lugar se autoclavó en un erlenmeyer parte del agua junto con el agar en la siguiente proporción:

Agar bacteriológico	15 g	(1,5%, p/v)
H ₂ O bidestilada	360 ml	

Una vez esterilizado se añadieron las siguientes soluciones preesterilizadas:

Glucosa 20%	25 ml	(0,5%, p/v)
YNB 7% sin aminoácidos y con sulfato amónico	100 ml	(0,7%, p/v)

Al mismo tiempo se autoclavó en otro erlenmeyer la parte restante del agua para obtener 1 l de medio, junto con el ácido poligalacturónico (se había disuelto con anterioridad en la misma agua mediante agitación y calentamiento a 90 °C) en la siguiente proporción:

Ácido poligalacturónico	20 g	(2%, p/v)
H ₂ O bidestilada	480 ml	

Una vez preparados, se mezcló el contenido de cada uno de los dos erlenmeyers y se vertió el medio resultante en placas Petri.

- Medio sintético con ácido poligalacturónico (2% p/v) (SDPA): Este medio se utilizó para la determinación en placa de la actividad endopoligalacturonasa de la cepa W303-1A y de sus transformantes. Se prepara del mismo modo que el medio descrito en el apartado anterior, pero ajustando el erlenmeyer conteniendo el agar a un volumen final de 310 ml a los que, una vez esterilizados, se añadieron 10 ml de disoluciones de cada uno de los requerimientos auxotróficos propios de la cepa W303-1A preparados a una concentración 100 veces superior a la que finalmente presenta el medio final y que son iguales a las descritas para el medio mínimo SD.
- Licor obtenido de residuos de cítricos: Se ha obtenido mediante prensado de las cortezas y bagazos de naranja y se ha utilizado como medio de cultivo para la cepa CECT 1926. Las cortezas y bagazos de naranja proceden del residuo que se obtiene tras la extracción del zumo de naranja mediante un extractor de copas industrial (extractor Fomex de la empresa Fomesa, Valencia, España). Para la obtención del licor, antes del prensado del residuo se trató con hidróxido de calcio al 0,3% (p/p), removiéndose la mezcla durante 20 min. Una vez transcurrido el tiempo de mezclado, el material se prensó dos veces consecutivas en una prensa neumática (3 Kg/m² de presión durante 7 minutos) y se recogió el líquido que sale de la prensa. A continuación se resumen las características del licor que se ha utilizado en esta Tesis.

pH	°Bx	Aceites esenciales	Azúcares mayoritarios (g/l)			
			Glucosa	Fructosa	Sacarosa	Total
5,95	13,7	1015 ppm	37,59 (±0,73)	26,27 (±0,26)	29,26 (±2,10)	93,13 (±3,09)

- Mosto industrial obtenido de malta al 100%. Ha sido proporcionado por la empresa Heineken España, S. A., siendo elaborada en su factoría de Valencia y se ha utilizado como medio de crecimiento en la determinación de los mutantes deficientes en respiración y en la prueba de fermentación con levaduras cerveceras evolucionadas para disminuir su producción de diacetilo.

2.2. Medios de cultivo de bacterias

Los cultivos líquidos de *E. coli* se incubaron a 37 °C y 200 r.p.m. de agitación orbital. Los cultivos sólidos se incubaron en estufa a 37 °C. Los medios utilizados fueron:

- Medio LB: (Luria-Bertani) Se trata de un medio complejo utilizado para el crecimiento de *E. coli*. Su composición es la siguiente:

Triptona	10 g	(1%, p/v)
Extracto de levadura	5 g	(0,5%, p/v)
NaCl	10 g	(1%, p/v)
Agar bacteriológico	20 g	(2%, p/v)
Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5 N		
H ₂ O bidestilada	c.s.p. 1 l	

Para el crecimiento de bacterias transformadas con plásmidos que confieren resistencia a antibióticos de tipo beta-lactámico, se añadió ampicilina al medio LB a una concentración final de 100 µg/ml.

- Medio SOB: Éste fue el medio de cultivo utilizado para el crecimiento de *E. coli* en la preparación de células competentes. Su composición se muestra a continuación:

Triptona	20 g	(2%, p/v)
Extracto de levadura	5 g	(0,5%, p/v)
NaCl	0,5 g	(0,05%, p/v)
KCl 250 Mm	10 ml	2,5 mM
Ajustar el pH a 7,0 con NaOH 5 N		
H ₂ O bidestilada	c.s.p. 1 l	

Antes de su utilización se añadieron 5 ml de una solución estéril de $MgCl_2$ 2 M.

- Medio SOC: Éste medio es idéntico al medio SOB, excepto que, tras su esterilización en el autoclave, se añadió glucosa hasta una concentración final igual a 20 mM. Se utilizó para facilitar la recuperación de las bacterias después de haber sido transformadas.

2.3. Conservación de las cepas utilizadas

Para su almacenamiento a largo plazo, las cepas se mantuvieron a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ en microviales estériles de 2 ml, con una concentración final de glicerol estéril al 15% (v/v). Para el uso diario y continuo de las cepas, se conservaron en medio sólido almacenado en nevera durante un mes.

3. Técnicas de biología molecular

3.1. Obtención y purificación de ADN genómico de levadura

Se partió de un cultivo de la cepa de levadura cuyo ADN genómico se va aislar y que previamente se había inoculado en 2 ml de medio YPD y se había crecido durante 24 horas a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ en un agitador orbital a 240 r.p.m. El aislamiento y purificación del ADN se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Green y Sambrook (2012) basado en la digestión de la pared celular con la enzima Zimoliasa 20T (Seikagaku Corporation, Japan), y una lisis posterior del esferoplasto resultante con dodecil sulfato sódico. Además, se incorporaron las modificaciones realizadas por Lee (1992) para evitar que posibles inhibidores de enzimas se aislen junto con el ADN.

3.2. Obtención de ADN plasmídico de *E. coli*

Dependiendo del propósito del aislamiento se utilizaron tres protocolos alternativos.

En el caso de que el fin fuera la preparación y la purificación de los plásmidos pYPGE15 y pYPGE15+YAP1 o la secuenciación de este último, se hizo uso del protocolo facilitado por el fabricante del kit, “Pure Link™ Quick Plasmid Miniprep Kit” (Invitrogen Corporation, EE. UU.).

Para utilizar el plásmido con otros propósitos, tales como digestión con enzimas de restricción, se realizaron las “minipreparaciones” del ADN plasmídico por el método de ebullición (Holmes y Quigley, 1981).

Por último, para utilizar el plásmido en la transformación de las cepas de levaduras industriales, se realizaron las “maxipreparaciones” del ADN plasmídico mediante lisis alcalina con dodecil sulfato sódico (Green y Sambrook, 2012) y se purificó el ADN plasmídico así obtenido mediante el kit “Wizard *Plus* Maxipreps DNA Purification System” (Promega Corporation, Madison, WI, EE. UU.).

3.3. Construcción del plásmido pYPGE15+YAP1

A partir del ADN genómico de la cepa S1, se amplificó por PCR un fragmento de 2.046 pares de bases (pb) conteniendo la pauta de lectura abierta del gen *YAP1* y se clonó dicho fragmento en el plásmido multicopia pYPGE15 bajo control del promotor del gen *PGK1* contenido en dicho plásmido.

Para la amplificación del fragmento conteniendo el gen *YAP1* se utilizaron los cebadores YAPPARTD y YAPR cuya secuencia y programa de amplificación se describen en las Tablas 6 y 7. Se utilizaron 2,5 unidades de la ADN polimerasa termoestable denominada “Pwo DNA Polymerase” (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), empleando como tampón de reacción el proporcionado por el fabricante de la enzima y añadiéndole sulfato magnésico hasta una concentración final de 2 mM. Dicha enzima deja extremos romos en los productos amplificados, de tal forma pueden ser directamente utilizados para la ligación. El fragmento obtenido se purificó según lo descrito en el apartado 3.4. y finalmente se cuantificó conforme a lo indicado en el apartado 3.7.

Por otro lado, el vector pYPGE15 se preparó y purificó mediante el kit descrito en el apartado 3.2. y, finalmente, se cuantificó. El plásmido obtenido se digirió con la endonucleasa de restricción *SmaI* (Fermentas International Inc., Canada) siguiendo las instrucciones del fabricante. Tras la digestión del vector, éste se trató con fosfatasa alcalina procedente de gamba (Fermentas International Inc., Canada) para desfosforilar sus extremos, añadiendo 0,4 unidades de enzima por cada picomol de extremos 5' en el ADN del vector linearizado e incubando durante 1 hora a 37 °C. De esta forma se intentó minimizar la recircularización del vector durante la ligación posterior. La fosfatasa alcalina se inactivó calentando 15 minutos a 65 °C.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' → 3')
ILV1D	GACGGGAAGGCACAAAAGAC
ILV1R	TGGCAATAGAGCCGAAATCAC
ILV2R	ACCGTGGATACCACCCATTA
ILV3D	ATCTGTTCTTCCGCTCTACCGTG
ILV3R	TTCCAGACGGCGTAAGAAGAGT
ILVPPGK1D	TTTACAACAAATATAAAACAATGTTGAGAACTCAAGCCGCCAG
INP1BD	ATCACCAGTGCGGCATGAATAG
INP1R	TGGTGTCGGAGAATGCGTAGG
INP2R	ATTGAAATCGCCCATCCA
INP2RB	CCAGCTATCGAATCACTGCCCTC
INP3R	TGGAGCGGGTCGTATAATCTAA
INPBD	GTTAGGCAGGAATTGAGTTTC <u>ACTTCCCCATTCTTGGACGCACAT</u>
INPPGK1R	CTTGAGTTGAAGTCAGGA <u>ACTTCCCATCTTCACTAATACCCTCC</u>
PGKINP1D	TAGTGAAGATGGGAGAGT <u>TCCTGACTTCAACTCAAGACGCAC</u>
PGKINT1R	GCAAGTCGAAACCGACCATAG
PGKPILVFD	ATAAGTAAAAAATAAAACTTCCTGACTTCAACTCAAGACGCAC
PGKPPGUFD	CATTGATGGACAAACGCATT <u>CCTGACTTCAACTCAAGACGCAC</u>
PGU1D	CTGGAGGATTGGGGAGGC
PGU1R	TTTCAGACGATCCCAAGGGT
PGU2D	GGCTCCTAAATATCATGGCGCT
PGU2R	TGCTGTGCGCACCTTCTACG
PGU3D	CTAAGGTCGCTATGGTCGTATG
PGU3R	CACCAGCCGAATCACCGTCT
PGUPGKFR	CTTGAGTTGAAGTCAGGAATGCGTTTGTCCATCAATGTGGGTAG
PGUPTDHF	AACACACATAAAACAAACAAA <u>ATGATTTCTGCTAATTCATTACTTATTTCC</u>
PGUPGKFD	TTTACAACAAATATAAAACAATGATTTCTGCTAATTCATTACTTATTTCC
PILVPGKFR	TTGAGTTGAAGTCAGGAAGTTTTATTTTTACTTATATTGCTGGTAGGGT
PINP1D	TGCTTTGCCCACTCATTCACC
PINP1R	GTGTAGATATTTGTTCCAACCTTCCG

Tabla 6. Secuencias de los cebadores utilizados en esta Tesis. En negrita se indican los nucleótidos añadidos que no hibridan con el ADN molde y que sirven para la adición de zonas de solapamiento con otros fragmentos que se quieren fusionar. Subrayados se indican los nucleótidos que hibridan con el ADN molde y que también son complementarios a la secuencia del fragmento a fusionar.

Nombre del cebador	Secuencia del cebador (5' → 3')
PINP2D	CTGTTTATCCTTCCAGCGTTT
PINP2R	TGAAACTCAATTCTGCCTAACC
PINP3D	CATACCAGGTGCCAGTTCTCAG
PINP4D	GCCAGTTCTCAGCAGCGTCAAT
PINPYAPTD	GTTATCTATGCCGCTTAAAG <u>C</u> TTTGCCCACTCATTACCACTT
PPGK1R	<u>GACAT</u> TGTTTTATATTTGTTGTAAAAAGTAG
PPGK2D	TGCAAGTACCACTGAGCAGG
PPGKF5D	GTTATCTATGCCGCTTAAAG TCCTGACTTCAACTCAAGACGCAC
PPGKYAPFD	AGAAGGAAAAGTTGTTT <u>C</u> TCCTGACTTCAACTCAAGACGCAC
PTDH1R	<u>C</u> ATTTTGTGGTTTATGTGTGTTTAT
PTDHYAPFD	GGTTATCTATGCCGCTTAAAG <u>C</u> CTCATCAGTAAGACCCGTTGAAAAG
PYAP3D	GAGGAACCCCAACCATATTCATAG
PYAPD	GTACCATTGAGACGAAGTGGAGCAGTTTACAGTGAATA
PYAPR	AAGAAACAACTTTTCTTCTTTAAACGTTTTGGGTGGC
YAP2D	GAAGAGGACTGCCCAAAATCG
YAP3D	ACCAGGAAATGAAAGCGAAATC
YAPD	ATGAGTGTGTCTACCGCCAAGAGGTCGCTGGATGTGC
YAPINT1R	GGAAAGCCAGATTTGCGTTG
YAPPART2D	TTTACAACAAATATAAAACA <u>ATG</u> AGTGTGTCTACCGCCAAGAGGTC
YAPPARTR	AGGCATAGGAGCCGAATGACTTGGATCATTGGTGAAG
YAPPINT1R	GGAAAGCCAGATTTGCGTTG
YAPR	CGAAAAGGCGAAGCAAGGTAAGTTAA
YAPR3	TCATTAACCTAACGACCCGCAAC
YAPTERR	CTTTAAGCGGCATAGATAACCCTA

Tabla 6. (Continuación)

Finalmente se realizó una extracción con fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1), seguida de una precipitación estándar con etanol (Green y Sambrook, 2012).

En la reacción de ligación se mezclaron 244 ng de inserto y la cantidad suficiente del vector linearizado y desfosforilado para alcanzar una proporción, en cuanto al número de moles, de 3:1 entre el inserto y el vector. En el mismo tubo de reacción se añadieron 0,3 unidades Weiss de la enzima ADN ligasa del bacteriófago T4 (Roche Diagnostics GmbH, Alemania), el tampón suministrado por el propio fabricante y agua bidestilada hasta un volumen final de 7,5 µl. La reacción se llevó a cabo a 16 °C durante 15 horas. Como control de la capacidad de recircularización del vector se realizó una reacción de ligación paralela en la que el inserto se omitió. A continuación se procedió a realizar la transformación de células competentes de *E. coli*, tal y como se indica en el apartado

4.2. del presente capítulo. Una vez recogidos los transformantes se aisló el ADN plasmídico por el método descrito en el apartado 3.2. Tras obtener los plásmidos, se comprobó la presencia del inserto mediante la digestión con las enzimas de restricción *Bam*HI y *Kpn*I (Fermentas International Inc., Canada), verificando en un gel de agarosa la presencia de las bandas de ADN con los pesos moleculares correspondientes, que son respectivamente 187 pb y 8.259 pb en el caso de la digestión con *Bam*HI y 8.063 pb y 383 pb en el caso de la digestión con *Kpn*I. El plásmido obtenido se secuenció con los cebadores YAPPARTD, YAPINT1R y YAPR, para comprobar que el inserto no presentaba ningún cambio con respecto a la secuencia original.

3.4. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): generalidades

Esta metodología se utilizó para alcanzar los siguientes objetivos:

- 1) amplificación del gen *YAP1* de la cepa S1 para su posterior clonación en el plásmido pYPGE15.
- 2) a partir del ADN genómico de las cepas industriales S1, CECT 1926 y M69, amplificación de fragmentos conteniendo zonas del genoma cuyas secuencias se querían conocer. En el caso de la cepa S1, se amplificó un fragmento conteniendo el gen *YAP1* y su promotor, otro fragmento conteniendo el promotor y el principio del gen de la fosfogliceroquinasa (*PGK1*) y un último fragmento conteniendo el gen *ILV5* y su promotor. En el caso de la cepa CECT 1926, se amplificó un fragmento conteniendo el gen *PGU1* y su promotor y un fragmento conteniendo el promotor del gen *TDH3*. Por último, para la cepa M69 se amplificó un fragmento conteniendo el gen *INP51* y su promotor. En la Tabla 8 se indican los cebadores y el programa utilizado para cada amplificación, así como los cebadores empleados en la verificación por secuenciación de los fragmentos amplificados.
- 3) construcción de fragmentos mediante reacciones de amplificación y fusión por PCR (en la Tabla 7, se indican las reacciones de PCR empleadas para la obtención de los fragmentos). Dichos fragmentos se construyeron de forma que se integraran en el ADN genómico de las levaduras mediante recombinación homóloga.
- 4) determinación de la correcta integración de los fragmentos en el ADN genómico de los transformantes. En la Tabla 9 se indican las características de las reacciones de amplificación y el tamaño de los productos de PCR obtenidos para cada una de las cepas analizadas.

Para productos inferiores a los 5.000 pb (excepción hecha de la amplificación del gen *YAPI* para su clonación en plásmido pYPGE15), las reacciones de PCR se efectuaron en 50 μ l de volumen final, utilizando una mezcla de ADN polimerasas termoestables que se comercializa bajo la denominación “Expand High Fidelity PCR System” (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). En cada reacción se añadieron 1,3 unidades de enzima utilizando como tampón de reacción el proporcionado por el fabricante de dicha enzima y añadiéndole cloruro magnésico hasta una concentración final de 1,5 mM. Los desoxirribonucleótidos trifosfato (dNTPs) utilizados son los denominados “Pure Extreme™ dNTPs” (Fermentas International Inc.), cuya concentración final en el ensayo era, para cada uno de ellos, 0,2 mM.

Para productos superiores a los 5.000 pb, las reacciones de PCR se efectuaron en 25 μ l de volumen final, utilizando una mezcla de ADN polimerasas termoestables que se comercializa bajo la denominación “Expand 20 kb^{PLUS} PCR System” (Roche Diagnostics GmbH, Alemania). En cada reacción se añadieron 1,25 unidades de enzima utilizando como tampón de reacción el proporcionado por el fabricante de dicho producto y añadiéndole cloruro magnésico hasta una concentración final de 2,75 mM. Los dNTPs utilizados fueron los denominados “Pure Extreme™ dNTPs” (Fermentas International Inc.), cuya concentración final en el ensayo era, para cada uno de ellos, 0,5 mM.

En todas las reacciones de PCR, la concentración final en el tubo de reacción de cada uno de los cebadores, directo y reverso, fue de 300 nM. Todos los cebadores han sido diseñados mediante el programa informático Primer Premier 5 (Premier Biosoft Internacional, California) y su secuencia se muestra en la Tabla 6. Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador Mastercycler® gradient (Eppendorf AG, Alemania).

En todos los casos, una vez completado el número de ciclos necesarios para obtener el fragmento, se realizó una extensión final de una duración comprendida entre 3 y 6 minutos (dependiendo del tamaño final del fragmento) para, finalmente, enfriar y mantener la mezcla de reacción a 4 °C hasta su posterior análisis mediante electroforesis en un gel de agarosa.

En el caso de las reacciones de fusión (mediante la metodología conocida en la literatura como “overlap extensión”), se realizó una primera reacción de extensión por PCR sin añadir cebadores y utilizando los fragmentos que sirven de molde como megacebadores.

Cebadores	Desnat. inic.	Desnat.	Hibridación (30s)	Extensión	Ciclos
YAPD YAPR	95 °C 2 min	95 °C 30 s	65,3 °C	72 °C, 150 s	30
PYAP3D PYAPR	95 °C 2 min	95 °C 30 s	58 °C	72 °C, 70 s	30
YAPPART2D YAPPINT1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	58 °C	72 °C, 80 s	30
PPGKYAPFD PGKINT1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	53 °C	72 °C, 90 s	30
PYAPD PPGK1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	50 °C sin cb 57 °C con cb	72 °C, 90 s	11 26
PYAPD YAPPARTR	95 °C 2 min	95 °C 30 s	51 °C sin cb 62 °C con cb	72 °C, 120 s	11 26
PGKPPGUF YAPR3	95 °C 2 min	95 °C 30 s	58 °C	68 °C, 180 s	30
PPGKF5D PGKINT1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	62 °C	72 °C, 70 s	30
YAPD * YAPTERR	95 °C 2 min	95 °C 30 s	59 °C	68 °C, 180 s	30
PGU2D PGUPGKFR	95 °C 2 min	95 °C 30 s	55	72 °C, 120 s	30
PGUPGKFD PGU1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	56	72 °C, 130 s	35
YAP2D * PPGK1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	51 °C sin cb 58 °C con cb	68 °C, 180 s	16 25
YAP3D PGU2R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	51 °C sin cb 57 °C con cb	68 °C, 180 s	16 25

Tabla 7. Condiciones de las reacciones de amplificación por PCR de los fragmentos utilizados en las distintas construcciones realizadas. En cada marco coloreado se agrupan las reacciones de PCR necesarias para una determinada construcción: **verde**, pYPGE15+YAP1; **azul**, sobreexpresión del gen *YAP1* en la cepa S1; **morado**, sobreexpresión del gen *PGU1* en la cepa CECT 1926; **rojo**, sobreexpresión del gen *ILV5* en la cepa S1; **naranja**, delección del gen *INP51* en la cepa M69. El sombreado distingue las reacciones de fusión por PCR de las reacciones de amplificación. La presencia de * indica que la misma reacción de PCR se ha utilizado en otra construcción. El color de * indica en qué construcción se ha utilizado. cb = cebadores.

Cebadores	Desnat. inic.	Desnat.	Hibridación (30s)	Extensión	Ciclos
PGU3D	95 °C	95 °C	51 °C sin cb	68 °C, 285 s	20
YAPTERR	2 min	30 s	57 °C con cb		22
PGU1D	92 °C	92 °C	57 °C	68 °C, 450 s	26
PGU3R	2 min	10 s			
PTDHYAPFD	95 °C	95 °C	55 °C	72 °C, 60 s	30
PTDH1R	2 min	30 s			
PGUPTDHF	95 °C	95 °C	56 °C	72 °C, 130 s	30
PGU1R	2 min	30 s			
YAP2D	95 °C	95 °C	50 °C sin cb	68 °C, 215 s	16
PTDH1R	2 min	30 s	53 °C con cb		24
PTDHYAPD	95 °C	95 °C	52 °C sin cb	72 °C, 140 s	17
PGU3R	2 min	30 s	57 °C con cb		25
ILV1D	95 °C	95 °C	58 °C	68 °C, 70 s	30
PILVPGKFR	2 min	30 s			
PGKPILVFD	95 °C	95 °C	58 °C	68 °C, 240 s	30
YAPR3	2 min	30 s			
ILVPPGK1D	95 °C	95 °C	56 °C	72 °C, 95 s	30
ILV2R	2 min	30 s			
ILV3D	95 °C	95 °C	51 °C sin cb	68 °C, 270 s	15
YAPTERR	2 min	30 s	56 °C con cb		30
YAP3D	95 °C	95 °C	51 °C sin cb	72 °C, 200 s	16
ILV3R	2 min	30 s	56 °C con cb		30
ILV3D	92 °C	92 °C	57 °C	68 °C, 420 s	23
ILV3R	2 min	10 s			
PINP1D	95 °C	95 °C	57 °C	68 °C, 230 s	30
INPPGK1R	2 min	30 s			
PINPYAPTD	95 °C	95 °C	58 °C	72 °C, 85 s	30
PINP1R	2 min	30 s			
PGKINP1D	95 °C	95 °C	56 °C	68 °C, 300 s	30
YAPR3	2 min	30 s			
INPBD	95 °C	95 °C	60 °C	72 °C, 120 s	30
INP1R	2 min	30 s			

Tabla 7. (Continuación)

Cebadores	Desnat. inic.	Desnat.	Hibridación (30s)	Extensión	Ciclos
PINP2D	95 °C	95 °C	55 °C sin cb	68 °C, 300 s	15
YAPTERR	2 min	30 s	55 °C con cb		25
PINP3D	92 °C	92 °C	55 °C sin cb	68 °C, 360 s	15
PINP2R	2 min	10 s	57 °C con cb		25
PINP4D	92 °C	92 °C	55 °C sin cb	68 °C, 390 s	15
INP2RB	2 min	10 s	60 °C con cb		25

Tabla 7. (Continuación)

Se efectuaron un mínimo de 11 ciclos, suficientes para fusionar entre ellos los fragmentos obteniendo un único molde. En cada reacción se utilizaron cantidades equimolares de los 2 fragmentos a fusionar. A continuación, en el tubo resultante de la reacción realizada en la etapa precedente, se añadieron 10 picomoles de cada uno de los cebadores (directo y reverso) y se procedió de la misma forma que en una PCR convencional.

En el caso de la técnica conocida como “colony PCR”, se aplicaron unas condiciones de reacción (en lo que se refiere a la duración del período de desnaturalización inicial del ADN molde, a la temperatura de hibridación y al número total de ciclos) un poco diferentes a las explicadas anteriormente. De hecho, dichas reacciones se caracterizan por un período de desnaturalización inicial del ADN molde de 4 minutos, de una temperatura de hibridación más baja con respecto a la que permitiría la temperatura de fusión de los cebadores y comprendida entre 50 y 55 °C, y por un número total de 35 ciclos.

Cuando ha sido necesario purificar un fragmento obtenido tras una reacción de amplificación por PCR, dicha purificación se ha realizado mediante el kit comercial denominado “UltraClean PCR Clean-up DNA Purification Kit” (MO BIO Laboratories Inc., EE. UU.) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.5. Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Tanto los productos de PCR, como el plásmido pYPGE15+YAP1 han sido analizados por electroforesis horizontal sumergida, utilizando geles de agarosa al 1% (p/v) en tampón borato 10 mM (obtenido por dilución de una solución stock de tampón borato 200 mM, que se prepara a partir de una disolución de NaOH 200 mM que se lleva hasta

pH = 8,0 con ácido bórico) (Brody y Kern, 2004). Dicho tampón se caracteriza por tener una baja concentración iónica con respecto a los tampones de uso común como el tampón TAE 1X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,0) o el tampón TBE 1X (45 mM Tris-borato, 1 mM EDTA pH 8,0). En consecuencia el tampón borato 10 mM permite utilizar altos voltajes en la electroforesis sin la generación excesiva de calor en los geles y consigue reducir sustancialmente el tiempo de separación de los fragmentos de ADN. Una vez terminada, bien la reacción de amplificación, o bien la digestión con enzimas de restricción, se tomó una alícuota de la mezcla de reacción y se le añadió el tampón de carga para ácidos nucleicos (30% (v/v) glicerol, 60 mM Tris-HCl pH 7,5, 60 mM EDTA, 0,36% (p/v) Xileno cianol FF, 3,6% (p/v) Tartrazina) (Invitrogen Corporation, EE. UU.).

Cebadores	Desnat. In.	Desnat.	Hibridación (30s)	Extensión	Cebadores usados para su secuenciación
PYAPD YAPR	95 °C 2 min	95 °C 30 s	64,2 °C	68 °C, 190 s	PYAPD; YAPD
PPGK2D PGKINT1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	52,1 °C	68 °C, 190 s	PPGK2D; PPGK1R
PGU1D PGU1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	55 °C	72 °C, 105 s	PGU1D; PGU1R; PGU2R
PTDHYAPD PTDH1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	55 °C	72 °C, 60 s	PTDH1R
ILV1D ILV1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	55 °C	68 °C, 180 s	ILV1D; ILV1R; ILV3D; ILV2R; ILV3R
PINP1D INP1R	95 °C 2 min	95 °C 30 s	57 °C	68 °C, 270 s	PINP1D; INP1R; PINP2D; INP1BD; INP2R; INP3R

Tabla 8. Condiciones de las reacciones de amplificación por PCR de los fragmentos integrados en los genomas de sus correspondientes cepas y cebadores empleados posteriormente para la secuenciación de dichos fragmentos. En cada marco coloreado se agrupan los cebadores utilizados para la amplificación por PCR y la determinación de la secuencia de interés: **azul**, promotor y ORF del gen *YAPI* de la cepa S1; **morado**, promotor y ORF del gen *PGUI* y promotor del gen *TDH3* de la cepa CECT 1926; **rojo**, promotor y ORF del gen *ILV5* de la cepa S1; **naranja**, promotor y ORF del gen *INP51* de la cepa M69.

Los tamaños de los fragmentos separados por electroforesis se han calculado por comparación de su migración con respecto a la migración de un patrón de pesos moleculares. Se usaron como patrones de tamaño molecular, los fragmentos generados al digerir el ADN del fago λ con la endonucleasa de restricción *HindIII* (TrackIt™ λ DNA/*HindIII* Fragments, Invitrogen Corporation, EE. UU.), o un patrón de pesos moleculares conteniendo fragmentos que abarcan el intervalo desde 100 hasta 12.000 pb (TrackIt™ 1Kb Plus DNA Ladder, Invitrogen Corporation, EE. UU.), o un patrón de pesos moleculares conteniendo fragmentos con diferencias entre sí de 100 pares de bases y que abarcan el intervalo desde 100 hasta 1.500 pb (TrackIt™ 100 bp DNA Ladder, Invitrogen Corporation, EE. UU.).

El resultado de la separación electroforética se ha visualizado sumergiendo durante 20 minutos los geles de agarosa en una solución del fluorocromo “SYBR Gold Nucleic Acid Gel Stain” (Invitrogen Corporation, EE. UU.) en tampón borato 10 mM y a continuación, exponiendo el gel en un transiluminador de luz UV de 365 nm. Para la preparación del fluorocromo, se ha diluido la solución comercial del mismo 10.000 veces en el tampón de electroforesis y se ha almacenado en oscuridad y a temperatura de refrigeración. El sistema de documentación digital empleado para capturar la imagen del gel bajo la luz UV ha sido el Gel Logic 100 de Kodak, junto con el programa informático Kodak 1D Image Análisis Software, versión 3.6.1. (Eastman Kodak Company, EE. UU.).

3.6. Aislamiento de ADN a partir de geles de agarosa

En alguna ocasión, durante la reacción de amplificación por PCR, además del fragmento que se quería obtener se formaba un pequeño artefacto que no se conseguía eliminar. En esos casos, se tuvo que recurrir a realizar una electroforesis en gel de agarosa al 1% en tampón TAE 1× (Tris-acetato 40 mM, EDTA 1 mM, pH 8,0) del producto final de la reacción y tras teñir el gel con SYBR Gold, se cortó la banda de interés y se extrajo y purificó el fragmento mediante el kit denominado “Rapid Gel Extraction Protocol” (Marligen Biosciencias, Inc., EE. UU.). Posteriormente, 1 μ l de la solución obtenida tras la purificación se utilizó como molde en una segunda reacción de PCR en la que se empleaban las mismas condiciones y cebadores que en la anterior.

Cebadores	Des. i.	Des.	Hibridación	Extensión	Ciclos	Tamaño productos PCR (pb)	
PYAPD	95 °C	95 °C	57 °C	68 °C, 180 s	30	S1	1.999
YAPINT1R	2 min	30 s				S1-3T	1.999 y 2.766
PPGK1D	95 °C	95 °C	56 °C	72 °C, 100 s	30	S1	(-)
YAPPARTR	2 min	30 s				S1-3T	1.412
PGU1D	95 °C	95 °C	58 °C	68 °C, 180 s	30	1926	2.219
PGU1R	2 min	30 s				1926-12T	2.988 y 6.133
						1926-TP6	6.194
						1926-12T4PO	2.988
PPGK1D	95 °C	95 °C	56 °C	68 °C, 300 s	30	1926	(-)
PGU3R	2 min	30 s				1926-12T	1.293 y 4.437
						1926-TP6	4.518
						1926-12T4PO	1.293
YAPD	95 °C	95 °C	59 °C	68 °C, 180 s	30	1926	(-)
PGU3R	2 min	30 s				1926-12T	3.668
						1926-TP6	3.749
						1926-12T4PO	(-)
YAP3D	95 °C	95 °C	56 °C	68 °C, 210 s	30	S1	(-)
ILV2R	2 min	30 s				S1-PI6	2.292
						S1-PI6PO	(-)
ILV1D	95 °C	95 °C	56 °C	68 °C, 210 s	30	S1	(-)
YAPTERR	2 min	30 s				S1-PI6	4.035
						S1-PI6PO	(-)
PPGK1D	92 °C	55 °C	68 °C 390 s	68 °C, 360 s	30	S1	(-)
ILV1R	2 min	30 s				S1-PI6	2.292
						S1-PI6PO	2.292
PINP4D	95 °C	95 °C	60 °C	68 °C, 210 s	30	M69	2.537
INP2RB	2 min	30 s				M69DI1	2.537 y 5.841
						M69DI6	5.841
PINP1D	92 °C	92 °C	55 °C	68 °C, 390 s	30	M69	3.636
INP1R	2 min	10 s				M69DI1	6.943 y 3.636
						M69DI6	6.943

Tabla 9. Condiciones de las reacciones de PCR utilizadas para comprobar la correcta integración de los fragmentos en el ADN genómico de las cepas industriales así como la posterior eliminación del casete de selección. Los fragmentos amplificados se secuenciaron con los cebadores de la Tabla 8.

3.7. Cuantificación de ADN

La cuantificación del contenido en ADN de las soluciones de los diversos fragmentos o plásmidos ya purificados, se ha realizado por espectrofotometría, analizando 1 μ l de muestra con el sistema denominado NanoDrop[®] ND-1000 UV-Vis Spectrophotometer junto con el programa informático *ND-1000 3.2.0* (Nanodrop Technologies, Inc., EE. UU.).

3.8. Secuenciación y análisis de las secuencias

Uno de los primeros pasos en este trabajo, ha sido el establecimiento, en cada una de las cepas de levaduras que se iban a evolucionar, de la secuencia de cada uno de los genes utilizados para la construcción de los fragmentos que se iban a integrar en las mismas. Posteriormente, los fragmentos integrados en el ADN genómico de las cepas evolucionadas, han sido secuenciados para comprobar la concordancia de sus secuencias con las esperadas. La secuenciación se realizó mediante una modificación del método enzimático de los “didesoxirribonucleótidos” (Sanger *et al.*, 1977). Se utilizó para ello el kit comercial BigDye[®] Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems Corporate, EE. UU.) y el termociclador “ABI GeneAmp PCR System 9700 thermal cycler” (Applied Biosystems Corporate, EE. UU.). Finalmente, el secuenciador de ADN utilizado ha sido el ABI Prism[®] 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems Corporate, EE. UU.). La secuenciación fue llevada a cabo por el Servicio de Secuenciación del Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (IBMCP). Previamente a la secuenciación, los fragmentos fueron purificados y cuantificados como se describió en los apartados 3.4. y 3.7.

El análisis y comprobación de las secuencias se llevó a cabo mediante el programa informático “Chromas v2.31” (Technelysium Pty. Ltd., Australia). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con las depositadas en la base de datos *Saccharomyces* Genome Database[™], a través de su página Web (<http://www.yeastgenome.org/>) usando el programa BLAST.

3.9. Eliminación del casete de selección

Para la eliminación del casete de selección se crecieron los transformantes en 2 ml de YPD líquido durante 24 horas, tras lo cual se tomaba una pequeña alícuota que se

utilizaba para volver a inocular otros 2 ml de YPD, repitiéndose este ciclo hasta 35 veces. Pasado este período, y a partir del último tubo inoculado, se aislaron 1.650 colonias que se pasaron a placas de YPD y en placas de YPD conteniendo cerulenina a una concentración igual al medio usado para seleccionar los transformantes (ver Tabla 10). Se identificaron las colonias que no crecían en el medio YPD conteniendo cerulenina y se determinó mediante PCR si habían eliminado el casete de selección (ver Tabla 9).

4. Técnicas de transformación de microorganismos

4.1. Transformación de levaduras

Las distintas cepas de levadura se transformaron siguiendo el protocolo basado en el tratamiento con acetato de litio/ADN monocatenario de alto peso molecular/polietilenglicol (LiAC/ss-Carrier ADN/PEG) y choque térmico a 42 °C descrito por Gietz y Woods (2002).

En el caso de la cepa cervecera S1, cuya frecuencia de transformación es muy baja, se resuspendieron las células que se recogen tras la fase de crecimiento exponencial en YPD, en 50 ml de YNB sin aminoácidos y con sulfato amónico (1,7 g/l) durante 2 horas a 30 °C y 200 r.p.m. de agitación orbital. Después de este paso, se continuó con el protocolo descrito por Gietz y Woods. Además se aumentó el período de incubación a 42 °C de 40 a 50 minutos y se disminuyó la concentración del acetato de litio de 0,1 M a 0,06 M.

Con cada experimento de transformación, siempre se realizó un control negativo, sin la adición de ADN, y un control positivo para estimar la frecuencia de transformación, añadiendo una cantidad conocida del plásmido pYPGE15+YAP1.

Los transformantes de W303-1A (haploide y diploide) portadores del plásmido pYPGE15+YAP1 han sido seleccionados, tanto en medio mínimo SD-Ura, como en medio rico YPD conteniendo cerulenina, mientras que los transformantes de W303-1A (haploide y diploide) portadores de la construcción que sobreexpresa el gen *YAP1*, así como los transformantes de cepas industriales, han sido seleccionados en YPD conteniendo cerulenina. Posteriormente, siempre se ha efectuado una segunda selección por crecimiento en medio rico conteniendo cicloheximida. Finalmente, los

transformantes han sido identificados mediante la técnica conocida como “colony PCR” (Adams *et al.*, 1997). En la Tabla 10 se resume la resistencia de cada cepa a cerulenina y cicloheximida y la concentración de dichas drogas en los medios selectivos.

Cepas	Resistencia a cerulenina	Resistencia a cicloheximida	Selección en cerulenina	Selección en cicloheximida
W303-1A	1 ppm	0,2 ppm	3 ppm	0,6 ppm
S1	1 ppm	0,1 ppm	2 ppm	0,3 ppm
CECT 1926	1 ppm	0,2 ppm	2 ppm	0,5 ppm
M69	3,5 ppm	0,6 ppm	4,5 ppm	1,2 ppm

Tabla 10. Resistencia de las cepas a cerulenina y cicloheximida y medios de selección utilizados. Las concentraciones utilizadas corresponden en el caso de las resistencias a las concentraciones mínimas que inhiben completamente el crecimiento de la cepa en YPD sólido tras 7 días de incubación. Las concentraciones utilizadas para la selección se han determinado experimentalmente y corresponden a aquellas que reduciendo el crecimiento de fondo, no parecen afectar a la frecuencia de transformación.

4.2. Transformación de *E. coli*

Se prepararon células competentes de la cepa DH5 α de *E. coli* mediante el método de Inoue (Inoue *et al.*, 1990) y se conservaron a -80 °C. Para la transformación se siguió el sistema de transformación biológica artificial descrito por Hanahan (1983).

5. Otras técnicas utilizadas

5.1. Determinación cualitativa de la actividad endopoligalacturonasa

Las cepas cuya actividad endopoligalacturonasa (PG) se quería estimar, se incubaron en 2 ml de medio YPD líquido durante 48 horas a 30 °C y 200 r.p.m. En el caso de las cepas W303-1A, CECT 1926 y de los transformantes de ellas, se comprobó mediante lectura de la absorbancia a 600 nm de diluciones 1:100 de los cultivos, que el crecimiento fuese el mismo en todas las cepas. Se realizó una dilución decimal seriada de los cultivos líquidos de las cepas de interés, y se transfirieron aproximadamente 3 μ l

de cada dilución con la ayuda de un replicador (Sigma-Aldrich Co., EE. UU.) a placas de medio sólido YPA o SDPA (en el caso de la cepa W303-1A y sus transformantes). Las placas se incubaron 4 días a 30° C para la primera selección de cepas con alta actividad PG y 2 días a 30 °C para los transformantes de la cepa W303-1A y CECT 1926 que sobreexpresan el gen *PGUI*. La producción de la enzima endopoligalacturonasa se detectó vertiendo HCl 6 N sobre la placa, según lo descrito por Blanco *et al.* (1994). Cuando la cepa es productora de dicha enzima, aparece un halo de hidrólisis alrededor de la colonia, fácilmente reconocible frente al medio opaco, cuyo tamaño está relacionado con la actividad PG.

5.2. Determinación del contenido en azúcares fermentables en el licor obtenido de residuos de cítricos

Las muestras fueron centrifugadas a 13.400 r.p.m. durante 2 minutos, filtradas a través de una membrana de nylon de 0,45 µm de tamaño de poro (Scharlab S. L., Barcelona) y diluidas 1.000 veces con agua bidestilada. Todas las muestras fueron analizadas por duplicado.

La determinación de azúcares del licor inicial y al final de la fermentación con diferentes cepas fue realizada mediante cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución con detección amperométrica (HPAEC-PAD). Para ello se utilizó el Sistema modular CI Metrohm MIC-8, formado por el detector amperométrico Bioscan 817 y la bomba CI 709 (Metrohm Ltd, Herisau, Switzerland). Se utilizó la columna Metrosep Carb 1 (4,6 x 250 mm; Metrohm, Herisau, Switzerland) en las siguientes condiciones: eluyente NaOH 100 mM, temperatura de 32 °C, flujo de 1,0 ml/min y volumen de inyección de 20 µl que se realizó mediante un autoinyector. Los datos obtenidos se analizaron mediante el programa informático IC Net 2.3 de Metrohm (Metrohm Ltd, Herisau, Switzerland).

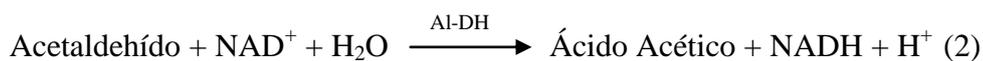
Se construyó una recta patrón para los 3 principales azúcares fermentables presentes en el licor (glucosa, fructosa y sacarosa) y en un intervalo de concentraciones para cada azúcar comprendidas entre 0 y 50 mg/l. La concentración de cada azúcar en las muestras se calculó interpolando en la recta patrón el valor del área cromatográfica del pico correspondiente.

5.3. Determinación del grado alcohólico

Se midió la concentración de etanol mediante un método enzimático, haciendo uso de un kit comercial de la firma Roche (Boehringer Mannheim, Roche Biopharma, Alemania) y siguiendo las instrucciones del fabricante. El kit se basa en dos reacciones enzimáticas acopladas; la primera reacción está catalizada por una alcohol deshidrogenasa (ADH), en la que el etanol se oxida a acetaldehído (reacción 1).



Sin embargo, dado que el equilibrio de la reacción (1) está desplazado hacia la producción del etanol y del NAD^+ , se requiere otra reacción para “atrapar” los productos y conseguir que la reacción transcurra hacia la derecha. Esto se consigue mediante la oxidación cuantitativa del acetaldehído en ácido acético en presencia de una aldehído deshidrogenasa (Al-DH) y NAD^+ (reacción 2).



Según la estequiometría de ambas reacciones, el número de moles de NADH formadas es el doble del número de moles de etanol añadidos con la muestra. Lo que se mide es el NADH por el incremento en la absorción a 340 nm.

5.4. Determinación de los grados Brix

La concentración de sólidos solubles se determinó a partir de la medida del índice de refracción a 20 °C, previa centrifugación de la muestra a 13.400 r.p.m. durante 1 minuto. Para la medida de los grados Brix (°Bx) se utilizó el refractómetro Abbe modelo NAR-3T (Atago Co., LTD, Japan). Para mantener la temperatura constante durante la determinación se utilizó un baño termostático de refrigeración/calor con recirculación modelo 912 de la marca Polysciences (Polysciences, Inc., Warrington PA, EE. UU.).

5.5. Determinación de la frecuencia de aparición de mutantes deficientes en respiración

Se determinó si la sobreexpresión del gen *YAP1* en la cepa evolucionada S1-3T, era capaz de disminuir la aparición espontánea de mutantes deficientes en respiración (“petites”) durante la fermentación del mosto cervecero. Para ello se inocularon 2 erlenmeyers conteniendo 200 ml de mosto cervecero preparado a partir de 100% malta, con la cepa S1 y con la cepa evolucionada S1-3T respectivamente. Las condiciones de fermentación fueron las siguientes: inóculo inicial $5 \cdot 10^6$ ufc/ml, temperatura 15 °C y 7 días de fermentación. A los 7 días de fermentación se determinó el porcentaje de los mutantes petites y se reutilizó parte de la levadura generada (tomando 20 ml del mosto fermentado) para inocular otros 200 ml de mosto. Este proceso se repitió hasta completar un total de 10 fermentaciones sucesivas. Se realizaron dos experimentos independientes para cada cepa.

Para detectar selectivamente a las células de levadura con deficiencia respiratoria se empleó el cloruro de 2, 3, 5 Trifeniltetrazolio (TTC), que es una sal incolora que cuando se reduce da lugar a un compuesto de color rojo e insoluble. Cuando se pone en contacto con una colonia de levaduras, las células con suficiente capacidad respiratoria reducirán el TTC, y las colonias se teñirán de rosa oscuro o rojo. Por otra parte, las células con deficiencias respiratorias no reducirán el colorante y retendrán su color original.

A partir de la suspensión de levaduras a analizar, se prepararon diluciones decimales seriadas en una solución isotónica estéril (NaCl, 0,9%, p/v), hasta obtener una dilución que contuviese entre 300-3.000 ufc/ml. Se sembraron 100 µl de la suspensión de levaduras en placas de medio YPD y se incubaron dichas placas a 30 °C durante 4 días. Una vez crecidas, la detección de las colonias correspondientes a los mutantes “petites” se realiza vertiendo sobre el medio una sobrecapa que contiene el reactivo TTC. Para ello se fundió a 60 °C el agar-tampón fosfato (tampón fosfato 67 mM, pH 7,10; glucosa 0,5% p/v; agar 1,5% p/v; esterilizado en autoclave) y se le añadió 1 ml de una solución acuosa de TTC al 0,5% (p/v). Se homogeneizó el reactivo, y se vertió sobre la placa, evitando que se mezclaran las colonias. Se incubaron las placas a 28 °C y se examinaron después de 4 horas. Las colonias de células normales son claramente rojas, mientras que las colonias procedentes de mutantes “petites” permanecen blancas o ligeramente

rosadas. Para su posterior confirmación, las colonias de “petites” se pasaron a placas de medio YPG para comprobar que no podían crecer en dicho medio.

5.6. Determinación de diacetilo

Mediante este análisis se quiso comprobar si durante el proceso de fermentación del mosto cervecero, la cepa evolucionada S1-PI6 producía menos diacetilo que la cepa cervecera original S1. A tal fin se realizaron 2 fermentaciones independientes con cada una de las cepas, es decir con la cepa original S1 y con la cepa evolucionada S1-PI6. Las fermentaciones de mostos industriales obtenidos de malta al 100%, se realizaron a 15 °C durante 9 días, seguidas por veinte días de guarda o “lagering” a 0 °C. Durante los primeros 9 días, cada 24 horas se determinó el pH, los grados Brix, el grado alcohólico de cada una de las 2 fermentaciones y se tomó en frío una alícuota de 10 ml para la determinación del diacetilo. Se repitieron las mismas determinaciones el día 10 y el día 20 del período de guarda.

El diacetilo se determinó por cromatografía gas/líquido, empleando la técnica de espacio de cabeza y un detector de captura de electrones (HS/GLC/ECD). Como patrón interno se utilizó 2,3 hexanodiona, cuya solución de trabajo se preparó disolviendo 150 µl de la solución stock (20 µl de 2,3 hexanodiona al 90% en 50 ml de etanol) en 500 ml de etanol al 5% (v/v). Se pipeteó 1 ml de patrón interno en un vial previamente enfriado en un baño de agua y hielo, se adicionaron inmediatamente 10 ml de la muestra, se cerró el vial y finalmente se guardó a -20 °C hasta su análisis cromatográfico. Antes de proceder al análisis cromatográfico, las muestras se atemperaron en nevera. La calibración se hizo añadiendo a una cerveza con baja concentración de diacetilo cantidades de la disolución de trabajo de diacetilo comprendidas entre 0 y 250 µl (se pesaron las cantidades añadidas para poder expresar el diacetilo añadido en µg/l) y se procedió según lo descrito en el párrafo anterior. La disolución de trabajo se preparó diluyendo 0,5 ml de disolución stock (20 µl de diacetilo al 97% en 50 ml de etanol) en 100 ml finales de agua destilada. El equipo instrumental utilizado fue un cromatógrafo de gases para columnas capilares de la marca Fisons (Milán, Italia) modelo 8130, equipado con un inyector automático Fisons HS 800 y un detector de captura de electrones (ECD) que fue puesto a nuestra disposición por la factoría de Valencia de la empresa Heineken España S. A. La columna cromatográfica utilizada fue una DB-5 (J&W Scientific, Folsom, CA, U.S.A.) de 50 m de longitud, 0,53 mm de diámetro

interno y 1,0 μm de espesor de capa de fase estacionaria. La programación de la temperatura fue la siguiente: una etapa isoterma inicial a 40 °C durante 9 minutos, acto seguido se desarrolla la primera rampa de calentamiento a una velocidad de 20 °C/min hasta alcanzar los 50 °C y se mantiene 5 minutos, a continuación se desarrolla la segunda rampa de calentamiento a una velocidad de 20 °C hasta los 100 °C, que se mantiene durante 3 minutos. Gas portador Nitrógeno (20 KPa, 10 ml/min). Temperatura del inyector 110 °C y temperatura del detector 150 °C.

5.7. Bioensayo de crecimiento en frío

Mediante este análisis se quiso determinar si la inactivación del gen *INP51* en las cepas W303-1A y M69 producía un fenotipo de mejor crecimiento a bajas temperaturas con respecto a las cepas parentales.

En el caso de la cepa W303-1A y de sus transformantes, se determinó la capacidad de crecer a 10 °C (la cepa parental prácticamente no crece a esa temperatura en los medios utilizados en este experimento) por incubación a dicha temperatura en medio YPD e YPD con fosfato 10 mM. La incubación se prolongó durante 12 días para YPD y 10 días para YPD con fosfato 10 mM. Además, también se determinó la capacidad de crecimiento de la cepa W303-1A y de sus transformantes a 8 °C durante 10 días en medio YPDT y YPDT con fosfato 10 mM (la cepa salvaje prácticamente no crece en estos medios y a esa temperatura).

En el caso de la cepa M69 y de sus transformantes, se determinó la capacidad de crecer a 6 °C (la cepa salvaje prácticamente no crece a esa temperatura en los medios utilizados en este experimento) por incubación durante 14 días a dicha temperatura en medio YPD, YPD con fosfato 10 mM, YPDT y YPDT con fosfato 10 mM.

En todas las cepas analizadas y en cada uno de los medios de cultivo, se determinó también la capacidad de crecimiento a 30 °C.

Para los ensayos de crecimiento, se realizaron diluciones decimales seriadas de cultivos líquidos de las cepas de interés, y se transfirieron aproximadamente 3 μl de cada dilución con la ayuda de un replicador (Sigma-Aldrich Co., EE. UU.) a placas de medio sólido con las condiciones diferenciales a estudiar. Posteriormente, se incubaron las placas a 30, 10, 8 °C o 6 °C durante el tiempo adecuado para cada temperatura y medio de cultivo. En el análisis del crecimiento, se tuvo en cuenta tanto la mayor dilución a la cual aún se observaba crecimiento como el tamaño de las colonias.

RESULTADOS

1. Construcción del casete de selección

La metodología experimental que se ha diseñado (ver Figura 5), ha consistido en obtener, sólo mediante reacciones de PCR que utilizan como ADN molde el ADN genómico de la cepa que se quiere evolucionar, una construcción que, posteriormente a su inserción cromosómica mediante recombinación homóloga, sustituirá en dicha cepa al promotor original del gen *YAPI* por un promotor fuerte de un gen de la ruta de la glicólisis, el promotor del gen *PGK1*. El gen *YAPI* de *S. cerevisiae*, codifica para un factor de transcripción de la familia AP-1, responsable de la adaptación de la levadura a diversas condiciones de estrés (Moye-Rowley *et al.*, 1989; Kuge *et al.*, 1997) y se ha descrito como marcador dominante de gran utilidad para la transformación de cepas de levadura industriales (Akada *et al.*, 2002). Efectivamente, la sobreexpresión de dicho gen confiere resistencia a varias sustancias como:

- ✓ cerulenina, un inhibidor de la síntesis de ácidos grasos (Kawaguchi *et al.*, 1982);
- ✓ cicloheximida, un inhibidor de la síntesis de proteínas (Hashida-Okado *et al.*, 1996);
- ✓ iones cadmio (Vido *et al.*, 2001);
- ✓ diazaborine, una droga antibacteriana que, en células de levadura, inhibe el proceso de producción de los precursores del rRNA para la subunidad ribosomal más grande (Wendler *et al.*, 1997; Pertschy *et al.*, 2004);
- ✓ metil-sulfometuron, un herbicida;
- ✓ 4-NQO (4-nitroquinolina-N-óxido), un carcinógeno;
- ✓ *N*-metil-*N*9-nitro-*N*-nitrosoguanidina, un carcinógeno;
- ✓ 1,10-fenantrolina, un quelante de metales;
- ✓ iones cinc, y a diversas especies químicas muy reactivas y oxidantes del oxígeno (Balzi y Goffeau, 1994);
- ✓ 7-clorotetrazolo (5, 1-c) benzo (1, 2, 4) triazina, un agente antifúngico (Drobna *et al.*, 2012).

Así pues, al colocar al gen *YAPI* bajo el control de un promotor que activa fuertemente su transcripción durante el crecimiento de la levadura por fermentación, se ha cambiado la regulación y el patrón de expresión temporal de *YAPI*, además de sobreexpresar el producto de dicho gen, adquiriendo la cepa portadora de la construcción las resistencias

descritas en el párrafo anterior. Dicha construcción constituirá el casete de selección que se quiere desarrollar y que incorporará únicamente elementos génicos procedentes de la propia cepa que se pretende evolucionar.

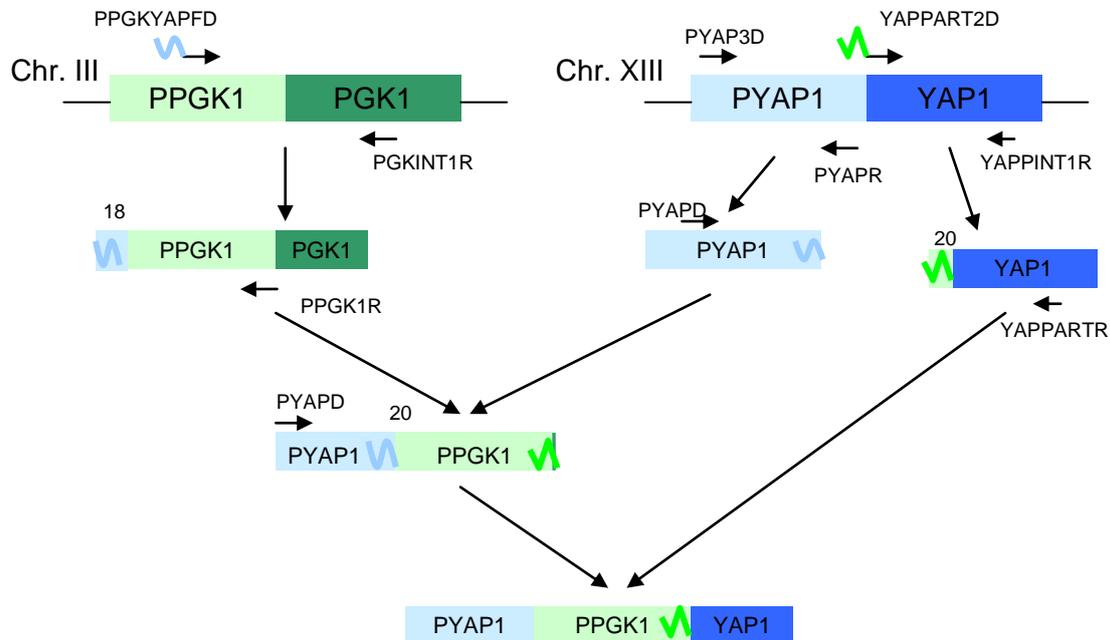


Figura 5. Diagrama de las reacciones de PCR para la construcción del fragmento denominado $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$. En verde se representa el gen *PGK1* con su secuencia promotora y en azul el gen *YAP1* con su secuencia promotora. En ambos casos la secuencia promotora de cada gen se representa en una tonalidad más clara.

1.1. Secuenciación de las zonas de interés en el genoma de la cepa S1

El primer paso en el proceso de construcción del casete de selección ha sido el establecimiento de las secuencias de cada uno de los genes objeto de este estudio y en cada una de las cepas de levadura con las que hemos trabajado: el gen *YAP1*, el promotor del gen *YAP1* (*PYAP1*) y el promotor y el principio del gen de la fosfogliceroquinasa (*PPGK1*). Mientras que para la cepa W303-1A se ha recurrido a la base de datos SGD disponible a través de la World Wide Web, para la cepa cervecera S1 ha sido necesario amplificar por PCR y secuenciar las zonas del genoma en las que se querían diseñar cebadores para amplificar los fragmentos de los genes de interés. En las reacciones de amplificación por PCR de los fragmentos que luego iban a ser secuenciados, se utilizaron un conjunto de cebadores diseñados a partir de las

secuencias que se encuentran en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae*. La levadura S1 es una cepa industrial de producción de cerveza tipo “lager”, y como tal, es muy probablemente una cepa aloaneuploide con una ploidía próxima a cuatro. Por lo tanto, para cada gen cabría esperar la presencia en su genoma de dos secuencias heterozigóticas como resultado de la presencia de los dos genomas de las dos cepas parentales diploides de las que procede. Sin embargo, de la amplificación de la zona que comprende al promotor de la *PGK1* y su posterior secuenciación, obtenemos 2 secuencias que difieren en la base de coordenada 137.527, donde puede leerse alternativamente una Adenina o una Guanina según la secuencia considerada (en la secuencia publicada en la base de datos de SGD hay una Adenina), y en la base de coordenada 137.652 donde puede leerse una Timina o una Guanina, (en la secuencia publicada hay una Timina). En lo que se refiere al promotor y la pauta de lectura abierta del gen *YAP1*, sólo se ha notado la presencia de una sola secuencia con dos cambios respecto a la secuencia publicada, uno en la base de coordenada 253.503 (donde hay una Timina en vez de una Guanina) y otro en la coordenada 254.427 (donde hay una Timina en vez de una Adenina). Esto es debido a que, muy probablemente, los cebadores que hemos utilizado hibridan, a la temperatura del experimento, con sólo los alelos correspondientes a uno de los dos genomas presentes (y procedentes de las dos cepas parentales), el correspondiente a *Saccharomyces cerevisiae*. De hecho, la comparación de las secuencias depositadas en las bases de datos para el gen *YAP1* de *S. cerevisiae* y de *S. pastorianus*, difieren a nivel de nucleótidos en más del 20%.

1.2. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$

A continuación se describen las reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento que, posteriormente a su inserción cromosómica mediante recombinación homóloga, sustituirá al promotor original del gen *YAP1* por el promotor del gen *PGK1*. Para la construcción del fragmento final sólo se necesitaron 5 reacciones de PCR.

a) Amplificación por PCR de un fragmento del promotor del gen *YAP1* (F_{PYAP1})

A partir del ADN genómico de las cepas W303-1A y S1, se han amplificado por PCR los fragmentos del promotor del gen *YAP1* correspondientes a cada cepa. El cebador

directo que se ha utilizado ha sido PYAP3D, que consta de una secuencia de 24 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *YAPI* situada 1.120 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI*; el cebador reverso (PYAPR) consta de una secuencia de 38 nucleótidos correspondiente a la región del promotor del gen *YAPI* situada 6 pb antes del ATG de inicio de dicho gen. El fragmento resultante (F_{PYAPI}) de la amplificación contiene una secuencia de 1.115 pb de la región promotora del gen *YAPI* situada 6 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen.

b) Amplificación por PCR de un fragmento del comienzo del gen *YAP1* con una zona de solapamiento (F_{YAP1})

En esta reacción se ha amplificado mediante un cebador directo híbrido (denominamos cebador híbrido, a aquel en el que sólo una parte de su secuencia, la situada en el extremo 3', es complementaria con la secuencia del fragmento a amplificar, mientras que la secuencia del extremo 5' que no hibrida se empleará posteriormente en reacciones de fusión por PCR) un fragmento del comienzo del gen *YAPI* con una zona de solapamiento en 5' con el extremo 3' del promotor del gen *PGK1*. El cebador híbrido directo que se ha utilizado (YAPPART2D) contiene una secuencia de 20 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *PGK1* situada justo antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen y seguida por una secuencia de 26 nucleótidos homóloga a la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* desde su ATG de inicio. El cebador reverso (YAPPINT1R) contiene una secuencia de 20 nucleótidos complementaria a la región de *YAPI* situada 1.417 pb desde el ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen. El fragmento resultante (F_{YAP1}) de la amplificación tiene un tamaño de 1.437 pb.

c) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el promotor del gen *PGK1* con una zona de solapamiento (F_{PPGK1})

A partir del ADN genómico de las cepas W303-1A y S1, se han amplificado por PCR los fragmentos del promotor del gen *PGK1* correspondientes a cada cepa. El cebador híbrido directo que se ha utilizado (PPGKYAPFD) contiene en su extremo 5' una secuencia de 18 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *YAPI* que acaba 6 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen y seguida por una zona de 25 nucleótidos homóloga a la región del promotor del gen *PGK1* situada

769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del gen *PGK1*. El cebador reverso (PGKINT1R) consta de una secuencia de 21 nucleótidos complementaria a la secuencia del gen *PGK1* y que comienza 538 pb después del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen. El fragmento resultante de la amplificación (F_{PPGK1}) tiene un tamaño de 1.325 pb.

d) Fusión por PCR de F_{PYAP1} con F_{PPGK1} ($F_{PYAP1-PPGK1}$)

En este paso se lleva a cabo una reacción de PCR que al mismo tiempo que amplifica, fusiona dos de los fragmentos obtenidos anteriormente. Para ello se han utilizado cebadores internos a los fragmentos a fusionar (empleando, por tanto, lo que en inglés se denominan “nested primers”), lo que según la experiencia adquirida en esta Tesis, resulta esencial para tener amplificación en las reacciones de fusión por PCR. El cebador directo (PYAPD) contiene una secuencia de 38 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *YAPI* que comienza 582 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen, mientras que el cebador reverso (PPGK1R) consta de una secuencia de 31 nucleótidos complementaria a la región promotora del gen *PGK1* y a las primeras 5 bases del mismo gen. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 20 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 20 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento ($F_{PYAP1-PPGK1}$) conteniendo la región promotora del gen *YAPI* de 575 pb que comienza 582 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen. La longitud del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1}$ es de 1.349 pb.

e) Fusión por PCR de $F_{PYAP1-PGK1}$ con F_{YAP1} ($F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$)

Se ha utilizado como cebador directo el PYAPD y como reverso un cebador interno al fragmento a fusionar (YAPPARTR), que consta de una secuencia de 38 nucleótidos complementaria a la región de *YAPI* situada 645 pb desde el ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen. Utilizando como moldes $F_{PYAP1-PPGK1}$ y F_{YAP1} , se obtiene tras la reacción de fusión por PCR, un fragmento nuevo ($F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$) conteniendo la construcción completa que consta de: la región promotora del gen *YAPI* de 575 pb situada 582 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen,

seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con la secuencia de los primeros 645 nucleótidos de la pauta de lectura abierta del gen *YAP1*. La longitud de $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ es de 1.989 pb.

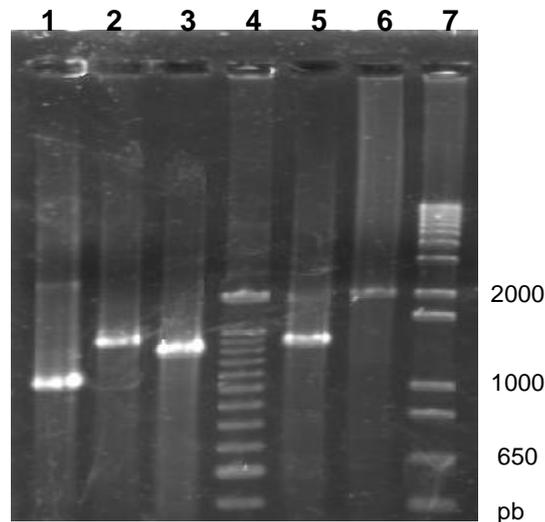


Figura 6. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos para la construcción del casete de selección: F_{PYAP1} (pocillo 1); F_{YAP1} (pocillo 2); F_{PPGK1} (pocillo 3); $F_{PYAP1-PPGK1}$ (pocillo 5); $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ (pocillo 6). Los patrones de peso molecular utilizados han sido el TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (pocillo 4) y el TrackIt™ 1 Kb plus DNA Ladder (pocillo 7).

1.3. Transformación de W303-1A y S1 con $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$

El fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ es el que se ha utilizado para la transformación de las cepas W303-1A y S1 siguiendo el procedimiento descrito por Gietz y Woods. En el caso de la cepa W303-1A se han utilizado en cada transformación entre 2 y 8 μg de fragmento. En el caso de la cepa S1, cuya frecuencia de transformación es de varios órdenes de magnitud inferior a las levaduras de laboratorio, se han empleado aproximadamente 100 μg de fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$, obtenido a partir de ADN genómico del transformante WT-410 (ver Tabla 12). De esta forma se ha conseguido obtener una cepa a partir de la cual y mediante reacciones de amplificación por PCR, se puede generar en el tubo de ensayo una población de fragmentos $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ sin cambios en la secuencia de bases con respecto a la secuencia original del fragmento construido (ver apartado 1.4.).

En la Tabla 11 se resumen las frecuencias de transformación obtenidas con la cepa W303-1A dependiendo del medio de selección utilizado y si se transforma con el plásmido pYPGE15+YAP1 o con el fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$. Después de la primera selección, se han pasado las colonias a placas de medio YPD conteniendo o cerulenina o cicloheximida (dependiendo de si la primera selección se efectuó respectivamente en cicloheximida o en cerulenina) para distinguir los transformantes de las colonias que provienen de mutantes espontáneos.

Medio de selección		con pYPGE15+YAP1				con $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$			
Medio	Droga (ppm)	Nº colon.	Nº transf.	% Transf.	F.T.	Nº colon.	Nº transf.	% Transf.	F.T.
SD-Ura	/	45	45	100	$6,0 \cdot 10^4$	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
SD-Ura	/	75	75	100	$2,3 \cdot 10^4$	n. a.	n. a.	n. a.	n. a.
YPD	Cerulen. (3)	65	65	100	$4,0 \cdot 10^3$	20	19	95,0	21,9
YPD	Cerulen. (3)	250	226	90,4	$4,3 \cdot 10^3$	26	20	76,9	35,6
YPD	Cerulen. (3)	51	51	100	$1,1 \cdot 10^4$	14	13	92,9	17,6
YPD	Ciclohex. (0,6)	27	19	70,4	$1,2 \cdot 10^2$	5	1	20,0	1,1
YPD	Ciclohex. (0,6)	45	30	66,7	$2,3 \cdot 10^2$	12	5	41,7	3,6

Tabla 11. Frecuencia de transformación de W303-1A usando el plásmido pYPGE15+YAP1 o el fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ y diversas formas de selección. En el sombreado rosa se indica la transformación cuyos transformantes se han secuenciado. (F.T.: número de colonias/ μ g de ADN).

Como se puede observar en la Tabla 11, en todos los experimentos la frecuencia de transformación (FT) del plásmido pYPGE15+YAP1 en la cepa W303-1A, es más alta cuando se utiliza como medio de selección SD-Ura, mientras que en YPD + 3 ppm de cerulenina se obtiene una FT de aproximadamente un orden de magnitud inferior. A menores concentraciones de cerulenina, se incrementaría la FT, sin embargo se recuperarían un mayor número de mutantes espontáneos y sería más laborioso distinguir los verdaderos transformantes. Seleccionando en medio YPD conteniendo 0,6 ppm de cicloheximida, se reduce drásticamente la FT, indicando que la toxicidad de la cicloheximida sobre las células de levadura afecta muy significativamente a la eficiencia final del proceso de transformación. Si se hubiera reducido la concentración de cicloheximida posiblemente habría aumentado la FT, pero al mismo tiempo que habría aumentado el número total de presuntos transformantes, también lo habría hecho, y en mucha mayor proporción, el porcentaje de falsos transformantes que aparecen como consecuencia de mutaciones espontáneas. Al revés, aumentando la concentración

de cicloheximida se habrían reducido o incluso eliminado la aparición de los mutantes, pero la frecuencia de transformación habría sido mucho menor e incluso es posible que no se hubiera encontrado ningún transformante. Por lo tanto, como metodología para distinguir los verdaderos transformantes de los mutantes espontáneos, se ha realizado una primera selección en medio YPD conteniendo cerulenina, ya que en este medio se recuperan muchos transformantes y pocos mutantes espontáneos para, a continuación, pasar todas las colonias a placas de YPD conteniendo cicloheximida. Esta doble selección es muy efectiva, ya que se ha comprobado mediante la técnica denominada “colony PCR”, que el 100% de las colonias resistentes a las dos drogas han integrado el casete de selección en su ADN genómico. En todos los presuntos transformantes que pasaban la doble selección, se verificaba la correcta integración del fragmento en el sitio elegido mediante la amplificación por PCR de dicho fragmento y de las zonas adyacentes al lugar de integración y la posterior secuenciación de todo ese locus genómico. Esta metodología se ha utilizado en todas las transformaciones de esta Tesis, es decir, con las cepas W303-1A, S1, M69 y CET1926 y con todos los fragmentos construidos a lo largo de este trabajo.

En el caso de la cepa industrial S1, la FT empleando el protocolo de transformación originalmente descrito por Gietz y Woods es muy baja, alrededor de 10 transformantes por μg de plásmido. Para aumentar dicha FT, se ensayaron, tanto protocolos de electroporación, que no parecen funcionar bien con esta cepa, como diversas versiones del protocolo de tratamiento con sales de litio o combinaciones del mismo con la electroporación, sin obtener resultados satisfactorios. Por lo tanto, se procedió a ir variando sistemática y paulatinamente los siguientes parámetros del protocolo de sales de litio: la duración del período de incubación a 42°C , la concentración de los componentes de la mezcla de transformación, el número de células de levadura empleadas en cada transformación, o incluso la adición a la mezcla de transformación de compuestos tales como el DMSO o el etanol. La condición que parece influir más sobre la FT de la cepa S1 es la concentración de acetato de litio presente en la mezcla de transformación. En particular, su disminución desde 0,1 M a 0,06 M aumenta la FT de aproximadamente 4 veces (ver Figura 7). También se aumentó la duración del tiempo de exposición a 42°C , pasando de 40 a 50 minutos, con lo que se notó un pequeño aumento de la FT (datos no presentados). Para intentar mejorar ulteriormente la FT de la cepa S1, se adoptó otra estrategia complementaria a las modificaciones ya efectuadas sobre el protocolo de Gietz y Woods, y consistente en diversos tratamientos de las

células de levadura antes de ser convertidas en células competentes. Mediante la mayoría de estos tratamientos no se consiguió aumentar la FT de la cepa S1; sin embargo, en el caso de las transformaciones en que se resuspendieron las células de levadura que se recogen tras la fase de crecimiento exponencial, en Yeast Nitrogen Base sin aminoácidos y con sulfato de amonio (1,7 g/l) durante 2 horas a 30 °C y en agitación a 200 r.p.m., sí que se observó una diferencia significativa. Mediante esta variación de la metodología original se consigue aumentar la FT, aproximadamente, 1 orden de magnitud pero sólo cuando se obtiene una baja frecuencia de transformación (entre 0,6 y 10 transformantes por microgramo de plásmido pYPGE15+YAP1), mientras que no hay variación cuando se obtiene la FT esperada (datos no presentados). Cuando se probó esta modificación de la metodología de transformación con las otras cepas de levadura utilizadas en esta Tesis, en todas ellas se observó un marcado decremento de la FT.

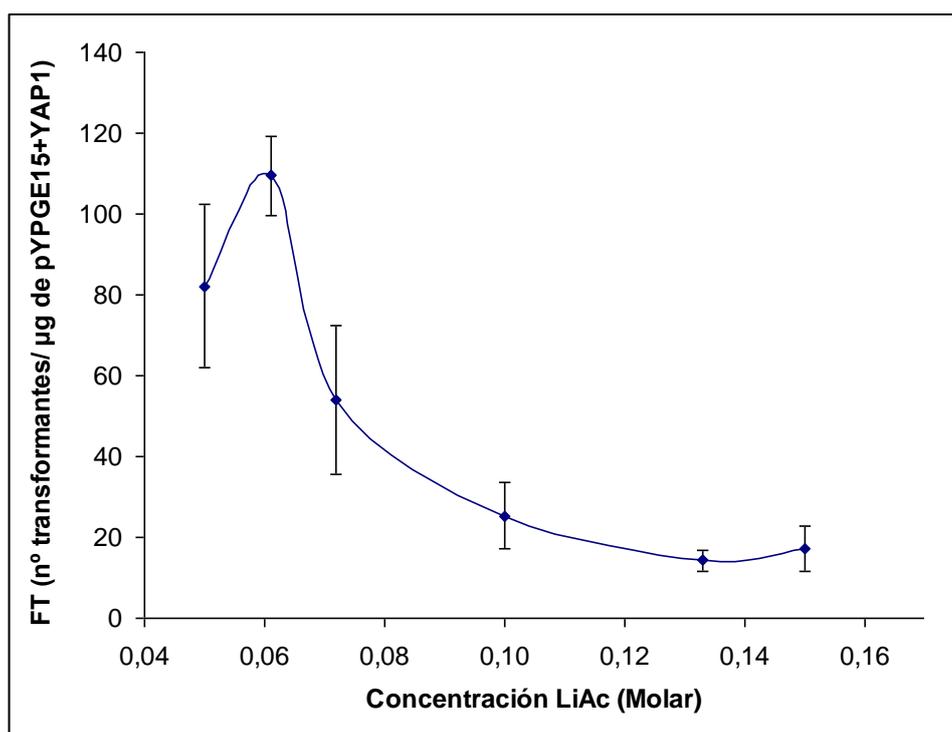


Figura 7. Influencia de la concentración de acetato de litio en la mezclas de transformación sobre la frecuencia de transformación de la cepa S1. Los datos mostrados representan la media de la FT de 3 o más experimentos independientes con sus correspondientes desviaciones estándar.

Con las modificaciones ya mencionadas sobre el protocolo de transformación descrito por Gietz y Woods, se transformó la cepa S1 con el fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$. Se

realizaron 2 transformaciones en las cuales se recuperaron 2 (S1-1T y S1-2T) y 1 transformantes (S1-3T). Mediante PCR se comprobó la correcta integración del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ en el ADN genómico de los transformantes (ver Figura 8).

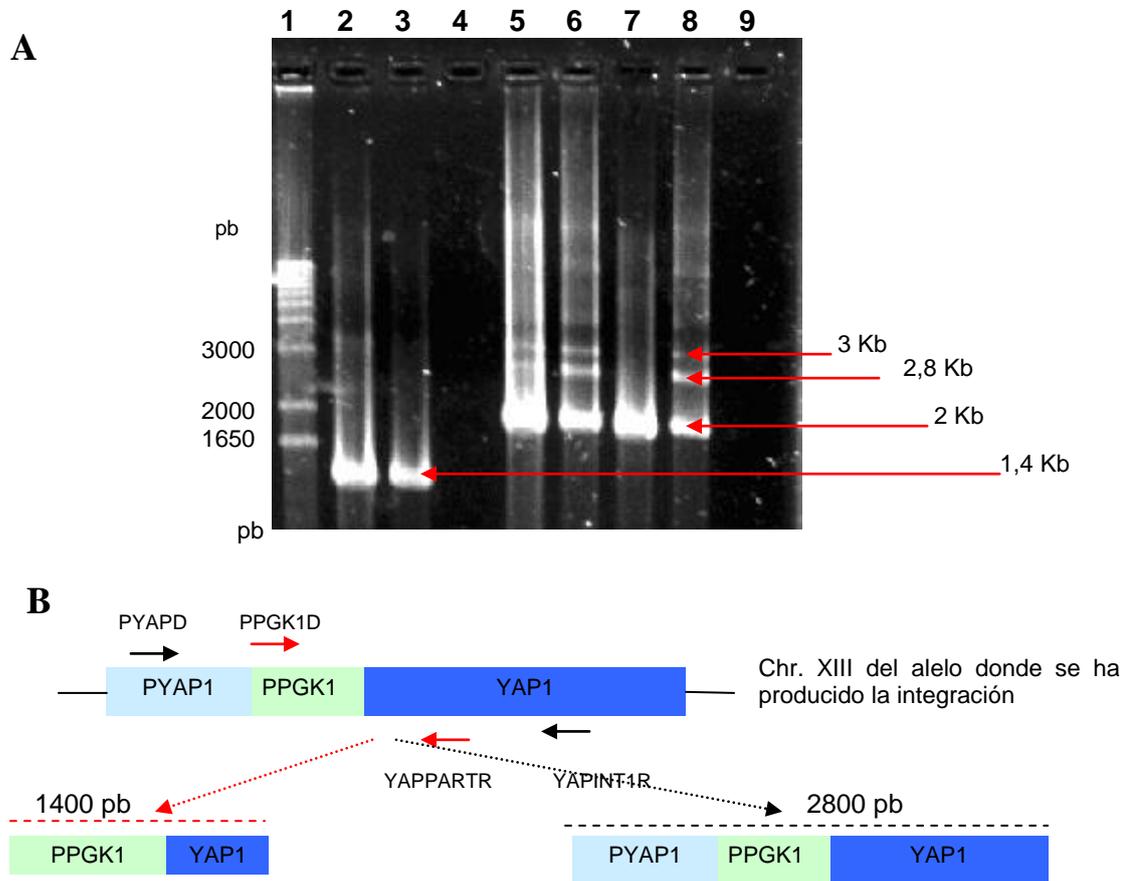


Figura 8. A- Comprobación por PCR de la correcta integración de $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ en los transformantes obtenidos. El patrón de peso molecular utilizado ha sido el TrackIt™ 1 Kbp plus DNA Ladder (pocillo 1). B- Representación esquemática de los fragmentos que confirman la integración de $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ en el locus *YAP1*.

Los fragmentos de ≈ 1.400 pb que se amplifican por PCR mediante los cebadores PPGK1D y YAPPARTR, confirman que las cepas S1-1T (pocillo 2) y S1-3T (pocillo 3) son transformantes. Utilizando los mismos cebadores y ADN genómico de S1 (pocillo 4), no se amplifica ningún producto de PCR. Los fragmentos de un tamaño ≈ 2.800 pb amplificados mediante los cebadores PYAPD y YAPINT1R, confirman que las cepas S1-1T (pocillo 5) y S1-3T (pocillo 6) han integrado correctamente la construcción $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ en el locus *YAP1*. Los productos de PCR de ≈ 2.000 pb presentes en los mismos tubos de reacción, corresponden a la amplificación de un fragmento conteniendo el promotor y parte del gen *YAP1* del locus correspondiente al alelo en el que no se ha

producido la integración, como se puede comprobar al amplificar con los mismos cebadores el ADN genómico de S1 (pocillo 7), lo que indica que $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ se ha integrado en un solo alelo del genoma de *S. cerevisiae* presente en S1. En los pocillos 5 y 6 aparece, además, una banda de ≈ 3.000 pb originada probablemente por combinación de los fragmentos de 2.000 y 2.800 pb. Como confirmación de dicha hipótesis, a partir de una mezcla de ADN genómico de WT-410 y de S1 y utilizando los cebadores PYAPD y YAPINT1R, se amplifican los mismos fragmentos (pocillo 8). En el control negativo no se puso ADN genómico en la reacción de PCR (pocillo 9).

Transforman.	Cambios en YAP1					Cambios en PPGK1		
	Posición	Nueva base	Base origin.	Nuevo aa	Aa origin.	Posición	Nueva base	Base origin.
WT41	/	/	/	/	/	- 429 - 459	T G	C A
WT42	291 609	G G	A T	Gly Ala	Ser Ser	No secuenciado	/	/
WT44	281 296	A C	G A	/ Phe	/ Leu	No secuenciado	/	/
WT45	210	G	A	Ala	Thr	No secuenciado	/	/
WT46	/	/	/	/	/	- 527	G	A
WT47	210	G	A	Ala	Thr	No secuenciado	/	/
WT48	379	G	A	Cys	Tyr	No secuenciado	/	/
WT49	210	G	A	Ala	Thr	No secuenciado	/	/
WT410	/	/	/	/	/	/	/	/
WT411	/	/	/	/	/	- 527 - 698	G C	A T
WT412	/	/	/	/	/	- 219	G	A
WT413	291	G	A	Gly	Ser	No secuenciado	/	/
WT414	388	G	A			No secuenciado	/	/
S1-3T	/	/	/	/	/	/	/	/

Tabla 12. Cambios en la secuencia integrada en los transformantes con respecto a la secuencia original de $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$. Se indica la posición de la base cambiada con respecto al ATG de inicio del gen correspondiente (en el caso del promotor del gen *PGK1*, los números son negativos en cuanto los cambios están situado antes del inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen), el cambio de base ocurrido y el aminoácido resultante de dicho cambio. En el encuadre rojo se indica el transformante de W303-1A sin cambios en la secuencia integrada. En el sombreado rosa se indica el transformante obtenido de dicha transformación, que no presenta ningún cambio en la secuencia integrada.

1.4. Secuenciación de los transformantes

Se verificó por secuenciación la construcción integrada en el cromosoma de los transformantes. En primer lugar se ha secuenciado el gen *YAPI* y sucesivamente, entre los transformantes que no presentaban cambios, se ha secuenciado la zona promotora del gen *PGKI*. Como se puede observar en la Tabla 12, de los 13 transformantes obtenidos en la transformación de W303-1A con el fragmento $F_{PYAPI-PPGKI-YAPI}$, 5 (38,46%) no presentan ningún cambio en el gen *YAPI* y 1 (7,69%) de estos (denominado WT-410) no presenta ningún cambio en toda la secuencia integrada. Dado que, antes de su utilización en la transformación, el fragmento $F_{PYAPI-PPGKI-YAPI}$ se ha secuenciado y su secuencia era correcta, parece que la presencia de dichas mutaciones puntuales sea debida a los errores generados por la polimerasa durante el proceso de amplificación por PCR. De hecho, según las instrucciones del fabricante, la enzima Expand High Fidelity PCR System genera durante 30 ciclos de amplificación por PCR de un fragmento de 2 Kpb, un porcentaje de fragmentos con cambios respecto a la secuencia original de alrededor del 23%.

A partir del ADN genómico de WT-410, se amplificó por PCR el fragmento $F_{PYAPI-PPGKI-YAPI}$, que se utilizó para transformar la cepa S1. Se obtuvo un solo transformante (S1-3T) de los tres que proporcionó la transformación de la cepa S1, cuya secuencia del fragmento integrado no presentó ningún cambio con respecto a la secuencia original de $F_{PYAPI-PPGKI-YAPI}$.

Mediante este resultado ha quedado patente la viabilidad experimental del concepto de evolución genómica por diseño molecular, al haber obtenido una levadura cervecera para producción de cerveza tipo “lager” que sobreexpresa un factor de transcripción implicado en la respuesta al estrés oxidativo, a partir exclusivamente del genoma de la propia cepa y diseñando “a priori” la reordenación génica que se iba a seleccionar, sin que mediasen etapas de clonaje, ni de utilización de otros microorganismos, ni el uso de vectores de clonación, ni se introduzca o modifique la secuencia del material genético inicialmente presente en la cepa en una sola base.

1.5. La sobreexpresión del gen *YAP1* disminuye la aparición de mutantes *petites*

Se determinó si la sobreexpresión del gen *YAPI* en la cepa cervecera evolucionada S1-3T, era capaz de disminuir la aparición espontánea de mutantes deficientes en

respiración (“petites”) durante la fermentación del mosto cervecero. La continuada reutilización industrial de la levadura cervecera está asociada con un incremento en la frecuencia de la aparición de petites, con el consiguiente efecto negativo sobre el proceso fermentativo. Además, está descrito en la literatura que las células de levadura con reducido potencial antioxidante presentan una mayor aparición de mutantes petites durante el proceso de fermentación (Lee *et al.*, 2001).

Como se puede observar en la Figura 9, la cepa evolucionada S1-3T, caracterizada por sobreexpresar el gen *YAP1*, que codifica para un factor de transcripción necesario en la respuesta al estrés oxidativo, presenta claramente una menor formación de petites durante su reutilización a lo largo de 10 fermentaciones sucesivas, con respecto a la cepa parental S1.

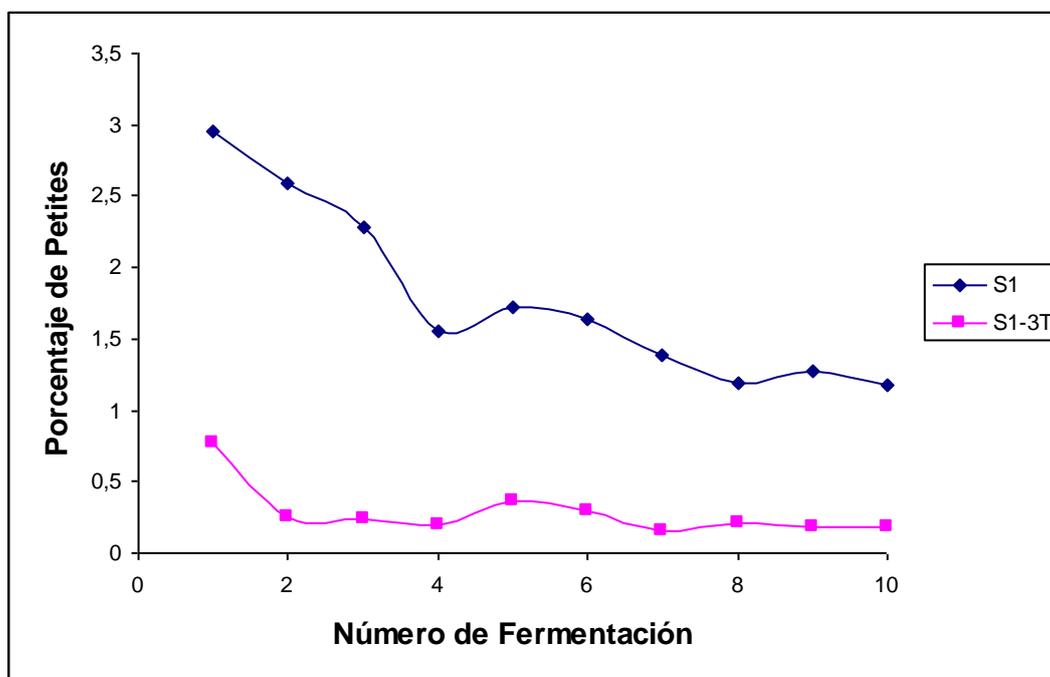


Figura 9. Aparición de mutantes deficientes en respiración en las cepas S1 y S1-3T a lo largo de 10 fermentaciones sucesivas. Los datos mostrados representan la media del porcentaje de aparición de mutantes petites de dos experimentos independientes.

2. Desarrollo de una levadura industrial con alta actividad pectinolítica

Se aplicó la metodología del concepto de evolución genómica por diseño molecular, para el desarrollo de una levadura industrial con alta actividad pectinolítica por

sobreexpresión del gen *PGUI*, que codifica para una endopoligalacturonasa. Se diseñaron 2 reordenaciones génicas: una conduce a la sobreexpresión del gen *PGUI*, mientras que la otra además de seguir la misma estrategia para lograr la sobreexpresión del gen *PGUI*, deja al mismo tiempo “programada” en el genoma de la cepa la pérdida del casete de selección, pérdida que se producirá después del crecimiento continuado de la cepa evolucionada en un medio no selectivo. Las endopoligalacturonasas hidrolizan los enlaces glicosídicos α -1,4 del interior de las cadenas de homogalacturonano que constituyen el polímero de pectina. Por lo tanto, las levaduras evolucionadas de manera que presenten dicha actividad podrían ser utilizadas en la industria enológica y en la de elaboración de cavas y sidra, para facilitar el desfangado y la clarificación de mostos, vinos y bebidas alcohólicas; asimismo, también tendría una utilización práctica en las levaduras de destilería, como las empleadas en la obtención de bioetanol a partir de material vegetal, como sería el caso del que se obtiene de cortezas de naranja. Así, por fermentación del licor obtenido por prensado de las cortezas de naranja mediante el uso de la cepa evolucionada, se lograría obtener un caldo con elevada actividad pectinolítica, que podría ser parcialmente reciclado para alimentar alguna etapa previa de tratamiento y extracción de la materia prima. Además, se obtiene un caldo con alto contenido en ácido galacturónico, que puede ser fermentado a etanol mediante la cepa de *Escherichia coli* etanologénica KO11 (Grohmann *et al.*, 1995) y, posiblemente en un futuro, mediante una levadura transgénica.

A continuación se describen en detalle los resultados obtenidos en cada una de las etapas que ha sido necesario desarrollar para alcanzar este objetivo.

2.1. Selección de una cepa de levadura industrial con un buen rendimiento en alcohol y elevada actividad endopoligalacturonasa

En primer lugar, se analizó un conjunto de levaduras industriales presentes en nuestra colección (cerveceras, vónicas, de producción de sidra o de destilería) en relación a la presencia de actividad endopoligalacturonasa en las mismas. Como se puede observar en la Figura 10, de las 34 cepas de levaduras industriales analizadas, aproximadamente la mitad posee actividad endopoligalacturonasa y de estas, sólo 9 muestran una actividad relevante. De este primer análisis se seleccionaron 7 cepas de levadura por ser las que presentaban mayor actividad PG. Se puede observar que las cepas CECT

1926, CECT 1384, CECT 11020, CECT 1189, CECT 11002, CECT 1319 y ICV-D254 presentan claramente una mayor actividad endopoligalacturonasa.

A continuación se llevaron a cabo ensayos de crecimiento en licor obtenido de cortezas de naranja, para determinar la conversión de los azúcares solubles y el rendimiento en cuanto a la producción de etanol del proceso fermentativo en las 7 cepas seleccionadas, con el objetivo de ir seleccionando aquellas que presentasen las características que mejor se adecuaban al sustrato, a las condiciones del proceso fermentativo y alcanzaran la mayor concentración final de etanol. Tras realizar unos ensayos preliminares, se fijó en 4 días a temperatura de 30 °C la duración del proceso fermentativo, por lo que transcurrido ese tiempo se analizaron los azúcares restantes en el licor fermentado para poder determinar el porcentaje de conversión de azúcares solubles y se determinó el grado alcohólico. Se seleccionaron de esta forma 4 cepas que presentaban una alta actividad PG y una buena cinética de producción de etanol en el licor obtenido de residuos cítricos. Por último, en estas 4 cepas se determinó la frecuencia de transformación que presentaban utilizando el protocolo de sales de litio (Gietz y Woods, 2002).

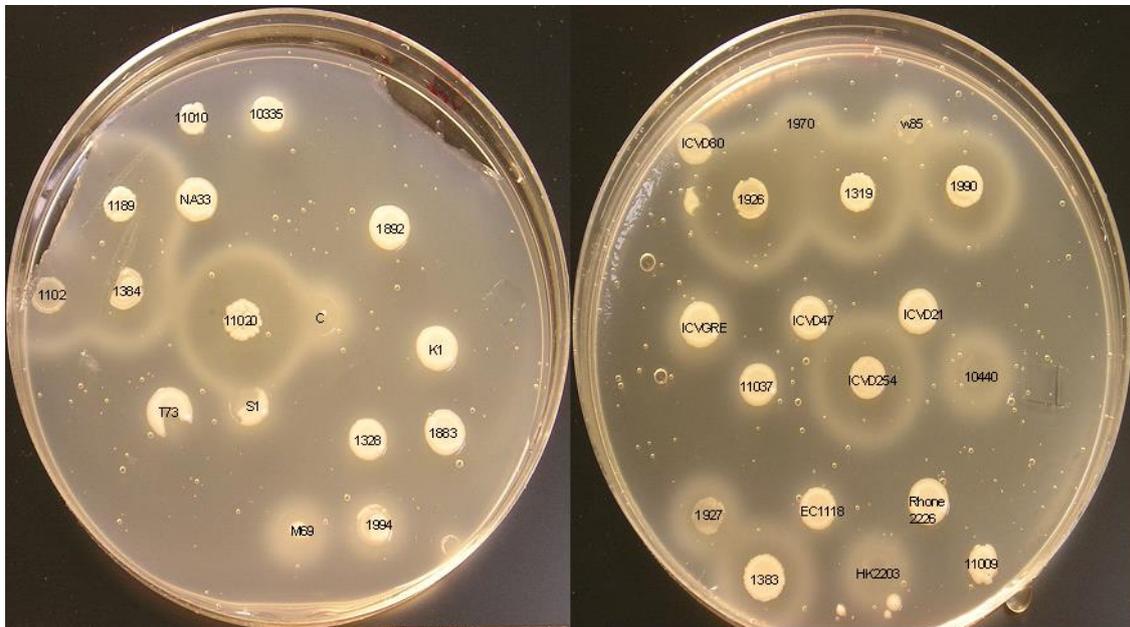


Figura 10. Determinación de la actividad endopoligalacturonasa en placas conteniendo medio YPA. Las cepas se crecieron durante 4 días a 30 °C y luego las placas se trataron con HCl 6 N. El halo alrededor de las cepas indica actividad endopoligalacturonasa.

En la Tabla 13 se resumen los valores obtenidos para cada una de estos parámetros y en cada cepa analizada, con excepción de la determinación de azúcares ya que, para todas ellas, a final de fermentación había una completa utilización de los mismos.

Finalmente se seleccionó la cepa CECT 1926, ya que presentaba las mejores características en todos los parámetros analizados (ver Figura 10 y Tabla 13).

CEPAS	° Alcohólico (%, v/v)	FT $\left(\frac{N^{\circ} \text{transformates}}{\mu\text{g plasmido}} \right)$
CECT 1189	2,38 ± 0,085	n. d.
CECT 1319	2,90 ± 0,042	23 ± 6,4
CECT 1384	2.22 ± 0,028	n. d.
CECT 1926	3.51 ± 0,042	555 ± 39,6
CECT 11002	2,39 ± 0,056	20 ± 3,4
CECT 11020	3,24 ± 0,071	10 ± 1,8
ICVD254	2,89 ± 0,014	n. d.

Tabla 13. Grado alcohólico alcanzado y frecuencia de transformación que presentan las 7 cepas de levaduras seleccionadas por su alta actividad PG. Sólo se determinó la frecuencia de transformación en las cuatros cepas que mayor grado alcohólico alcanzaron.

n. d. : no determinado.

2.2. Secuenciación de las zonas de interés en el genoma de la cepa CECT 1926

El primer paso en el proceso de diseño y construcción de un fragmento de ADN que tras su integración cromosómica consiga el objetivo de evolucionar la cepa de levadura en el sentido de potenciar y aumentar su actividad endopoligalacturonasa, ha sido el establecimiento de las secuencias de cada uno de los genes relacionados con dicho objetivo: el gen *PGUI*, el promotor del gen *PGUI* (*PPGU1*) y el promotor del gen de la gliceraldehido-3-fosfato-deshidrogenasa (*PTDH3*). Con tal fin se amplificaron por PCR y luego se secuenciaron las zonas del genoma que contenían los genes de interés. En las reacciones de amplificación por PCR se utilizaron un conjunto de cebadores diseñados a partir de las secuencias que se encuentran en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae*.

En la Tabla 14 se indican los cambios que aparecen en la cepa CECT 1926 con respecto a las secuencias presentes en la base de datos SGD.

Secuencia genómica	Posición	CECT 1926	SGD
PPGU1	- 519	T	G
	- 490	G	A
PGU1	89	A	C
PTDH3	- 40	A	G
	- 154	A	G
	- 265	A	G
	- 297	A	G
	- 358	G	C
	- 516	T	C
	- 586	C	T

Tabla 14. Cambios en las secuencias de PPGU1, *PGU1* y PTDH3 que presenta la cepa CECT 1926 con respecto a las secuencias depositadas en SGD.

2.3. Diseños y estrategia de las reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEPO-PGU1}}$

A continuación se describen las reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento denominado $F_{\text{GEPO-PGU1}}$ (del inglés Fragment for Genomic Evolution with Pop Out of *PGU1* gene) que, posteriormente a su inserción cromosómica mediante recombinación homóloga, sustituirá al promotor original del gen *PGU1* por el promotor del gen *PGK1* y que, al mismo tiempo, integrará torrente abajo del promotor del gen *PGU1* el casete de selección construido con anterioridad. Dicha construcción permite la sobreexpresión del gen *PGU1* y a la vez la pérdida del casete de selección, después del crecimiento de la cepa evolucionada en un medio no selectivo. Para la construcción del fragmento final se necesitaron 9 reacciones de PCR. En la Figura 11 se ilustra el diagrama de las reacciones de PCR utilizadas, que se detallan a continuación:

a) Amplificación por PCR del casete de selección

A partir de ADN genómico de WT-410, se amplificó por PCR un fragmento de 3.688 pb conteniendo el casete de selección con una zona de solapamiento en 5' con el extremo 3' del promotor del gen *PGU1* de la cepa CECT 1926.

Como cebador directo híbrido se utilizó el cebador PGKPPGUF_D que consta de una secuencia de 18 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *PGU1* situada justo antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen y seguida por una secuencia de 25 nucleótidos homóloga a región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio del gen *YAP1*. Como cebador reverso se utilizó YAPR3, que consta de una secuencia de 22 nucleótidos complementaria a la secuencia de una región del genoma situada 948 pb después del fin del gen *YAP1*.

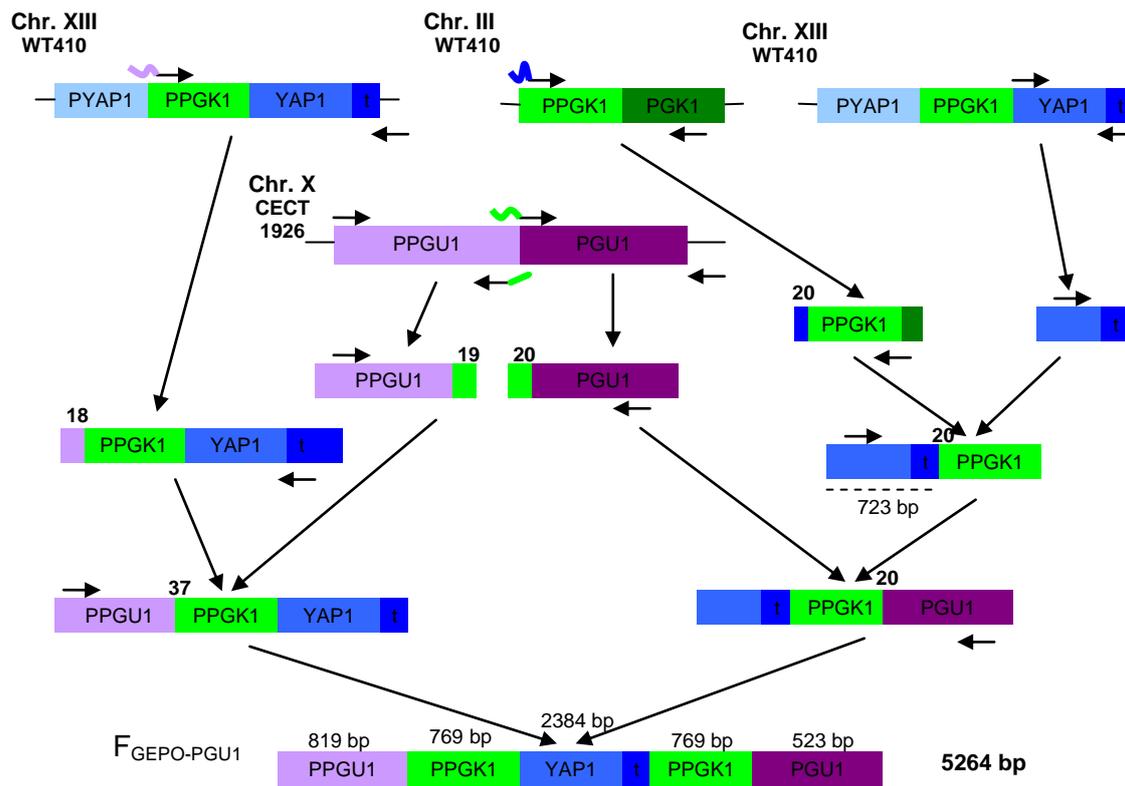


Figura 11. Diagrama de las reacciones de PCR realizadas para la obtención del fragmento denominado $F_{GEPO-PGU1}$ que, una vez insertado en el ADN genómico de CECT 1926, permite la sobreexpresión del gen *PGU1* y a la vez la pérdida del casete de selección.

b) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el promotor del gen *PGU1*

A partir del ADN genómico de la cepa CECT 1926, se amplificó por PCR el fragmento del promotor del gen *PGU1*. El cebador directo que se ha utilizado (PGU2D) contiene una secuencia de 22 nucleótidos homóloga a una región del genoma situada 1.728 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del gen *PGU1*. El cebador reverso (PGUPGKFR) consta de una secuencia de 19 nucleótidos complementaria a la

secuencia del promotor del gen *PGKI* y situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen seguida por una secuencia de 25 nucleótidos complementaria a la región promotora del gen *PGUI* y situada justo antes del ATG de inicio del mismo gen. El fragmento resultante de la amplificación contiene una secuencia de 1.747 pb conteniendo el promotor del gen *PGUI* de la cepa CECT 1926 con una zona de solapamiento en 3' con el extremo 5' del casete de selección.

c) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el gen *PGUI*

El cebador híbrido directo que se ha utilizado (PGUPGKFD) contiene una secuencia de 20 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *PGKI* situada justo antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen y seguida por una secuencia de 30 nucleótidos homóloga a la pauta de lectura abierta del gen *PGUI* desde el ATG de inicio. El cebador reverso (PGUIR) contiene una secuencia de 20 nucleótidos complementaria a una región del genoma situada 314 pb desde el final de la pauta de lectura abierta del gen *PGUI*. El fragmento resultante de la amplificación contiene una secuencia de 1.420 pb conteniendo el gen *PGUI* de la cepa CECT 1926 con una zona de solapamiento en 5' con el extremo 3' del promotor de la *PGKI* del casete de selección.

d) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el promotor del gen *PGK1*

A partir de ADN genómico de WT-410 se amplificó por PCR un fragmento de 1.327 pb conteniendo el promotor del gen *PGKI* con una zona de solapamiento en 5' con el extremo 3' del terminador del gen *YAPI* de la misma cepa.

Como cebador directo híbrido se utilizó el cebador híbrido PPGKF5D que consta de una secuencia de 20 nucleótidos homóloga a la región terminadora del gen *YAPI* situada 412 pb después del final de la pauta de lectura abierta del mismo gen y seguida por una secuencia de 25 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio del mismo gen. Como cebador reverso se utilizó PGKINT1R, ya descrito en el apartado 1.2.

e) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el gen *YAP1* y su terminador

A partir del ADN genómico de la cepa WT-410, se amplificó por PCR un fragmento conteniendo el gen *YAPI*. El cebador directo (YAPD) que se ha utilizado contiene una

secuencia de 37 nucleótidos homóloga a la secuencia de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* desde el ATG de inicio. Como cebador reverso se ha utilizado YAPTERR, que consta de una secuencia de 24 nucleótidos complementaria a la región terminadora del gen *YAPI* y situada 431 pb desde el final de la pauta de lectura abierta del mismo gen. El fragmento resultante de la amplificación de 2.384 pb contiene la secuencia completa de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* y su terminador.

f) Fusión mediante amplificación por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (a) y (b)

El cebador directo (PGU3D) contiene una secuencia de 22 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *PGUI* situada 1.708 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen, mientras que se ha utilizado como cebador reverso interno el denominado YAPTERR. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 37 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de igual longitud del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento conteniendo la región promotora del gen *PGUI* de 1.708 pb situada justo antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con la secuencia de 2.384 pb del gen *YAPI* y su terminador. La longitud total del fragmento es de 4.861 pb.

g) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (d) y (e)

El cebador directo interno que se ha utilizado (YAP2D) contiene una secuencia de 21 nucleótidos homóloga a una región del gen *YAPI* situada 203 pb después del inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen, mientras que se ha utilizado como cebador reverso interno el denominado PPGK1R (ver apartado 1.2.). Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 20 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de igual longitud del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento conteniendo la parte final del gen *YAPI* seguida de su terminador, fusionada con la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen. La longitud del fragmento es de 2.950 pb.

h) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (g) y (c)

El cebador directo interno que se ha utilizado (YAP3D) contiene una secuencia de 22 nucleótidos homóloga a la secuencia del gen *YAPI* situada 1.662 pb después del inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen, mientras que se ha utilizado como reverso un cebador (PGU2R) que consta de una secuencia de 20 nucleótidos complementaria a la secuencia del gen *PGUI* situada 793 pb después del ATG de inicio del gen *PGUI*. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona con la misma secuencia y situada en uno de los fragmentos en su extremo 3' y en el otro en su extremo 5'), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento formado por una secuencia de 723 pb de longitud, situada 1.662 pb después del comienzo de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI*, y que comprende el final de dicha pauta junto con la región correspondiente al terminador del gen *YAPI*, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen y fusionada con la secuencia de los primeros 793 nucleótidos del gen *PGUI*. La longitud total del fragmento es de 2.285 pb.

i) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (h) y (f)

El cebador directo interno que se ha utilizado (PGU1D) contiene una secuencia de 18 nucleótidos homóloga a la secuencia del promotor del gen *PGUI* situada 819 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen, mientras que se ha utilizado como cebador reverso, un cebador interno (PGU3R) que consta de una secuencia de 20 nucleótidos complementaria a la secuencia del gen *PGUI* situada 523 pb después del ATG de inicio de dicho gen. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 723 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 723 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un fragmento nuevo denominado F_{GEPO-PGUI} (Genomic Evolution con Pop Out de *PGUI*) que consta de: la secuencia de la región promotora del gen *PGUI* de la cepa CECT 1926 situada 819 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con la secuencia de 2.384 nucleótidos de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* y de su terminador, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura

abierta de dicho gen, fusionada con los primeros 523 nucleótidos de la pauta de lectura abierta del gen *PGUI*. La longitud total de $F_{\text{GEPO-PGUI}}$ es de 5.264 pb.

Los resultados de todas las reacciones de amplificación y de fusión efectuadas hasta obtener el fragmento de integración $F_{\text{GEPO-PGUI}}$ se presentan en la Figura 12 y como se puede observar en el carril correspondiente al pocillo 10 de la misma, además del fragmento de interés se amplifica un fragmento de 2.111 pb correspondiente a la secuencia de la región promotora del gen *PGUI* de la cepa CECT 1926 situada 819 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con los primeros 523 nucleótidos de la pauta de lectura abierta del gen *PGUI*.

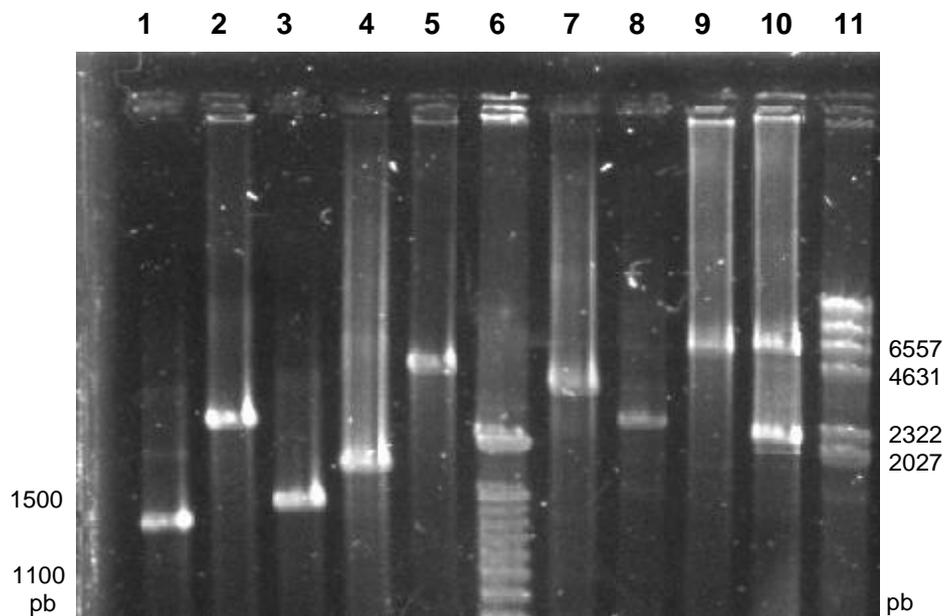


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos en las distintas reacciones de amplificación y de fusión realizadas a lo largo de la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEPO-PGUI}}$: (d) (pocillo 1); (e) (pocillo 2); (c) (pocillo 3); (b) (pocillo 4); (a) (pocillo 5); (g) (pocillo 7); (h) (pocillo 8); (f) (pocillo 9); (i) (pocillo 10). Los patrones de pesos moleculares utilizados han sido el TrackIt™ 100 bp DNA Ladder (pocillo 6) y el ADN del fago λ cortado con la endonucleasa de restricción *HindIII* (pocillo 11).

Para intentar evitar que la fusión de los fragmentos (h) y (f) ocurriera en la región promotora del gen *PGKI* (ya que los dos fragmentos a fusionar contienen la secuencia de 769 pb correspondiente al promotor de dicho gen), se ha construido el fragmento (h) de forma que contuviera en el extremo 5' una muy extensa zona de solapamiento de 723 nucleótidos con el extremo 3' del fragmento (f). Sin embargo, esta medida no ha

evitado que, en parte, la reacción de fusión entre los 2 fragmentos ocurra en el sitio equivocado. En las transformaciones se utilizó por lo tanto una mezcla de $F_{GEPO-PGU1}$ y del fragmento espúreo que se forma, ya que los transformantes portadores del mismo no se seleccionarán al no llevar el casete de selección, aunque pudiera ser que su presencia afectase a la frecuencia de transformación.

Como se puede observar en la Tabla 15, la FT es prácticamente la misma cuando se utiliza $F_{GEPO-PGU1}$ o $F_{GE-PGU1}$, por lo tanto la presencia del fragmento de 2.111 pb no parece afectar negativamente a la frecuencia de transformación.

2.4. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{GE-PGU1}$

A continuación se describen las reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento denominado $F_{GE-PGU1}$ (del inglés Fragment for Genomic Evolution of *PGU1* gene) que, posteriormente a su inserción cromosómica mediante recombinación homóloga, sustituirá al promotor original del gen *PGU1* por el promotor del gen *TDH3*, y que insertará en la misma integración el casete de selección construido con anterioridad.

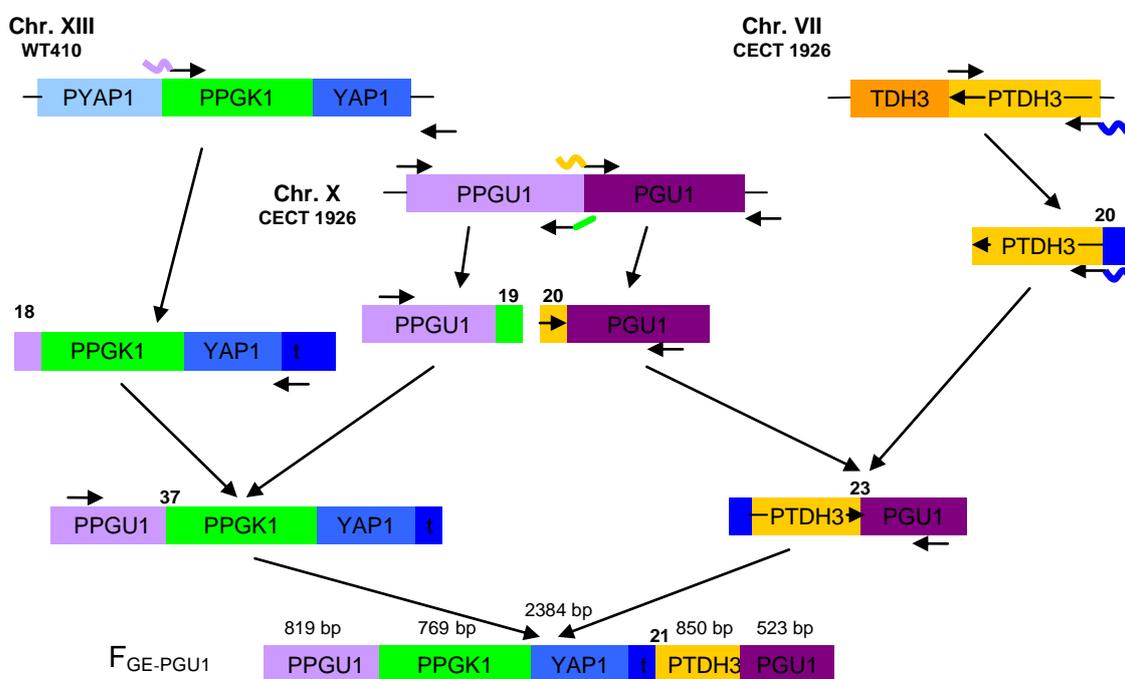


Figura 13. Diagrama de las reacciones de PCR efectuadas para la obtención del fragmento denominado $F_{GE-PGU1}$ que, una vez insertado en el ADN genómico de la cepa CECT 1926, permite la sobreexpresión del gen *PGU1*.

Para la construcción del fragmento final se necesitaron 7 reacciones de PCR. En la Figura 13 se ilustra el diagrama de las reacciones de PCR utilizadas.

a) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el casete de selección

Para esta amplificación, ver el paso (a) de la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEPO-PGU1}}$ (ver página 109).

b) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el promotor del gen *PGU1*

Para esta amplificación, ver el paso (b) de la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEPO-PGU1}}$ (ver página 110).

c) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el gen *PGU1*

El cebador híbrido directo que se ha utilizado (PGUTDHFD) contiene una secuencia de 20 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *TDH3* situada justo antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen y seguida por una secuencia de 30 nucleótidos homóloga a la pauta de lectura abierta del gen *PGU1* desde su ATG de inicio. Como cebador reverso se ha utilizado PGU1R (ver página 111). El fragmento resultante de la amplificación contiene una secuencia de 1.420 pb conteniendo el gen *PGU1* de la cepa CECT 1926 con una zona de solapamiento en 5' con el extremo 3' del promotor del gen *TDH3*.

d) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el promotor del gen *TDH3*

El cebador híbrido directo que se ha utilizado (PTDHYAPFD) contiene una secuencia de 20 nucleótidos homóloga a la región terminadora del gen *YAP1* situada 412 pb después del fin de la pauta de lectura abierta del mismo gen y seguida por una secuencia de 27 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *TDH3* situada 851 pb antes del ATG de inicio del mismo gen. Como cebador reverso se ha utilizado PTDH1R, que consta de una secuencia de 26 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *TDH3* y de las primeras 3 bases de la pauta de lectura abierta del mismo gen. El fragmento resultante de la amplificación contiene una secuencia de 874 pb conteniendo la región promotora del gen *TDH3* de la cepa CECT 1926 con una zona de solapamiento en 5' con el extremo 3' del terminador del gen *YAP1*.

e) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (a) y (b)

Para esta amplificación, ver el paso (f) de la construcción del fragmento de integración $F_{GEPO-PGU1}$ (ver página 112).

f) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (c) y (d)

Se ha utilizado como cebador directo PTDHYAPFD y como reverso PGU2R (ver página 113). Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 23 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 37 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento conteniendo una secuencia de 20 nucleótidos homóloga al extremo 3' del terminador del gen *YAPI* situada 431 pb desde el fin de la pauta de lectura abierta del mismo gen fusionada con la región promotora del gen *TDH3* de 851 pb situada justo antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de los primeros 793 nucleótidos del gen *PGU1*. La longitud total del fragmento es de 1.664 pb.

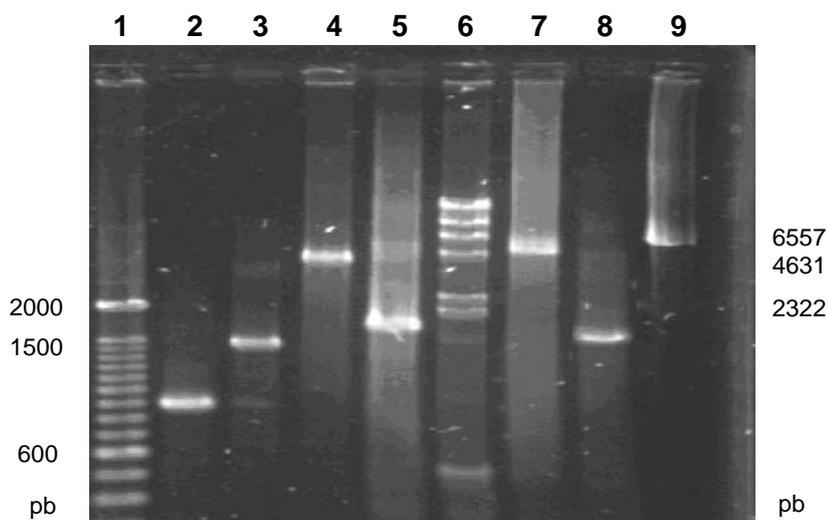


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos a lo largo de la construcción de $F_{GE-PGU1}$: (d) (pocillo 2); (c) (pocillo 3); (a) (pocillo 4); (b) (pocillo 5); (e) (pocillo 7); (f) (pocillo 8); (g) (pocillo 9). Los patrones de peso molecular utilizados han sido el 100 bp DNA Ladder (pocillo 1) y el ADN del fago λ cortado con la endonucleasa de restricción *HindIII* (pocillo 6).

g) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (e) y (f)

Los cebadores internos que se han utilizado han sido PGU1D y PGU3R. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona

de 21 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 21 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un fragmento nuevo denominado $F_{GE-PGU1}$ (del inglés Fragment for Genomic Evolution of *PGU1* gene) que consta de: la secuencia de la región promotora del gen *PGU1* de la cepa CECT 1926 situada 819 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con la secuencia de 2.384 nucleótidos de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* y de su terminador, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *TDH3* situada 850 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con los primeros 523 nucleótidos de la pauta de lectura abierta del gen *PGU1*. La longitud total de $F_{GE-PGU1}$ es de 5.345 pb. Los resultados de todas las reacciones de amplificación y de fusión efectuadas hasta obtener el fragmento de integración $F_{GE-PGU1}$ se presentan en la Figura 14.

2.5. Transformación de W303-1A y CECT 1926 con $F_{GE-PGU1}$ y

$F_{GEPO-PGU1}$

Los fragmentos $F_{GE-PGU1}$ y $F_{GEPO-PGU1}$ son los que se utilizaron para la transformación de las cepas W303-1A y CECT 1926 siguiendo el procedimiento descrito por Gietz y Woods. En el caso de la cepa W303-1A se utilizaron en cada transformación entre 2 y 8 μg de cada fragmento, mientras que en el caso de la cepa CECT 1926, se utilizaron aproximadamente 10 μg del fragmento $F_{GE-PGU1}$ obtenido a partir del ADN genómico del transformante WTP6, y 10 μg del fragmento $F_{GEPO-PGU1}$ obtenido a partir del ADN genómico del transformante WPP45 (ver apartado 2.7.).

En la Tabla 15 se resumen las frecuencias de transformación obtenidas con las cepas W303-1A y CECT 1926.

Mediante PCR se comprobó la correcta integración de los fragmentos introducidos en el ADN genómico de algunos transformantes de las cepas W303-1A y CECT 1926. En las Figuras 15A y 15B se presenta, a modo de ejemplo, la comprobación de la integración de ambos fragmentos en la cepa W303-1A. En la Figura 15A el fragmento de ≈ 7.000 pb obtenido mediante los cebadores PGU2D y PGU1R, confirma que los transformantes

WTP6 (pocillo 1) y WTP7 (pocillo 2) han integrado correctamente el fragmento $F_{GE-PGU1}$.

Cepas	Frecuencia de transformación		
	pYPGE15+YAP1	$F_{GE-PGU1}$	$F_{GEPO-PGU1}$
W303-1A	$4,5 \cdot 10^3$	29,3	/
W303-1A	$1,1 \cdot 10^4$	/	33,2
CECT 1926	$5,2 \cdot 10^2$	1,2	/
CECT 1926	$5,7 \cdot 10^2$	/	1,7

Tabla 15. Frecuencias de transformación (número de colonias/ μ g de ADN) de las cepas W303-1A y CECT 1926 con el plásmido pYPGE15+YAP1 y los fragmentos $F_{GE-PGU1}$ y $F_{GEPO-PGU1}$. La transformación con el plásmido pYPGE15+YAP1 se utiliza como control de la competencia alcanzada en cada transformación.

Con los mismos cebadores y utilizando ADN genómico de W303-1A (pocillo 4) se amplifica un fragmento de ≈ 3.200 pb. En la Figura 15B la banda de ≈ 7.000 pb obtenida mediante los cebadores PGU2D y PGU1R, confirma que el transformante WPP45 (pocillo 1) ha integrado correctamente el fragmento $F_{GEPO-PGU1}$. Con los mismos cebadores y utilizando ADN genómico de W303-1A (pocillo 2) se amplifica una banda de ≈ 3.200 pb.

2.6. Eliminación del casete de selección en un transformante de la cepa CECT 1926

Para la eliminación del casete de selección se procedió de acuerdo con el protocolo ya descrito en el apartado de Materiales y Métodos. La cepa 1926-12T (transformante de la cepa CECT 1926, donde se ha integrado el fragmento $F_{GEPO-PGU1}$) se creció durante 35 pases en medio no selectivo (YPD) tras lo cual se analizaron 1.650 colonias para determinar su resistencia a cicloheximida. Se verificó mediante PCR la eliminación del casete de selección en las colonias que no presentaban resistencia a cicloheximida y, finalmente, en la cepa denominada 1926-12TPO se determinó la secuencia resultante tras el proceso de eliminación. El 0,39% del total de las colonias analizadas resultaban haber perdido el casete de selección.

En la Figura 15C se representa la comprobación de la eliminación del casete de selección. La amplificación de un solo fragmento de 1.293 pb (pocillo 3), indica que el

transformante 1926-12T ha eliminado el casete de selección mediante recombinación homóloga. De hecho, a partir de ADN genómico de la cepa 1926-12T y utilizando en la reacción de amplificación los mismos cebadores (PPGK1D y PGU3R) se amplifican 2 fragmentos de 1.293 pb y 4.437 pb (pocillo 2). Como control negativo se ha utilizado en la reacción de amplificación ADN genómico de CECT 1926 (pocillo 4). En la Figura 16 se resume el proceso de integración del fragmento $F_{GEPO-PGU1}$ en el ADN genómico de la cepa CECT 1926 y la posterior eliminación del casete de selección. El promotor del gen *PGU1*, situado en el extremo 5' del fragmento, y el gen *PGU1*, situado en el extremo 3', son los responsables de dirigir la correcta integración por recombinación homóloga de $F_{GEPO-PGU1}$ en el genoma de CECT 1926. El transformante 1926-12T, después de muchas generaciones de crecimiento en un medio sin la presión de selección de la cicloheximida, elimina el casete de selección mediante recombinación homóloga dando lugar a la cepa 1926-12TPO.

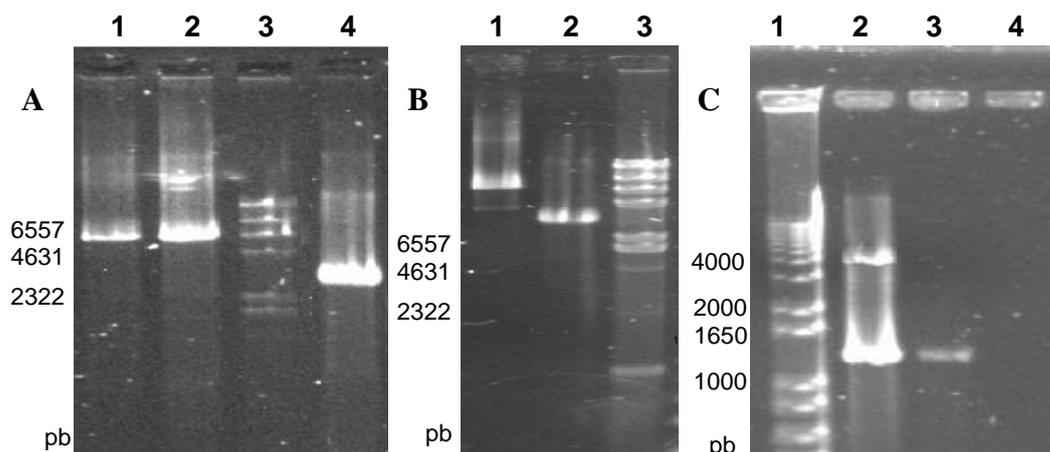


Figura 15 A- Comprobación mediante PCR de la correcta integración del fragmento $F_{GE-PGU1}$ en la cepa W303-1A mediante PCR. El patrón de peso molecular utilizado ha sido el ADN del fago λ cortado con la endonucleasa de restricción *HindIII* (pocillo 3).

B- Comprobación mediante PCR de la correcta integración de $F_{GEPO-PGU1}$ en W303-1A. El patrón de peso molecular utilizado ha sido el ADN del fago λ cortado con la endonucleasa de restricción *HindIII* (pocillo 3).

C- Comprobación de la eliminación del casete de selección. El patrón de peso molecular utilizado ha sido el 1Kbp plus DNA Ladder (pocillo 1).

La eliminación del casete de selección es importante por dos motivos:

1) De manera general, y tal y como se ha descrito en la Introducción, para aumentar la aceptabilidad de las levaduras modificadas genéticamente es deseable la eliminación de

las construcciones portadoras de los genes marcadores de resistencia, aunque en este caso, al no ser de naturaleza heteróloga, sino corresponder íntegramente a secuencias y fragmentos génicos ya presentes en el genoma y, además, siendo la cepa mejorada genéticamente una levadura destinada a la producción de bioetanol y no de uso alimentario, este objetivo presentaría escasa relevancia. No obstante, sigue siendo un criterio prudente y aconsejable, restringir las modificaciones genéticas al mínimo necesario para alcanzar el objetivo propuesto.

2) Se puede volver a usar el mismo casete de selección para introducir en la cepa evolucionada otras características de interés industrial.

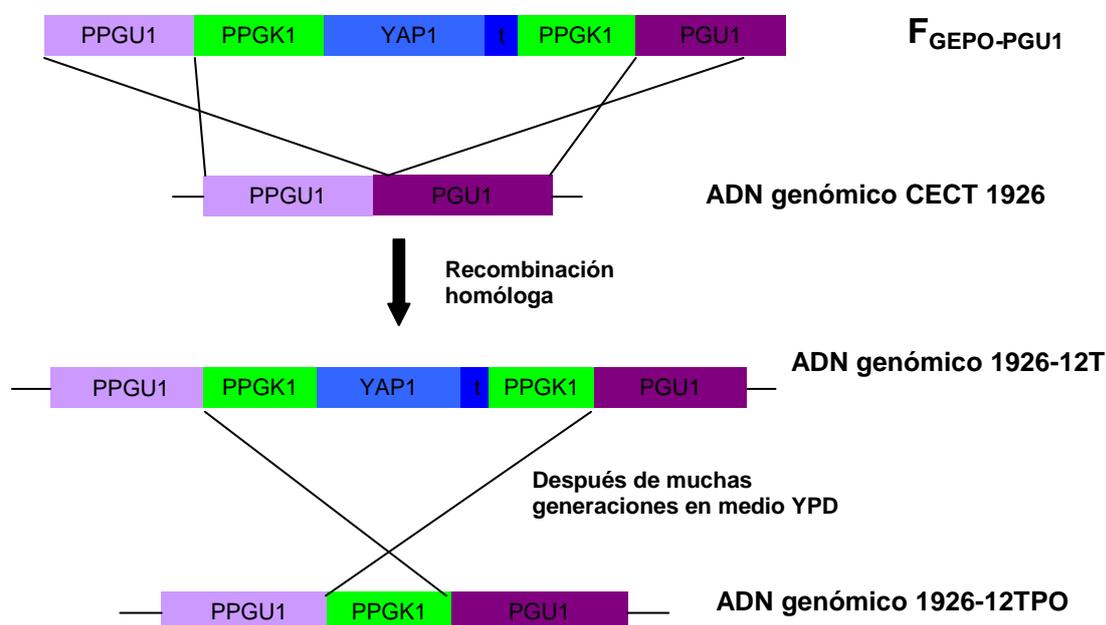


Figura 16. Diagrama del proceso de integración de $F_{GEPO-PGU1}$ en el ADN genómico de la cepa CECT 1926 y de la posterior eliminación del casete de selección.

2.7. Secuenciación de los transformantes obtenidos por integración de los distintos fragmentos conteniendo el gen *PGU1*

Se determinó la secuencia de un transformante de W303-1A con el fragmento $F_{GE-PGU1}$ (denominado WTP6) y de un transformante de W303-1A con el fragmento $F_{GEPO-PGU1}$ (denominado WPP45).

A partir de ADN genómico de WTP6, se amplificó por PCR el fragmento $F_{GE-PGU1}$, que se utilizó para transformar la cepa CECT 1926. Asimismo, a partir del ADN genómico

de WPP45, se amplificó por PCR el fragmento $F_{GEPO-PGU1}$, que se utilizó para transformar la cepa CECT 1926. En cada transformación se analizó la secuencia de un solo transformante denominados 1926-TP6 (en el caso de la transformación con $F_{GE-PGU1}$) y 1926-12T (en el caso de la transformación con $F_{GEPO-PGU1}$). De conformidad con lo esperado, se observó que la secuencia del fragmento integrado en el cromosoma era exactamente igual entre los transformantes WTP6 y 1926-TP6, y entre WPP45 y 1926-12T. El número de cambios encontrados en la secuencia de los fragmentos integrados, para cada pareja de cepas, es muy bajo, no afectando en ningún caso al gen *PGU1*.

Se determinó también la secuencia del fragmento resultante del proceso de eliminación del casete de selección en el transformante 1926-12TPO, donde se puede notar que, de las dos secuencias conteniendo el promotor del gen *PGK1*, se elimina la que sobreexpresa el gen *YAP1*. Habría que analizar la secuencia de más cepas que hubieran experimentado el fenómeno del “pop-out”, para establecer si la eliminación del casete de selección ocurre siempre mediante la eliminación del promotor que sobreexpresa dicho casete, o si también puede darse la eliminación del otro fragmento situado tras el gen *YAP1*.

En la Figura 17 se ilustra gráficamente la zona secuenciada en cada transformante y los cambios encontrados con respecto a la secuencia original del fragmento construido.

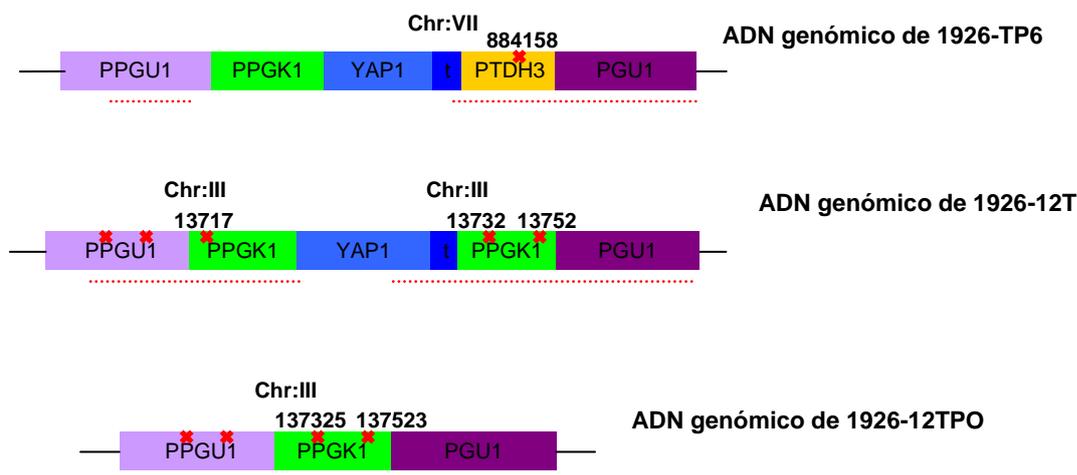


Figura 17. Determinación de las secuencias de los transformantes obtenidos a partir de la cepa CECT 1926. Las líneas rojas representan las zonas del genoma que se han secuenciado y la cruces del mismo color, los cambios con respecto a la secuencia de la cepa CECT 1926.

2.8. Análisis fenotípico de los transformantes obtenidos por integración de los distintos fragmentos conteniendo el gen *PGU1*

Se determinó cualitativamente el aumento de la actividad endopoligalacturonasa en las cepas evolucionadas 1926-12T, 1926-12TPO y 1926-TP6 con respecto a la cepa parental CECT 1926. También se determinó el contenido final de azúcares y el grado alcohólico del licor fermentado con dichas cepas, para comprobar que el único parámetro que se ha cambiado en las cepas evolucionadas ha sido la producción de la enzima endopoligalacturonasa. Como se puede observar en la Figura 18, hay un notable incremento de la actividad PG en las cepas evolucionadas, sin perjuicio en la producción de etanol ni en la capacidad fermentativa (datos no presentados). Analizando el área de los halos alrededor de las cepas (ver Figura 19), se puede estimar que la actividad endopoligalacturonasa es prácticamente la misma en las tres cepas evolucionadas.

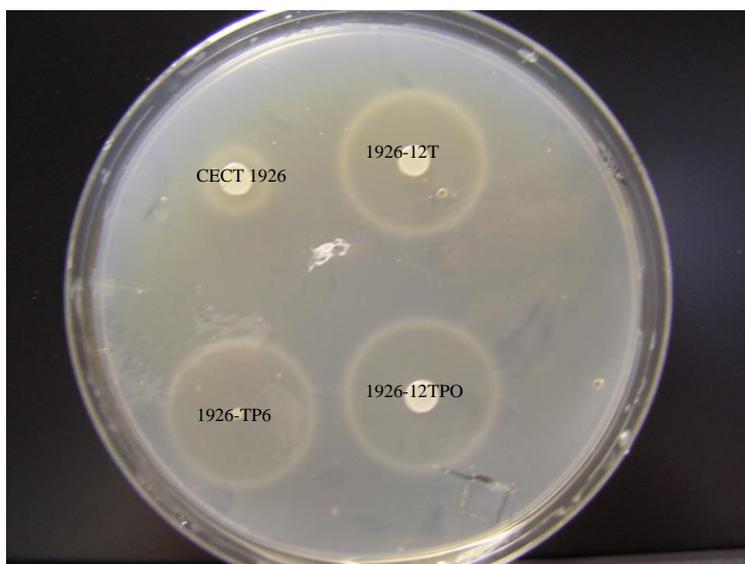


Figura 18. Determinación del aumento de la actividad PG en las cepas evolucionadas. Antes de realizar el inóculo se comprobó por espectrofotometría a 600 nm que el crecimiento había sido uniforme en las 4 cepas analizadas. Las cepas se crecieron durante 2 días a 30 °C en medio YPA, y luego se lavaron con HCl 6 N. El halo alrededor de las cepas indica actividad endopoligalacturonasa y a mayor halo, mayor actividad.

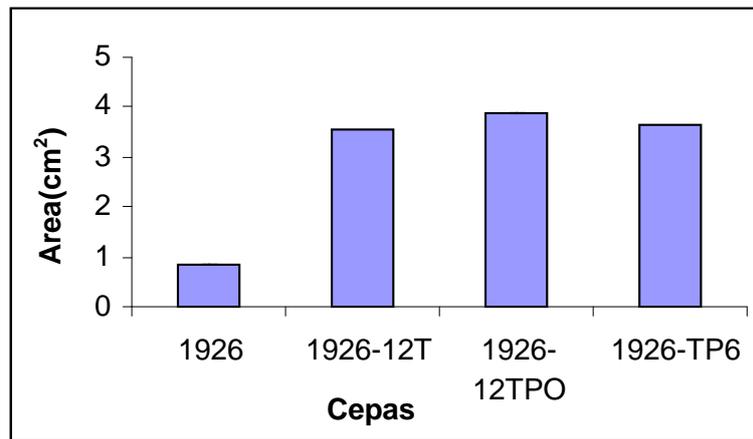


Figura 19. Valor de las áreas de los halos de hidrólisis de ácido poligalacturónico para cada cepa considerada. Los datos mostrados representan la media de 2 experimentos independientes.

3. Desarrollo de una levadura industrial de elaboración de cerveza tipo lager con baja producción de diacetilo

Utilizando la metodología de evolución genómica por diseño molecular, se evolucionó la cepa de levadura industrial S1, de forma que produzca menos diacetilo durante el proceso de fermentación. El diacetilo (2,3 butanodiona) se caracteriza por conferir a la cerveza un fuerte bouquet y aroma a mantequilla y, por lo tanto, representa un defecto en el perfil aromático del producto final. Su concentración en la cerveza no debe superar las 0,1 ppm y en la cerveza tipo lager es deseable que no supere las 0,05 ppm. El diacetilo se origina a partir de la descarboxilación no enzimática en el mosto del α -acetolactato, un producto intermedio de la ruta de biosíntesis de la valina (Krogenus and Gibson). La levadura es capaz de reducir el diacetilo, a medida que difunde en el interior de la célula, por medio de una reductasa que utiliza como coenzima NADH, para producir 2,3 butanodiol, casi totalmente desprovisto de aroma. La concentración del diacetilo disminuye mediante el proceso de maduración (o lagering) donde es reutilizado por la propia levadura y se transforma en acetoina y finalmente se convierte en 2,3-butanodiol (ver Figura 20). Aplicando el concepto y la metodología de la evolución genómica por diseño molecular, se sobreexpresó el gen *ILV5* de la propia cepa S1, gen que codifica para una isomero-reductasa que convierte el α -acetolactato en α - β -dihidroxi-valerato. De esta forma, se evitará la acumulación de α -acetolactato en la

cerveza y se acortará sensiblemente su proceso de lagering al haberse reducido la concentración de diacetilo inicial.

3.1. Secuenciación de las zonas de interés en el genoma de la cepa S1

El primer paso en el proceso de construcción del fragmento de integración fue el establecimiento de la secuencia del gen *ILV5* y de su promotor en la cepa a evolucionar. Con tal fin se amplificó por PCR y se secuenció un fragmento genómico conteniendo el gen *ILV5* y su promotor. En la reacción de amplificación por PCR se utilizó un conjunto de cebadores diseñados a partir de las secuencias que se encuentran en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae*.

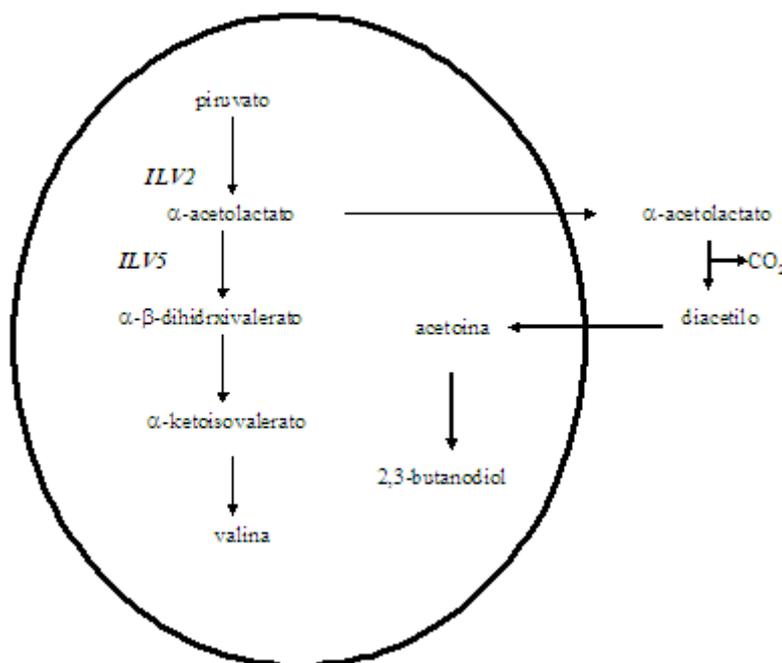


Figura 20. Representación esquemática de la formación y eliminación del diacetilo por la levadura cervecera.

Se ha encontrado sólo un cambio en la región promotora del gen *ILV5* con respecto a la secuencia depositada en la base de datos SGD en la base de coordenada 839.478 donde puede leerse una Guanina en vez de una Adenina y otro cambio en la pauta de lectura abierta del gen *ILV5* en la base de coordenada 838.838 donde puede leerse una Guanina en vez de una Timina.

3.2. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEPO-ILV5}}$

A continuación se describen las reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento denominado $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ que, posteriormente a su inserción cromosómica mediante recombinación homóloga, sustituirá al promotor original del gen *ILV5* por el promotor del gen *PGK1* y que insertará en la misma integración el casete de selección construido con anterioridad. Dicha construcción permite la sobreexpresión del gen *ILV5* y, a la vez, la posterior eliminación del casete de selección, después del crecimiento de la cepa evolucionada en un medio no selectivo. Para la construcción del fragmento final se necesitaron 9 reacciones de PCR. En la Figura 21 se ilustra el diagrama de las reacciones de PCR utilizadas.

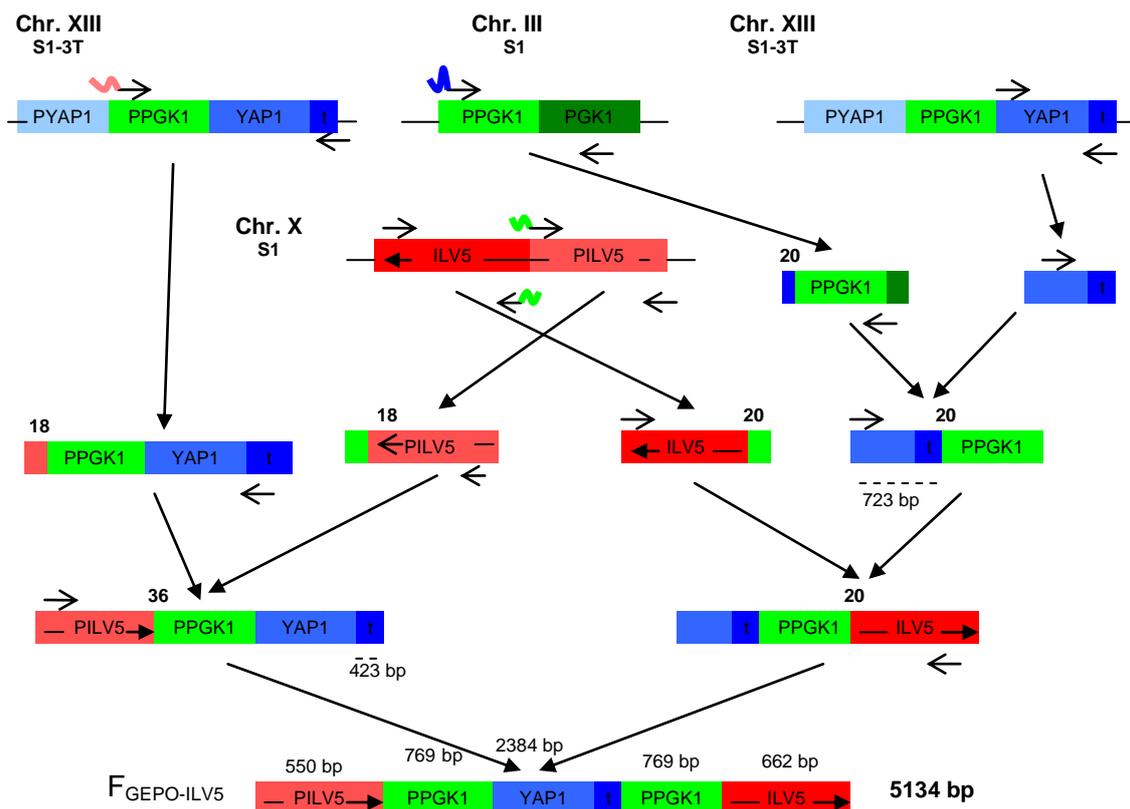


Figura 21. Diagrama de las reacciones de PCR llevadas a cabo para la obtención del fragmento denominado $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ que, una vez insertado en el ADN genómico de la cepa S1, permite la sobreexpresión del gen *ILV5* y, a la vez, la posterior eliminación del casete de selección.

a) Amplificación por PCR del casete de selección

A partir del ADN genómico de la cepa S1-3T se amplificó por PCR un fragmento de 3.688 pb conteniendo el casete de selección, junto con una zona de solapamiento en 5' con el extremo 3' del promotor del gen *ILV5* de la cepa S1.

Como cebador directo híbrido se utilizó el cebador PGKPILFD, que consta de una secuencia de 18 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *ILV5* situada justo antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen, y seguida por una secuencia de 25 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio del gen *YAPI* del casete de selección previamente integrado en el genoma de S1. Como cebador reverso se utilizó YAPR3.

b) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el promotor del gen *ILV5*

A partir del ADN genómico de la cepa S1, se amplificó por PCR el fragmento génico correspondiente al promotor del gen *ILV5*. El cebador directo que se ha utilizado (ILV1D) contiene una secuencia de 20 nucleótidos homóloga a una región del genoma situada 890 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del gen *ILV5*. El cebador reverso (PILVPGKFR) consta de una secuencia de 18 nucleótidos complementaria a la secuencia del promotor del gen *PGK1* y situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen seguida por una secuencia de 32 nucleótidos complementaria a la región promotora del gen *ILV5* y situada justo antes del ATG de inicio del mismo gen. El fragmento resultante de la amplificación contiene una secuencia de 908 pb conteniendo el promotor del gen *ILV5* de la cepa S1 con una zona de solapamiento en 3' de 18 pb con el extremo 5' del casete de selección.

c) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el inicio y parte de la pauta de lectura abierta del gen *ILV5*

Tomando como material de partida el ADN genómico de la cepa S1, se procedió a amplificar por PCR un fragmento que contiene el inicio y parte de la pauta de lectura abierta del gen *ILV5*. El cebador híbrido directo que se ha utilizado (ILVPPGK1D) contiene una secuencia de 20 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *PGK1* situada justo antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen y seguida por una secuencia de 23 nucleótidos homóloga a la pauta de lectura abierta del gen *ILV5* desde el ATG de inicio. El cebador reverso (ILV1R) contiene una

secuencia de 21 nucleótidos complementaria a una región del genoma situada 820 pb después del inicio de la pauta de lectura abierta del gen *ILV5*. El fragmento resultante de la amplificación contiene una secuencia de 840 pb conteniendo el gen *ILV5* de la cepa S1 con una zona de solapamiento en 5' de 20 pb con el extremo 3' del promotor de la *PGK1* del casete de selección.

d) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el promotor del gen *PGK1*

Para efectuar esta amplificación se partió del ADN genómico de la cepa S1-3T y se siguieron los pasos descritos en el apartado (d) de la construcción del fragmento F_{GEPO-PGU1} (ver página 111).

e) Amplificación por PCR de un fragmento conteniendo el gen *YAP1*

Para efectuar esta amplificación se partió del ADN genómico de la cepa S1-3T y se siguieron los pasos descritos en el apartado (e) de la construcción del fragmento F_{GEPO-PGU1} (ver página 111).

f) Fusión mediante amplificación por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (a) y (b)

El cebador directo (ILV3D) contiene una secuencia de 23 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *ILV5* situada 550 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen, mientras que se ha utilizado como cebador reverso interno el denominado YAPTERR. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 36 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 36 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento conteniendo la región promotora del gen *ILV5*, de 550 pb y situada justo antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con la secuencia de 2.384 pb del gen *YAP1* y su terminador. La longitud total del fragmento es de 3.703 pb.

g) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (d) y (e)

Para esta fusión, se siguieron los pasos descritos en el apartado (g) de la construcción del fragmento $F_{\text{GEPO-PGU1}}$ (ver página 112).

h) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (g) y (c)

Como cebador directo interno se utilizó YAP3D, mientras que como cebador reverso interno se utilizó ILV2R, que consta de una secuencia de 20 nucleótidos complementaria a la secuencia del gen *ILV5* situada 767 pb después del ATG de inicio del gen *ILV5*. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 20 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 20 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento conteniendo una región de 723 pb situada 1.662 pb después del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del gen *YAP1* y que contiene el final del mismo y su terminador, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGK1*, situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con la secuencia de los primeros 767 nucleótidos del gen *ILV5*. La longitud total del fragmento es de 2.259 pb.

i) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (h) y (f)

Se utilizó como cebador directo ILV3D, mientras que se utilizó como reverso un cebador interno (ILV3R) que consta de una secuencia de 22 nucleótidos complementaria a la secuencia del gen *ILV5* situada 662 pb después del ATG de inicio del gen *ILV5*. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 723 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 723 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un fragmento nuevo denominado $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ (Genomic Evolution con Pop Out de *ILV5*) que consta de: la secuencia de la región promotora del gen *ILV5* de la cepa S1 situada 550 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con la secuencia de

2.384 pb de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* y de su terminador, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con los primeros 662 nucleótidos de la pauta de lectura abierta del gen *ILV5*. La longitud total de $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ es de 5.134 pb.

Como en el caso del fragmento $F_{\text{GEPO-PGU1}}$, además del fragmento de interés se amplifica un fragmento no deseado de 1.981 pb (ver Figura 22), correspondiente a la secuencia de la región promotora del gen *ILV5* de la cepa S1 situada 550 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con los primeros 662 nucleótidos de la pauta de lectura abierta del gen *ILV5*. En las transformaciones se utilizó por lo tanto una mezcla de $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ y del fragmento no deseado, sin que ello parezca afectar a la frecuencia de transformación, como se desprende de los resultados presentados en las Tablas 16 y 17.

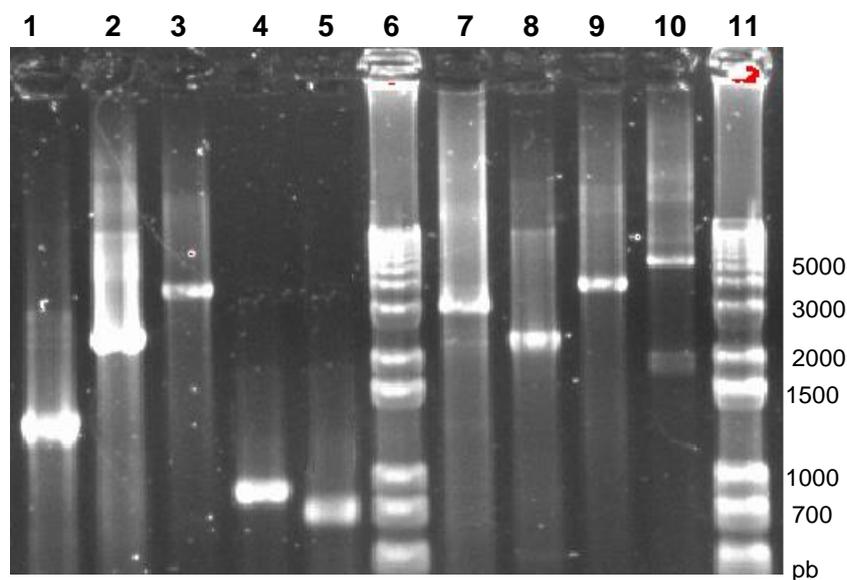


Figura 22. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos a lo largo de la construcción de $F_{\text{GEPO-ILV5}}$: (d) (pocillo 1); (e) (pocillo 2); (a) (pocillo 3); (b) (pocillo 4); (c) (pocillo 5); (g) (pocillo 7); (h) (pocillo 8); (f) (pocillo 9); (i) (pocillo 10). Los patrones de peso molecular utilizados han sido el TrackIt™ 1 Kbp plus DNA Ladder (pocillos 6 y 11).

3.3. Transformación de W303-1A y S1 con $F_{\text{GEPO-ILV5}}$

El fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ se utilizó para la transformación de las cepas W303-1A y S1 siguiendo el procedimiento descrito por Gietz y Woods. En el caso de la cepa W303-1A se utilizaron 1,5 μg de fragmento, mientras que en el caso de la cepa S1, se utilizaron aproximadamente 100 μg de fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ obtenido a partir de ADN genómico del transformante WPI8 (ver Tabla 17).

En la Tabla 16 se resumen las frecuencias de transformación obtenidas con las cepas W303-1A y S1.

Cepas	Frecuencia de transformación	
	pYPGE15+YAP1	$F_{\text{GEPO-ILV5}}$
W303-1A	$1,1 \cdot 10^4$	13,3
S1	$7,8 \cdot 10^1$	0,11

Tabla 16. Frecuencias de transformación (número de colonias/ μg de ADN) de las cepas W303-1A y S1 con el plásmido pYPGE15+YAP1 y el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$. La transformación con el plásmido pYPGE15+YAP1 se utiliza como control de la competencia alcanzada en cada transformación.

Mediante PCR se comprobó la correcta integración de los fragmentos integrados en el ADN genómico de algunos transformantes de las cepas W303-1A y S1. En la Figura 23 se presenta la comprobación de la integración de los fragmentos en la cepa S1. Los fragmentos a 4.035 pb (pocillo 1, obtenido mediante los cebadores ILV1D y YAPTERR) y a 2.292 pb (pocillo 3, obtenido mediante los cebadores YAP3D y ILV2R), confirman que el transformante S1-PI6 ha integrado correctamente el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$. Con los mismos cebadores y utilizando ADN genómico de S1 (pocillos 2 y 4) no se amplifica ningún fragmento. Sorprendentemente, utilizando en la reacción de PCR los cebadores ILV3D y ILV3R, se amplifica, sea con ADN genómico procedente de la cepa S1 (pocillo7), o bien sea con ADN de la cepa S1-PI6 (pocillo 6), solamente un fragmento de 1.212 pb correspondiente al principio del gen *IVL5* y a su promotor. Probablemente, en la reacción de PCR se favorece la amplificación del fragmento más pequeño, no amplificándose el fragmento conteniendo $F_{\text{GEPO-ILV5}}$. Se comprobó que el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ se había insertado correctamente secuenciando los fragmentos amplificados en los pocillos 1 y 3.

3.4. Eliminación del casete de selección en la cepa S1-PI6

En la Figura 24 se resume el proceso de integración del fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ en el ADN genómico de la cepa S1 y la posterior eliminación del casete de selección. El promotor del gen *ILV5*, situado en el extremo 5' del fragmento, y el gen *ILV5*, situado en el extremo 3', son los responsables de dirigir la correcta integración por recombinación homóloga de $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ en el genoma de S1.

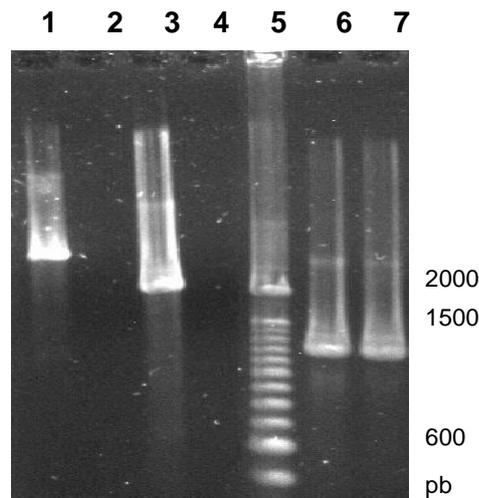


Figura 23. Comprobación mediante PCR de la correcta integración de $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ en la cepa S1-PI6. El patrón de peso molecular utilizado ha sido el TrackIt™ 100 pb (pocillo 5).

El transformante S1-PI6, después de muchas generaciones de crecimiento en un medio sin la presión de selección de la cicloheximida, elimina el casete de selección mediante recombinación homóloga. Se analizaron 1.500 colonias aprox. para su resistencia a cerulenina y se seleccionó sólo 1 colonia que no presentaba resistencia a cerulenina (S1-PI6PO), y mediante PCR se comprobó que, en efecto, había perdido el casete de selección (ver Figura 25). A partir del ADN genómico de la cepa S1-PI6 y utilizando como parejas de cebadores, bien PPGK1D e ILV1R, o bien YAP3D e ILV2R, se amplifica por PCR, bien un fragmento de 2.778 pb (pocillo 1), o bien un fragmento de 2.292 pb (pocillo 2) respectivamente. Utilizando las mismas parejas de cebadores, a partir del ADN genómico de la cepa S1-PI6PO, se amplifica el mismo fragmento de 2.778 pb (pocillo 3), mientras que no se obtiene ningún producto de amplificación utilizando como cebadores YAP3D e ILV2R (pocillo 4). A partir del ADN genómico de la cepa S1, y utilizando como cebadores PPGK1D e ILV1R, no se obtiene ningún producto de amplificación (pocillo 6).

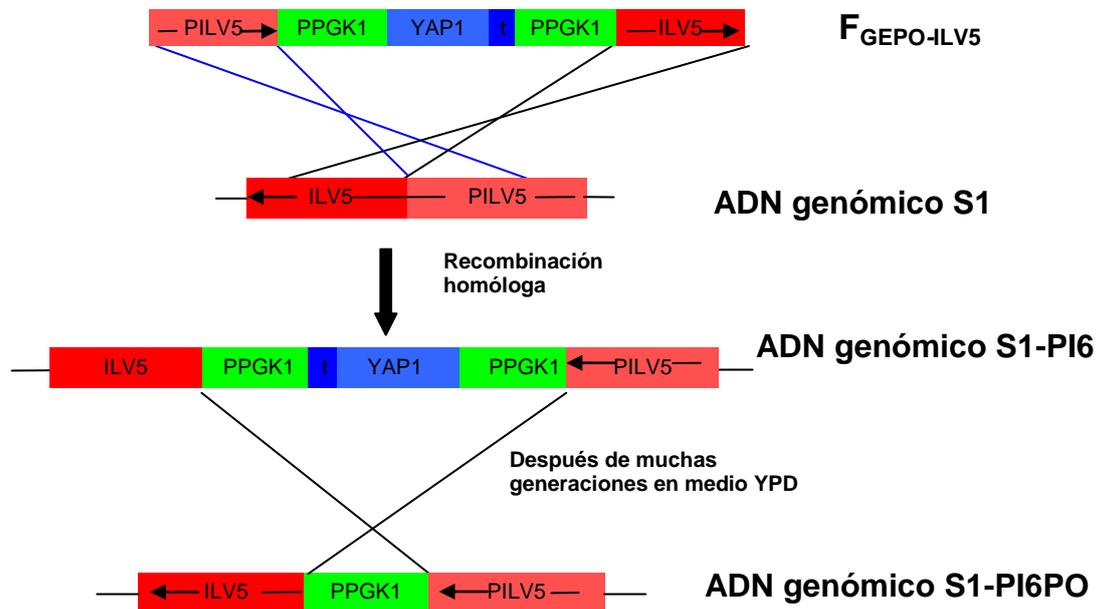


Figura 24. Diagrama del proceso de integración de $F_{GEPO-ILV5}$ en el ADN genómico de la cepa S1 y de la posterior eliminación del casete de selección.

A diferencia de la cepa 1926-12T, la eliminación del casete de selección en la cepa S1-PI6 es importante bien para aumentar la aceptabilidad del consumidor hacia una cerveza producida con este tipo de levadura, bien para reutilizar el mismo casete de selección para la introducción en la cepa mejorada de otras características de interés industrial.

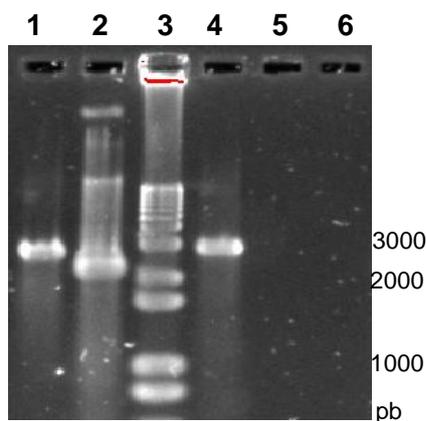


Figura 25. Comprobación de la eliminación del casete de selección en la cepa S1-PI6PO El patrón de peso molecular utilizado ha sido el TrackIt™ 1 Kbp plus DNA Ladder (pocillo 3).

3.5. Secuenciación de los transformantes obtenidos con el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$

Se determinó la secuencia de 4 transformantes de W303-1A con que habían integrado el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$. Entre los transformantes analizados, el denominado como WPI8 no presenta ningún cambio en la secuencia del fragmento integrado en el cromosoma con respecto a la secuencia original del fragmento construido (ver Tabla 17).

Transformantes	Cambios en ILV5					Cambios en PPGK1		
	Posición	Nueva base	Base original	Nuevo aa	Aa original	Posición	Nueva base	Base original
WPI2	204	G	A	Ser	Arg	/	/	/
WPI7	/	/	/	/	/	-379	G	A
WPI8	/	/	/	/	/	/	/	/
WPI10	/	/	/	/	/	-577	T	C
						-568	C	T
S1-PI6	/	/	/	/	/	/	/	/

Tabla 17. Transformantes secuenciados y cambios en la secuencia integrada tras la transformación de las cepas W303-1A y S1 con el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$. En el encuadre rojo se indica el transformante de W303-1A que no presenta cambios en la secuencia integrada. En el sombreado rosa se presentan los datos correspondientes al único transformante analizado al integrar el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$ en la cepa S1 (S1-PI6), que no presenta ningún cambio en la secuencia integrada.

A partir del ADN genómico de WPI8, se amplificó por PCR el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$, que se utilizó para transformar la cepa S1. Entre todos los transformantes obtenidos se analizó la secuencia de uno solo, denominado S1-PI6. Como era de esperar, se observó que la secuencia del fragmento integrado en el cromosoma era exactamente igual en WPI8 y S1-PI6 y que por lo tanto no había ningún cambio con respecto a la secuencia de S1.

3.6. La sobreexpresión del gen ILV5 en la cepa S1-PI6 disminuye la producción de diacetilo

Como se puede observar en la Figura 26, y bajo las condiciones de un proceso de microfermentación en el laboratorio (ver Materiales y Métodos), la cepa evolucionada

S1-PI6 consigue disminuir en más de 10 días, con respecto a la cepa original S1, el tiempo necesario para que la concentración de diacetilo esté al nivel que la práctica industrial considera aceptable para dar por finalizado el proceso de “lagering”. Con solo 10 días de “lagering” la concentración de diacetilo en la cerveza fermentada por la cepa S1-PI6 es igual a 0,086 ppm, mientras que la concentración del diacetilo en la cerveza fermentada por la cepa silvestre baja de las 0,1 ppm sólo en el día 20 de “lagering”. Además, con la cepa S1-PI6 se consigue disminuir la producción de diacetilo de un 34,0% con respecto a la cepa silvestre considerando el punto de máxima concentración alcanzada durante la fermentación para cada cepa, mientras que al final del período de fermentación la diferencia en la concentración de diacetilo es del 47,4%.

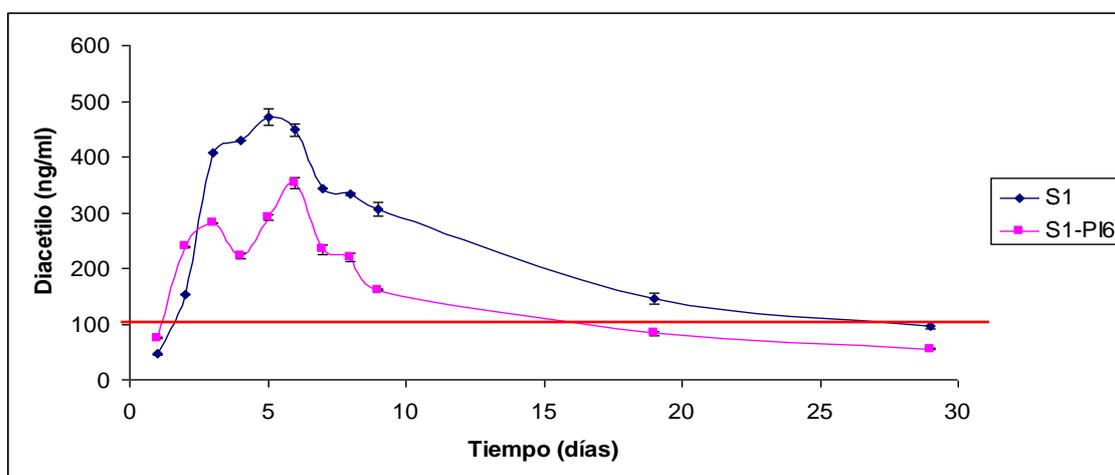


Figura 26. Evolución de la concentración de diacetilo durante la fermentación y el período de guarda de un mosto industrial inoculado con las cepas S1 y S1-PI6. La línea roja indica el umbral de concentración de diacetilo del que hay que descender para dar por finalizado el proceso de maduración.

El consumo de los azúcares (ver Figura 27A) así como la producción de alcohol (ver Figura 27C) durante el proceso de fermentación no resultan alterados tras la reordenación cromosómica realizada. Por otro lado, se nota un pequeño decremento del pH del mosto fermentado con la cepa S1-PI6 con respecto al fermentado con la cepa S1 (ver Figura 27B). El gen *ILV5* contribuye al mantenimiento del ADN mitocondrial y su sobreexpresión puede causar una variación en la producción de compuestos aromáticos y ácidos orgánicos. Por lo tanto, es posible que esa pequeña diferencia de pH sea debida a una variación en la producción de ácidos de la cepa S1-PI6 con respecto a la cepa silvestre.

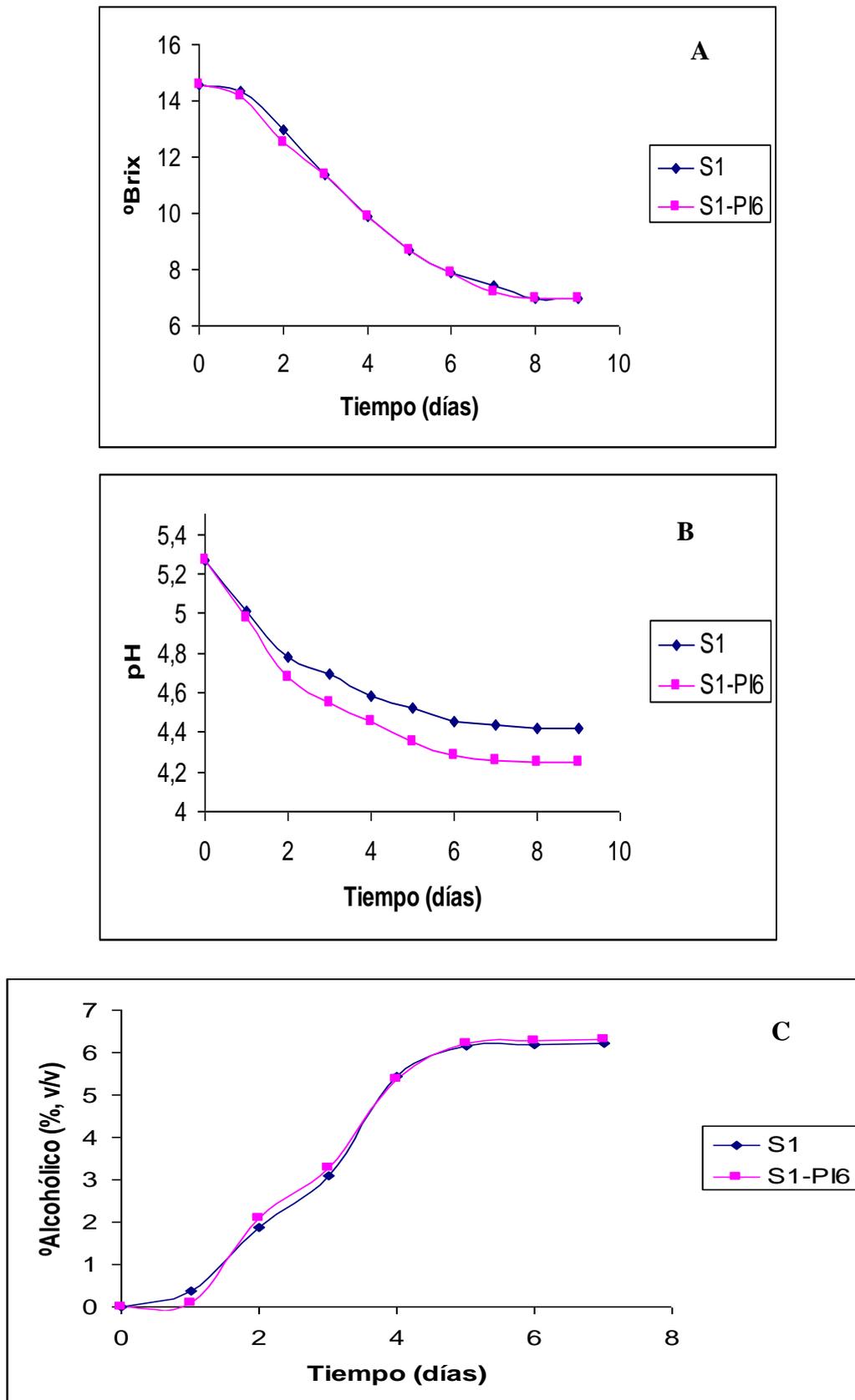


Figura 27. Evolución del °Bx (A), pH (B), y grado alcohólico (C) durante la fermentación de un mosto industrial inoculado con las cepas S1 y S1-PI6.

4. Desarrollo de una levadura vínica con mayor capacidad de crecimiento a bajas temperaturas

Se aplicó la metodología de evolución genómica por diseño molecular, para intentar mejorar el crecimiento a baja temperatura de la cepa M69, una levadura industrial utilizada para la producción de vino blanco. En este caso se ha intentado obtener el fenotipo buscado mediante inactivación del gen *INP51*. El gen *INP51* codifica una enzima inositol polifosfato 5-fosfatasa, implicada en la homeostasis del inositol 4, 5-difosfato, cuya pérdida de función provoca la acumulación de dicho metabolito y, según se ha descrito en la literatura, un aumento de la tolerancia al frío (Stolz *et al.*, 1998). Por tanto, se diseñó una reordenación génica de forma que condujese a la inactivación del gen *INP51* por inserción, en mitad de su pauta de lectura abierta, del casete de selección obtenido con anterioridad. Además, en posición 3' con respecto al casete de selección, se insertó una secuencia conteniendo el promotor del gen *INP51*. De tal forma, cuando el fragmento se inserta por recombinación homóloga en el ADN genómico de la cepa a evolucionar, se obtiene la repetición del promotor del gen *INP51*, permitiendo la pérdida del casete de selección después del crecimiento de la cepa evolucionada en un medio no selectivo.

4.1. Secuenciación de las zonas de interés en el genoma de la cepa M69

El primer paso en el proceso de construcción del fragmento de integración fue el establecimiento de la secuencia del gen *INP51* y de su promotor en el genoma de la cepa a evolucionar. Con tal fin se amplificó por PCR y se secuenció un fragmento genómico conteniendo el gen *INP51* y su promotor. En la reacción de amplificación por PCR se utilizó un conjunto de cebadores diseñados a partir de las secuencias que se encuentran en la base de datos del genoma de *S. cerevisiae*. Del análisis de la secuencia, se encontraron 2 variantes que difieren en la base de coordenada 353.092, donde puede leerse alternativamente una Citosina o una Timina según la secuencia del alelo considerado (en la secuencia publicada en la base de datos de SGD hay una Timina).

4.2. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEP0-}INP51}$

A continuación se describen las reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento denominado $F_{\text{GEP0-}INP51}$ que, posteriormente a su introducción cromosómica mediante recombinación homóloga, inactivará al gen *INP51* por inserción, en mitad de su pauta de lectura abierta, del casete de selección construido con anterioridad. En la Figura 28 se ilustra el diagrama de las reacciones de PCR utilizadas.

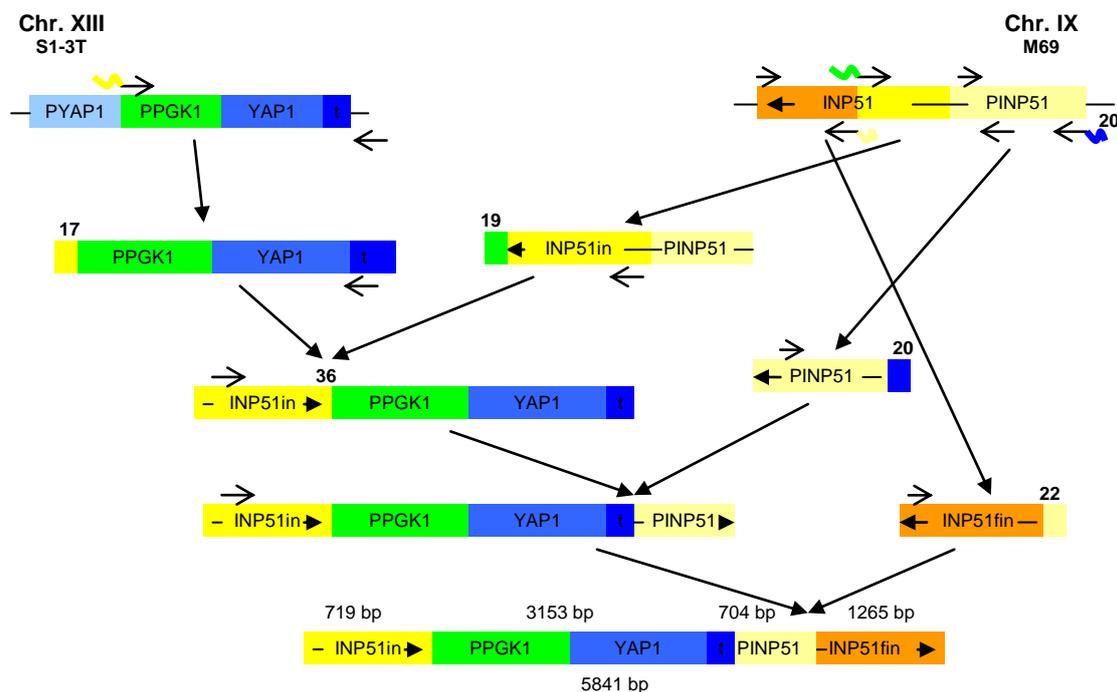


Figura 28. Diagrama de las reacciones de PCR llevadas a cabo para la obtención del fragmento denominado $F_{\text{GEP0-}INP51}$ que, una vez insertado en el ADN genómico de la cepa M69, permite la inactivación del gen *INP51* y, a la vez, la posterior eliminación del casete de selección.

a) Amplificación por PCR del casete de selección

A partir del ADN genómico de la cepa S1-3T, se amplificó por PCR un fragmento de 3.688 pb conteniendo el casete de selección y una zona de solapamiento en 5' con una secuencia interna al gen *INP51* de la cepa M69.

Como cebador directo híbrido se utilizó PGKINP1D, que consta de una secuencia de 17 nucleótidos homóloga a la secuencia del gen *INP51* situada 795 pb después del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen y seguida por una secuencia de 25

nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *PGK1* situada 769 pb antes del ATG de inicio del gen *YAPI*. Como cebador reverso se utilizó YAPR3.

b) Amplificación por PCR de la parte inicial del gen *INP51*

A partir del ADN genómico de la cepa M69, se amplificó por PCR un fragmento conteniendo la parte inicial de la pauta de lectura abierta del gen *INP51*. El cebador directo que se ha utilizado (PINP1D) contiene una secuencia de 21 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *INP51* situada 985 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen. El cebador reverso (INPPGK1R) consta de una secuencia de 19 nucleótidos complementaria a la secuencia del promotor del gen *PGK1* y situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por una secuencia de 26 nucleótidos complementaria a la región de la pauta de lectura abierta del gen *INP51* situada 812 pb después del ATG de inicio del mismo gen. El fragmento resultante de la amplificación contiene una secuencia de 1.816 pb conteniendo los primeros 812 nucleótidos del gen *INP51* de la cepa M69 con una zona de 19 pb en 3' que solapa con el extremo 5' del casete de selección.

c) Amplificación por PCR del promotor del gen *INP51*

El cebador híbrido directo que se ha utilizado (PINPYAPTD) contiene una secuencia de 20 nucleótidos homóloga a la región terminadora del gen *YAPI* de la cepa S1-3T, situada 412 pb después del fin de la pauta de lectura abierta del mismo gen, seguida por una secuencia de 22 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *INP51* situada 983 pb antes del ATG de inicio del mismo gen. Como cebador reverso se ha utilizado PINP1R que consta de una secuencia de 26 nucleótidos complementaria a la región promotora del gen *INP51* y situada 121 pb antes del ATG de inicio del mismo gen. El fragmento resultante de la amplificación contiene una secuencia de 883 pb conteniendo el promotor del gen *INP51* de la cepa M69 con una zona de solapamiento en 5' con el terminador del gen *YAPI* de la cepa S1-3T.

d) Amplificación por PCR de la parte final del gen *INP51*

A partir del ADN genómico de la cepa M69, se amplificó por PCR un fragmento conteniendo la parte final de la pauta de lectura abierta del gen *INP51*. El cebador híbrido directo que se ha utilizado (INPBD) contiene una secuencia de 22 nucleótidos homóloga a la región promotora del gen *INP51* situada 279 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta del mismo gen, seguida por una secuencia de 23

nucleótidos homóloga a la pauta de lectura abierta del gen *INP51* y situada 1.366 pb después del ATG de inicio del mismo gen. El cebador reverso (INP1R) consta de una secuencia de 21 nucleótidos complementaria a la secuencia del gen *INP51* situada 2.652 pb después del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen. La longitud total del fragmento resultante es de 1.309 pb. Dicho fragmento contiene una secuencia de 1.287 pb de la parte final del gen *INP51* de la cepa M69, con una zona de 22 pb en 5' que solapa con el extremo 3' del fragmento del promotor del gen *INP51* amplificado en el apartado (c).

e) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (a) y (b)

Como cebador directo interno se utilizó PINP2D, que consta de una secuencia de 21 nucleótidos homóloga al gen *INP51* y situada 57 pb después del ATG de inicio del mismo gen, mientras que como cebador reverso interno se utilizó YAPTERR. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 36 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 36 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento conteniendo una parte del gen *INP51* de 756 pb situada entre las bases 57 y 812 del mismo gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen fusionada con la secuencia de 2.384 pb de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* y su terminador. La longitud total del fragmento es de 3.909 pb.

f) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (e) y (c)

Como cebador directo interno se utilizó PINP3D, que consta de una secuencia de 22 nucleótidos homóloga al gen *INP51* y situada 84 pb después del ATG de inicio del mismo gen, mientras que como cebador reverso interno se utilizó PINP2R que consta de una secuencia de 23 nucleótidos complementaria a la región promotora del gen *INP51* situada 280 pb antes del ATG de inicio del mismo gen. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 20 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 20 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento

conteniendo una región de la pauta de lectura abierta del gen *INP51* de 729 pb situada entre las bases 84 y 812 de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen fusionada con la secuencia de 2.384 pb de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* y su terminador, seguida por la secuencia de la región promotora de *INP51* de 704 pb situada entre las bases 280 y 983 antes del ATG de inicio del mismo gen. La longitud total del fragmento es de 4.686 pb.

g) Fusión por PCR de los fragmentos obtenidos en los pasos (f) y (d)

Como cebador directo interno se utilizó PINP4D, que consta de una secuencia de 22 nucleótidos homóloga al gen *INP51* y situada 94 pb después del ATG de inicio del mismo gen, mientras que como cebador reverso interno se utilizó INP2RB que consta de una secuencia de 23 nucleótidos complementaria a la pauta de lectura abierta del gen *INP51* situada 2.630 pb después del ATG de inicio del mismo gen. Utilizando estos cebadores y partiendo de los dos fragmentos a fusionar (que presentan una zona de 22 nucleótidos en el extremo 3' de la cadena de Watson de uno de los fragmentos que es complementaria con otra zona de 22 nucleótidos del extremo 3' de la cadena de Crick del otro fragmento), se obtendrá tras la reacción de PCR un nuevo fragmento conteniendo una parte de la región inicial del gen *INP51* de 719 pb situada entre las bases 94 y 812 de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 769 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con la secuencia de 2.384 pb de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* y su terminador, seguida por la secuencia de la región promotora de *INP51* de 704 pb situada entre las bases 280 y 983 antes del ATG de inicio del mismo gen, fusionada con la parte final del gen *INP51* de 1.265 pb situada entre las bases 1.366 y 2.630. La longitud total del fragmento $F_{\text{GEP0-}INP51}$ es de 5.841 pb.

Los resultados de todas las reacciones de amplificación y de fusión efectuadas hasta obtener el fragmento de integración $F_{\text{GEP0-}INP51}$ se presentan en la Figura 29.

4.3. Transformación de W303-1A y M69 con $F_{\text{GEP0-}INP51}$

El fragmento $F_{\text{GEP0-}INP51}$ se utilizó para la transformación de las cepas W303-1A y M69 siguiendo el procedimiento descrito por Gietz y Woods. En el caso de la cepa W303-1A

se utilizó 1 μg de fragmento, mientras que en la cepa M69, se utilizaron aproximadamente 10 μg de fragmento $F_{\text{GEPO-IMP51}}$, obtenido a partir del ADN genómico del transformante WDIMP5 (ver Tabla 19).

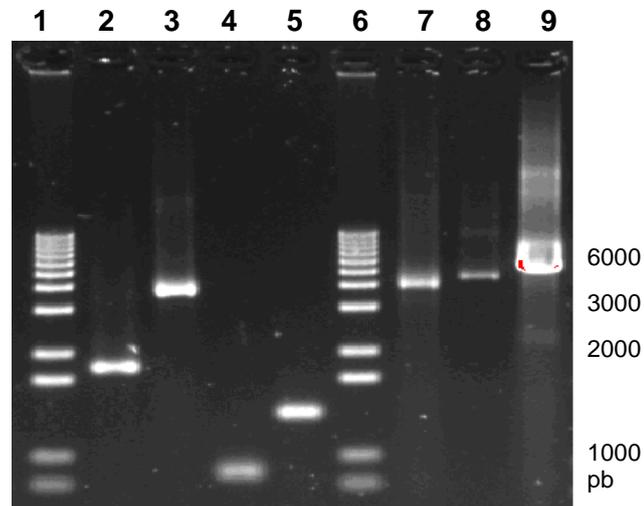


Figura 29. Electroforesis en gel de agarosa al 1% de los productos de PCR obtenidos a lo largo de la construcción de $F_{\text{GEPO-IMP51}}$: (b) (pocillo 2); (a) (pocillo 3); (c) (pocillo 4); (d) (pocillo 5); (e) (pocillo 7); (f) (pocillo 8); (g) (pocillo 9). El patrón de peso molecular utilizado ha sido el TrackIt™ 1 Kbp plus DNA Ladder (pocillos 1 y 6).

En la Tabla 18 se resumen las frecuencias de transformación obtenidas con las cepas W303-1A y M69.

Cepas	Frecuencia de transformación	
	pYPGE15+YAP1	$F_{\text{GEPO-IMP51}}$
W303-1A	$1,4 \cdot 10^4$	23,1
M69	$4,7 \cdot 10^2$	1,3

Tabla 18. Frecuencias de transformación (número de colonias/ μg de ADN) de las cepas W303-1A y M69 con el plásmido pYPGE15+YAP1 y el fragmento $F_{\text{GEPO-IMP51}}$. La transformación con el plásmido pYPGE15+YAP1 se utiliza como control de la competencia alcanzada en cada transformación.

Mediante PCR se comprobó la correcta integración de los fragmentos introducidos en el ADN genómico de algunos transformantes de las cepas W303-1A y M69 (ver Figura 30). En la Figura 30A, los fragmentos a 2.516 y 5.860 pb (pocillo 1, amplificados

mediante los cebadores PINP4D e INP2RB), confirman que el transformante M69DI1 ha integrado el fragmento $F_{\text{GEPO-}INP51}$ en uno de los dos alelos del gen *INP51*. Las cepas que no han sido transformadas, sólo amplifican la banda a 2.516 pb (pocillos 2, 3, 4 y 5).

En la Figura 30B, el fragmento a 5.860 pb (pocillo 1, obtenido mediante los cebadores PINP4D y INP2RB) confirma que el transformante M69DI6 ha integrado el fragmento $F_{\text{GEPO-}INP51}$ en el ADN genómico de M69. La ausencia de la banda a 2.516 pb revela que el fragmento se ha integrado en los dos alelos del gen *INP51*. A partir de ADN genómico de M69 y con las mismas condiciones de PCR se amplifica un fragmento de 2.516 pb (pocillo 2).

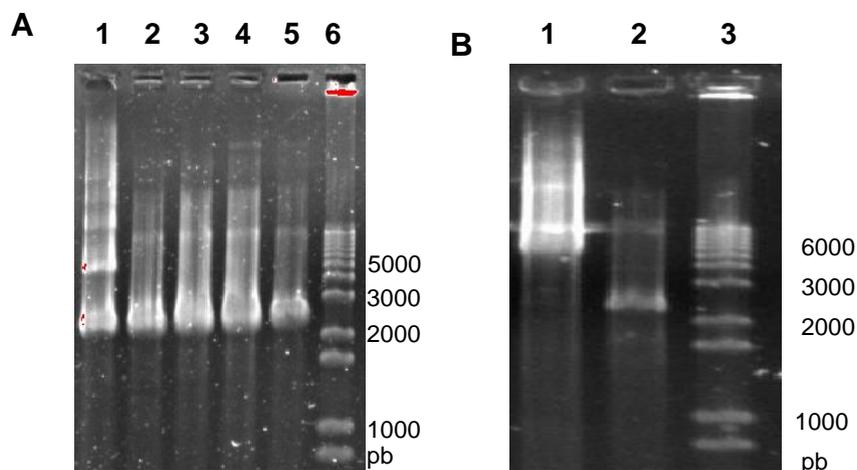


Figura 30. Comprobación mediante PCR de la correcta integración del fragmento $F_{\text{GEPO-}INP51}$ en la cepa M69. A- El fragmento $F_{\text{GEPO-}INP51}$ se ha integrado sólo en un alelo del gen *INP51* (transformante M69DI1). B- El fragmento $F_{\text{GEPO-}INP51}$ se ha integrado en los dos alelos del gen *INP51* (transformante M69DI6). En las dos figuras el patrón de peso molecular utilizado ha sido el TrackIt™ 1 Kbp plus DNA Ladder.

4.4. **Secuenciación de los transformantes obtenidos con el fragmento $F_{\text{GEPO-}INP51}$**

Se determinó la secuencia de 4 transformantes de W303-1A que habían integrado el fragmento $F_{\text{GEPO-}INP51}$. Entre los transformantes analizados, el denominado WDINP5 no presenta ningún cambio en la secuencia del fragmento integrado en el cromosoma con respecto a la secuencia original del fragmento construido (ver Tabla 19).

A partir del ADN genómico de WDINP5, se amplificó por PCR el fragmento $F_{\text{GEP0-}}_{\text{INP51}}$, que se utilizó para transformar la cepa M69. En esta transformación se analizó la secuencia de un solo transformante denominado M69-DI1.

Transformantes	Cambios en <i>INP51</i>					Cambios en <i>PINP51</i>		
	Posición	Nueva base	Base original	Nuevo aa	Aa original	Posición	Nueva base	Base original
WDINP1	/	/	/	/	/	-445 -446	/ /	A A
WDINP3	/	/	/	/	/	-445 -814 -929	/ T C	A C T
WDINP5	/	/	/	/	/	/	/	/
WDINP6	/	/	/	/	/	-386 -621 -766	T C C	C T T
M69-DI1	/	/	/	/	/	/	/	/

Tabla 19. Transformantes secuenciados y cambios en la secuencia integrada tras la transformación de las cepas W303-1A y M69 con el fragmento $F_{\text{GEP0-}}_{\text{INP51}}$. En el encuadre rojo se indica el transformante de W303-1A sin cambios en la secuencia integrada. En el sombreado rosa se indica el transformante M69-DI1 que no presenta ningún cambio en la secuencia integrada.

Como era de esperar, se observó que la secuencia del fragmento integrado en el cromosoma era exactamente igual en las cepas WDINP5 y M69DI1 y que, por lo tanto, no se han introducidos cambios con respecto a las secuencias originales y presentes en la cepa M69.

4.5. La inactivación de *INP51* no incrementa la resistencia al frío en cepas industriales

Tras el análisis genético de los transformantes, se procedió a comprobar su fenotipo, en relación con la capacidad de crecimiento a bajas temperaturas, mediante un bioensayo según ya se describió en el apartado de Materiales y Métodos. Como se puede observar en la Figura 32, la inactivación del gen *INP51* no aumenta la resistencia al frío de la cepa M69 en ninguno de los medios de cultivos ensayados. En el caso de la cepa W303-1A, sí se observa una mejora en el crecimiento a bajas temperaturas de los

transformantes con respecto a la cepa salvaje, sin embargo dicha diferencia desaparece cuando se añade al medio de cultivo el aminoácido triptófano (ver Figura 31).

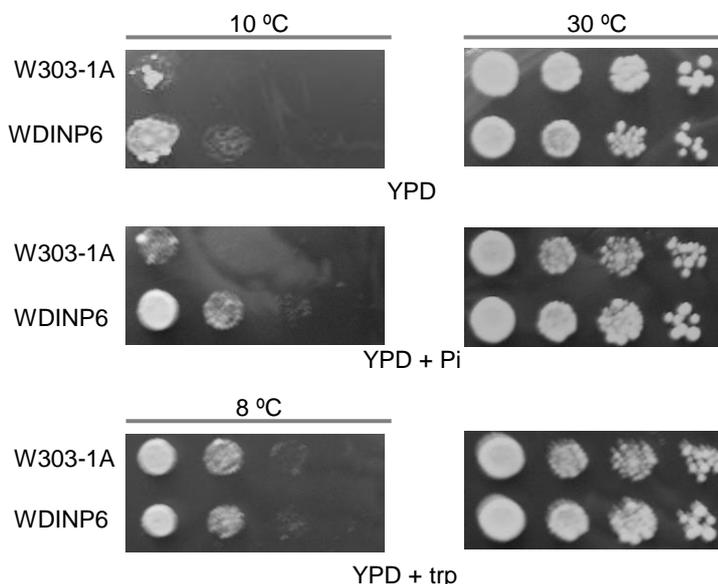


Figura 31. Comparación del crecimiento a 30 °C (condiciones control) y a 8 °C ó 10 °C entre la cepa W303-1A y WDINP6. Partiendo aproximadamente de 10⁷ células/ml de cada uno, se realizaron diluciones seriadas de 10⁻¹ a 10⁻⁴ (de izquierda a derecha) que fueron sembradas sobre YPD, YPD con fosfato 10 mM e YPD con exceso de triptófano (2 mg/ml). Las incubaciones a 8 °C y 10 °C se llevaron a cabo durante 10 días. WDINP6 crece mejor a baja temperatura en medio YPD y YPD+Pi, mientras que en YPD+ trp no hay diferencia de crecimiento.

El mecanismo por el cual la inactivación del gen *INP51* en cepas de laboratorio confiere mayor capacidad de crecimiento a bajas temperaturas se desconoce. Lo que se conoce es que el mutante *inp51* presenta una mayor velocidad de incorporación de triptófano que la cepa parental. Por lo tanto, es posible que las cepas de levaduras de laboratorio, auxótrofas para el triptófano, resulten beneficiadas de esta mayor velocidad de incorporación. Por otro lado, en las cepas de levaduras industriales, generalmente protótrofas, la incorporación de triptófano no resulta ser un factor limitante para su crecimiento a bajas temperaturas (González, 2009).

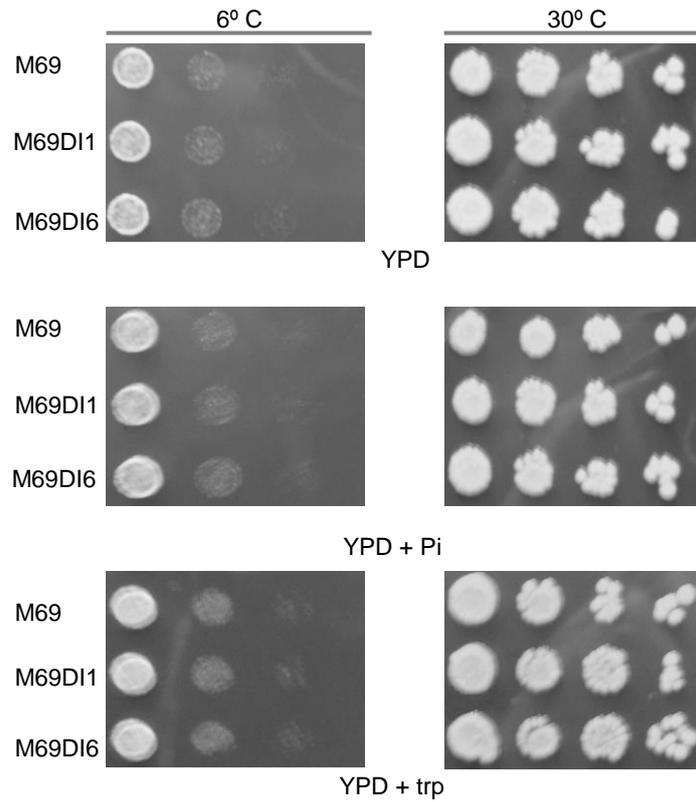


Figura 32. Comparación del crecimiento a 30 °C (condiciones control) y 6 °C entre las cepas M69, M69DI1 y M69DI6. Partiendo aproximadamente de 10^7 células/ml de cada uno, se realizaron diluciones seriadas de 10^{-1} a 10^{-4} (de izquierda a derecha) que fueron sembradas sobre YPD, YPD con fosfato 10 mM e YPD con exceso de triptófano (2 mg/ml). La incubación a 6 °C se llevó a cabo durante 15 días.

DISCUSIÓN

En este trabajo se ha desarrollado y comprobado la validez del concepto de “Evolución Genómica por Diseño Molecular”, así como su aplicación en el desarrollo de levaduras industriales con características de interés para las empresas agroalimentarias. La técnica puesta a punto en este trabajo, y luego aplicada para la obtención de varias cepas, tanto de laboratorio como industriales, con nuevas características, permite realizar “*a priori*” un diseño molecular para seleccionar una reorganización del genoma nuclear de una levadura que corresponda a una translocación cromosómica recíproca concreta. Dicho evento podría suceder de manera natural si bien en un plazo de tiempo indeterminado, con una probabilidad extremadamente baja y, en ausencia de presión alguna de selección, se perdería o quedaría diluido en el conjunto de la población celular. Mediante la metodología desarrollada, se puede obtener y rescatar la reordenación genómica deseada de manera relativamente rápida y de forma muy específica. Además, el resultado sobre el genoma de la cepa evolucionada resulta lo que en inglés se denomina “seamless”, o lo que es lo mismo, sin costuras, lo que significa que al no dejar ningún nucleótido o secuencia de nucleótidos que no estuviera ya presente en el genoma de la propia cepa de levadura, no deja ninguna huella detectable (a no ser que se conozca exactamente qué reorganización cromosómica se diseñó) y hace que la nueva cepa de levadura sea prácticamente indistinguible de la parental excepto por el nuevo fenotipo que presente o por la característica que se haya modificado.

Esta nueva metodología se diferencia de las tradicionales denominadas como “self-cloning” en cuanto que aprovecha la capacidad de recombinación homóloga de las levaduras del género *Saccharomyces* y, además, no sólo incorpora material genético procedente de la misma especie, sino que dicho material genético proviene de la propia cepa de levadura a evolucionar. Además, se evita el empleo de vectores de clonación y de genes de resistencia heterólogos, homeólogos o conteniendo mutaciones, obteniendo un doble efecto positivo: 1- la ausencia de cambios en la secuencia introducida por efecto de las manipulaciones propias de las técnicas de clonaje, tales como la introducción de lugares de corte para enzimas de restricción; 2- se evita el paso del material genético por otros sistemas celulares, como por ejemplo *E. coli*, y la necesidad de obtener mutantes de las cepas industriales o de los genes a utilizar como marcadores de selección.

1. Construcción del cassette de selección y de los fragmentos de integración

El primer objetivo de esta Tesis doctoral, ha sido la construcción de un cassette de selección mediante la fusión de elementos genéticos procedentes de la misma cepa de levadura a evolucionar. Para conseguir este objetivo respetando las estrictas condiciones contenidas en el concepto de “Evolución Genómica Por Diseño Molecular”, se ha utilizado el método que se denomina en inglés “Gene Splicing by Overlap Extension” (Horton *et al.*, 1989). Este método se basa en la fusión por PCR de 2 o más fragmentos de ADN obtenidos individualmente mediante reacciones de amplificación por PCR. Para conseguir la fusión es necesario que los fragmentos de ADN contengan una zona de solapamiento entre ellos. Por consiguiente, se hace indispensable en las reacciones de amplificación por PCR, el uso de cebadores híbridos, que se caracterizan por tener en el extremo 5' una secuencia de, por lo menos, 15 bases complementaria al extremo 3' del fragmento a fusionar. La aplicación de este método de fusión de genes ha sido delimitada inicialmente al estudio de cepas de laboratorio, sobre todo al análisis funcional de genes. Baudin *et al.* (1993) fueron entre los primeros en desarrollar una técnica que permitiera la disrupción génica en cepas de levaduras de laboratorio sin el uso de enzimas de restricción, ADN ligasa y vectores de clonación. Mediante una sola reacción de amplificación por PCR y utilizando cebadores híbridos, amplificaron un marcador de selección con zonas de solapamiento con el gen a eliminar de 35-51 nucleótidos en sus extremos con el gen a eliminar. Esta metodología es válida sólo para cepas de levadura de laboratorio, ya que las cepas industriales necesitan una zona de solapamiento más grande para permitir la integración de la construcción en el ADN genómico. Para ello, Kuwayama *et al.* (2002) desarrollaron una técnica basada en reacciones de amplificación y fusión por PCR que permite la realización de una construcción para la disrupción génica con grandes zonas de solapamiento. En primer lugar amplifican mediante 3 reacciones independientes de PCR el casete de selección y las regiones 5' y 3' del gen diana. En estas reacciones de amplificación utilizan cebadores híbridos de forma que los tres fragmentos amplificados contengan zonas de solapamiento entre ellos. A continuación fusionan, mediante una reacción de PCR, los fragmentos obtenidos en el paso anterior, obteniendo el fragmento final que permite, mediante integración por recombinación homóloga, la disrupción génica. Recientemente esta metodología está siendo utilizada para integrar fragmentos genéticos en cualquier

zona predeterminada de un vector de clonación (Bryksin y Matsumura, 2010; Ulrich *et al.*, 2012), o de una cepa industrial por recombinación homóloga. Este método se diferencia de las clásicas técnicas de fusión de genes que implican la digestión de secuencias genéticas mediante enzimas de restricción y la posterior unión mediante reacciones de ligación, ya que permite que dos o más fragmentos de ADN puedan ser unidos de forma precisa de modo que ningún nucleótido no deseado sea añadido en la unión entre los fragmentos. Este es un aspecto muy importante, ya que los nucleótidos no deseados introducidos durante la modificación genética, pueden cambiar los espacios entre las secuencias de ADN e introducir aminoácidos extras en la unión de las secuencias que pueden conferir efectos no deseados en la estructura y función de la proteína resultante interfiriendo en la correcta expresión genética. De hecho hay mucho interés por parte de varios grupos de investigación en el desarrollo de métodos eficaces que permitan la introducción “sin costuras” de secuencias genéticas en el organismo huésped, principalmente en plásmidos (Lu, 2005; Ulrich *et al.*, 2012; Tee y Wang, 2013).

Chang *et al.* (2012) desarrollaron una nueva técnica, denominada en inglés “Promoter-based Gene Assembly and Simultaneous Overexpression (PGASO)” que permite la inserción, en un orden preestablecido, de varios casetes génicos en el genoma de una determinada cepa por recombinación homóloga. Cada casete génico, construido mediante reacciones de fusión por PCR y empleando cebadores híbridos, contiene 2 partes: una secuencia genética fusionada en el extremo 5' con una secuencia promotora, y una secuencia situada en el extremo 3' del casete génico, que es idéntica al extremo 5' del casete adyacente. Además, el extremo 5' del primer casete génico y el extremo 3' del último casete contienen una zona homóloga a un determinado sitio de la cepa huésped, para favorecer la inserción por recombinación homóloga en un determinado locus genético. Cuando los casetes génicos son introducidos en las células, se ordenan aprovechando las zonas de solapamiento que existen entre ellos y se insertan por recombinación homóloga en el genoma de la cepa guiados por las zonas homólogas del primer y del último casete génico.

A la hora de establecer cómo realizar los fragmentos de integración para obtener la modificación genética deseada, se han evaluado 2 estrategias diferentes: la integración por recombinación homóloga, o “ends-in”, y la integración por recombinación homóloga, o “ends-out”. Estas 2 estrategias se han utilizando ampliamente en la técnica denominada “gene targeting”, que se basa en la modificación de una determinada

secuencia genética mediante recombinación homóloga entre un fragmento de ADN exógeno y el gen diana homólogo en la cepa a modificar. El uso de una metodología o de la otra, depende del producto que se desee obtener. Los términos “ends-in” o “ends-out”, se refieren a la orientación del fragmento de doble cadena del ADN exógeno que se utiliza para estimular la recombinación.

En el caso del “ends-in”, la rotura de la doble cadena en las moléculas de ADN exógeno se produce en una región contigua de homología con ambos extremos del fragmento a integrar. La recombinación entre la molécula de ADN exógena y la secuencia diana genera una duplicación del locus diana (ver Figura 33). Por lo tanto, en ausencia de condiciones selectivas, se puede perder la secuencia introducida por recombinación homóloga y volver a la situación inicial antes de la modificación genética.

En el caso del “ends-out”, una secuencia genética interrumpe una región lineal de homología. La recombinación entre la molécula de ADN exógena y la secuencia diana provoca la inserción estable en el gen diana del fragmento a insertar.

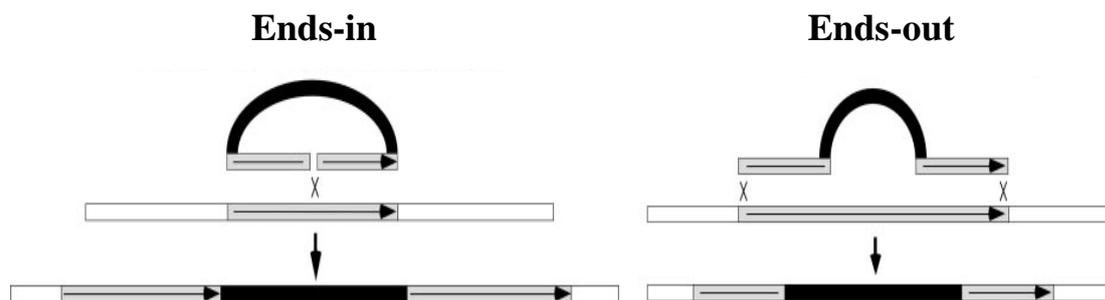


Figura 33. Diagrama que representa las 2 estrategias de integración por recombinación homóloga mediante la técnica denominada “gene targeting”. Las moléculas de ADN exógeno (en lo alto de la figura) recombinan con el gen diana situado en el cromosoma de la cepa a modificar, dando lugar a diferentes productos de recombinación (abajo en la figura) según el diseño del fragmento a integrar. La región gris representa el ADN diana homólogo mientras que la región negra representa el gen marcador (Gong *et al.*, 2003).

La metodología del “ends-out” es más utilizada en la modificación genética de levaduras, por cuanto proporciona una sencilla ruta para reemplazar o eliminar el locus diana. Varios estudios concuerdan en una mayor eficacia en la modificación de un determinado gen cuando se utiliza la metodología del “ends-in” (Hastings *et al.*, 1997), mientras que otros autores indican que los dos tipos de estrategias son equivalentes (Deng y Capecchi, 1992). En este trabajo se eligió la metodología “ends-out” porque

permite la inserción estable de la secuencia genética deseada, mientras que la tecnología “ends-in” es más apropiada para la eliminación posterior de la secuencia insertada.

A continuación se comenta la metodología usada para la obtención del casete de selección. A partir de la experiencia y de los resultados obtenidos en la construcción de dicho casete, se estableció el diseño de todas las modificaciones genéticas realizadas con posterioridad. El casete de selección construido consta de una secuencia de 575 pb correspondiente a la parte final del promotor del gen *YAPI*, fusionada con un fragmento de 769 pb conteniendo el promotor del gen *PGKI*, seguido por un fragmento de 645 pb correspondiente a la parte inicial del gen *YAPI*. Los 2 fragmentos que flanquean al promotor del gen *PGKI* son los responsables de la correcta integración por recombinación homóloga del casete de selección en el genoma de la cepa S1. Teóricamente, con sólo entre 30 y 50 pb habrían sido suficientes para dirigir la integración por recombinación homóloga (Baudin *et al.*, 1993; Oldenburg *et al.*, 1997; Hawkins *et al.*, 2003), pero se ha preferido aumentar en más de 10 veces las zonas que flanquean el promotor del gen *PGKI* para obtener un significativo aumento de la frecuencia de integración (Wach, 1996; Erdeniz *et al.*, 1997; Puig *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2002), que será de especial importancia a la hora de integrar la construcción en cepas industriales, cuya frecuencia de transformación es muy baja.

Durante las reacciones de PCR para la obtención del fragmento de integración, siempre se obtienen algunas copias del fragmento a amplificar que contienen mutaciones en relación con la secuencia original o molde, como consecuencia de los errores que comete la ADN polimerasa termoestable a lo largo de los distintos ciclos de amplificación. Para minimizar este problema, todas las reacciones de PCR han sido realizadas empleando mezclas enzimáticas de ADN polimerasas termoestables de alta fidelidad que presentan una tasa de introducción de errores mucho más baja que las *Taq* polimerasas convencionales (Barnes, 1992), porque poseen una actividad exonucleasa 3'→5' que corrige los errores producidos durante el acoplamiento entre bases. Sin embargo, en las primeras construcciones del casete de selección, se obtuvieron transformantes de W303-1A con el fragmento $F_{PYAPI-PPGKI-YAPI}$ conteniendo muchos cambios en la secuencia del fragmento integrado en el cromosoma con respecto a la secuencia original del fragmento diseñado, y resultó imposible recuperar un transformante sin ningún cambio.

Se realizaron 4 diferentes diseños para la obtención del fragmento $F_{PYAPI-PPGKI-YAPI}$. El primer diseño constaba de 7 reacciones de PCR, aunque debido a un diseño poco

adecuado de los cebadores, al final se necesitaron 11 reacciones totales más una reacción extra para la producción del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ en suficiente cantidad para la transformación. Se analizó la secuencia de uno de los transformantes obtenidos a partir de la cepa W303-1A, donde se pudo comprobar la presencia de 12 cambios en la secuencia del fragmento integrado con respecto a la secuencia original de $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ (datos no presentados). Nueve de estos cambios estaban localizados en el promotor del gen *PGK1*, esto es debido a que, de acuerdo con el diseño efectuado inicialmente, se amplificó muchas veces la secuencia promotora del gen *PGK1* durante la construcción del fragmento de integración.

Se volvió a repetir el diseño anterior, pero esta vez cambiando algunos de los cebadores de forma que se necesitaron “sólo” 8 reacciones de PCR más una reacción extra para la producción de $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ en suficiente cantidad para la transformación (ver Figura 34). Se analizó la secuencia de 5 transformantes y todos presentaban cambios en número variable con respecto a la secuencia del fragmento original, con un mínimo de 2 y un máximo de 9 cambios. En líneas generales, había más cambios en la secuencia promotora del gen *PGK1* con respecto a la secuencia de la pauta de lectura abierta del gen *YAP1* y no se recuperó ningún transformante sin cambios en este gen.

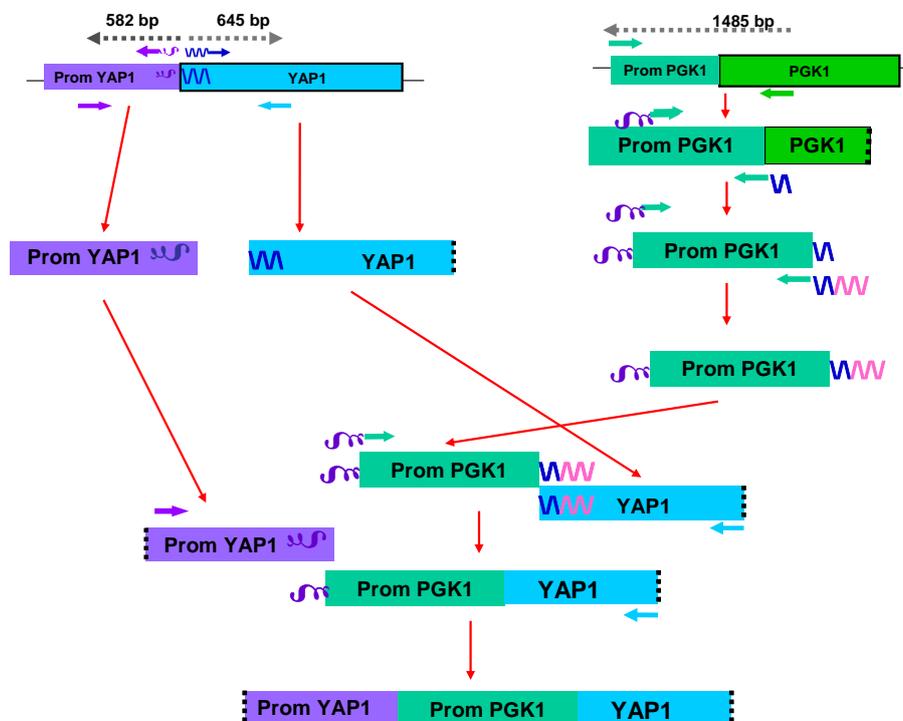


Figura 34. Diagrama de las reacciones de PCR usadas para la obtención del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$ (segundo diseño).

El tercer diseño se diferenciaba del anterior sólo en la amplificación del promotor del gen *YAPI*. En este caso se amplificó un fragmento de 606 pb conteniendo parte del promotor del gen *YAPI* situado 1.120 pb antes del ATG de inicio de dicho gen. El fragmento resultante de esta construcción constaba por lo tanto, de: parte de la región promotora del gen *YAPI* de 606 pb situada 1.120 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, seguida por la secuencia de la región promotora del gen *PGKI* situada 767 pb antes del ATG de inicio de la pauta de lectura abierta de dicho gen, fusionada con la secuencia de los primeros 645 nucleótidos de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI*. La longitud del fragmento final era de 2.018 pb. Mediante esta construcción se quiso averiguar si la presencia de cambios en la secuencia del fragmento integrado en los transformantes, era debida al tipo de construcción realizada en los diseños anteriores, en los que las zonas homólogas que dirigían la integración se situaban exactamente una a continuación de la otra, lo que quizás pudiera a la hora de integrarse producir cambios en la secuencia con respecto al fragmento original. Se analizó la secuencia de 2 transformantes, los cuales presentaban cambios tanto en la secuencia del promotor del gen *PGKI*, como en la pauta de lectura abierta del gen *YAPI*, lo que ha descartado la hipótesis anterior.

A raíz de los resultados obtenidos con estas tres construcciones, se diseñó la construcción de un nuevo casete de selección que sobreexpresase el gen *YAPI* tal y como ya se describió en el apartado de Resultados. A la hora de realizar el diseño se redujo al máximo el número de reacciones de PCR con el fin de minimizar o incluso eliminar el número de cambios que se pudieran introducir en la secuencia de bases de los fragmentos amplificados. A tal fin se consideraron los siguientes aspectos:

1. Se usaron cebadores híbridos apropiados que consienten la amplificación de fragmentos, con zonas adicionales de solapamiento que permitirán su posterior fusión, a partir directamente del ADN genómico de la cepa a evolucionar. Es importante que la temperatura de fusión (T_m) de la zona en los que los cebadores son complementarios a la secuencia diana del cromosoma, sea la más alta posible (≥ 65 °C). De hecho, la temperatura de fusión de los cebadores híbridos, en los primeros ciclos de la reacción de PCR, es igual a la temperatura de fusión de dicha zona, por cuanto sólo esa parte híbrida con el molde. Por eso es importante que la temperatura de anillamiento sea lo más alta posible, de forma que se pueda utilizar un valor elevado para dicha temperatura (65 – 68

- °C) desde el primer ciclo de la reacción de PCR, evitando así la formación de producto no deseados.
2. En las reacciones de fusión se ha seguido una secuencia especial, tanto en lo que se refiere a la adición de los reactivos y componentes de la mezcla de amplificación, como a la programación de los ciclos en el termociclador, y que consta de dos pasos: **a)** un primer conjunto de ciclos de amplificación por PCR, sin añadir los cebadores y utilizando los fragmentos que sirven de molde como Megacebadores: en esta primera fase se efectuaban 11 ciclos de PCR a baja temperatura de anillamiento (55 – 60 °C). Es muy importante que los fragmentos utilizados en la reacción de fusión estén presentes en concentraciones similares para evitar la presencia del fragmento en mayor concentración como producto final o la aparición de artefactos. La temperatura de anillamiento en esta primera fase depende de la temperatura de fusión de la zona de solapamiento entre los dos fragmentos a fusionar, por eso cuanto menor longitud presenta esta zona, menor tiene que ser la temperatura de anillamiento. En este paso se obtiene una pequeña amplificación del producto de fusión por cuanto los dos fragmentos que hacen de molde también actúan como megacebadores (Karreman, 1998; Shevchuk *et al.*, 2004). **b)** Un segundo conjunto de ciclos de amplificación por PCR utilizando cebadores convencionales: en este último paso se añadían los cebadores y se efectuaban entre 22-30 ciclos de PCR a una temperatura de anillamiento más alta, por lo que los cebadores amplificarán el producto de fusión formado anteriormente. En este caso, la temperatura de anillamiento dependerá de la *T_m* de los cebadores utilizados. Cuando se han realizado pruebas utilizando programas normales de PCR (es decir sin la etapa **a**), siempre se ha obtenido un bajo rendimiento del producto de fusión y la formación de fragmentos no deseados.
 3. En las reacciones de amplificación por PCR que hacen uso de fragmentos amplificados con anterioridad, así como en las reacciones de fusión de fragmentos, se usaron preferentemente cebadores internos. El uso de cebadores internos es indispensable, puesto que en la amplificación por PCR de fragmentos grandes, frecuentemente se obtienen productos que son un poco más cortos, en las zonas finales, de lo esperado y por eso se suelen presentar dificultades a la hora de intentar nuevas reacciones de amplificación con los mismos cebadores (Shevchuk *et al.*, 2004).

4. Se utilizó un mismo fragmento en un número de reacciones de amplificación inferior o igual a 3, con el fin de minimizar dentro de lo posible la introducción de errores en el fragmento a integrar.

En la Figura 35, se representan los posibles diseños que se han planteado para la obtención mediante reacciones de PCR del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$. Aunque hay varias alternativas de diseño posibles para la obtención del fragmento de integración, sin embargo todas se pueden reconducir a las 3 esquematizadas en la Figura 36.

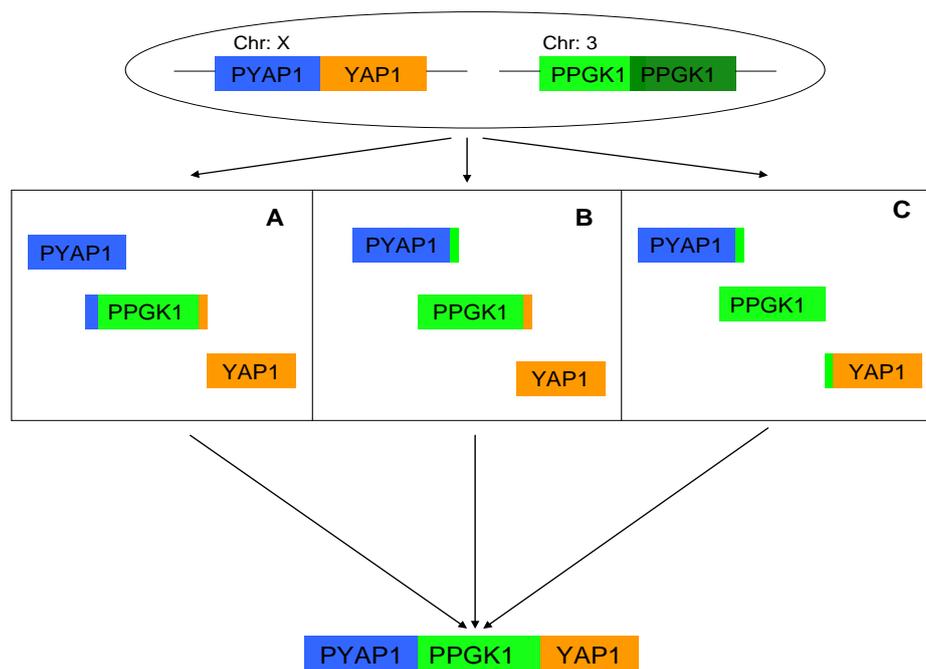


Figura 35. Esquema de las posibles alternativas de diseño para la obtención del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$.

El diseño A se basa en la amplificación, a partir de ADN genómico de la cepa a evolucionar, de un fragmento conteniendo el promotor del gen *PGK1* con una zona de solapamiento en 5' con el extremo 3' de un fragmento conteniendo el promotor del gen *YAP1* y en 3' con las primeras bases del gen *YAP1*. En 2 reacciones de PCR sucesivas, se fusionarían al producto de PCR obtenido, un fragmento conteniendo el promotor del gen *YAP1* y un fragmento conteniendo las primeras bases del gen *YAP1*. En este caso se necesitarían 6 reacciones de PCR, ya que a partir directamente de ADN genómico de la cepa a evolucionar no se ha conseguido obtener en experimentos previos un fragmento con una zona de solapamiento en cada uno de sus extremos. Además, se volvería a utilizar un mismo cebador en 2 reacciones de PCR y se amplificaría el promotor del gen

PGKI 4 veces, aumentando las probabilidades de introducción de errores en su secuencia. Una forma para reducir a 5 el número de reacciones necesarias para la obtención del fragmento final, sería realizar una triple fusión de los tres fragmentos obtenidos tal y como se ha descrito en la bibliografía (Shevchuk *et al.*, 2004).

Se probó a realizar la fusión de los 3 fragmentos obtenidos en la construcción del 2º diseño, un fragmento conteniendo el promotor del gen *YAPI*, un fragmento conteniendo la parte inicial de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* y un fragmento conteniendo el promotor del gen *PGKI* con una zona de solapamiento en 5' con el promotor del gen *YAPI* y en 3' con el gen *YAPI* (ver Figura 34). Aunque se aplicaron todas las condiciones descritas por Shevchuk *et al.*, como añadir los fragmentos purificados y en cantidad equimolar, el uso de cebadores internos y una primera fase de la reacción de fusión sin el uso de cebadores y con baja temperatura de anillamiento, no se consiguió obtener la fusión de los tres fragmentos. El diseño B se basa en la amplificación, a partir del ADN genómico de la cepa a evolucionar, de un fragmento conteniendo el promotor del gen *YAPI* con una zona de solapamiento en 3' con el extremo 5' del promotor del gen *PGKI*, de un fragmento conteniendo el promotor del gen *PGKI* con una zona de solapamiento en 3' con las primeras bases del gen *YAPI* y de un fragmento conteniendo las primeras bases de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI*. Se fusionaría primero el fragmento conteniendo el inicio de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* con el fragmento conteniendo el promotor del gen *PGKI*, y el producto de esta reacción de PCR se fusionaría con el fragmento conteniendo el promotor del gen *YAPI*. En este caso se necesitarían 5 reacciones de PCR y se amplificarían 3 veces las secuencias conteniendo el gen *YAPI* y el promotor del gen *PGKI*.

El diseño C se basa en la amplificación, a partir del ADN genómico de la cepa a evolucionar, de un fragmento conteniendo el promotor del gen *YAPI* con una zona de solapamiento en 3' con el extremo 5' del promotor del gen *PGKI*, de un fragmento conteniendo el promotor del gen *PGKI* y de un fragmento conteniendo el inicio de la pauta de lectura abierta del gen *YAPI* con una zona de solapamiento en 5' con el extremo 3' del promotor del gen *PGKI*. Se fusionaría primero el fragmento conteniendo el promotor del gen *YAPI* con el fragmento conteniendo el promotor del gen *PGKI*, y el producto de esta reacción de PCR se fusionaría con el fragmento conteniendo las primeras bases del gen *YAPI*. En este caso se necesitarían 5 reacciones de PCR y se amplificarían 3 veces las secuencias conteniendo el promotor del gen *YAPI* y el promotor del gen *PGKI*.

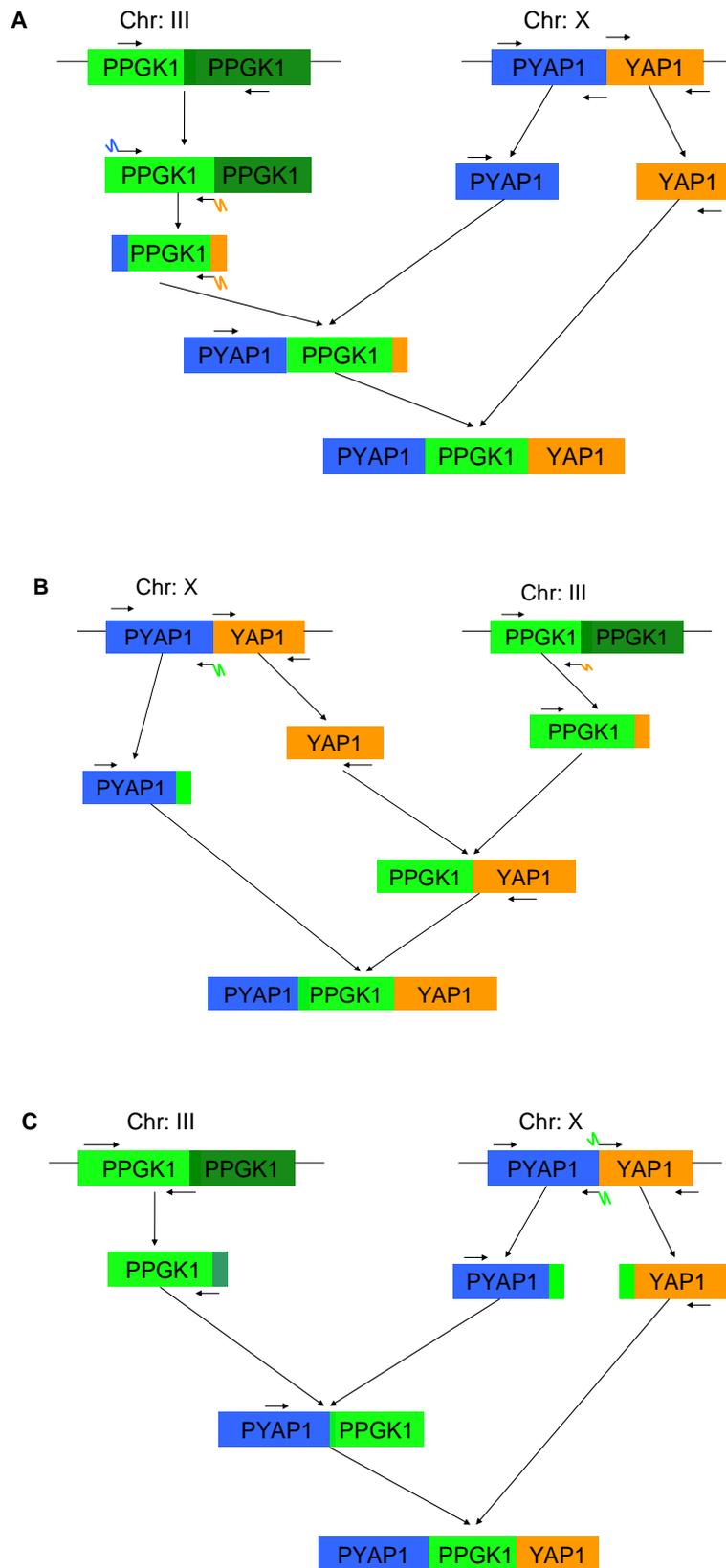


Figura 36. Diagramas que detallan la secuencia de fragmentos a amplificar o fusionar en cada una de las 3 posibles estrategias de diseño para la obtención del fragmento $F_{PYAP1-PPGK1-YAP1}$.

Entre las 3 posibles opciones, se eligió el diseño C por cuanto se necesitan sólo 5 reacciones de PCR para la amplificación del fragmento final, no se reutiliza ningún cebador y se amplifica sólo 2 veces el gen *YAPI*. El objetivo principal ha sido la obtención de transformantes sin cambios en el gen *YAPI* y, en un segundo lugar, sin cambios en la secuencia del promotor del gen *PGK1*. De menor importancia es la inserción de cambios en el promotor del gen *YAPI*, ya que pierde su funcionalidad una vez que el fragmento final se integra en el cromosoma de la cepa a evolucionar.

Como se puede observar en la Tabla 12 del apartado de Resultados, de 13 transformantes de la cepa W303-1A obtenidos, sólo 1 (7,7%) no presenta ningún cambio en la secuencia integrada con respecto a la secuencia de la cepa silvestre. Para incrementar el número de transformantes sin cambios en las construcciones siguientes, se ha realizado la última reacción de fusión en varios tubos de PCR y al mismo tiempo para, a continuación, reunir el producto de dichas reacciones en un solo tubo. De esta forma, se evita la reacción de PCR adicional para obtener la cantidad de fragmento necesario para la posterior transformación y, en consecuencia, se disminuyen los errores introducidos por la polimerasa.

En función de los resultados obtenidos en la construcción del casete de selección, se han elaborado los diseños para la sobreexpresión o eliminación de otros genes de interés industrial como son los genes *ILV5*, *PGU1* e *INP51*. En estas construcciones, además, se han insertado unas secuencias adicionales para permitir la posterior eliminación del casete de selección, pues tal y como se ha descrito en la Introducción de esta Tesis, el uso de genes que confieren resistencia a drogas o antibióticos pueden ser motivo de rechazo por parte de los consumidores. En el caso del casete de selección construido, no se ha insertado ningún gen extraño a la cepa evolucionada, sin embargo se ha preferido realizar una construcción que permita la posterior eliminación del marcador de selección integrado en el genoma para, así, minimizar la reordenación génica finalmente integrada y reducir los posibles motivos de rechazo de las cepas evolucionadas. Otra ventaja que permite esta construcción es la posibilidad de volver a usar el mismo casete de selección para introducir en la cepa evolucionada otras características de interés industrial. En la literatura hay muchos ejemplos de modificaciones genéticas que permiten la eliminación del marcador dominante mediante un mecanismo denominado “pop-out” (Alani *et al.*, 1987; Liingle-Rouault y Jacobs, 1995; Schneider *et al.*, 1996; Dong *et al.*, 2013). La eliminación del marcador es posible en los fragmentos que incorporan zonas genéticas con secuencias repetidas (en inglés “direct repeats”, DR)

que flanquean un determinado locus genético. La recombinación homóloga entre los DR da como resultado la eliminación completa del segmento genómico comprendido. Como inconveniente, hay que mencionar el hecho de que, sobre todo en las primeras construcciones, queda en el genoma una copia de los DR. En las primeras construcciones realizadas mediante las técnicas clásica de ingeniería genética, se utilizaban como DR secuencias que procedían de sistemas heterólogos como el gen *hisG* de *Salmonella typhimurium* (Alani *et al.*, 1987) o el gen *LEU2* del hongo filamentoso *Ashbya gossypii* (Wach *et al.*, 1994). Una versión más actual, que utiliza DR de *S. cerevisiae*, alcanza el objetivo del self-cloning, sin embargo la secuencia remanente después del proceso de recombinación no se encuentra en su locus natural (Estruch y Prieto, 2003). Es muy importante conseguir la ausencia de DR en el genoma después de la eliminación del marcador por los siguientes motivos: la presencia de secuencias genéticas foráneas en el ADN genómico conlleva el rechazo por parte de los consumidores de la cepa mejorada genéticamente; la presencia de una secuencia extraña puede influir en la expresión del gen objetivo; la presencia de DR puede reducir la frecuencia de transformación y/o dirigir la integración del casete de selección a un locus no deseado en una segunda utilización del mismo marcador. Hasta la fecha sólo unos pocos sistemas han conseguido obtener la ausencia de DR después de la eliminación del gen marcador. En general, estos sistemas se basan en flanquear el gen marcador o el casete contra-seleccionable por DR derivadas de la secuencias 5' de la pauta de lectura abierta del gen diana (Walker *et al.*, 2005; Akada *et al.*, 2006). De tal forma se consigue la eliminación genética sin insertar establemente una secuencia foránea a la cepa a evolucionar y tampoco ninguna secuencia genética en un locus diferente respecto al original. Sofyanovich *et al.* (2011) desarrollaron recientemente un nuevo método que consiste en sustituir el promotor del gen diana por un promotor fuerte sin introducir secuencias extrañas a la cepa de levadura a modificar. El sistema se basa en flanquear un casete contra-seleccionable por DR derivadas de la amplificación de la secuencia promotora deseada. Este fragmento se integrará corriente arriba del gen objetivo por unas secuencias situadas en sus extremos que dirigen la integración por recombinación homóloga al locus del gen diana. Otra aproximación ha sido descrita por Storici *et al.* (2001) mediante el sistema denominado “delitto perfetto”, consiguiendo alterar el genoma de una cepa de levadura sin dejar rastros de la secuencia del marcador genético usado en el proceso de selección. En este caso la modificación genética se realiza en dos pasos. En el primer paso se realiza la integración de un fragmento conteniendo un casete

contra-seleccionable (por ejemplo, el marcador *URA3*) y un gen indicador (por ejemplo, el marcador *Kan^R*) en el locus genético deseado mediante recombinación homóloga. A continuación se transforma la cepa mediante oligonucleótidos apropiados que permiten la eliminación del fragmento insertado y la introducción de la modificación genética deseada.

Normalmente estos tipos de construcciones se han realizado clonando y fusionando las distintas partes que componen el fragmento de integración en un vector multicopia y utilizando los marcadores *URA3* y *LYS2*, para los cuales existe un eficaz sistema de contraselección, que permite la identificación de los transformantes que han eliminado el casete de selección. Alternativamente, también se ha utilizado como marcador dominante *KanMX3*, que confiere resistencia a G418/geneticina (Schade *et al.*, 2003). Muy recientemente se ha desarrollado un nuevo casete contra-seleccionable, denominado *amdSYM*, que confiere a *S. cerevisiae* la habilidad de usar acetamida como única fuente de nitrógeno (Solis-Escalante *et al.*, 2013). Para poder reciclar el mismo casete varias veces, los autores han flanqueado el gen *amdS* con DR. Se identifican las cepas que han eliminado el casete mediante su crecimiento en un medio conteniendo fluoroacetamida.

Los sistemas que se basan únicamente en reacciones de PCR para la construcción de fragmentos de integración que permiten la eliminación del marcador de selección, han tenido hasta la fecha una limitada utilización. Esto es debido a que estos sistemas presentan los siguientes inconvenientes:

- requieren de muchas reacciones de PCR para la obtención del fragmento de integración.
- se insertan cambios en la secuencia de integración debidos a errores introducidos por la polimerasa durante las reacciones de PCR.
- las secuencias repetidas que se utilizan normalmente son demasiado largas para garantizar una eficaz amplificación por PCR (este es el caso, por ejemplo, de las secuencias repetidas *hisG* que se utilizan para flanquear el marcador *URA3*). Para soslayar este inconveniente, Wilson *et al.* (2000) desarrollaron una versión del mismo casete flanqueado por secuencias repetidas más cortas.

Más éxito ha tenido otra aproximación que combina los métodos basados en la PCR con el sistema Cre/loxP (Güldener *et al.*, 1996). En este sistema, el gen marcador está flanqueado por secuencias *loxP*. Estas secuencias son reconocidas por la recombinasa Cre del bacteriófago P1 de *Escherichia coli*, que cataliza la recombinación entre ellas y,

por tanto, la eliminación del gen marcador. Así, las cepas en las que se inserta el marcador de resistencia se transforman con plásmidos que posean la secuencia codificante de la recombinasa Cre bajo el control de un promotor fuerte, de forma que las secuencias *loxP* recombinen entre ellas. Este sistema tiene el inconveniente que después de la eliminación del gen marcador, queda en el genoma de la cepa evolucionada una copia de la secuencia *loxP*.

Mediante el concepto de evolución genómica por diseño molecular se ha diseñado un sistema que permite la eliminación del casete de selección y que, con respecto a los sistemas anteriores, tiene las siguientes ventajas:

- evita el empleo de genes foráneos a la cepa a evolucionar.
- evita el uso de vectores de clonación.
- evita la presencia de secuencias extrañas y no deja ningún nucleótido o secuencia de nucleótidos que no estuviera ya presente en el genoma de la propia cepa a evolucionar.

En el caso de la sobreexpresión de los genes *PGUI* e *ILV5*, se ha conseguido la delección del casete flanqueando el gen *YAPI* con la secuencia promotora del gen *PGK1*, como ya se describió en el apartado de Resultados. En teoría, unos DR de unos 30 pb habrían sido suficientes para la eliminación del casete de selección (Dutoit *et al.*, 2010). Sin embargo se ha preferido generar unos DR superiores a los 700 pb para aumentar considerablemente la frecuencia de recombinación homóloga. El resultado final de la modificación genética es la obtención de una nueva cepa de levadura que se diferencia de la cepa salvaje sólo por la sustitución de la zona promotora del gen de interés por un promotor “fuerte” de la misma cepa. A la hora de realizar el diseño se minimizó el número de reacciones de PCR con el fin de reducir al máximo el número de cambios introducidos por la ADN polimerasa en la secuencia de los fragmentos amplificados. En el caso de la sobreexpresión del gen *ILV5*, se obtuvo un transformante sin cambios en la secuencia insertada. En el caso de la sobreexpresión del gen *PGUI*, el transformante 1926-12T no presenta ningún cambio en la pauta de lectura abierta del gen que codifica para la endopolipoligalacturonasa, mientras que se aprecian 2 cambios en la secuencia promotora del gen *PGK1* situada justo antes el ATG de inicio del gen *PGUI* y un cambio en la secuencia promotora del gen *PGK1* situada justo antes del ATG de inicio del gen *YAPI*. Dichos cambios no afectan a la actividad endopoligalacturonasa del transformante (ver Figuras 18 y 19). La recombinación

homóloga entre las dos secuencias promotoras del gen *PGKI* permite la eliminación del marcador de selección. Resulta interesante la observación realizada de que los cambios en la secuencia promotora del gen *PGKI* de la cepa 1926-12TPO son iguales a los presentes en la secuencia promotora del mismo gen situada justo antes la pauta de lectura abierta del gen *PGUI* del transformante 1926-12T. Este resultado sugiere que en el proceso de recombinación homóloga, el DR situado corriente abajo con respecto al marcador dominante, es la secuencia que queda finalmente en el genoma después del proceso del “pop-out”. Sin embargo, para confirmar esta hipótesis sería necesario analizar la secuencia de muchos más transformantes, antes y después de la eliminación del casete de selección.

En el caso de la delección del gen *INP51*, se ha conseguido un sistema análogo al de Walker *et al.* (2005). En este caso el marcador dominante no se ha flanqueado de DR, sino que corriente abajo del mismo se ha fusionado con una secuencia de 725 pb homóloga a parte de la secuencia promotora del gen *INP51*. De tal forma, cuando el fragmento se inserta por recombinación homóloga en el ADN genómico de la cepa a evolucionar, se obtiene la repetición de una zona del promotor del gen *INP51*, permitiendo la pérdida del casete de selección después del crecimiento de la cepa evolucionada en un medio no selectivo. Como ya se ha comentado anteriormente, una secuencia de 30 pb habría sido suficiente para la eliminación del casete, sin embargo se ha optado por una secuencia superior a los 700 pb para incrementar notablemente la frecuencia de recombinación homóloga.

También como ya se ha mencionado, siempre se plantea una estrategia de diseño que reduzca al mínimo el número de reacciones de amplificación de cada elemento del fragmento a construir y el número total de reacciones de PCR a realizar, con el fin de reducir al máximo el número de cambios introducidos por la ADN polimerasa en la secuencia de los fragmentos amplificados. En concreto, para el caso particular del fragmento $F_{\text{GEPO-}INP51}$, se realizó el diseño de forma que la parte final del gen *INP51* y su promotor no contuvieran cambios, pues después de la eliminación del casete de selección sólo quedarán en la secuencia insertada dichos elementos. Como se puede observar en la Figura 28 del apartado de Resultados, para la obtención de $F_{\text{GEPO-}INP51}$ se amplificó sólo 2 veces el fragmento conteniendo la parte final de la pauta de lectura abierta del gen *INP51* y 3 veces el fragmento conteniendo el promotor del gen *INP51*. El resultado es la obtención de un transformante (denominado M69DI1) que no contiene cambios en la secuencia analizada. Dicho transformante, debido a la repetición

de la secuencia de su promotor, permite la eliminación del casete de selección así como de la parte inicial del gen *INP51*, obteniendo la modificación genética deseada sin dejar ninguna secuencia de nucleótidos que no estuviera ya presente en el genoma de la propia cepa de levadura.

2. La sobreexpresión del gen *YAP1* disminuye la aparición de mutantes petites

Las mutaciones en el ADN mitocondrial pueden resultar en la formación de dos formas de mutantes: mutantes ρ^- , en el cual el ADN mitocondrial está presente pero genes o secuencias específicas han sido eliminadas y las secuencias restantes son amplificadas; o mutantes ρ^0 , en las cuales no está presente el ADN mitocondrial. Los mutantes ρ^- se originan espontáneamente por procesos de recombinación en el genoma mitocondrial, mientras que los mutantes ρ^0 se forman a partir de los primeros mediante un proceso aún desconocido. Los mutantes ρ^0 no han sido todavía encontrados en las levaduras analizadas durante el proceso de producción de la cerveza, probablemente debido a la falta de técnicas adecuadas para la diferenciación de los 2 tipos de mutantes (Smart, 2007).

Los mutantes deficientes en respiración son rutinariamente identificados en los controles de calidad de las empresas productoras de cerveza. La continuada reutilización industrial de la levadura cervecera está asociada con un incremento en la frecuencia de la aparición de células petites que, en las levaduras recolectadas de una partida de mosto fermentado, se encuentra, generalmente, comprendida entre el 0,1 y el 6% (Jenkins *et al.*, 2009). No se encuentran en la literaturas referencias que describan niveles superiores ya que los cerveceros normalmente descartan las levaduras cuando detectan una presencia de mutantes petites alrededor del 5%.

El acúmulo de dichos mutantes en el mosto cervecero tiene consecuencias negativas sobre el proceso fermentativo. De hecho, estas levaduras mutantes, que sobreviven junto con la levadura de cultivo normal, son responsables de una reducción de la tasa de fermentación, de la pérdida de la capacidad de floculación, y de la producción de sustancias responsables de sabores y aromas anómalos, debido principalmente a la sobreproducción de alcoholes superiores, como el isobutílico e isoamílico, a una baja

producción de estéres y a una mayor formación de diacetilo (O'Connor-Cox *et al.*, 1995; Toksoy *et al.*, 2005).

Los motivos que causan la aparición de mutantes petites no están del todo claros, aunque se conocen varias condiciones responsables de su aparición, como la exposición de las células de levadura al estrés oxidativo, al etanol y a las altas presiones hidrostáticas, la edad del cultivo de levadura, es decir, el número de veces que se ha reutilizado en un proceso de fermentación, o el hecho de encontrarse en estado de carencia nutricional. Concretamente, un reciente estudio demuestra que el estrés oxidativo, por la producción endógena de especies reactivas del oxígeno (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) durante el envejecimiento celular, provoca la formación de mutantes con deficiencia respiratoria en cepas de levaduras cerveceras (Gibson *et al.*, 2009). En el mismo estudio, además, se confirma el resultado de otras investigaciones, es decir, que la frecuencia y la propensión a formar mutantes mitocondriales es dependiente de la cepa y que la formación de estos mutantes se produce hacia el final de la fermentación, cuando la levadura se acumula en la base cónica del fermentador (Jenkins *et al.*, 2009).

A partir de estas investigaciones y de los estudios de Lee *et al.* (2001), que razonan que las células de levadura con reducido potencial antioxidante presentan una mayor aparición de mutantes petites durante el proceso fermentativo, se consideró que un aumento del potencial antioxidante en una cepa de levadura podría reducir la formación de dichos mutantes. Como ha quedado constatado en el apartado de Resultados de la presente Tesis, el aumento en la expresión del gen *YAPI*, que codifica para un factor de transcripción responsable de la adaptación de la levadura a diversas condiciones de estrés y que es necesario para la respuesta al estrés oxidativo, produce un marcado decremento de la aparición de mutantes petites en la cepa industrial S1. Este resultado es de gran importancia, pues sugiere que cepas de levadura con mayor potencial antioxidante tienen una menor predisposición a producir mutantes petites. Este fenómeno podría ser debido a una menor generación intracelular de ROS en la cepa evolucionada durante el proceso de envejecimiento celular, pues la acumulación de ROS en la mitocondria daña de forma irremediable el ADN mitocondrial y provoca la generación de mutantes petites (Gibson *et al.*, 2009). Asimismo se ha demostrado que los antioxidantes celulares influyen en la longevidad de las células y que la eliminación o la sobreexpresión de genes que intervienen en la respuesta al estrés oxidativo comportan respectivamente una reducción o un aumento en el tiempo de vida (Van

Zandycke *et al.*, 2002; Harris *et al.*, 2003; Bonawitz *et al.*, 2006;). En apoyo de esta hipótesis, se ha demostrado que otros factores relacionados con la formación de mutantes petites, como el etanol o distintos tipos de estrés, incrementan el nivel de ROS producidos intracelularmente (Sugiyama *et al.*, 2000; Wu y Cederbaum, 2003; Orozco *et al.*, 2013).

Sin embargo, a diferencia de lo que ocurre a nivel industrial, no se ha observado un incremento en la formación de mutantes petites a lo largo de 10 microfermentaciones sucesivas a escala de laboratorio, cuando en cada fermentación tendría que aumentar la proporción de células envejecidas. Probablemente durante la producción industrial de cerveza intervienen otros factores de estrés, oxidativos y no-oxidativos, que no ha sido posible reproducir en el laboratorio, y que incrementan paulatinamente el número de células con altos niveles intracelulares de ROS.

Sobre la base del resultado obtenido, se abre la posibilidad de desarrollar nuevas cepas cerveceras utilizando la metodología desarrollada en este trabajo que sobreexpresen genes implicados en la respuesta al estrés oxidativo, para así disminuir la formación de mutantes petites. A tal fin se podrían sobreexpresar en cepas de levaduras industriales utilizadas para la producción de cerveza, los factores de transcripción Msn2/4 que regulan la respuesta general al estrés y que se ha demostrado que están implicado en la respuesta al estrés oxidativo o los genes *YAP1*, *YAP2*, *SKN7* y *HSF1* que regulan las respuestas específicas al estrés por ROS.

3. La sobreexpresión del gen *PGU1* permite la degradación de la pectina en las moléculas de ácido galacturónico que la componen

Las tecnologías actuales de producción de bioetanol para carburantes a partir de cereales no ofrecen todavía soluciones competitivas desde el punto de vista de su coste. Por lo tanto, la Unión Europea con el fin de apoyar el desarrollo de la tecnología de los biocarburantes y su implantación en un futuro cercano, ha emitido la Directiva 2003/30/CE que permite anular el Impuesto Especial de Hidrocarburos al cual están sujetos el resto de carburantes. Entre los objetivos de la misma Directiva se cita que el desarrollo de los biocarburantes deberá estar unido a la búsqueda de materias primas de bajo coste alternativas a las tradicionales, como pueden ser las de origen residual.

La producción de cítricos de la Comunitat Valenciana se cifra en torno a 4.189.000 toneladas de cítricos al año, principalmente de mandarinas (51%), naranjas (43%) y limones (6%), según el Anuario Estadístico CV 2009 del Instituto Valenciano de Estadística. De estos, aproximadamente dos millones van destinados al consumo humano y un millón a la producción de zumos. Por lo tanto, se producen 1.200.000 toneladas de excedentes de cítricos, a los que hay que añadir 600.000 toneladas de residuos generados por la industria de producción de zumos. Los residuos de la corteza, la pulpa y las naranjas excedentes, debido a la elevada concentración de azúcares que contienen, ofrecen un gran potencial de utilización como sustrato en procesos biológicos para la obtención de etanol u otros productos de alto valor añadido.

Las etapas de un proceso de obtención de bioetanol a partir de residuos de cítricos pueden resumirse como sigue:

1. Pretratamiento y prensado de los residuos cítricos.
2. Fermentación del líquido obtenido en la primera etapa por parte de levaduras con buenas características fermentativas.
3. Destilación. La mezcla alcohólica se lleva a una torre de rectificación donde se obtiene un primer concentrado de etanol al 66% (v/v). La corriente de cabeza va a otra torre de destilación azeotrópica, donde finalmente se obtiene etanol al 96% (v/v).
4. El etanol se lleva a un tanque de deshidratación con tamices moleculares, donde se obtiene etanol de pureza mayor al 99,5% apto para uso en motores de automoción.

El objetivo de la reordenación cromosómica realizada, era obtener una cepa de levadura industrial con muy alta actividad endopoligalacturonasa para obtener en el menor tiempo posible, la hidrólisis de la pectina presente tanto en los residuos cítricos como en el líquido obtenido por prensado de los mismos. Las ventajas de esta modificación genética son múltiples. Por un lado se obtiene la despolimerización de las pectinas a moléculas de ácido galacturónico que puede ser fermentado a etanol por la cepa de *Escherichia coli* etanologénica KO11 (Grohmann *et al.*, 1995) y, presumiblemente en un futuro no muy lejano, por parte de una levadura MG (Van Maris *et al.*, 2006); por otro lado, se obtiene un líquido con alta actividad endopoligalacturonasa que se puede emplear en una etapa previa de tratamiento de materia prima para mejorar el rendimiento de extracción de líquido y azúcares a partir de los residuos de cítricos.

Los polisacáridos pécticos son una mezcla compleja de polímeros ácidos y neutros, que se caracterizan por su capacidad para formar geles y actuar como sustancias cementantes en la lámina media y en la pared primaria de las plantas superiores. Se denominan pectinas a los polisacáridos ácidos complejos de naturaleza coloidal que contienen un esqueleto de residuos de ácido D-galacturónico unidos mediante enlaces $\alpha(1-4)$. Estos residuos pueden estar parcialmente metilados, es decir, esterificados en el C-6 con alcohol metílico, siendo el grado de metilación variable según el origen de la pectina. La pectina también contiene con frecuencia residuos de ramnosa, arabinosa y galactosa. Generalmente la ramnosa forma parte de la cadena principal, mientras que la arabinosa y la galactosa se encuentran en las cadenas laterales unidas a la cadena principal formando ramificaciones.

Las pectinas contienen principalmente dos regiones definidas que se alternan entre sí (Pérez *et al.*, 2000): la *región lisa* o homogalacturonano que consiste en un esqueleto de residuos de ácido D-galacturónico, y la *región rugosa o peluda*, denominada *ramnogalacturonano I*, donde los residuos de ácido D-galacturónico del esqueleto están interrumpidos por residuos de L-ramnosa unidos por enlaces $\alpha(1\rightarrow2)$, a los cuales pueden unirse largas cadenas de arabinano y galactano mediante el C-4 (De Vries y Visser, 2001). Se puede diferenciar otra región, denominada *ramnogalacturonano II*, que consiste de un polisacárido de unas 30 unidades que contiene un esqueleto de ácido galacturónico, sustituido por 4 tipos diferentes de cadenas laterales que contienen ramnosa, arabinosa y azúcares poco comunes como apiosa y metilfucosa (Pérez *et al.*, 2000). Se desconoce si el ramnogalacturonano II está unido covalentemente a la cadena principal de pectina.

Las endopoligalacturonasas, enzimas que degradan las sustancias pécticas hidrolizando los enlaces 1,4- α -glucosídicos entre dos residuos de ácido galacturónico, han sido puestas de manifiesto en plantas, bacterias, hongos filamentosos y levaduras. Las enzimas péctinolíticas tienen interés comercial ya que son muy utilizadas en la industria alimentaria en la clarificación de zumos, en el procesado de frutos y vegetales y en la industria de producción de bioetanol en la hidrólisis de la pectina a azúcares monoméricos. Hasta ahora, la principal fuente de enzimas péctinolíticas es el hongo *Aspergillus niger*. La actividad endopoligalacturonasa es la principal actividad péctinolítica presente en *S. cerevisiae*, aunque sólo se ha observado su presencia en determinadas cepas de este género (Radoi *et al.*, 2005).

El principal problema que presenta el uso de enzimas pectinolíticas producidos por levaduras del género *Saccharomyces*, sigue siendo el bajo nivel de expresión encontrado en las cepas productoras.

Como se puede observar en la Figura 10 del apartado de Resultados, muchas cepas no presentan actividad poligalacturonas y sólo 9 de entre las 34 cepas analizadas muestran una actividad endopoligalacturonasa relevante. El gen *PGUI* está ausente en algunas cepas de *S. cerevisiae*, y en consecuencia, estas cepas no poseen actividad endopoligalacturonasa (Fernández-González *et al.*, 2004). Sin embargo, algunas de estas cepas que poseen un gen *PGUI* funcional, carecen de actividad endopoligalacturonasa porque el gen no se expresa (Jia y Wheals, 2000). La frecuencia con la cual un gen es transcrito depende de su secuencia promotora y de la presencia de factores de transcripción que se unan al promotor para activar la transcripción. Además la expresión de un gen depende también de su posición en el genoma (Flagfeldt *et al.*, 2009). La expresión de genes localizados en posición subtelomérica, como es el caso de *PGUI*, está inhibida. Un reciente estudio ha demostrado que el gen *PGUI* se encuentra silenciado mediante regulación epigenética en aquellas cepas que, pese a tener dicho gen en su genoma, no presentan actividad endopoligalacturonasa (Louw *et al.*, 2010). Los mismos autores indican en otro estudio que la expresión del gen *PGUI* depende del nivel de transcripción de sus factores de transcripción *TEC1* y *STE12* (Louw *et al.*, 2009).

Como quedó reflejado en el apartado de Resultados, entre todas las cepas ensayadas, se seleccionaron aquellas que tenían una alta actividad enzimática de forma que, sustituyendo el promotor del gen *PGUI* por un promotor fuerte y que induzca altos niveles de transcripción bajo condiciones fermentativas, como el promotor del gen *PGK1*, se aumentara todo lo posible la producción de endopoligalacturonasa. Blanco *et al.* (1998) demostraron que la actividad endopoligalacturonasa de cepas de *S. cerevisiae* en las cuales se sobreexpresaba el gen *PGUI*, dependía del “background” genético de cada cepa. Eschstruth y Divol (2011) comprobaron que no había mucha diferencia en la sobreexpresión en una cepa vínica del gen *PGUI* procedente de una cepa con alta actividad endopoligalacturonasa, como *S. paradoxus*, o procedente de una cepa con baja actividad, como *S. cerevisiae*. Por lo tanto, la diferencia en la expresión del gen *PGUI* se debe probablemente a un diferente mecanismo de regulación propio de cada cepa y no a cambios en la secuencia del gen *PGUI*. Finalmente se seleccionó la cepa CECT 1926, porque además de presentar una alta actividad endopoligalacturonasa, tenía una

mejor adaptación al medio de crecimiento y una buena frecuencia de transformación, lo que facilitaba notablemente la aplicación de la metodología desarrollada.

Del análisis de la secuencia de la cepa CECT 1926, se puede observar que sólo hay 1 cambio en la pauta de lectura abierta del gen *PGUI* y 2 cambios en la secuencia promotora de dicho gen con respecto a la secuencia depositada en la base de datos SGD, mientras que hay 7 cambios en la región promotora del gen *TDH3*. La levadura CECT 1926 es un *Saccharomyces bayanus* var. *bayanus*, por lo tanto probablemente se trata de un híbrido natural de *S. cerevisiae* con otra especie del género *Saccharomyces* (ver apartado 1.3. de la Introducción). Así pues, del análisis de la secuencia se deduce que en la PCR se ha amplificado sólo la secuencia correspondiente a uno de los genomas parentales, el de *S. cerevisiae* ya que en caso contrario se habrían recuperado muchos más cambios con respecto a la secuencia depositada en la base de datos SGD. En consecuencia, los dos fragmentos que se han construido, $F_{GE-PGUI}$ y $F_{GEPO-PGUI}$, sólo se integrarán en los alelos correspondientes a uno de los 2 genomas que componen la cepa CECT 1926. Como se puede observar en las Figuras 18 y 19 del apartado de Resultados de la presente Tesis, las nuevas cepas aisladas aplicando el procedimiento de evolución genómica por diseño molecular, muestran un considerable incremento de la actividad endopoligalacturonasa con respecto a la cepa silvestre. Este resultado es similar al obtenido en otras investigaciones en las que se ha sobreexpresado el gen *PGUI* en cepas industriales de levaduras vínicas mediante la transformación de dichas cepas con plásmidos multicopia (Blanco *et al.*, 1998; Gognies *et al.*, 1999; Villanova *et al.*, 2000) o con fragmentos de integración (Fernández-González *et al.*, 2005).

Una ventaja del uso de esta nueva tecnología de mejora genética que se ha desarrollado con respecto a las anteriores, es la posibilidad de incrementar ulteriormente la actividad enzimática de interés utilizando el mismo fragmento de integración utilizado en la 1ª integración e incluso el mismo casete de selección. De hecho, se podría volver a transformar la cepa 1926-12T4PO con el fragmento de integración $F_{GEPO-PGUI}$, pero habría que considerar que dicho fragmento se insertaría con más probabilidad (debido a la mayor zona de homología) con la copia genómica del gen *PGUI* ya sobreexpresada. Por otro lado, las probabilidades de que el fragmento $F_{GE-PGUI}$ se inserte, en una nueva transformación de la cepa 1926-12T4PO, en la copia genómica del gen *PGUI* sin sobreexpresar, se ven reducidas con respecto a la primera integración y, en todo caso, cabría esperar obtener un transformante donde las dos copias del gen *PGUI* de uno solo de los dos genomas que componen la cepa CECT 1926 resulten sobreexpresadas.

Alternativamente, se podría construir e integrar el mismo fragmento $F_{\text{GEP0-PGU1}}$ pero esta vez obtenido a partir de la secuencia del gen *PGUI* correspondiente al alelo de *S. bayanus* var. *uvarum* que junto a *S. cerevisiae* componen probablemente el genoma de la cepa CECT 1926.

Otro resultado que cabría esperar del uso de la cepa 1926-12T4PO es la obtención de un líquido con alta actividad endopoligalacturonasa, que se podría emplear en una etapa previa, como pretratamiento de la materia prima, para mejorar el rendimiento en la extracción de líquido y azúcares a partir de residuos de cítricos. Normalmente, para la extracción se añade a los residuos cítricos hidróxido de calcio en una proporción comprendida entre un 0,3 y un 5% (p/p) y se remueve toda la masa durante 30-60 minutos. Estudios previos de otros autores han demostrado que la aplicación de pectinasas junto con el hidróxido de calcio facilita la extracción de líquido y azúcares de los residuos de cítricos (Tripodo *et al.*, 2004).

En pruebas preliminares realizadas en planta piloto, se ha ensayado el efecto de utilizar parte del líquido fermentado por la cepa 1926-12T4PO para aumentar el rendimiento en la extracción del mismo, así como de los azúcares, a partir de los residuos cítricos. Aunque se ha observado un sustancial aumento en la disgregación de los residuos, no se pudo demostrar una mejora en el proceso de extracción con respecto al control (cepa de levadura sin actividad endopoligalacturonasa, datos no presentados), probablemente debido a que el sistema de extracción utilizado, una prensa neumática para la producción de vino, no era el más adecuado teniendo en cuenta el material de partida empleado.

La mayoría de las investigaciones acerca del gen *PGUI* estaban relacionadas con la modificación genética de levaduras vínicas, de forma que produjesen grandes cantidades de la enzima endopoligalacturonasa. De este modo se consiguen los mismos efectos que con las enzimas comerciales, en lo que respecta a la clarificación y filtración de los vinos, pero sin los problemas que el uso de dichas preparaciones enzimáticas (que en muchos de los casos son cócteles, mal caracterizados, de múltiples actividades enzimáticas) conlleva a nivel aromático y de producción de metanol (Villanova *et al.*, 2000; Fernández-González *et al.*, 2005).

En la industria enológica, durante la transformación del mosto en vino, las sustancias pécticas son modificadas por la acción de pectinasas naturales de la uva o por enzimas industriales, añadidos durante la fermentación, para facilitar los procesos de clarificación y filtración. Los preparados comerciales de enzimas pectinolíticas están

constituidos por una mezcla de enzimas, que representan un espectro bastante amplio de actividades enzimáticas, alguna de las cuales se consideran desfavorables ya que dan lugar a características no deseadas en el vino (Chatonnet *et al.*, 1992). Por otra parte el uso de endopoligalacturonasas de levaduras no provoca un aumento en el contenido de metanol de los vinos. Van Rensburg y Pretorius (2000) destacan además la gran utilidad que tendría el disponer de una cepa de levadura con alta actividad pectolítica, ya que ayudaría a extraer de la piel de la uva las moléculas precursoras del aroma y del color del vino que se incorporarían al proceso normal de la fermentación. Como ya se ha comentado anteriormente, el único inconveniente en el uso de levaduras del género *Saccharomyces* es el bajo nivel de expresión del gen *PGUI* en las cepas productoras. Para soslayar este inconveniente, se hace indispensable el uso de cepas de levaduras que sobreexpresen el gen *PGUI*. Por lo tanto, otra utilización práctica de la construcción *F_{GEPO-PGUI}*, es su integración en una cepa vínica con el objetivo de obtener una cepa con alta actividad pectinolítica que mejore la clarificación y filtración de los vinos sin perjudicar el perfil aromático y de calidad de los caldos obtenidos.

4. La sobreexpresión del gen *ILV5* permite disminuir la duración del proceso de “lagering” o maduración en la producción de cerveza

Como aplicación del concepto de evolución genómica por diseño molecular, se decidió obtener una cepa de levadura industrial con baja producción de diacetilo. Hay mucho interés por parte de las empresas cerveceras en este tipo de mejora de las características de la levadura de cultivo y, no obstante las numerosas levaduras MG descritas en la literatura que consiguen reducir la producción de diacetilo, ninguna de ella se está usando en la producción de cerveza.

La concentración final de diacetilo en la cerveza, excluyendo posibles contaminaciones bacterianas que incrementen su nivel, depende fundamentalmente de tres procesos: 1- la síntesis y la eliminación del α -acetolactato, el precursor inmediato del diacetilo; 2- la conversión no-enzimática de este precursor a diacetilo; 3- la eliminación del diacetilo por parte de la levadura. Por lo tanto, los distintos grupos de investigación que han abordado este problema han elegido actuar sobre alguna de estas 3 vías para conseguir obtener una cepa con baja producción de diacetilo (Krogerus y Gibson, 2013).

El gen *ILV2* codifica para una enzima que forma acetolactato a partir de piruvato. Manipulando la actividad enzimática del gen *ILV2*, se puede controlar la concentración de diacetilo. La producción de diacetilo se ve eliminada por completo en los mutantes en los que se ha inactivado o eliminado el gen *ILV2*, sin embargo esas levaduras tienen una escasa capacidad de fermentación debido a su incapacidad para biosintetizar leucina y valina (Ryder y Masschelein, 1985). En realidad, en las cepas de levaduras industriales este inconveniente no existe, pues siendo aloaneuploides y de una dotación genética cercana a la tetraploidia, la eliminación de tan solo una copia del gen *ILV2* ya consigue una reducción en la producción de diacetilo sin perjudicar excesivamente a la producción de leucina y valina. Wang *et al.* (2008) consiguieron una disminución de la producción del diacetilo de aproximadamente el 60% eliminando una copia del gen *ILV2* en dos cepas de levaduras cerveceras. Una solución para reducir y no eliminar por completo la actividad enzimática del producto del gen *ILV2*, podría ser el cambio de la secuencia promotora del gen *ILV2*, por un promotor que da lugar a bajos niveles de transcripción bajo las condiciones de un proceso fermentativo.

Otra estrategia para eliminar la alta concentración de diacetilo en la cerveza “verde”, es decir, nada más acabar la fermentación, podría ser la expresión en la levadura de la enzima heteróloga α -acetolactato decarboxilasa (ALDC) (Godtfredsen y Ottesen, 1982). Esta enzima convierte el α -acetolactato en acetoina, cuyo valor de percepción sensorial de 3.0 ppm es mucho más alto que el del diacetilo. Varias ALDC procedentes de diferentes bacterias han sido clonadas y expresadas en las levaduras cerveceras, sin embargo, a parte del marcado decremento en la producción de diacetilo, las levaduras resultantes eran auxótrofas para los aminoácidos leucina, valina e isoleucina. Para resolver este problema, Vogel *et al.* (1995) expresaron en una cepa cervecera una ALDC extracelular de forma que sólo el α -acetolactato extracelular fuera decarboxilado a acetoina. El principal inconveniente que presenta esta estrategia es la difícil aceptación de la utilización de un microorganismo modificado genéticamente por parte de los consumidores, pues la levadura resultante de la modificación genética sobreexpresa un gen procedente de otro sistema biológico.

Otra forma para disminuir el contenido en diacetilo, es incrementar el flujo del α -acetolactato hacia la síntesis de aminoácidos. Esto se puede conseguir mediante la sobreexpresión de los genes *ILV3* e *ILV5*, que codifican para los 2 pasos enzimáticos situados corriente abajo del gen que regula la producción de α -acetolactato. Según se ha descrito, la sobreexpresión del gen *ILV5* es más efectiva en la reducción del diacetilo que

la sobreexpresión del gen *ILV3*. Villa *et al.* (1995) sobreexpresaron mediante plásmidos multicopia el gen *ILV5*, el gen *ILV3* y los dos genes simultáneamente, obteniendo una reducción en el contenido de vicinal diquetonos del 70, 40 y 60%, respectivamente, con respecto a la cepa silvestre. La sobreexpresión de dichos genes no afectó de manera significativa a la producción de aromas y ácidos orgánicos. Sin embargo, otros autores consideran que la sobreexpresión de *ILV5* e *ILV3* puede comportar un cambio en el perfil aromático de las cervezas: los genes *ILV5* e *ILV3* son responsables del mantenimiento del ADN mitocondrial (Zelenaya-Troitskaya *et al.*, 1995; Bateman *et al.*, 2002; Macierzanka *et al.*, 2008) y no se puede descartar que su sobreexpresión pueda causar una segregación o estabilidad anómalas de dicho ADN. Para evitar este inconveniente, Omura (2008) sobreexpresó una enzima *Ilv5* que actúa sólo a nivel del citosol de la célula. Con este propósito desarrolló una enzima *Ilv5* en la que se eliminaron los 46 últimos residuos de aminoácidos. Esta nueva enzima muestra una función estable únicamente en el citosol y su sobreexpresión en una cepa industrial comportó la misma disminución de la producción de diacetilo que la sobreexpresión del gen *ILV5*, sin modificar la producción de ácidos orgánicos y compuestos aromáticos importantes para el aroma y sabor de la cerveza.

El inconveniente de todas estas modificaciones genéticas es su difícil aplicación a nivel industrial por el rechazo de la opinión pública hacia este tipo de modificaciones genéticas.

Como solución, Kusonoki y Ogata (2012) desarrollaron una cepa cervecera con una baja producción de diacetilo mediante una estrategia de “self cloning”, de forma que la cepa resultante no fuera tratada como OMG. La modificación genética realizada consiste en la integración de un fragmento conteniendo el gen *ILV5* de *S. cerevisiae* corriente arriba del gen *ILV2* obteniendo de tal forma una cepa con una copia más del gen *ILV5*. También se reemplazó, por transformación, el gen *ILV2* mediante un marcador dominante basado en gen *SMR1B* que confiere resistencia al sulfometuron metil. De esta forma consiguieron una reducción en la producción de diacetilo y, en consecuencia, del período de maduración sin perjuicio de la producción de alcoholes.

Entre todas las estrategias analizadas, se decidió sobreexpresar el gen *ILV5* en la levadura industrial S1. Esta modificación genética permite obtener una elevada reducción en la producción de diacetilo. Como inconveniente es posible que se genere un ligero cambio en el perfil aromático del producto final.

El análisis de la secuencia del gen *ILV5* de la cepa S1, muestra que sólo hay 2 cambios con respecto a la secuencia depositada en la base de datos SGD, uno situado en la región promotora del gen *ILV5* y otro situado en la pauta de lectura abierta del mismo gen. La levadura S1 es un *Saccharomyces pastorianus*, es decir es un híbrido natural de *S. cerevisiae* con *Saccharomyces eubayanus*. Por lo tanto, del análisis de la secuencia se deduce que el fragmento amplificado por PCR corresponde sólo a la secuencia del alelo procedente de uno de los genomas que la componen, el de *S. cerevisiae*, ya que en caso contrario se habrían recuperado muchos más cambios con respecto a la secuencia depositada en la base de datos SGD. Para esta reordenación cromosómica valen las mismas consideraciones que ya se han hecho en el caso de la sobreexpresión del gen *PGU1* y a las cuales nos remitimos. Gracias a la metodología desarrollada, es posible sobreexpresar ulteriormente el otro alelo del gen *ILV5* y obtener por lo tanto una mayor reducción en la producción de diacetilo. Mithieux *et al.* (2006) consiguieron una cepa de levadura industrial conteniendo tres copias en tandem del gen *ILV5*. La cepa resultante se caracteriza por una elevada expresión de la enzima acetohidroxiácido reductasa y, en consecuencia, un marcado decremento en la producción de diacetilo.

Bajo las condiciones de nuestro ensayo de microfermentación, la cepa S1-PI6 consigue disminuir la producción de diacetilo de un 34,0% con respecto a la cepa silvestre considerando el punto de máxima concentración alcanzada durante la fermentación para cada cepa, mientras que al final del período de fermentación la diferencia en la concentración de diacetilo es del 47,4%. En la literatura, las células de levadura que han sido transformadas con plásmidos multicopia muestran un decremento en la producción de diacetilo con respecto a la cepa silvestre comprendido entre el 50 y el 60% (Gjermasen *et al.*, 1988; Omura, 2008). El hecho que la cepa S1-PI6 no consiga disminuir tanto la producción de diacetilo, puede ser debido a 2 motivos principales:

- 1- En muchas investigaciones se ha sobreexpresado el gen *ILV5* en cepas de laboratorio que se caracterizan por ser haploides o diploides. En la cepa S1-PI6 sólo se ha sobreexpresado una copia del gen *ILV5*, quedando sin sobreexpresar las otras 3 copias del mismo gen.
- 2- La sobreexpresión del gen *ILV5* normalmente se ha llevado a cabo con plásmidos multicopia. Es razonable suponer que mediante la transformación con plásmidos se consiga una mayor sobreexpresión del gen *ILV5* que en el caso de la sustitución del promotor original con un promotor fuerte.

5. La inactivación del gen *INP51* no incrementa la resistencia al frío en cepas industriales

El gen *INP51/YIL002C* codifica para una enzima inositol polifosfato 5-fosfatasa, implicada en la homeostasis del inositol 4, 5-difosfato, y cuya pérdida de función provoca la acumulación de dicho metabolito. Stolz *et al.* (1998) han descrito un aumento en la tolerancia al frío del mutante *inp51*, pues se ha observado que dicho mutante crece significativamente más rápido con respecto a la cepa salvaje a temperaturas inferiores a los 15 °C. El mecanismo por el cual dicha mutación confiere mayor capacidad de crecimiento a bajas temperaturas se desconoce. Resulta poco probable que se deba directamente al aumento de fosfolípidos totales de la levadura, ya que el inositol 4,5-difosfato representa una fracción minoritaria (0,01%). Algunos autores postulan que el mecanismo por el que la eliminación de este gen confiere mejor crecimiento a bajas temperaturas presenta muchas analogías con el caso de *Arabidopsis* y su tolerancia al frío a través de cambios en la fluidez y/o permeabilidad de las membranas (Miquel *et al.*, 1993; Murata *et al.*, 1992).

Como se puede observar en la Figura 32, la inactivación del gen *INP51* no aumenta la resistencia al frío de la cepa M69 en ninguno de los medios de cultivos ensayados. En el caso de la cepa W303-1A, sí se observa una mejora en el crecimiento a bajas temperaturas de los transformantes con respecto a la cepa salvaje, sin embargo dicha diferencia desaparece cuando se añade al medio de cultivo el aminoácido triptófano.

Se ha descrito que el mutante *inp51* presenta una mayor velocidad de incorporación de triptófano que la cepa parental, lo que sugiere que quizás el efecto de mejora del crecimiento a baja temperatura de dicho mutante se ejerce por activación, bien directa o indirectamente, de alguna de las permeasas de triptófano (*TAT1* y *TAT2*). Mutaciones en la maquinaria de transporte o de biosíntesis del triptófano están asociadas frecuentemente con cambios en la capacidad de crecimiento a baja temperatura, incluso en presencia de triptófano en el medio de cultivo (Chen *et al.*, 1994; Singh *et al.*, 1974; Schmidt *et al.*, 1994; Nagayama *et al.*, 2004). Por lo tanto, es posible que las cepas de levaduras de laboratorio auxótrofas para el triptófano, resulten beneficiadas de esta mayor velocidad de incorporación. Por otro lado, en las cepas de levaduras industriales, generalmente protótrofas, la incorporación de triptófano no resulta ser un factor limitante para su crecimiento a bajas temperaturas. Por tanto, nuestros resultados confirman la hipótesis formulada por otros autores (Stolz *et al.*, 1998) de que el efecto

que la inactivación del gen *INP51* tiene sobre el crecimiento a bajas temperaturas está relacionado con la biodisponibilidad de triptófano.

Otro factor a tener en consideración es que en la cepa M69-DI6 sólo se han inactivado las 2 copias del gen *INP51* correspondientes a alelos procedentes del genoma de *S. cerevisiae*. La cepa Lalvin M69 aparece descrita como un *S. cerevisiae*, sin embargo, como se mencionó en la Introducción, varias investigaciones han demostrado que cepas catalogadas como *S. cerevisiae* en realidad eran híbridos entre dos o más especies. Por lo tanto, existe la posibilidad que la cepa utilizada sea en realidad un híbrido y que en la cepa M69-DI6 esté presente alguna copia activa de un gen homeólogo al gen *INP51*.

CONCLUSIONES

1. Se ha desarrollado y comprobado la validez del concepto de “Evolución Genómica por Diseño Molecular”, así como su aplicación en el desarrollo de levaduras industriales con características de interés para las empresas agroalimentarias. Este nuevo concepto aspira soslayar las conocidas reticencias que pesan sobre los OMG y frenan su aplicación en la tecnología de alimentos.
2. La técnica puesta a punto en este trabajo, permite realizar “*a priori*” un diseño molecular para seleccionar una reorganización del genoma nuclear de una levadura que corresponda a una translocación cromosómica recíproca concreta. Como resultado se obtiene una cepa evolucionada, en cuyo genoma no aparece ningún nucleótido o secuencia de nucleótidos que no estuviera ya presente en la cepa parental, pero diferenciándose por la presencia del nuevo fenotipo o característica que el diseño original perseguía.
3. Mediante la metodología aplicada, se consigue la eliminación de las construcciones portadoras de los genes marcadores de resistencia, reduciendo de tal forma las reordenaciones génicas al mínimo necesario para alcanzar el objetivo propuesto. Además, ello permite que se pueda volver a usar el mismo casete de selección para introducir en una cepa ya evolucionada otras características adicionales que también presenten interés industrial.
4. El aumento en la expresión del gen *YAP1* produce un marcado decremento de la aparición de mutantes petites en la cepa industrial S1 de producción de cerveza tipo “lager”. Este resultado sugiere que las cepas de levadura con mayor potencial antioxidante tienen una menor predisposición a producir mutantes petites.
5. Aplicando el concepto de evolución genómica por diseño molecular, se ha obtenido una cepa de levadura industrial con muy alta actividad endopoligalacturonasa. Las aplicaciones de esta modificación genética son múltiples en la industria agroalimentaria.
6. Aplicando el concepto de evolución genómica por diseño molecular, se ha obtenido una cepa de levadura cervecera con elevada expresión del gen *ILV5*. La cepa evolucionada consigue disminuir en más de 10 días, con respecto a la cepa parental S1, el tiempo de guarda o “lagering”.
7. La inactivación del gen *INP51* en la levadura enológica M69, no mejora su capacidad de crecimiento a bajas temperaturas en ninguno de los medios de cultivo ensayados. En el caso de la levadura de laboratorio W303-1A, sí se

observa una mejora en el crecimiento a bajas temperaturas de las cepas evolucionadas con respecto a la cepa parental. Sin embargo, dicha diferencia desaparece cuando se añade triptófano al medio de cultivo.

BIBLIOGRAFÍA

- Adams, J., Puskas-Rozsa, S., Simlar, J. and Wilke, C. M. Adaptation and major chromosomal changes in populations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.* **22**, 13-19 (1992).
- Adams, A., Gottschling, D. E., Kaiser, C. A. and Stearn, T. *Methods in Yeast Genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (1997).
- Akada, R., Shimizu, Y., Matsushita, Y., Kawahata, M., Hoshida, H. and Nishizawa, Y. Use of a *YAPI* overexpression cassette conferring specific resistance to cerulenin and cycloheximide as an efficient selectable marker in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **19**, 17-28 (2002).
- Akada, R., Kitagawa, T., Kaneko, S., Toyonaga, D., Ito, S., Kakihara, Y., Hoshida, H., Morimura, S., Kondo, A. and Kida, K. PCR-mediated seamless gene deletion and marker recycling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**, 399-405 (2006).
- Alani, E., Cao, L. and Kleckner, N. A method for gene disruption that allows repeated use of *URA3* selection in the construction of multiply disrupted yeast strains. *Genetics* **116**, 541-545 (1987).
- Alper, H., Moxley, J., Nevoigt, E., Fink, G. R. and Stephanopoulos, G. Engineering yeast transcription machinery for improved ethanol tolerance and production. *Science* **314**, 1565-1568 (2006).
- Andalis, A. A., Storchova, Z., Styles, C., Galitski, T., Pellman, D. and Fink, G. R. Defects arising from whole-genome duplications in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **167**, 1109-1121 (2004).
- Ando, A., Suzuki, C. and Shima, J. Survival of Genetically Modified and Self-Cloned Strains of Commercial Baker's Yeast in Simulated Natural Environments: Environmental Risk Assessment. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 7075-7082 (2005).
- Antunovics, Z., Irinyi, L. and Sipiczki, M. Combined application of methods to taxonomic identification of *Saccharomyces* strains in fermenting botrytized grape must. *J. Appl. Microbiol.* **98**, 971-979 (2005).
- Aritomi, K., Hirosawa, I., Hoshida, H., Shiigi, M., Nishizawa, Y., Kashiwagi, S. and Akada, R. Self-cloning yeast strains containing novel *FAS2* mutations produce a higher amount of ethyl caproate in Japanese sake. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **68**, 206-214 (2004).
- Attfield, P. V. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnol.* **15**, 1351-1357 (1997).
- Attfield, A. V. and Bell, P. J. L. Genetics and Classical Genetic Manipulations of Industrial Yeasts in Winde, J. H. d. (Ed), *Functional genetics of industrial yeasts*, pp. 17-55 (2003).
- Bailey, J. E. Toward a science of metabolic engineering. *Science* **252**, 1668-75 (1991).

- Bailey, J. E., Sburlati, A., Hatzimanikatis, V., Lee, K., Renner, W. A. and Tsai, P. S. Inverse metabolic engineering: a strategy for directed genetic engineering of useful phenotypes. *Biotechnol. Bioeng.* **79**, 568-579 (2002).
- Ball, C. A., Jin, H., Sherlock, G., Weng, S., Matese, J. C., Andrada, R., Binkley, G., Dolinski, K., Dwight, S. S., Harris, M. A., Issel-Tarver, L., Schroeder, M., Botstein, D. and Cherry, J. M. *Saccharomyces* Genome Database provides tools to survey gene expression and functional analysis data. *Nucleic Acids Res.* **29**, 80-81 (2001).
- Balzi, E. and Goffeau, A. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. *Biochim. Biophys. Acta* **1187**, 151-162 (1994).
- Bamforth, C. *Beer: Tap into the Art and Science of Brewing* (Third edition. Oxford University Press, 2009).
- Barnes, W. M. The fidelity of *Taq* polymerase catalyzing PCR is improved by an N-terminal deletion. *Gene* **112**, 29-35 (1992).
- Bateman, J. M., Iacovino, M., Perlman, P. S. and Butow, R. A. Mitochondrial DNA instability mutants of the bifunctional protein Ilv5p have altered organization in mitochondria and are targeted for degradation by Hsp78 and the Pim1p protease. *J. Biol. Chem.* **277**, 47946-47953 (2002).
- Bateman, J. M., Perlman, P. S. and Butow, R. A. Mutational Bisection of the Mitochondrial DNA Stability and Amino Acid Biosynthetic Functions of Ilv5p of Budding Yeast. *Genetics* **161**, 1043-1052 (2002).
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F. and Cullin, C. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **21**, 3329-3330 (1993).
- Bauer, F. F. and Pretorius, I. S. Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine - a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 27-51 (2000).
- Bauer, F., Dequin, S., Pretorius, I., Shoeman, H., Wolfaardt, M. B., Schroeder, M. B. and Grossmann, M. K. The assessment of the environmental impact of genetically modified wine yeast strains. *Proceedings of the "Actes de 83ème Assemblée Générale de l'O.I.V"* (2003).
- Becker, J. V. W., Armstrong, G. O., Van Der Merwe, M. J., Lambrechts, M. G., Vivier, M. A. and Pretorius, I. S. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for the synthesis of the wine-related antioxidant resveratrol. *FEMS Yeast Res.* **4**, 79-85 (2003).
- Beekwilder, J., Wolswinkel, R., Jonker, H., Hall, R., de Vos, C. H. R. and Bovy, A. Production of resveratrol in recombinant microorganisms. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5670-5672 (2006).
- Bennett, P. M., Livesey, C. T., Nathwani, D., Reeves, D. S., Saunders, J. R. and Wise, R. An assessment of the risks associated with the use of antibiotic resistance genes in

genetically modified plants: report of the Working Party of the British Society for Antimicrobial Chemotherapy. *J. Antimicrob. Chemother.* **53**, 418-431 (2004).

Blanco, P., Sieiro, C., Diaz, A. and Villa, T. G. Production and partial characterization of an endopolygalacturonase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol.* **40**, 974-977 (1994).

Blanco, P., Sieiro, C., Reboredo, N. M. and Villa, T. G. Cloning, molecular characterization, and expression of an endopolygalacturonase-encoding gene from *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b. *FEMS Microbiol. Lett.* **164**, 249-255 (1998).

Blieck, L., Toye, G., Dumortier, F., Verstrepen, K. J., Delvaux, F. R., Thevelein, J. M. and Van Dijck, P. Isolation and Characterization of Brewer's Yeast Variants with Improved Fermentation Performance under High-Gravity Conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 815-824 (2007).

Bonawitz, N. D., Rodeheffer, M. S. and Shadel, G. S. Defective mitochondrial gene expression results in reactive oxygen species-mediated inhibition of respiration and reduction of yeast life span. *Mol. Cell. Biol.* **26**, 4818-4829 (2006).

Boone, C., Sommer, S. S., Hensel, A. and Bussey, H. Yeast *KRE* genes provide evidence for a pathway of cell wall beta-glucan assembly. *J. Cell Biol.* **110**, 1833-1843 (1990).

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

Borneman, A. R., Desany, B. A., Riches, D., Affourtit, J. P., Forgan, A. H., Pretorius, I. S., Egholm, M. and Chambers, P. J. The genome sequence of the wine yeast VIN7 reveals an allotriploid hybrid genome with *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces kudriavzevii* origins. *FEMS Yeast Res.* **12**, 88-96 (2012).

Boulton, C. and Quain, D. *Brewing yeast and fermentation* (Blackwell Science Ltd., Oxford, 2001).

Bryksin, A. V. and Matsumura, I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *BioTechniques* **48**, 463-465 (2010).

Brody, J. R. and Kern, S. E. Sodium boric acid: a Tris-free, cooler conductive medium for DNA electrophoresis. *Biotechniques* **36**, 214-216 (2004).

Brosnan, M. P., Donnelly, D., James, T. C. and Bond, U. The stress response in repressed during fermentation in brewery strains of yeast. *J. Appl. Microbiol.* **88**, 746-755 (2000).

Brown, S. L., Stockdale, V. J., Pettolino, F., Pocock, K. F., De Barros Lopes, M., Williams, P. J., Bacic, A., Fincher, G. B., Høj, P. B. and Waters, E. J. Reducing haziness in white wine by overexpression of *Saccharomyces cerevisiae* genes YOL155c and YDR055w. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **73**, 1363-1376 (2007).

- Byrne, K. P. and Wolfe, K. H. Consistent patterns of rate asymmetry and gene loss indicate widespread neofunctionalization of yeast genes after whole-genome duplication. *Genetics* **175**, 1341-1350 (2007).
- Burke, D., Dawson, D. and Stearns, T. *Methods in yeast genetics: A Cold Spring Harbor Laboratory Course Manual*. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory (2000).
- Casaregola S., Nguyen, H. V., Lapathitis, G., Kotyk, A. and Gaillardin, C. Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* **51**, 1607-1618 (2001).
- Caesar, R., Palmfeldt, J., Gustafsson, J. S., Pettersson, E., Hashemi, S. H. and Blomberg, A. Comparative proteomics of industrial lager yeast reveals differential expression of the *cerevisiae* and non-*cerevisiae* parts of their genomes. *Proteomics* **7**, 4135-4147 (2007).
- Cagniard-Latour, C. Mémoire sur la fermentation vineuse. *Compt. Rend.* **4**, 905-906 (1837).
- Carrasco, P., Querol, A. and del Olmo, M. Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strain. *Arch. Microbiol.* **175**, 450-457 (2001).
- Cavalieri, D., Townsend, J. P. and Hartl, D. L. Manifold anomalies in gene expression in a vineyard isolate of *Saccharomyces cerevisiae* revealed by DNA microarray analysis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **24**, 12369-12374 (2000).
- Cebollero, E., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L. and Gonzalez, R. Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? *Biotechnol. Lett.* **29**, 191-200 (2007).
- Chatonnet, P., Dubordieu, P. and Boidron, J. N. Le caractère phenolé des vins rouges: caractérisation, origine et moyen de lutte. *Rev. Fr. Oenol.* **138**, 21-24 (1992).
- Chen, C., Wanduragala, S., Becker, D. F. and Dickman, M. B. Tomato QM-like protein protects *Saccharomyces cerevisiae* cells against oxidative stress by regulating intracellular proline levels. *Appl Environ Microbiol.* **72**, 4001-4006 (2006).
- Chen, X. H., Xiao, Z. and Fitzgerald-Hayes, M. SCM2, a tryptophan permease in *Saccharomyces cerevisiae*, is important for cell growth. *Mol. Gen. Genet.* **244**, 260-268 (1994).
- Cherry, J. M., Adler, C., Ball, C., Chervitz, S. A., Dwight, S. S., Hester, E. T., Jia, Y., Juvik, G., Roe, T., Schroeder, M., Weng, S. and Botstein, D. SGD: *Saccharomyces* Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **26**, 73-79 (1998).
- Cliften, P. F., Fulton, R. S., Wilson R. K. and Johnston, M. After the Duplication: Gene Loss and Adaptation in *Saccharomyces* Genomes. *Genetics* **182**, 863-872 (2006).

- Codex Alimentarius Commission. Guideline for the conduct of food safety assessment of foods produced using recombinant-DNA microorganisms. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, Rome, CAC GL 46-2003.
- Codón, A. C., Benitez, T. and Korhola, M. Chromosomal polyphormism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**, 154-163 (1998).
- Coloretti, F., Zambonelli, C. and Tini, V. Characterization of flocculent *Saccharomyces* interspecific hybrids for the production of sparkling wines. *Food Microbiol.* **23**, 672-676 (2006).
- Colson, I., Delneri, D. and Oliver, S. G. Effects of reciprocal chromosomal translocations on the fitness of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Rep.* **5**, 392-398 (2004).
- Cordente, A. G., Heinrich, A., Pretorius, I. S. and Swiegers, J. H. Isolation of sulfite reductase variants of a commercial wine yeast with significantly reduced hydrogen sulfide production. *FEMS Yeast Res.* **9**, 446-459 (2009).
- Cordero-Bueso, G., Arroyo, T., Serrano, A. and Valero, E. Remanence and survival of commercial yeast in different ecological niches of the vineyard. *FEMS Microbiol. Ecol.* **77**, 429-437(2011).
- Coulon, J., Husnik, J. I., Inglis, D. L., Van der Merwe, G. K., Lonvaud, A., Erasmus, D. J. and Van Vuuren, H. J. J. Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* to minimize the production of ethyl carbamate in wine. *Am. J. Enol. Viticult.* **57**, 113-124 (2006).
- Dale, P. J., Clarke, B. and Fontes, E. M. G. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nat. Biotechnol.* **20**, 567-574 (2002)
- Deckwer, W. -D., Jahn, D., Hempel, D. and Zeng, A. -P. Systems biology approaches to bioprocess development. *Eng. Life Sci.* **6**, 455-469 (2006).
- Demuyter, C., Lollier, M., Legras, J. L. and Le Jeune, C. Predominance of *Saccharomyces uvarum* during spontaneous alcoholic fermentation, for three consecutive years, in an Alsatian winery. *J. Appl. Microbiol.* **97**, 1140-1148 (2004).
- Deng, C. and Capecchi, M. Reexamination of gene targeting frequency as a function of the extent of homology between the targeting vector and the target locus. *Mol. Cell. Biol.* **12**, 3365-3371 (1992).
- Dequin, S., Baptista, E. and Barre, P. Acidification of grape musts by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts strains genetically engineered to produce lactic acid. *Am. J. Enol. Viticult.* **50**, 45-50 (1999).
- Dequin, S. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 577-588 (2001).

- Derbise, A., Chenal-Francisque, V., Pouillot, F., Fayolle, C., Prévost, M. C., Médigue, C., Hinnebusch, B. J. and Carniel, E. A horizontally acquired filamentous phage contributes to the pathogenicity of the plague bacillus. *Mol. Microbiol.* **63**, 1145-1157 (2007).
- De Vries, R. P. and Visser, J. *Aspergillus* enzymes involved in degradation of plant cell wall polysaccharides *Microb. Mol. Biol. Rev.* **65**, 497-522 (2001).
- Dietrich, F. S., Voegeli, S., Brachat, S., Lerch, A. and Gates, K. The *Ashbya gossypii* genome as a tool for mapping the ancient *Saccharomyces cerevisiae* genome. *Science* **304**, 304-307 (2004).
- Dietvorst, J., Londesborough, J. and Steensma, H. Y. Maltotriose utilization in lager yeast strains: *MTT1* encodes a maltotriose transporter. *Yeast* **22**, 775-788 (2005).
- Dixon, B. Yeast as factory and factotum. *Biologist* **47**, 15-18 (2000).
- Donalies, U. E. B. and Stahl, U. Increasing sulphite formation in *Saccharomyces cerevisiae* by overexpression of *MET14* and *SSU1*. *Yeast* **19**, 475-484 (2002).
- Dong, J., Wang, G., Zhang, C., Tan, H., Sun, X., Wu, M. and Xiao, D. A two step integration method for seamless gene deletion in baker's yeast. *Anal. Biochem.* **439**, 30-36 (2013).
- Drobna, E., Gazdag, Z., Culakova, H., Dzugasova, V., Gbelska, Y., Pesti, M. and Subik, J. Overexpression of the *YAP1*, *PDE2*, and *STB3* genes enhances the tolerance of yeast to oxidative stress induced by 7-chlorotetrazolo[5,1-c]benzo[1,2,4]triazine. *FEMS Yeast Res.* **12**, 958-968 (2012).
- Dykhuizen, D. E. and Hartl, D. L. Selection in chemostats. *Microbiol. Rev.* **47**, 150-168 (1983).
- Dujon, B., Sherman, D., Fischer, G., Durrens, P., Casaregola, S., Lafontaine, I., De Montigny, J., Marck, C., Neuveglise, C., Talla, E., Goffard, N., Frangeul, L., Aigle, M., Anthouard, V., Babour, A., Barbe, V., Barnay, S., Blanchin, S., Beckerich, J. M., Beyne, E., Bleykasten, C., Boisrame, A., Boyer, J., Cattolico, L., Confanioleri, F., De Daruvar, A., Despons, L., Fabre, E., Fairhead, C., Ferry-Dumazet, H., Groppi, A., Hantraye, F., Hennequin, C., Jauniaux, N., Joyet, P., Kachouri, R., Kerrest, A., Koszul, R., Lemaire, M., Lesur, I., Ma, L., Muller, H., Nicaud, J. M., Nikolski, M., Oztas, S., Ozier-Kalogeropoulos, O., Pellenz, S., Potier, S., Richard, G.F., Straub, M.L., Suleau, A., Swennen, D., Tekaia, F., Wesolowski-Louvel, M., Westhof, E., Wirth, B., Zeniou-Meyer, M., Zivanovic, I., Bolotin-Fukuhara, M., Thierry, A., Bouchier, C., Caudron, B., Scarpelli, C., Gaillardin, C., Weissenbach, J., Wincker, P. and Souciet, J. L. Genome evolution in yeasts. *Nature* **430**, 35-44 (2004).
- Dunham, M. J., Badrane, H., Ferea, T., Adams, J., Brown, P. O., Rosenzweig, F. and Botstein, D. Characteristic genome rearrangements in experimental evolution of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 16144-16149 (2002).

- Dunn, B. and Sherlock, G. Reconstruction of the genome origins and evolution of the hybrid lager yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Genome Res.* **18**, 1610-1623 (2008).
- Du Toit, M. and Pretorius, I. S. Microbial spoilage and preservation of wine: using weapons for nature's own arsenal – A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 74-96 (2000).
- Dutoit, R., Evelyne Dubois, E. and Eric Jacobs, E. Selection systems based on dominant-negative transcription factors for precise genetic engineering. *Nucleic Acids Res.* **38**, 6313-6323 (2010).
- Eschstruth, A. and Divol, B. Comparative characterization of endo-polygalacturonase (Pgu1) from *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* under winemaking conditions. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **91**, 623-634 (2011).
- Eglinton, J. M., Heinrich, A. J., Pollnitz, A. P., Langridge, P., Henschke, P. A. and Barros Lopes, M. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the *ALD6* aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast* **19**, 295-301 (2002).
- Enari, T. M., Nikkola, M., Suihko, M. L., Penttilä, M. and Knowles, J. Yeast strains suitable for accelerated brewing. US Patent 7,044,244 (1987).
- Erdeniz, N., Mortensen, U. H. and Rothstein, R. Cloning-free PCR-based allele replacement methods. *Genome Res*, **7**, 1174-1183 (1997).
- Estruch, F. and Prieto, J. A. Construction of a Trp commercial baker's yeast strain by using food-safe grade dominant drug resistance cassettes. *FEMS Yeast Res.* **4**, 329-338 (2003).
- European Commission. Council Directive 90/220/EEC of 23 April 1990 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms. *OJ L117*, 15-27 (1990).
- European Commission. Regulation (EC) N° 258/97 of the European Parliament and of the Council concerning novel foods and novel food ingredients. *OJ L43*, 1-7 (1997a).
- European Commission. Directive 98/81/EC of the European Parliament and of the Council of 26 October 1998 amending Directive 90/219/EEC on the contained use of genetically modified micro-organisms. *OJ L330*, 13-31 (1998).
- European Commission. Directive 2001/18/EC of the European Parliament and of the Council of 12 March 2001 on the deliberate release into the environment of genetically modified organisms and repealing Council Directive 90/220/EEC. *OJ L106*, 1-39 (2001).
- European Commission. Regulation (EC) No 1829/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 on genetically modified food and feed. *OJ L268*, 1-23 (2003a).

European Commission. Regulation (EC) No 1830/2003 of the European Parliament and of the Council of 22 September 2003 concerning the traceability and labelling of genetically modified organisms and the traceability of food and feed products produced from genetically modified organisms and amending Directive 2001/18/EC. *OJ L268*, 24-28 (2003b).

European Commission. Regulation (EC) No 65/2004 of 14 January 2004 establishing a system for the development and assignment of unique identifiers for genetically modified organisms. *OJ L10*, 5-10 (2004).

Falk, B. W. and Bruening, G. Will transgenic crops generate new viruses and new diseases? *Science* **263**, 1395-1396 (1994).

Fan, X., He, X., Guo, X., Qu, N., Wang, Ch. and Zhang, B. Increasing glutathione formation by functional expression of the γ -glutamylcysteine synthetase gene in *Saccharomyces cerevisiae*, *Biotechnol. Lett.* **26**, 415-417 (2004).

Fernández-González, M., Úbeda, J. F., Vasudevan, T. G., Cordero Otero, R. R. and Briones, A. I. Evaluation of polygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *FEMS Microbiol. Lett.* **237**, 261-266 (2004).

Fernandez-Gonzalez, M., Úbeda, F., Cordero-Otero, R. R., Thanvanthri Gururajan, V. and Briones, A. I. Engineering of an oenological *Saccharomyces cerevisiae* strain with pectinolytic activity and its effect on wine. *Int. J. Food Microbiol.* **102**, 173-183 (2005).

Fernandez-Ricaud, L., Warringer, J., Ericson, E., Glaab, K., Davidsson, P., Nilsson, F., Graham J. L. Kemp, G. J. L., Nerman, O. and Blomberg, A. PROPHECY- a yeast phenome database, update 2006. *Nucleic Acids Res.* **35** (Database issue), D463-D467 (2007).

Flagfeldt, D. B., Siewers, V. and Nielsen, J. Characterization of chromosomal integration sites for heterologous gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **26**, 545-551 (2009).

Frewer, L., Howard, C. and Shepherd, R. Public concerns in the United Kingdom about general and specific applications of genetic engineering: Risks, benefits and ethics. *Sci. Technol. Hu. Val.* **22**, 98-124 (1997).

Frewer, L. Societal issues and public attitudes towards genetically modified foods. *Trends Food Sci Technol.* **14**, 319-332 (2003).

Fujimura, H., Sakuma, Y. and Amann, E. Survival of genetically engineered and wild-type strains of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under simulated environmental conditions: a contribution on risk assessment. *J. Appl. Bacteriol.* **77**, 689-693 (1994).

Gasent-Ramirez J. M., Codón, A. C. and Benítez, T. Characterization of genetically transformed *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts able to metabolize melibiose. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 2113-2121 (1995).

Gasent-Ramirez, J. M., Castrejón, F., Querol, A., Ramon, D. and Benitez, T. Genomic stability of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Syst. Appl. Microbiol.* **22**, 329-340 (1999).

Gaskell, G., Allansdóttir, A., Allum, N., Corchero, C., Fischler, C., Hampel, J., Jackson, J., Kronberger, N., Mejlgård, N., Revuelta, G., Schreiner, C., Stares, S., Torgersen, H. and Wagner, W. Europeans and Biotechnology in 2005: Patterns and Trends. Disponible en http://ec.europa.eu/research/press/2006/pdf/pr1906_eb_64_3_final_report-may2006_en.pdf (2006).

Gaskell, G., Stares, S., Allansdóttir, A., Allum, N., Castro, P., Esmer, Y., Fischler, C., Jackson, J., Kronberger, N., Hampel, J., Mejlgård, N., Quintanilha, A., Rammer, A., Revuelta, G., Stoneman, P., Torgersen, H. and Wagner, W. Europeans and Biotechnology in 2010: Patterns and Trends. Disponible en http://ec.europa.eu/public_opinion/archives/ebs/ebs_341_winds_en.pdf (2010).

Gaugitsch, H. Experience with environmental issues in GM crop production and the likely future scenarios. *Toxicol Lett.* **127**, 351-357 (2002).

Geladé, R., Van de Velde, S., Van Dijck, P. and Thevelein, M. J. Multi-level response of the yeast genome to glucose. *Gen. Biol.* **4**, 233 (2003).

Gibson, B. R., Cheung, A. W. Y., Saddiq Zahari, M. and Smart, K. A. Ethanol, membrane permeability and petite mutation in lager brewing yeast. *Tech. Q. Master Brew. Assoc. Am.* doi:10.1094/TQ-46-2-0428-01 (2009).

Gietz, R. D. and Woods, R. A. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol.* **350**, 87-96 (2002).

Godtfredsen, S. E. and Ottesen, M. Maturation of beer with α -acetolactate decarboxylase *Carlsberg Res. Comm.* **47**, 93-102 (1982).

Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., Johnston, M., Louis, E. J., Mewes, H. W., Murakami, Y., Philippsen, P., Tettelin, H. and Oliver, S. G. Life with 6000 genes. *Science* **274**, 563-567 (1996).

Goffeau, A. Four years of post-genomic life with 6000 yeast genes. *FEBS Lett.* **480**, 37-41 (2000).

Gong, W. J. and Golic, K. G. Ends-out, or replacement, gene targeting in *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 2556-2561 (2003).

Gognies, S., Gainvors, A., Aigle, M. and Belarbi, A. Cloning, sequence analysis and overexpression of a *Saccharomyces cerevisiae* endopolygalacturonase-encoding gene (*PGL1*). *Yeast* **15**, 11-22 (1999).

González, S., Barrio, E., Gafner, J. and Querol, A. Natural hybrids from *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces kudriavzevii* in wine fermentations. *FEMS Yeast Res.* **6**, 122-134 (2006).

González, S., Barrio, E. and Querol, A. Molecular characterization of new natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *S. kudriavzevii* in brewing. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2314-2320 (2008).

Gonzalez-Ramos, D., Cebollero, E. and Gonzalez, R. A recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain overproducing mannoproteins stabilizes wine against protein haze. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 5533-5540 (2008).

González, I. Aislamiento e identificación de genes de *Saccharomyces cerevisiae* implicados en la tolerancia al frío, Tesis Doctoral, Universidad Politécnica de Valencia, 2009.

Govender, P., Bester, M. and Bauer, F. F. *FLO* gene-dependent phenotypes in industrial wine yeast strains. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **86**, 931-945 (2010).

Green, M. R. and Sambrook, J. *Molecular cloning. A laboratory manual* (fourth edition) (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 2012).

Gresham, D., Desail, M. M., Tucker, C. M., Jenq, H. T., Pai, D. A., Ward, A., Desevo, C. G., Botstein, D. and Dunham, M. J. The repertoire and dynamics of evolutionary adaptations to controlled nutrient-limited environments in yeast. *PLoS Genet.* **4**, 1-19 (2008).

Grohmann, K., Cameron, R. G. and Buslig, B. S. Fermentation of sugars in orange peel hydrolysates to ethanol by recombinant *Escherichia coli* K011. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51/52**, 423-435 (1995).

Guijo, S., Mauricio, J. C., Salmon, J. M. and Ortega, J. M. Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and “flor” film ageing of dry sherry-type wine. *Yeast* **13**, 101-117 (1997).

Guldener, U., Münsterkötter, M., Kastenmüller, G., Strack, N., van Helden, J., Lemer, C., Richelles, J., Wodak, S. J., García-Martínez, J., Pérez-Ortín, J. E., Michael, H., Kaps, A., Talla, E., Dujon, B., André, B., Souciet, J. L., De Montigny, J., Bon, E., Gaillardin, C. and Mewes, H. W. CYGD: the Comprehensive Yeast Genome Database. *Nucleic Acids Res.* **33**, D364-8 (2005).

Hammond, J. R. Genetically-modified brewing yeast for the 21st century. Progress to date. *Yeast* **11**, 1613-1627 (1995).

Hanahan, D. Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-580 (1983).

Hansen, E. C. Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques V. Methodes pour obtenir des cultures pures de *Saccharomyces* et de mikroorganismes analogues. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **2**, 92-105 (1883).

Hansen, E. C. Recherches sur la physiologie et la morphologie des ferments alcooliques. XIII. Nouvelles études sur des levures de brasserie à fermentation basse. *Compt. Rend. Trav. Lab. Carlsberg* **7**, 179-217 (1908).

Hansen, J. and Kielland-Brandt, M. C. Inactivation of *MET2* in brewer's yeast increases the level of sulphite in beer. *J. Biotechnol.* **50**, 75-87 (1996).

Hao, R. Y., Liu, Y. L., Wang, Z. Y. and Zhang, B. R. Construction of self-cloning, indigenous wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* with enhanced glycerol and glutathione production. *Biotechnol. Lett.* **34**, 1711–1717 (2012).

Harris, N., Costa, V., MacLean, M., Mollapour, M., Moradas-Ferreira, P. and Piper, P. W. MnSOD overexpression extends the yeast chronological (G_0) life span but acts independently of Sir2p histone deacetylase to shorten the replicative life span of dividing cells. *Free Radic. Biol. Med.* **34**, 1599-1606 (2003).

Hashida-Okado, T., Ogawa, A., Endo, M., Yasumoto, R., Takesako, K. and Kato, I. *AUR1*, a novel gene conferring aureobasidin resistance on *Saccharomyces cerevisiae*: a study of defective morphologies in Aur1p-depleted cells. *Mol. Gen. Genet.* **251**, 236-244 (1996).

Hastings, P. J., McGill, C., Shafert, B. and Strathem, J. N. Ends-In vs. Ends-Out recombination in yeast. *Genetics*, **135**, 973-980 (1993).

Hauser, N. C., Fellenberg, K., Gil, R., Bastuck, S., Hoheisel, J. D. and Jeffries, T. W. Whole genome analysis of wine yeast strain. *Comp. Funct. Genomics* **2**, 69-79 (2001).

Hawkins, N. C., Garriga, G. and Beh, C. T. Creating precise GFP fusions in plasmids using yeast homologous recombination. *Biotechniques* **34**, 74-80 (2003).

Herrero, O., Ramon, D. and Orejas, M. Engineering the *Saccharomyces cerevisiae* isoprenoid pathway for *de novo* production of aromatic monoterpenes in wine. *Metab. Eng.* **10**, 78-86 (2008).

Heux, S., Sablayrolles, J. M., Cachon, R. and Dequin, S. Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 5822-5828 (2006).

Hinnen, A., Hicks, J. B. and Fink, G. R. Transformation of yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **75**, 1929-1933 (1978).

Hino, A. Safety assessment and public concerns for genetically modified food products: the Japanese experience. *Toxicol. Pathol.* **30**, 126-128 (2002).

Hirosawa, I., Aritomi, K., Hoshida, H., Kashiwagi, S., Nishizawa, Y. and Akada, R. Construction of a self-cloning sake yeast that overexpresses alcohol acetyltransferase gene by a two-step gene replacement protocol. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **65**, 68-73 (2004).

- Hittinger, C. T. *Saccharomyces* diversity and evolution: a budding model genus. *Trends Genet.* **29**, 309-317 (2013).
- Hodges, P. E., Payne, W. E. and Garrels, J. I. The Yeast Protein Database (YPD): a curated proteome database for *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.* **26**, 68-72 (1998).
- Hollenberg, C. P. and Strasser, A. W. M. Improvement of baker's and brewer's yeast by gene technology. *Food Biotechnol.* **4**, 527-534 (1990).
- Holmes, D. S. and Quigley, M. A. rapid boiling method for the preparation of bacterial plasmids. *Anal. Biochem.* **114**, 193-197 (1981).
- Hornsey, I. *A history of beer and brewing*. (RSC Paperbacks, Cambridge, U. K., 2003).
- Horton, R. M., Hunt, H. D., Ho, S. N., Pullen, J. K. and Pease, L. R. Engineering hybrid genes without the use of restriction enzymes: gene splicing by overlap extension. *Gene* **77**, 61-68 (1989).
- Husnik, J. I., Volschenk, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z. and Van Vuuren, H. J. J. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metab. Eng.* **8**, 315-323 (2006).
- Inoue, H., Nojima, H. and Okayama, H. High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-28 (1990).
- Iijima, K. and Ogata, T. Construction and evaluation of self-cloning bottom-fermenting yeast with high *SSU1* expression. *J. Appl. Microbiol.* **109**, 1906-1913 (2010).
- James, T. C., Usher, J., Campbell, S. and Bond, U. Lager yeast possess dynamic genomes that undergo rearrangements and amplification in response to stress. *Curr. Genet.* **3**, 139-152 (2008).
- Jenkins, C. L., Lawrence, S. J., Kennedy, A. I., Thurston, P., Hodgson, J. A. and Smart, K. A. Incidence and Formation of Petite Mutants in Lager Brewing Yeast *Saccharomyces cerevisiae* (syn. *S. pastorianus*) Populations. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **67**, 72-80 (2009).
- Jia, J. and Wheals, A. E. Endopolygalacturonase genes and enzymes from *Kluyveromyces marxianus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genetics* **38**, 264-270 (2000).
- Johnston, S. A. and De Vit, M. J. Biolistic transformation of yeast. *Methods Mol. Biol.* **53**, 147-153 (1996).
- Jonas, D. A., Elmadfa, I., Engel, K. H., Heller, K. H., Kozianowski, G., König, A., Müller, D., Narbonne, J. F., Wackernagel, W. and Kleiner, J. Safety considerations of DNA in food. *Ann. Nutr. Metab.* **45**, 235-254 (2001).
- Joint FAO/WHO Food Standards Programme, Codex alimentarius: Foods derived from biotechnology (2004), descargable en <http://www.codexalimentarius.net>.

- Karreman, C. Fusion PCR, a one-step variant of the “megaprimer” method of mutagenesis. *Biotechniques* **24**, 736-742 (1998).
- Kawaguchi, A., Tomoda, H., Nozoe, S., Omura, S. and Okuda, S. Mechanism of action of cerulenin on fatty acid synthetase: effect of cerulenin on iodoacetamide-induced malonyl-CoA decarboxylase activity. *J. Biochem.* **92**, 7-12 (1982).
- Kees, P. Risks from GMOs due to Horizontal Gene Transfer. *Environ. Biosafety Res.* **7**, 123-149 (2008).
- Kellis, M., Birren, B. W. and Lander, E. S. Proof and evolutionary analysis of ancient genome duplication in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **428**, 617-624 (2004).
- Kitamoto, K., Oda, K., Gomi, K. and Takahashi, K. Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene. *Appl. Environ. Microbiol.* **57**, 301-306 (1991).
- Kodama, Y., Kielland-Brandt, M. C. and Hansen, J. Lager brewing yeast. In *Comparative genomics* (eds. P. Sunnerhagen and J. Piskur), pp. 145-164. Springer-Verlag, Berlin, 2005.
- Krogenus, K. and Gibson, B. R. 125th Anniversary Review: Diacetyl and its control during brewing fermentation. *J. Inst. Brew.* **119**, 86-97 (2013).
- Kuge, S. and Jones, N. *YAP1* dependent activation of *TRX2* is essential for the response of *Saccharomyces cerevisiae* to oxidative stress by hydroperoxides. *EMBO J.* **13**, 655-664 (1994).
- Kutyna, D. R., Varela, C., Stanley, G. A., Borneman, A. R., Henschke, P. A. and Chambers, P. J. Adaptive evolution of *Saccharomyces cerevisiae* to generate strains with enhanced glycerol production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **93**, 1175-1184 (2012).
- Kwast, K. E., Liang-Chuan, L., Menda, N., James, D. T., Aref, S. and Burke, P. V. Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of *Rox1* and other factors in mediating the anoxic response. *J. Bacteriol.* **184**, 250-265 (2002).
- Lack, G. Clinical risk assessment of GM foods. *Toxicol. Lett.* **127**, 337-340 (2002).
- Lancashire, W. E., Carter, A. T., Howard, J. J. and Wilde, R. J. Super-attenuating brewing yeast. *Eur. Brew. Conv. Proc. Congr.* **22**, 491-498 (1989).
- Langkjaer, R. B., Nielsen, M. L., Daugaard, P. R., Liu, W. and Piskur, J. Yeast chromosomes have been significantly reshaped during their evolutionary history. *J. Mol. Biol.* **304**, 271-288 (2000).

- Langkjaer, R. B., Cliften, P. F., Johnston, M. and Piskur, J. Yeast genome duplication was followed by asynchronous differentiation of duplicated genes. *Nature* **421**, 848-852 (2003).
- Langle-Rouault, F. and Jacobs, E. A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker. *Nucleic Acids Res.* **23**, 3079-3081 (1995).
- Lee, F. J. Modified protocol for yeast DNA mini-preparation. *Biotechniques* **12**, 677 (1992).
- Lee, J. C., Straffon, M. J., Jang, T. Y., Higgins, V. J., Grant, C. M. and Dawes, I. W. The essential and ancillary role of glutathione in *Saccharomyces cerevisiae* analysed using a grande *gsh1* disruptant strain. *FEMS Yeast Res.* **1**, 57-65 (2001).
- Lee, Y. T. and Bamforth, C. W. Variations in solubility of barley beta-glucan during malting and impact on levels of beta-glucan in wort and beer. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **67**, 67-71 (2009).
- Le Jeune, C., Lollier, M., Demuyter, C., Erny, C., Legras, J. L., Aigle, M. and Masneuf-Pomarede, I. Characterization of natural hybrids of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum*. *FEMS Yeast Res.* **7**, 540-549 (2007).
- Libkind, D., Hittinger, C., Valério, E., Gonçalves, C., Dover, J., Johnston, M., Gonçalves, P. and Sampaio, J. Microbe domestication and the identification of the wild genetic stock of lager-brewing yeast *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 14539-14544 (2011).
- Lilly, M., Bauer, F. F., Lambrechts, M. G., Swiegers, J. H., Cozzolino, D. and Pretorius, I. S. The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* **23**, 641-659 (2006).
- Liti, G., Peruffo, A., James, S. A., Roberts, I. N. and Louis, E. J. Inferences of evolutionary relationships from a population survey of LTR-retrotransposons and telomeric-associated sequences in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast* **22**, 177-192 (2005).
- Liti, G., Carter, D. M., Moses, A. M., Warringer, J., Parts, L., James, S. A., Davey, R. P., Roberts, I. N., Burt, A., Koufopanou, V., Tsai, I. J., Bergman, C. M., Bensasson, D., O'Kelly, M. J. T., van Oudenaarden, A., Barton, D. B. H., Bailes, E., Ba, A. N., Jones, M., Quail, M. A., Goodhead, I., Sims, S., Smith, F., Blomberg, A., Durbin, R. and Louis, E. J. Population genomics of domestic and wild yeasts. *Nature* **458**, 337-341 (2009).
- Liu, X. F., Wang, Z. Y., Wang, J. J., Lu, Y., He, X. P. and Zhang, B. R. Expression of *GAI* gene and disruption of *PEP4* gene in an industrial brewer's yeast strain. *Lett. Appl. Microbiol.* **49**, 117-123 (2009).
- Llorente, B., Durrens P., Malpertuy, A., Aigle, M., Artiguenave, F., Blandin, G., Bolotin-Fukuhara, M., Bon, E., Brottier, P., Casaregola, S., Dujon, B., de Montigny, J.,

Lépingle, A., Neuvéglise, C., Ozier-Kalogeropoulos, O., Potier, S., Saurin, W., Tekaiia, F., Toffano-Nioche, C., Wésolowski-Louvel, M., Wincker, P., Weissenbach, J., Souciet, J-L. and Gaillardin, C. Genomic exploration of the hemiascomycetous yeasts: 20. Evolution of gene redundancy compared to *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* **487**, 122-133 (2000).

Louw, C., Young, P. R., van Rensburg, P. and Divol, B. Regulation of endopolygalacturonase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **10**, 44-57 (2010).

Louw, C., Young, P. R., van Rensburg, P. and Divol, B. Epigenetic regulation of *PGUI* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **10**, 158-167 (2010).

Lu, Q. Seamless cloning and gene fusion. *Trends Biotechnol.* **23**, 199-207 (2005).

Macierzanka, M., Płotka, M., Pryputniewicz-Drobińska, D., Lewandowska, A., Lightowlers, R. and Marszałek, J. Maintenance and stabilization of mtDNA can be facilitated by the DNA-binding activity of Ilv5p. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 107-117 (2008).

Magadum, S., Banerjee, U., Murugan, P., Gangapur, D. and Ravikesavan, R. Gene duplication as a major force in evolution. *J. Genet.* **92**, 155-161 (2013).

Malherbe, D.F., Du Toit, M., Cordero Otero, R. R., Van Rensburg, P. and Pretorius, I. S. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **61**, 502-511 (2003).

Marin, D., Jimenez, A. and Lobato, M. F. Construction of an efficient amylolytic industrial yeast strain containing DNA exclusively derived from yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* **201**, 249-253 (2001).

Martin, T., Sherman, D. J. and Durrens, P. The Génolevures database. *C. R. Biol.* **334**, 585-589 (2011).

Masneuf, I., Hansen, J., Groth, C., Piskur, J. and Dubourdieu, D. X. New hybrids between *Saccharomyces sensu stricto* yeast species found among wine and cider production strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3887-3892 (1998).

McGovern, P. E., Fleming, S. J. and Katz, S. H. *The origins and ancient history of wine.* (Gordon and Breach, Luxembourg, 1995).

McGovern, P. E. *Ancient Wine: The Search for the Origins of Viniculture* (Princeton Univ. Press, Princeton, 2003).

McGovern, P.E., Zhang, J., Tang, J., Zhang, Z., Hall, G.R., Moreau, R.A., Nuñez, A. Butrym, E. D., Richards, M. P., Wang, C. S., Cheng, G., Zhao, Z. and Wang, C. Fermented beverages of pre- and protohistoric china. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 17593-17598 (2004).

Meyen, J. Jahresbericht über die resultate der arbeiten im felde der physiologischen botanik von dem jahre 1837. *Arch. Naturgesch.* **4**, 1-186 (1838).

Mewes, H. W., Frishman, D., Mayer, K. F. X., Münsterkötter, M., Noubibou, O., Pagel, P., Rattei, T., Oesterheld, M., Ruepp, A. and Stümpflen, V. MIPS: analysis and annotation of proteins from whole genomes in 2005. *Nucleic Acids Res.* **34** (*Database issue*), D169-D172 (2006).

Michel, R. H., McGovern, P. E. and Badler, V. R. (1992) Chemical evidence of ancient beer. *Nature* **360**, 24 (1992).

Michel, R. H., McGovern, P. E. and Badler, V. R. The first wine and beer. *Anal. Chem.* **65**, 408-413 (1993).

Michnick S., Roustan J. L., Remize F., Barre P. and Dequin S. 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**, 783-793 (1997).

Mild, M., Esbjörnsson, J., Fenyö, E. M. and Medstrand, P. Frequent intrapatient recombination between HIV-1 R5 and X4 envelopes: Implications for coreceptor switch. *J. Virol.* **81**, 3369-3376 (2007).

Miquel, M., James Jr., D., Dooner, H. and Browse, J. *Arabidopsis* requires polyunsaturated lipids for low-temperature survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**, 6208-6212 (1993).

Mithieux, S. M. and Weiss, A. S. Tandem integration of multiple *ILV5* copies and elevated transcription in polyploid yeast. *Yeast.* **28**, 175-183 (1995).

Mortimer, R., Romano, P., Suzzi, G. and Polsinelli, M. Genome renewal: a new phenomenon revealed from a genetic study of 43 strains of *Saccharomyces cerevisiae* from natural fermentation of grape musts. *Yeast* **10**, 1543-1552, (1994).

Moye-Rowley, W. S., Harshman, K. D. and Parker, C. S. Yeast *YAP1* encodes a novel form of the *jun* family of transcriptional activator proteins. *Genes Dev.* **3**, 283-292 (1989).

Murata, N., Ishizaki-Nishizawa, O., Higashi, S., Hayashi, H., Tasaka, Y. and Nishida, I. Genetically engineered alteration in the chilling sensitivity of plants. *Nature* **356**, 710-713 (1993).

Nagayama, A., Kato, C. and Abe, F. The N- and C- terminal mutations in tryptophan permease Tat2 confer cell growth in *Saccharomyces cerevisiae* under high-pressure and low temperature conditions. *Extremophiles* **8**, 143-149 (2004).

Nakao, Y., Kanamori, T., Itoh, T., Kodama, Y., Rainieri, S., Nakamura, N., Shimonaga, T., Hattori, M. and Ashikari, T. Genome Sequence of the Lager Brewing Yeast, an Interspecies Hybrid. *DNA Res.* **16**, 115-129 (2009).

- Naumov, G. I. *Saccharomyces bayanus* var *uvarum* comb. nov., a new variety established by genetic analysis. *Mikrobiologiya* **69**, 410-414 (2000).
- Naumova, E. S., Naumov, G. I., Masneuf-Pomarede, I., Aigle, M. and Dubourdieu, D. Molecular genetic study of introgression between *Saccharomyces bayanus* and *S. cerevisiae*. *Yeast* **22**, 1099-1115 (2005).
- Nevoigt, E. and Stahl, U. Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD⁺] levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 1331-1337 (1996).
- Nevoigt, E., Pilger, R., Mast-Gerlach, E., Schmidt, U., Freihammer S., Eschenbrenner M., Garbe L. and Stahl, U. Genetic engineering of brewing yeast to reduce the content of ethanol in beer. *FEMS Yeast Res.* **2**, 225-232 (2002).
- Nguyen, H. V. and Gaillardin, C. Two subgroups within the *Saccharomyces bayanus* species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit. *Syst. Appl. Microbiol.* **20**, 286-294 (1997).
- Nguyen, H. V., Lepingle, A. and Gaillardin, C. Molecular typing demonstrates homogeneity of *Saccharomyces uvarum* strains and reveals the existence of hybrids between *Saccharomyces uvarum* and *Saccharomyces cerevisiae*, including the *Saccharomyces bayanus* type strain CBS 380. *Syst. Appl. Microbiol.* **23**, 71-85 (2000).
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J. L., Wincker, P., Casaregola, S. and Dequin, S. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **106**, 16333-16338 (2009).
- Nielsen, J. and Jewett, M. C. Impact of systems biology on metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **8**, 122-131 (2008).
- O'Connor-Cox E. S. C., Lodolo E. J. and Axcell B. C. The relative importance of mitochondrial protein synthesis to brewing yeast performance. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 128-135 (1995).
- Oldenburg, K. R., Vo, K. T., Michaelis, S. and Paddon, C. Recombination-mediated PCR-directed plasmid construction *in vivo* in yeast. *Nucleic Acids Res.* **25**, 451-452 (1997).
- Omura, F., Shibano, Y., Fukui, N. and Nakatani, K. Reduction of hydrogen sulfide production in brewing yeast by constitutive expression of *MET25* gene. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 58-62 (1995).
- Omura, F., Fujita, A., Miyajima, K. and Fukui, N. Engineering of yeast Put4 permease and its application to lager yeast for efficient proline assimilation. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **69**, 1162-1171 (2005).

- Omura, F. Targeting of mitochondrial *Saccharomyces cerevisiae* Ilv5p to the cytosol and its effect on vicinal diketone formation in brewing. *Appl Microbiol Biotechnol* **78**, 503-513 (2008).
- Orozco, H., Matallana, E. and Aranda, A. Genetic manipulation of longevity-related genes as a tool to regulate yeast life span and metabolite production during winemaking. *Microb. Cell. Fact.* **12:1** doi: 10.1186/1475-2859-12-1 (2013).
- Osinga, K. A., Beudeker, R. F., Van der Plaats, J. B. and De Hollander, J. A. New yeast strains providing for an enhanced rate of the fermentation of sugars, a process to obtain such yeasts and the use of these yeasts. Eur. Patent 0306107B1 (1988).
- Panadero, J., Ranz-Gil, F. and Prieto, J. A. Heterologous expression of type I antifreeze peptide GS-5 in baker's yeast increase freeze tolerance and provides enhanced gas production in frozen dough. *J. Agric. Food Chem* **53**, 9966-9970 (2005).
- Panadero, J., Hernandez-Lopez M. J., Prieto, J. A. and Ranz-Gil, F. Overexpression of the calcineurin target *CRZ1* provides freeze tolerance and enhances the fermentative capacity of baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 4824-4831 (2007).
- Pasteur, L. Mémoire sur la fermentation alcoolique. *Compt. Rend.* **45**, 1032-1036 (1857).
- Pengelly, R. J. and Wheals, A. E. Rapid identification of *Saccharomyces eubayanus* and its hybrids. *FEMS Yeast Res.* **13**, 156-161 (2013).
- Peña-Castillo, L. and Hughes, T. R. Why are there still over 1000 uncharacterized yeast genes? *Genetics* **176**, 7-14 (2007).
- Pérez, S., Mazeau, K. and Hervé du Penhoat, C. The three-dimensional structures of the pectic polysaccharides. *Plant Physiol. Biochem.* **38**, 37-55 (2000).
- Perez-Gonzalez, J. A., Gonzales, R., Querol, A., Sendra, J. and Ramon, D. Construction of a recombinant wine yeast expressing β -(1-4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2801-2806 (1993).
- Pérez-Ortín, J. E., Querol, A., Puig, S. and Barrio, E. Molecular characterization of a chromosomal rearrangement involved in the adaptative evolution of yeast strains. *Genome Res.* **12**, 1533-1539 (2002).
- Peris, D., Lopes, C. A., Belloch, C., Querol, A. and Barrio, E. Comparative genomics among *Saccharomyces cerevisiae* \times *Saccharomyces kudriavzevii* natural hybrid strains isolated from wine and beer reveals different origins. *BMC Genomics.* **13**:407 doi: 10.1186/1471-2164-13-407 (2012).
- Perry, C. and Meaden, P. Properties of a genetically-engineered dextrin-fermenting strain of brewers' yeast. *J. Inst. Brew. London* **94**, 64-67 (1988).
- Pertschy, B., Zisser, G., Schein, H., Köffel, R., Rauch, G., Grillitsch, K., Morgenstern, C., Durchschlag, M., Högenauer, G. and Bergler, H. Diazaborine treatment of yeast

- cells inhibits maturation of the 60S ribosomal subunit. *Mol. Cell. Biol.* **24**, 6476-6487 (2004).
- Piskur, J. Origin of the duplicated regions in the yeast genomes. *Trends Genet.* **17**, 302-303 (2001).
- Pretorius, I. S. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729 (2000).
- Puig, S., Ramón, D. and Pérez-Ortín, J. E. Optimized method to obtain stable food-safe recombinant wine yeast strains. *J. Agric. Food Chem.* **46**, 1689-1693 (1998).
- Puig, O., Rutz, B., Luukkonen, B. G. M., Kandels-Lewis, S., Bragado-Nilsson, E. and Séraphin, B. New constructs and strategies for efficient PCR-based gene manipulations in yeast. *Yeast* **14**, 1139-1146 (1998).
- Querol, A., Fernández-Espinar, M. T., Del Olmo, M. and Barrio, E. Adaptative evolution of wine yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **86**, 3-10 (2003).
- Querol, A. and Bond, U. The complex and dynamic genomes of industrial yeast. *FEMS Microbiol. Lett.* **293**, 1-10 (2009).
- Radoi, F., Kishida, M. and Kawasaki, H. Endo-polygalacturonase in *Saccharomyces* wine yeasts: effect of carbon source on enzyme production. *FEMS Yeast Res.* **5**, 663-668 (2005).
- Rainieri, S., Kodama, Y., Kaneko, Y., Mikata, K., Nakao, Y. and Ashikari, T. Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 3968-3974 (2006).
- Remize, F., Roustan, J.L., Sablayrolles, J.M., Barre, P. and Dequin, S. Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 143-149 (1999).
- Remize, F., Andrieu, E. and Dequin, S. Engineering of the pyruvate dehydrogenase bypass in *Saccharomyces cerevisiae*: Role of the cytosolic Mg²⁺ and mitochondrial K⁺ acetaldehyde dehydrogenases Ald6p and Ald4p in acetate formation during alcoholic fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 3151-3159 (2000).
- Replansky, T., Koufopanou, V., Greig, D. and Bell, G. *Saccharomyces sensu stricto* as a model system for evolution and ecology. *Trends Ecol. Evolut.* **23**, 494-501 (2008).
- Robinson, J. *The Oxford companion to wine* (Oxford University Press: Oxford, 1994).
- Rodriguez-Vargas, S., Sanchez-Garcia, A., Martinez-Rivas, J. M., Prieto, J. A. and Randez-Gil, F. Fluidization of membrane lipids enhances the tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* to freezing and salt stress. *Appl. Environ. Microbiol.* **73**, 110-116 (2007).

Ryder, D. S. and Masschelein, C. A., The growth process of brewing yeast and the biotechnological challenge. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **43**, 66-75 (1985).

Salmon, J. M. and Barre, P. Improvement of Nitrogen Assimilation and Fermentation Kinetics under Enological Conditions by Derepression of Alternative Nitrogen-Assimilatory Pathways in an Industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 3831-3837 (1998).

Samuel, D. Investigation of ancient egyptian baking and brewing methods by correlative microscopy. *Science* **273**, 488-490 (1996).

Samuel, D. "Bread", in *The Oxford Encyclopedia of ancient Egypt* (Edited by D. B. Redford, pp. 196-198. Oxford: Oxford University Press, 2001).

Samuel, D. "Beer", in *The Oxford Encyclopedia of ancient Egypt* (Edited by D. B. Redford, pp. 171-172. Oxford: Oxford University Press, 2001).

Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**, 5463-5467 (1977).

Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Ohtsu, I., Shima, J. and Takagi, H. Overexpression of the transcription activator Msn2 enhances the fermentation ability of industrial baker's yeast in frozen dough. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **76**, 624-627 (2012).

Sasano, Y., Haitani, Y., Hashida, K., Oshiro, S., Shima, J. and Takagi, H. Improvement of fermentation ability under baking-associated stress conditions by altering the *POG1* gene expression in baker's yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **165**, 241-245 (2013).

Sauer, U. and Schlattner, U. Inverse metabolic engineering with phosphagen kinase systems improves the cellular energy state. *Metab. Eng.* **6**, 220-228 (2004).

Schacherer, J., Shapiro, J. A., Ruderfer, D. M. and Kruglyak, L. Comprehensive polymorphism survey elucidates population structure of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **458**, 342-345 (2009).

Schade, D., Walther, A. and Wendland, J. The development of a transformation system for the dimorphic plant pathogen *Holleya sinicauda* based on *Ashyba gossypii* DNA elements. *Fungal Genet. Biol.* **40**, 65-71 (2003).

Schmidt, A., Hall, M. N. and Koller, A. Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae*, *TAT1* and *TAT2*, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 6597-6606 (1994).

Schneider, B. L., Steiner, B., Seufert, W. and Futcher, A. B. pMPY-ZAP: a reusable polymerase chain reaction-directed gene disruption cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 129-134 (1996).

Schwann, T. Vorläufige Mittheilung betreffend Versuche über die Weingährung und Fäulnis. *Phys. Chem. (Poggendorff)* **41**, 184-193 (1837).

- Schoeman, H., Vivier, M. A., Du Toit, M., Dicks, L. M. and Pretorius, I. S. The development of bactericidal yeast strains by expressing the *Pediococcus acidilactici* pediocin gene (*pedA*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**, 647-656 (1999).
- Schoeman, H., Wolfaardt, G. M., Botha, A., van Rensburg, P. and Pretorius, I. S. Establishing a risk-assessment process for release of genetically modified wine yeast into the environment. *Can. J. Microbiol.* **55**, 990-1002 (2009).
- Schuller, D. and Casal, M. The use of genetically modified *Saccharomyces cerevisiae* strains in the wine industry. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **68**, 292-304 (2005).
- Schuermans, J. M., Rossell, S. L., van Tuijl, A., Bakker, B. M., Hellingwerf, K. J. and de Mattos, M. J. Effect of *hvk2* deletion and *HAP4* overexpression on fermentative capacity in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **8**, 195-203 (2008).
- Seoighe, C. and Wolfe, K. H. Updated map of duplicated regions in the yeast genome. *Gene* **238**, 253-261 (1999).
- Sherman, F. Getting started with yeast. *Methods Enzymol.* **350**, 3-41 (2002).
- Sherman, D. J., Durrens, P., Beyne, E., Nikolski, M. and Souciet, J. L. Genolevures: comparative genomics and molecular evolution of hemiascomycetous yeasts. *Nucleic Acids Res.* **32** (Database issue), D315-D318 (2004).
- Sherman, D. J., Martin, T., Nikolski, M., Cayla, C., Souciet, J. L. and Durrens, P. Genolevures: protein families and synteny among complete hemiascomycetous yeast proteomes and genomes. *Nucleic Acids Res.* **37** (Database issue), D550-D554 (2009).
- Shevchuk, N. A., Bryksin, A. V., Nusinovich, Y. A., Cabello, F. C., Sutherland, M. and Ladisch, S. Construction of long DNA molecules using long PCR-based fusion of several fragments simultaneously. *Nucleic Acids Res.* **32**, 1-12 (2004).
- Sicard, D. and Legras, J. L. Bread, beer and wine: yeast domestication in the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *C. R. Biol.* **334**, 229-236 (2011).
- Singh, A. and Manney, T. R. Genetic analysis of mutations affecting growth of *Saccharomyces cerevisiae* at low temperature, *Genetics* **77**, 651-659 (1974).
- Smart, K. A. Brewing yeast genomes and genome-wide expression and proteome profiling during fermentation. *Yeast* **24**, 993-1013 (2007).
- Sofyanovich, O. A., Nishiuchi, H., Yamagishi, K., Maekawa, K. and Serebryanyy, V. A. A new method for repeated "self-cloning" promoter replacement in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Biotechnol.* **48**, 218-227 (2011).
- Solis-Escalante, D., Kuijpers, N. G., Bongaerts, N., Bolat, I., Bosman, L., Pronk, J. T., Daran, J. M. and Daran-Lapujade, P. *amdSYM*, a new dominant recyclable marker cassette for *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res.* **13**, 126-139 (2013).

Spencer, F., Ketner, G., Connelly, C. and Hieter, P. Targeted recombination-based cloning and manipulation of large DNA segments in yeast. *Methods* **5**, 161-165 (1993).

Stewart C. N. Jr, Richards H. A. and Halfhill, M. D. Transgenic plants and biosafety: science, misconceptions and public perception. *Biotechniques* **29**, 832-843 (2000).

Stolz, L. E., Kuo, W. J., Longchamps, J., Sekhon, M. K. and York, J. D. *INP51*, a yeast inositol polyphosphate 5-phosphatase required for phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate homeostasis and whose absence confers a cold-resistant phenotype. *J. Biol. Chem.* **273**, 11852-11861 (1998).

Storici F., Lewis, L. K. and Resnick, M. A. *In vivo* site-directed mutagenesis using oligonucleotides. *Nat. Biotechnol.* **19**, 773-776 (2001).

Sugiyama, K., Kawamura, A., Izawa, S. and Inoue, Y. Role of glutathione in heat-shock-induced cell death of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. J.* **352**, 71-78 (2000).

Swiegers, J. H., Capone, D. L., Pardon, K. H., Elsey, G. M., Sefton, M. A., Francis, L. I. and Pretorius, I. S. Engineering volatile thiol release in *Saccharomyces cerevisiae* for improved wine aroma. *Yeast* **24**, 561-574 (2007).

Sybesma, W., Hugenholtz, J., de Vos W. M. and Smid, E. J. Safe use of genetically modified lactic acid bacteria in food. Bridging the gap between consumers, green groups, and industry. *Electronic J. Biotechnol.* **9**:4. doi: 102225/vol9-issue4-fulltext-12 (2006).

Tabera, L., Muñoz, R. and Gonzalez, R. Deletion of *BCY1* from the *Saccharomyces cerevisiae* genome is semidominant and induces autolytic phenotypes suitable for improvement of sparkling wines. *Appl. Environ. Microbiol.* **72**, 2351-2358 (2006).

Takagi, H., Takaoka, M., Kawaguchi, A. and Kubo, Y. Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **71**, 8656-8662 (2005).

Tamai, Y., Momma, T., Yoshimoto, H. and Keneko, Y. Coexistence of two types of chromosomes in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* **14**, 923-933 (1998).

Tanghe, A., Van Dijck, P., Dumortier, F., Teunissen, A., Hohmann, S. and Thevelein, J. M. Aquaporin expression correlates with freeze tolerance in baker's yeast and overexpression improves freeze tolerance in industrial strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 5981-5989 (2002).

Tee, K. L. and Wong, T. S. Polishing the craft of genetic diversity creation in directed evolution. *Biotechnol. Adv.* in press (<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2013.08.21> (2013)).

Teunissen, A., Dumortier, F., Gorwa, M. F., Bauer, J., Tanghe, A., Loïez, A., Smet, P., Van Dijck, P. and Thevelein, J. M. Isolation and characterization of a freeze-tolerant

diploid derivative of an industrial baker's yeast strain and its use in frozen doughs. *Appl. Environ. Microbiol.* **68**, 4780-4787 (2002).

Tezuka, H., Mori, T., Okumura, Y., Kitabatake, K. and Tsumura, Y. Cloning of a gene suppressing hydrogen sulfide production by *Saccharomyces cerevisiae* and its expression in a brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **50**, 130-133 (1992).

Thomas, B. J. and Rothstein, N. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**, 619-630 (1989).

Toksoy Oner E., Oliver S. G. and Kirdar, B. Production of ethanol from starch by respiration-deficient recombinant *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Environ. Microbiol.* **71**, 6443-6445 (2005).

Tripodo, M. M., Lanuzza, F., Micali, G., Coppolino, R. and Nucita, F. Citrus waste recovery: a new environmentally friendly procedure to obtain animal feed. *Bioresource Technol.* **91**, 111-115 (2004).

Ulrich, A., Andersen, K. R. and Schwartz, T. U. Exponential Megapriming PCR (EMP) Cloning—Seamless DNA Insertion into Any Target Plasmid without Sequence Constraints. *PLoS ONE* **7**: e53360. doi:10.1371/journal.pone.0053360 (2012).

Uzogara, S. G. The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: a review. *Biotechnol. Adv.* **18**, 179-206 (2000).

Vakeria, D., Box, W., Bird, L. and Mellor, J. Characterisation of amylolytic brewing yeast *J. Inst. Brew.* **102**, 27-32 (1996).

Valero, E., Cambon, B., Schuller, D., Casal, M. and Dequin, S. Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res.* **7**, 317-329 (2007).

Van Maris A. J. A., Abbott, D. A., Bellissimi, E., van den Brink, J., Kuyper, M., Luttk, M. A., Wisselink, H. W., Scheffers, W. A., van Dijken, J. P. and Pronk, J. T. Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek* **90**, 391-418 (2006).

Van Rensburg, P. and Pretorius, I. S. Enzymes in winemaking: harnessing natural catalyst for efficient biotransformations – a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **21**, 52-73 (2000).

Van Wyk, H. and Benoit, D. Recovery of endo-polygalacturonase activity in wine yeast and its effect on wine aroma. *FEMS Yeast Res.* **10**, 58-71 (2010).

Van Zandycke, S. M., Sohler, P. J. and Smart, K. A. The impact of catalase expression on the replicative lifespan of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mech. Ageing Dev.* **123**, 365-373 (2002).

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Delvaux, F. R., Winderichx, J., Thevelein, J. M., Bauer, F. F. and Pretorius, I. S. Late fermentation expression of *FLO1* in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **59**, 69-76 (2001).

Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. M. P., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M. and Delvaux, F. R. The expression levels of the yeast alcohol acetyl transferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1* and *ATF2*, control the formation of a broad range of different volatile esters. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**, 5228-5237 (2003).

Vido, K., Spector, D., Lagniel, G., Lopez, S., Toledano, M. and Labarre, J. A proteome analysis of the cadmium response in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **276**, 8469-8474 (2001).

Villa, K. D., Lee, S., Goossens, E., Debourg, A. and Masschelein, C. A. Control of vicinal diketone production by brewer's yeast: Effect of *ILV5* and *ILV3* amplification of vicinal diketone production and ILV enzyme activity. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **53**, 49-53 (1995).

Villanova, M., Blanco, P., Cortes, S., Castro, M., Villa, T. G. and Sieiro, C. Use of a *PGUI* recombinant *Saccharomyces cerevisiae* strain in oenological fermentations. *J. Appl. Microbiol.* **89**, 876-883 (2000).

Vogel, J., Wackerbauer, K. and Stahl, U. *Improvement of beer brewing by using genetically modified yeast*. Genetically Modified Foods Chapter 14, 160-170 (1995).

Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-1808 (1994).

Wach, A. PCR-synthesis of marker cassettes with long flanking homology regions for gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 259-265 (1996).

Walker, G.M. *Yeast physiology and biotechnology* (Wiley & Sons, New York, 1998).

Walker, M., Vystavelova, A., Pedler, S., Eglinton, J. and Jiranek, V. PCR-based gene disruption and recombinatory marker excision to produce modified industrial *Saccharomyces cerevisiae* without added sequences. *J. Microbiol. Methods* **63**, 193-204 (2005).

Wang, H-L, Postier, B. L. and Burnap, R. L. Optimization of fusion PCR for *in vitro* construction of gene knockout fragments. *Biotechniques* **33**, 26-32 (2002).

Wang, Z., He, X. and Zhang, B. Maltotriose utilization in lager yeast strains: *MTT1* encodes a maltotriose transporter, *Int. J. Food Microbiol.* **22**, 775-778 (2005).

Wang, Z., He, X. P., Liu, N. and Zhang, B. R. Construction of self-cloning industrial brewing yeast with high-glutathione and low-diacetyl production. *Int. J. Food Sci. Tech.* **43**, 989-994 (2008).

- Wang, Z. Y., He, X. P. and Zhang, B. R. Over-expression of *GSH1* gene and disruption of *PEP4* gene in self-cloning industrial brewer's yeast. *Int. J. Food Microbiol.* **119**, 192-199 (2007).
- Watari, J., Nomura, M., Sahara, H. and Koshino, S. Construction of flocculent brewer's yeast by chromosomal integration of the yeast flocculation gene *FLO1*. *J. Inst. Brew.* **100**, 73-77 (1994).
- Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., Buckles, E. L., Liou, S. R., Boutin, A., Hackett, J., Stroud, D., Mayhew, G. F., Rose, D. J., Zhou, S., Schwartz, D. C., Perna, N. T., Mobley, H. L., Donnenberg, M. S. and Blattner, F. R. Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* **99**, 17020-17024 (2002).
- Wendler, F., Bergler, H. and Prutej, K., Diazaborine resistance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* reveals a link between *YAP1* and the pleiotropic drug resistance genes *PDR1* and *PDR3*. *J. Biol. Chem.* **272**, 27091-27098 (1997).
- Wolfe, K. H. and Shields, D. C. Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature* **387**, 708-713 (1997).
- Wong, S., Butler, G. and Wolfe, K. H. Gene order evolution and paleopolyploidy in hemiascomycete yeasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 9272-9277 (2002).
- Wu, D. and Cederbaum, A. I. Alcohol, oxidative stress, and free radical damage. *Alc. Res. Health* **27**, 277-284 (2003).
- Yamano, S., Tomizuka, K., Sone, H., Imura, M., Takeuchi, T., Tanaka, J. and Inoue, T. Brewing performance of a brewer's yeast having alpha-acetolactate decarboxylase from *Acetobacter aceti* subsp. *xylinum*. *J. Biotechnol.* **39**, 21-26 (1995).
- Yamashita, I., Nahamura, M. and Fukui, S. Gene fusion is a possible mechanism underlying the evolution of *STAI*. *J. Bacteriol.* **169**, 2142-2149 (1987).
- Yoshida, S., Imoto, J., Minato, T., Oouchi, R., Sugihara, M., Imai, T., Ishiguro, T., Mizutani, S., Tomita, M., Soga, T. and Yoshimoto, H. Development of bottom fermenting saccharomyces strains that produce high SO₂ levels, using integrated metabolome and transcriptome analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* **74**, 2787-2796 (2008).
- Zelenaya-Troitskaya, O., Perlman, P. S. and Butow, R. A. An enzyme in yeast mitochondria that catalyzes a step in branched-chain amino acid biosynthesis also functions in mitochondrial DNA stability. *EMBO J.* **14**, 3268-3276 (1995).
- Zhang, Y., Wang, Z. Y., He, X. P., Liu, N. and Zhang, B. R. New industrial brewing yeast strains with *ILV2* disruption and *LSD1* expression. *Int. J. Food Microbiol.* **123**, 18-24 (2008).

ANEXO:
REACTIVOS QUÍMICOS

Anexo: Reactivos químicos

Agar Bacteriológico, Pronadisa, España

Agarosa, Pronadisa España

Extracto de levadura, Pronadisa, España

Peptona, Pronadisa, España

Triptona, Pronadisa, España

“Yeast Nitrogen Base” sin aminoácidos y con sulfato amónico, Pronadisa, España

ORGÁNICOS

Acetato sódico anhidro (min. 99,5%, p.a.) Merck KGaA, Alemania

Acetato amónico (min. 98%, p.a.) Scharlau Chemie S.A., España

Acetato de litio dihidrato (min 97%, p.a.) Sigma-Aldrich Co., EE. UU.

Acetato potásico (min 99%) Sigma-Aldrich Co., EE. UU.

Ácido acético (glacial) (min. 99,8%, p.a.) Merck KGaA, Alemania

Ácido poligalacturónico, sal sódica de cítricos (min. 70%), Sigma-Aldrich Co., EE. UU.

Ácido succínico (min 99,0%, p.a.), Sigma-Aldrich Co., EE. UU.

Adenina (min. 98,0%, para bioquímica) ,Merck, KGaA, Alemania

Alcohol isoamílico, Sigma-Aldrich Co., EE. UU.

Alcohol isopropílico, Merck KGaA, Alemania

Ampicilina sódica (biotechnology performance certified) , Sigma-Aldrich Co., EE. UU.

Bromuro de etidio (para bioquímica), Merck KGaA, Alemania

Cerulenina (min 98%, p.a.), Fermentek Ltd, Israel

Cicloheximida (min. 94%. p.a.), Sigma-Aldrich Co., EE. UU.

Cloroformo (p.a.), Merck KGaA, Alemania

Dimetil sulfóxido (p. a.), Merck KGaA, Alemania

Dodecil sulfato sódico (mín 99,0%, para bioquímica), Merck KGaA, Alemania

Etanol absoluto (min. 99,5%, p.a.), Panreac Quimica SA, España

Etanol 96° (min. 96,0 % v/v) Panreac Quimica SA, España

Fenol (p.a.), Merck KGaA, Alemania

Glicerol (min. 99,5%, p.a.), Merck KGaA, Alemania

D(+)-Glucosa anhidra, J.T Baker, Holanda

Hidróxido de calcio, Merck KGaA, Alemania

L-Histidina (min. 99,0%, para bioquímica), Merck KGaA, Alemania

L-Leucina (min. 99,0%, para bioquímica), Merck KGaA, Alemania
PIPES (Piperazina-N,N'-bis[2-ácido etanosulfónico]) (min 99,0%, biotechnology performance certified), Sigma-Aldrich Co., EE. UU.
Polietilenglicol 3350, Sigma-Aldrich Co., EE. UU.
2-Propanol (min. 99,8%, p.a.), Scharlau Chemie S.A, España
Sacarosa (para bioquímica), Merck KGaA, Alemania
D(-)-Sorbitol (para fines bioquímicos), Merck KGaA, Alemania
L-Triptófano (min. 99,0%, para bioquímica), Merck KGaA, Alemania
Tris(hidroximetil)aminometano (99,8-100,1%, p.a.), Merck KGaA, Alemania
Uracilo (min. 98,0%, para bioquímica), Merck KGaA, Alemania

INORGÁNICOS

Ácido clorhídrico (min. 32%, p.a.), Merck KGaA, Alemania
Ácido bórico (min. 99,8%, p.a.), Merck KGaA, Alemania
Cloruro cálcico dihidrato (min. 99,0%, para biología molecular), Sigma-Aldrich Co. EE. UU.
Cloruro magnésico hexahidrato (min 99,0%, calidad biología molecular), Merck KGaA, Alemania
Cloruro potásico (99,5-100,5%, p.a.), Merck KGaA, Alemania
Cloruro sódico (min. 99,5%, p.a.), Merck KgaA, Alemania
Hidróxido potásico (min. 85,0%, p.a.), Merck KGaA, Alemania
Hidróxido sódico (min. 99,0%, p.a.), Merck KgaA, Alemania
Sulfato magnésico heptahidrato (min. 99,5%, p.a.), Merck KGaA, Alemania
Sulfato amónico (min. 99,5%, p.a.), Merck KgaA, Alemania

