

RESUMEN

En esta Tesis Doctoral se propone una alternativa a la coyuntura actual de rechazo social frente al uso de OMGs 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 mediante 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 con el tiempo. 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 mediante 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 cicloheximida y 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 diseñado 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 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 mediante Diseño Molecular, el paso siguiente consistió en la aplicación de dicha metodología al desarrollo de levaduras con 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 -dihidroxicvalerato. 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 mediante Diseño Molecular en la mejora de las cepas de levaduras industriales del género *Saccharomyces*