

RESUM

En aquesta tesi doctoral, es proposa una alternativa a la conjuntura actual de rebuig social enfront de l'ús d'OMGs 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 cerveser 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*.