

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.....	41
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	49
3.3.	Evolución de cepas de levaduras industriales.....	51
•	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 poligalacturonasa	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 ° Brix.....	86
5.5. Determinación de la frecuencia de aparición de mutantes deficientes en respiración	86
5.6. Determinación de diacetilo.....	87
5.7. Bioensayo de crecimiento en frío	89

● **RESULTADOS**

1. Construcción del casete de selección.....	93
1.1. Secuenciación de las zonas de interés de la cepa S1	94
1.2. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración	95
1.3. Transformación de W303-1A y S1 con $F_{PYAPI-PPGK1-YAPI}$	98
1.4. Secuenciación de los transformantes.....	104
1.5. La sobreexpresión del gen <i>YAPI</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 1926108	
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>PGU1</i>	122

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	124
3.2. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEPO-ILV5}}$	125
3.3. Transformación de W303-1A y S1 con $F_{\text{GEPO-ILV5}}$	130
3.4. Eliminación del casete de selección en la cepa S1-PI6	131
3.5. Secuenciación de los transformantes obtenidos con el fragmento $F_{\text{GEPO-ILV5}}$	133
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.....	136
4.1. Secuenciación de las zonas de interés en el genoma de la cepa M69	136
4.2. Reacciones de PCR utilizadas para la construcción del fragmento de integración $F_{\text{GEPO-INP51}}$	137
4.3. Transformación de W303-1A y M69 con $F_{\text{GEPO-INP51}}$	141
4.4. Secuenciación de los transformantes obtenidos con el fragmento $F_{\text{GEPO-INP51}}$	142
4.5. La inactivación de <i>INP51</i> no incrementa la resistencia al frío en cepas industriales.....	143

● DISCUSIÓN

1. Construcción del casete de selección y de los fragmentos de integración	150
2. La sobreexpresión del gen <i>YAPI</i> disminuye la aparición de mutantes petites	164
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	172
5. La inactivación de <i>INP51</i> no incrementa la resistencia al frío en cepas industriales	176

• CONCLUSIONES	181
• BIBLIOGRAFÍA	185
• ANEXO: Reactivos químicos	213