

ÍNDICE GENERAL

• ÍNDICE DE TABLAS Y FIGURAS	1
• ABREVIATURAS	7
• INTRODUCCIÓN	11
1. BIOTECNOLOGÍA DE LA FERMENTACIÓN	13
1.1. La fermentación como un antiguo arte	
1.2. Levadura y ciencia	
1.3. Innovaciones biotecnológicas en los procesos fermentativos en la producción de bebidas alcohólicas y productos panaderos	
1.3.1. Principales dificultades biotecnológicas en la mejora genética de levaduras industriales	
1.3.2. Levaduras genéticamente modificadas para la mejora de los procesos industriales y la calidad de los productos	
2. LEVADURA, ESTRÉS Y FERMENTACIÓN A BAJA TEMPERATURA	25
2.1. Importancia del control de la temperatura durante la fermentación en la producción de bebidas alcohólicas	
3. RESPUESTA MOLECULAR A BAJAS TEMPERATURAS	28
3.1. Principales efectos adversos causados por las bajas temperaturas	
3.2. Principios generales de adaptación al frío	
3.3. Mecanismos de adaptación de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> a bajas temperaturas	
3.3.1. Respuesta temprana	
3.3.2. Respuesta tardía	
3.4. Mecanismos sensores de bajas temperaturas	
4. PERSPECTIVAS BIOTECNOLÓGICAS PARA APLICACIONES INDUSTRIALES A BAJAS TEMPERATURAS	48
• OBJETIVOS Y JUSTIFICACIÓN	49

• MATERIALES Y MÉTODOS.....	55
1. REACTIVOS Y MATERIAL BIOLÓGICO	57
1.1. Reactivos	
1.2. Cepas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
1.3. Cepas de <i>Escherichia coli</i>	
2. MEDIOS, CONDICIONES DE CULTIVO Y DE CONSERVACIÓN DE MICROORGANISMOS.....	58
2.1. Medios de cultivo de levaduras	
2.2. Medios de cultivo de bacterias	
2.3. Conservación de las diferentes cepas utilizadas	
2.4. Ensayos de crecimiento en medio líquido y sólido	
2.5. Determinación de la resistencia a la congelación	
3. TÉCNICAS DE TRANSFORMACIÓN DE MICROORGANISMOS	66
3.1. Transformación de levaduras	
3.2. Transformación de <i>E.coli</i>	
4. MÉTODOS DE MANIPULACIÓN DE ÁCIDOS NUCLEICOS	67
4.1. Obtención de DNA genómico de levadura	
4.2. Obtención de DNA plasmídico de levadura	
4.3. Obtención de DNA plasmídico de <i>E. coli</i>	
4.4. Obtención de RNA total de levadura	
4.5. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	
4.6. Electroforesis de DNA en geles de agarosa	
4.7. Cuantificación de DNA	
4.8. Clonaje a partir de productos amplificados	
4.9. Secuenciación y análisis de las secuencias	
5. AMPLIFICACIÓN Y CRIBADO DE UNA GENOTECA DE <i>S.CEREVISIAE</i>	76
5.1. Amplificación de la genoteca de <i>S. cerevisiae</i>	
5.2. Condiciones de transformación de la genoteca	
5.3. Condiciones de cribado de la genoteca	
5.3.1. Cribado de la genoteca a 10° C	
5.3.2. Cribado de la genoteca a 8° C	
5.4. Análisis de los clones seleccionados	
5.5. Subclonaje de los genes candidatos	
5.6. Hibridación con sondas de DNA marcadas con quimioluminiscencia	

6. CUANTIFICACIÓN DE LA EXPRESIÓN DE LOS GENES <i>TAT2</i> , <i>TAT1</i> Y <i>PHO90</i>	81
7. ENSAYO DE TRANSPORTE DE TRIPTÓFANO.....	83
• RESULTADOS	85
1. SELECCIÓN DE CLONES QUE MEJORAN LA CAPACIDAD DE CRECIMIENTO A 10° Y 8° C.....	87
2. IDENTIFICACIÓN DE LOS GENES RESPONSABLES DEL FENOTIPO DE TOLERANCIA A FRÍO.....	88
2.1. Confirmación del fenotipo de los clones seleccionados	
2.2. Verificación de la relación biunívoca entre presencia de plásmido y fenotipo de tolerancia a frío	
2.3. Resultados de secuenciación y análisis de los insertos	
2.4. Sobreexpresión de los genes candidatos. Estudio de la tolerancia a frío	
2.4.1. La sobreexpresión de <i>TAT2</i> , <i>TAT1</i> , <i>TRP1</i> , <i>PRO2</i> , <i>PCK1</i> o <i>NSG2</i> en W303 mejora su crecimiento a 10° C	
2.4.2. La sobreexpresión de <i>PHO84</i> , <i>GTR1</i> , <i>PHO87</i> , <i>PHO90</i> o <i>YCR015C</i> en W303 mejora su crecimiento a 8° C en medio rico con exceso de triptófano	
3. LA PROTOTROFÍA AL TRIPTÓFANO O EL EXCESO DE TRIPTÓFANO Y LA TOLERANCIA A FRÍO.....	106
3.1. Sobreexpresión de los genes identificados en una cepa protótrofa para triptófano	
4. ESTUDIO DE LOS NIVELES DE EXPRESIÓN DE <i>TAT2</i> , <i>TAT1</i> Y <i>PHO90</i> A BAJAS TEMPERATURAS	109
5. POSIBLE PAPEL DE LOS GENES IDENTIFICADOS POR MEJORAR EL CRECIMIENTO EN FRÍO, EN LA SUPERVIVENCIA A LA CONGELACIÓN.....	112
6. ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE LAS BAJAS TEMPERATURAS SOBRE EL TRANSPORTE DE TRIPTÓFANO	113
6.1. La sobreexpresión de los genes <i>TAT2</i> y <i>TAT1</i> confiere mayor capacidad de transporte de triptófano	
6.2. La sobreexpresión del gen <i>YCR015C</i> no confiere mayor capacidad de transporte de triptófano	
6.3. Las cepas de levaduras industriales presentan la misma velocidad inicial de transporte que la cepa de laboratorio W303	

6.4. Comparativa de las velocidades iniciales de transporte de triptófano en las distintas cepas estudiadas

• DISCUSIÓN	121
• CONCLUSIONES	141
• BIBLIOGRAFÍA	145
• ANEXO: Reactivos químicos	165