

UCH-Fc  
Biotecnología  
V. 297  
C.1

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE



**METODOLOGÍAS PARA LA MODIFICACIÓN GENÉTICA DE UNA  
LEVADURA INDUSTRIAL *S. CEREVISIAE*, CON APLICACIÓN EN EL  
DESARROLLO DE CEPAS HIPO PRODUCTORAS DE ETANOL**

Seminario de Título

Entregada a la

Universidad de Chile

en cumplimiento parcial de los requisitos

para optar al Título de

Ingeniero en Biotecnología Molecular

Por:

Felipe Antonio Vargas Vargas

Diciembre 2007

Santiago - Chile

Director de Memoria de Título: Dr. Eduardo Agosín Trumper

FACULTAD DE CIENCIAS  
UNIVERSIDAD DE CHILE

INFORME DE APROBACION  
MEMORIA DE TITULO

Se informa a la Escuela de Ciencias de la Facultad de Ciencias que la Memoria de Título presentada por el candidato.

Felipe Antonio Vargas Vargas

Ha sido aprobada por la Comisión de Evaluación de la Memoria de Título como requisito para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular, en el examen de Defensa de la Memoria rendido el día , del mes de año .

Director de Memoria de Título:

Dr. Eduardo Assin



Comisión de Evaluación de la Memoria de Título

Dr. Victoria Cifuentes

Dr. Manuelo Borge





Mi nombre es Felipe Vargas, nací el 19 de Abril de 1984. Soy el segundo de cuatro hermanos de una hermosa familia, una familia de gran esfuerzo por sacar a sus hijos adelante; sin embargo, uno no es consciente de todo ese sacrificio hasta que empieza a ver el mundo por sí mismo. Fue cuando entré al Instituto Nacional que me di cuenta, por primera vez, que la vida no es tan simple como parecía ser, que las cosas cuestan; quizás mis padres tenían razón en lo que me decían. Esos años me sirvieron para enfrentar y mirar al mundo desde otro punto de vista, un punto de vista más real.

Logré entrar a la universidad de manera de que esto no significara una carga para mis padres; entré además, al lugar y la carrera que tanto anhelaba. Estos enormes objetivos fueron un gran aliciente para mi desarrollo personal y los nuevos desafíos venideros. Durante los años de mi carrera las cosas anduvieron muy bien, no puedo negar que lo pasé bien, que compartí gratos momentos con mis amigos y que los años de experiencia ganados durante las pasantías no fueron en vano. Costó, no lo niego, pero afortunadamente el tesón y la perseverancia tienen frutos.

Siempre he contado con el apoyo de mi familia, y es tal vez ello lo que me ha ayudado a perseverar en la vida. No puedo decir que las cosas me han costado más que a otros, pero sí puedo afirmar que todo en la vida es posible, desde lo más simple hasta lo más idealista, sólo es cuestión de proponérselo... junto al apoyo de los más cercanos.

*A mi familia...*



## AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer primero que todo a mi tutor Dr. Eduardo Agosín por su guía, apoyo y confianza depositada. Gracias por las discusiones constructivas que me hicieron crecer tanto en forma profesional como personal.

Quiero agradecer a los miembros de mi comisión de evaluación Dr. Víctor Cifuentes y Dr. Marcelo Baeza por las enriquecedoras discusiones, que fueron una enorme contribución a mi desarrollo profesional.

Quiero dar mi agradecimiento a todos mis compañeros de trabajo, a todos quienes estuvieron allí para dar nuevas alternativas, mirar desde otro punto de vista o sólo para escuchar un problema. Gracias Francisco Pizarro por tu ayuda incondicional; Ana María Molina, Víctor Guadalupe y María Isabel Moenne por su apoyo y consejos. Gracias a todos aquellos que participaron indirectamente en la realización de esta memoria Carolina, David, Katty, Mauricio, Marcelo, Sebastián, Cristian y Alejandro.

Para mí es de especial importancia agradecer a mis padres y hermanos por su preocupación y amor, que hacen de uno una persona más íntegra que el día de ayer. Gracias por ser como son y ser mi familia.

Por último, quiero dar mis más sincero agradecimiento a Lorena Carrasco, que gracias a su amor y ayuda no podría haber realizado éste ni otros desafíos.

## ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE FIGURAS.....	VI
ÍNDICE DE TABLAS .....	VII
ÍNDICE DE ANEXOS.....	VIII
RESUMEN.....	X
ABSTRACT.....	XII
I. INTRODUCCIÓN .....	1
I.1. VINO Y FERMENTACIÓN.....	1
I.2. EL PROBLEMA.....	3
I.3. ESTADO DEL ARTE .....	5
I.4. LA PROPUESTA .....	9
I.5. HIPÓTESIS DE TRABAJO .....	11
I.6. OBJETIVOS .....	12
II. MATERIALES Y MÉTODOS .....	13
II.1. CEPAS Y PLÁSMIDOS .....	13
II.1.1. CEPAS DE MICROORGANISMOS .....	13
II.1.2. PLÁSMIDOS .....	14
II.2. MEDIOS DE CULTIVO.....	14
II.2.1. MEDIOS DE CULTIVO PARA BACTERIA .....	14
II.2.2. MEDIOS DE CULTIVO PARA LEVADURA.....	15
II.2.2.1. MEDIO YPD.....	15
II.2.2.2. MEDIO MS300 .....	15
II.2.3. CRECIMIENTO Y MANTENCIÓN DE CÉLULAS .....	16
II.3. MÉTODOS DE TRANSFERENCIA GÉNICA .....	17
II.3.1. TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.....	17
II.3.1.1. OBTENCIÓN DE CÉLULAS COMPETENTES DE <i>E. COLI</i> .....	17
II.3.1.2. TRANSFORMACIÓN POR CHOQUE TÉRMICO.....	17
II.3.2. TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS.....	18
II.4. TÉCNICAS DE SILENCIAMIENTO GÉNICO .....	18
II.4.1. SILENCIAMIENTO DE GENES CROMOSÓMICOS UTILIZANDO FRAGMENTOS.....	18
DE PCR.....	18
II.4.2. GENERACIÓN DEL MÓDULO DE ESCISIÓN GÉNICA .....	19
II.4.3. ELIMINACIÓN DE LA RESISTENCIA AL ANTIBIÓTICO.....	20
II.5. TÉCNICAS DE ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEICOS .....	21
II.5.1. AISLAMIENTO DE ADN.....	21
II.5.1.1. AISLAMIENTO DE ADN PLASMÍDICO DE BACTERIA .....	21

II.5.1.2.	AISLAMIENTO DE ADN CROMOSÓMICO DE LEVADURA .....	21
II.5.2.	ANÁLISIS DE FRAGMENTOS DE ADN .....	22
II.5.3.	PURIFICACIÓN DE BANDAS DESDE GELES DE AGAROSA .....	22
II.5.4.	USO DE ENZIMAS DE RESTRICCIÓN .....	23
II.5.5.	AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS DE ADN MEDIANTE LA REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR) .....	23
II.5.5.1.	DISEÑO DE PARTIDORES .....	24
II.6.	MICROFERMENTACIONES .....	27
II.6.1.	TÉCNICAS ANALÍTICAS .....	27
II.6.1.1.	MUESTREO .....	27
II.6.1.2.	CUANTIFICACIÓN .....	28
II.6.1.2.1.	BIOMASA .....	28
II.6.1.2.2.	METABOLITOS .....	28
II.6.2.	ANÁLISIS ESTADÍSTICO .....	29
III.	RESULTADOS .....	31
III.1.	SELECCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UNA ESTRATEGIA DE ESCISIÓN GÉNICA .....	31
III.2.	GENERACIÓN Y TRANSFORMACIÓN DEL MÓDULO DE ESCISIÓN .....	32
III.3.	VERIFICACIÓN DE TRANSFORMANTES .....	35
III.4.	REMOCIÓN DEL MÓDULO <i>LOXP-KANMX-LOXP</i> INSERTADO EN EL ADN CROMOSÓMICO .....	43
III.5.	MICROFERMENTACIONES .....	44
III.6.	ANÁLISIS DE LOS DATOS .....	48
IV.	DISCUSIÓN .....	52
IV.	CONCLUSIONES .....	57
V.	PERSPECTIVAS Y TRABAJOS FUTUROS .....	58
V.	BIBLIOGRAFÍA .....	59
VI.	ANEXOS .....	64

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Esquema que representa la generación del módulo de escisión génica .....	20
Figura 2	Esquema del locus YBR145W del cromosoma II de levadura y la ubicación de los partidores utilizados.....	26
Figura 3	Visualización de la generación del módulo de escisión <i>AD1-loxp-KanMX-loxp-AD2</i> .....	34
Figura 4	Esquema ilustrativo de los amplicones generados a partir de la amplificación de región YBR145W del cromosoma II de levadura para la condición silvestre y mutada.....	36
Figura 5	Amplificación del gen ADH5 desde ADN cromosómico, utilizando tanto partidores flanqueantes a la mutación como del interior de los genes de interés .....	38
Figura 6	Amplificación desde bandas purificadas que corresponden a las zonas flanqueantes al gen ADH5 (amplificado previamente con partidores B1/B2), utilizando tanto partidores flanqueantes a la mutación como del interior de los genes de interés.....	40
Figura 7	Análisis de digestión de los amplicones purificados desde las zonas contiguas al gen ADH5 para las cepas silvestre y mutada (bandas $\alpha$ y $\beta$ ) .....	42
Figura 8	Cinéticas de consumo de glucosa y fructosa junto a la síntesis de etanol , glicerol, ácido acético y biomasa para fermentaciones en triplicado con <i>S. cerevisiae</i> EC1118 silvestre y <i>S. cerevisiae</i> E14.....	47

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Plásmidos utilizados en la realización de este trabajo.....	14
Tabla 2	Protocolo para la reacción de amplificación a las zonas flanqueantes del gen ADH5 desde ADN cromosómico o purificado desde bandas.....	24
Tabla 3	Resumen estadístico de la pruebas de t de student pareadas, para las cepas, <i>S. cerevisiae</i> EC1118 nativa y <i>S. cerevisiae</i> EC1118 modificada genéticamente.....	51
Tabla 4	Tabla resumen de los rendimientos promedio $Y_{SE}$ .....	51

## ÍNDICE DE ANEXOS

ANEXO 1	Esquema escisión gen adh5 por recombinación homóloga.....	64
ANEXO 2	Limitaciones para aplicar la prueba t de Student pareada.....	65

## LISTA DE ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
Cmol	Carbono mol o moles por unidad de carbono
GRAS	Sigla del inglés <i>Generally Recognized As Safe</i> , que quiere decir que es reconocido como seguro
Ks	Constante de saturación del sustrato limitante (nitrógeno) [g/L]
OGMs	Organismos genéticamente modificados
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
Sdev	Desviación estándar
STD	Estándar de peso molecular
$\mu$	Velocidad específica de crecimiento del microorganismo [1/Hora]
$\mu_{\max}$	Velocidad específica máxima de crecimiento [1/Hora]
$Y_{SE}$	Rendimiento de etanol sobre glucosa consumida, $Y_{SE} = -dE/dS = -\Delta E/\Delta S$ [Cmol/Cmol].

## RESUMEN

El vino es una bebida alcohólica derivada de la fermentación anaerobia del jugo de uva. Chile como uno de los principales exportadores de este producto, en los últimos años ha incrementado la investigación y desarrollo en el tema, de manera de mantener su posicionamiento en los mercados internacionales.

Un problema recurrente en las viñas de todo el mundo, especialmente en las viñas chilenas, es la excesiva cantidad de etanol producido por la fermentación de levaduras, dado por una parte por la tendencia actual de cosechar uvas sobremaduras con alto contenido de azúcar; y por otra parte por la extraordinaria eficiencia con que las levaduras convierten el azúcar en etanol. Actualmente para solucionar el problema se utilizan costosos procesos fisicoquímicos de remoción de etanol del vino, los cuales pueden afectar la calidad del vino final.

En esta memoria de título se abordó una solución biotecnológica a este problema, la cual fue: el desarrollo de levaduras vínicas hipoproductoras de etanol. Para este propósito y como primera aproximación, se realizó la remoción de uno de dos alelos del gen para la alcohol deshidrogenasa isoenzima V (ADH5). Este gen tiene una participación secundaria en la síntesis de etanol; sin embargo su rol en condiciones vínicas no ha sido descrito.

El primer paso fue el desarrollo de una metodología que permitiera la manipulación génica de levaduras industriales. Se implementaron metodologías para llevar a cabo primero la transformación de la cepa industrial y luego la remoción por recombinación homóloga del gen ADH5, utilizando un módulo de escisión génica con el gen de resistencia a Geneticina (KanMX) y con el sistema de escisión *Cre-Loxp*. Luego éste fue transformado a la cepa diploide industrial *S. cerevisiae* var. *bayanus* EC1118.

Fermentaciones batch en mosto sintético de *S. cerevisiae* EC1118 ADH5/adh5 y *S. cerevisiae* EC1118 ADH5/ADH5, evaluando estadísticamente tanto la cinética de síntesis de metabolitos como del consumo de nutrientes, revelaron que no hay diferencias significativas entre la cepa silvestre y la mutada. La mutación de un alelo del gen ADH5 de la cepa industrial *S. cerevisiae* EC1118 es aún escaso para observar un fenotipo. Sin embargo estos resultados son una primera aproximación experimental al objetivo principal y generaron una plataforma de discusión para nuevas formas para abordar el desafío de obtener una cepa vínica hipoproductora de etanol.

## ABSTRACT

Wine is an alcoholic beverage derived from an anaerobic fermentation of grape-juice. In the last few years Chile has increased its R&D efforts in this area to sustain its position in the global market.

A recurrent problem in wineries around the world, and specially in Chilean wineries, is the excessive amount of ethanol produced by yeast fermentation. This is caused on the one hand by the trends to harvest over-ripe grapes, *i.e.* with high sugar content; and on the other hand by the yeast extraordinary efficiency to convert sugar into ethanol. To solve this problem expensive physico-chemical processes are used to remove wine ethanol, which may also affect the quality of the final wine.

In this work, a biotechnological approach was used to solve this problem: the development of a ethanol hypoproducing wine yeast strain. To accomplish this, as a first approach, one allele of the alcohol dehydrogenase isoenzyme V (ADH5) gene was deleted. This gene has a secondary participation in ethanol synthesis. However, its role in the whole ethanol synthesis under winemaking conditions has not been described.

I first develop a platform for the manipulation of yeast genes, mainly industrial wine yeast. Techniques and protocols were implemented to develop first the transformation of an industrial yeast strain and then the deletion by homologous recombination of ADH5

gene. A deletion construction with the Geneticin (KanMX) resistant gene and at the same time compatible with the *Cre-Loxp* excision system was constructed. Then, the construct was used to transform the diploid industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* EC1118.

The ADH5/*adh5* and *S. cerevisiae* EC1118 ADH5/ADH5 strains were evaluated in anaerobic batch fermentations in a synthetic must. Statistical analyses of nutrient uptake rates and metabolic production rates revealed no significant differences between wild-type and mutant strains. The mutation of only one allele of ADH5 gene does not produce an observable phenotype. Further genetic modifications are required. Nevertheless, these results are first step to reach the target. They generated a discussion platform of different approaches to obtain an ethanol hypoproducing industrial strain.

## I. INTRODUCCIÓN

### I.1. Vino y fermentación

El vino es una bebida alcohólica derivada de la fermentación batch anaerobia de jugo de uva. Su elaboración desde hace más de 8000 años hace que sea uno de los procesos biotecnológicos más antiguos del mundo (Pretorius, 2000; This y col., 2006). Una definición rigurosa del vino lo considera una bebida rica en etanol, glicerol, aromas, compuestos fenólicos, ésteres y un sinnúmero de otros compuestos derivados de la composición de la baya y su posterior fermentación (Lilly y col., 2000; Swiegers y col., 2005).

El proceso tradicional de elaboración del vino es el resultado de una compleja sucesión de interacciones microbianas entre hongos filamentosos, levaduras, bacterias e incluso virus (Fleet, 2003). Sin embargo es la acción de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* la que juega un rol decisivo en el desarrollo y el resultado final de la fermentación (Bisson, 2004).

Para elaborar vinos de calidad, el clima y el suelo son fundamentales y no menos importante es el proceso de vinificación. Éste último depende tanto de los microorganismos utilizados como de la habilidad de los enólogos en su manejo (Husnik y col., 2006). La tendencia actual de inocular el mosto de uva con cultivos de levadura *S. cerevisiae* puros y específicos ayuda a dirigir la fermentación hacia un producto

específico con un determinado sabor y aroma en el vino final, “bouquet de fermentación”, mas es preciso una correcta selección de la cepa de levadura. Desde un punto de vista biotecnológico, el uso de levaduras rehidratadas comerciales (active dry yeast) tiene un alto impacto en la microbiota de la fermentación, ya que induce una clara predominancia de la cepa inoculada sobre las cepas endógenas (Beltran y col., 2002; Perez-Gonzalez y col., 1993).

Durante la fermentación, las levaduras no crecen en un medio rico. Por el contrario, el medio (jugo de uva) si bien comienza con exceso de nutrientes cambia durante la fermentación debido al consumo y a la acumulación de compuestos que se sintetizan durante el crecimiento de las levaduras; volviéndose inhóspito y estresante para todo tipo de vida presente. La concentración de glucosa y fructosa cambia de más de 200g/L a menos de 2 g/L (Alexandre and Charpentier, 1998), los compuestos nitrogenados se agotan, aumenta el nivel de etanol y acetaldehído, baja el pH y se genera anaerobiosis (Bisson, 1999; Varela y col., 2004).

Debido a la complejidad del proceso y la directa relación que tiene la elaboración del vino con el crecimiento de levaduras de la especie *S. cerevisiae* hacen que el estudio de este microorganismo sea extremadamente interesante a la hora de buscar soluciones para problemas típicos de la industria del vino, y más que eso hacen de esta levadura un organismo objetivo a la hora de modificar y realzar cualidades deseables para el vino.

## **I.2. El Problema**

Uno de los principales desafíos a abordar en el mercado del vino es, sin duda, el innovar; abrir nuevos mercados a partir del desarrollo de nuevos tipos y estilos de vino, en particular, gestados por las exigentes preferencias del consumidor (Pretorius, 2000; Pretorius and Bauer, 2002).

La tendencia actual, desde la perspectiva del consumidor, es gestada principalmente por el ritmo de vida de la sociedad contemporánea y sus hábitos de consumo limitados por estrictas normas para los consumidores que limita cada día más la ingesta de alcohol. Esto ha provocado un aumento en la demanda de vinos con bajo grado alcohólico e incluso vinos des-alcoholizados, generando una fuerte presión sobre los productores de vinos.

Un problema propio de los países del nuevo mundo es la tendencia de cosechar uvas sobremaduras para alcanzar un máximo en la madurez polifenólica, buscando mostos con buen potencial aromático. Sin embargo esto resulta en la deshidratación de la baya con el consecuente aumento en la concentración de azúcar (Swiegers y *col.*, 2005). En las regiones cálidas los niveles de azúcar que se alcanzan son aún más altos, lo que se traduce en vinos con una alta concentración de alcohol que, en el caso de los tintos, superan los 14° (v/v) de etanol. Además, es importante considerar que la alta concentración de etanol puede afectar las propiedades sensoriales del vino (Guth and

Sies, 2002), enmascarando aromas y los sabores de éste. Más aún, dependiendo del estilo del vino, el alcohol puede ser percibido como una sensación de calor en el paladar, lo que puede resultar en un vino desbalanceado.

Cabe señalar que la nomenclatura aduanera clasifica los vinos en función de su nivel de alcohol, haciéndoles corresponder un impuesto más alto para los vinos de mayor graduación. Por esta razón, los productores deben incurrir en procesos de reducción o remoción de alcohol del vino, que representan un costo adicional y además pueden provocar pérdidas de compuestos aromáticos y sabores. Para este propósito existen dos grandes empresas que comercializan equipos donde el alcohol es removido por procesos fisicoquímicos, osmosis inversa (Vinnovation, Inc.) y *columna* de conos rotatorios (Spinning Cone Column, SCC) (FlavourTech Co.). También ha sido descrito que procesos como destilación, filtración con membranas, extracción, adsorción, centrifugación, concentración por congelación y fermentación parcial, podrían ser igualmente válidos para reducir la carga alcohólica de un vino (Swiegers y *col.*, 2005).

Aunque la mayoría de estos métodos son efectivos y la cantidad de alcohol removido es fácilmente controlable, estos métodos son costosos y pueden llegar a ser muy intensivos desde el punto de vista del productor. Inclusive, algunas de estas técnicas, no pueden ser usadas o no están aprobadas explícitamente por la Organización Internacional de la Vid y el Vino (OIV) y/o legislaciones locales.

### **I.3. Estado del Arte**

La desafiante búsqueda por reducir el grado alcohólico del vino de una forma económica y que no signifique una pérdida en la calidad de éste, se ha traducido en diferentes puntos de vista y alternativas en la forma de abordar el problema. Una alternativa no física es el tratamiento del mosto con preparaciones enzimáticas, tales como la glucosa oxidasa (GOX), que reduce el contenido de azúcar del mosto. La glucosa del mosto es convertida por GOX en D-glucono- $\gamma$ -lactona y ácido glucónico, y por lo tanto, no se encuentra disponible para la formación de etanol durante el proceso fermentativo (Pickering y *col.*, 1999). A pesar de ser una manera eficiente de reducir los niveles del alcohol en el vino, el uso de preparaciones enzimáticas puras a una escala industrial es todavía muy costoso. Más aún, el impacto que pueda tener en las propiedades sensoriales del vino es desconocido.

Una alternativa a las soluciones fisicoquímicas actualmente en uso a nivel industrial, es evaluar una solución biológica a la menor producción de etanol. Ésta es posible abordarla de dos formas diferentes: primero pensando en modificar las condiciones o parámetros de fermentación, de manera de favorecer una determinada condición fisiológica en donde se produce menos etanol, por ejemplo favoreciendo la respiración celular por pulsos de microoxigenación (Heux y *col.*, 2006).

La segunda forma busca disminuir la concentración de alcohol en el vino a partir de la selección o desarrollo de cepas de levaduras en las cuales el flujo glicolítico de azúcar sea desviado de la producción de alcohol hacia la formación de compuestos secundarios como glicerol. Si bien el glicerol no tiene un impacto directo en las características aromáticas del vino, si tiene una directa relación con la calidad de éste, debido a las propiedades sensoriales que aporta al sabor y quimio-estasis del vino (Eglinton y col., 2002; Remize y col., 1999b). Por lo tanto también puede ser de interés producir glicerol sobre los niveles normales (4-9 g/L) para mejorar así, la calidad del vino.

En cultivo anaerobio, *S. cerevisiae* convierte eficientemente el azúcar en etanol, los rendimientos de etanol experimentales sobre glucosa ( $Y_{SE}$ ) fluctúan entre 0.5 y 0.6 Cmol /Cmol, valores muy cercanos al  $Y_{SE}$  máximo teórico (0.66 Cmol/Cmol). Por lo tanto la generación de un organismo genéticamente modificado (GMO) se vislumbra como una solución factible a la hora de desviar el flujo de síntesis de etanol y así reducir el  $Y_{SE}$ .

La fermentación alcohólica del mosto por la levadura no sólo produce etanol y dióxido de carbono, además produce biomasa y otros metabolitos, siendo el glicerol y los ácidos orgánicos cuantitativamente los más importantes. Aumentos significativos en la concentración de glicerol extracelular se han logrado por sobreproducción de GPDH (glicerol-3-fosfato deshidrogenasa). La sobreexpresión de la principal isoenzima GDP1 en levaduras de laboratorio y vnicas resulta en un aumento de 2-3 veces en la producción de glicerol, al mismo tiempo de una disminución del etanol (Michnick y col., 1997; Nevoigt and Stahl, 1996; Remize y col., 1999b). La transformación de una cepa

con un plásmido multicopia que contiene el gen que codifica para la GPD1 bajo el promotor de la ADHI produjo 12-18 g de glicerol / litro y aproximadamente 1% v/v menos de etanol (Remize y col., 1999b). Disminuciones similares de alcohol se han conseguido con la expresión en levaduras del gen de glucosa oxidasa GOX1 del hongo *Aspergillus niger*. Al combinar estas dos estrategias se tendría teóricamente el potencial de disminuir el contenido de alcohol más de un 4% (v/v) si fuese requerido (Malherbe y col., 2003). Como resultado del reacomodo del balance de carbono y de un equilibrio redox alterado, estas mutantes exhiben altos niveles de producción de productos secundarios, principalmente ácido acético, 2,3-butanodiol y ácido succínico, compuestos muchas veces indeseados en el "bouquet" del vino final (Michnick y col., 1997; Remize y col., 1999a). Una modificación adicional, la escisión del gen ALD6 (aldehído deshidrogenasa) produjo altos niveles de glicerol, sin haber aumentado la producción de acetato, aunque el reordenamiento y reacomodo del flujo de carbono aumentó la formación de succinato, acetoina, acetato y 2,3 butanodiol (Eglinton y col., 2002; Remize y col., 1999b)

Usando métodos de genética clásica, que involucraron el cruce de cepas hiper productoras de glicerol para desarrollar una cepa súper productora, se consiguió duplicar la biosíntesis de glicerol. Con métodos similares se han obtenido hasta 18 g/L de glicerol en fermentaciones vínicas (Prior y col., 1999). Por otra parte, experimentos de ingeniería genética han logrado sobreproducir los niveles de glicerol hasta un 400% con el consecuente reducción de etanol (Michnick y col., 1997; Remize y col., 1999a); sin embargo los niveles de productos secundarios son demasiado altos.

Para fines enológicos, el grado alcohólico no es necesario reducirlo en grandes cantidades; más bien sólo en un 2-3 % v/v del vino final. Si el  $Y_{SE}$  real es normalmente 0,61 Cmol de etanol por Cmol de glucosa (rendimiento de etanol producido sobre glucosa consumida), entonces es necesario reducirlo a alrededor de 0,5 Cmol de etanol por Cmol de glucosa. Esto equivale a redireccionar, dentro del flujo glicolítico, alrededor de 0,11 Cmoles de etanol por cada Cmol de glucosa consumida, además de los 0,06 moles de NADH por Cmol de glucosa que no se oxidan por este concepto.

A pesar que las técnicas modernas ofrecen transformaciones biotecnológicas junto a los usos del ADN recombinante, éstas no pueden ser empleadas por el momento en levaduras comerciales para la elaboración de vinos, y es Chile quien puede verse afectado al introducir ingeniería genética en sus levaduras ya que los mercados internacionales tienen, actualmente, un alto rechazo a los OGMs. El desconocimiento, sumado a la incertidumbre, se ha traducido en miedo y negación a aquellos productos en los que ha intervenido esta disciplina. Sin embargo, ante una eventual liberación de los OGMs, es indudable que todos los países que no hayan desarrollado investigación propia en el área se verán en una situación de desventaja con sus tradicionales competidores (Bisson, 2004; Dequin, 2001; Pretorius and Bauer, 2002).

#### I.4. La propuesta

Una solución, no abordada por investigadores, es disminuir la síntesis de etanol a partir del silenciamiento de genes que codifican para isoenzimas de la aldehído deshidrogenasa ADH, las cuales poseen actividades bastante menores a la enzima principal. En levadura, se ha descrito hasta el momento 7 alcohol deshidrogenasas (ADH1 a ADH7). ADH1 es la isoforma citoplasmática de alcohol deshidrogenasa y la principal enzima requerida para la conversión de acetaldehído en etanol (Drewke y col., 1990). Sólo las ADH1, ADH3 y ADH5 están involucradas en la síntesis de etanol; las demás se relacionan con crecimiento a partir de etanol, hidrólisis de formaldehído y formación de alcoholes superiores (Larroy y col., 2002).

En condiciones aeróbicas una cepa *adh1* reduce un 50 % su producción de etanol, indicando que es la isoforma predominante (Smith y col., 2004). Además, una triple mutante *adh1,3* y *5* reduce en un 35% el etanol liberado comparado con una cepa doble mutante *adh1,3* (Smith y col., 2004); y una cepa tetra mutante *adh1,2,3,4* produce un tercio del etanol que una cepa silvestre y no crece en medio anaeróbico (Drewke y col., 1990). Esto deja de manifiesto un rol no descrito de la enzima ADH5 en la síntesis de etanol en condiciones vínicas; más aún si se toma en consideración que los estudios realizados a la fecha son mayoritariamente en medios aeróbicos y la fermentación vínica es un proceso anaerobio.

El gen ADH5 podría estar involucrado en la síntesis de alrededor de un 15% del etanol total, lo que abre una interesante posibilidad para la obtención del rendimiento  $Y_{SE}$  deseado; es indudable que la posibilidad de generar un desbalance redox (exceso de NADH) es alta a partir de una escisión génica como ésta; pero también es factible que la síntesis de glicerol compense, al menos en parte, dicho déficit.

Para evaluar la función que tiene esta enzima en condiciones vínicas se abordó un diseño experimental que permitió remover, en una primera instancia, un alelo del gen ADH5 de una cepa industrial vínica, sentando las bases para continuar con el siguiente alelo. Se utilizó la cepa diploide *S. cerevisiae* EC1118, la cual se ha reportado tener sobre un 99% de identidad con la levadura S288c y sobre un 99% de sus genes en dos copias (Dunn *y col.*, 2005). De esa forma no sólo se conocería la importancia de este gen en condiciones vínicas, sino que también se implementarían las metodologías necesarias para desarrollar silenciamiento génico en cualquier gen de una cepa industrial vínica. Si bien se utilizaron metodologías invasivas para cumplir el objetivo, se generó una plataforma de discusión sobre nuevas estrategias a fin de obtener soluciones biológicas no invasivas, no transgénicas y reconocidas como seguras (GRAS, del inglés *Generally Recognize As Safe*).

## **I.5. Hipótesis de trabajo**

La generación de un módulo de escisión génica basado en la recombinación homóloga de secuencias laterales al gen de interés es suficiente para remover un alelo del gen *ADH5* en una levadura industrial vínica. Luego, si la dosis génica de este gen es importante en el fenotipo será posible observar una reducción en el rendimiento de etanol sobre glucosa ( $Y_{SE}$ ) evaluado sobre una fermentación vínica en mosto sintético.

## **I.6. Objetivos**

### **I.6.1. Objetivos generales**

- Desarrollar e implementar una metodología que sea capaz de escindir genes de interés en una cepa industrial de *S. cerevisiae*.
- Analizar las implicancias que tiene la remoción de un alelo del gen ADH5 de una cepa industrial en la síntesis de etanol en una fermentación vínica.

### **I.6.2. Objetivos específicos**

- Revisión del estado del arte.
- Planificación de una estrategia de escisión génica.
- Implementación de los protocolos y técnicas asociadas.
- Generación y transformación del módulo de escisión génica a una cepa *S. cerevisiae* industrial.
- Selección y verificación de clones con el alelo del gen ADH5 removido.
- Micro fermentaciones comparando a la cepa mutada versus la cepa silvestre.
- Análisis estadístico de los resultados obtenidos.

## II. MATERIALES Y MÉTODOS

### II.1. Cepas y plásmidos

#### II.1.1. Cepas de microorganismos

Durante el desarrollo de este trabajo se utilizó la cepa de *E. coli* JM109 (endA1, recA1, gyrA96, thi, hsdR17 (rk-, mk+), relA1, supE44,  $\Delta$ ( lac-proAB), [F' traD36, proAB, laqIqZAM15]) (Promega Corporation) la cual permite la  $\alpha$ -complementación con el gen LacZ presente en plásmidos de clonamiento. Estos microorganismos se utilizaron principalmente para la propagación y almacenaje de plásmidos.

Para la modificación génica y fermentación vínica se utilizó a la levadura *Saccharomyces cerevisiae* var. *bayanus* EC1118, formalmente conocida como “Prise de Mousse”, es una levadura industrial con genotipo diploide (Bradbury y col., 2006), homotática y con sobre un 99% de sus genes en dos copias (Dunn y col., 2005). Es comercializada por Lalvin/Lallemand.

## II.1.2. Plásmidos

A continuación se describen características de los plásmidos utilizados para la realización de este trabajo:

Tabla 1 Plásmidos utilizados en la realización de este trabajo

Plásmido	Descripción	Referencia
pGEM-T	AmpR, <i>ori</i> <sub>bact</sub>	Promega
pUG6	AmpR, KanMX, <i>ori</i> <sub>bact</sub>	Güdenner, 2002; EUROSCARF <sup>1</sup>
pSH65	AmpR, FleoR, recombinasa CRE, <i>ori</i> <sub>bact</sub>	Güdenner, 1996, EUROSCARF <sup>1</sup>

## II.2. Medios de Cultivo

### II.2.1. Medios de cultivo para bacteria

Para el mantenimiento y cultivo habitual de cepas bacterianas se utilizó el medio LB (Luria-Bertani) (Sambrook y *col.*, 1989) que contiene 10 g/L de bacto-triptona, 5 g/l de extracto de levadura y 10 g/l de NaCl. Para la recuperación de células tras la transformación de ADN se utilizó el medio SOC, compuesto de 20 g/L de bacto-triptona, 5 g/L de extracto de levadura, 0,5 g/L de NaCl, 0,18 de KCl, 0,24 MgCl<sub>2</sub> y 3,6 g/L de glucosa. Para el crecimiento sobre sustrato sólido se adicionó 15 g/L de agar al

---

<sup>1</sup> EUROpean *Saccharomyces Cerevisiae* ARchive for Functional analysis

medio de cultivo. En los casos donde fuese necesario el medio de cultivo se suplementó con ampicilina 100 µg / mL (Sambrook y col., 1989).

## **II.2.2. Medios de cultivo para levadura**

### **II.2.2.1. Medio YPD**

El cultivo de cepas *S. cerevisiae* industriales EC1118 utilizadas en este trabajo experimental se llevó a cabo empleando habitualmente el medio de cultivo YPD (Sherman, 2002), el cual es un medio complejo, apto tanto para el crecimiento habitual de las levaduras como para su recuperación luego de transformación. Este medio se compone de 10 g/L de extracto de levadura, 20 g/L de peptona y 20 g/L de glucosa. Para YPD sólido, se adicionó 20 g/L de agar y 0,1g/L de NaOH, para elevar el pH y evitar precipitación del agar (Ausubel y col., 2000). En los casos donde fue necesario los medios de cultivos se suplementaron con Geneticina (G-418 sulfato) (Gibco™, Invitrogen) 200 µg / mL y/o fleomicina (Sigma) 7,5 µg/mL (Xiao, 2006).

### **II.2.2.2. Medio MS300**

Para las fermentaciones vínicas se utilizó un medio definido denominado mosto sintético, el cual imita las condiciones naturales de un mosto de uva estándar, previamente descrito (Bely y col., 1990; Giudici and Kunkee, 1994). Es rico en azúcar, pero limitado en nitrógeno. Este medio contiene por litro: 100 g de glucosa, 100 g de fructosa, 6 g of ácido cítrico, 6 g de ácido DL-málico, 750 mg de KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 500 mg de

$\text{KH}_2\text{SO}_4$ , 250 mg de  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 155 mg de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 200 mg de NaCl, 4 mg de  $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , 4 mg de  $\text{ZnSO}_4$ , 1 mg de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg de KI, 0,4 mg de  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ , 1 mg de  $\text{H}_3\text{BO}_3$ , 1 mg de  $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ , 20 mg de mio-inositol, 2 mg de ácido nicotínico, 1,5 mg de pantotenato de calcio, 0,25 mg de hidrocloreto de tiamina, 0,25 mg of hidroxicloreto de piridoxina, y 0,003 mg de biotina.

Las fuentes de nitrógeno adicionadas son: 18,6% p/p de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ , 20,5% p/p L-prolina, 16,9% p/p L-glutamina, 1,25% p/p L-arginina, 6% p/p L-triptófano, 4,9% p/p L-alanina, 4% p/p ácido L-ácido glutámico, 2,6% p/p L-serina, 2,6% p/p L-treonina, 1,6% p/p L-leucina, 1,5% p/p ácido L-aspartico, 15% p/p L-valina, 1,3% p/p L-fenilalanina, 1,1% p/p L-isoleucina, 1,1% p/p L-histidina, 1,1% p/p L-metionina, 0,6% p/p L-tirosina, 0,6% p/p L-glicina, 0,6% p/p L-lisina, y 0,4% p/p cisteína.

Como el oxígeno es un sustrato esencial para la biosíntesis de esteroides (ergosterol) y ácidos grasos insaturados (Fornairon-Bonnefond *y col.*, 2002) se suministraron los factores anaerobios necesarios : 15 mg/L de ergosterol, 5 mg/L de oleato de sodio y 0,5 ml/L de Tween 80.

### II.2.3. Crecimiento y mantención de células

Las cepas de *S. cerevisiae* y de *E. coli* se conservaron a  $-80\text{ }^\circ\text{C}$  suspendidas en glicerol al 15 y 20% (p/v), respectivamente. Las de uso frecuente se mantenían a  $4\text{ }^\circ\text{C}$  en placas petri crecidas en el medio sólido adecuado . El cultivo en medio líquido se realizó en

matraces o tubos de ensayo de al menos 5 veces el volumen del medio de cultivo a contener, para asegurar una buena aireación. La incubación de *S. cerevisiae* y *E. coli* se realizó, respectivamente, a 30 y 37 °C con agitación entre 150-200 rpm. Los cultivos en medios sólidos se realizaron en placas petri incubadas a las mismas temperaturas del medio líquido.

Los estudios de vinificación se realizaron en matraces de 500 mL llenos con 500 mL de medio MS300, de manera de imponer una condición anaerobia. Las fermentaciones se llevaron a cabo sin agitación y a 30°C. Para inocular los cultivos se utilizaron 10<sup>6</sup> células /mL de cultivo, las cuales fueron previamente lavadas con NaCl 0,1 M.

### **II.3. Métodos de transferencia génica**

#### **II.3.1. Transformación bacteriana**

##### **II.3.1.1. Obtención de células competentes de *E. coli***

Las células de *E. coli* JM109 (Promega) fueron hechas competentes mediante el método del cloruro de calcio (Sambrook y col., 1989). Luego almacenadas a -80°C hasta su utilización.

##### **II.3.1.2. Transformación por choque térmico**

Este método de transformación es descrito en Sambrook y col., (1989) y en las especificaciones técnicas del distribuidor. Se mezclaron 50 µL de células competentes

con 50 ng de ADN a transformar (pGEM-T::fragmento ligado). La mezcla se incubó en hielo por 20 minutos, luego se aplicó un choque térmico de 50 segundos a 42 °C y se incubó en hielo otros 2 minutos. Finalmente se adicionó 1 mL de medio SOC a la mezcla y se incubó 1 hora a 37°C. Luego se sembró el cultivo transformado en placas de medio LB/Amp/IPTG/X-Gal.

### **II.3.2. Transformación de levaduras**

La transformación de células de *S. cerevisiae*, cepa EC1118, se realizó mediante el método de acetato de litio (Xiao, 2006). Esta técnica utiliza una solución de cationes divalentes (acetato de litio) tanto en la preparación de las células competentes como en la transformación por choque térmico (Ito y col., 1983), además del uso de un coadyuvante para la transformación -ADN de esperma de salmón- (Schiestl and Gietz, 1989). Para un buen porcentaje de éxito la transformación de 50 µL de células competentes necesita ~1 µg de producto de PCR a introducir (Xiao, 2006).

## **II.4. Técnicas de silenciamiento génico**

### **II.4.1. Silenciamiento de genes cromosómicos utilizando fragmentos de PCR**

Con esta metodología es posible reemplazar una secuencia cromosómica por un gen de resistencia a antibióticos, generado por PCR, utilizando oligonucleótidos con extensiones homólogas correspondientes al gen a remover. Estas extensiones permitirán la recombinación en las regiones flanqueantes al gen. Después de la selección de

mutantes, la resistencia al antibiótico puede ser eliminada utilizando el plásmido pSH65 que expresa la recombinasa CRE, actuando sobre la repetición directa **Loxp** adyacente al gen de la resistencia.

#### **II.4.2. Generación del módulo de escisión génica**

La resistencia a geneticina, proporcionada por el gen KanMX (Wach *y col.*, 1994) del plásmido pUG6, se amplificó utilizando oligonucleótidos que en su extremo 5' contienen secuencias homólogas (entre 40 y 43 nucleótidos) al gen objeto de mutación (AD1 y AD2), más la secuencia correspondiente a loxp1 y loxp2 del plásmido pUG6 (Figura 1). En total los oligonucleótidos midieron entre 59 y 65 nucleótidos. De esta forma, al amplificar la secuencia *loxp-KanMX-loxp* del plásmido pUG6, se genera un fragmento de PCR que contiene la resistencia al antibiótico KanMX, flanqueada por los sitios loxp, más las secuencias homólogas al gen que se quiere escindir (AD-1 y AD-2). Todo el segmento generado tiene un tamaño teórico de de 1695 pb. El fragmento amplificado no es necesario purificarlo debido a que el plásmido pUG6 no tiene origen de replicación en levadura.

El programa de amplificación utilizado para el termociclador PTC-200 (Peltier Thermalcycler) fue con un comienzo de 95°C por 5 minutos, luego 25 ciclos de denaturación, hibridación y extensión a 94 (40 segundos), 58 (1 minutos) y 68°C (2 minutos), respectivamente. Finalmente una extensión final a 68 °C durante 15 min.

A.

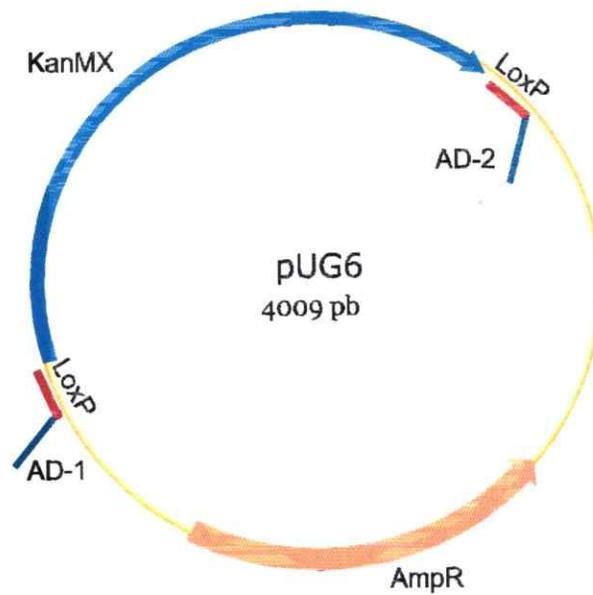
PartidorADH5-Loxp1



PartidorADH5-Loxp2



B.



**Figura 1** Esquema que representa la generación del módulo de escisión génica. En **A** se ilustra los partidores necesarios para amplificar el gen de resistencia KanMX, este se componen de una región de homología con el locus génico a recombinar y de la región partidora para los sitios Loxp del plásmido pUG6. En **B** se esquematiza la amplificación del plásmido pUG6 a partir de los partidores sintetizados.

### **II.4.3. Eliminación de la resistencia al antibiótico**

Una vez comprobada la mutación del gen en un alelo por PCR, se transformó con el plásmido pSH65, que contiene el gen para la recombinasa CRE bajo el promotor GAL, resistente a ampicilina y fleomicina, y con origen de replicación bacteriano. Los transformantes se sembraron en medio sólido YPD a 30°C, y luego las colonias se repicaron en medio sólido YPG para favorecer la expresión de la recombinasa CRE. Las células crecidas fueron sembradas en duplicado en placas YPD-agar con y sin geneticina. Las colonias que pierdan la resistencia a geneticina son las que debieran haber removido el segmento KanMX de su genoma.

## **II.5. Técnicas de análisis de ácidos nucleicos**

### **II.5.1. Aislamiento de ADN**

#### **II.5.1.1. Aislamiento de ADN plasmídico de bacteria**

El aislamiento de ADN plasmídico de *E. coli* se realizó según el método de lisis alcalina descrito por Sambrook *et al.*, (1989). El método se llevó a cabo a pequeña escala (miniprep) a partir de 2-3 ml de cultivo.

#### **II.5.1.2. Aislamiento de ADN cromosómico de levadura**

Para aislar el ADN cromosómico de levaduras se utilizó un método mecánico de ruptura de células (Hoffman and Winston, 1987) basado en la utilización de perlas de vidrio de

tamaño 0.5 mm (BioSpec products, Inc.), junto a una solución de SDS y Triton X-100 para lisar las levaduras.

### **II.5.2. Análisis de fragmentos de ADN**

Los fragmentos de ADN, ya sea producto de una amplificación por PCR o resultado de una digestión enzimática, fueron visualizados tras electroforesis horizontales en geles de agarosa. Todos los geles de agarosa se prepararon al 1,5 % (p/v) en el tampón Tris Acetato-EDTA 1x (TAE 1x), que contiene 40 mM de Tris-base pH 8,0, 1 mM de EDTA y 0,1142 % (v/v) de ácido acético glacial, según se describe en Sambrook, (1989). Las electroforesis se realizaron a 70-100 voltios. Las bandas de los fragmentos de ADN se hicieron visibles al teñirlas con una solución de bromuro de etidio 10 mg / mL y luego iluminando el gel con un transiluminador de luz ultravioleta Vilver Lourmat de 320 nm.

### **II.5.3. Purificación de bandas desde geles de agarosa**

Para purificar bandas de ADN desde geles de agarosa con el fin de obtener ADN molde para reacciones de PCR, se utilizaron columnas S.N.A.P.TM y su protocolo descrito en el manual I-SAGETM (Invitrogen). Se aisló y molió la banda del gel a purificar, se adicionó 150 µL de un solución de 3 mM Tris-HCl, pH 7,5 y 0,2 mM EDTA, pH 7,5 junto a 30 µL de acetato de amonio 7,5 mM, esta mezcla se incubó 2 horas a 65°C. Luego se hizo pasar por la columna S.N.A.P. TM; el eluido se precipitó por etanol 100% y se lavó con etanol 70%, luego de secar el pellet se resuspendió en buffer TE.

#### **II.5.4. Uso de enzimas de restricción**

La digestión de ADN con endonucleasas de restricción se realizó según se describe en Sambrook *y col.*, (1989), utilizando los tampones y condiciones de incubación recomendados por el fabricante (Promega Corporation), para las enzimas *HhaI* y *BclI*.

Las enzimas de restricción utilizadas fueron elegidas computacionalmente de acuerdo a las secuencias genéticas del ADN anotado de levadura S288c (Goffeau *y col.*, 1996).

#### **II.5.5. Amplificación de fragmentos de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)**

Para las reacciones de amplificación de ADN cromosómico por PCR o por bandas purificadas desde geles de agarosa se utilizó la enzima termoestable Taq polimerasa (Invitrogen). El protocolo de amplificación, fue modificado a partir del descrito en Xiao, (2006), en el cual se optimizó la concentración de cloruro de magnesio en la reacción a 5 mM.

**Tabla 2** Protocolo para la reacción de amplificación a las zonas flanqueantes del gen ADH5 desde ADN cromosómico o purificados desde bandas. Se tabulan los compuestos para una reacción de amplificación de 10 y 100  $\mu\text{L}$  de solución final.

Reactivo	[ ] final	$\mu\text{L}$	$\mu\text{L}$
H <sub>2</sub> O <sub>dd</sub>		73-x	7,3-x
Tampon PCR 10X		10	1
ADN (50 / 5 ng)		x	x
Primer 1 (50 pmol/ $\mu\text{L}$ )	100 pmol/100 $\mu\text{L}$	2	0,2
Primer 2 (50 pmol/ $\mu\text{L}$ )	100 pmol/100 $\mu\text{L}$	2	0,2
dNTP's 10 mM	0.2mM	2	0,2
MgCl <sub>2</sub> 50 mM	5 mM	10	1
Taq 5 / 0,5U		1	0,1
		100	10

El programa de amplificación utilizado para el termociclador PTC-200 (Peltier Thermalcycler) fue con un comienzo de 94°C por 5 minutos, luego 35 ciclos de denaturación, hibridación y extensión a 94 (1 minuto 30 segundos), 61 (2 minutos) y 72°C (2 minutos 30 segundos), respectivamente. Finalmente una extensión final a 72°C durante 7 min. Para la amplificación de ADN purificado desde geles de agarosa, el programa del termociclador utilizó 1 minuto para cada paso de denaturación, hibridación y extensión.

#### II.5.5.1. Diseño de partidores

Para el análisis de la mutación se utilizaron una serie de partidores que amplificaban desde fuera de la mutación o desde dentro (Figura 2). Los partidores fueron diseñados mediante el programa computacional Vector NTI *advance*, versión 10.3.0, Invitrogen

Corporation, 2006; utilizando una concentración teórica de partidores en la solución de PCR de 0,25  $\mu$ M y una concentración de sales de 50 mM.

El diseño de los partidores contempló, además, el análisis de los mismos, en *software* online disponibles públicamente, como el PCR *in silico*<sup>2</sup> (Bikandi y col.), de la Universidad del país Vasco, en donde se puede testear el número de amplificaciones específicas e inespecíficas que se pueden obtener con el par de partidores diseñados. Además se usó el software online Oligo Analyzer 3.0, IDT SciTools<sup>3</sup> que estima, a partir de partidores ya diseñados, parámetros como T<sub>m</sub>, formación de horquillas, autodímeros, heterodímeros, etc.

El par de partidores (B1 y B2) fue diseñado para amplificar desde 181 pb río arriba hasta 314 pb río abajo de la zona de recombinación (AD-1 y AD-2). Los partidores pADH5, pLoxp y pKanMX amplifican desde zonas al interior de los genes de interés. El partidor pADH5 desde el interior del gen ADH5, el partidor pKanMX desde al interior del gen KanMX y el partidor pLoxp desde el interior del repetido directo Loxp. Esta conformación se esquematiza en la figura 2.

---

<sup>2</sup> <http://insilico.ehu.es/PCR/index.php?mo=eukarya>

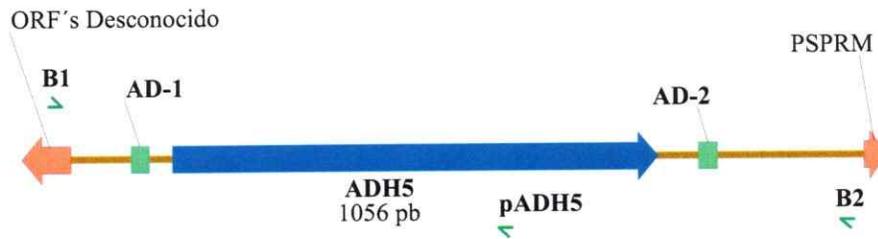
<sup>3</sup> <http://www.idtADN.com/analyzer/Applications/OligoAnalyzer/Default.aspx>

A.

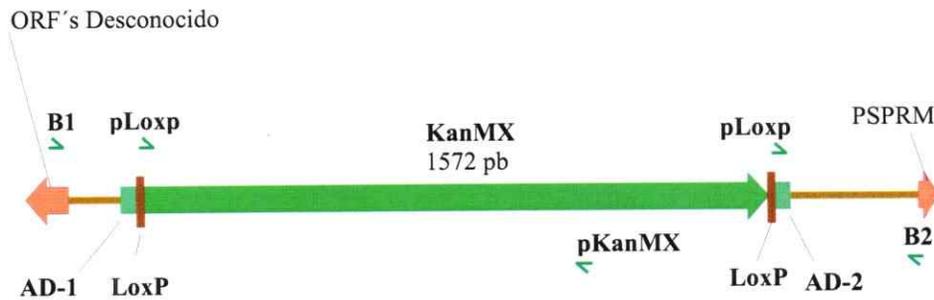
Partidores:

B1	5- TAACAGAGCCCGGCGGCATTG
B2	5- CCGCTTGGCTCAAACCTCTGTCC
pADH5	5-CAGGAACATCCGATAGGCCAGC
pLoxp	5-ACTTCGTATAATGTATGCTATACGAAG
pKanMX	5-ACCTGGAATGCTGTTTTGCCG

B.



C.



**Figura 2** Esquema del locus YBR145W del cromosoma II de levadura y la ubicación de los partidores utilizados. **A** partidores para generar amplicones de diferente longitud según si el gen es silvestre o mutado. **B** condición del locus sin modificar, silvestre, se esquematiza el gen ADH5 flanqueado de las regiones de homología AD-1 y AD-2, luego más alejado se encuentran los ORF's para la proteína de la subunidad pequeña del ribosoma mitocondrial (PSPRM), y un ORF's desconocido. **C** ilustra el gen ADH5 recombinado con el segmento génico *AD-1-loxp-KanMX-loxp-AD-2*. Como el segmento KanMX es de mayor tamaño que ADH5 se espera aumentar la distancia entre las zonas de homología (AD-1 y AD-2) de 1275 pb a 1690 pb.

## II.6. Microfermentaciones

### II.6.1. Técnicas analíticas

#### II.6.1.1. Muestreo

Se realizaron 6 fermentaciones en paralelo, 3 fermentaciones por cada cepa (cepa mutada y cepa sin modificar). Para seguir el estado de la fermentación, se tomaron muestras periódicamente. Hubo dos tipos de muestras, la primera se tomó 1 vez al día: 5 mL de cultivo para la medición de biomasa a partir del peso seco de ésta. El otro tipo de muestra se realizó dos veces al día, cada 8 y 12 horas aproximadamente para analizarlas mediante HPLC y determinar la concentración de glucosa, fructosa, ácidos orgánicos (ácido cítrico, málico, succínico, láctico, y acético), glicerol y etanol. Estas muestras se tomaron a partir de 1 mL de cultivo centrifugado por 1 minuto a 13.000 RPM, para descartar impurezas y microorganismos. El sobrenadante se guardó a -80 °C para el análisis conjunto en el equipo de HPLC.

Debido al grado de error que pudiera estar asociado a estas microfermentaciones, es que revierte especial importancia la manipulación y procedimiento de muestreo. Para sobrellevar de la mejor manera estos errores se decidió aleatorizar el proceso de muestreo, de manera de no sesgar el experimento. Esto se realizó en cada jornada de muestreo, dejando al azar el orden en que las 6 muestras de fermentación fueron tomadas. Con este simple, pero riguroso procedimiento se anuló gran parte del error, ruido o "*background*" experimental.

Las fermentaciones se realizaron dentro de un agitador orbital Lab-Line®, Intruments Inc., sin agitación, a 30 °C. Por lo tanto, para obtener muestras representativas se debió homogenizar el cultivo previo a la toma de muestras; para ello, se agitó en forma circular el matraz, de la forma más uniforme posible, durante 1 minuto, sólo deteniéndose en el caso de formación de excesiva espuma. Sí y sólo sí no persistió el precipitado en el matraz se sacó una muestra, de lo contrario se siguió agitando. De esta forma se evitó gran parte de los errores asociados a la homogenización y las muestras representativas de cada matraz.

## **II.6.1.2. Cuantificación**

### **II.6.1.2.1. Biomasa**

La biomasa de las fermentaciones fue estimada a partir de la medición del peso seco de 5 mL de muestra, en una balanza infrarroja Precisa HA300 a 65°C, la cual deshidrata las muestras y luego entrega el peso final.

### **II.6.1.2.2. Metabolitos**

Los metabolitos fueron medidos a partir de 1 mL de sobrenadante de muestra almacenados a -80°C. La concentración de glucosa y fructosa fue medida por cromatografía líquida de alta resolución (HPLC), usando una columna Bio-Rad HPX-87H (Waters Corporation) y un detector de índice de refracción (Varela y *col.*, 2004).

La concentración de ácidos orgánicos (ácido cítrico, málico, succínico, láctico, y acético), glicerol y etanol fueron medidos por HPLC usando una columna Bio-Rad HPX-87H (Waters Corporation) y un detector de absorbancia en el rango ultravioleta (Varela y col., 2003).

## II.6.2. Análisis Estadístico

Una vez obtenidos los resultados de las muestras de HPLC y peso seco, éstas se analizaron y evaluaron mediante programas computacionales como Microsoft Excel<sup>TM</sup> 2007 y Statgraphics plus version 5.1. Para un mejor análisis estadístico se consideró los dos experimentos de fermentación en triplicado como 3 series de experimentos pareados (fermentación *S. cerevisiae* EC1118 silvestre / fermentación *S. cerevisiae* EC1118 modificada), lo cual valida la utilización de una prueba estadística t de student pareada (ver limitaciones de éste modelo en anexo 2).

Esta prueba estadística resuelve el problema de determinar diferencias (en el comportamiento promedio) de dos tipos de tratamientos. Entonces, el parámetro de interés es la diferencia promedio en la síntesis o consumo entre ambas fermentaciones y no la varianza intra y entre tratamiento (análisis de ANOVA típico para triplicados).

El estadístico de la prueba fue:

$$t_o = \frac{d}{Sdev/\sqrt{n}}$$

Donde  $d$  y  $Sdev$  son el promedio y desviación estándar muestrales de las diferencias entre los pares fermentación *S. cerevisiae* EC1118 silvestre / fermentación *S. cerevisiae* EC1118 modificada, respectivamente, y  $n$  los grados de libertad de las muestras.

Si se analiza la distribución de probabilidad para las diferencias entre ambas cepas se aprecia que si  $-t_{0,025,G.L} < t_0 < t_{0,025,G.L}$ , entonces con un criterio de confianza mayor a 95%, es posible afirmar que no habría motivos para rechazar la hipótesis nula ( $\mu_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$ ), es decir no existen motivos para afirmar que las diferencias entre ambas fermentaciones sean nulas; de lo contrario existirían diferencias.

### III. RESULTADOS

#### III.1. Selección y optimización de una estrategia de escisión génica

Aunque una primera aproximación experimental consistió en generar un módulo de escisión génica con regiones de homología de 120 pb y 248 pb cada una, asegurando de esa forma, la recombinación e intercambio del gen heterólogo de resistencia por el gen ADH5 nativo. El enorme tiempo debido a los pasos de clonación fue un factor limitante. Así se decidió abordar un diseño experimental que permitió con una sola reacción de PCR generar un módulo de escisión con segmentos cortos de homología de sólo 40 y 42 pb (AD-1 y AD-2 respectivamente)(Figura 1)(Baudin *y col.*, 1993; Gueldener *y col.*, 1996; Gueldener *y col.*, 2002; Reid *y col.*, 2002), además de disponer del sistema CRE/loxP para remover luego la resistencia introducida. La eficiencia de éste método no es significativamente menor a la anterior, y el tiempo ahorrado pasa a ser un factor altamente atractivo (Gueldener *y col.*, 1996)

Al principio de la investigación el desconocimiento de la forma como transformar levaduras vínicas era un hecho. La primera técnica que pareció más asequible fue la electroporación, mas en la literatura especializada existen protocolos contradictorios para llevarla a cabo (Ausubel *y col.*, 2000; Delorme, 1989; Hill, 1989; Manivasakam and Schiestl, 1993). La forma de volver competentes las células era semejante; sin embargo, los parámetros de electroporación eran muy diferentes. Así, se elaboró un diseño experimental multifactorial que varió los parámetros de voltaje, resistencia, capacitancia y uso o deficiencia de ADN de esperma de salmón, como adyuvante.

Desafortunadamente, todos los experimentos fueron negativos, evidenciado por la ausencia de colonias resistentes al fungicida Geneticina G-418. Luego, el uso de cationes divalentes como el acetato de litio y un choque térmico en presencia de esta sal, fue una forma eficaz de transformación a levaduras industriales, sin la necesidad, además, de costosos aparatos.

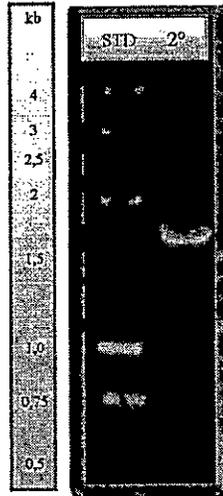
Para verificar la mutación, se utilizó PCR a partir de secuencias laterales e internas a ésta. Ésta técnica se optimizó a partir de los protocolos descritos por Xiao, (2006); debido que bajo condiciones habituales no amplifica. Se analizaron las variables de temperatura de hibridación, concentración de ADN molde, concentración de partidores, temperatura de extensión, calidad de los reactivos. Finalmente el factor limitante a la hora de amplificar ADN genómico de levaduras industriales es la concentración de magnesio ( $MgCl_2$ ) en la solución, la cual debió ser mayor a 5 mM.

### **III.2. Generación y transformación del módulo de escisión**

La amplificación del gen KanMX, presente en el plásmido pUG6 con los partidores ADH5-loxp1 y ADH5-loxp2 permitió generar el módulo de escisión AD-1-loxp-KanMX-loxp-AD-2 de 1690 pb (figura 3).

Con dos reacciones de PCR - 100  $\mu$ L cada una - se obtuvo alrededor de 1  $\mu$ g del amplicon de interés. Esta mezcla se concentró en un volumen 6 veces menor y se

transformó directamente a 50  $\mu$ L de levadura *S. cerevisiae* EC1118 (  $2 \times 10^9$  células/mL), luego se plaqueó en medio selectivo (Geneticina G418) (ver detalles en materiales y métodos) y se obtuvo una gran cantidad de colonias de pequeño tamaño y sólo algunas grandes. Éstas última se repicaron en nuevas placas con medio selectivo. Sólo las colonias que crecieron en ambas placas fueron conducentes análisis a partir de reacciones de PCR, para amplificar desde zonas flanqueantes e internas al lugar de recombinación (ver materiales y métodos). A partir de  $1 \times 10^8$  células competentes de levadura *S. cerevisiae* EC1118 se seleccionaron 7 colonias con resistencia a geneticina G418 heredable; es decir, se encontró que la eficiencia en el procedimiento global de escisión (transformación + adquisición de la resistencia) para la cepa industrial *S. cerevisiae* EC1118 era bastante bajo correspondiente a  $7 \times 10^{-6}$  %.



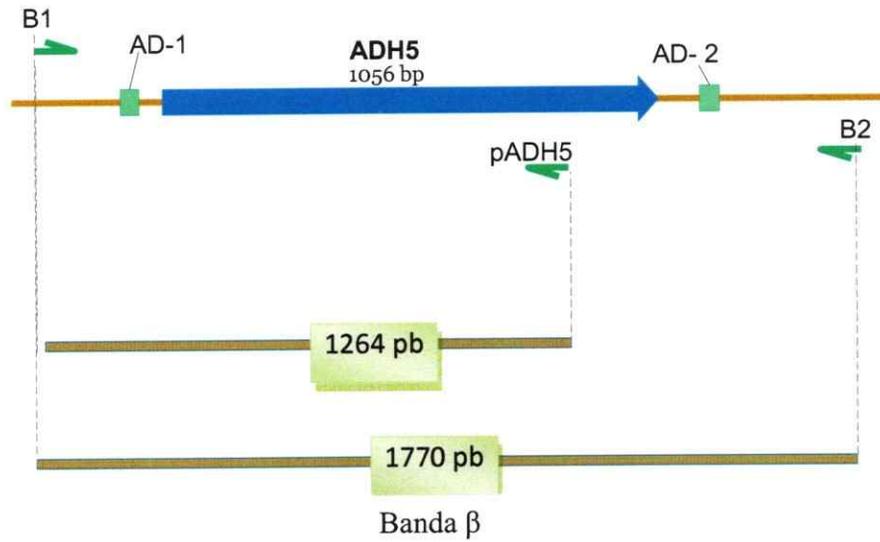
**Figura 3:** Visualización de la generación del módulo de escisión *AD1-loxp-KanMX-loxp-AD2*, a partir de la amplificación por PCR del plásmido pUG6. En el carril 1 está el marcador de peso molecular de 1 kb (Invitrogen, USA). En el segundo carril 10  $\mu$ L de la reacción de amplificación del módulo génico.

### **III.3. Verificación de transformantes**

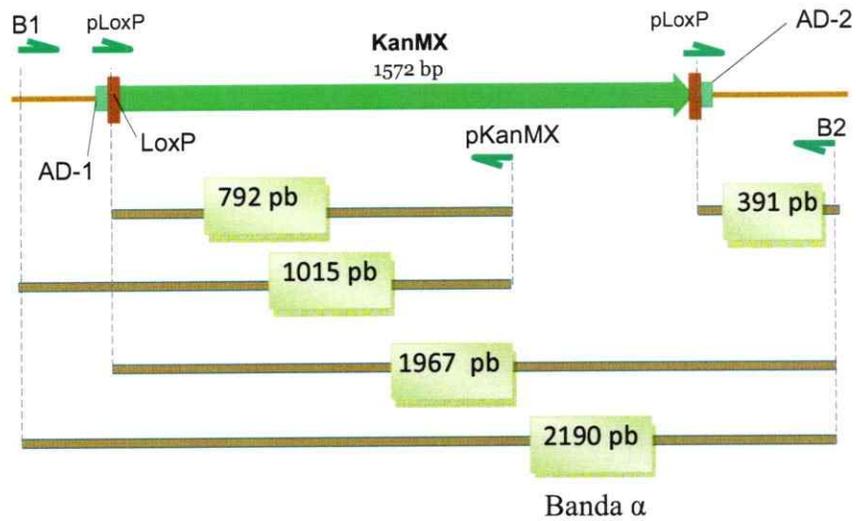
Para verificar la correcta mutación en el gen ADH5 de los clones transformantes genéticamente resistentes. Se amplificó por PCR utilizando diferentes pares de primers al ADN cromosómico obtenidos a partir de 5 mL de cultivo en medio selectivo.

Se utilizaron 5 pares de primers diferentes, generando 5 posibilidades de pares de primers utilizables. Los pares de primers B1/B2 se diseñaron para amplificar desde 181 pb río arriba hasta 314 pb río abajo de la zona de recombinación (AD-1 y AD-2), generando teóricamente un amplicado de largo 1770 pb para el caso donde no ocurría escisión y una región de 2190 pb si el gen ADH5 había recombinado. En la figura 4 se esquematiza el tamaño de los amplicones para cada uno de los 5 pares de primers (B1/B2, pLoxp/B2, B1/pKanMX, pLoxp/pKanMX, B1/pADH5) en el caso de amplificar un alelo mutado con KanMX o un alelo silvestre.

A.



B.

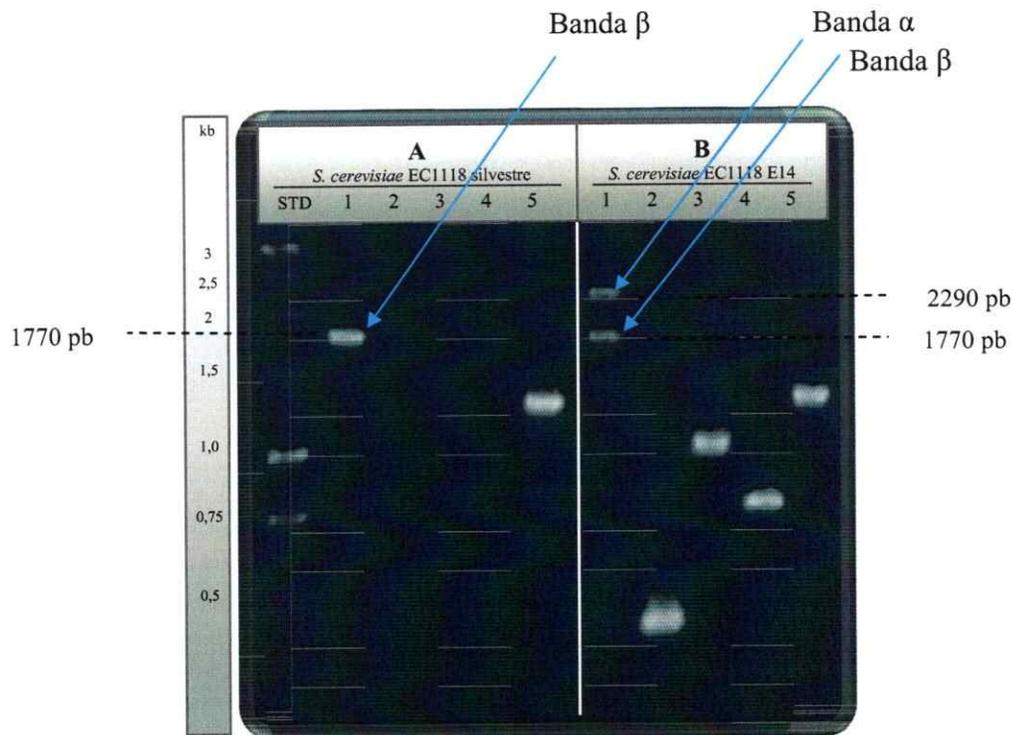


**Figura 4** Esquema ilustrativo de los amplicones generados a partir de la amplificación de la región YBR145W del cromosoma II de levadura para la condición silvestre y mutada, donde se aprecia los distintos tamaños moleculares para los amplicones utilizando los diferentes pares de partidores. En **A** se aprecia el caso del locus silvestre, mostrando las zonas de recombinación teóricas AD-1 y AD-2, además de las zonas de apareamiento con los partidores. En **B** se aprecia el caso en que el gen *ADH5* silvestre haya recombinado con el módulo *AD1-loxp-KanMX-loxp-AD2*, generando la remoción del gen silvestre. En ambos casos se ilustran los tamaños moleculares esperados para las amplificaciones por PCR usando los partidores B1/B2, pLoxp/B2, B1/pKanMX, pLoxp/pKanMX, B1/pADH5. Los amplicones obtenidos utilizando los partidores B1/B2, corresponden a las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  de la figura 5, según si es amplificación al locus mutado o silvestre, respectivamente.

De los 7 clones transformantes *S. cerevisiae* EC1118 genéticamente resistentes, sólo el clon 14 (designado E14) presentó la banda de kanMX en uno de los alelos ADH5, luego de una amplificación utilizando los partidores B1/B2. Así sólo la cepa E14 fue utilizada en los análisis posteriores.

Al amplificar el ADN cromosómico de la cepa *S. cerevisiae* E14 utilizando las combinaciones de partidores mostrados en la figura 4, se observaron tamaños coherentes a los esperados utilizando las bases de datos disponibles (figura 5). Sólo la amplificación utilizando los partidores pLoxp/B2 muestra una de las dos bandas esperadas, sólo se observa la banda de tamaño 391 pb y no de 1967 pb. Posiblemente debido a la procesividad de la taq polimerasa que posee mayor probabilidad de amplificar un tamaño pequeño que uno de gran tamaño; sumado a esto, el primer Loxp (ubicado en el lado 5') se visualiza con la amplificación utilizando los partidores Loxp/KanMX (carril N°4 de Figura 5b) que da una banda de tamaño esperado -792 pb-.

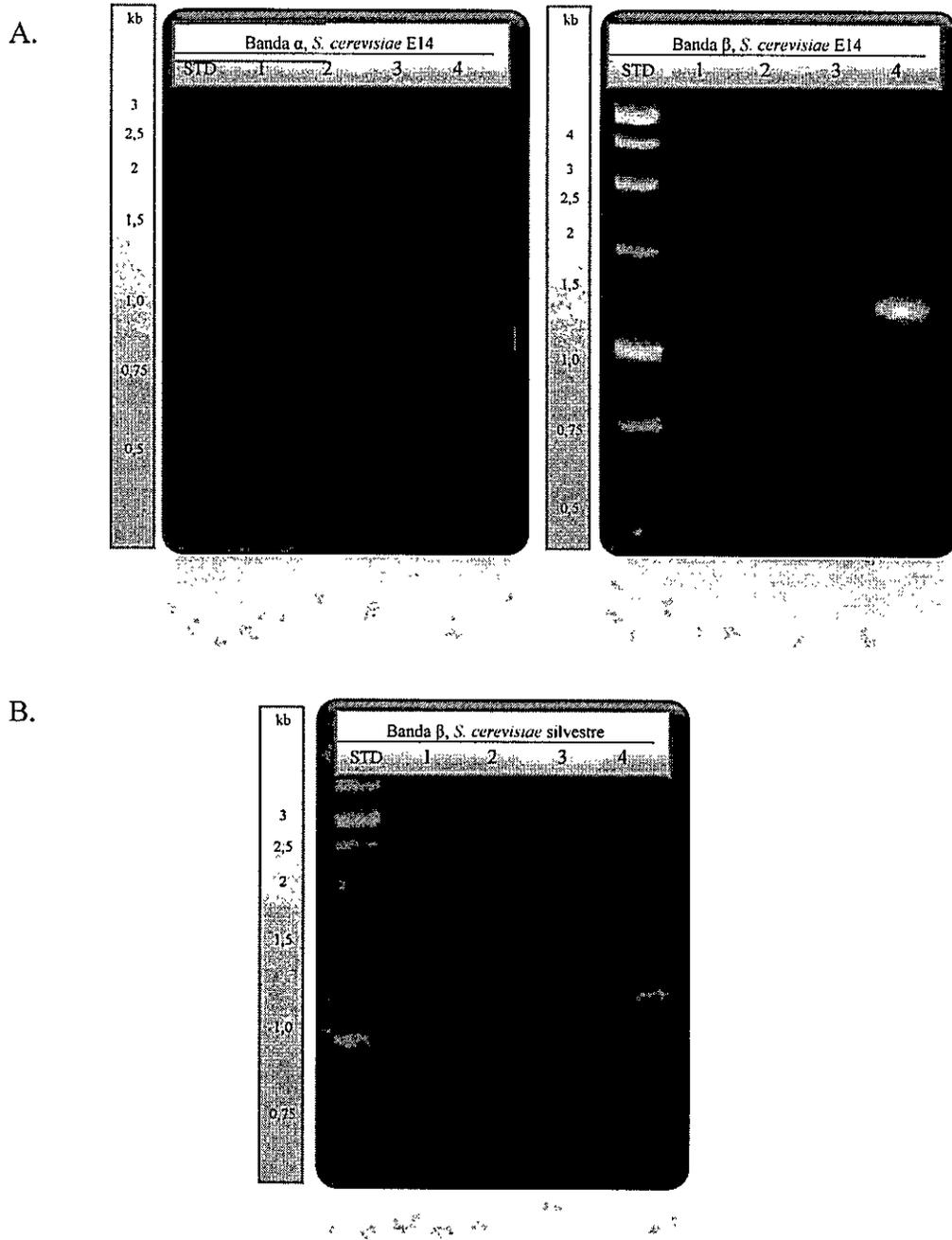
Estos resultados muestran que un alelo del gen ADH5 se encuentra cambiado por el gen KanMX flanqueado por secuencias Loxp. Para validar los tamaños moleculares encontrados para cada reacción de amplificación y poder afirmar con mayor certeza que tras amplificar desde las zonas flanqueantes a la mutación (partidores B1/B2), la banda de 2290 pb (Banda  $\alpha$ , Figura 5) corresponde a la mutación y que las bandas de 1770 pb (bandas  $\beta$ , Figura 5) corresponden al alelo silvestre, es que se purificaron éstas bandas desde geles de agarosa. A partir de éstas bandas aisladas se realizaron nuevas amplificaciones de PCR y digestiones utilizando enzimas de restricción.



**Figura 5** Amplificación del gen ADH5 desde ADN cromosómico, utilizando tanto partidores flanqueantes a la mutación como del interior de los genes de interés. **A** muestra amplificaciones desde ADN cromosómico de *S. cerevisiae* EC1118 silvestre y en **B** desde ADN cromosómico de *S. cerevisiae* EC1118 E14. El orden de corrida es para **A** y **B** de la misma forma y es: **STD** estándar de peso molecular de 1 kb: **1** partidores B1/B2, **2** partidores pLoxp/B2, **3** partidores B1/pKanMX, **4** partidores pLoxp/pKanMX y **5** partidores B1/pADH5. Con flechas se muestran las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  aisladas para su análisis posterior

Al amplificar desde las bandas purificadas (Figura 6) se obtienen amplicones con los mismos tamaños moleculares que los observados en la figura 5, pero esta vez ordenados de acuerdo al ADN molde de origen o alelo de origen. La bandas  $\beta$  presentan el mismo patrón de amplificación, sólo amplifican desde los partidores B1 y pADH5, que amplifican desde dentro del gen ADH5. La banda  $\alpha$ , amplifica utilizando partidores al interior del gen KanMX, ya sea desde el mismo gen (Banda 2, del primer gel de figura 6a) como de las secuencias Loxp (Banda 3, del primer gel de figura 6a).

De estas amplificaciones se puede observar que las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  extraídas a partir de una amplificación desde las zonas flanqueantes al lugar de mutación de la cepa *S. cerevisiae* E14 corresponden al gen KanMX flanqueado de los sitios Loxp y al alelo ADH5 silvestre, respectivamente.

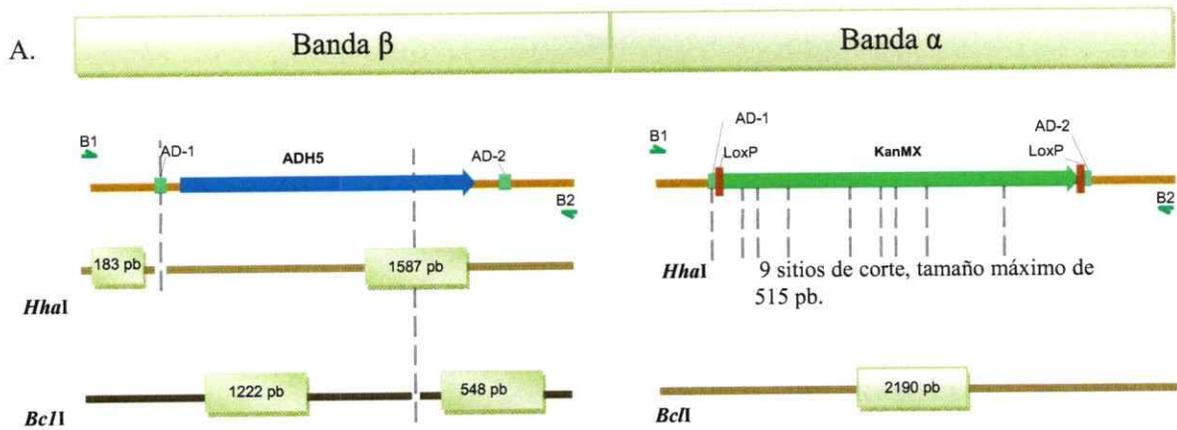


**Figura 6** Amplificación desde bandas purificadas que corresponden a las zonas flanqueantes al gen ADH5 (amplificado previamente con partidores B1/B2), utilizando tanto partidores flanqueantes a la mutación como del interior de los genes de interés. **A** gel izquierda muestra amplificaciones desde la banda 2190 pb de *S. cerevisiae* E14, gel derecha muestra amplificaciones de la banda 1770 pb de *S. cerevisiae* E14, **B** muestra amplificaciones de la banda 1770 de *S. cerevisiae* EC1118 silvestre. El orden de corrida es para **A** y **B** de la misma forma y es: STD estándar de peso molecular de 1 kb: 1 partidores pLoxp/B2, 2 partidores B1/pKanMX, 3 partidores pLoxp/pKanMX y 4 partidores B1/pADH5.

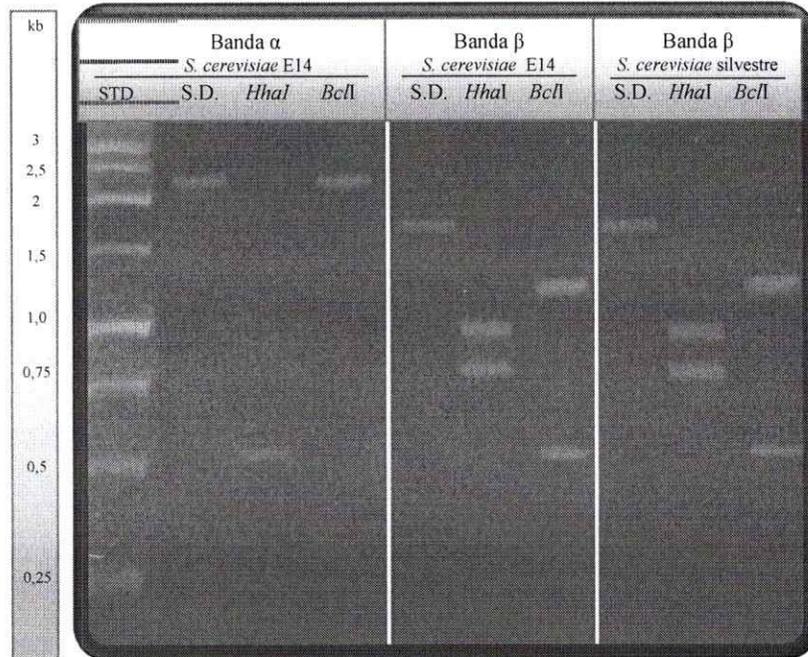
Para darle mayor validez a los resultados, se realizaron digestiones enzimáticas utilizando como molde a las bandas purificadas ( $\alpha$  y  $\beta$ ). Así, se esperaron patrones de digestión característicos al digerir los segmentos génicos con las enzimas de restricción *HhaI* y *BclI* (Figura 7a).

Las digestiones esperadas de la figura 7a se basan en la secuencia anotada de *S. cerevisiae* S288c (Goffeau y col., 1996), es de esperar que una cepa industrial posea polimorfismos con respecto a esta secuencia. El gen ADH5 de *S. cerevisiae* EC1118 no fue la excepción, tras digerir la banda  $\beta$  que corresponde a la amplificación desde zonas flanqueantes al gen ADH5 silvestre con la enzima *HhaI* se esperó dos bandas una de 1587 bp y otra de 183 pb, pero se obtuvo dos bandas de ~940 y ~810 pb (Figura 7b). Este hecho señala que existe una mutación ~230 pb río arriba al ATG del gen, que evita el corte con la enzima y por lo tanto también existe otra mutación ~670 o ~520 pb río abajo del ATG que genera un nuevo blanco para la enzima de restricción. Este polimorfismo también se encuentra en la banda  $\beta$  de la cepa E14, lo que afirma nuevamente que esta banda corresponde al alelo silvestre (Figura 7b).

La banda  $\alpha$  que contiene el gen KanMX mostró los patrones esperados para dicha condición. La enzima *HhaI* posee teóricamente 9 sitios de corte en la banda  $\alpha$  (Figura 7a), generando fragmentos muy pequeños, el más grande de 535 pb, sólo éste último se observa en el gel (Figura 7b). Este segmento génico no posee cortes con *BclI*, lo cual también se aprecia en los resultados.



B.



**Figura 7** Análisis de digestión de los amplicones purificados desde las zonas contiguas al gen ADH5 para las cepas silvestre y mutada (bandas  $\alpha$  y  $\beta$ ). **A** tamaños teóricos para la digestión de las bandas  $\alpha$  y  $\beta$ . **B** digestión por enzimas de restricción a las bandas  $\alpha$  y  $\beta$  respectivamente. En el primer carril se encuentra el marcador de tamaño molecular de 1 kb. *BclI*: amplicon digerido con la enzima de restricción *BclI*; *HhaI*: amplicon digerido con la enzima de restricción *HhaI*; S.D.: amplicon sin digerir.

#### **III.4. Remoción del módulo *loxp-KanMX-loxp* insertado en el ADN cromosómico**

Con el fin de escindir el fragmento *loxp-KanMX-loxp* del ADN genómico, se transformó con el plásmido pSH65 que contiene la recombinasa CRE inducible por galactosa. Se obtuvieron 19 clones transformantes fleomicina resistentes, pero al someterlos a un cambio de la fuente de carbono para inducir la recombinasa, éstos no perdieron la resistencia fenotípica a geneticina ni el gen KanMX. En este punto la escisión de fragmentos Loxp ha sido reportada como exitosa en un alto rendimiento (80%-90% de los casos) para cepas de laboratorio *S. cerevisiae* (Guldener y col., 1996; Xiao, 2006).

Luego, estos 19 clones se repicaron sucesivamente durante 5 días en placas galactosa en ausencia del fungicida, en cada día se picaron las colonias en duplicado en placas YPD en presencia y ausencia de geneticina; sin embargo no hubo pérdida de la resistencia a geneticina ni del gen KanMX. Esto revela que en una levadura industrial no se dan las condiciones óptimas para que la recombinasa CRE se exprese. Es necesario un estudio más profundo sobre las óptimas condiciones en que la recombinasa CRE es inducible en una cepa industrial.

En resumen, se logró mutar un alelo del gen ADH5 de una levadura industrial a partir de la recombinación homóloga con el gen KanMX. Sin embargo no fue posible remover el gen KanMX del genoma, a partir de la expresión de la recombinasa CRE. Un alelo mutado de la cepa industrial es probablemente insuficiente para observar un fenotipo en la cantidad de alcohol que la levadura produce. La obtención de una levadura

homocigota a la mutación,  $\Delta adh5$ , es importante para un completo estudio funcional, y corresponde al siguiente paso de experimentación; sin embargo su obtención se encuentra fuera del marco de esta memoria. Ahora bien, es posible realizar algunas especulaciones, se podría pensar que la dosis génica es un actor importante en este gen y como los factores de transcripción y su abundancia no se han descrito en condiciones vínicas, entonces no es obvio asumir que un alelo mutado pueda o no tener relevancia en la gran cantidad de etanol que produce la levadura. En este sentido se realizaron microfermentaciones vínicas para corroborar estas hipótesis.

### **III.5. Microfermentaciones**

Los experimentos de fermentación en mosto sintético MS300 tuvieron la finalidad de comparar y evaluar las diferencias entre las cinéticas de consumo de nutrientes y síntesis de metabolitos al utilizar la cepa *S. cerevisiae* EC1118 E14 ADH5/*adh5* y la cepa *S. cerevisiae* EC1118 silvestre ADH5/ADH5.

Se realizaron 6 fermentaciones en paralelo, 3 fermentaciones para cada cepa de *S. cerevisiae* (silvestre y mutada). En la Figura 8 se muestran las cinéticas para los sustratos y productos como promedios de cada triplicado en cada punto de muestreo. Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto sintético MS300 sin agitación permanente,

para promover la anaerobiosis. Tras 10 días de cultivo las fermentaciones se finalizaron con una sequedad de  $11.7 \pm 5.8$  g/L de azúcar total (glucosa + fructosa) para la cepa *S. cerevisiae* EC1118 sin modificar y de  $15.3 \pm 8.3$  g/L de azúcar total para la cepa *S. cerevisiae* EC1118 modificada genéticamente (Figura 10a, c).

A pesar de no haber alcanzado una sequedad menor a 5 g/L (rango utilizado en la industria) es posible apreciar en la cinética de consumo de azúcares que la levadura tiene preferencia en el consumo de glucosa más que la fructosa, esto porque si bien los transportadores de fructosa son los mismos que de glucosa (HXT), tienen mayor afinidad por esta última (Diderich y *col.*, 1999; Raamsdonk y *col.*, 2001). Así, la glucosa es consumida antes que la fructosa de manera no excluyente como fuera en un caso de crecimiento diauxico.

La biomasa muestra una cinética de síntesis poco ilustrativa (Figura 8f), debido al bajo número de muestras y el gran error que poseen. No es posible caracterizar la tasa de fermentación y calcular con ello parámetros cinéticos como  $K_m$  y  $\mu_{max}$  para cada levadura. Sólo es posible estimar (por simple apreciación gráfica) que alrededor de las 50 horas de fermentación comienza el estado estacionario para ambas levaduras.

Las cinéticas de síntesis de etanol, glicerol y ácido acético (Figura 8b,d y e, respectivamente) revelan que los productos metabólicos son sintetizados de manera independiente del crecimiento microbiano (biomasa), éstos continúan sintetizándose aún

cuando la célula entró a estado estacionario y su tasa de crecimiento disminuye a cero ( $\mu = 0 \text{ h}^{-1}$ ).

El etanol producido - metabolito de gran interés para esta memoria - se sintetizó siguiendo un comportamiento o una cinética de síntesis bastante semejante para ambas cepas (Figura 8b), sólo en la última etapa de la fermentación (final del estado estacionario) se pronuncia una posible divergencia en el etanol sintetizado,  $73.4 \pm 3 \text{ g/L}$  de etanol para las fermentaciones con *S. cerevisiae* EC1118 silvestre y  $68,8 \pm 3,1 \text{ g/L}$  de etanol para *S. cerevisiae* EC1118 E14, mas esta diferencia no es estadísticamente significativa (explicado en la siguiente sección). Es importante mencionar que es en estado estacionario donde se producen 2/3 partes del alcohol total de una fermentación (Salmon and Barre, 1998). De ese modo, diferencias fisiológicas en este período pueden significar cambios en el rendimiento de etanol para una levadura.

La biomasa sintetizada presenta diferencias según la cepa, la fermentación acaba con  $1.73 \pm 0.12 \text{ g/L}$  de biomasa para la fermentación con *S. cerevisiae* EC1118 silvestre y con  $2,13 \pm 0,12 \text{ g/L}$  de biomasa para *S. cerevisiae* EC1118 E14 (Figura 8f). La síntesis de glicerol no presentó diferencias para ambas cepas, alcanzó  $8,1 \pm 0,3 \text{ g/L}$  para la fermentación con *S. cerevisiae* EC1118 silvestre y  $7,9 \pm 0,3 \text{ g/L}$  para *S. cerevisiae* EC1118 E14 (Figura 8d).

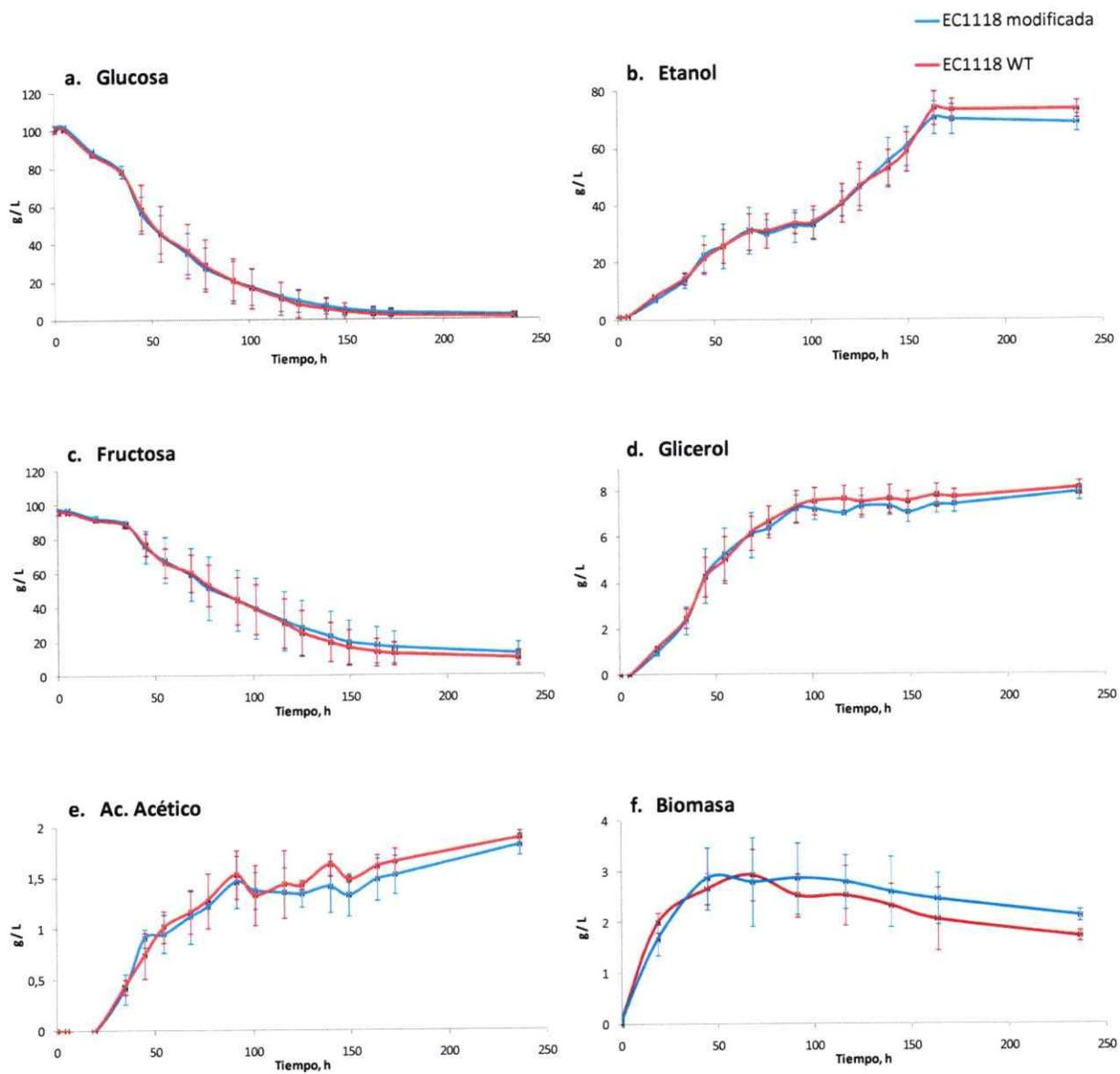


Figura 8 Cinéticas de consumo de glucosa (a) y fructosa (c) junto a la síntesis de etanol (b), glicerol (d), ácido acético (e) y biomasa (f) para fermentaciones en triplicado con *S. cerevisiae* EC1118 silvestre (ADH5/ADH5) y *S. cerevisiae* EC1118 E14 (ADH5/adh5). En azul se muestran las gráficas de la cepa *S. cerevisiae* E14 como promedio de 3 fermentaciones. En rojo se muestran las gráficas de la cepa *S. cerevisiae* EC1118 silvestre como promedio de 3 fermentaciones.

Las cinéticas de síntesis de ácido acético, aparentemente, no presentan diferencias para las fermentaciones llevadas a cabo por las levaduras *S. cerevisiae* EC1118 silvestre y *S. cerevisiae* EC1118 E14 (Figura 8e), alcanzando una concentración final de  $1,9 \pm 0,07$  g/L para la fermentación con *S. cerevisiae* EC1118 silvestre y  $1,8 \pm 0,1$  g/L para *S. cerevisiae* EC1118 E14. Las cinéticas de síntesis son semejantes a las descritas en literatura; es decir, en el período exponencial se produce la mayor parte del glicerol y ácido acético presente en el vino (Salmon and Barre, 1998).

Las curvas del ácido málico y ácido cítrico no fueron mostradas, ya que las concentraciones de éstos compuestos para ambas cepas no variaron a lo largo de las fermentaciones 6,8 g/L y 6,2 g/L, respectivamente. Por lo tanto ácido cítrico y ácido málico son metabolitos que no son sintetizados ni metabolizados por la levadura bajo las condiciones estudiadas.

### **III.6. Análisis de los datos**

A partir de los datos obtenidos se determinó si existió una diferencia (en promedio) significativa entre las cinéticas de fermentación de ambas levaduras. Para ello se utilizó una prueba t de Student pareada, asumiendo que ambas fermentaciones realizadas en triplicado corresponden a un diseño experimental de tres experimentos simultáneos entre

pares *S. cerevisiae* EC1118 silvestre / EC118 mutada (ver detalle en materiales y métodos).

De esa forma la estadística de la muestra es el promedio y desviación estándar de la diferencia de los pares y no el promedio y desviación estándar de cada triplicado. Esto permite independizar los datos de la variable tiempo (serie temporal), lo cual ayuda de sobremanera en el análisis de los datos.

El parámetro de interés es la diferencia en el comportamiento (cinética, síntesis de metabolitos, biomasa, etc) promedio entre ambas levaduras *S. cerevisiae* EC1118 modificada y silvestre. Por lo tanto el objeto del test fue verificar si es razonable admitir que las cinéticas de ambas levaduras eran iguales  $\mu_0 = \mu_1 - \mu_2 = 0$  a la luz de los datos obtenidos en el experimento (Box y col., 1989; Montgomery y col., 2004). Los restos de los pares entre la cepa mutada menos la silvestre no se muestran, pero para todas las cinéticas los comportamientos promedio de los restos están en torno del cero, y su distribuciones son normales, lo que valida y respalda el muestreo y la toma de datos.

A partir del análisis generado fue posible construir la Tabla 3, donde se resume el desarrollo conceptual y la conclusión para cada uno de los compuestos analizados.

Desafortunadamente bajo un 95% de confianza todos los compuestos analizados, incluida la biomasa, arrojaron ser igualmente consumidos o sintetizados (etanol) por la

cepa industrial *S. cerevisiae* EC1118 silvestre y la cepa *S. cerevisiae* EC1118 modificada genéticamente (ADH5/ADH5 y ADH5/adh5, respectivamente).

Además, al realizar un balance de etanol global (sólo considerando la concentraciones finales e iniciales) y calcular los rendimientos de producción de etanol sobre glucosa consumida en Cmoles de etanol / Cmol de glucosa, arrojaron los siguientes resultados resumidos en la Tabla 4.

Al realizar un test de student normal a estos datos no aprueba la hipótesis y arroja que con un 95% de confianza los valores de  $Y_{SE}$  son iguales para ambas cepas. De esa forma un análisis de rendimiento global concuerda con el análisis de muestras pareadas de la Tabla 3.

Tabla 3 Resumen estadístico de la pruebas de t de student pareadas, que se realizaron para comparar la cinética de crecimiento (biomasa), consumo de nutrientes (glucosa, fructosa, ácido cítrico y málico) y producción de metabolitos (ácido acético, glicerol y etanol) de dos cepas, *S. cerevisiae* EC1118 nativa y *S. cerevisiae* EC1118 modificada genéticamente. Como  $-t_{\alpha=0,025} < t_0 < t_{\alpha=0,025}$ , entonces las cepas son C.E.I (cepas estadísticamente iguales) con un 95% de certeza.

	Glucosa	Fructosa	Glicerol	Etanol	Ac. Acético	Ac. Cítrico	Ac. Málico	Biomasa
Promedio de las diferencias $\mu_1 - \mu_2$	0,0756	0,2111	-0,0322	-0,2598	-0,0122	0,0058	0,0032	-0,8750
Desv. Std. de las diferencias $\mu_1 - \mu_2$	1,9698	5,3710	0,2632	3,5115	0,0517	0,0348	0,1085	3,7800
Grados de libertad	56	56	50	56	47	56	56	23
Distribución T inversa para $\alpha = 0,025$	2,0032	2,0032	2,0086	2,0032	2,0117	2,0032	2,0032	2,0687
Distribución $T_0$	0,2871	0,2941	-0,8644	-0,5537	-1,6241	1,2547	0,2175	-1,1102
Resultado de la prueba	C.E.I	C.E.I	C.E.I	C.E.I	C.E.I	C.E.I	C.E.I	C.E.I

Tabla 4 Tabla resumen de los rendimientos promedio  $Y_{SE}$  (Cmol de etanol producidos por Cmol de glucosa consumida) obtenidos para las dos cepas *S. cerevisiae* EC1118 estudiadas (silvestre y mutada). Se resumen los valores para los rendimientos respectivos, junto a la desviación estándar (STD) asociada a cada uno de los valores.

	Cepa EC1118 ADH5/ADH5		Cepa EC1118 ADH5/adh5	
	Promedio	STD	Promedio	STD
$Y_{SE}$	0.569	0.015	0.552	0.003

#### IV. DISCUSIÓN

La mutación de un alelo del gen ADH5 se utilizó como una prueba de conceptos a la hora de conseguir los objetivos planteados en esta memoria de título, primero implementar y probar técnicas de biología molecular que cimienten las bases para desarrollar ingeniería metabólica en levaduras; y segundo, evaluar la importancia que tiene este gen (o un alelo de este gen) en condiciones vínicas en la reducción de alcohol.

En una primera instancia se trabajó en la construcción de un módulo de escisión génica con grandes regiones de homología con el locus silvestre, método que ha sido reportado ser al menos 30 veces más eficiente que construir fragmentos cortos de homología (Wach *y col.*, 1994). Sin embargo, la búsqueda por optimizar las metodologías llevó a reducir las zonas de homología hasta 40 pb, lo cual fue posible realizar con una sola reacción de PCR; no obstante secuencias de homología aún más cortas como 30 pb todavía son efectivas y no afectan de sobremanera la recombinación (Langle-Rouault and Jacobs, 1995). Esta metodología evitó una excesiva manipulación del ADN y eventos reiterados de clonación en bacterias. De esa forma, además de reducir el tiempo necesario para obtener una mutación, disminuye la “contaminación” del cromosoma de *S. cerevisiae* con ADN exógeno. Además luego de recombinado el fragmento de interés teóricamente es posible escindirlo del cromosoma por la inducción de la recombinación de los repetidos directos loxp, quedando teóricamente sólo un repetido loxp de 32 pb en el locus génico (ver Anexo 1).

Los resultados muestran que el módulo de escisión generado por PCR transforma levaduras industriales vínicas con relativa facilidad por el método de acetato de litio y de ninguna forma por electroporación; sin embargo se encontró que éste se integra con una baja frecuencia al genoma de la célula ( $10^{-5}$  -  $10^{-6}$  %); dentro del cual un 84% de las cepas G418 resistentes son debido a integraciones por recombinación homóloga no específicas en el ADN (usualmente denominadas como integraciones al azar) o por resistencia adquirida espontánea; mientras que, para cepas de laboratorio se ha reportado que sólo un 2% (Wach y col., 1994) hasta un 30% (Gueldener y col., 1996) de las cepas G418 resistentes son falsas positivas.

El módulo de escisión *loxp-KanMX-loxp* no se escinde con facilidad del locus genómico incluso en presencia de la recombinasa CRE. Cultivos seriados hasta por cinco días en ausencia de presión selectiva exhibieron el alelo mutado y con ello la resistencia a geneticina. Aunque en cepas de laboratorio la frecuencia de escisión es de  $10^{-3}$  -  $10^{-4}$  usando repetidos directos de 470 pb (Wach y col., 1994), pareciera que para cepas industriales hay más factores que inciden en este mecanismo.

Sin embargo, se ha visto que debido al polimorfismo genético que presentan las levaduras industriales, principalmente diploides, aneuploides o poliploides (Pretorius, 2000; Rachidi y col., 1999), poseen la capacidad de adaptarse con facilidad a condiciones extremas de fermentación (Ferea y col., 1999), lo que se ha visto es gestado por una gran variedad de re arreglos genómicos que van desde nucleótidos, genes o incluso cromosomas enteros, resultando en una forma de incrementar el número de

genes de importancia para fermentar (Dunn *y col.*, 2005; Rossignol *y col.*, 2003) o el desarrollo de regulaciones específicas que cambian la expresión génica (Rachidi *y col.*, 1999; Rachidi *y col.*, 2000; Rossignol *y col.*, 2003). Estos reacomodos y recombinaciones ocurren principalmente durante el crecimiento vegetativo (fermentación) (Bisson, 2004; Longo and Vezinhet, 1993) y no por meiosis (Puig *y col.*, 2000).

Además, estudios con cepas industriales de levadura en fermentaciones vínicas, mostraron que la frecuencia de recombinación mitótica o conversión génica mitótica es de  $1 \times 10^{-5}$  a  $3 \times 10^{-5}$  por generación y se confirma la ausencia de esporulación o meiosis en este tipo de cultivos (Puig *y col.*, 2000). Mientras que para cepas de laboratorio la frecuencia de conversión meiótica es aproximadamente un 2% y la conversión mitótica entre 3 y 4 órdenes de magnitud inferior (Perez-Ortín *y col.*, 2002; Puig *y col.*, 2000; Symington and Petes, 1988).

En este trabajo experimental se utilizaron cepas industriales pero toda su manipulación se realizó en cultivos estándares como el YPD. Esto puede haber incidido en la obtención de tasas de conversión génica mitótica muy bajas, revelado por las bajas frecuencias de recombinación con el fragmento *AD1-loxp-KanMX-loxp-AD2* con el gen *ADH5* y la nula escisión del segmento *loxp-KanMX-loxp*.

La levadura industrial utilizada en estos experimentos (*S. cerevisiae* EC1118) posee al igual que todas las cepas industriales polimorfismos, en este caso su secuencia con

respecto a la secuencia anotada de *S. cerevisiae* S288c presenta diferencias que fueron apreciables al utilizar a la enzima *HhaI*, revelando una mutación ~230 pb río arriba al ATG del gen, que evita el corte con la enzima y otra mutación ~670 o ~520 pb río abajo del ATG que genera un nuevo blanco para la enzima de restricción. Esto sólo vislumbra una pequeña parte de los innumerables cambios que pudiera tener la secuencia de una levadura industrial con respecto a una levadura de laboratorio.

Para esta memoria se utilizó una prueba estadística que permitió concluir de manera fehaciente y confiable a partir del análisis de todos los datos. Se utilizó la prueba t de student pareada, analizando las diferencias de las fermentaciones de cada par *S. cerevisiae* EC1118 silvestre / EC1118 mutada, de ese modo se utilizó el comportamiento normal de los datos para asociarlos a un modelo matemático (estadístico), en este caso la distribución t de student. La utilización de los residuos o restos para el análisis permitió independizarse de la variable tiempo, la cual invalidaba un análisis de ANOVA corriente.

Desafortunadamente la prueba estadística arrojó, con una confianza mayor al 95% que no hay motivos para afirmar que las cepas *S. cerevisiae* EC1118 ADH5/ADH5 y *S. cerevisiae* EC1118 ADH5/adh5 sean diferentes, en relación a su cinética de crecimiento, producción de ácido acético, glicerol, ácido málico, etanol, ácido cítrico y su consumo azúcares. Por lo tanto, con la mutación de un alelo del gen ADH5 se logró el objetivo de generar una cepa modificada genéticamente, sin embargo esta cepa no es todavía

ineficiente en la producción de etanol. Resultados que concuerdan con la prueba t de student simple realizada sólo a los rendimientos globales de etanol sobre glucosa  $Y_{SE}$ .

El uso de microfermentadores de 500 mL sin agitación y en un estado pseudo anaerobio añade grados de libertad extra al sistema, traducidos por ejemplo en los bajos rendimientos de biomasa, sólo se sintetizaron alrededor de 3 g/L de biomasa, y rendimientos  $Y_{SE}$  que fluctúan los 0.55 Cmol/Cmol siendo que en una fermentación batch en cubas industriales el  $Y_{SE}$  llega a 0.61 Cmol/Cmol. No obstante, los resultados obtenidos son analizados desde un punto de vista relativo y no absoluto (prueba t student pareada) es necesario futuros estudios en bioreactores controlados y/o estudios en plantas piloto para un mejor acercamiento a la realidad.

#### **IV. CONCLUSIONES**

La metodología implementada con el fin de lograr una mutación específica a un gen de interés en una levadura industrial es eficaz, y cumple plenamente los objetivos planteados.

La mutación de un alelo del gen ADH5 es aún escaso para observar un cambio en la cantidad de etanol producido. La concentración de factores de transcripción no es un factor limitante a la hora de producir grandes cantidades de etanol. Puede que este gen no tenga una trascendencia en las condiciones estudiadas o bien sea necesario remover los dos alelos para observarla.

## V. PERSPECTIVAS Y TRABAJOS FUTUROS

El próximo paso será la generación de la cepa mutante para los dos alelos del gen *ADH5*, lo cual se realizará encontrando los parámetros óptimos de expresión y actividad de la recombinasa *CRE*, o bien por la generación de algún diseño experimental que permita una mejor selección de cepas que hayan escindido el fragmento. Así se dará paso a la transformación de la cepa, nuevamente con el módulo *AD1-loxp-KanMX-loxp-AD2* y luego la selección y verificación de la doble mutante. Esto también podría ser obtenido por la generación de un módulo de escisión con un nuevo gen heterólogo de resistencia, por ejemplo fleomicina o higromicina (Güldener y col., 2002).

Con las fermentaciones de las nuevas mutantes homocigotas para la mutación se dará término a este capítulo para dar paso a una mirada más holística del problema de la generación de cepas hipoproductoras de etanol. Estas pueden abordar tanto el uso de modelos metabólicos, en especial modelos a escala genómica (Forster y col., 2003), como metodologías de *self-cloning* (Husnik y col., 2006), que pudieran resultar en una cepa comercial reconocida como segura (GRAS).

## V. BIBLIOGRAFÍA

- Alexandre, H. and Charpentier, C. 1998. Biochemical aspects of stuck and sluggish fermentation in grape must. *J Ind Microbiol Biotechnol* **20**, 20-27.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J. G., Smith, J. S. and Struhl, K. (2000). *Current Protocols in Molecular Biology* John Wiley & Sons, Inc., New York.
- Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F. and Cullin, C. 1993. A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**, 3329-3330.
- Beltran, G., Torija, M. J., Novo, M., Ferrer, N., Poblet, M., Guillamon, J. M., Rozes, N. and Mas, A. 2002. Analysis of yeast populations during alcoholic fermentation: a six year follow-up study. *Syst Appl Microbiol* **25**, 287-93.
- Bely, M., Sablayrolles, J. M. and Barre, P. 1990. Description of Alcoholic Fermentation Kinetics: Its Variability and Significance. *American Journal of Enology and Viticulture* **41**, 319-324.
- Bikandi, J., San Millán, R., Rementeria, A. and Garaizar, J. In silico analysis of complete bacterial genomes: PCR, AFLP-PCR and endonuclease restriction. *Bioinformatics* **20**, 5.
- Bisson, L. F. 1999. Stuck and Sluggish Fermentations. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**, 107-119.
- Bisson, L. F. 2004. Biotechnology of wine yeast. *Food Biotechnol* **18**, 63-96.
- Box, G. E. P., Hunter, W. G. and Hunter, J. S. 1989. *Estadística para investigadores: Introducción al diseño de experimentos, análisis de datos y construcción de modelos*. Reverté.
- Bradbury, J. E., Richards, K. D., Niederer, H. A., Lee, S. A., Rod Dunbar, P. and Gardner, R. C. 2006. A homozygous diploid subset of commercial wine yeast strains. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**, 27-37.
- Delorme, E. 1989. Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 2242-2246.
- Dequin, S. 2001. The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**, 577-88.
- Diderich, J., Schepper, M., van Hoek, P., Luttk, M., van Dijken, J., Pronk, J., Klaassen, P., Boelens, H., de Mattos, M., van Dam, K. and Kruckeberg, A. 1999. Glucose uptake kinetics and transcription of HXT genes in chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **274**, 15350-9.

- Drewke, C., Thielen, J. and Ciriacy, M. 1990. Ethanol formation in adh0 mutants reveals the existence of a novel acetaldehyde-reducing activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **172**, 3909-3917.
- Dunn, B., Levine, R. P. and Sherlock, G. 2005. Microarray karyotyping of commercial wine yeast strains reveals shared, as well as unique, genomic signatures. *BMC Genomics* **6**, 53.
- Eglinton, J. M., Heinrich, A. J., Pollnitz, A. P., Langridge, P., Henschke, P. A. and de Barros Lopes, M. 2002. Decreasing acetic acid accumulation by a glycerol overproducing strain of *Saccharomyces cerevisiae* by deleting the ALD 6 aldehyde dehydrogenase gene. *Yeast* **19**, 295.
- Ferea, T. L., Botstein, D., Brown, P. O. and Rosenzweig, R. F. 1999. Systematic changes in gene expression patterns following adaptive evolution in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9721-6.
- Fleet, G. H. 2003. Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* **86**, 11-22.
- Fornairon-Bonnefond, C., Demaretz, V., Rosenfeld, E. and Salmon, J. M. 2002. Oxygen Addition and Sterol Synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* during Enological Fermentation. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **93**, 176-182.
- Forster, J., Famili, I., Fu, P., Palsson, B. O. and Nielsen, J. 2003. Genome-scale reconstruction of the *Saccharomyces cerevisiae* metabolic network. *Genome Res* **13**, 244-53.
- Giudici, P. and Kunkee, R. E. (1994). The Effect of Nitrogen Deficiency and Sulfur-Containing Amino Acids on the Reduction of Sulfate to Hydrogen Sulfide by Wine Yeasts, *Am Soc Enol Viticulture*.
- 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. 1996. Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546-&.
- Gueldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J. H. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 2519-24.
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D. and Hegemann, J. H. 2002. A second set of loxP marker cassettes for Cre-mediated multiple gene knockouts in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **30**, e23.
- Guldener, U., Heck, S., Fielder, T., Beinhauer, J. and Hegemann, J. H. 1996. A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**, 2519-24.
- Guth, H. and Sies, A. 2002. Flavour of wines: towards an understanding by reconstruction experiments and an analysis of ethanol's effect on odour activity of key compounds. *Proceedings of the 11th Australian Wine Industry Technical Conference*, 128-139.

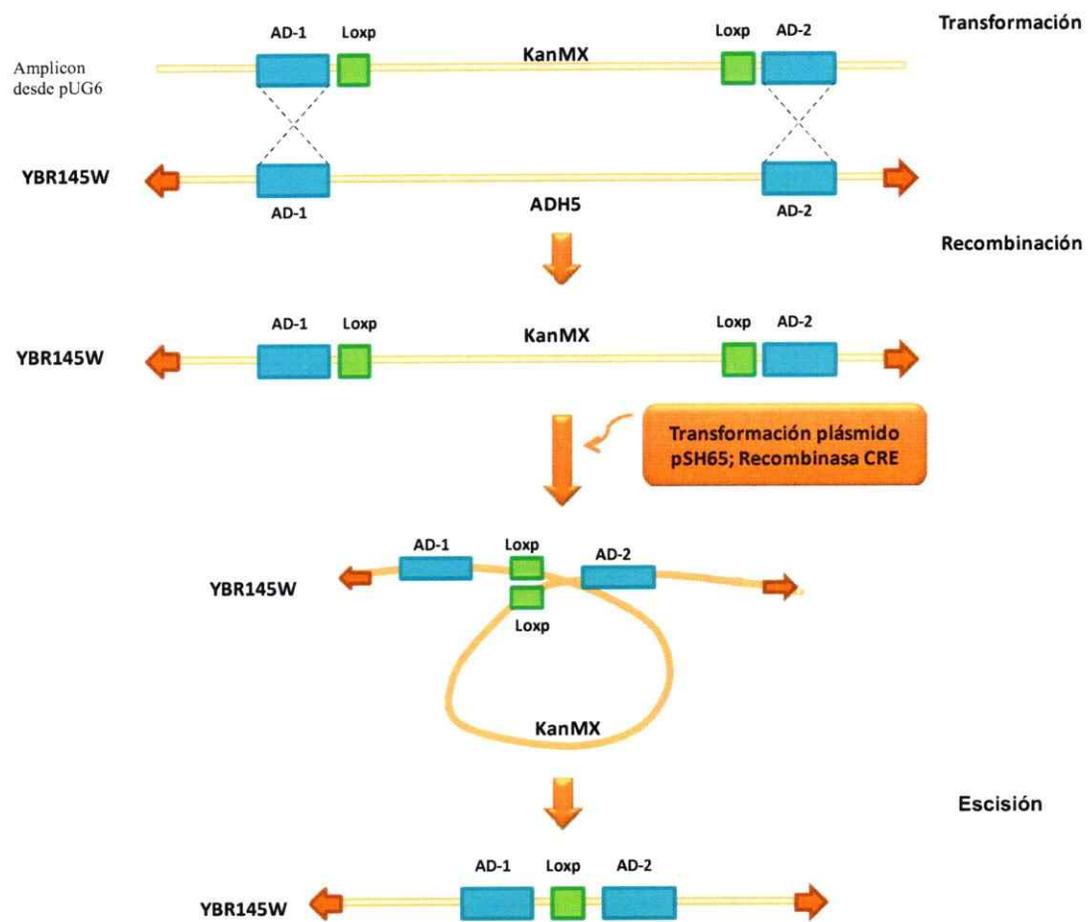
- Heux, S., Sablayrolles, J. M., Cachon, R. and Dequin, S. 2006. Engineering a *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast that exhibits reduced ethanol production during fermentation under controlled microoxygenation conditions. *Appl Environ Microbiol* **72**, 5822-8.
- Hill, D. E. 1989. Integrative transformation of yeast using electroporation. *Nucleic Acids Res* **17**, 8011.
- Hoffman, C. S. and Winston, F. 1987. Rapid DNA extraction procedure. *Gene* **57**, 267-272.
- Husnik, J. I., Volschenk, H., Bauer, J., Colavizza, D., Luo, Z. and van Vuuren, H. J. 2006. Metabolic engineering of malolactic wine yeast. *Metab Eng.*
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. and Kimura, A. 1983. Transformation of intact yeast cells treated with alkali cations. *Journal of Bacteriology* **153**, 163-168.
- Langle-Rouault, F. and Jacobs, E. 1995. A method for performing precise alterations in the yeast genome using a recyclable selectable marker. *Nucleic Acids Res* **23**, 3079-81.
- Larroy, C., Fernandez, M. R., Gonzalez, E., Pares, X. and Biosca, J. A. 2002. Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* YMR318C (ADH6) gene product as a broad specificity NADPH-dependent alcohol dehydrogenase: relevance in aldehyde reduction. *Biochem. J* **361**, 163-172.
- Lilly, M., Lambrechts, M. G. and Pretorius, I. S. 2000. Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol* **66**, 744-53.
- Longo, E. and Veziñhet, F. 1993. Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied and Environmental Microbiology* **59**, 322-326.
- Malherbe, D. F., du Toit, M., Cordero Otero, R. R., van Rensburg, P. and Pretorius, I. S. 2003. Expression of the *Aspergillus niger* glucose oxidase gene in *Saccharomyces cerevisiae* and its potential applications in wine production. *Appl Microbiol Biotechnol* **61**, 502-511.
- Manivasakam, P. and Schiestl, R. H. 1993. High efficiency transformation of *Saccharomyces cerevisiae* by electroporation. *Nucleic Acids Res* **21**, 4414-4415.
- Michnick, S., Roustan, J., Remize, F., Barre, P. and Dequin, S. 1997. 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**, 783-93.
- Montgomery, D. C., Runger, G. C. and Medal, E. G. U. 2004. *Probabilidad y estadística aplicadas a la ingeniería*. McGraw-Hill.
- Nevoigt, E. and Stahl, U. 1996. Reduced pyruvate decarboxylase and increased glycerol-3-phosphate dehydrogenase [NAD<sup>+</sup>] levels enhance glycerol production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**, 1331-7.

- Perez-Gonzalez, J., Gonzalez, R., Querol, A., Sendra, J. and Ramon, D. 1993. Construction of a recombinant wine yeast strain expressing beta-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl Environ Microbiol* **59**, 2801-6.
- Perez-Ortin, J., Garcia-Martinez, J. and Alberola, T. 2002. DNA chips for yeast biotechnology. The case of wine yeasts. *J Biotechnol* **98**, 227-241.
- Pickering, G. J., Heatherbell, D. A. and Barnes, M. F. 1999. The Production of Reduced-Alcohol Wine Using Glucose Oxidase Treated Juice. Part I. Composition. *American Journal of Enology and Viticulture* **50**, 291-298.
- Pretorius, I. S. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729.
- Pretorius, I. S. and Bauer, F. F. 2002. Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol* **20**, 426-32.
- Prior, B. A., Baccari, C. and Mortimer, R. K. 1999. Selective breeding of *Saccharomyces cerevisiae* to increase glycerol levels in wine. *J. Int. Sci. Vign. Vin* **33**, 57-65.
- Puig, S., Querol, A., Barrio, E. and Perez-Ortin, J. E. 2000. Mitotic Recombination and Genetic Changes in *Saccharomyces cerevisiae* during Wine Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**, 2057-2061.
- Raamsdonk, L. M., Diderich, J. A., Kuiper, A., van Gaalen, M., Kruckberg, A. L., Berden, J. A. and Van Dam, K. 2001. Co-consumption of sugars or ethanol and glucose in a *Saccharomyces cerevisiae* strain deleted in the HXK 2 gene. *Yeast* **18**, 1023-1033.
- Rachidi, N., Barre, P. and Blondin, B. 1999. Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **261**, 841-50.
- Rachidi, N., Barre, P. and Blondin, B. 2000. Examination of the transcriptional specificity of an enological yeast. A pilot experiment on the chromosome-III right arm. *Curr Genet* **37**, 1-11.
- Reid, R. J. D., Sunjevaric, I., Kedacche, M. and Rothstein, R. 2002. Efficient PCR-based gene disruption in *Saccharomyces* strains using intergenic primers. *Yeast* **19**, 319.
- Remize, F., Roustan, J., Sablayrolles, J., Barre, P. and Dequin, S. 1999a. 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.
- Remize, F., Roustan, J. L., Sablayrolles, J. M., Barre, P. and Dequin, S. 1999b. 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. *Applied and Environmental Microbiology* **65**, 143-149.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A. and Blondin, B. 2003. Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* **20**, 1369-85.
- Salmon, J. and Barre, P. 1998. 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**, 3831-7.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Schiestl, R. H. and Gietz, R. D. 1989. High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Current Genetics* **16**, 339-346.
- Sherman, F. 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**, 3-41.
- Smith, M. G., Des Etages, S. G. and Snyder, M. 2004. Microbial Synergy via an Ethanol-Triggered Pathway. *Molecular and Cellular Biology* **24**, 3874-3884.
- Swiegers, J. H., Bartowsky, E. J., Henschke, P. A. and Pretorius, I. S. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. *Australian Journal of Grape and Wine Research* **11**, 139-173.
- Symington, L. S. and Petes, T. D. 1988. Meiotic recombination within the centromere of a yeast chromosome. *Cell* **52**, 237-40.
- This, P., Lacombe, T. and Thomas, M. R. 2006. Historical origins and genetic diversity of wine grapes. *Trends Genet* **22**, 511-9.
- Varela, C., Agosin, E., Baez, M., Klapa, M. and Stephanopoulos, G. 2003. Metabolic flux redistribution in *Corynebacterium glutamicum* in response to osmotic stress. *Applied Microbiology and Biotechnology* **60**, 547-555.
- Varela, C., Pizarro, F. and Agosin, E. 2004. Biomass content governs fermentation rate in nitrogen-deficient wine musts. *Appl Environ Microbiol* **70**, 3392-400.
- Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. and Philippsen, P. 1994. New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**, 1793-808.
- Xiao, E. b. W. 2006. *Yeast Protocols*, Second edn. Humana Press.

## VI. ANEXOS

### 1. Esquema escisión gen *adh5* por recombinación homóloga



## 2. Limitaciones para aplicar la prueba t de Student pareada

Es indudable que toda aplicación de un modelo matemático (prueba estadística) tiene limitaciones; en este caso, sujetas al dinamismo propio de una fermentación vínica. A continuación se muestran las restricciones bajo la cual depende la aplicación de una prueba t de student en el caso de estudio:

1. El tiempo en que las levaduras comienzan los diferentes estados de crecimiento, ya que si se compara una cepa en estado de crecimiento exponencial con otra en lag, obviamente habrá muchas diferencias, pero esto no quiere decir que sus productos finales sean diferentes.
2. Número de muestras que se toman en algún estado fisiológico específico, ya que el resultado de la prueba estadística variará por el mayor número de datos para ese período de tiempo; por ello es preciso tomar muestras en períodos de tiempo relativamente constantes, de manera de no sesgar el resultado
3. No hay error asociado en agrupar un diseño experimental en triplicado, con muestras tomadas en forma aleatoria dentro un espacio de tiempo de media hora, en 3 muestras pareadas *S. cerevisiae* mutada/ *S. cerevisiae* silvestre