

UCH-FC
Biotecnología
A.283
C.1



UNIVERSIDAD DE CHILE -FACULTAD DE CIENCIAS -ESCUELA DE PREGRADO

FUNCIÓN DEL GEN *YAP3* DE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE* DURANTE LA FERMENTACIÓN VÍNICA

Seminario de Título entregado a la Universidad de Chile en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología Molecular

MATÍAS CRISTÓBAL AGUILERA BARRIOS

Director de Seminario de Título:

Dr. Claudio Martínez Fernández

Patrocinante:

Dr. Marcelo Baeza

Mayo, 2016

Santiago – Chile





INFORME DE APROBACIÓN SEMINARIO DE TÍTULO

Se informa a la Escuela de Pregrado de la Facultad de Ciencias, de la Universidad de Chile que el Seminario de Título, presentado por el candidato:

MATÍAS CRISTÓBAL AGUILERA BARRIOS

“FUNCIÓN DEL GEN YAP3 DE SACCHAROMYCES CEREVISIAE DURANTE LA FERMENTACIÓN VÍNICA”

Ha sido aprobado por la Comisión de Evaluación, en cumplimiento parcial de los requisitos para optar al Título de Ingeniero en Biotecnología molecular.

Dr. Claudio Martínez Fernández

Director Seminario de Título

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal. A la derecha, un sello circular de la Facultad de Ciencias, Biblioteca Central, U. de Chile.

Dr. Marcelo Baeza Cancino

Prof. Patrocinante Seminario de Título

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Comisión Revisora y Evaluadora

Dra. Jennifer Alcaíno Gorman

Presidenta

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Dra. Julieta Orlando

Evaluadora

Firma manuscrita en azul sobre una línea horizontal.

Santiago de Chile, 26 de Julio 2016

"Phase one, collect underpants"

-Gnomes, South Park.

AUTOBIOGRAFÍA

Chumango de nacimiento, antofagastino efímeramente y Santiaguino de crianza. Llegué al mundo a un equipo de tres y no fui el último en llegar a esa ciudad austral de Punta Arenas. Del frío y verde, al calor con paisajes desconcertantes pero con su encanto único, al que he vuelto a visitar y aprendido a admirar. La gran capital nos recibió con los brazos a medio abrir y nos tenía un último integrante de sorpresa.



Aquí no hubo epifanía ni voy a inventar una anagnórisis, la ciencia fue un privilegio al que fui expuesto desde que tengo uso de razón y se lo agradezco enormemente a mis padres que han siempre hecho lo imposible por nuestra familia, y obviamente no se los recuerdo tanto como debería. La curiosidad es algo natural en el hombre y si ésta se alimenta de respuestas y preguntas, ésta crecerá. Si solo ofrecemos respuestas, ésta se estanca.

La Universidad de Chile me abrió las puertas en 2007 y en ella logré conocer y reencontrarme con un sinfín de personas. El conocimiento y lecciones aprendidas ahí lo atesoraré por siempre.

AGRADECIMIENTOS

A mis padres, Walter y Marlene, y mis herman@s, Felipe, Fede y Jaci. Mi familia. Que me han soportado y apoyado todo este tiempo. Por los retos, los llantos, los abrazos y el crecimiento mutuo. Por las risas, la sobremesa y el café en grano.

Como alguien más ya escribió, *Friends will be friends*. Gracias Gino, Nico, Javi, Emilio, Tebo, Chancha, Nati, Barbs, Negra, Mary, Ren, Deaho, Pari, Vitor y Negro. Por los aciertos y desaciertos; desde la infancia, a las curaderas, las historias, el basquet y el ocio. A sus familias igual.

A Ariel, Nicole, Talo, Rolo, Juanjo, Aliosha, Joel y Bryan que fueron quienes me recibieron como una segunda familia en la Universidad. Los viajes, la casa de Juanjo, el LoL y su cariño incondicional.

A Bea, Piña, Hernan, Caty, Clio, Naty, Maca, PaPablo, R y Vale. Por esas largas noches de estudio y fiesta (no necesariamente en distintos días). Las onces y acaloradas tardes de cerveza en JGM.

A todos los chicos ANEIB que conocí y tuve el agrado de trabajar.

A Ricardo, Karel y Tito por la ciencia y nuestras pequeñas charlas sobre la vida.

A Claudio Martínez y a todo el CECTA por soportarme durante el tiempo que compartimos y por creer en las segundas y terceras oportunidades.

Y finalmente a ti 503, por ser la mejor y estar ahí en las buenas y en las malas, como un fiel corcel que lleva al dueño a la puerta del hogar.

ÍNDICE

AUTOBIOGRAFÍA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
ÍNDICE.....	V
ÍNDICE DE FIGURAS.....	IX
ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS.....	X
INDICE DE TABLAS.....	XI
ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS.....	XII
INDICE DE ABREVIACIONES.....	XIII
1. RESUMEN.....	XIV
2. ABSTRACT.....	XV
3. INTRODUCCIÓN.....	1
3.1. LA MICROBIOLOGÍA DEL VINO.....	1
3.2. <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> COMO EL MICROORGANISMO DE MAYOR IMPORTANCIA EN LA VINIFICACIÓN.....	2
3.3. IMPORTANCIA DEL NITRÓGENO EN LA VINIFICACIÓN.....	3
3.4. EL METABOLISMO DEL NITRÓGENO.....	4
3.5. ESTUDIOS TRANSCRIPTÓMICOS.....	7
3.6. YAP3 Y LA FAMILIA DE PROTEÍNAS YAP.....	9
4. HIPÓTESIS.....	12
5. OBJETIVOS.....	12

5.1.	OBJETIVO GENERAL	12
5.2.	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	12
6.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	13
6.1.	CEPAS Y MEDIOS DE CULTIVO	13
6.2.	PARTIDORES UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO.....	13
6.3.	FERMENTACIONES.....	15
6.4.	CUANTIFICACIÓN DE PARÁMETROS ENOLÓGICOS.....	16
6.5.	DETERMINACIÓN DEL CONSUMO DE FUENTES NITROGENADAS	17
6.6.	MÉTODOS ESTADÍSTICOS	17
6.7.	EXTRACCIÓN DE RNA Y PCR CUANTITATIVO (qPCR)	17
6.8.	TRANSFORMACIÓN BACTERIANA.....	18
6.8.1	<i>Preparación de células electrocompetentes.....</i>	<i>18</i>
6.8.2	<i>Transformación por electroporación</i>	<i>19</i>
6.9.	PCR DE COLONIA DESDE <i>E. COLI</i>	19
6.10.	EXTRACCIÓN DE DNA PLASMIDIAL Y PURIFICACIÓN DE BANDAS	20
6.11.	DIGESTIÓN Y LIGACIÓN ENZIMÁTICA.....	20
6.12.	EXTRACCIÓN DE DNA PLASMIDIAL.....	21
6.13.	EXTRACCIÓN DE DNA GENÓMICO	21
6.14.	CLONAMIENTO DEL GEN <i>YAP3</i> BAJO EL PROMOTOR DE <i>ACT1</i> MEDIANTE LA TÉCNICA DE RECOMBINACIÓN IN VITRO CON MUTAGÉNESIS SOE (SPLICING BY OVERLAP EXTENSION)	22
6.15.	SECUENCIACIÓN PLASMIDIAL Y HERRAMIENTAS BIOINFORMÁTICAS	23
6.16.	TRANSFORMACIÓN DE LEVADURAS	23
6.16.1	<i>Preparación de células electrocompetentes de S. cerevisiae.....</i>	<i>23</i>
6.16.2	<i>Transformación por electroporación</i>	<i>24</i>
6.17.	IDENTIFICACIÓN DE LEVADURAS POR ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LA REGIÓN ITS	24

7.	RESULTADOS	26
7.1.	FERMENTACIÓN EN MOSTO SINTÉTICO DE LA CEPA EC1118 DE <i>S. CEREVISIAE</i>	26
7.1.1	<i>Evaluación fisiológica y enológica durante la fermentación vínica en condiciones de estrés nutricional</i>	26
7.1.2	<i>Niveles de transcritos relativos de YAP3 durante la fermentación vínica</i> ..	29
7.2.	CREACIÓN DE UNA CEPA INDUSTRIAL EC1118 QUE SOBREENPRESE EL GEN YAP3.....	30
7.2.1	<i>Digestión y purificación del vector YEpAct4MX</i>	31
7.2.2	<i>Construcción de un producto híbrido entre ACT1 y YAP3</i>	32
7.2.3	<i>Transformación y comprobación del vector YEpAct4MX-YAP3E en E. coli DH5α</i>	34
7.2.4	<i>Secuenciaciones y alineamientos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas</i>	36
7.2.5	<i>Transformación de la cepa industrial EC1118 con el vector de expresión YEpAct4MX-YAP3E</i>	36
7.3.	FERMENTACIÓN EN MOSTO SINTÉTICO DE LA CEPA EC1118-YAP3E DE <i>S. CEREVISIAE</i>	39
7.3.1	<i>Evaluación fisiológica y enológica durante la fermentación vínica de la cepa EC1118-YAP3E</i>	40
7.3.2	<i>Evaluación del consumo de fuentes nitrogenadas durante la fermentación vínica</i>	42
8.	DISCUSIÓN	45
8.1.	YAP3 EN CONDICIONES DE ESTRÉS NUTRICIONAL	45
8.2.	YAP3 COMO POSIBLE ACTIVADOR EN RUTAS DE REGULACIÓN DE NITRÓGENO	49
9.	CONCLUSIONES	53
10.	BIBLIOGRAFÍA	54

11. ANEXOS	61
11.1. MOSTO SINTÉTICO MS380.....	61
11.2. TITULACIÓN POR FORMOL (MÉTODO DE SÓRENSEN).....	63
11.3. ESQUEMATIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE SOEING MOLECULAR	64
11.4. CONSUMO DE FUENTES NITROGENADAS AGRUPADAS POR CONSUMO TEMPRANO, MEDIO, TARDÍO Y ERRÁTICO DURANTE LA FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA.....	65
11.5. CINÉTICA DE CONSUMO DEL YAN TOTAL.....	69

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: METABOLISMO CENTRAL DEL NITRÓGENO.	5
FIGURA 2: ESQUEMA DE LA PROTEÍNA YAP3.	10
FIGURA 3: FENOTIPOS DE INTERÉS ENOLÓGICOS EN FERMENTACIONES EN MS380 Y MS60.	28
FIGURA 4: PERFIL DE EXPRESIÓN DE <i>YAP3</i> EN CONDICIONES DE NITRÓGENO NORMAL Y BAJO.	30
FIGURA 5: VECTOR DE EXPRESIÓN YEPACT4MX.	31
FIGURA 6: DIGESTIONES PARCIALES DEL VECTOR YEPACT4MX CON LA ENZIMA DE RESTRICCIÓN <i>HINDIII</i>	32
FIGURA 7: PRODUCTOS DE PCR PARA LA CONSTRUCCIÓN DE UN PRODUCTO HÍBRIDO.	33
FIGURA 8: FRAGMENTOS DE DNA DE INTERÉS PURIFICADOS DESDE GEL DE AGAROSA. PRODUCTO DE SOE PACT1/YAP3 Y YEPACT4MX CON EXTREMOS COHESIVOS <i>SMAI</i> Y <i>HINDIII</i>	34
FIGURA 9: COMPROBACIÓN DEL VECTOR YEPACT4MX-YAP3E MEDIANTE PCR Y DIGESTIONES.	35
FIGURA 10: ALINEAMIENTO DE SECUENCIAS DE <i>YAP3P</i>	37
FIGURA 11: ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN DE LA REGIÓN ITS PARA TRANSFORMANTES <i>S. CEREVISIAE</i> EC1118 YEPACT4MX-YAP3E.	38
FIGURA 12: CINÉTICA DE PÉRDIDA DE CO ₂ DURANTE LA FERMENTACIÓN Y FENOTIPOS FINALES DE INTERÉS ENOLÓGICO EN MOSTO SINTÉTICO MS380.	41
FIGURA 13: CINÉTICA DE CONSUMO DE AMINOÁCIDOS Y AMONIO DURANTE LA FERMENTACIÓN EN MS380.	43

ÍNDICE DE FIGURAS SUPLEMENTARIAS

FIGURA SUPLEMENTARIA 1: PRODUCTO MUTANTE AD. MUTAGÉNESIS SITIO DIRIGIDA POR SOE.	64
FIGURA SUPLEMENTARIA 2: CINÉTICA DE CONSUMO DE AMINOÁCIDOS DE MANERA TEMPRANA DURANTE LA FERMENTACIÓN EN MS380.	65
FIGURA SUPLEMENTARIA 3: CINÉTICA DE CONSUMO DE AMINOÁCIDOS EN EL GRUPO MEDIO DURANTE LA FERMENTACIÓN EN MS380.	66
FIGURA SUPLEMENTARIA 4: CINÉTICA DE CONSUMO DE AMINOÁCIDOS DE MANERA TARDÍA DURANTE LA FERMENTACIÓN EN MS380.	67
FIGURA SUPLEMENTARIA 5: CINÉTICA DE CONSUMO DE AMINOÁCIDOS DE MANERA ERRÁTICA DURANTE LA FERMENTACIÓN EN MS380.	68
FIGURA SUPLEMENTARIA 6: CINÉTICA DE CONSUMO DEL YAN TOTAL DURANTE LA FERMENTACIÓN EN MS380.	69

INDICE DE TABLAS

TABLA 1: CEPAS UTILIZADAS EN ESTE ESTUDIO	14
TABLA 2: PARTIDORES UTILIZADOS EN LA CONSTRUCCIÓN Y ANÁLISIS DEL VECTOR YEPACT4MX- YAP3E	14
TABLA 3: PARTIDORES UTILIZADOS EN QPCR Y ANÁLISIS DE RESTRICCIÓN ITS	15

ÍNDICE DE TABLAS SUPLEMENTARIAS

TABLA SUPLEMENTARIA 1: CONCENTRACIONES DE AZÚCARES PARA MS380	61
TABLA SUPLEMENTARIA 2: CONCENTRACIONES DE SALES PARA MS380	61
TABLA SUPLEMENTARIA 3: CONCENTRACIONES DE VITAMINAS PARA MS380	62
TABLA SUPLEMENTARIA 4: CONCENTRACIÓN DE AMINOÁCIDOS PARA MS380	62
TABLA SUPLEMENTARIA 5: CONCENTRACIÓN DE FACTORES DE ANAEROBIOSIS PARA MS380	62

INDICE DE ABREVIACIONES

DNA	Ácido desoxirribonucleico
RNA	Ácido ribonucleico
CO ₂	Dióxido de carbono
YAN	Nitrógeno asimilable por la levadura
DAP	Fosfato de diamonio
SOB	Caldo súper óptimo ('Super Optimal Broth')
cDNA	Ácido desoxirribonucleico codificante
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
SOE	Empalme por extensión de solapamiento ('Splicing by overlap extension')
ITS	Espaciador transcrito intergénico ('internal transcribed spacer')
MS380	Mosto sintético, 380 mg N/L
YAP	Proteína de activación en levaduras
b-ZIP	Dominio cierre básico de leucina
AP-1	Proteína de activación 1
TOR	Diana de rapamicina ('Target of rapamycin')

1. RESUMEN

La elaboración del vino es un proceso microbiológico complejo, en este *S. cerevisiae* es la principal responsable de la transformación del mosto de uva en vino. Durante la fermentación, el consumo de fuentes nitrogenadas asimilables es fundamental en el crecimiento y el metabolismo de esta levadura y su insuficiencia o escasez en los mostos de uva es una de las causas principales de fermentaciones lentas o incompletas. Estudios previos de microarreglos realizados en cepas vínicas nativas durante condiciones de estrés nutricional de nitrógeno en fermentación vínica, reportan la activación del factor transcripcional *YAP3*. No obstante, no se ha demostrado si este gen podría tener un rol en el metabolismo del nitrógeno y su función es desconocida.

Con el objetivo de caracterizar el rol de *YAP3* durante la fermentación vínica, se midieron los niveles de transcritos del gen en condiciones de suficiencia e insuficiencia de fuentes nitrogenadas. Además, se desarrolló y evaluó una cepa vínica que sobreexpresa episomalmente el gen *YAP3*. Los resultados obtenidos de la fermentación en mosto sintético indican que la expresión del gen se ve modulada por la disponibilidad de nitrógeno en el medio en experimentos de qPCR. La clonación del gen y su posterior secuenciación mostró discrepancias con la secuencia reportada para la cepa industrial EC1118 por lo que se sugiere la existencia de un locus heterólogo. Finalmente, la sobreexpresión de *YAP3* afectó algunas de las características fisiológicas y enológicas de la cepa. Notablemente, el consumo de aminoácidos fue significativamente menor en la cepa que sobreexpresa *YAP3*, durante las primeras 24 horas de fermentación y tendió a igualarlo hacia el final de ésta.

2. ABSTRACT

Winemaking is a complex microbiological process; in it *S. cerevisiae* is the main responsible for the transformation of the grape must into wine. During the fermentation, consumption of assimilable nitrogenous sources is fundamental for the growth and metabolism of this yeast and failure or shortage in grapes is one of the main causes of slow or incomplete fermentation. Previous microarray studies conducted in native strains during nitrogen nutritional stress conditions in wine fermentation, report the activation of the transcriptional factor *YAP3*. However, it has not been proven whether this gene may play a role in nitrogen metabolism and its function is unknown.

In order to characterize the role of *YAP3* during wine fermentation, the levels of gene transcripts were measured at sufficient and insufficient nitrogen source conditions. In addition, we developed and evaluated a strain overexpressing the gene *YAP3* episomally. The qPCR results of the fermentation in synthetic must indicate that gene expression is modulated by availability of nitrogen in the medium. In addition, sequence discrepancies were found with the sequence reported for the industrial strain EC1118, this suggests the existence of a heterologous locus. Finally, the overexpression of *YAP3* affected some of the oenological and physiological characteristics of the strain. Notably, the amino acid consumption was significantly lower in the strain overexpressing *YAP3* during the first 24 hours of fermentation and tended to match it to the end.

3. INTRODUCCIÓN

3.1. La microbiología del vino

La fermentación del mosto de uva para la elaboración de vino (vinificación) es un proceso microbiológico y bioquímico complejo, el cual involucra el desarrollo secuencial de distintos microorganismos y la conversión de los azúcares del mosto en ácidos orgánicos, etanol y CO₂. Ésta involucra la interacción entre levaduras, bacterias y hongos filamentosos, siendo las levaduras los organismos que desarrollan un papel central (Pretorius, 2000). Dentro de los géneros de levadura que predominan la fermentación en estados tempranos se encuentran los géneros *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia* y *Torulaspota*. A medida que la concentración de etanol aumenta durante el proceso ocurre un cambio poblacional, en el cual el género de levaduras *Saccharomyces* se convierte en dominante, siendo la especie *S. cerevisiae*, el microorganismo vínico de mayor importancia y el principal responsable de llevar a cabo la fermentación alcohólica (Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon y col., 2006).

Tradicionalmente la fermentación vínica se ha llevado a cabo aprovechando la microbiota presente en la superficie de las uvas y en el ambiente de la viña y bodegas, a este proceso se le conoce como fermentación natural (Mortimer, 2000). Sin embargo, las prácticas actuales en la industria, en la elaboración del vino, contemplan el uso de un inóculo inicial de levaduras seleccionadas. Esta práctica permite un acortamiento de la fase de latencia, asegura una rápida y completa fermentación del mosto y conduce a

un grado importante de reproducibilidad en el producto final año tras año (Pretorius & Bauer, 2002).

3.2. *Saccharomyces cerevisiae* como el microorganismo de mayor importancia en la vinificación

La selección de cepas de levaduras vínicas de *S. cerevisiae* para su uso industrial se ha enfocado, primeramente, en cepas que aseguren un término de fermentación en tiempos cortos; luego, esta búsqueda se enfocó en propiedades más sofisticadas que influenciaran la calidad del vino, incluyendo la producción de compuestos aromáticos, tolerancia a condiciones de fermentación difíciles (dado la composición de los mostos o factores externos), fenotipo 'killer' o propiedades tecnológicas (Cebollero y col., 2007). En mayor detalle los principales fenotipos deseados son: tolerancia al alcohol, tolerancia al dióxido de azufre, reproducibilidad de la fermentación, azúcar residual en baja concentración (2-5 g/L), fermentación a bajas temperaturas, fase de latencia corta, producción de glicerol y β -glicosidasa, baja producción de sulfuro de hidrógeno, acidez volátil, formación de espuma y precursores de etil carbamato; producción de ésteres deseables, capacidad de controlar e imponerse en diversas condiciones de fermentación, tolerancia a otros microorganismos, tolerancia a bajo pH (3,0-3,9), mínimo impacto sobre las características de la variedad de la uva y tolerancia a cantidades decrecientes de nutrientes (como fuentes de nitrógeno) (Aranda y col., 2011; Bisson, 2005; Degre, 1993).

3.3.Importancia del nitrógeno en la vinificación

De todos los compuestos asimilables por *S. cerevisiae* durante la fermentación, los nitrogenados son cuantitativamente el segundo grupo de nutrientes consumidos, después de los hidratos de carbono. Éstos ejercen una gran influencia en el crecimiento y el metabolismo de esta levadura (Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon y col., 2006).

Las concentraciones de nitrógeno soluble en los mostos de uva varían entre 0,1 y 1,0 g/L (Henschke & Jiranek, 1993) y su composición es principalmente amonio (3 – 10%), aminoácidos (25 – 30%), polipéptidos (25 – 40%), proteínas (5 – 10%) y pequeñas cantidades de nitritos, nitratos, nucleótidos, vitaminas y aminas (Aranda y col., 2011). Las levaduras del género *Saccharomyces* son incapaces de asimilar el nitrógeno inorgánico en forma de nitritos y nitratos, polipéptidos y proteínas presentes en el mosto, esto deja como fuentes asimilables de nitrógeno por la levadura (YAN, por sus siglas en inglés) fundamentalmente al amonio y aminoácidos (comentado por Aranda y cols., 2011). Ahora bien, los niveles de nitrógeno mínimos reportados para llevar a cabo una fermentación alcohólica exitosa varían, autores sugieren un rango entre 120 - 140 mg YAN/L (Bely y col., 1990b), mientras otros reportan 200 – 267 mg YAN/L (Mendes-Ferreira y col., 2004); sin embargo, estas diferencias se le pueden atribuir a la cepa utilizada o el tipo de fuente nitrogenada utilizada.

La insuficiencia o escasez de YAN en los mostos de uva es una de las causas principales de los problemas cinéticos en las fermentaciones vnicas, que resultan en fermentaciones lentas o incompletas (Bisson, 1999; Salmon, 1989), éstas corren el riesgo de deterioro por contaminantes microbianos u oxidación, lo que disminuye la calidad del producto final. Esta insuficiencia en la industria puede ser manejada de dos

formas, mediante regímenes de fertilización de los viñedos o la suplementación de los mostos de uva con nitrógeno inorgánico, en forma de fosfato de diamonio (DAP, por sus siglas en inglés). Sin embargo, el exceso de nitrógeno también puede generar otros problemas, como la producción de metabolitos indeseados como el etil carbamato o aminas biogénicas, e inestabilidad microbiológica (Pretorius, 2000; Ribéreau-Gayon y col., 2006).

3.4.El metabolismo del nitrógeno

Estudios realizados en levaduras de laboratorio, en condiciones controladas, han ayudado a dilucidar los procesos bioquímicos que ocurren durante el consumo de fuentes nitrogenadas. Brevemente, la asimilación de fuentes nitrogenadas por la levadura *S. cerevisiae* dependerá de la naturaleza y la cantidad de ésta. La preferencia de una fuente sobre otra se puede expresar en forma cuantitativa, con una tasa de crecimiento aumentada en un medio con una fuente preferida, relativa a la tasa de crecimiento, en otra fuente; y en forma cualitativa, por la habilidad de la fuente preferida en inducir una represión de los genes para catabolizar las otras fuentes nitrogenadas (Magasanik & Kaiser, 2002). Esta última es el mecanismo conocido como represión catabólica por nitrógeno (NCR, por sus siglas en inglés), que reduce la innecesaria divergencia en la capacidad sintética de las células (en la formación de enzimas y permeasas) para la utilización de compuestos que no son fuentes preferidas de glutamato y glutamina, cuando existe una fuente preferida de nitrógeno (Magasanik, 1992).

Ahora bien, las células de levadura son capaces de sintetizar todos los aminoácidos desde una variedad de fuentes nitrogenadas. Para utilizar una molécula como fuente, las células tienen que convertir esta molécula a glutamato y glutamina, y

a partir de estos dos aminoácidos, se pueden sintetizar todos los compuestos nitrogenados en la célula (Magasanik, 1992). Debido a la posición central de estas moléculas en el metabolismo del nitrógeno, llamaremos a esto el metabolismo central del nitrógeno (CNM, siglas en ingles). Estas reacciones permiten la síntesis de glutamato a partir de α -cetoglutarato y amonio, por la acción de la enzima glutamato deshidrogenasa; y la síntesis de glutamina desde glutamato y amonio por la acción de la enzima glutamina sintetasa, véase Figura 1 (Magasanik & Kaiser, 2002). Las levaduras asimilan fuentes nitrogenadas que no sean glutamato ni glutamina mediante la conversión a amonio y luego la condensación con α -cetoglutarato para formar glutamato.

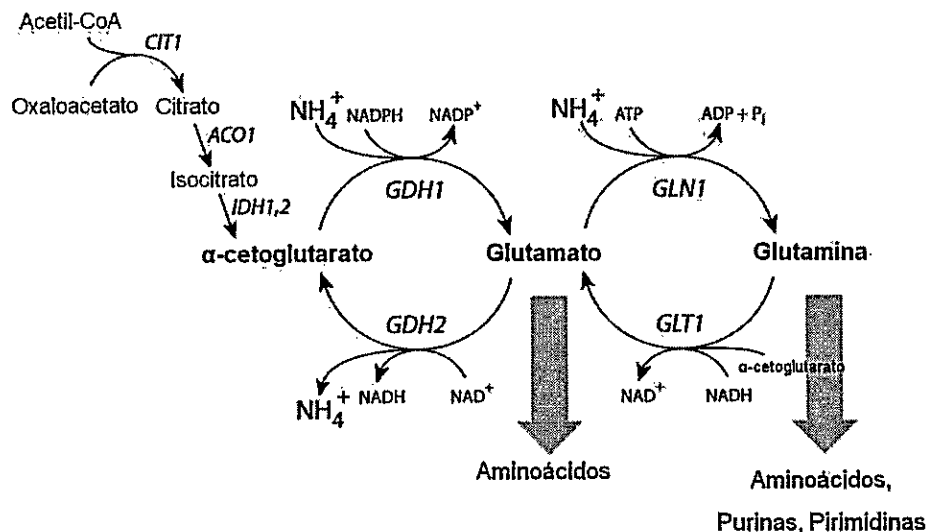


Figura 1: Metabolismo central del nitrógeno. Los compuestos nitrogenados en la célula son sintetizados desde glutamato o glutamina. La mayor vía de síntesis de glutamato es mediante la combinación de amonio con α -cetoglutarato, el cual es sintetizado desde acetil-CoA y oxalacetato en el ciclo del ácido cítrico (CIT1: Citrato Sintasa, ACO1: Aconitasa, IDH1,2: Isocitrato Deshidrogenasa). Glutamina es sintetizada por la combinación de amonio y glutamato por la enzima glutamina sintetasa (GLN1). GDH1: glutamato deshidrogenasa dependiente de NADP^+ , GDH2: glutamato deshidrogenasa dependiente de NAD^+ , GLT1: glutamato sintetasa. Modificado desde Magasanik & Kaiser (2002).

Los mecanismos de regulación del metabolismo de fuentes nitrogenadas son variados y responden a diferentes estímulos y han sido revisados por Zaman y col. (2008), éstos son: la vía de discriminación por nitrógeno (NDP, por sus siglas en inglés); la vía de regulación retrógrada (RTG); la red TOR (diana de rapamicina); el sistema SPS (Ssy1-Ptr3-Ssy5); y el sistema de control general de biosíntesis de aminoácidos (GCN por sus siglas en inglés). El primero (NDP), se caracteriza por estar controlado por la interacción de cuatro factores de transcripción de la familia "dedos de zinc", dos activadores (Gln3 y Gat1) y dos represores (Dal80 y Gzf3), en este, la célula regula los genes NDP (alrededor de 90 genes), principalmente mediante la modulación de la localización subcelular de los activadores transcripcionales. La segunda (RTG), consiste en la respuesta celular a la disfunción mitocondrial, que altera la expresión de genes nucleares (cuatro reguladores positivos y cuatro reguladores negativos), que a su vez regulan la expresión de las primeras tres enzimas del ciclo del ácido cítrico, las enzimas encargadas de la biosíntesis de lisina y algunos genes del ciclo del glioxilato y la β -oxidación de ácidos grasos. El tercero (TOR), constituido por dos complejos en el género *Saccharomyces* (TORC1 y TORC2) que actúan como quinasas. Existe evidencia que sugiere que la actividad de TORC1 responde a los niveles de nutrientes, principalmente a la calidad de fuente de nitrógeno. A pesar de que no se conoce con exactitud el rol que toma TORC1 en la vía de señalización, TORC1 sí juega un papel importante en la transición entre crecimiento y quiescencia celular, regulando los procesos que proveen los medios de supervivencia bajo condiciones de privación de nutrientes o estrés. El cuarto (sistema SPS), regula la expresión génica de las permeasas de aminoácidos, genes catabólicos sensibles a nitrógeno y genes involucrados a estrés, en respuesta a la presencia de aminoácidos en el medio. Finalmente el quinto mecanismo (GCN), detecta la concentración interna de

aminoácidos, induciendo al activador transcripcional Gcn4 que responde a la limitación de cualquier aminoácido, activando la transcripción de más de 500 genes.

No obstante la información en levaduras de laboratorio, poco se conoce sobre los mecanismos de regulación genética en levaduras vínicas. Estudios realizados por Deeds y col. (2011) demostraron grandes e inesperadas diferencias en la respuesta transcripcional de NCR en levaduras vínicas, durante una fermentación alcohólica, con respecto a condiciones estándar de fermentación, lo que podría reflejar diferencias entre las cepas de levadura (de laboratorio y vínica) o diferencias en la regulación génica durante la fermentación alcohólica (Deed y col., 2011).

3.5. Estudios transcriptómicos

Aproximaciones de genética funcional, como los análisis de microarreglos, son herramientas poderosas para el análisis de la expresión génica a escala genómica, dando una mirada exhaustiva de la fisiología de la levadura (DeRisi y col., 1997). Análisis globales de la expresión génica se llevan a cabo frecuentemente en levaduras de laboratorio, pero si queremos entender cómo las levaduras vínicas hacen frente a su ambiente de estrés, es necesario estudiar la expresión bajo condiciones de vinificación, que difieren considerablemente de las condiciones de laboratorio. Como bien se mencionó anteriormente, existe poca información sobre los mecanismos por los cuales las levaduras vínicas regulan la expresión génica para enfrentarse a condiciones de estrés cambiantes (Rossignol y col., 2003). No obstante, a la fecha, la revisión más exhaustiva de estas tecnologías utilizada en levaduras vínicas fue realizada por los autores Pérez-Ortín y García-Martínez (2011).

Así mismo, en nuestro laboratorio, Contreras (2012) analizó la expresión génica en levaduras vínicas con la finalidad de identificar genes relacionados al fenotipo de consumo de fuentes nitrogenadas mediante la comparación de perfiles de expresión y qPCR. Para ello se utilizaron cepas vínicas de *S. cerevisiae* con fenotipos enológicos y genotipos similares pero que diferían en sus capacidades de consumir fuentes nitrogenadas bajo las mismas condiciones de fermentación. Estas cepas se obtuvieron mediante esporulación de una cepa híbrida (llamada L-3044), proveniente del cruce de cultivos monospóricos de las cepas vínicas nativas L-3145 y L-3147. Del híbrido L-3044 se obtuvieron 115 descendientes genéticamente emparentados, de los cuales se seleccionaron 3 cepas que cumplieran con un perfil enológico similar, pero con diferencias en el consumo de fuentes asimilables de nitrógeno disponible. Esta estrategia difiere de las usadas habitualmente en estudios de perfiles de expresión, en que éstos generalmente exponen a las levaduras a diferentes condiciones de cultivo que podrían desencadenar respuestas a estrés global que dificulten la detección de genes directamente involucrados en el fenotipo en estudio.

Tres cepas de *S. cerevisiae* provenientes del híbrido L-3044 fueron seleccionadas, denominadas AC19, AC114 Y AC115; debido a que presentaron diferencias en el consumo de fuentes nitrogenadas (consumo de amonio y aminoácidos) y no presentaron diferencias estadísticamente significativas en sus características enológicas y otros parámetros fermentativos, como producción de glicerol y etanol, tiempo generacional y velocidad específica de crecimiento. La cepa AC19, presentó un alto consumo de amonio y bajo de aminoácidos; la cepa AC114, un consumo promedio de amonio y bajo de aminoácidos; y la cepa AC115, un consumo promedio de amonio pero alto de aminoácidos. Posteriormente se realizaron estudios

transcriptómicos mediante el uso de microarreglos de cDNA. Al comparar la cepa AC19 con la cepa AC114 (diferencias en el consumo de amonio) existieron 248 genes con diferencias de expresión, cuyo análisis funcional mostró que correspondían a genes relacionados con el transporte de iones y reguladores transcripcionales con motivos de dedos de cinc principalmente. Al comparar AC19 con la cepa AC115 (diferencias en el consumo de nitrógeno total) hubo 168 genes con diferencias en su expresión y cuyo análisis funcional mostró que correspondían a genes relacionados con el transporte de hexosas y reguladores transcripcionales con motivos de dedos de cinc (Contreras y col., 2012). Genes candidatos fueron analizados mediante ensayos de qPCR y macroarreglos, con el fin de confirmar las diferencias de expresión detectadas por microarreglos. Estos resultados arrojaron como un interesante candidato de estudio al gen *YAP3* (nombre sistemático YHL009C), el cual, presentó un aumento en su expresión relativa al compararse dos condiciones de nitrógeno asimilable en las cepas vínicas nativas AC19 y AC114. Esta observación vincularía a *YAP3* con el uso de amonio como fuente nitrogenada en condiciones de fermentación vínica y que los niveles de expresión de este gen estarían involucrados con una respuesta a la escasez de fuentes nitrogenadas.

3.6.YAP3 y la familia de proteínas YAP

El gen *YAP3* codifica una proteína de 330 residuos aminoácidos de la familia de factores transcripcionales YAP (del inglés 'yeast activator protein') y su función hasta ahora es desconocida (Figura 2). La familia de proteínas YAP es una familia de factores de transcripción b-ZIP exclusiva de levaduras, que abarca 8 miembros con una importante similitud de secuencia a la proteína AP-1, Gcn4, en su sitio de unión a DNA (Fernandes y col., 1997). Inicialmente dos de estas proteínas, Yap1 y Yap2,

asociadas a la resistencia pleiotropica de drogas, fueron descritas como factores AP-1. Luego, de su secuenciación y posteriores alineamientos de su región de unión a DNA revelaron otras 6 proteínas, Yap3-8, que conservaban estos residuos aminoacídicos presentes en Yap1 y Yap2 (Rodrigues-Pousada y col., 2010).



Figura 2: Esquema de la proteína Yap3. La proteína Yap3p está compuesta de 330 residuos aminoacídicos y posee las cuatro regiones características de las proteínas Yap: el motivo rico en cisteínas en el amino terminal (N-CRD) y el motivo rico en cisteínas en el carboxilo terminal (C-CRD), encargados de controlar la translocación al núcleo por transiciones de oxidación y reducción; el dominio bZIP, encargado de la dimerización y de la unión al sitio de reconocimiento; y el motivo señal de incorporación a núcleo (NES) se destaca su secuencia. Se muestran la posición de los residuos de cisteína en los motivos N-CRD y C-CRD. Modificado de Rodrigues-Pousada y col. (2010).

Además de los resultados obtenidos en nuestro laboratorio, no existe mucha información sobre el posible rol o función del gen *YAP3*. No obstante, al utilizar datos desde estudios en microarreglos es posible observar, en experimentos que miden el patrón de expresión global frente a transiciones ambientales en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae*, que la expresión del gen *YAP3* podría depender de los niveles de nitrógeno ambiental donde se reportó que ante la disminución drástica del nitrógeno después de un cambio del medio de cultivo, el gen *YAP3* muestra una sobreexpresión durante las primeras cuatro horas (Gasch & Werner-Washburne, 2002). Esta observación también vincularía a *YAP3* con una respuesta a la escasez de fuentes nitrogenadas.

Por lo anterior, para investigar el posible rol que cumple *YAP3* en la respuesta a estrés nutricional de nitrógeno y en el consumo de fuentes nitrogenadas, en este trabajo se propuso generar una cepa que sobreexpresa episomalmente Yap3p en la cepa modelo industrial de *S. cerevisiae* EC1118, y evaluar su fenotipo en condiciones que simulen una fermentación vínica.

4. HIPÓTESIS

Bajo condiciones de fermentación vínica, la transcripción del gen del factor transcripcional Yap3p en *Saccharomyces cerevisiae* es regulada por el nitrógeno asimilable y su sobreexpresión permite un aumento en el consumo de amonio.

5. OBJETIVOS

5.1.Objetivo General.

Evaluar bajo condiciones de fermentación vínica la relación entre la expresión génica de *YAP3* y el fenotipo consumo de nitrógeno.

5.2.Objetivos Específicos.

-Estudiar la expresión génica de *YAP3* en relación a la disponibilidad de nitrógeno en mosto vínico.

-Generar una cepa vínica industrial de *S. cerevisiae* que sobreexpresa el gen *YAP3* episomalmente.

-Evaluar el fenotipo vínico de la cepa industrial que sobreexpresa el gen *YAP3* durante la fermentación en MS380.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Cepas y medios de cultivo

Las cepas utilizadas durante este trabajo se describen en la Tabla 1 y fueron obtenidas desde el cepario del Laboratorio de Biotecnología y Microbiología Aplicada (LAMAP) de la Universidad de Santiago de Chile. La cepa de *S. cerevisiae* EC1118 fue crecida en medio YPD (0,5% extracto levadura, 0,5% peptona y 2% glucosa) a 28 °C por 24 h o sembrada en placas de YPD-agar 2%. En cuanto a las cepas de *S. cerevisiae* EC1118-YEpAct4MX y EC1118-YAP3E, éstas fueron crecidas en medio YPD suplementado con geneticina (G418) en concentración de 100 µg/mL durante 24 h a 28 °C y sembradas en placas de agar YPD suplementadas con G418 a una concentración de 100µg/µL a 28 °C durante 48 h. La cepa de *Escherichia coli* DH5α fue crecida en medio LB (0,5% extracto de levadura, 1% triptona y 1% cloruro de sodio) a 37 °C por 12 h, mientras que la cepa de *E. coli* DH5α-YAP3E fue crecida en medio LB suplementado con ampicilina en concentración de 100 µg/mL a 37 °C por 12 h.

6.2. Partidores utilizados en este estudio

En la Tabla 2 se muestran los partidores diseñados y utilizados en la estrategia de clonamiento del gen YAP3, la construcción del vector YEpAct4MX-YAP3E y su verificación. La Tabla 3 muestra los partidores utilizados para los experimentos de qPCR y en el análisis de restricción de la región ITS.



Tabla 1: Cepas utilizadas en este estudio

Cepa	Características	Fuente
DH5α	Cepa de <i>E. coli</i> utilizada para experimentos de clonación, propagación y construcción de plásmidos.	Taylor y col. (1993)
DH5α-YAP3E	Cepa de <i>E. coli</i> transformada con el plásmido YEpAct4MX-YAP3E.	Este trabajo
EC1118	Cepa de <i>S. cerevisiae</i> vinica industrial diploide de origen francés.	Lallemand Inc.
EC1118-MX	Cepa de levadura derivada de EC1118, que porta el plásmido YEpAct4MX.	Soto (2012)
EC1118-YAP3E	Cepa de levadura derivada de EC1118, que expresa constitutivamente el gen YAP3 bajo el control del promotor del gen ACT1 en el plásmido YEpAct4MX.	Este trabajo

Tabla 2: Partidores utilizados en la construcción y análisis del vector YEpAct4MX-YAP3E

Partidor	Secuencia (5'-3')	Descripción
YAP3a	ATC GAG CTC GGG ACC CGG GTA AGC TGC C	Partidor sentido para el promotor de actina con un sitio <i>Sma</i> I.
YAP3b	CCA TAT TAG AAG GCG TCA TGG TTA ATT CAG TAA ATT TTC GAT C	Partidor antisentido para el promotor de actina que empalma con la región 5' de forma antisentido del gen YAP3.
YAP3c	ATG ACG CCT TCT AAT ATG G	Partidor sentido para la clonación del gen YAP3
YAP3d	GA AAG CTT TTT GCC TCA TGA AGA TGT TG	Partidor antisentido para la clonación el terminador del gen YAP3, con sitio <i>Hind</i> III.
M13R	CAGGAAACAGCTATGAC	Partidor antisentido para la verificación del cassette <i>KANMX</i> y para la confirmación del clonamiento de genes.
M13F	GTA AAA CGA CGG CCA GT	Partidor sentido para la verificación del cassette <i>KANMX</i> y para la confirmación del clonamiento de genes.

* En negrita y subrayado se observan los sitios de corte enzimáticos incorporados.

Tabla 3: Partidores utilizados en qPCR y análisis de restricción ITS

Partidor	Gen	Secuencia (5'- 3')	Amplicón (pb)	Referencia
YAP3F	YHL009c	TAT TGA GCG AGC AAA CAG CA	157	(Contreras y col., 2012)
YAP3R		TCG CCT GAA ATA GGG GTT AG		
ACT1F	YFL039c	TTG GCC GGT AGA GAT TTG AC	266	(Contreras y col., 2012)
ACT1R		CCC AAA ACA GAA GGT GGA A		
ITS1	5.8S rDNA	TCC GTA GGT GAA CCT GCG G	880	(Esteve-Zarzoso y col., 1999)
ITS4	ITS1-ITS2	TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC		

6.3.Fermentaciones

Las fermentaciones se realizaron en el mosto vínico sintético descrito por Rossignol y col. (2003), de ahora en adelante llamado MS380, el cual contiene 250 g/L de azúcares (125 g/L de glucosa y 125 g/L de fructosa), sales, vitaminas, factores de anaerobiosis y 380 mg N/L de nitrógeno asimilable de los cuales 120 mg/L provienen de amonio, 260 mg/L de una mezcla de 19 aminoácidos y con un pH de 3,3. También se utilizó un mosto modificado, solo con menor concentración de nitrógeno asimilable (60 mg N/L, llamado de ahora en adelante MS60) manteniendo las proporciones de amonio y aminoácidos. Las concentraciones detalladas del mosto sintético se indican en el Anexo 11.1

Las fermentaciones se realizaron en 2 formatos, en tubos estériles de 50 mL con 40 mL de mosto sintético y en tubos estériles de 15 mL con 12 mL de mosto sintético. El primer formato se utilizó para llevar a cabo el primer objetivo específico y el segundo, para el tercer objetivo específico (véase 5.2).

Pre-inóculos de la cepa EC1118 se realizaron en tubos estériles con 5 mL de mosto MS380 incubados 16 h en agitación a 28 °C. Por otro lado, pre-inóculos de las

cepas EC1118-YEpAct4MX y EC1118-YAP3E se realizaron en 5 mL de mosto MS380 suplementado con una concentración de 200 µg/µL de G418.

Las fermentaciones fueron inoculadas con una concentración de 1×10^6 células/mL, obtenidas de los pre-inóculos. Éstas se mantuvieron a 25 °C durante 15 días sin agitación. La producción de CO₂ fue monitoreada mediante la pérdida de masa de los tubos cada 12 horas, para esto se utilizó una balanza electrónica.

6.4. Cuantificación de parámetros enológicos

En tiempos determinados durante la fermentación y al final de la fermentación del mosto sintético: 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 200 y 366 h para el primer objetivo específico y 0, 6, 24, 144 y 480 h para el tercer objetivo específico. Los tubos fueron centrifugados durante 5 min a 5.000 x g con el fin de separar el mosto fermentado de las células. El sobrenadante se analizó mediante cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) para los siguientes parámetros enológicos: cantidad de azúcar, etanol, trehalosa, glicerol y ácidos orgánicos (ácido málico, ácido succínico, ácido acético y ácido láctico) según lo descrito por Nissen y col. (1997). El equipo de HPLC utilizado fue Shimadzu CBM-20A (Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, USA), utilizando una columna de exclusión iónica Aminex HPX-87C (Bio-Rad, USA). La columna fue eluída a 55 °C con una solución 4 mM de H₂SO₄, con un flujo de elución de 0,5 mL/min. Ácidos orgánicos, glicerol y trehalosa fueron detectados mediante el uso de un detector UV a 220 nm, mientras que etanol y azúcares con un detector de índice refractivo.

6.5.Determinación del consumo de fuentes nitrogenadas

El nitrógeno asimilable por la levadura (YAN) se determinó utilizando la titulación por formol o método de Sørensen, como fue descrito por Aerny (1996). En la sección 11.2 se detalla este proceso.

Finalmente, en tiempos determinados durante y al final de ésta (los mismos que en la sección anterior) se obtuvieron muestras de 500 µL de mosto sintético, las cuales fueron centrifugadas 5 min a 5.000 x g. Posteriormente, se cuantificó la cantidad de aminoácidos y amonio por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC) por un servicio externo, siguiendo lo descrito por Gómez-Alonso y col. (2007). Para ello los aminoácidos y el amonio fueron derivatizados con dietil etoximetilmalonato (DEEMM), y separados mediante el uso de dos fases móviles, fase A (25 mM buffer acetato pH = 5,8 con 0,02% azida de sodio) y fase B (una proporción 80:20 de acetonitrilo y metanol).

6.6.Métodos estadísticos

Los resultados se muestran como media y desviación estándar. Las diferencias estadísticamente significativas se calcularon mediante una comparación múltiple de muestras con el test de intervalos de Fisher LSD (*'least significant different'*) utilizando el software Statgraphics Centurion XVI v16.1.11 (StatPoint Technologies, Inc, USA). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado como una diferencia estadísticamente significativa.

6.7.Extracción de RNA y PCR cuantitativo (qPCR)

La extracción de RNA se realizó durante el transcurso de fermentaciones en mosto sintético, a distintos tiempos (6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 200, 336 h), utilizando 'RNeasy Mini Kit' (Quiagen, USA). La integridad del RNA fue observada en

geles de agarosa con formaldehído y bromuro de etidio al 1,4%. La reacción de transcripción reversa (RT) se basó en lo descrito en Zuzuarregui y col. (2006). La cuantificación del cDNA se realizó en Infinite® 200 PRO NanoQuant (Tecan Group Ltd., Suiza) bajo las indicaciones del fabricante. El cDNA obtenido fue usado para la reacción de qPCR, la reacción se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ L siguiendo lo descrito por Contreras y col. (2012). Los resultados fueron analizados usando el software LightCycler 4.0 (Roche, Alemania) y la cuantificación de la expresión relativa del gen se realizó usando el modelo matemático de delta delta CT (Livak & Schmittgen, 2001), normalizando con la expresión del gen *ACT1*.

6.8. Transformación bacteriana

6.8.1 Preparación de células electrocompetentes

La cepa *E. coli* DH5 α , fue utilizada para la preparación de células ultracompetentes según la metodología descrita por Inove (1990). Se realizó un preinóculo de esta cepa en 5 mL de medio LB, la cual fue crecida hasta saturación, con agitación durante toda la noche a 37 °C, posteriormente se inoculó un matraz con 300 ml de medio SOB (2% triptona, 0,5% extracto de levadura, 10 mM NaCl y 2,5 mM KCl) en una proporción 1:100. El cultivo fue incubado a 37 °C sin agitación hasta una densidad óptica medida a 600 nm (DO_{600}) de 0,75. Las células fueron recolectadas por centrifugación a 2.500 x *g* (Centrifuga, *Hettich*) durante 10 min. A continuación, se realizaron tres lavados del sedimento, utilizando 50 mL de glicerol al 10% frío y estéril. Entre cada lavado se centrifugó a 2.500 x *g* (Centrifuga, *Hettich*) durante 10 min a 4 °C. Luego el sedimento fue suspendido en 2 mL de glicerol 10%. Las células se almacenaron a -80 °C hasta su utilización.

6.8.2 Transformación por electroporación

La transformación de *E. coli* DH5 α se llevó a cabo según las especificaciones indicadas en el manual de procedimientos del equipo de electroporación (MicroPulser, Biorad). Se mezcló 40 μ L de células ultracompetentes con 5 μ L del DNA deseado. Una vez electroporadas las células potencialmente transformantes fueron recuperadas durante 45 min en 1 mL de medio SOC (medio SOB suplementado con 20 mM de glucosa y 20 mM de MgSO₄) a 37 °C. Transcurrido este tiempo se centrifugó a 2.500 x g (Eppendorf, micro centrifuga 5415 D) durante 5 min, se descartó el sobrenadante y se sembró en placas con medio LB agar suplementado con 100 μ g/mL de ampicilina, para la selección de los clones transformantes portadores de los vectores.

6.9.PCR de colonia desde *E. coli*

El PCR de colonia se realizó picando una colonia aislada en 100 μ L de agua bidestilada, contenida en un tubo de 1,5 mL y se suspendió mediante vortex. Posteriormente el tubo fue incubado por 30 min a 95 °C, con agitación constante en un termomixer (Thermomixer Compac, Eppendorf). Luego, las células fueron centrifugadas a velocidad máxima por 10 min en microcentrífuga, donde el lisado de células obtenido fue utilizado como molde para realizar un PCR confirmativo a partir de 20 μ L de lisado celular como molde. Las condiciones de PCR utilizadas fueron las sugeridas por el fabricante "RBC *Taq* DNA Polymerase" (RBCBioscience, USA). El programa de PCR utilizado fue: 94 °C durante 3 min, 30 ciclos de 94 °C por 45 s, 56 °C por 45 s y 72 °C por 2 min 20 s; finalmente una elongación de 7 min.

6.10.Extracción de DNA plasmidial y purificación de bandas

La extracción y purificación de DNA plasmidial se realizó utilizando el sistema "AxyPrep Plasmid Mini Prep Kit" (AxyGen, USA), de acuerdo a las indicaciones del fabricante. El DNA obtenido fue cuantificado a través de una electroforesis en gel de agarosa al 1% en una cámara electroforética (BioRad, USA) utilizando TAE 1 X como tampón de corrida por 1,5 horas, a 90 V y 140 mA de corriente. Finalmente la visualización y cuantificación se llevó a cabo mediante la tinción con una solución de bromuro de etidio a una concentración de 1 µg/mL, luego el gel se observó en un transiluminador UV (Vilbert Lourmat, Francia) y se compararon las intensidades de bandas obtenidas en contraste con las del patrón.

Las bandas o fragmentos de DNA obtenidas mediante producto de PCR, fueron cortadas desde el gel de garosa y purificadas utilizando el sistema "AxyPrep DNA Gel Extraction Kit" (Axygen, USA). Los fragmentos de DNA purificados fueron cuantificados mediante una electroforesis en gel de agarosa según lo especificado anteriormente.

6.11.Digestión y ligación enzimática

Digestiones enzimáticas simples y dobles se realizaron con las enzimas *SmaI* y *HindIII* (Fermentas, USA) según las indicaciones del fabricante. La incubación de las reacciones fue durante 3 h a 37 °C. Luego de este periodo, se procedió a inactivar las enzimas incubando la reacción a 65 °C durante 1 h.

Un protocolo de digestión parcial se realizó según lo descrito por Campeau (2009). En éste se digirieron completamente 10 µL del plásmido YEpAct4MX purificado (como se indica en el punto anterior) en 20 µL finales de reacción, con la enzima *SmaI*, durante 1 hora a 37 °C. Una vez completada la primera digestión, se añadieron 72 µL

de H₂O, 8 µL de solución tampón de la enzima *Hind*III (“buffer Tango”, Fermentas, USA), para tener un volumen final de 100 µL manteniéndolo en hielo. Tres alícuotas de 20 µL y una de 10 µL se pusieron en tubos de 1,5 mL nuevos, dejando 30 µL en el tubo original. A éste se le adicionó 1 µL de la enzima *Hind*III y se realizaron así, diluciones seriadas de la enzima transfiriendo 10 µL, mezclando entre cada dilución. Luego de esto, se incubaron todos los tubos a 37 °C durante 2 min. Los tubos, finalizada la incubación, se traspasaron a hielo. Los productos de la digestión parcial, se purificaron con el sistema “AxyPrep DNA Gel Extraction Kit” y se visualizaron en geles de agarosa (véase punto anterior).

La ligación enzimática se realizó con la enzima T4 DNA Ligase (Promega, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Las reacciones se realizaron en un volumen final de 50 µL, incubación a 16 °C durante toda la noche, luego 1 hora a 22 °C y finalmente se almacenó el producto a 4 °C hasta su utilización.

6.12.Extracción de DNA plasmidial

La extracción de DNA plasmidial de la cepa *E. coli* DH5α B3023, se realizó utilizando el sistema de extracción “Plasmid DNA extraction kit” (Favorgen, Biotect Corp., USA), según indicaciones del fabricante.

6.13.Extracción de DNA genómico

La extracción de DNA genómico de la cepa EC1118 se realizó utilizando el sistema de extracción “Wizard®, Genomic DNA purificación Kit” (Promega, Madison, USA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se realizó un paso previo de digestión de pared celular. Para ello, se inocularon 5 mL de cultivo YPD, el cual se incubó durante toda la noche a 28 °C. El cultivo obtenido fue centrifugado a 16.000 x g durante

5 min. Luego, el sobrenadante fue eliminado y el precipitado suspendido en 285 μ l de EDTA 50 mM, e inmediatamente se adicionaron 15 μ l de 'Zymoliasa 100T'; 10 mg/ml (Seikagaku Corporation, Tokio, Japan), esta mezcla fue incubada durante 2 h a 37 °C en un termomezclador (Eppendorf, Termomixer Comfort y Compact) con agitación a 50 x g.

La extracción de DNA total en la cepa EC1118-YAP3E se realizó utilizando el protocolo anterior, con algunas modificaciones. Se inoculó un tubo con 5 mL de caldo YPD con el marcador de selección G418 (100 μ g/mL) y se incubó durante 24 h.

6.14. Clonamiento del gen YAP3 bajo el promotor de ACT1 mediante la técnica de recombinación in vitro con mutagénesis SOE (Splicing by Overlap Extension)

El protocolo de SOE y la construcción de los partidores siguió lo indicado por Horton (Horton, 1996; Horton, 1997). En el clonamiento del gen YAP3 se utilizó como receptor el vector YEpAct4MX (Soto, 2010). Para ello se amplificó el promotor del gen ACT1 (pACT1) y el gen YAP3 con los partidores mutagénicos YAP3a y YAP3b; y YAP3c y YAP3d respectivamente (Tabla 2), con 'PfuUltra II Fusion HS DNA Polymerase' (Agilent Technologies, Inc., USA) siguiendo lo indicado por el fabricante en una reacción con un volumen final de 100 μ L. El programa de PCR utilizado fue: 95 °C por 3 min, 30 ciclos de 95 °C por 20 s, 50 °C por 20 s y 72 °C por 2 min, finalmente una etapa de 72 °C por 7 min. La visualización del resultado se realizó en un gel de agarosa al 1%. Posterior a esta reacción inicial, los productos de PCR se purificaron según lo indicado en la sección 6.9. Con los productos purificados se realizó una subsiguiente reacción de PCR (SOE) con estos amplicones como moldes. La reacción fue la siguiente: 31 μ L de H₂O bidestilada, 5 μ L de 10 x "PfuUltra II reaction buffer", 10 μ L de un mix de dNTPs (25 mM de cada dNTP), 1 μ L de cada DNA y 0,5 μ L de "Pfu II

fusion HS DNA polymerase". Esta mezcla se sometió a 2 ciclos de PCR: 94 °C por 3 min inicial, 2 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 3 min. Finalizado el segundo ciclo, se adicionaron 10 µM de los partidores YAP3a y YAP3d, para finalizar 28 ciclos de 94 °C por 30 s, 56 °C por 30 s y 72 °C por 3 min y 72 °C durante 7 min. El producto fue purificado según lo descrito en la sección 6.9.

6.15. Secuenciación plasmidial y herramientas bioinformáticas

Las muestras de plasmidio fueron extraídas de *E. coli* (concentración de 100 ng/µL), estas muestras se enviaron a Macrogen, Korea para su secuenciación con partidores sentido y antisentido; internos y externos a la región clonada (Tabla 2).

Posterior al análisis de los cromatogramas, se realizaron alineamientos de secuencias nucleotídicas para determinar la secuencia consenso clonada en el software 'ContigExpress Vector NTI' versión 11.0 (Invitrogen Corporation, CA, USA). Los análisis de identidad de secuencia (nucleotídica y proteica) se realizaron con el software 'AlignX Vector NTI' versión 11.0 (Invitrogen Corporation, CA, USA). Las secuencias utilizadas se obtuvieron desde los genomas de *S. cerevisiae* 288c (Cherry y col., 2012; Goffeau y col., 1996) y EC1118 (Novo y col., 2009).

6.16. Transformación de levaduras

6.16.1 Preparación de células electrocompetentes de *S. cerevisiae*

La transformación de *S. cerevisiae* EC1118 se realizó mediante la técnica de electroporación y se llevo a cabo según la metodología descrita por Becker & Guarente (1991) con algunas modificaciones. Se inoculó un matraz con 50 ml de caldo YPD con un preinóculo saturado de la cepa en una proporción 1:100. El cultivo fue incubado a 28 °C hasta que la DO₆₀₀ alcanzara entre 1,3 y 1,5. Posteriormente las células fueron

recolectas por centrifugación a $4.479 \times g$ (Centrifuga, *Hettich*) por 5 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, al instante las células fueron lavadas dos veces con agua estéril a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Un último lavado se realizó con 2 ml de sorbitol 1M a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Todas las centrifugaciones entre cada lavado se realizaron a $4.479 \times g$ (Centrifuga, *Hettich*) por 5 min a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez finalizados los lavados, el sedimento obtenido fue suspendido en $50 \mu\text{L}$ de sorbitol 1M a $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$.

6.16.2 Transformación por electroporación

La transformación se llevó a cabo al mezclar $40 \mu\text{L}$ de las células electrocompetentes con $10 \mu\text{L}$ del plásmido YEpAct4MX-YAP3E purificado. Se electroporó según las indicaciones descritas en el manual del equipo de electroporación (MicroPulser, Biorad). Rápidamente, se les añadió a las células 1mL de sorbitol frío, y se incubaron por 2 h a $28 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Transcurrido este tiempo se centrifugó a $2.300 \times g$ (Eppendorf, micro centrifuga 5415 D) durante 5 min para eliminar el sobrenadante y suspender el sedimento en el medio remanente. La suspensión resultante fue sembrada en placas con medio YPD agar, Sorbitol 1M, suplementado con $100 \mu\text{g/mL}$ de G418 para la selección de las levaduras transformantes.

6.17. Identificación de levaduras por análisis de restricción de la región ITS

La metodología de identificación de levaduras por la región espaciadora transcrita interna 5.8S (ITS por sus siglas en inglés), la cual consiste en el análisis de restricción de la región ITS 5,8S y regiones adyacentes ITS1 e ITS2, para la identificación de especies de levadura; se realizó de acuerdo a lo descrito por Esteve-Zaroso y cols. (1999).

Brevemente, células colectadas desde una colonia fresca de levadura se suspendieron en $100 \mu\text{L}$ de reacción de PCR que contenía: $0,5 \mu\text{M}$ de los partidores

ITS1 e ITS4 (véase Tabla 3), 10 μ M de un mix de dNTPs (Fermentas, USA), 1,5 mM $MgCl_2$ y 1x buffer "RBC *Taq* DNA Polymerase" (RBC Bioscience, Taiwan). La suspensión se calentó a 95 °C durante 15 min. Una unidad de "RBC *Taq* DNA Polymerase" se añadió a cada tubo y se siguió el siguiente programa: 95 °C por 5 min, 35 ciclos de 94 °C por 1 min, 55,5 °C por 2 min y 72 °C por 2 min, finalmente una etapa de 72°C por 10 min. Los productos de PCR se digirieron con las endonucleasas *Cfo*I, *Hae*III y *Hin*FI (Fermentas, USA). La visualización de los productos se realizó en geles de agarosa 1,4% en 1x buffer TAE.

7. RESULTADOS

7.1. Fermentación en mosto sintético de la cepa EC1118 de *S. cerevisiae*

Anteriormente en nuestro laboratorio se observaron diferencias en la expresión génica de *YAP3* en cepas de vnicas silvestres de *S. cerevisiae*. Estas cepas (AC114 y AC19) mostraron un aumento en la expresión relativa de *YAP3* en condiciones de fermentación vnica al compararse dos condiciones de nitrógeno asimilable en experimentos con macroarreglos (Contreras y col., 2012). Sin embargo, este comportamiento no ha sido estudiado en cepas industriales comúnmente utilizadas en la vinificación como la cepa EC1118. Es por esto que con el objetivo de relacionar los cambios en la expresión génica de *YAP3* con la disponibilidad de nitrógeno en mosto sintético durante la fermentación vnica de la cepa industrial EC1118, se realizaron evaluaciones fisiológicas, enológicas y la cuantificación relativa de la cantidad de transcrito en condiciones de abundancia de nitrógeno (MS380) y deficiencia de nitrógeno (MS60).

7.1.1 Evaluación fisiológica y enológica durante la fermentación vnica en condiciones de estrés nutricional

Se obtuvo el perfil de fermentación para la cepa industrial EC1118 en dos mostos sintéticos que diferían en su concentración de fuentes nitrogenadas. Los parámetros enológicos cuantificados fueron YAN, azúcar residual, producción de etanol y la pérdida de CO₂. La cinética fermentativa de la cepa industrial EC1118 se observa en la Figura 3 en dos condiciones de cultivo MS380 (círculos negros) y MS60

(triángulos grises) durante 336 horas (14 días). Los tiempos de evaluación de parámetros de interés se indican en la Figura 3.

El YAN disponible en el mosto a lo largo de la fermentación se observa en la Figura 3A, esta es una forma indirecta de inferir el consumo de YAN por la levadura y se aprecia cómo su disponibilidad disminuye a lo largo del tiempo. En el caso de MS60, se ve un consumo estable durante las primeras 48 h, alcanzando valores inferiores al límite de detección hacia el final de la fermentación; mientras que para MS380, se observa un consumo abrupto/pronunciado durante las primeras 24 h para luego alcanzar un estancamiento a las 200 h.

El azúcar residual en MS60 sigue un patrón similar al consumo de YAN, durante las primeras 48 h se observa un consumo estable para luego llegar a una desaceleración, que culmina con un consumo estable hacia el final de las 336 h, dejando unos 117 g/L de azúcares en el mosto (Figura 3B). Por otra parte, el consumo de azúcar en MS380 presenta una aceleración posterior a las 24 h y que significa que el mayor consumo se produce durante las 24 y 100 h, llegando a una desaceleración y estancamiento luego de las 200 h con valores cercanos a 7 g/L.

A su vez, la producción de etanol sigue un patrón inverso al consumo de hexosas, ya que existe una relación directa entre estos parámetros. Para MS60 se observa un enlentecimiento de la producción de etanol, en relación a MS380, alcanzando los 8,9% v/v de etanol. Para MS380 se observa una producción estable luego de las primeras 24 h hasta las 144 h y una desaceleración de la producción posterior a esto, estancándose en un valor alrededor de los 14% v/v de etanol. Las

cinéticas de producción de CO₂ siguieron patrones muy similares a la producción de etanol en ambas condiciones (Figura 3C y D).

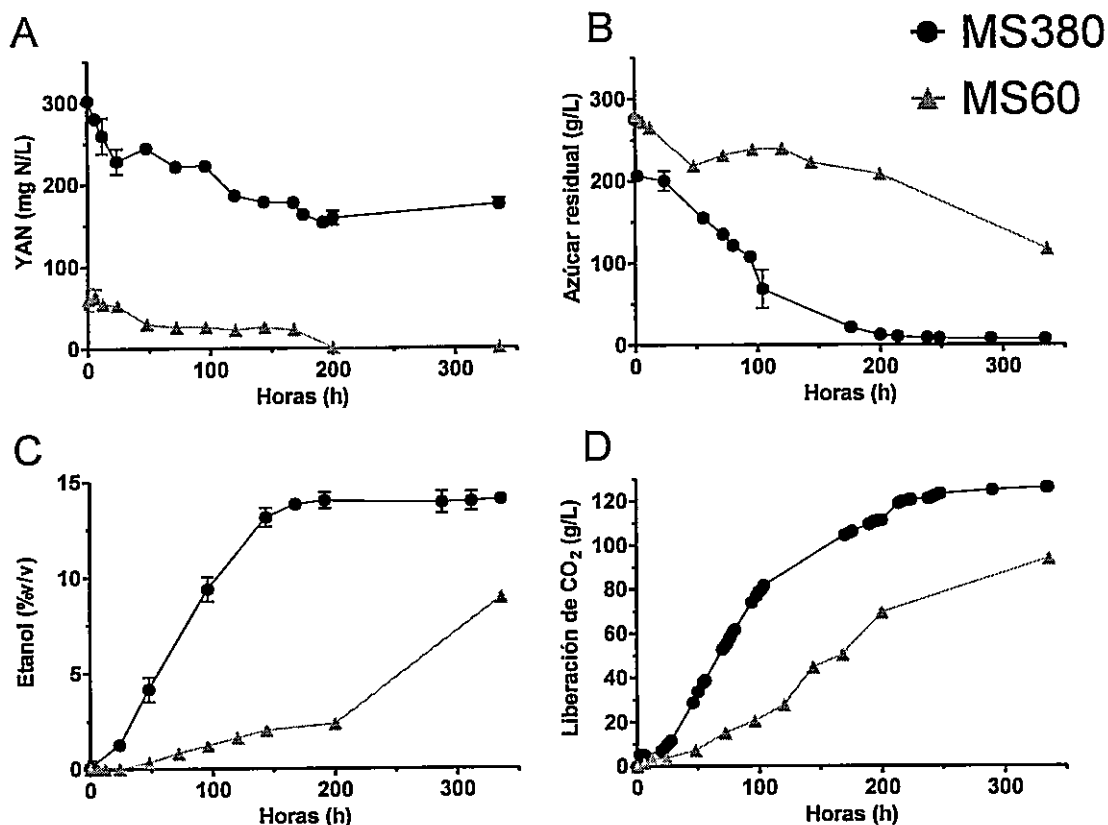


Figura 3: Fenotipos de interés enológico en fermentaciones en MS380 y MS60. Se muestran los resultados para las fermentaciones en MS380 (círculos negros) y MS60 (triángulos grises). (A) Nitrógeno asimilable por la levadura disponible en el mosto (YAN). (B) Azúcares residuales totales, glucosa y fructosa. (C) Producción de etanol. (D) Cinética de la liberación total de CO₂. Los tiempos utilizados para la evaluación de los fenotipos de interés corresponden a: 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 168, 200 y 336 horas. Las barras de error representan las desviaciones estándar entre replicas de fermentaciones independientes (n = 3).

En resumen, la cepa EC1118 en el medio MS60 no logró terminar la fermentación alcohólica y mostró las características de una fermentación lenta o

incompleta. Lo cual se manifestó con niveles bajos de producción de etanol y niveles altos de azúcares residuales (bajo consumo). Por otra parte, en el medio MS380, se logró una fermentación completa, ya que se alcanzaron niveles de etanol deseados (superior a 14% v/v) y el azúcar residual fue bajo.

Una vez obtenidos los perfiles fermentativos de la cepa EC1118 en ambas condiciones, se determinó la expresión relativa de *YAP3*, para establecer si existe regulación de su expresión asociada a la disponibilidad de nitrógeno durante la fermentación vínica.

7.1.2 Niveles de transcritos relativos de *YAP3* durante la fermentación vínica

La expresión relativa del gen *YAP3* en la cepa vínica EC1118 se realizó mediante qPCR, la cual está normalizada en relación a la expresión del gen *ACT1* y expresada en función a la expresión presente a las 6 h (Figura 4). En la condición de MS380, se observa un aumento progresivo de la expresión relativa y un pico a finales de la fase exponencial de la liberación de CO₂, a las 200 h. En la condición de MS60 se observan variaciones en la expresión del gen *YAP3*, pero sólo se observa un pico de expresión a las 200 horas, con una intensidad mucho menor que en el caso de MS380, pero que mantiene un nivel alto hacia el final de la fermentación a diferencia del caso de MS380.

Estos resultados sugieren que los niveles de transcrito del gen *YAP3* son regulados por la disponibilidad de YAN en el medio, ya que su perfil de expresión varía en MS380 y MS60.

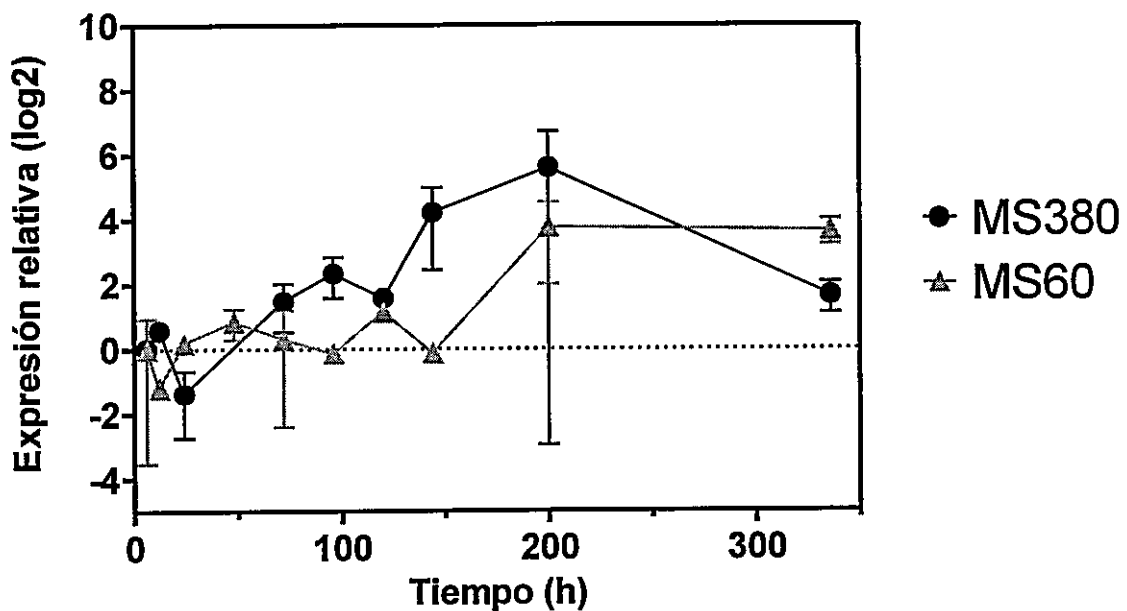


Figura 4: Perfil de expresión de *YAP3* en condiciones de nitrógeno normal y bajo. Se muestran los resultados para las fermentaciones en MS380 (círculos negros) y MS60 (triángulos grises) de la expresión relativa del gen *YAP3* en relación a las 6 horas. Se utilizó como gen normalizador a *ACT1*. Los tiempos en los que la expresión relativa fue evaluada corresponden a: 12, 24, 48, 72, 96, 120, 144, 200 y 336 horas. Las barras de error representan las desviaciones estándar entre replicas técnicas (n = 3).

7.2. Creación de una cepa industrial EC1118 que sobreexpresa el gen *YAP3*

Para generar una cepa de *S. cerevisiae* EC1118 capaz de sobreexpresar el gen *YAP3* bajo el promotor de *ACT1* de manera episomal, fue necesario clonar un producto híbrido (entre el promotor de *ACT1* y el gen *YAP3*) en la construcción plasmidial YEpAct4MX (Figura 5), creado por el trabajo de Soto (2012).

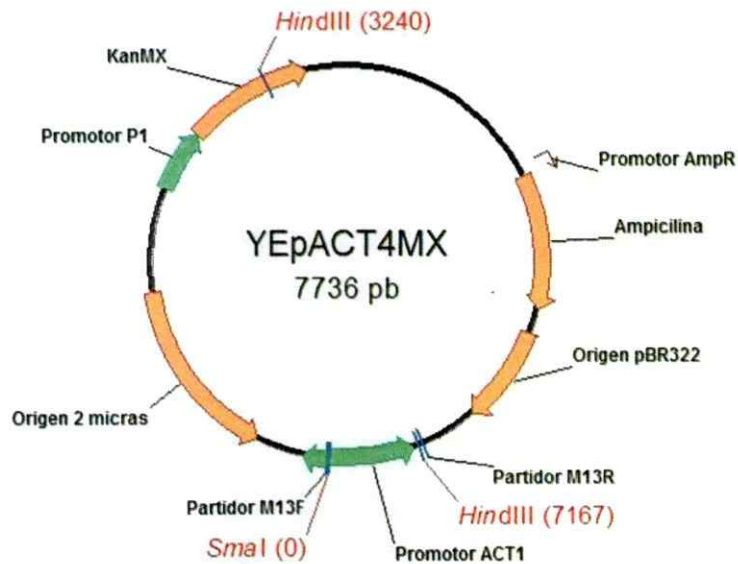


Figura 5: Vector de expresión YEpAct4MX. Los elementos representados en flechas naranjas sólidas corresponden a orígenes de replicación y 'cassettes' de resistencia (ampicilina y kanamicina). Los elementos representados en flechas verde sólidas corresponden a promotores eucariontes. Flechas sobre el vector corresponden a promotores procariontes. Se representan los sitios de unión a partidores de interés (M13F y M13R). En rojo, los sitios de restricción pertinentes (nombre de la enzima), el número que acompaña a cada enzima corresponde al sitio de corte luego de linearizar el plásmido con una digestión completa de la enzima *Sma*I. Los fragmentos que se obtendrían luego de una digestión parcial con la enzima *Hind*III son, de menor a mayor: 569pb, 3240pb, 3927pb, 4496pb, **7167pb** y 7736pb. El fragmento de interés (7167 pb con extremos cohesivos *Sma*I y *Hind*III) fue aislado mediante extracción desde gel de agarosa. Este vector de expresión fue utilizado para clonar el gen *YAP3* y su posterior transformación en *E.coli*. Esquema del vector se generó con el software 'Vector NTI Advance 11.0' (Invitrogen Corporation, USA).

7.2.1 Digestión y purificación del vector YEpAct4MX

Para la obtención de un vector lineal con extremos cohesivos *Sma*I y *Hind*III se realizó la digestión parcial de YEpAct4MX. Ésta fue necesaria dado por a la presencia de 2 sitios de restricción para la enzima *Hind*III (Figura 5). La digestión parcial del

vector se realizó con la enzima *Hind*III, posterior a la linearización del mismo con *Sma*I. Para el protocolo de digestiones parciales (Campeau, 2009) se utilizaron cantidades decrecientes de unidades enzimáticas en un tiempo igual para todas las muestras (Figura 6) y se necesitó de un paso de purificación desde gel de agarosa, para obtener el fragmento de 7,1kb con los extremos cohesivos pertinentes (Figura 8 carril 4).

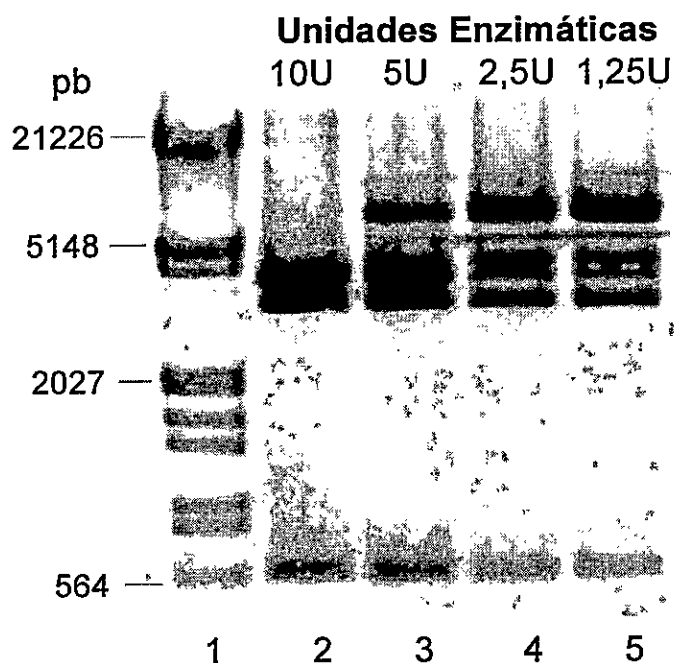


Figura 6: Digestiones parciales del vector YEpAct4MX con la enzima de restricción *Hind*III. Diluciones seriadas de la cantidad de enzima *Hind*III permitió generar distintos mapas de restricción. Carril 1: Estándar de peso molecular Lambda DNA/*Eco*RI+*Hind*III (Fermentas, USA); carril 2-5: Digestión con 10U, 5U, 2,5U y 1,25U de *Hind*III respectivamente. Las digestiones se llevaron a cabo a 37°C durante 4 minutos.

7.2.2 Construcción de un producto híbrido entre *ACT1* y *YAP3*

El producto híbrido se obtuvo mediante la técnica de recombinación *in vitro* con la técnica de mutagénesis SOE (Horton, 1997) la cual permite la recombinación de dos

fragmentos de DNA sin depender de sitios de restricción, y se detalla en Anexo11.3. La amplificación del promotor de *ACT1* (producto de ~500pb) y el gen *YAP3* (producto de ~1000pb) se realizaron desde el vector YEpAct4MX y desde una extracción de DNA de la cepa EC1118, respectivamente (Figura 7, carriles 2 y 3). Posteriormente se realizó una reacción de PCR con los fragmentos purificados para originar el producto híbrido (producto de ~1500 pb) (Figura 8, carril 2 y 3).

Digestiones dobles con las enzimas de restricción *HindIII* y *SmaI* se realizaron para el producto híbrido (Figura 8 carriles 2, 3 y 5). La ligación del producto híbrido y del vector se llevó a cabo durante toda la noche en la proporción 3:1 respectivamente.

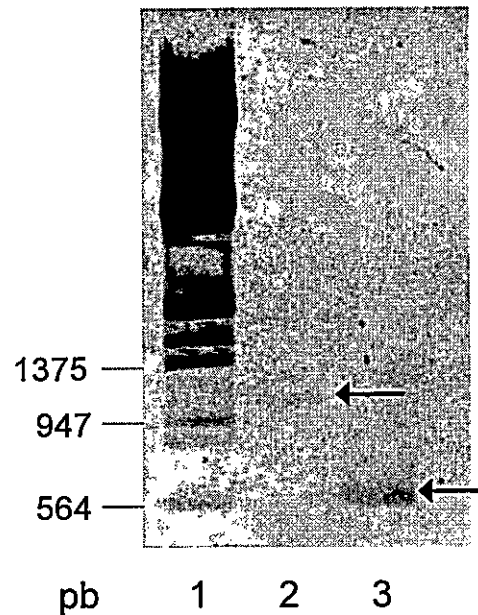


Figura 7: Productos de PCR para la construcción de un producto híbrido. Carril 1: Estándar de peso molecular Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII* Marker (Fermentas, USA); carril 2: *YAP3* (1062 pb); carril 3: *pACT1* (569 pb)

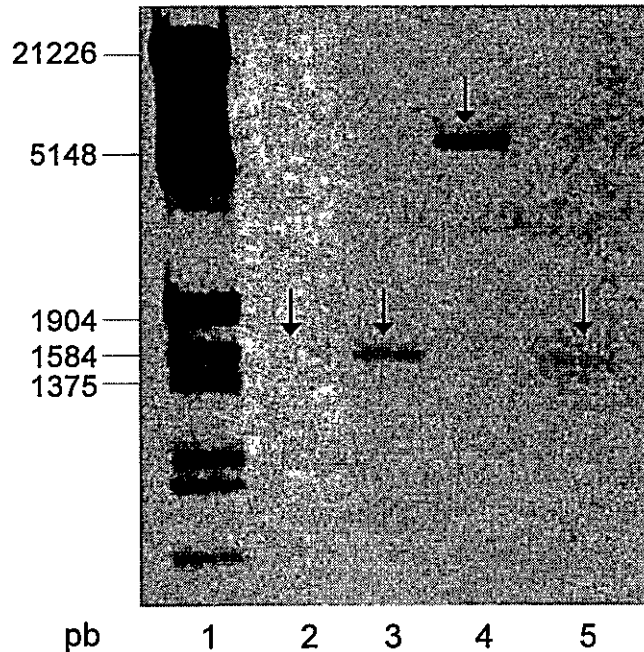


Figura 8: Fragmentos de DNA de interés purificados desde gel de agarosa. Producto de SOE pACT1/YAP3 y YEpAct4MX con extremos cohesivos *SmaI* y *HindIII*. Carril 1: Estándar de peso molecular Lambda DNA/*EcoRI*+*HindIII*; carriles 2-3: Producto híbrido pACT/YAP3, carril 4: Fragmento YEpAct4MX con extremos cohesivos *HindIII/SmaI*; carril 5: Digestión producto híbrido *HindIII+SmaI*. Cada carril fue cargado con 1 μ L del producto purificado.

7.2.3 Transformación y comprobación del vector YEpAct4MX-YAP3E en *E. coli* DH5 α

Células ultracompetentes de *E. coli* DH5 α fueron transformadas con el producto de ligación y crecidas en un medio selectivo, agar LB con ampicilina. Las colonias positivas fueron sometidas a comprobación por PCR de colonia con los partidores M13F y YAP3R (resultados no mostrados). A las colonias positivas se les extrajo DNA plasmidial, con la finalidad de realizar comprobaciones posteriores. Una vez aislado el DNA plasmidial del clon seleccionado, se comprobó la construcción mediante dos

metodologías: PCR y mapas de restricción. La primera metodología utilizó dos parejas de partidores, la primera con dos partidores del vector externos al inserto (M13R y M13F) (Figura 9A carril 2); la segunda pareja, un partidore interno del híbrido pACT1/YAP3 (YAP3R) y uno externo al vector YEpAct4MX (M13F) (Figura 9A carril 3). La segunda, consistió en realizar mapas de restricción con las enzimas *Hind*III y *Sma*I, a partir de los cuales se observaron fragmentos de peso molecular esperados de 1601, 3240 y 3927 pb (Figura 9B).

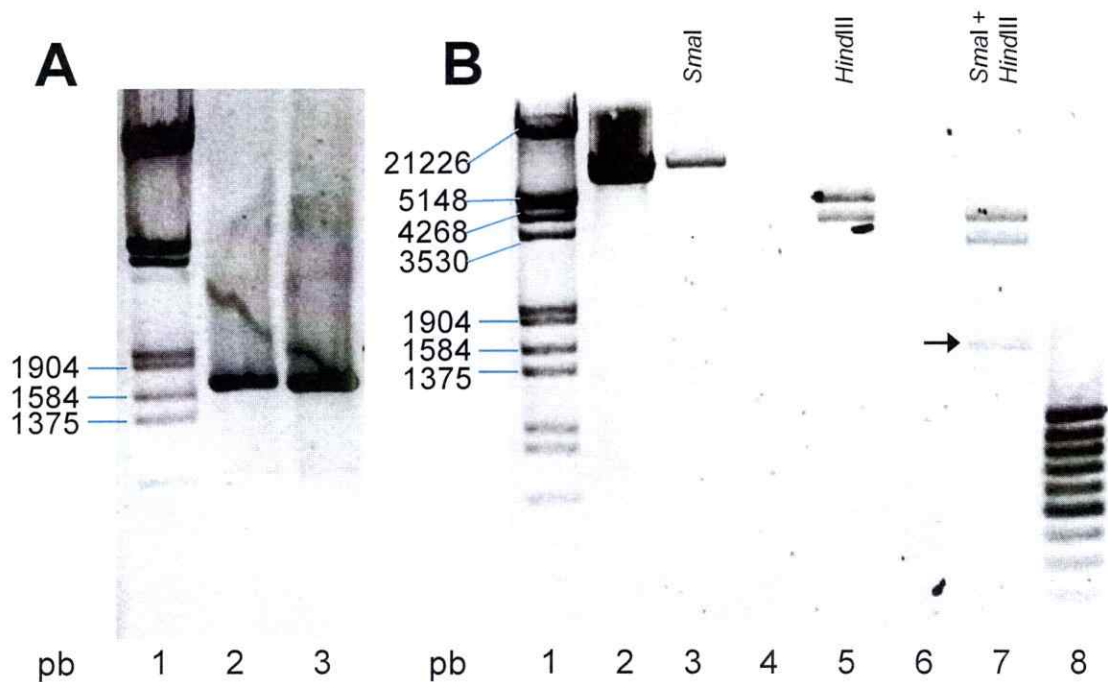


Figura 9: Comprobación del vector YEpAct4MX-YAP3E mediante PCR y digestiones. A: Carril 1: Estándar de peso molecular Lambda DNA/EcoRI+*Hind*III; Productos de PCR con partidores carril 2: M13F y M13R y carril 3: M13F y YAP3R. B: Digestiones de YEpAct4MX-YAP3E. Carril 1: Estándar de peso molecular Lambda DNA/EcoRI+*Hind*III; carril 2 YEpAct4MX-YAP3E sin digerir; carril 3: Digestión de YEpAct4MX-YAP3E con *Sma*I; carril 5: Digestión de YEpAct4MX-YAP3E con *Hind*III; carril 7: Digestión de YEpAct4MX-YAP3E con *Sma*I y *Hind*III; carril 8: Estándar de peso molecular 100pb; carriles 4 y 6: vacíos. Las digestiones se llevaron a cabo a 37°C durante 1 h.

7.2.4 Secuenciaciones y alineamientos de secuencias nucleotídicas y aminoacídicas deducidas

Una vez obtenido el vector YEpAct4MX-YAP3E, se llevó a cabo una secuenciación nucleotídica, para así corroborar la identidad del gen que se insertó en éste. La secuencia obtenida se comparó con las reportadas para la cepa EC1118 y de la cepa modelo S288c. Una delección única en la secuencia nucleotídica de EC1118 genera un codón de término temprano en relación a la cepa modelo S288c, esta delección no se observa en el vector YEpAct4MX-YAP3E aislado (Figura 10). Además, los alineamientos de secuencia aminoacídica deducida mostraron que la secuencia de Yap3p obtenida en este trabajo comparte una identidad de 97,0% con Yap3p de S288c y de 86,7% con la reportada de EC1118. De importancia es notar que la identidad de secuencia de sitios activos en Yap3p se conservan (Figura 10).

Los resultados del análisis de restricción del plásmido (con *Sma*I y *Hind*III), junto con la secuenciación del inserto presente en éste, indican que el vector obtenido en este trabajo contiene los elementos génicos e identidad deseados. Por lo tanto, se procedió a transformar a la levadura EC1118 con el vector YEpAct4MX-YAP3E.

7.2.5 Transformación de la cepa industrial EC1118 con el vector de expresión YEpAct4MX-YAP3E

El vector de expresión YEpAct4MX-YAP3E se utilizó para transformar, mediante electroporación, células electrocompetentes de *S. cerevisiae* EC1118. Posterior a la transformación, las levaduras fueron sembradas en un medio selectivo que contenía G418. Las transformantes positivas fueron sometidas a una segunda comprobación mediante retrotransformación (resultados no mostrados), la cual consiste en aislar el

DNA total de una colonia positiva de *S. cerevisiae* y con éste transformar nuevamente células competentes de *E. coli* y sembrarlas en LB-agar con el marcador de selección (ampicilina).

		1		50
YAP3p	(1)	MTSPSNMDLNTSGFMKFINPQCQEEDCCIRN	SLFQEDSKCIKQQPDLLSEQ	
S288c YAP3p	(1)	MTSPSNMDLNTSGFMKFINPQCQEEDCCIRN	SLFQEDSKCIKQQPDLLSEQ	
EC1118 YAP3p	(1)	MTSPSNMDLNTSGFMKFINPQCQEEDCCIRN	SLFQEDSKCIKQQPDLLSEQ	
		51	* ** *	100
YAP3p	(51)	AAPFPILEDQCPALNLDRSNNDLLLQNI	ISIPKGSDDLQAIQLTPI	SGDYS
S288c YAP3p	(51)	AAPFPILEDQCPALNLDRSNNDLLLQNI	ISIFPKGSDDLQAIQLTPI	SGDYS
EC1118 YAP3p	(51)	AAPFPILEDQCPALNLDRSNNDLLLQNI	ISIPKGSDDLQAIQLTPI	SGDYS
		101		150
YAP3p	(101)	TYVMADNNNDNDSYSNINYS	SKNSGISPSSRIP	PSVAHNENVPDDSKAKK
S288c YAP3p	(101)	TYVMADNNNDNDSYSNTNY	FSKNNGISPSSRIP	PSVAHNENVPDDSKAKK
EC1118 YAP3p	(101)	TYVMADNNNDNDSYSNINYS	SKNSGISPSSRIP	PSVAHNENVPDDSKAKK
		151		200
YAP3p	(151)	KAQNRAAQKAFRERKEARMKELQDKLLE	SERNRQSLLEIEELRKANTEI	
S288c YAP3p	(151)	KAQNRAAQKAFRERKEARMKELQDKLLE	SERNRQSLLEIEELRKANTEI	
EC1118 YAP3p	(151)	KAQNRAAQKAFRERKEARMKELQDKLLE	SERNRQSLLEIEELRKANTEI	
		201		250
YAP3p	(201)	NAENRLLLRSGNENFSKDIEDDTNYKYS	FPTKDEFFTS	SMVLESKLNHHKGG
S288c YAP3p	(201)	NAENRLLLRSGNENFSKDIEDDTNYKYS	FPTKDEFFTS	SMVLESKLNHHKGG
EC1118 YAP3p	(201)	NAENRLLLRSGNENFSKDIEDDTNYKYS	FPTKDEFFTS	SMVLESKLNHHKGG
		251		300
YAP3p	(251)	YSLKDNEIMKRNTQYTDEAGRHVLTVPAT	WEYLYKLSE	ERDFDVTYVMSK
S288c YAP3p	(251)	YSLKDNEIMKRNTQYTDEAGRHVLTVPAT	WEYLYKLSE	ERDFDVTYVMSK
EC1118 YAP3p	(251)	YSLKDNEIMKRNTQYTDEAGRHVLTVPAT	WEYLYKLSE	EGTLM-----
		301		330
YAP3p	(301)	LOGQECCHTHGPAYPRSLIDFLVEEATLNE		
S288c YAP3p	(301)	LOGQECCHTHGPAYPRSLIDFLVEEATLNE		
EC1118 YAP3p	(294)	-----**-----		

Figura 10: Alineamiento de secuencias de Yap3p. Las secuencias mostradas se obtuvieron luego de una traducción *in vitro* con el software AlignX de Vector NTI Advance 11.0 (Invitrogen Corporation, USA). En amarillo se destacan aminoácidos idénticos, en cian se destacan cambios conservados y en rosado, sustituciones similares. En asteriscos, la región rica en cisteínas N-CRD (21, 26, 27, 39) y C-CRD (306-307); en negrita, el dominio bZIP (144-207) y la Región básica (147-168); en cursiva, el cierre de Leucina (172-207). Finalmente, la señal de exportación nuclear (NES) (292-300) en negrita nuevamente (Rodrigues-Pousada y col., 2010).

Además, se realizó un análisis de restricción de la región ITS con dos aislados positivos, denominados MAB1 y MAB9 (Figura 11), el cual consiste en la comparación de un mapa de restricción con una cepa modelo, para así comprobar su identidad. Una vez comprobada la correcta identidad del vector YEpActMX-YAP3E en la cepa EC1118 de *S. cerevisiae* (la cual denominaremos EC1118-YAP3E de ahora en adelante) fue posible dar por finalizado el objetivo específico número 2.

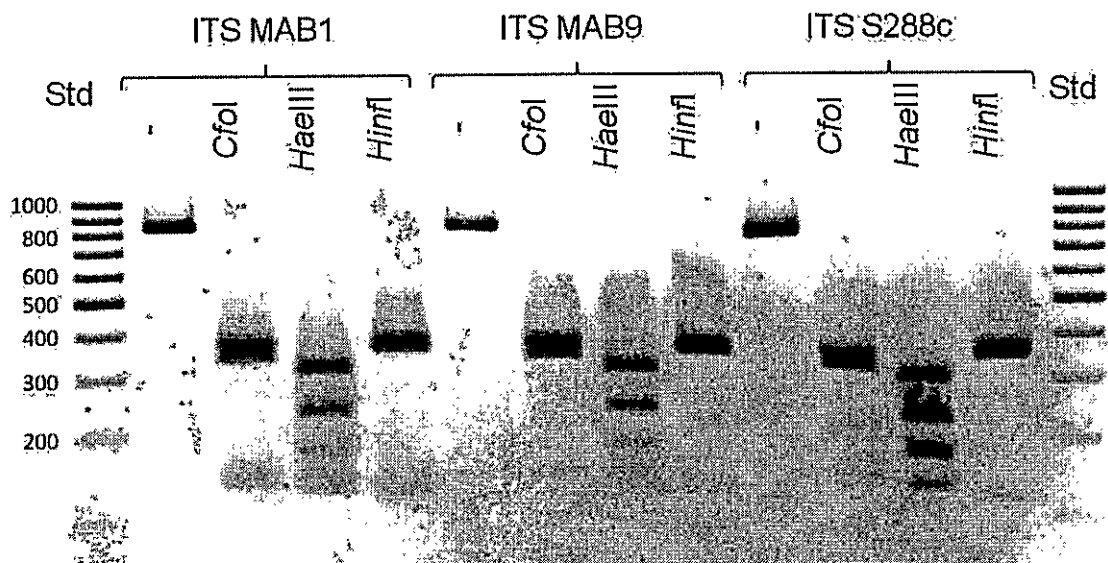


Figura 11: Análisis de restricción de la región ITS para transformantes *S. cerevisiae* EC1118 YEpAct4MX-YAP3E. Sobre los paréntesis se indican los nombres de la cepa *S. cerevisiae*, utilizadas para cada reacción. MAB1 y MAB9 corresponden a los transformantes positivos de la cepa EC1118-YAP3; S288c corresponde a una cepa de laboratorio modelo de *S. cerevisiae*. Carril Std: Estándar de peso molecular 100pb; Carril -: control negativo; Carril *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI*: digestión del amplicon con la enzima de restricción *CfoI*, *HaeIII*, *HinfI* respectivamente.

7.3. Fermentación en mosto sintético de la cepa EC1118-YAP3E de *S. cerevisiae*

Una vez obtenida la cepa EC1118 transformante, y con el objetivo de observar el efecto de la sobreexpresión del gen *YAP3* durante la fermentación vínica, se procedió a realizar una fermentación en mosto sintético MS380 de las cepas EC1118 nativa (control positivo), la cepa EC1118-MX (transformada con el vector vacío) y la cepa EC1118-YAP3E (véase Tabla 1), para así comparar los parámetros enológicos de estas cepas y las diferencias que éstas presentan. De esta manera se obtendría información indirecta sobre el posible rol del gen *YAP3*, en el consumo de fuentes nitrogenadas como también en el fenotipo vínico. Se utilizó un medio rico YAN (MS380) ya que éste nos permitirá observar diferencias en su consumo, a diferencia de un medio bajo en YAN (MS60), el cual no lograría una fermentación completa y probablemente depletaría el medio de YAN.

Para lograr lo anterior se realizaron fermentaciones para cada cepa en volúmenes de 12 mL, de las cuales se registró la cinética de pérdida de CO₂ durante 20 días. Asimismo, se cuantificaron durante la fermentación (6, 24, 144 y 480 h) los parámetros enológicos azúcar residual, aminoácidos y amonio, etanol y ácidos orgánicos, en cuadruplicado y en quintuplicado a las 480 horas, mediante HPLC. Estos parámetros se cuantificaron ya que tienen importancia en el proceso fermentativo y alteran las características organolépticas del producto final. Además, se analizó el consumo de aminoácidos y amonio individualmente en este objetivo, lo que permitió observar con mayor detalle los cambios en el consumo de fuentes nitrogenadas que la sobreexpresión de *YAP3* generó en la cepa industrial.

7.3.1 Evaluación fisiológica y enológica durante la fermentación vínica de la cepa EC1118-YAP3E

Las curvas de pérdida de CO₂ para las tres cepas utilizadas, se comportan de manera similar, éstas comienzan con una fase de latencia breve, hasta aproximadamente 12 h, luego presentan un aumento en la tasa de liberación de CO₂ hasta las 240 h y finalmente una desaceleración (Figura 12A). No se presentaron diferencias estadísticamente significativas entre la cepa control y EC1118-MX. Sin embargo, la cepa EC1118-YAP3E liberó mayor cantidad de CO₂ y presentó diferencias estadísticamente significativas con las cepas EC1118 y EC1118-MX (desde las 288 horas y 312 horas, respectivamente, hasta el final de la fermentación).

La producción de ácidos orgánicos en punto final (480 horas) no presentó diferencias para los ácidos cítrico y málico (bajo el límite de detección), ni succínico. Sin embargo, sí hubo diferencias para los ácidos láctico y acético (Figura 12B) y glicerol. La trehalosa, no presentó diferencias; glucosa y fructosa, fueron consumidos en mayor cantidad por la cepa EC1118-YAP3E en relación a las demás cepas, estas variaciones tuvieron significancia estadística (Figura 12C). Por otra parte, la producción de etanol no presentó diferencias estadísticamente significativas entre las cepas al final de la fermentación, y sus valores fluctuaron entre 12 y 16,7% v/v (Figura 12B).

Por lo tanto, la cepa EC1118-YAP3E mostró una liberación mayor de CO₂ y consumo de azúcares, lo que se traduciría en una fermentación más rápida que el resto de las cepas.

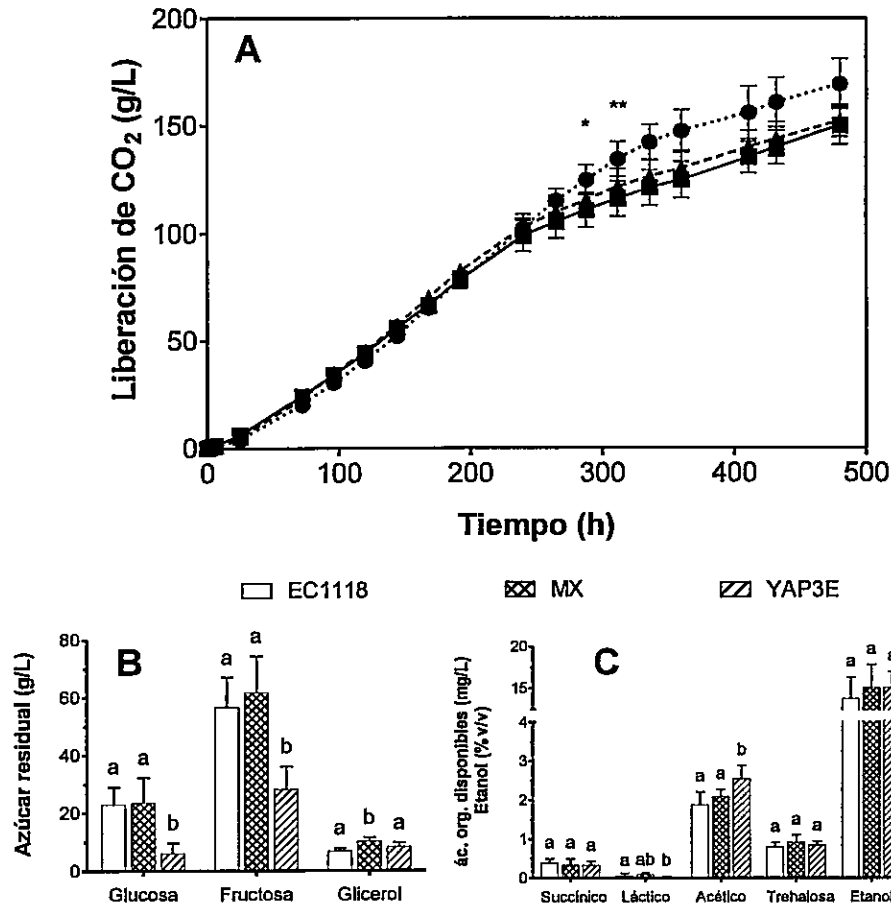


Figura 12: Cinética de pérdida de CO₂ durante la fermentación y fenotipos finales de interés enológico en mosto sintético MS380. A: Liberación de CO₂ acumulada (en g/L) para las fermentaciones en MS380 de las cepas EC1118 (■), EC1118-MX (▲) y EC1118-YAP3E (●). En asteriscos (**) se señala el comienzo de diferencias estadísticamente significativas en la liberación de CO₂ de la cepa EC1118-YAP3E con la cepa EC1118 (288 h) y, (***) con la cepa EC1118-MX (312 h). B: Azúcares residuales (en g/L) presentes luego de 480 horas de fermentación (glucosa, fructosa y glicerol) C: Ácidos orgánicos (ácidos succínico, láctico, acético), trehalosa (en mg/L) y etanol (en % v/v) presentes a las 480 horas para las cepas EC1118, EC1118-MX y EC1118-YAP3E. Las barras de error representan la desviación estándar para replicas de fermentaciones independientes (n = 5). Las diferencias estadísticamente significativas (p<0.05) entre las cepas se calcularon mediante una comparación múltiple de muestras con el test de intervalos de Fisher LSD ('least significant different') cada tratamiento fue aplicado por hora entre las cepas. Grupos homogéneos (sin diferencias significativas) se representan con letras minúsculas (a, b, c).

7.3.2 Evaluación del consumo de fuentes nitrogenadas durante la fermentación vínica

La cinética de consumo de fuentes nitrogenadas fue evaluada en 4 puntos durante la fermentación (6, 24, 140 y 360 h de fermentación). Prolina, presentó problemas de detección con la metodología utilizada y no es parte de los análisis presentados a continuación. De las 18 fuentes nitrogenadas analizadas y luego de determinar los perfiles de consumo para cada cepa y compararlos entre ellos, fue posible observar una preferencia por ciertas fuentes nitrogenadas de manera secuencial, como también un consumo bajo o nulo e incluso, la liberación de algunas de éstas al mosto sintético (Anexos 11.4).

Los aminoácidos y el amonio fueron agrupados según su cinética de consumo, utilizando el criterio de cuando se consumió más del 50% durante la fermentación y si fueron consumidos o liberados hacia el final de la fermentación. Bajo este criterio y utilizando la cepa EC1118-YAP3E como estándar, se generaron 4 grupos, temprano, medio, tardío y errático. Lisina, aspartato y glutamato fueron consumidos temprano, esto significó que a las 24 h sus niveles en el medio ya habían sido depletados en un 50%. Amonio, metionina, fenilalanina, tirosina, leucina, histidina e isoleucina fueron consumidos en un tiempo medio, consumidos en un 50% a las 144 h. Glutamina, tirosina, valina, treonina y serina fueron consumidos de manera tardía, lo que significó que a las 360 h habían sido consumidos en alguna medida. Finalmente, arginina, glicina, cisteína y alanina presentaron un incremento en relación a la concentración inicial luego de las 360 h (en la Figura 13 se muestra un representante de cada grupo).

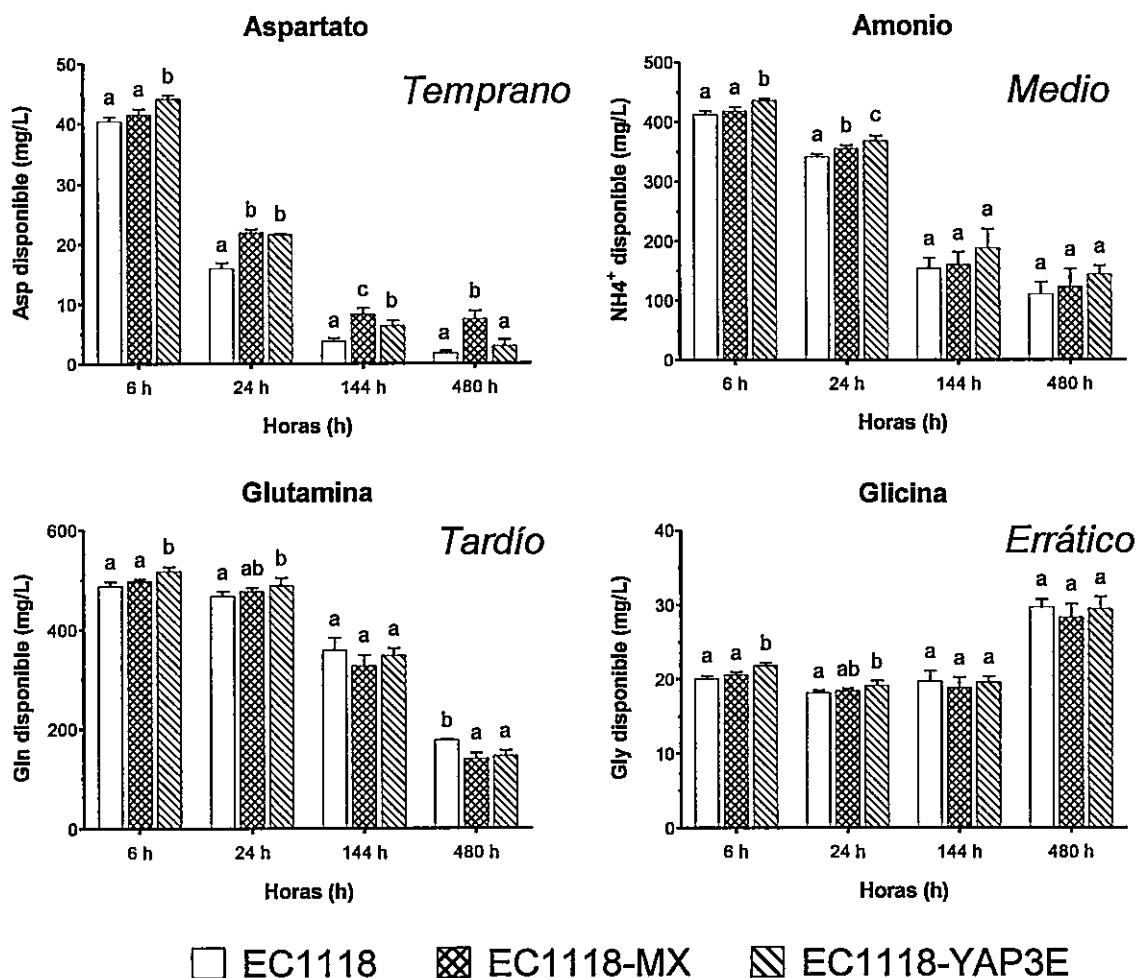


Figura 13: Cinética de consumo de aminoácidos y amonio durante la fermentación en MS380. Concentraciones residuales de ácido aspártico, amonio, glutamina y glicina. Cada fuente nitrogenada representa a uno de los grupos descritos de acuerdo a su cinética de consumo (temprano, medio, tardío y errático). Las diferencias significativas entre las cepas EC1118, EC1118-MX y EC1118-YAP3E, para cada tiempo indicado (6, 24, 144 y 480 h). Las barras de error representan la desviación estándar para replicas de fermentaciones independientes (n = 5). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las cepas se calcularon mediante una comparación múltiple de muestras con el test de intervalos de Fisher LSD ('least significant different'), cada tratamiento fue aplicado por hora entre las cepas. Grupos homogéneos (sin diferencias significativas) se representan con letras minúsculas (a, b, c).

Si bien existieron diferencias significativas entre la disponibilidad de aminoácidos y amonio entre las cepas de interés a lo largo de la fermentación, no existió un cambio importante reconocible en el consumo de ninguno de éstos. No obstante, existen tres comportamientos destacables al comparar todas las fuentes nitrogenadas consumidas. El primero corresponde a una consistente mayor disponibilidad de fuentes nitrogenadas (16 de las 19) para la cepa EC1118-YAP3E en las primeras 6 horas de fermentación, que se traduce en un menor consumo de éstas (Esto se ve ilustrado en la Figura suplementaria 6). El segundo, a las diferencias significativas en las cantidades disponibles de fuentes nitrogenadas a las 480 h de fermentación, ya que esto impacta las características organolépticas de un producto final en la fermentación vínica. Los aminoácidos que presentaron dichas diferencias corresponden a glutamato, triptófano y lisina (menos consumidos por EC1118-YAP3E con respecto a EC1118) e histidina, glutamina, treonina, alanina, tirosina, valina, cisteína, isoleucina y fenilalanina (más consumidos por EC1118-YAP3E). Finalmente, el perfil de consumo de la cepa EC1118-MX, luego de las 144 h, muestra la tendencia a tener niveles de fuentes nitrogenadas disponibles con mayor similitud a la cepa EC1118-YAP3E en relación a la cepa nativa EC1118 (Anexo 11.4).

8. DISCUSIÓN

Yap3p es un factor de transcripción perteneciente a la familia YAP de activadores de dedos de zinc, esta familia ha sido asociada a la respuesta de estrés general en cepas de laboratorio. Sin embargo, la función de Yap3p no ha sido asociada a ningún tipo de estrés en estudios en cepas de laboratorio ni vínicas y su función es desconocida (Fernandes y col., 1997; Rodrigues-Pousada y col., 2010).

8.1. YAP3 en condiciones de estrés nutricional

Observaciones en estudios transcriptómicos, reportan que el gen *YAP3* responde a la escasez de fuentes nitrogenadas durante el proceso de fermentación vínica, aumentando su expresión relativa en cepas vínicas nativas. A su vez, en experimentos de microarreglos de dos canales y al comparar cepas con distintos requerimientos nutricionales, relacionados a la fuente nitrogenada preferida, se observaron variaciones en los niveles de expresión de *YAP3* (Contreras y col., 2012). En otro estudio, en el cual midieron el patrón de expresión global frente a transiciones ambientales en cepas de laboratorio de *S. cerevisiae* se reportó que ante la disminución drástica del nitrógeno después de un cambio del medio de cultivo, el gen *YAP3* muestra una sobreexpresión durante las primeras cuatro horas (Gasch & Werner-Washburne, 2002). La escasa información existente sobre a cuáles estímulos los niveles de expresión de *YAP3* están sujetos, no han permitido inferir ni estudiar su función biológica anteriormente. Sin embargo, los cambios en la expresión de *YAP3* observados frente al estrés nutricional relacionado a la disponibilidad de fuentes nitrogenadas en el medio (amonio y aminoácidos) se presenta como una forma

atractiva para el estudio de su rol en el proceso fermentativo. Este seminario de título se enfocó en el rol de Yap3p en el consumo de fuentes nitrogenadas en condiciones de estrés nutricional durante la fermentación vínica, en particular en la cepa industrial *S. cerevisiae* EC1118. El uso de esta cepa es interesante, ya que es una de las cepas industriales más frecuentemente utilizadas como iniciador de la fermentación a nivel mundial y ha sido extensamente utilizada como una cepa vínica modelo (Rossignol y col., 2003).

Para observar el comportamiento del gen *YAP3* en la cepa EC1118, se realizaron fermentaciones en mosto sintético, en condiciones de suficiencia y escasez de nitrógeno asimilable. Las fermentaciones muestran el progreso del consumo y producción de metabolitos de interés enológico, los cuales reflejan un resultado esperado en ambas condiciones. La escases de fuentes nitrogenadas, como lo refleja la fermentación en MS60, ha sido ampliamente reportada como una de las principales causas de fermentaciones lentas o incompletas en la industria (Bateyron & Sablayrolles, 2001). Correlaciones entre la cantidad de CO₂ liberado y la cantidad inicial de YAN; y la cantidad de glucosa consumida y etanol producido han sido reportadas con anterioridad (Bely y col., 1990a). Donde a mayor cantidad de CO₂ liberado, se espera una mayor cantidad inicial de YAN; y a mayor cantidad de azúcares consumidos, mayor producción de etanol, como se observa en este trabajo.

Se observa que el gen *YAP3* tiene un perfil de expresión que depende de la fase en la curva de producción de CO₂ y de la concentración de nitrógeno asimilable, un comportamiento que indica la existencia de regulación de la expresión de este gen frente a la disponibilidad de nitrógeno en la cepa EC1118 y se comportaría de manera diferente en las condiciones utilizadas, ya que el agotamiento de nitrógeno, la

adaptación al proceso fermentativo y el estrés nutricional en ambas condiciones no es el mismo. Cambios a nivel global de expresión de un 70% del transcriptoma de *S. cerevisiae*, en condiciones de microvinificación, en diferentes concentraciones de nitrógeno inicial han sido descritos por Mendes-Ferreira y col. (2007). Sin embargo, la regulación y sobreexpresión de *YAP3*, no han sido reportados con anterioridad en esta cepa ni en condiciones similares. Esto se puede deber, por ejemplo a que si bien la cantidad de estudios transcriptómicos en cepas de interés enológico va en aumento (Rossouw & Bauer, 2009), dicha información puede ser pasada por alto como un falso negativo o, simplemente, dejada de lado al presentar una cantidad enorme de información a la vez. No obstante, los estudios realizados con tecnologías de este tipo ('omics') son de gran importancia en el entendimiento e investigación de organismos y dan una mirada exhaustiva de la fisiología de las levaduras.

En relación a la construcción del vector de sobreexpresión, el promotor de actina (*ACT1*) utilizado como promotor constitutivo en esta fermentación vínica, ha sido estudiado con anterioridad y comparado con otros promotores utilizados normalmente en levaduras de laboratorio. En dicho estudio se describió cómo las condiciones de microvinificación alteran la expresión de estos genes, expresándose solo en los primeros días en cepas de levadura vínica; por otro lado, *ACT1* se presentó como un buen promotor candidato de expresión constitutiva (Puig y col., 1996).

Con respecto a la utilización de KanMX como marcador de selección, Karim y col. (2013) caracterizaron los efectos en la tasa de crecimiento de una batería de plásmidos, variando su tamaño, su promotor, su marcador de selección y su origen de replicación en *S. cerevisiae*. Sus resultados indican que el factor que mayor impacto tiene en la tasa de crecimiento es el marcador de selección, a pesar de esto, también

informan que KanMX es el marcador que presenta la menor variación. Esto es importante a la hora de diseñar plásmidos que impacten en bajos niveles la habilidad de la cepa en producir resultados esperados, como lo es en las aplicaciones industriales y, en nuestro caso, la fermentación vínica.

La secuencia nucleotídica de *YAP3* en el genoma de la cepa EC1118 reportada por Novo y col. (2009) presenta un '*gap*' en el nucleótido 863, este cambio de marco de lectura produce un codón de término anticipado en el producto final de Yap3p, generando una proteína trunca que no posee la señal de exportación del núcleo (NES) predicha por Rodrigues-Pousada y col. (2010). Esta mutación podría afectar la localización y por consiguiente la funcionalidad o actividad de la proteína Yap3p en la cepa industrial EC1118. No obstante, es importante notar que la validez de un dominio NES necesita ser corroborada experimentalmente, ya que no solo basta una predicción desde la secuencia consenso (la Cour y col., 2004).

Ahora bien, durante la construcción del vector de sobreexpresión YEpAct4MX-YAP3E y para nuestra sorpresa, se encontraron diferencias con la secuencia reportada de *YAP3* de la cepa EC1118. El alelo secuenciado por nuestro laboratorio no presenta el antes mencionado '*gap*' e incluso reporta una identidad de secuencia mayor con la cepa de laboratorio S288c (Figura 11). Este resultado podría sugerir la presencia de un locus heterocigoto en la cepa EC1118, lo cual es interesante desde el punto de vista funcional de la proteína Yap3p, ya que uno de los productos génicos de estos alelos podría presentar mayor actividad en relación al otro. Esto se podría corroborar con experimentos de localización celular, utilizando marcadores de fusión como la proteína fluorescente verde y nuevas secuenciaciones del gen.

8.2. YAP3 como posible activador en rutas de regulación de nitrógeno

Para determinar con más detalle el rol que podría tener el factor transcripcional Yap3p en el consumo de fuentes nitrogenadas durante la fermentación vínica, se midió de forma independiente el consumo de cada aminoácido y amonio (no como YAN). De esta manera se podría evaluar si YAP3 afecta de forma directa el consumo y, por consiguiente, altera la activación de una ruta o gen responsable en el consumo de fuentes nitrogenadas durante la fermentación.

Los parámetros enológicos obtenidos de las cepas de *S. cerevisiae* EC1118, EC1118-MX y EC1118-YAP3E al final de la fermentación, presentan una variación importante en el consumo de hexosas (glucosa y fructosa) siendo la cepa con mayor consumo, EC1118-YAP3. Este resultado no se ve reflejado en una mayor producción de etanol (Figura 13) ni biomasa (resultados no mostrados) pero se le podría atribuir al aumento en la liberación de CO₂. Los demás ácidos orgánicos no presentan diferencias significativas importantes en su concentración, manteniendo las características enológicas deseadas en la cepa.

Al considerar las cinéticas de consumo y utilizar como parámetro de comparación una depleción del 50% de la fuente nitrogenada, fue posible establecer cuáles fuentes son preferidas en relación al resto (Figura 13). Las permeasas encargadas del consumo temprano de aminoácidos (aspartato, glutamato, metionina, fenilalanina, tirosina, leucina, histidina, glutamina, treonina y serina) son reguladas por el sistema SPS y se expresan al comienzo de la fermentación según lo descrito por Crépin y col. (2012). Sin embargo, observamos que algunos de estos aminoácidos fueron consumidos de manera tardía en todas las cepas, este fenómeno se le puede atribuir a la alta cantidad de YAN disponible en el medio, el cual no fue consumido en

su totalidad. La sobreexpresión de Yap3p no tuvo un impacto aparente en la preferencia global de fuentes nitrogenadas. Alanina, arginina y glicina han sido reportadas con anterioridad como las últimas fuentes asimiladas y como fuentes asimiladas solo después de la depleción de los demás compuestos nitrogenados. Esto se explica por la represión de la proteína de transporte Gap1p por mecanismo de NCR, que se ha observado reprime la expresión de Gap1p durante las primeras etapas de la fermentación vínica (Beltran y col., 2004; Crépin y col., 2012). Lo anterior justificaría el porqué estas fuentes no fueron consumidas durante la fermentación en un mosto sintético rico en nitrógeno. La cisteína también es reportada usualmente como uno de los aminoácidos sintetizados en fermentaciones vínicas terminadas y se ha sugerido que este mecanismo podría ser el resultado de la reoxidación de NAD(P)H para mantener un balance redox normal en las etapas tardías del ciclo celular (Valero y col., 2003). Cabe destacar que los resultados se obtuvieron solo en 4 puntos durante la fermentación. Sería interesante ahondar en la cinética de consumo de fuentes nitrogenadas analizando una mayor cantidad de tiempos a lo largo de la fermentación, como también, realizar fermentaciones con distintas cantidades de YAN y observar la participación de *YAP3* en estas condiciones.

La tendencia observada en 16 de los 19 aminoácidos y en amonio durante las primeras 6 h; y en 10 de 19 a las 24 h, de un menor consumo en la cepa EC1118-YAP3E podría ser explicada debido a la presencia de un plásmido en la cepa y la carga génica que éste puede conferirle a la cepa. Sin embargo, dicha explicación se puede descartar al comparar la cepa EC1118-MX y EC1118-YAP3E, donde la tendencia se mantiene. Este resultado sugiere entonces una posible interacción de Yap3p con alguno de los mecanismos de regulación del metabolismo del nitrógeno, como por

ejemplo del sistema SPS, alterando su capacidad de censar o transportar las fuentes de nitrógeno disponibles en el medio. Interesantemente, la tasa de liberación de CO₂ durante las primeras horas no se vio afectado por este fenómeno (no muestra una menor liberación). Futuras exploraciones con la cepa EC1118-YAP3E podrían centrarse en las primeras horas de la fermentación vínica para lograr un mayor entendimiento de los genes que este activador transcripcional regula.

Al observar individualmente cada fuente nitrogenada, es importante destacar que los resultados obtenidos no corroboran lo observado por Contreras y col. (2012), los cuales indican una posible regulación del consumo de nitrógeno por parte de Yap3p. La cepa EC1118-YAP3E no presentó diferencias de consumo en los estadios finales de la fermentación en relación a la cepa nativa. Esto se podría explicar dado la diferencia en los modelos experimentales de ambos trabajos. Las variaciones observadas en el trabajo de Contreras y col. (2012) son respuestas globales en cepas nativas vínicas en diferentes condiciones, mientras que los resultados observados para EC1118-YAP3E son solo en una condición. Las diferencias observadas en los puntos finales de aminoácidos, es variada y altamente compleja, atribuir estos resultados a una ruta específica de regulación de fuentes nitrogenadas es una tarea que requeriría una mayor cantidad de estudios funcionales en variadas condiciones.

Finalmente, el desarrollo de herramientas bioinformáticas permite la predicción y un mejor diseño experimental a la hora de investigar genes con funcionalidad desconocida. Por ejemplo, utilizando la base de datos disponible BioGRID, un repositorio general de set de datos para interacciones génicas (Stark y col., 2006), se infieren ciertas vías en las cuales Yap3p podría participar como activador transcripcional. Ésta muestra que Yap3p está asociado con proteínas encargadas de la

fosforilación de otros blancos. El estudio de estos genes blancos en una mutante nula de *YAP3*, durante una fermentación vínica y en condiciones con distinto nitrógeno disponible, sería de gran interés para observar las posibles rutas que este gen afecta y ver si su capacidad fermentativa se ve afectada.

9. CONCLUSIONES



La expresión del gen *YAP3* se ve modulada por las condiciones de estrés nutricional de fuentes nitrogenadas en la cepa EC1118 y el modelo de fermentación vínica se presenta como una alternativa interesante al realizar estudios de estrés nutricional.

La secuencia nucleotídica del gen *YAP3* en la cepa EC1118 difiere de manera importante a la reportada en la literatura, la cual posee un cambio en el marco de lectura que genera una proteína trunca de 293 residuos en comparación a la obtenida de 330 residuos.

La sobreexpresión del gen *YAP3* altera el consumo de fuentes nitrogenadas al menos durante las primeras 24 horas de la fermentación vínica en relación a una cepa nativa.

10. BIBLIOGRAFÍA

- Aerny, J. (1996). Composés azotés des moûts et des vins. *Revue Suisse de Viticulture Arboriculture Horticulture* **28**, 161-165.
- Aranda, A., Matallana, E., y del Olmo, M. (2011). *Saccharomyces* Yeasts I: Primary Fermentation. In "Molecular Wine Microbiology" (A. Carrascosa, R. Muñoz y R. Gonzalez, eds.), pp. 1-31. Academic Press, London, UK.
- Becker, D. M., y Guarente, L. (1991). High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in Enzymology* **194**, 182-187.
- Beltran, G., Novo, M., Rozes, N., Mas, A., y Guillamon, J. M. (2004). Nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentations. *FEMS Yeast Research* **4**, 625-32.
- Bely, M., Sablayrolles, J.-M., y Barre, P. (1990a). Automatic detection of assimilable nitrogen deficiencies during alcoholic fermentation in oenological conditions. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **70**, 246-252.
- Bely, M., Sablayrolles, J., y Barre, P. (1990b). Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance. *American Journal of Enology and Viticulture* **41**, 319.
- Bisson, L. F. (1999). Stuck and sluggish fermentations. *American Society for Enology and Viticulture* **50**, 107-119.
- Bisson, L. F. (2005). The Biotechnology of Wine Yeast. *Food Biotechnology* **18**, 63-96.

- Blateyron, L., y Sablayrolles, J. M. (2001). Stuck and slow fermentations in enology: statistical study of causes and effectiveness of combined additions of oxygen and diammonium phosphate. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **91**, 184-189.
- Campeau, E. (2009). Eric Campeau: Manuals and Protocols [en línea]. <http://www.ericcampeau.com/images/Partial%20digestion%20protocol%20V1_0.pdf> [Consulta: Nov, 2012].
- Cebollero, E., Gonzalez-Ramos, D., Tabera, L., y Gonzalez, R. (2007). Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? *Biotechnology Letters* **29**, 191-200.
- Contreras, A., García, V., Salinas, F., Urzúa, U., Ganga, M., y Martínez, C. (2012). Identification of genes related to nitrogen uptake in wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* **28**, 1107-1113.
- Crépin, L., Nidelet, T., Sanchez, I., Dequin, S., y Camarasa, C. (2012). Sequential use of nitrogen compounds by *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation: a model based on kinetic and regulation characteristics of nitrogen permeases. *Applied and Environmental Microbiology* **78**, 8102-8111.
- Cherry, J. M., Hong, E. L., Amundsen, C., Balakrishnan, R., Binkley, G., Chan, E. T., Christie, K. R., Costanzo, M. C., Dwight, S. S., Engel, S. R., Fisk, D. G., Hirschman, J. E., Hitz, B. C., Karra, K., Krieger, C. J., Miyasato, S. R., Nash, R. S., Park, J., Skrzypek, M. S., Simison, M., Weng, S., y Wong, E. D. (2012). *Saccharomyces* Genome Database: the genomics resource of budding yeast. *Nucleic Acids Research* **40**, 5.
- Deed, N., van Vuuren, H., y Gardner, R. (2011). Effects of nitrogen catabolite repression and di-ammonium phosphate addition during wine fermentation by a

- commercial strain of *S. cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **89**, 1537-1549.
- Degre, R. (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 421-447.
- DeRisi, J. L., Iyer, V. R., y Brown, P. O. (1997). Exploring the Metabolic and Genetic Control of Gene Expression on a Genomic Scale. *Science* **278**, 680-686.
- Esteve-Zarzoso, B., Belloch, C., Uruburu, F., y Querol, A. (1999). Identification of yeasts by RFLP analysis of the 5.8S rRNA gene and the two ribosomal internal transcribed spacers. *International Journal of Systematic Bacteriology* **49**, 329-37.
- Fernandes, L., Rodrigues-Pousada, C., y Struhl, K. (1997). Yap, a novel family of eight bZIP proteins in *Saccharomyces cerevisiae* with distinct biological functions. *Molecular and Cellular Biology* **17**, 6982-7075.
- Filipe-Ribeiro, L., y Mendes-Faia, A. (2007). Validation and comparison of analytical methods used to evaluate the nitrogen status of grape juice. *Food Chemistry* **100**.
- Gasch, A., y Werner-Washburne, M. (2002). The genomics of yeast responses to environmental stress and starvation. *Functional & Integrative Genomics* **2**, 181-192.
- Goffeau, A., Barrell, B. G., Bussey, H., Davis, R. W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J. D., Jacq, C., y Johnston, M. (1996). Life with 6000 genes. *Science* **274**, 546-567.
- Gomez-Alonso, S., Hermosin-Gutierrez, I., y Garcia-Romero, E. (2007). Simultaneous HPLC analysis of biogenic amines, amino acids, and ammonium ion as aminoenone derivatives in wine and beer samples. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**, 608-13.

- Henschke, P., y Jiranek, V. (1993). Yeasts-metabolism of nitrogen compounds. *Wine Microbiology and Biotechnology*, 77-164.
- Horton, R. M. (1996). In vitro recombination and mutagenesis of DNA. SOEing together tailor-made genes. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **67**, 141-149.
- Horton, R. M. (1997). In vitro recombination and mutagenesis of DNA. *Methods in Molecular Biology: PCR Cloning Protocols* **67**, 141-149.
- Karim, A. S., Curran, K. A., y Alper, H. S. (2013). Characterization of plasmid burden and copy number in *Saccharomyces cerevisiae* for optimization of metabolic engineering applications. *FEMS Yeast Research* **13**, 107-116.
- la Cour, T., Kiemer, L., Mølgaard, A., Gupta, R., Skriver, K., y Brunak, S. (2004). Analysis and prediction of leucine-rich nuclear export signals. *Protein Engineering Design and Selection* **17**, 527-536.
- Livak, K. J., y Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods* **25**, 402-8.
- Magasanik, B. (1992). Regulation of Nitrogen Utilization. In "Volume II: The Molecular and Cellular Biology of the Yeast *Saccharomyces*: Gene Expression", Vol. 2, pp. 283-317. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- Magasanik, B., y Kaiser, C. (2002). Nitrogen regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene* **290**, 1-18.
- Mendes-Ferreira, A., del Olmo, M., Garcia-Martinez, J., Jimenez-Marti, E., Mendes-Faia, A., Perez-Ortin, J. E., y Leao, C. (2007). Transcriptional Response of *Saccharomyces cerevisiae* to Different Nitrogen Concentrations during Alcoholic Fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **73**, 3049-3060.

- Mendes-Ferreira, A., Mendes-Faia, A., y Leão, C. (2004). Growth and fermentation patterns of *Saccharomyces cerevisiae* under different ammonium concentrations and its implications in winemaking industry. *Journal of Applied Microbiology* **97**, 540-545.
- Mortimer, R. K. (2000). Evolution and Variation of the Yeast (*Saccharomyces*) Genome. *Genome Research* **10**, 403-409.
- Nissen, T., Schulze, U., Nielsen, J., y Villadsen, J. (1997). Flux distributions in anaerobic, glucose-limited continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology (Reading, England)* **143 (Pt 1)**, 203-221.
- Novo, M., Bigey, F., Beyne, E., Galeote, V., Gavory, F., Mallet, S., Cambon, B., Legras, J. L., Wincker, P., Casaregola, S., y Dequin, S. (2009). Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **106**, 16333-8.
- Pérez-Ortín, J. E., y García-Martínez, J. (2011). Genomic and Proteomic Analysis of Wine Yeasts. In "Molecular Wine Microbiology", pp. 143-168. Academic Press, San Diego.
- 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., y Bauer, F. F. (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends in Biotechnology* **20**, 426-432.
- Puig, S., Querol, A., Ramón, D., y Pérez-Ortín, J. E. (1996). Evaluation of the use of phase-specific gene promoters for the expression of enological enzymes in an industrial wine yeast strain. *Biotechnology Letters* **18**, 887-892.

- Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donèche, B., y Lonvaud, A. (2006). "Handbook of Enology, Vol. 1. The microbiology of wine and vinifications," 2nd/Ed. John Wiley & Sons, Chichester, UK.
- Rodrigues-Pousada, C., Menezes, R. A., y Pimentel, C. (2010). The Yap family and its role in stress response. *Yeast* **27**, 245-258.
- Rossignol, T., Dulau, L., Julien, A., y Blondin, B. (2003). Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation. *Yeast* **20**, 1369-1385.
- Rossouw, D., y Bauer, F. (2009). Wine Science in the Omics Era: The Impact of Systems Biology on the Future of Wine Research. *South African Journal of Enology and Viticulture* **30**, 101.
- Salmon, J. (1989). Effect of Sugar Transport Inactivation in *Saccharomyces cerevisiae* on Sluggish and Stuck Enological Fermentations. *Applied and Environmental Microbiology* **55**, 953-958.
- Soto, D. (2012). Obtención de cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae* eficientes en el consumo de aminoácidos como fuente de nitrógeno (Grado de Magíster en Tecnología de Alimentos), Facultad de Ingeniería. Universidad de Santiago de Chile.
- Stark, C., Breitkreutz, B.-J., Reguly, T., Boucher, L., Breitkreutz, A., y Tyers, M. (2006). BioGRID: a general repository for interaction datasets. *Nucleic Acids Research* **34**, 9.
- Taylor, R., Walker, D., y McInnes, R. (1993). *E. coli* host strains significantly affect the quality of small scale plasmid DNA preparations used for sequencing. *Nucleic Acids Research* **21**, 1677-1678.

- Valero, E., Millán, C., y Ortega, J. M. (2003). Concentration of amino acids in wine after the end of fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* strains. *Journal of the Science of Food and Agriculture*.
- Zaman, S., Lippman, S., Zhao, X., y Broach, J. (2008). How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annual Review of Genetics* **42**, 27-81.
- Zuzuarregui, A., Monteoliva, L., Gil, C., y del Olmo, M. (2006). Transcriptomic and proteomic approach for understanding the molecular basis of adaptation of *Saccharomyces cerevisiae* to wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **72**, 836-47.

11. ANEXOS

11.1. Mosto sintético MS380.

Para la elaboración del mosto sintético descrito por Rossignol y cols (2003), se prepararon 5 soluciones independientes las cuales se detallan a continuación. La esterilización de cada una de ellas se realiza de manera separada y se indica al final de cada tabla en cursiva. Una vez todas mezcladas, el pH del mosto sintético es ajustado a 3,3 para simular jugo de uva natural.

Tabla suplementaria 1: Concentraciones de azúcares para MS380

Azúcares	g/L
Glucosa	125
Fructosa	125
<i>Autoclave</i>	

Tabla suplementaria 2: Concentraciones de sales para MS380

Sales	mg/L
KH_2PO_4	750
K_2SO_4	500
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	155
NaCl	200
$\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	4
ZnSO_4	4
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	1
KI	1
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0,4
H_3BO_3	1
$\text{NaMoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	1
<i>Autoclave</i>	

Tabla suplementaria 3: Concentraciones de vitaminas para MS380

Vitaminas	mg/L
Mio-inositol	20
Acido nicotínico	2
Panteonato de calcio	1,5
Tiamina HCl	0,25
Piridoxina HCl	0,25
Biotina	0,003
<i>Filtración</i>	

Tabla suplementaria 4: Concentración de aminoácidos para MS380

Aminoácidos	mg/L
NH ₄ Cl	460
L-Acido Glutámico	120,4
L-Acido aspartico	44,5
L-Histidina	50
L-Lisina	24
L-Arginina	503,5
L-Glutamina	505,3
L-Serina	78,5
L-Cisteína	13,1
L-Glicina	18,3
L-Metionina	31,4
L-Alanina	145,3
L-Treonina	759,2
L-Leucina	48,4
L-Valina	44,5
L-Fenilalanina	37,9
L-Isoleucina	32,7
L-Tirosina	18,3
L-Prolina	612,6
L-Triptófano	179,3
<i>Filtración</i>	

Tabla suplementaria 5: Concentración de factores de anaerobiosis para MS380

Factores de anaerobiosis	mg/L
Oleato de Sodio	5
Ergosterol	15
<i>Sonicado</i>	

11.2. Titulación por formol (método de Sørensen)

El principio del método Sørensen, se basa en el bloqueo de la función amina por la adición de un exceso de formol. El derivado formado contiene el carboxilo de los aminoácidos, pero no posee el grupo básico (NH_2), por lo tanto, se produce un descenso en el pH el cual se puede titular con hidróxido de sodio. Además, bloquea al NH_4^+ , y por ende la medida obtenida es la suma de nitrógeno aminado y amoniacal.

Para su medición, las muestras de mosto sintético fermentado se diluyeron en un factor conocido con agua destilada, luego ajustadas a pH 8,0 con una solución de NaOH. Una vez alcanzado este valor de pH se adicionaron 800 μL de formaldehído, el cual fue ajustado a pH 8,0 previamente. Finalmente la solución obtenida se tituló con hidróxido de sodio, previamente titulada a una concentración normal conocida ([NaOH]). Se utilizó un medidor de pH modelo HI-9321, Hanna Instruments, USA. La concentración de nitrógeno asimilable se calculó con la siguiente ecuación (Filipe-Ribeiro & Mendes-Faia, 2007).

$$Y_{AN} \left(\frac{\text{mg N}}{\text{L}} \right) = \frac{[(\text{vol. NaOH}) \times (\text{conc. NaOH}) \times 14 \times 1000 \times \text{Factor de dilución}]}{\text{Volumen titulado de muestra}}$$

11.3. Esquematización de la técnica de SOEing molecular

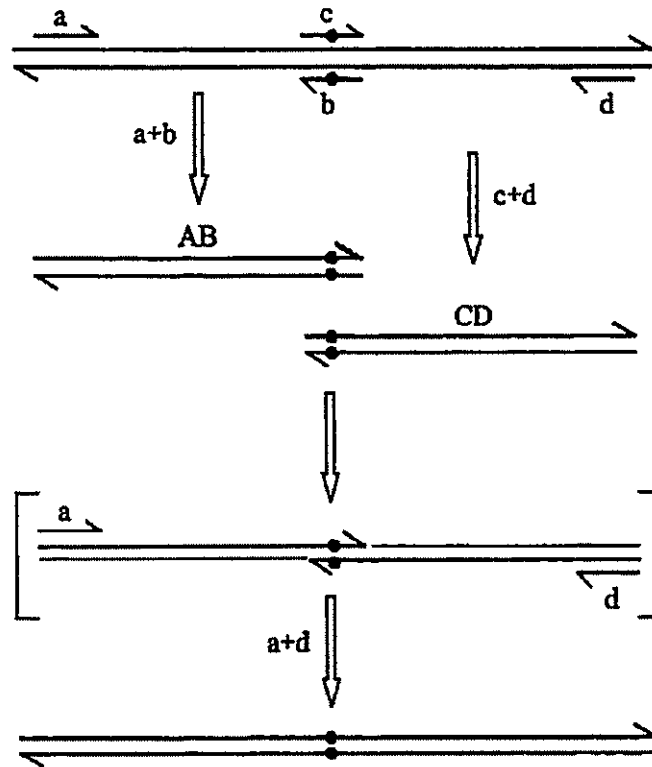


Figura suplementaria 1: Producto mutante AD. Mutagénesis sitio dirigida por SOE. Hebras de DNA y primers sintéticos se representan en líneas, con flechas indicando la orientación 5'-3'. La mutación se representa con un círculo sólido. Los primers se etiquetan con letras en minúsculas. Los productos de PCR se nombran con pares de letras en mayúscula que corresponden a los primers usados para generarlos. La especie intermedia, encerradas entre corchetes, se forma por la hibridación en la región de solapamiento. El solapamiento se extiende desde el extremo 3' de cada hebra por una polimerasa para generar un producto híbrido que puede ser amplificado por los primers *a* y *d*. Modificado de Horton (1996).

11.4. Consumo de fuentes nitrogenadas agrupadas por consumo temprano, medio, tardío y errático durante la fermentación alcohólica.

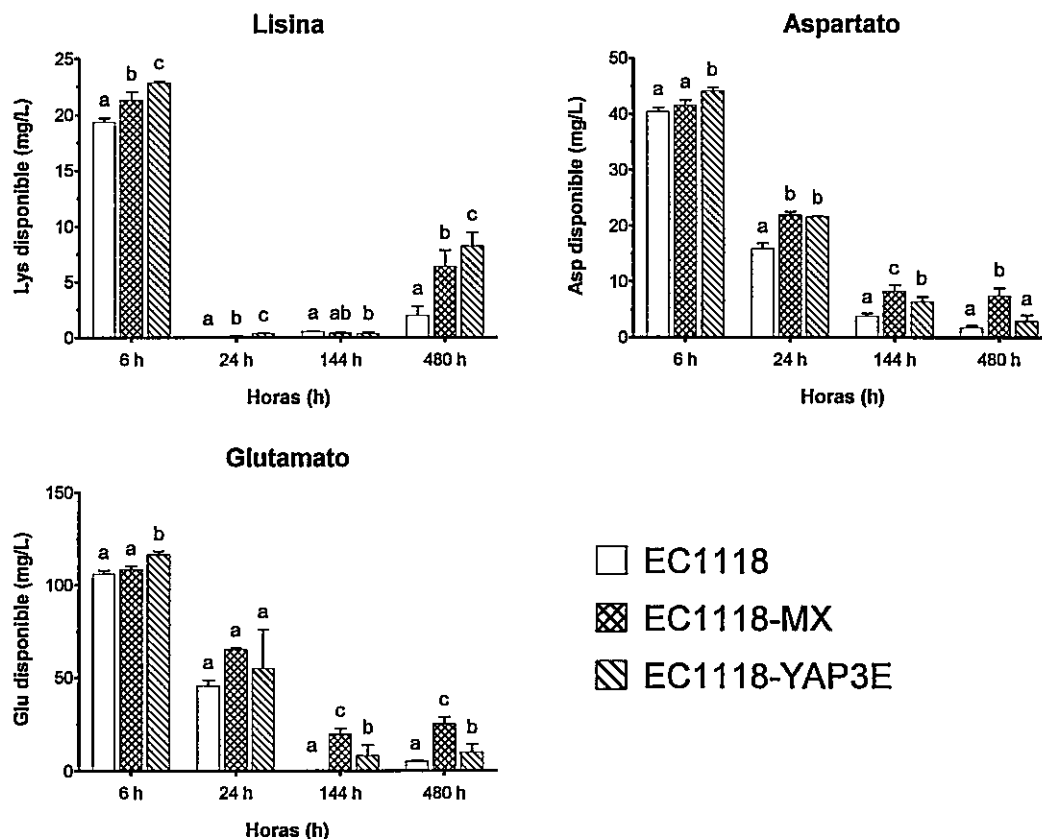


Figura suplementaria 2: Cinética de consumo de aminoácidos de manera temprana durante la fermentación en MS380. Las diferencias significativas entre las cepas EC1118, EC1118-MX y EC1118-YAP3E, para cada tiempo indicado (6, 24, 144 y 480 h), se muestran como grupos homogéneos representados con letras minúsculas (a, b, c) para las cantidades de aminoácido disponible en el medio (fuente nitrogenada indicada en los títulos). Las barras de error representan la desviación estándar para réplicas de fermentaciones independientes (n = 5). Las diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$) entre las cepas se calcularon mediante una comparación múltiple de muestras con el test de intervalos de Fisher LSD (*'least significant different'*), cada tratamiento fue aplicado por hora entre las cepas. Grupos homogéneos (sin diferencias significativas) se representan con letras minúsculas (a, b, c).

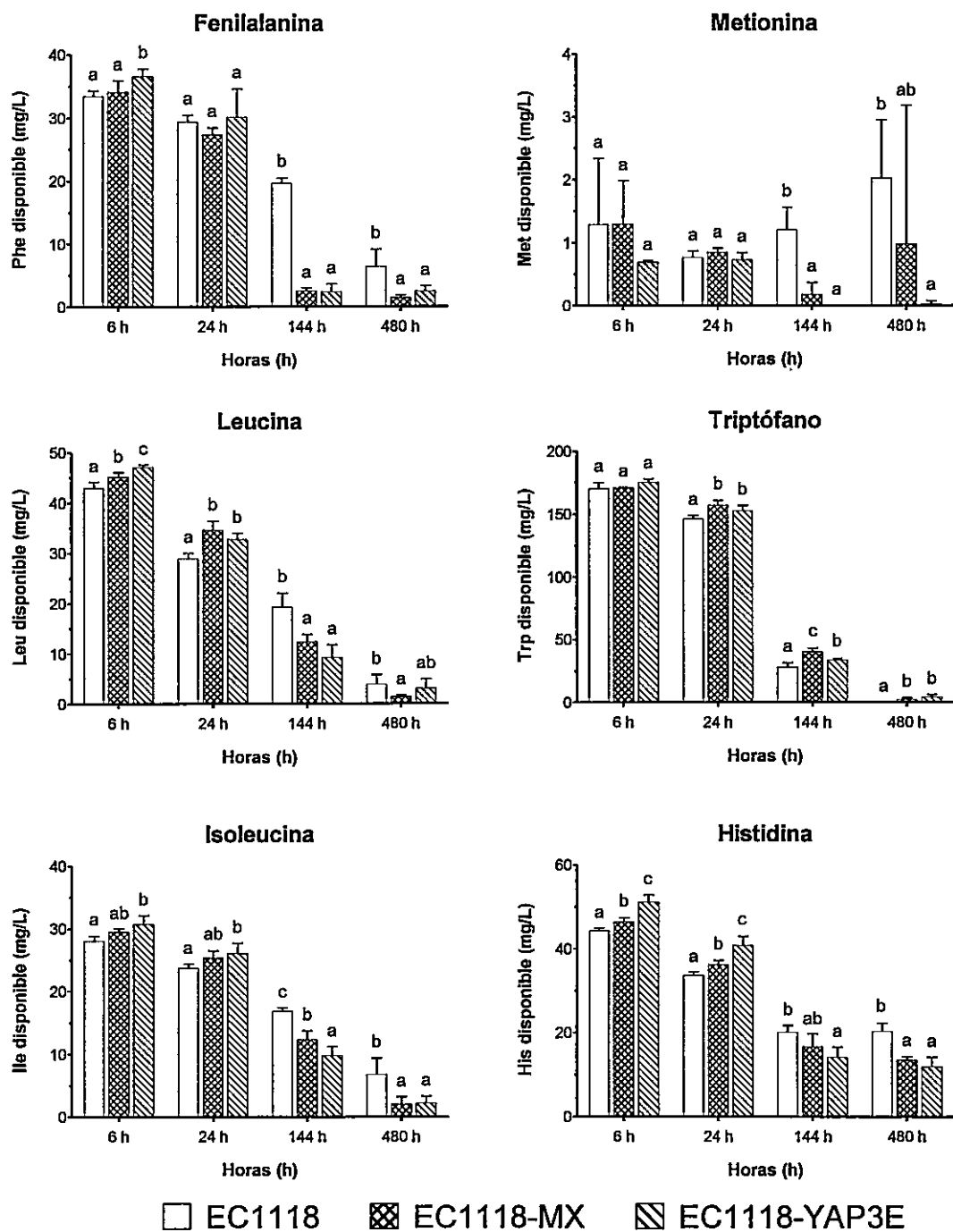


Figura suplementaria 3: Cinética de consumo de aminoácidos en el grupo medio durante la fermentación en MS380. Las diferencias significativas entre las cepas EC1118, EC1118-MX y EC1118-YAP3E, para cada tiempo indicado (6, 24, 144 y 480 horas) recibieron el mismo tratamiento que la figura suplementaria 2.

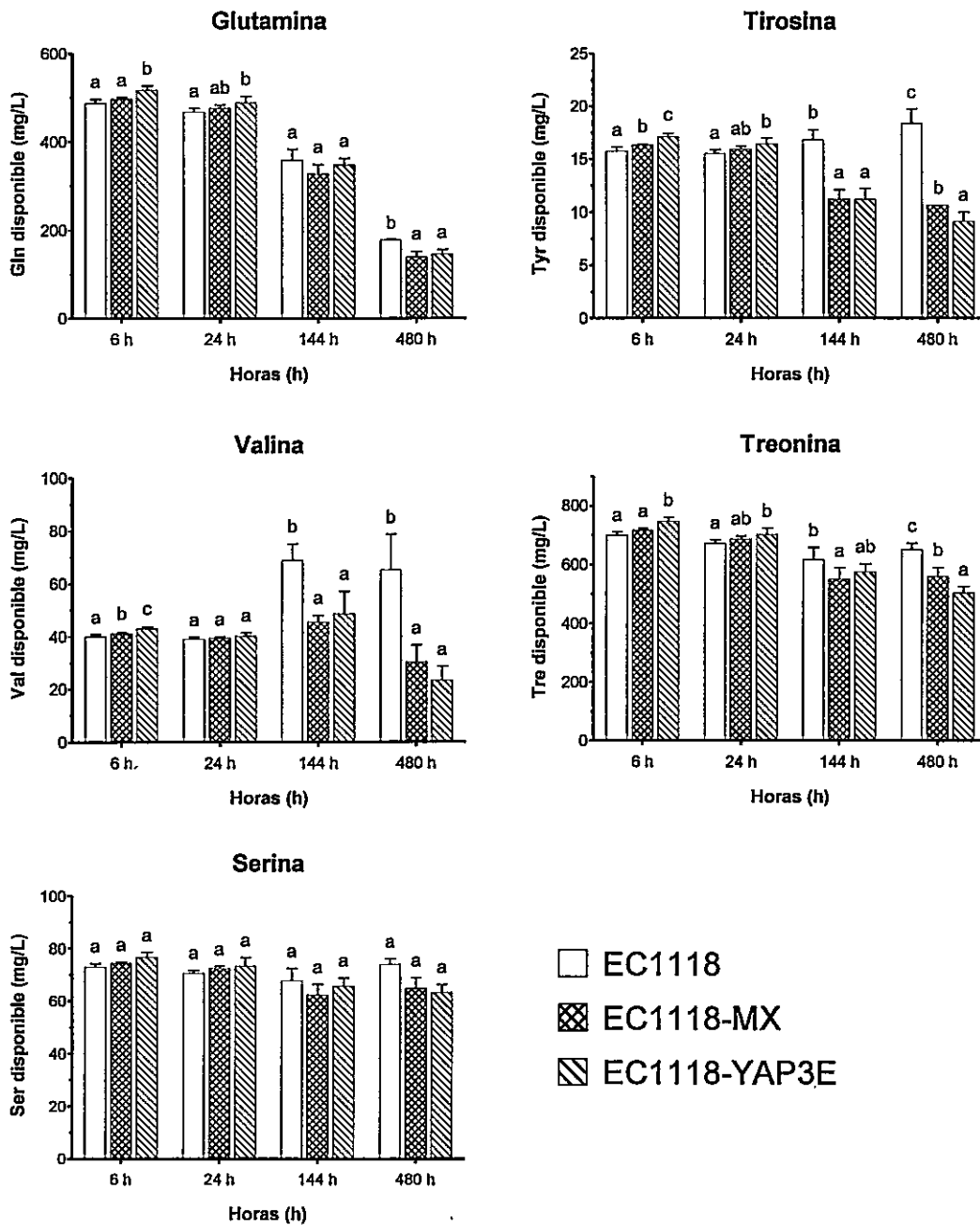


Figura suplementaria 4: Cinética de consumo de aminoácidos de manera tardía durante la fermentación en MS380. Las diferencias significativas entre las cepas EC1118, EC1118-MX y EC1118-YAP3E, para cada tiempo indicado (6, 24, 144 y 480 horas) recibieron el mismo tratamiento que la figura suplementaria 2.

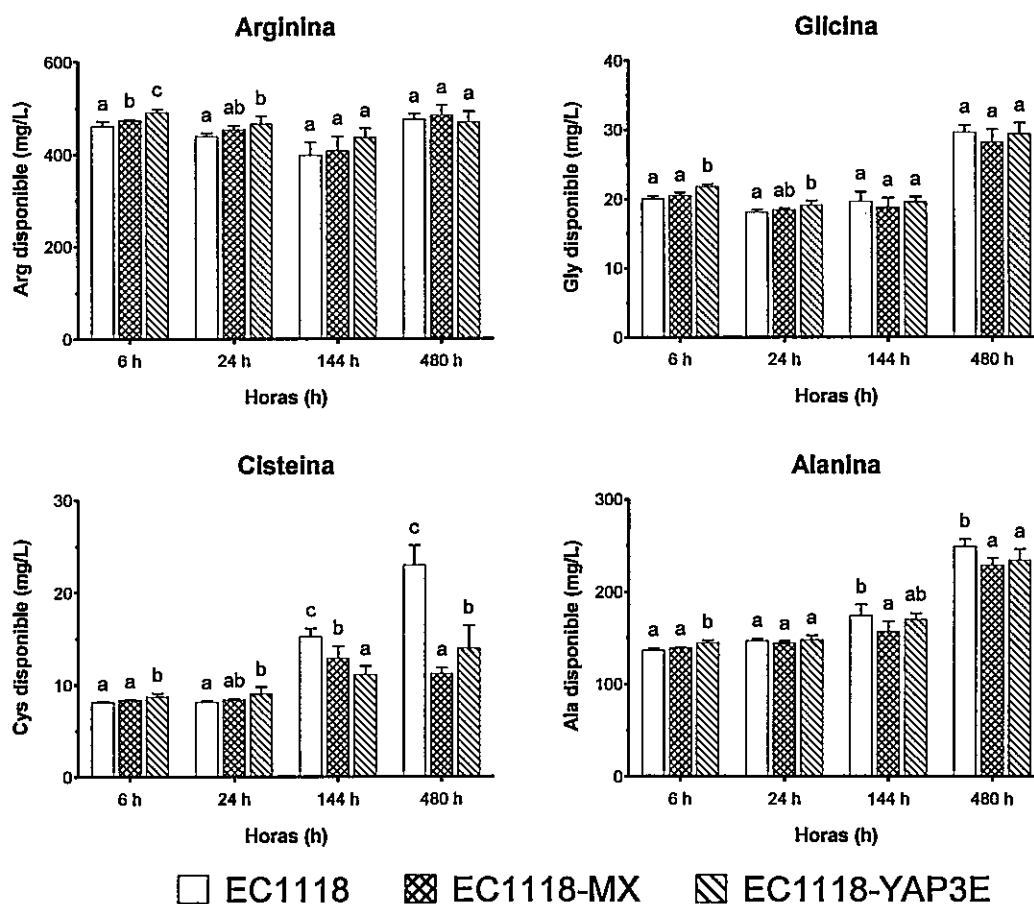


Figura suplementaria 5: Cinética de consumo de aminoácidos de manera errática durante la fermentación en MS380. Las diferencias significativas entre las cepas EC1118, EC1118-MX y EC1118-YAP3E, para cada tiempo indicado (6, 24, 144 y 480 horas) recibieron el mismo tratamiento que la figura suplementaria 2.

11.5. Cinética de consumo del YAN total

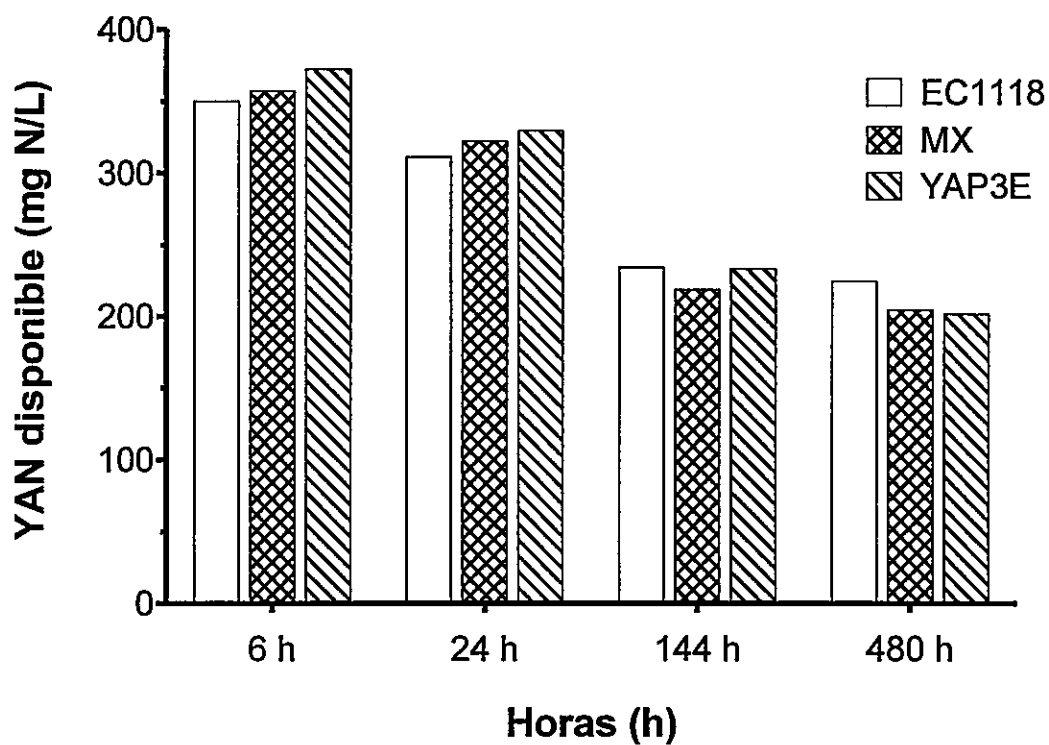


Figura suplementaria 6: Cinética de consumo del YAN total durante la fermentación en MS380. Figura ilustrativa que se construyó sumando el aporte promedio de nitrógeno de cada fuente cuantificada (aminoácidos y amonio) en los tiempos determinados a lo largo de la fermentación (6, 24, 144 y 480 horas).