



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

**Mejora genética de levaduras implicadas en la
elaboración de vinos tipo *Fino***

Jesús Fierro Risco

Tesis Doctoral

2011

DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
UNIVERSIDAD DE SEVILLA

Mejora genética de levaduras implicadas en la elaboración de vinos tipo *Fino*

Trabajo presentado para optar al grado de Doctor en Biología por el licenciado

Jesús Fierro Risco

Sevilla, junio de 2011

Directora:

Dra. Tahía Benítez Fernández

Catedrática de Genética

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

Co-Director

Dr. Antonio Carballo Codón

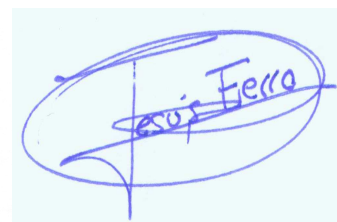
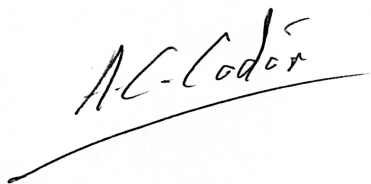
Profesor Titular de Genética

Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla

Directora

co-Director

Doctorando



Dra. Tahía Benítez Fernández

Dr. Antonio Carballo Codón

Jesús Fierro Risco

A Mónica, Carmen y Manolo, mi familia.

A Inma

Las grandes ideas son aquellas de las que lo único que nos sorprende es que no se nos
hayan ocurrido antes.

Noel Clarasól (1905-1985)

Agradecimientos

Quizás por mi forma de entender la vida, mi escala de prioridades y mi incapacidad de separar mi vida social de la laboral, el número de personas a las cuales debería de dedicarles un par de frases en estos agradecimientos sería demasiado elevado. Aunque sus nombres no aparezcan en las siguientes líneas todos ellos están en mis recuerdos y ahí permanecerán para siempre.

Quisiera agradecer a la Dra. Tahía Benítez Fernández la oportunidad que me ofreció para formar parte de su grupo de investigación, la confianza que depositó en mí y que durante todos estos años a mantenido, por su disposición a atenderme, aconsejarme y comentar cualquier aspecto de este trabajo aún cuando ya no era su obligación.

También quisiera agradecer al Dr. Antonio Carballo Codón que estuviera de acuerdo en co-dirigir este trabajo y aceptarme como miembro del grupo, por tener los objetivos de este trabajo siempre tan claros y por recordármelos cuando hizo falta, por su enorme contribución a la elaboración de esta memoria.

A la Dra. María del Rosario Espuny Gómez, porque si no me hubiese dado la oportunidad de contar nódulos de *Sinorhizobium fredii* en las raíces de la soja durante mi último año de carrera posiblemente no estaría escribiendo ahora estas palabras. A Carlitos por hacerle caso a Charo y aceptarme como alumno interno.

A mis amigos y compañeros del 113, a los Tahíos. A la Dra. Ana María Rincón Romero, porque ha pesar de encontrarse en plena escritura de tesis en el momento de mi incorporación nunca recibí de ella nada que no fuera ayuda, porque siempre que la he necesitado ha estado ahí. Al Dr. Miguel Ángel Moreno Mateos alias “Tito More”, por enseñarme a trabajar con *Trichoderma*, porque siempre pude preguntarle lo que fuera y recibir una buena respuesta, por enriquecer mi cultura musical. Al Dr. Rafael Dueñas Sánchez, por ser mi “hermano mayor”, por contagiarme su entusiasmo científico, por defenderme y dar la cara por mí cuando hizo falta, por aguantar mi buen humor mañanero y mis abrazos que no son más que muestras del cariño y gran aprecio que le tengo, por ser mejor persona que científico (cosa nada fácil). A Felipe Guevara, por aguantarme y compartir todos los días ese estrecho pasillito en el que trabajamos, por no darme nunca una mala contestación a mis constantes preguntas sobre su inexorable vida privada y aún así querer compartir conmigo más de un secreto. A Antonio Alejandro López García alias “lejan”, por tantas y tantas horas extralaborales compartidas (con todo lo que ello conlleva), por ser de Cádiz y hacerme sentir como en “casa”. A María Jesús Rodríguez Palero, por su disposición a ayudarme en lo que fuera, sus valiosos consejos y gran sinceridad.

A todos los miembros del departamento de genética que me enseñaron como hacer y como no hacer las cosas, los que me enseñaron a poner y quitar autoclaves, los que respondieron por los pasillos a las típicas preguntas de doctorando de primer año que aún no tiene muy claro ni si quiera donde están los aparatos o donde se guardan los matraces. A todos con los que he crecido científicamente y con los que he podido compartir parte de estos años tanto a nivel personal como laboral y a las últimas incorporaciones, porque aunque no seáis conscientes de ello, todos habéis contribuido, de una forma o de otra, a la realización de esta tesis y a todos os estoy agradecido. Gracias por los días de FERIA, las cenas de Navidad, los días de rodaje, “San Pipeto”, barbacoas y demás eventos, porque gracias a ellos he podido conocerlos un poco mejor y sentirme mucho más a gusto trabajando con vosotros.

También quisiera agradecer a la empresa Beam Global S.A y en especial a Alicia Puerto, Antonio Florido y su director técnico Manuel Valcárcel, la cesión de mosto y realización de medidas de compuestos aromáticos volátiles mediante cromatografía de gases.

A la Dra. Cristina Lasanta Melero de la Universidad de Cádiz, por los análisis de variables enológicas medidas durante la caracterización fisiológica de las cepas implicadas en crianza biológica.

A las secretarías por servir de intermediarias con la Universidad y hacerse cargo de todo el papeleo, y a Luis Romanco, Pepe Córdoba e Isabel por su apoyo técnico y logístico y especialmente por el buen humor y las agradables conversaciones y comentarios intercambiados a lo largo de estos años.

A todos los ministerios, junta de Andalucía y empresas privadas que han contribuido a la financiación del trabajo de investigación desarrollado en esta tesis y por tanto a mi independencia temporal.

A mi familia, a mi hermana Mónica porque sé que pregunta por mí, por ser tan buena y generosa. A mis padres, Manolo y A. Carmen, porque soy consciente de los numerosos sacrificios que han tenido que hacer para darme siempre la mejor educación y la posibilidad de llegar hasta donde he llegado académicamente, por enseñarme las cosas verdaderamente importantes de la vida, por ser un ejemplo a seguir, por tantos y tantos días al sol en las piedras de la caleta, por llenar mi mente de millones de recuerdos inolvidables con ellos cogidos de mis manos.

A Inma, por cruzarse en mi camino y salvarme, por su sonrisa, su alegría, por sobrevivir y no dejarme solo, por querer seguir a mi lado.

Índice

INTRODUCCIÓN GENERAL.....	19
1.- Biotecnología y microorganismos industriales.....	21
2.- Las levaduras en la industria alimentaria.....	22
3.- Los vinos del marco de Jerez.....	23
3.1.- Reseña histórica.....	24
3.2.- La elaboración.....	25
3.2.1.- La obtención del mosto y la fermentación.....	25
3.2.2.- Clasificación del vino base y encabezado.....	26
3.2.3.- La crianza y sus tipos.....	26
3.2.4.- Sistema de envejecimiento.....	28
3.3.- Tipos de vino.....	29
3.3.1.- Vinos con crianza biológica.....	29
3.3.1.1.- Vinos tipo Fino y Manzanilla.....	29
3.3.1.2.- Vinos tipo Amontillados.....	30
3.3.2.- Vinos con crianza físico-química.....	30
3.3.2.1.- Vinos tipo Oloroso.....	30
3.3.2.2.- Vinos Dulces.....	31
4.- Características de levaduras implicadas en la elaboración de vinos de crianza biológica.....	31
4.1.- Levaduras de fermentación.....	31
4.2.- Levaduras de maduración.....	31
OBJETIVOS.....	33
MATERIALES Y MÉTODOS.....	37
1.- Organismos.....	39
1.1.- Levaduras.....	39
1.2.- Bacterias.....	40
2.- Vectores.....	40
3.- Cebadores.....	41
4.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.....	43
4.1.- Cultivo de <i>E. coli</i>	43
4.2.- Cultivo de levaduras en medios de laboratorio.....	43
4.3.- Cultivo en medio industrial.....	44
5.- Condiciones de esterilización.....	45
6.- Transformación de microorganismos.....	45
6.1.- Transformación de <i>E. coli</i>	45
6.2.- Transformación de <i>S. cerevisiae</i> por el método del acetato de litio (Gietz & Woods, 2002).....	46
7.- Extracción de ácidos nucleicos.....	47
7.1.- Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> a pequeña escala.....	47
7.2.- Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i> a gran escala.....	47
7.3.- Extracción de ADN genómico de <i>S. cerevisiae</i>	48
7.3.1.- Procedimiento con zimoliasa y β -mercaptoetanol.....	48
7.3.2.- Procedimiento con kit comercial.....	49
7.4.- Extracción de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i>	49
7.5.- Extracción de ARN de <i>S. cerevisiae</i>	50

7.5.1.- Procedimiento con fenol-cloroformo	50
7.5.2.- Procedimiento mediante kit comercial.....	50
8.- Manipulación de ácidos nucleicos.	51
8.1.- Precipitación de ADN y ARN.	51
8.2.- Digestión de ADN con enzimas de restricción.	51
8.3.- Generación de extremos romos.	51
8.4.- Desfosforilación de plásmidos.	51
8.5.- Ligación.	52
8.6.- Tratamiento con ADNasa.	52
8.7.- Cuantificación de ácidos nucleicos.....	52
8.8.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	52
8.8.1.- Reacción convencional.....	52
8.8.2.- RAPD-PCR.	52
8.8.3.- Reacción con enzimas de alta fidelidad.....	53
8.8.4.- Reacción de rt-qPCR.	53
8.9.- Obtención de ADN para cariotipos.....	54
8.10.- Separación de ácidos nucleicos.	55
8.10.1.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.	55
8.10.2.- Electroforesis de ADN en campo pulsante.	55
8.11.- Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.....	56
9.- Hibridación de sondas marcadas a ADN fijado en membrana.....	56
9.1.- Transferencia de ADN a membranas.....	56
9.1.1.- Transferencia de fragmentos de ADN.....	56
9.1.2.- Transferencia de cromosomas.....	56
9.2.- Marcaje y cuantificación de sondas radiactivas.	57
9.3.- Hibridación de ácidos nucleicos.....	57
9.4.- Deshibridación de membranas.	58
10.- Citometría de flujo.	58
10.1.- Contenido en ADN.....	58
10.2.- Viabilidad.....	58
10.3.- Viabilidad tras la desecación.	59
11.- Determinación de hidratos de carbono.....	59
11.1.- Determinación de azúcares reductores.....	59
11.1.1.- Procedimiento químico (Nelson, 1957 y Somogyi, 1952).	59
11.1.2.- Determinación mediante kit comercial.	60
12.- Determinación de etanol, glicerol, acetaldehído y ácido acético.....	60
13.- Determinación de asimilación y fermentación de azúcares.....	60
14.- Determinación del contenido en aminoácidos.	60
14.1.- Obtención de muestras.....	60
14.2.- Concentración extracelular.	61
14.3.- Concentración interna.	61
14.4.- Derivatización de las muestras.	61
14.5.- Condiciones de cromatografía.	61
15.- Determinación del contenido de compuestos volátiles.	62
15.1.- Determinación de ésteres superiores.....	62
15.2.- Determinación de aldehídos, acetales, cetonas y alcoholes.	62
16.- Determinación del contenido interno de glutatión.....	64
17.- Determinación de los niveles de peroxidación de lípidos de membrana.	64

18.- Determinación de la sensibilidad a zimoliasa.....	64
19.- Obtención y manipulación de proteínas.....	64
19.1.- Extracción de proteínas.....	64
19.1.1.- Extractos totales.....	64
19.1.2.- Fracción mitocondrial.....	65
19.2.- Cuantificación de proteínas.....	65
19.3.- Ensayos de actividad enzimática.....	66
19.3.1.- Actividad catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.....	66
19.3.2.- Actividad superóxido dismutasa mitocondrial.....	66
19.3.3.- Actividad superóxido dismutasa citoplasmática.....	66
20.- Cinética de formación de <i>velo de flor</i>.....	66
21.- Obtención de cepas industriales auxótrofas para aminoácidos.....	66
CAPÍTULO I:	69
MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS FERMENTATIVAS PARA MEJORAR EL AROMA (LAS PROPIEDADES ORGANOLÉPTICAS) EN VINOS DE CRIANZA BIOLÓGICA.....	69
INTRODUCCIÓN	71
1.- El aroma de los vinos.....	73
1.1.- Generalidades.....	73
1.2.- El aroma en los vinos tipo <i>Fino</i>	75
2.- Principales compuestos aromáticos implicados en las propiedades organolépticas del vino tipo Fino: síntesis y regulación en la levadura fermentativa <i>S. cerevisiae</i>.....	76
2.1.- Alcoholes superiores o alcoholes de fusel.....	76
2.2.- Ésteres.....	78
3.- Regulación y síntesis de aminoácidos en <i>S. cerevisiae</i>: efectos en el aroma del vino.....	81
3.1.- Síntesis de aminoácidos aromáticos.....	82
3.2.- Regulación de la síntesis de aminoácidos.....	84
4.- Mejora de las propiedades organolépticas del vino.....	84
RESULTADOS	87
1.- Modificación del perfil organoléptico mediante el uso de nuevas cepas fermentativas superproductoras de aminoácidos aromáticos.....	89
1.1.- Obtención de derivados resistentes a p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP).....	89
1.2.- Cariotipo electroforético de los derivados.....	89
1.3.- Determinación del contenido interno de aminoácidos.....	90
1.4.- Caracterización fisiológica.....	91
1.4.1.- Concentración interna de aminoácidos.....	91
1.4.2.- Crecimiento y consumo de azúcares reductores.....	92
1.4.3.- Producción de etanol, glicerol y ácido acético.....	92
1.4.4.- Producción de compuestos aromáticos.....	94
1.4.5.- Resistencia a desecación.....	95
2.- Modificación del perfil organoléptico mediante la sobreexpresión de genes involucrados en la síntesis de compuestos aromáticos.....	96

2.1.- Integración de los genes <i>ATF1</i> y <i>ATF2</i> en cepas vínicas fermentativas.....	96
2.2.- Caracterización molecular de las cepas transformadas.....	98
2.3.- Niveles de expresión de <i>ATF1</i> y <i>ATF2</i> en las cepas transformadas.....	103
2.4.- Caracterización fisiológica.....	104
2.4.1.- Concentración interna de aminoácidos.....	104
2.4.2.- Crecimiento y consumo de azúcares reductores durante la fermentación.....	106
2.4.3.- Producción de etanol, glicerol y ácido acético.....	107
2.4.4.- Producción de compuestos aromáticos.....	109
2.4.5.- Resistencia a desecación.....	111
DISCUSIÓN.....	113
1.- Variaciones en la concentración interna de aminoácidos de cepas utilizadas como pie de cuba y sus consecuencias sobre las propiedades organolépticas del vino.....	115
2.- Sobreexpresión en levaduras fermentativas de los genes <i>ATF1</i> y <i>ATF2</i> y su efecto en el perfil aromático de vinos jóvenes.....	117
CAPÍTULO II:.....	121
CARACTERIZACIÓN MOLECULAR Y FISIOLÓGICA DE LEVADURAS FORMADORAS DE VELO DE FLOR IMPLICADAS EN CRIANZA BIOLÓGICA.....	121
INTRODUCCIÓN.....	123
1.- Características de levaduras implicadas en la maduración de vinos con crianza biológica.....	125
1.1.- Características fisiológicas.....	125
1.1.1.- Metabolismo respiratorio.....	125
1.1.2.- Formación del <i>velo de flor</i>	126
1.2.- Características genéticas.....	128
1.2.1.- Estructura genética de cepas de laboratorio e industriales.....	128
1.2.2.- Características moleculares de levaduras formadoras de <i>velo de flor</i>	130
RESULTADOS.....	135
1.- Caracterización fisiológica.....	137
1.1.- Asimilación y fermentación de azúcares.....	137
1.2.- Cinética de formación de <i>velo de flor</i>	137
1.3.- Medida de variables enológicas.....	140
1.4.- Resistencia a acetaldehído.....	140
2.- Caracterización molecular.....	141
2.1.- Cariotipo electroforético.....	141
2.2.- Restricciones de ADN mitocondrial (RFLP).....	142
2.3.- Amplificación aleatoria de fragmentos de ADN (RAPD).....	143
2.4.- Contenido en ADN.....	145
2.5.- Localización cromosómica de genes de interés enológico.....	145
DISCUSIÓN.....	149
1.- Selección de una cepa de crianza biológica en función de sus características fisiológicas.....	151

2.- Caracterización de las cepas de <i>velo de flor</i> FJF206, FJF414, B16 y SF mediante técnicas moleculares.....	153
CAPÍTULO III:	157
SOBREEXPRESIÓN DE GENES IMPLICADOS EN LA RESPUESTA A ESTRÉS EN LEVADURAS FORMADORAS DE <i>VELO DE FLOR</i> INVOLUCRADAS EN CRIANZA BIOLÓGICA.	157
INTRODUCCIÓN	159
1.- Tipos de estrés a los que se encuentran sometidos las levaduras formadoras de <i>velo de flor</i> durante la crianza biológica.	161
1.1.- Estrés producido por etanol.	162
1.1.1.- Respuesta transcripcional y fisiológica.	164
1.2.- Estrés producido por acetaldehído.	164
1.2.1.- Respuesta transcripcional y fisiológica.	165
1.3.- Estrés oxidativo.....	166
1.3.1.- Respuesta transcripcional y fisiológica.	167
RESULTADOS	171
1.- Obtención de cepas vínicas auxótrofas para uracilo.	173
2.- Estrategia para la integración de los genes <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> y <i>HSP12</i> en cepas auxótrofas para uracilo formadoras de <i>velo de flor</i>	176
3.- Caracterización molecular de los transformantes.....	177
4.- Niveles de expresión de <i>SOD1</i> , <i>SOD2</i> y <i>HSP12</i> en las cepas transformadas.	182
5.- Caracterización fisiológica.	184
Para la caracterización fisiológica de las cepas objeto de este estudio se utilizaron las mismas condiciones de cultivo descritas en el apartado anterior.....	184
5.1.- Medida de actividades enzimáticas.	184
5.2.- Medida de la sensibilidad a enzimas líticas de pared celular.	187
5.3.- Niveles internos de glutatión.	188
5.3.- Peroxidación de lípidos de membranas biológicas.....	189
Independientemente del medio de cultivo en el que se ha realizado el ensayo, la cepa B16 presenta los niveles de peroxidación de lípidos más elevados. Esto indicaría una gran sensibilidad por parte de esta cepa al estrés oxidativo responsable de la formación de estas moléculas reactivas.	190
5.4.- Cinética de crecimiento y formación de <i>velo de flor</i>	190
5.5.- Viabilidad celular.	193
5.6.- Medida de variables enológicas.	194
DISCUSIÓN	197
1.- Obtención de cepas formadoras de <i>velo de flor</i> auxótrofas.	199
2.- Incremento de la viabilidad en levaduras formadoras de <i>velo de flor</i> y su efecto industrial.	200
CONCLUSIONES	203

APÉNDICES	207
BIBLIOGRAFÍA.....	215
ABREVIATURAS Y SIGLAS	239

Introducción General

1.- Biotecnología y microorganismos industriales.

En términos generales se define la Biotecnología como *“el uso de organismos vivos o de compuestos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre.”* Organizaciones de ámbito internacional como la FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) aceptan la Biotecnología, en una declaración publicada en Marzo del año 2000, como *"toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos para usos específicos"*.

La biotecnología ha sido utilizada tradicionalmente por el hombre desde hace más de 8000 años en actividades tales como la elaboración del pan, cerveza, vino, queso y yogur llevada a cabo por microorganismos o la mejora de cultivos y animales domésticos mediante selección.

Desde un punto de vista más actual, debido en gran parte a la aparición de nuevas tecnologías como la ingeniería genética, la biotecnología se podría definir como *"la aplicación comercial de organismos vivos o sus productos, la cual involucra la manipulación deliberada de sus moléculas de ADN"*. Por lo tanto la biotecnología del siglo XXI no sustituye ninguna técnica preexistente, sino que más bien gracias a la aparición de la ingeniería genética se ha visto enriquecida y ha ampliado las posibilidades de aplicación.

Uno de los grupos de microorganismos más importantes en Biotecnología son los hongos, los cuales tienen numerosas aplicaciones:

- Producen toxinas, enzimas y factores de crecimiento (Thammajaruk et al, 2010).
- Aumentan la resistencia de plantas a patógenos (Lahlali & Hijri, 2010).
- Se usan como agentes de control biológico (Moreno-Mateos et al, 2007).
- Producen aminoácidos y se usan como prebióticos (Gobbetti et al, 2010).
- Son generadores de nuevas fuentes de energía renovables como etanol y otros solventes (Mukhtar et al, 2010).
- Degradan compuestos inertes o tóxicos como herbicidas y pesticidas (Kawai, 2010).
- Intervienen en la producción de bebidas fermentadas y en la obtención de la biomasa necesaria para elaborar productos panarios (Dueñas-Sánchez et al, 2010).

Los hongos levaduriformes o levaduras son probablemente los microorganismos más utilizados por el hombre, y sus aplicaciones industriales abarcan un gran número de sectores comerciales con una elevada implicación en la sociedad actual (Figura 1).

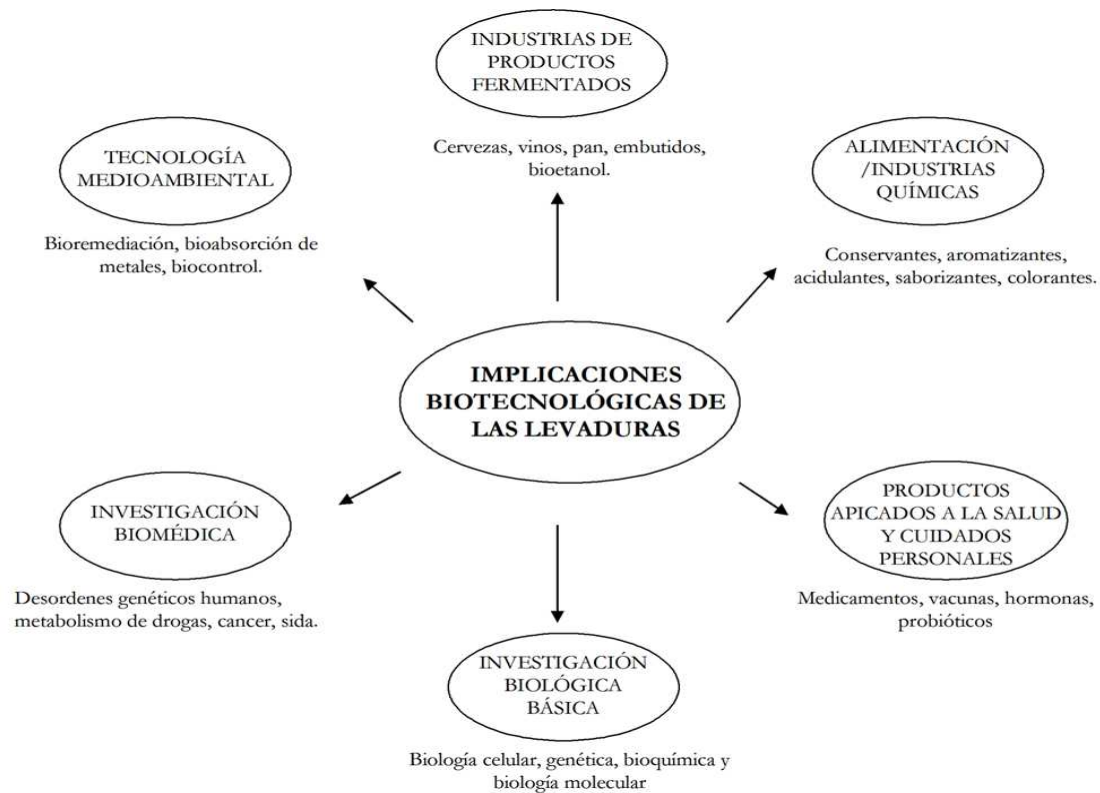


Figura 1.- Representación esquemática de las implicaciones de las levaduras en la biotecnología. Modificada de (Walker, 1998).

2.- Las levaduras en la industria alimentaria.

Las implicaciones de las levaduras en el sector alimentario son muy numerosas. Se usan para la obtención de conservantes, aromatizantes, vitaminas, aminoácidos, etc. Si bien la aplicación más conocida en esta industria es la producción de vino, cerveza, bebidas destiladas y pan.

Existen numerosas especies de levaduras implicadas en estos procesos, siendo *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces bayanus* y *Saccharomyces pastorianus* las más utilizadas. Sin embargo, existen otras levaduras no pertenecientes al género *Saccharomyces* que también intervienen en la producción de alimentos fermentados:

- *Hanseniaspora (Kloeckera)*, *Candida*, *Pichia*, *Metschnikowia*, *Kluyveromyces*, *Schizosaccharomyces* e *Issatchenkia* contribuyen en la producción de vinos y sidras (Fleet, 1998; Fleet, 2003; Pretorius, 2000).
- *Dekkera (Brettanomyces)* participa en la elaboración de algunos tipos de cervezas (Dufour et al, 2003).
- *Schizosaccharomyces* interviene en la obtención de bebidas destiladas como el ron (Fahrasmane & Ganou, 1998).

- *Debaryomyces*, *Yarrowia*, *Kluyveromyces*, *Galactomyces*, *Candida* y varias especies de *Pichia* junto con las bacterias del ácido láctico modifican el aroma y textura de quesos y fermentan la leche para formar kefir (Fleet, 1990; Frohlich-Wyder, 2003).
- *Candida*, *Debaryomyces* y *Yarrowia* junto con las bacterias del ácido láctico, fermentan la carne para formar embutidos (Lucke, 1998; Samelis & Sofos, 2003).
- Varias especies de *Pichia*, *Candida*, *Torulaspota* y *Saccharomyces* como son *C. humicola*, *T. delbrueckii* y *S. exiguus* intervienen en la fermentación de masas panarias (Jenson, 1998; Meroth et al, 2003; Hammes et al, 2005).
- *Pichia*, *Candida*, *Kluyveromyces*, *Saccharomyces*, *Hanseniaspora* y *Issatchenkia* contribuyen a la formación de precursores aromáticos en el café o chocolate (Schwan & Wheals, 2003, 2004).
- *Zygosaccharomyces rouxxi* interviene en la fermentación de soja (Hanya & Nakadai, 2003).

La producción de vino es una de las aplicaciones biotecnológicas más importantes desde un punto de vista económico y cultural. Existen evidencias en yacimientos neolíticos de asentamientos humanos de hace 7000 años del consumo de zumo de uva fermentado (McGovern et al, 1997), pero las primeras evidencias arqueológicas del cultivo y machacado de uvas para la obtención de vino la encontramos en grabados del antiguo Egipto hacia el año 3000 a.C. A partir de la evolución del hombre a especie sedentaria el cultivo de la vid y la elaboración del vino fueron evolucionando hasta nuestros días, dando como resultado una gran variedad de vinos con olor, sabor y textura características e identificativas de la región de origen, método de elaboración y tipo de uva.

3.- Los vinos del marco de Jerez.

La región de producción de los vinos amparados por las Denominaciones de Origen "JEREZ-XÉRÈS-SHERRY" Y "MANZANILLA-SANLÚCAR DE BARRAMEDA" está constituida por los terrenos ubicados en los términos municipales de Jerez de la Frontera, El Puerto de Santa María, Sanlúcar de Barrameda, Chipiona, Trebujena, Rota, Puerto Real, Chiclana de la Frontera y determinados pagos de Lebrija.

El carácter único del vino de Jerez se debe a diversos factores, entre los que destacan el singular clima, suelo, variedades de uva utilizadas, así como el exclusivo proceso de producción (Bravo-Abad, 1986). El clima se caracteriza por conjugar las beneficiosas corrientes húmedas del Atlántico con las más secas del Mediterráneo, formando ambas un

microclima único en el mundo. Las principales variedades plantadas son la Palomino (95% de todo el viñedo) y en menor proporción Pedro Ximénez y Moscatel. Éstas se cultivan en una tierra de color blanco compuesta por caliza, arcilla y arena que recibe el nombre de “*albariza*”. Es una tierra pobre en nutrientes pero con una gran capacidad de retención hídrica, muy importante para superar las condiciones climáticas de la zona.

3.1.- Reseña histórica.

Las primeras noticias del vino de Jerez nos las proporciona en el siglo I a.C. el geógrafo griego Estrabón, que atribuye a los fenicios el haber traído las vides a nuestra región, allá por el año 1100 a.C. El vino elaborado en aquella época tenía una graduación alcohólica muy alta, era muy imperfecto y se cocía para que no se estropeará con el transporte. Una prueba que demuestra esta reseña histórica es el hallazgo de dos lagares encontrados en el yacimiento fenicio del Castillo de Doña Blanca (siglo VII a.C.), en El Puerto de Santa María, cerca de Jerez de la Frontera.

En el año 138 a.C. Escipión Emiliano pacifica la región y comienza a exportar productos a Roma: vino, aceite de oliva y garum (una pasta de pescado parecida al escabeche). De esta forma se comenzó a extender el vino de Jerez por todo el imperio.

Sobre el año 711 d.C. comienza la dominación árabe de la región, pero se sigue consumiendo vino a pesar de la prohibición del Corán. En el año 966, Almanzor, visir del califa Alhaken II, decide arrancar las vides, pero los jerezanos convencen al califa de que las uvas pasas dan energía a los soldados, y consiguen conservar un tercio de las vides.

En 1264 Alfonso X El Sabio conquista Jerez y extiende el consumo de vino. Los cristianos bebían vino y comían cerdo para diferenciarse de los musulmanes, incluso se lo daban a beber a los caballos antes de las batallas.

Uno de los mercados históricos del vino de Jerez era y es Inglaterra. Su entrada, en el siglo XII, cuentan que se produce cuando Enrique I propuso a los bordeleses una operación de trueque, lana inglesa por vino de Burdeos, para desarrollar las manufacturas nacionales. La negativa de los franceses abrió las puertas a los jerezanos, que sí aceptaron la propuesta. Se dio a conocer por el nombre árabe de la ciudad, "**Sherish**", origen de la palabra “sherry”.

En los siglos XV y XVI, el vino de Jerez se convierte en una fuente de riqueza para la región y se exporta a Inglaterra, Francia y los Países Bajos. Como ejemplo, en todos los barcos que iban a América, se reservaba un tercio de la carga para el vino. Debido al valor del vino muchos de estos barcos fueron blanco de numerosos ataques piratas como el

perpetrado en 1587 por Martin Frobisher, de la flota de Francis Drake. Éste atacó Cádiz y Jerez y se llevó 3000 botas de estos vinos. Este botín puso de moda el Jerez en la corte inglesa.

A partir de 1682, tras algunos intentos violentos, los ingleses deciden importar el vino pacíficamente, y empresarios ingleses se establecen en Jerez, fundando bodegas como: Garvey, Duff-Gordon, Wisdom & Walter o Osborne. Tras ellos vinieron los capitales españoles repatriados tras la independencia de las colonias como González o Marqués de Misa, así como los franceses Domecq o Lacave.

3.2.- La elaboración.

3.2.1.- La obtención del mosto y la fermentación.

Las uvas, cosechadas a finales de agosto-primeros de septiembre, se someten a un primer prensado a baja presión obteniéndose *mosto de primera yema*. Posteriormente se procede a una segunda extracción, a más presión obteniéndose *mosto de segunda yema* y a una tercera que dará lugar a las llamadas *prensas*. Los *mostos de primera y segunda yema* se utilizan para la producción de los distintos tipos de vino, mientras que las *prensas* se fermentan para destilar luego el producto fermentado (*vino de prensa*) y obtener etanol que se utiliza posteriormente para el *encabezado*. Antes de la fermentación el mosto se deja reposar para que decanten las partes sólidas durante 24 horas, operación llamada *desfangado*.

En la flora natural de la uva podemos encontrar hongos como *Mucor*, *Rhizopus*, *Aspergillus*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Candida*, *Pichia*, *Hansenula*, *Saccharomycodes* y *Saccharomyces*, además de bacterias como *Acetobacter*, *Pediococcus* o *Lactobacillus*. Todos estos microorganismos están presentes en el mosto inicial pero debido a la corrección de la acidez (añadiendo ácido tartárico $1,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$), la adición de sulfito y el aumento en la graduación alcohólica conforme avanza la fermentación, las levaduras del género *Saccharomyces* se van imponiendo hasta ser las predominantes al final del proceso fermentativo (Charpentier et al, 2009; Martínez et al, 1995).

Actualmente las fermentaciones se llevan a cabo en depósitos de acero inoxidable con temperatura y otros parámetros controlados (Suárez-Lepe, 1997) y se realizan de forma dirigida inoculando una cepa de la especie *S. cerevisiae* seleccionada en la propia bodega. Este inóculo recibe el nombre de pié de cuba (PDC).

Las características y el metabolismo de estas levaduras se tratarán con mayor detenimiento a lo largo de esta memoria.

3.2.2.- Clasificación del vino base y encabezado.

Hacia finales del mes de diciembre, los vinos nuevos obtenidos tras la fermentación (vinos base) están listos para su primera clasificación. Aquellos vinos que normalmente procedentes de mosto obtenidos sin presión o con presiones muy ligeras, se destinarán a su posterior crianza como *Finos o Manzanillas* (vinos con crianza biológica elaborados en Sanlúcar de Barrameda) y aquellos otros lotes de vino que presenten una mayor estructura se destinarán a la obtención de vinos *Olorosos*.

Una de las características del vino de Jerez es el ser un vino fortificado. Es decir, se trata de vinos a los que se les ha adicionado una cierta cantidad de alcohol de vino, al objeto de aumentar ligeramente su graduación alcohólica final. Este procedimiento se denomina *encabezado*. Los vinos base, una vez clasificados, se encabezan de forma gradual, mediante el procedimiento de ir añadiendo "mitad y mitad" (vino y alcohol de prensa), hasta alcanzar la graduación alcohólica deseada. Inicialmente la graduación alcohólica del vino base suele oscilar entre los 11° y los 12,5°. Tras el *encabezado* ésta aumenta hasta los 15° en aquellos vinos clasificados para su crianza como *Finos y Manzanillas* y hasta un mínimo de 17° en aquellos vinos destinados para su envejecimiento como *Olorosos* (Figura 2). Además, esta fortificación o *encabezado* de los vinos es el instrumento utilizado por el bodeguero para decidir el tipo de envejecimiento o crianza al que se van a ver sometidos los vinos.

3.2.3.- La crianza y sus tipos.

En la zona del Jerez se desarrollan dos tipos de crianza: la *crianza oxidativa* y la *crianza biológica*.

Durante la *crianza biológica* el vino sufre una transformación bioquímica como consecuencia de la actividad metabólica de las levaduras implicadas en el proceso. Este tipo de levaduras tienen la capacidad de establecerse formando una película sobre la superficie del vino en el interior de la bota denominada *velo de flor*. Para que éste se forma deben darse una serie de condiciones óptimas, siendo las más importantes la existencia de suficiente superficie de contacto entre el vino y la atmósfera (por eso se deja 1/6 de la capacidad de las botas sin rellenar), temperatura comprendida entre 15 y 20° C, y una concentración de etanol entre 14,5 y 15,5°.

La crianza biológica surge por primera vez en Sanlúcar de Barrameda en el siglo XVIII. En principio este tipo de maduración se establece de forma estacional ya que el *velo de flor* se perdía como consecuencia de las condiciones climáticas adversas durante el verano

y el invierno volviendo a formarse en primavera y otoño. Esta estacionalidad deja paso a la permanencia cuando las bodegas comienzan a adecuarse para mantener las condiciones ambientales idóneas para el desarrollo del mismo. El desarrollo del *velo de flor* comienza con la aparición de islas sobre la superficie del vino (*velo en islotes*) que crecen hasta formar una película fina, delgada y lisa (*velo en pandereta*). Al cabo de pocos días esta película se espesa y se arruga (*velo rugoso*). El *velo* joven presenta un color blanquecino mientras que un *velo* viejo es de color grisáceo.

Durante esta etapa son metabolizados muchos componentes del vino y surgen otros, así el vino va adquiriendo sus características organolépticas finales, además el *velo de flor* actúa aislando al vino del contacto con el oxígeno lo que impide que el vino se oxide (Pérez, 1982).

Respecto a las levaduras que están implicadas en la crianza biológica, el análisis del *velo* en bodegas específicas ha indicado la existencia de levaduras pertenecientes a los géneros *Saccharomyces*, *Debaryomyces*, *Pichia*, *Hansenula* y *Candida*. Más del 95% de esta población la constituyen cuatro tipos de levaduras, tres de ellas son razas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, denominadas *beticus*, *montuliensis* y *cheresiensis* y una cuarta clasificada como *Zygosaccharomyces rouxii*. Todas ellas se distinguen entre sí por sus características metabólicas (Martínez et al, 1997a). Las características fisiológicas y genéticas, el metabolismo de estas levaduras y los procesos moleculares que intervienen en la formación del *velo de flor* serán tratados con mayor detenimiento a lo largo de esta memoria.

El sistema de envejecimiento mediante crianza biológica también se utiliza en la elaboración de vinos de Montilla-Moriles, Condado de Hueva, Aljarafe y Rueda (Benítez et al, 2009). Fuera de España encontramos vinos sometidos a crianza biológica en Francia (Vinos Amarillos del Jura), Cerdeña, California, Sudáfrica y Australia y en algunas regiones europeas donde se producen vinos botritizados, sobre todo en Hungría (Tokay) (Charpentier et al, 2009; Kovacs et al, 2008; Fleet, 2007; Pirino et al, 2004; Sipiczki, 2008).

La *crianza oxidativa*, también llamada físico-química se produce en aquellos vinos donde, tras el encabezado, el alto contenido alcohólico no permite el desarrollo del *velo de flor*. Al no poseer el *velo* el vino está en contacto directo con el aire del interior de la bota, sufriendo un lento proceso de oxidación. Este fenómeno junto con la cesión de compuestos de la madera de la bota al vino le confiere el color oscuro y aroma característico a los vinos sometidos a este tipo de crianza.

3.2.4.- Sistema de envejecimiento.

Los vinos clasificados como futuros *Olorosos*, tras ser encabezados a su graduación alcohólica definitiva pueden pasar ya a formar parte de los sistemas de envejecimiento (Figura 2).

Sin embargo aquellos vinos encabezados a 15° se someten a un periodo de crianza intermedio entre la primera clasificación y la definitiva entrada en los sistemas de envejecimiento. Esta fase del proceso recibe el nombre de *sobretablas*. Este período oscila entre los seis meses y el año, tras los cuales se produce una segunda clasificación. Durante este periodo de tiempo se produce crianza biológica ya que se forma *velo de flor*. Aquellas botas en las que la flor sigue presente en el momento de la reclasificación se destinan finalmente a la obtención de vinos sometidos a crianza biológica, *Finos* o *Manzanillas*. Algunas de estas botas, a pesar de presentar *velo de flor*, se reconducen a crianza oxidativa. En este caso se obtienen vinos muy especiales que, tras una fase de sobretablas bajo *velo de flor*, se van a encabezar por encima de los 17° para iniciar el que será su envejecimiento definitivo, de carácter oxidativo dando lugar a los vinos *Amontillados* (Figura 2).

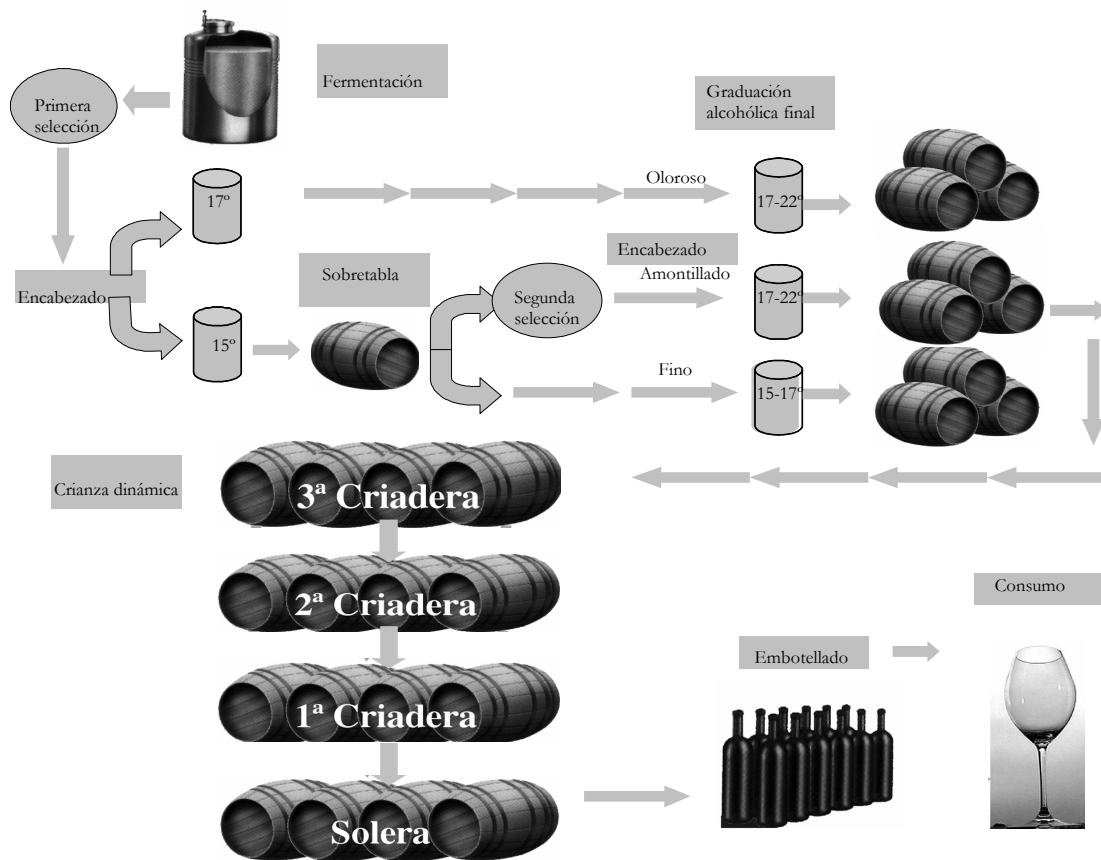


Figura 2.- Esquema representativo del proceso de elaboración de los vinos de crianza biológica.

El sistema tradicional de envejecimiento de los vinos de Jerez recibe el nombre de *Sistema de Criaderas y Solera*. Se trata de un sistema dinámico, mediante el que vinos con distintos nivel de envejecimiento son metódicamente mezclados, con el fin de perpetuar unas determinadas características en el vino finalmente comercializado. Cada sistema de soleras está compuesto por varias criaderas o escalas formadas por un número determinado de botas. La escala que contiene el vino con más crianza se sitúa sobre el suelo, denominándose *Solera*.

La fila que se encuentra encima de la *Solera* recibe el nombre de *Primera Criadera* y el vino es el segundo más viejo; la siguiente fila es la *Segunda Criadera* y así sucesivamente hasta llegar a la *Quinta* o *Sexta Criadera*. El vino se va homogeneizando y tipificando, realizando *sacas* para embotellar desde la *Solera* un par de veces al año. El volumen que se extrae de la *Solera* para el consumo es sustituido por un volumen equivalente de la *Primera Criadera*, éste de la *Segunda Criadera*, y así sucesivamente, hasta llegar a la *Criadera* más joven cuyo volumen es reemplazado por vino de *Sobretablas*, que ha estado sometido a maduración estática (*Añadas*). La operación de completar el vacío originado en cada una de las *sacas* se denomina *rocío*. Los vinos sacados de las *Soleras* se homogenizan, estabilizan, filtran y embotellan (Martínez et al, 1995). Estos vinos se mezclan con los procedentes de otras *Soleras* de la bodega en proporciones adecuadas para asegurar un producto final de propiedades constantes. Este sistema se mantiene tanto en vinos con envejecimiento físico-químico como en aquellos sometidos a crianza biológica. Acelera el proceso de oxidación en los vinos con crianza oxidativa gracias a la aireación producida durante el proceso y mantiene un velo saludable y metabólicamente activo durante el envejecimiento gracias al aporte de nuevos micronutrientes y oxígeno (Díaz Alonso, 1989)

3.3.- Tipos de vino.

3.3.1.- Vinos con crianza biológica.

3.3.1.1.- Vinos tipo *Fino* y *Manzanilla*.

Los vinos base obtenidos tras la fermentación con un contenido alcohólico de 10 a 12° destinados a este tipo de vino, se encabezan hasta 15° y se llevan a las botas que se llenan hasta 5/6 de su capacidad (Figura 2).

Las condiciones reductoras que se generan en el vino bajo el *velo de flor*, junto con los productos del metabolismo de las levaduras que lo forman, condicionan el aroma, el

sabor y el color de este vino: color oro pajizo, pálido, de aroma punzante y delicado, suavemente avellanado, seco y de gran paladar.

3.3.1.2.- Vinos tipo *Amontillados*.

Éstos sufren un tipo de envejecimiento mixto ya que son sometidos a crianza biológica y tras una segunda selección (Figura 2), se encabezan a 17° de etanol con lo que el velo se pierde, y se someten a envejecimiento físico-químico, dando lugar a los *Amontillados* cuando proceden de un *Fino* o en el caso de Sanlúcar a la *Manzanilla Pasada*. Estos vinos poseen un color ámbar y una aroma avellanado, suave y seco al paladar (García Maiquez, 1995).

Tabla 1. Características y variables básicas de los vinos de Jerez.

Características que dan la tipicidad	Vinos		
	Finos	Olorosos	Pedro Ximénez
Suelo	Albariza	Albariza	Albariza
Cepa	Palomino	Palomino	Pedro Ximénez
Vinificación: presión mostos	<0,5	0,5-1,5	>5
Vino: encabezado a (°)	15	17	10,0-15,5
Envejecimiento:			
crianza	Biológica	No biológica	No biológica
edad media en años	3-5	8-10	8-25
Valores analíticos medios:			
pH	2,9-3,3	3,1-3,5	3,6-4,1
alcohol	15,5-17,0	17-22	15,5
acidez total* (g ATH · L ⁻¹)	3,7-5,2	4,5-6,0	5,2-7,1
acidez volátil** (g AcH · L ⁻¹)	<0,3	<0,8-1,2	<0,8-1,3
acetaldehido (mg · L ⁻¹)	200-400	60-80	150-200
glicerina (g · L ⁻¹)	<1,0	5-8	3-5

* Expresado en g · L⁻¹ de ácido tartárico.

** Expresado en g · L⁻¹ de ácido acético.

Modificada de (García Maiquez, 1995).

3.3.2.- Vinos con crianza físico-química.

3.3.2.1.- Vinos tipo Oloroso.

Los vinos destinados a *Oloroso* se encabezan con alcohol hasta 17°, llegando a concentraciones finales de 17°-22° (Tabla 1). Son vinos de color ambar con pronunciados aromas a frutos secos como la nuez y madera noble. Presentan un alto contenido en glicerina lo que lo hace suave al paladar.

Algunos vinos de crianza físico-química desarrollan durante la maduración características combinadas de *Amontillados* (el aroma) y *Olorosos* (el sabor) y se denominan Palo Cortado.

3.3.2.2.- Vinos *Dulces*.

En Jerez también existen vinos dulces elaborados fundamentalmente con las variedades Pedro Ximénez y Moscatel (Tabla 1). Estos vinos parten de uvas fuertemente soleadas que son fermentadas parcialmente, encabezándose luego con alcohol para detener la fermentación y dejar los vinos dulces. Posteriormente estos vinos se someten a crianza físico-química, como la de los vinos *Olorosos*, dando vinos aterciopelados de color caoba (Martínez-Llopis et al, 1992; Martínez et al, 1995).

4.- Características de levaduras implicadas en la elaboración de vinos de crianza biológica.

4.1.- Levaduras de fermentación.

Son las encargadas de realizar la fermentación alcohólica del mosto. En la actualidad cada bodega intenta controlar el proceso fermentativo con la inoculación de una cepa seleccionada como pié de cuba, la cual presenta una serie de características específicas deseables. Entre estas características se encuentran la capacidad de fermentar con rapidez mostos con un 20-25% de azúcar y alta tolerancia al etanol, CO₂, SO₂ y temperatura. Además deben producir una baja concentración de metabolitos no deseables en el vino resultante (acidez volátil, H₂S, etc.) y una concentración adecuada de aquellos que contribuyen favorablemente en las cualidades organolépticas (acetaldehído, alcoholes y ésteres volátiles, etc.). En la elaboración de este tipo de vino la cepa utilizada como pie de cuba pertenece a la especie *S. cerevisiae*.

4.2.- Levaduras de maduración.

Las levaduras de maduración formadoras de *velo de flor* también a la especie *S. cerevisiae*, aunque son distintas a las de fermentación en cuanto a sus características metabólicas, fisiológicas y genéticas (Esteve-Zarzoso et al, 2001). Son autóctonas en las bodegas que se dedican a la elaboración de vinos con crianza biológica y se mantienen en las botas de forma permanente durante todo el año, desplazando a las de fermentación una vez que el vino se ha *encabezado* (Infante et al, 2003). Liberan acetaldehído (principal responsable del aroma y sabor característico del *Fino*) y acetoína y consumen glicerina, ácidos orgánicos (acético, láctico, etc.), aminoácidos, oxidan el etanol, disminuyen la acidez volátil y aumentan el contenido de alcoholes superiores (isobutanol e isoamílico) (Martínez et al, 1998; Muñoz et al, 2006).

El metabolismo de estas levaduras de flor además favorece la extracción de taninos y fenoles de la madera de las botas, así los *Finos* y *Amontillados* se enriquecen durante la crianza en compuestos como el 3-metilbutanal o el sotolón.

Sin duda la característica más apreciable en las levaduras de maduración es la capacidad de agregarse y formar una película blanca, rugosa y gruesa sobre la superficie del vino, el *velo de flor* (Figura 3).



Figura 3.- Formación de *velo de flor* en laboratorio (A) y en bodega (B).

El *velo de flor* se considera un mecanismo de adaptación consistente en cambios de forma, tamaño e hidrofobicidad en las células como consecuencia de la alta graduación alcohólica, alta concentración de acetaldehído y elevados niveles de estrés oxidativo. El proceso depende de proteínas hidrofóbicas de superficie, las cuales reciben el nombre de adhesinas (Huang et al, 2009), y de otras proteínas implicadas en la estabilidad de la membrana y en la resistencia a diversos tipos de estrés.

Debido al proceso de elaboración de este tipo de vino y para mejorar el producto final, en este trabajo se ha optado por: la obtención de cepas de levaduras fermentativas capaces de modificar y mejorar el perfil organoléptico final del vino y el desarrollo de nuevas cepas de levaduras de maduración formadoras de *velo de flor* más resistentes a los diferentes tipos de estrés a los que se encuentran sometidas durante la crianza biológica.

Estos son los principales objetivos de esta tesis doctoral. Las diferentes vías de actuación para desarrollar estas mejoras se discuten ampliamente en las introducciones de los respectivos capítulos.

Objetivos

Los objetivos de este trabajo han sido:

1. La mejora de las propiedades organolépticas en los vinos sometidos a crianza biológica mediante la obtención de cepas fermentativas superproductoras de L-fenilalanina y/o que sobreexpresan los genes *ATF1* y *ATF2*.
2. La caracterización a nivel fisiológico y molecular de cepas formadoras de *velo de flor* y la aplicación de las mismas en la realización de crianza biológica dirigida en bodega.
3. El aumento de la viabilidad celular y de la velocidad de formación de *velo de flor* mediante sobreexpresión de los genes *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* en cepas implicadas en crianza biológica.

Materiales y Métodos

1.- Organismos.

1.1.- Levaduras.

La mayor parte de las cepas de levaduras utilizadas en este trabajo pertenecen a la especie *S. cerevisiae* (Tabla 2). Cuando se trata de una especie diferente se especifica de forma concreta. La nomenclatura genética utilizada corresponde con la propuesta en la “Genetic Nomenclature Guide (1998) publicado en Trends in Genetics” y que se puede consultar en la base de datos *Saccharomyces Genome Database* (SGD) (www.yeastgenome.org/sgdpub/Saccharomyces_cerevisiae.pdf).

Tabla 2.- Cepas de levaduras empleadas en este trabajo.

CEPA	GENOTIPO/CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	ORIGEN
S288C	<i>MATα SUC2 mal gal2 CUP1 bap1Δ (L)</i>	YGSC ¹
DS81	<i>MATα/MATα SUC2/SUC2 mal/mal gal2/gal2 CUP1/CUP1 (L)</i>	(Codon et al, 1995)
BY4741	<i>MATα; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0 (L)</i>	Euroscarf ²
FJF206	Desconocido/velo (V)	Domecq (Jerez)
FJF414	Desconocido/velo (V)	Domecq (Jerez)
B16	Desconocido/velo (V)	Domecq (Jerez)
SF	Desconocido/velo (V)	California (EEUU)
F6U	Derivado de FJF206 auxótrofa para uracilo	Este trabajo
F4U	Derivado de FJF414 auxótrofa para uracilo	Este trabajo
B16U	Derivado de B16 auxótrofa para uracilo	Este trabajo
F61	Derivado de FJF206 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:SOD1:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
F62	Derivado de FJF206 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:SOD2:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
F612	Derivado de FJF206 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:HSP12:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
F6L	Derivado de FJF206 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:LacZ:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
F41	Derivado de FJF414 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:SOD1:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
F42	Derivado de FJF414 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:SOD2:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
F412	Derivado de FJF414 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:HSP12:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
F4L	Derivado de FJF414 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:LacZ:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
B1	Derivado de B16 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:SOD1:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
B2	Derivado de B16 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:SOD2:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
B12	Derivado de B16 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:HSP12:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
BL	Derivado de B16 con al menos una integración en <i>leu2Δ::P_{TDH3}:LacZ:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
<i>S. cerevisiae beticus</i>	Desconocido/velo (V)	Esteve-Zarzos et al, 2004
<i>S. cerevisiae cheresiensis</i>	Desconocido/velo (V)	Esteve-Zarzos et al, 2004
<i>S. cerevisiae montuliensis</i>	Desconocido/velo (V)	Esteve-Zarzos et al, 2004

<i>Z. rouxii</i>	Desconocido/velo (V)	Esteve-Zarzoso et al, 2004
PDC	Desconocido/Pie de cuba (V)	Domecq (Jerez)
ΔPDC	Derivado de PDC auxótrofo para leucina (V)	Guevara FA, tesis doctoral, Dept. Genética
P1	Derivado de PDC con al menos una integración en <i>leu2Δ</i> :: <i>P_{TDH3}:ATF1:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
P2	Derivado de PDC con al menos una integración en <i>leu2Δ</i> :: <i>P_{TDH3}:ATF2:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
P2.1	Derivado de PDC / resistente a p-fluoro-DL-fenilalanina (V)	Este trabajo
P2.6	Derivado de PDC / resistente a p-fluoro-DL-fenilalanina (V)	Este trabajo
P6.1	Derivado de PDC / resistente a p-fluoro-DL-fenilalanina (V)	Este trabajo
P8.1	Derivado de PDC / resistente a p-fluoro-DL-fenilalanina (V)	Este trabajo
P2.1.1	Derivado de P2.1 con al menos una integración en <i>leu2Δ</i> :: <i>P_{TDH3}:ATF1:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
P2.1.2	Derivado de P2.1 con al menos una integración en <i>leu2Δ</i> :: <i>P_{TDH3}:ATF2:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
P6.1.1	Derivado de P6.1 con al menos una integración en <i>leu2Δ</i> :: <i>P_{TDH3}:ATF1:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
P6.1.2	Derivado de P6.1 con al menos una integración en <i>leu2Δ</i> :: <i>P_{TDH3}:ATF2:T_{CYC1}</i> (V)	Este trabajo
PL	Derivado de PDC con al menos una integración en <i>leu2Δ</i> :: <i>P_{TDH3}:LacZ:T_{CYC1}</i> (V)	Guevara FA, tesis doctoral, Dept. Genética
V1	Desconocido (P)	CGL ³ (Valladolid)
V2	Desconocido (P)	CGL ³ (Valladolid)
V3	Desconocido (P)	Tamame M ⁵
L12	Desconocido (C)	DCL Yeast (Surrey UK)
<i>S. carlsbergensis</i>	Desconocido (C)	CECT1317 ⁴
<i>S. bayanus v. uvarum</i>	Desconocido (C)	CECT1969 ⁴

¹ Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, California (EEUU).

² European *Saccharomyces cerevisiae* archive for functional analysis.

³ Compañía General de Levaduras, Valladolid (España).

⁴ Colección Española de Cultivo Tipo, Valencia (España)

⁵ Instituto de Microbiología Bioquímica, CSIC, Salamanca (España).

(L), (P), (V) ó (C) Cepa de laboratorio, panadera, vínica ó cervecera respectivamente.

1.2.- Bacterias

La estirpe bacteriana que se ha utilizado como propagador de los distintos vectores ha sido *Escherichia coli* DH5α, comercializada por *Amersham-Pharmacia Biotech*.

2.- Vectores.

Tabla 3.- Plásmidos y vectores utilizados en este trabajo.

PLÁSMIDO	CARACTERÍSTICAS RELEVANTES	REFERENCIA
pGEMt-easy vector	Vector comercial diseñado para la clonación de fragmentos de ADN amplificados por PCR	Promega
p29	La restricción con EcoRI-SalI libera un fragmento de 1.6 Kb que corresponde al elemento transponible <i>Ty1</i> . Este fragmento se utilizó como sonda en los experimentos de hibridación.	Naumov et al, 1992
B205	La restricción con ClaI libera un fragmento de 1.7 Kb que corresponde al elemento transponible <i>Ty2</i> . Este fragmento se utilizó como sonda en los experimentos de hibridación.	Naumov et al, 1992

pUG6	Contiene el gen <i>KanMX4</i> flanqueado por repeticiones directas <i>L_{ox}P</i> . Se utilizó como molde para la amplificación de los casetes utilizados para la obtención de cepas industriales auxótrofas.	Guldener et al, 1996
YE _{p351-cre-cyh}	Contiene el gen de la recombinasa <i>creA</i> bajo control del <i>P_{GAL1}</i> y como marcador de selección el gen <i>LEU2</i> y el gen de resistencia a cicloheximida. Multicopia	Delneri et al, 2000
pRS416	Plásmido centromérico con el gen <i>URA3</i> como marcador de selección.	Mumberg et al, 1995
p416gpd	Derivado de pRS416 que contiene el promotor <i>P_{TDH3}</i> entre las dianas <i>SacI</i> y <i>XbaI</i> , y el terminador <i>T_{CYC1}</i> entre las dianas <i>XhoI</i> y <i>KpnI</i> .	Mumberg et al, 1995
pRD4F	Derivado de p416gpd que presenta en fase con el promotor el casete <i>KanMX4</i> flanqueado por repeticiones directas <i>L_{ox}P</i> clonado en la diana <i>KpnI</i> .	Dueñas-Sánchez R, tesis doctoral, Dept. Genética
pGDgpd	Derivado de p416gpd con el gen <i>LEU2</i> como marcador de selección	Guevara FA, tesis doctoral, Dept. Genética
pJF3	Derivado de p416gpd sin el fragmento de ADN bacteriano contenido entre las dianas <i>NsiI</i> y <i>KpnI</i>	Este trabajo
p416gpd:: <i>LacZ</i>	Derivado de p416gpd con el gen <i>LacZ</i> fusionado a <i>P_{TDH3}</i> y a <i>T_{CYC1}</i> mediante restricción, generación de extremos romos y ligación	Dept. Genética
pJF3:: <i>SOD1</i>	pJF3 con <i>SOD1</i> clonado entre los sitios <i>BamHI</i> y <i>Sall</i>	Este trabajo
pJF3:: <i>SOD2</i>	pJF3 con <i>SOD2</i> clonado entre los sitios <i>BamHI</i> y <i>Sall</i>	Este trabajo
pJF3:: <i>HSP12</i>	pJF3 con <i>HSP12</i> clonado entre los sitios <i>SpeI</i> y <i>Sall</i>	Este trabajo
pJF3:: <i>LacZ</i>	Derivado de p416gpd:: <i>LacZ</i> sin el fragmento de ADN bacteriano contenido entre las dianas <i>NsiI</i> y <i>KpnI</i>	Este trabajo
pGD:: <i>LacZ</i>	Derivado del pGDgpd con <i>LacZ</i> fusionado a <i>P_{TDH3}</i> y a <i>T_{CYC1}</i> mediante restricción, romización y ligación	Guevara FA, tesis doctoral, Dept. Genética
pGD:: <i>ATF1</i>	Derivado de pGDgpd con <i>ATF1</i> clonado entre los sitios <i>SpeI</i> y <i>Sall</i>	Este trabajo
pGD:: <i>ATF2</i>	Derivado de pGDgpd con <i>ATF2</i> clonado entre los sitios <i>SpeI</i> y <i>Sall</i>	Este trabajo
pRD4F:: <i>ATF1</i>	pRD4F con <i>ATF1</i> clonado entre los sitios <i>SpeI</i> y <i>Sall</i>	Este trabajo
pRD4F:: <i>ATF2</i>	pRD4F con <i>ATF2</i> clonado entre los sitios <i>SpeI</i> y <i>Sall</i>	Este trabajo

3.- Cebadores

Los cebadores empleados en el transcurso de este trabajo se muestran en la Tabla 4. En todos los casos las terminaciones en “u” o “l” indican que son cebadores utilizados en PCR convencional (directo e inverso respectivamente). Las terminaciones en “F” o “R” indican que son cebadores utilizados para RT-qPCR (directo e inverso respectivamente). Las secuencias subrayadas indican la presencia de una diana de restricción.

Tabla 4.- Cebadores utilizados en este trabajo.

Cebador	Secuencia 5' → 3'
ULP1.u	CCA GTA TTC TTA ACC CAA CTG CAC AGA ACA AAA ACC TGC AGG TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA
ULP1.l	GTT TTG CTG GCC GCA TCT TCT CAA ATA TGC TTC CCA GCC TGC CTT AGT GGA TCT GAT ATC ACC T
ULP2.u	TGC TAC TCA TCC TAG TCC TGT TGC TGC CAA GCT ATT TAA TAT TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA
ULP2.l	AGT CCT CTT CCA ACA ATA ATA ATG TCA GAT CCT GTA GAG ACC CTT AGT GGA TCT GAT ATC ACC T
ULP3.u	ATG TTC GTA CCA CCA AGG AAT TAC TGG AGT TAG TTG AAG CAT TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA
ULP3.l	TCC CTT GTC ATC TAA ACC CAC ACC GGG TGT CAT AAT CAA CCA CTT AGT GGA TCT GAT ATC ACC T
ULP4.u	ACA TGT GGA TAT CTT GAC TGA TTT TTC CAT GGA GGG CAC AGT TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA

ULP4.l	TCT CTT TGA GCA ATA AAG CCG ATA ACA AAA ATC TTT GTC GCT CTT AGT GGA TCT GAT ATC ACC T
ULP5.u	TAC AAT TTT TTA CTC TTC GAA GAC AGA AAA TTT GCT GAC ATT TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA
ULP5.l	ATT CTC CAG TAG CTA GGG AGC CCT TGC ATG ACA ATT CTG CTA CTT AGT GGA TCT GAT ATC ACC T
ULP6.u	CGG GTG TAT ACA GAA TAG CAG AAT GGG CAG ACA TTA CGA ATG TAA CTT CGT ATA ATG TAT GCT ATA
ULP6.l	TAC TTC TTC CGC CGC CTG CTT CAA ACC GCT AAC AAT ACC TGG CTT AGT GGA TCT GAT ATC ACC T
Kan.u	TTA GCT TGC CTC GTC CCC GC
Kan.l	TGC ACA CTG GAT GGC GGC GT
L2.u2	CGC TAT CGC ACA GAA TCA AAT TCG
L2.l	TTA AGC AAG GAT TTT CTT AAC
U3Cl.u	GAG CAG AAG GAA GAA CGA AGG AA
U3Cl.l	AAT ACT GTT ACT TGG TTC TGG CG
U3S2.u	TAA GCC GCT AAA GGC ATT ATC C
U3S2.l	CGC AAT GTC AAC AGT ACC CTT AG
GL2.u	CCC CTA AGA AGA TCG TCG TTT TGC CAG GTG ACC ACG TTG GGC TGG AGC TCA GTT TAT CAT
U3L2.l	AGC AAG GAT TTT CTT AAC TTC TTC GGC GAC AGC ATC ACC GGA TTC GGT AAT CTC CGA ACA GAA
TU3.u	TGC TAC TCA TCC TAG TCC TGT TGC TGC CAA GCT ATT TAA TAT ATT AAC CCT CAC TAA AGG GA
L2L.l	AGC AAG GAT TTT CTT AAC TTC TTC GGC GAC AGC ATC ACC GTC GAG GAG AAC TTC TAG TAT ATC
LacZ.u	CCC GTC GTT TTA CAA CGT CG
LacZ.l	GAC CAT TTT CAA TCC GCA
S1BamHI.u	AAT TAA <u>GGA TCC</u> ATG GTT CAA GCA GTC GCA GTG
S1SalI.l	CAA <u>AGT CGA CTT</u> AGT TGG TTA GAC CAA TGA CAC
S2BamHI.u	AAT TTA <u>AGG ATC CAT</u> GTT CGC GAA AAC AGC AGC
S2SalI.l	CAA <u>AGT CGA CTC</u> AGA TCT TGC CAG CAT CGA ATC
H12SpeI.u	CAA <u>ACT AGT</u> ACA ATG TCT GAC GCA GGT AGA AAA
H12SalI.l	CAA <u>AGT CGA CTT</u> ACT TCT TGG TTG GGT CTT CTT
A1SpeI.u	CAA <u>ACT AGT</u> AGC TCT CAT GAA TGA AAT CGA T
A1SalI.l	CAA <u>GTC GAC</u> TGT GAG ATC TAA GGG CCT AAA A
A2SpeI.u	CAA <u>ACT AGT</u> ATT ATG GAA GAT ATA GAA GGA TAC
A2SalI.l	CAA <u>AGT CGA CTT</u> AAA GCG ACG CAA ATT CGC CGA
ADC1.u	ATA ACC GCT AGA GTA CTT TGA AGA
ADC1.l	CAT TGT ATA TGA GAT AGT TGA TTG
HSP150.u	ATG CAA TAC AAA AAG ACT TTG GTT
HSP150.l	CTA TCA AAT CGA TAG CTT CCA AGT
ADH1.u	GCA ACG GTA TAC GGC CTT CCT TCC
ADH1.l	CGG CAT GCC GGT AGA GGT GTG GTC
ADH2.u	CGT AAT ACA CAA TGT CTA TTC CAG
ADH2.l	GAA GTG TCA ACA ACG TAT CTA CCA
CUP1.u	AAT CAT CAC ATA AAA TGT TCA GCG
CUP1.l	AGC AGC ATG ACT TCT TGG TTT CTT
MEL1.u	ATG TTT GCT TTC TAC TTT CTC ACC
MEL1.l	TCA AGA AGA GGG TCT CAA CCT ATA
AGT1.u	TCA TTT CAT TGG TAA GCA AGA AGA
AGT1.l	CAG CTG CAT TTA ATT CTC GCT GTT
MUC1SpeI.u	CAA <u>ACT AGT</u> ACT ATG CAA AGA CCA TTT CTA CTC
MUC1SalI.l	CAA <u>AGT CGA CTT</u> AGA ATA CAA CTG GAA GAG CGA
GAL1.u	AGA AAA AAC TAT AAT GAC TAA ATC TCA
GAL1.l	GAG CAA ATT TGG GAT CAG CAT TTA
MAL23.l	TTA AGG AAT TAT GCT GTC TTC ATC TTT
MAL23.u	ATG GGT ATT GCG AAA CAG TCT TGC
SUC2.l	CTA TTT TAC TTC CCT TAC TTG GAA CT
SUC2.u	ATG CTT TTG CAA GCT TTC CTT TTC C
Act1F	TGG ATT CCG GTG ATG GTG TT

Act1R	TCA AAA TGG CGT GAG GTA GAG A
A1F	GAA CCG ATC GAA AAG GTG ATA GA
A1R	GAT GAA ACC CGA AAG AAG TGA CTT
A2F	AGG TTC GCA TTA CGC CTA TCT AA
A2R	TCG ACA AGA CTC CAA AAC TTG TCA
S1F	TGC TGG TCC TCA CTT CAA TCC
S1R	TCA GTT GGA GCA CCA TGT GTC T
S2F	AGG CAA GCT GGA CGT TGT TC
S2R	ACT AGT GGG CCT GTG ACG GTA T
H12F	CAA GGT CGC TGG TAA GGT TCA
H12R	CCT TGG AAG ACA CCC TTG TTG T

4.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

4.1.- Cultivo de *E. coli*.

El crecimiento de la cepa de *E. coli* DH5 α se realizó en medio LB. Los cultivos líquidos se llevaron a cabo en un agitador orbital cerrado *Optic inymen system* a 37° C y 200 rpm mientras que los sólidos se incubaron en una estufa a la misma temperatura.

Medio Luria-Bertani (LB): contiene 10 g · L⁻¹ de triptona, 5 g · L⁻¹ de extracto de levadura, 10 g · L⁻¹ de NaCl, ajustando el pH a 7.5.

Suplementos: Ampicilina sódica 0.1 g · L⁻¹, X-Gal 50 mg · L⁻¹ (Sambrook & Russell, 2001).

4.2.- Cultivo de levaduras en medios de laboratorio.

Los cultivos líquidos en medios de laboratorio se realizaron a 200 rpm y 30° C en un agitador abierto *New Brunswick Scientific C10 Platform shaker*. El inóculo se realizó en tubos de 20 mL conteniendo 5 mL de medio a una D.O._{660nm} de 0.1 a partir de un precultivo de 12 h realizado en el mismo medio. El crecimiento de estos cultivos se estimó midiendo la variación de la D.O._{660nm} con un espectrofotómetro *Beckman DU 640*. Las células se recogieron tanto en fase exponencial como en estacionaria en función de las condiciones del ensayo.

YPD: contiene 10 g · L⁻¹ de extracto de levadura, 20 g · L⁻¹ de Bactopeptona y 20 g · L⁻¹ de glucosa.

YPG: contiene 10 g · L⁻¹ de extracto de levadura, 20 g · L⁻¹ de Bactopeptona y 26.1 g · L⁻¹ de glicerol.

YPGal: contiene 10 g · L⁻¹ de extracto de levadura, 20 g · L⁻¹ de Bactopeptona y 20 g · L⁻¹ de galactosa.

Suplementos: G418 (Sigma A1720) a 0,2 g · L⁻¹. Cicloheximida (Sigma C7698) a 0,2 μ g · mL⁻¹.

SD: contiene $1,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de YNB (Yeast Nitrore Base (DIFCO)) sin sulfato amónico y sin aminoácidos, $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de sulfato amónico y $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucosa.

Suplementos: aminoácidos o bases nitrogenadas a la concentraciones descritas en Sherman et al, 1986.

SDP: contiene $1,7 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de YNB sin sulfato amónico y sin aminoácidos, $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de L-prolina y $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ de glucosa.

Suplemento: p-Fluoro-DL-fenilalanina (Sigma F5251) en concentraciones variables.

4.3.- Cultivo en medio industrial.

Las microvinificaciones se realizaron en matraces de 50 mL conteniendo 20 mL de mosto. El inoculo se realizó al 4% (v/v) o a una $\text{D.O.}_{660\text{nm}}$ de 0,1 ($1,5 \times 10^6$ células $\cdot \text{mL}^{-1}$) a partir de un precultivo en mosto de 48 h, procedente de un preinóculo en medio YPD. Los matraces se mantuvieron sin agitación a 20°C en un incubador *IRE-160 (Trade Raypa®)* hasta una concentración final de azúcares inferior a $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$. Para la realización del análisis organoléptico se utilizaron matraces de 250 mL con 100 mL de mosto. El procedimiento de fermentación fue idéntico al descrito anteriormente.

MOSTO: procedente del primer prensado de uva variedad Palomino (cosechas 2006, 2008 y 2009). Tras varios ciclos de centrifugación para eliminar los precipitados se filtró a través de *Millipore* con diámetro de poro de $0,45 \mu\text{m}$ y se le corrigió la acidez ajustando el pH a 3 con ácido sulfúrico y los niveles de sulfito a 60-80 ppm con metadisulfito potásico ($120 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Se conservó a 4°C hasta su uso.

Para ensayos de formación de *velo de flor* y cultivos en vino en agitación se realizó un precultivo en medio YPG, para evitar la presencia de colonias *petite*. Posteriormente se inocularon, a una $\text{D.O.}_{660\text{nm}}$ de 0,1, tubos de 20 mL conteniendo 5 mL del medio (vino a 15° para la formación de velo y vino a 10° para cultivos sumergidos). En el caso de los cultivos en agitación, éstos se incubaron a 30°C en un agitador orbital abierto *New Brunswick Scientific C10 Platform shaker* a 200 rpm y el crecimiento se estimó midiendo la variación de la $\text{D.O.}_{660\text{nm}}$ con un espectrofotómetro *Beckman DU 640*, mientras que para la formación de *velo de flor*, los tubos se mantuvieron a 22°C sin agitación. Los cultivos sumergidos se recogieron tanto en fase exponencial de crecimiento como en estacionaria y los procedentes de *velo de flor* cuando éste aún no había cubierto toda la superficie del vino.

VINO: Tipo *Fino*, procedente de la sobretabla, con una graduación de 15-15,5° de etanol. Para obtener un menor porcentaje de etanol se diluyó con agua destilada esterilizada.

Se filtró a través de *Millipore* con diámetro de poro de 0,45 μm y se mantuvo a 4° C hasta su uso. Para ensayos de resistencia se suplementa con acetaldehído a diferentes concentraciones.

Tanto el mosto como el vino fueron facilitados por la empresa Beam Global S.A.

5.- Condiciones de esterilización.

Los medios de cultivo se esterilizaron mediante autoclavado durante 20' a una temperatura de 115 a 120° C.

Los suplementos se filtraron a través de membranas *Millipore* con un diámetro de poro inferior a 0,45 μm (salvo que se indique lo contrario) y se agregan a los medios tras su esterilización.

6.- Transformación de microorganismos.

6.1.- Transformación de *E. coli*.

Preparación de células competentes:

Se inoculó una colonia de *E. coli* en 3 mL de medio LB y se incubó de 9 a 10 h a 37° C. Se inocularon matraces de 500 mL conteniendo 200 mL de medio SOB con 500 μL del cultivo anterior y se incubó a 22° C hasta alcanzar $\text{D.O.}_{660\text{nm}}$ 0,4-0,7. El cultivo se mantuvo en hielo 10' y se centrifugó 10' a 4000 rpm (2500g) en una centrífuga modelo *Beckman J2-21M* con un rotor JA-14 a 4° C de temperatura. El precipitado, una vez seco, se resuspendió en 100 mL de TB a 4° C, agitándolo suavemente. La mezcla se dejó en hielo durante 10' y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones mencionadas anteriormente. El precipitado se resuspendió en 15 mL de TB a 4° C y se añadieron 560 μL de DMSO, se mezcló y se incubó en hielo 15'. Este último paso se repitió una vez más. La mezcla resultante se repartió en tubos eppendorfs en alícuotas de 200 μL , los cuales fueron sumergidos en N_2 líquido y mantenidos a -80° C hasta su uso.

Transformación de baja eficiencia.

Una vez descongeladas en hielo, 100 μL de la suspensión de células competentes se mezclaron con la solución que contenía el ADN con el que se quería transformar. La mezcla se incubó en hielo 5' y se sembró sobre cajas de petri precalentadas a 37° C conteniendo LB sólido suplementado con Ampicilina. Las cajas se incubaron 24 h a 37° C.

Nota: Este procedimiento se recomienda para la propagación de vectores.

Transformación de alta eficiencia.

A 100 μL de la suspensión de células competentes descongeladas en hielo se le añadieron de 25 a 50 μL de la solución que contenía el ADN. La mezcla se incubó en hielo de 15' a 30'. Posteriormente se incubó 1' a 42° C, tras lo cual se volvió a incubar en hielo. Tras añadir 500 μL de medio LB, la mezcla se mantuvo a 37° C de 20 a 40'. Por último se sembró en alícuotas sobre cajas de petri precalentadas a 37° C conteniendo LB sólido suplementado con Ampicilina.

Nota: Este procedimiento se usa para transformar con ADN procedente de ligaciones.

Medio SOB: contiene 20 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de triptona, 5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de extracto de levadura, 0,5 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de NaCl y KCl 1,5 mM. Se lleva a pH 7 añadiendo NaOH 10 M, se autoclava y se añade $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 10 mM.

Solución TB: contiene Pipes (ácida) 10 mM, $\text{CaCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 15 mM, KCl 0,25 M, pH 6,7 con KOH 2 N. Añadir $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 55 mM y esterilizar con filtros *Millipore* de un diámetro de poro igual a 0,45 μm .

Usar H_2O *MilliQ* para la preparación de todos los medios y soluciones.

6.2.- Transformación de *S. cerevisiae* por el método del acetato de litio (Gietz & Woods, 2002).

A partir de un preinóculo de la cepa a transformar se inocularon matraces de 50 mL conteniendo 15 mL de YPD y se incubaron a 30° C hasta que el cultivo alcanzó una $\text{D.O.}_{660\text{nm}}$ entre 0,4 - 0,6. Se centrifugó el cultivo en una centrífuga *ROTOFIX 32A (Hettich Zentrifugen)* a 3500 rpm (1400g) durante 5'. Al precipitado se le añadieron 10 mL de agua destilada, se centrifugó en las mismas condiciones y se pasó a un eppendorf estéril tras resuspenderlo en 1 mL de agua destilada. Éste se centrifugó a 13000 rpm (16000g) en una centrífuga *Heraeus Biofuge Pico (Sorvall)* durante 30", se resuspendió en 200 μL de agua destilada y se repartió equitativamente en dos eppendorf. Tras una nueva centrifugación de 30" el precipitado se resuspendió en 360 μL de la mezcla de transformación y se incubó en un termobloque a 42° C durante 40'. Las células se incubaron en hielo 2' y se centrifugaron a 13000 rpm (16000g) 30". Los precipitados se resuspendieron en 1 mL de agua destilada. Se volvieron a centrifugar a la misma velocidad y mismo tiempo y al precipitado se le añadió 1 mL del medio donde se van a seleccionar los transformantes (YPD, YPG, SD...). Si el marcador de selección utilizado era un gen que confiere resistencia a un antibiótico las

células se dejaron incubando 3-4 h a 30° C antes de sembrarlas en las cajas con medio selectivo. En caso contrario, se sembraron directamente y se incubaron a 30° C hasta que se observó la aparición de colonias.

Mezcla de transformación: contiene 240 µL de una solución de polietilenglicol (PEG) 3500 al 50% (p/v), 36 µL de una solución de acetato de litio 1 M, 50 µL de una solución de ADN de esperma de salmón 2 mg · mL⁻¹ 34 µL de una solución con ADN ó 34 µL de agua destilada estéril (para el control negativo).

7.- Extracción de ácidos nucleicos.

7.1.- Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* a pequeña escala.

Se centrifugaron 2' 1,5 mL de un cultivo bacteriano en fase estacionaria a 13000 rpm (16000g). Las células se resuspendieron en 100 µL de solución 1 a 4° C. Se añadieron 200 µL de solución 2, se mezcló por inversión y se adicionaron 150 µL de solución 3 a 4° C. Tras agitar la mezcla vigorosamente, ésta se mantuvo en hielo 3-5 minutos, tras lo cual se centrifugó a 13000 rpm (16000g) durante 5' en una centrífuga *Heraeus Biofuge Pico (Sorvall)*. El sobrenadante se transfirió a un nuevo eppendorf y se centrifugó de nuevo. Se descartó el precipitado y el ADN contenido en el sobrenadante se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol 96% a -20° C y 1/10 del volumen recuperado de la última centrifugación de acetato sódico 3 M. La mezcla se centrifugó 10' a 13000 rpm (16000g), se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70%. Se centrifugó 5' y cuando el precipitado estuvo seco se resuspendió incubándolo a 37° C durante 30' en 25-30 µL de TE 1X al que se le ha añadido 1 µL de ARNasa 10.

Solución 1: contiene sacarosa 25 mM, EDTA 10 mM en tampón Tris-HCl 25 mM a pH 8, 0,1 g · L⁻¹ de ARNasa

Solución 2: contiene NaOH 0,2 M y SDS 1 %. La solución se preparó justo antes de usarla.

Solución 3: contiene acetato potásico 3 M y ácido acético glacial 11,5 % (v/v).

Tampón TE 1X: contiene EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM a pH 7,5.

ARNasa 10: ARNasa 10 g · L⁻¹.

7.2.- Extracción de ADN plasmídico de *E. coli* a gran escala.

Se centrifugaron 50 mL del cultivo bacteriano en fase estacionaria 5' a 4500 rpm (3900g) en una centrífuga *Beckman-Coulter Allegra X22R centrifuge*. Las células se resuspendieron en 1,6 mL de solución 1 a 4° C y se incubaron 5' en hielo. Se añadieron 3,2

mL de solución 2, se mezcló por inversión y se adicionó 2,4 mL de solución 3 a 4° C. Tras agitar la mezcla vigorosamente, ésta se mantuvo en hielo 3-5 minutos, tras lo cual se centrifugó en las condiciones anteriores. Al sobrenadante, tras pasarlo a través de papel de filtro, se le añadieron 3,2 mL de fenol-cloroformo-álcool isoamílico 25:24:1. La mezcla se agitó vigorosamente y se centrifugó 5' a 4500 rpm (3900g). La fase hidrofílica se traspasó a un nuevo tubo y, después de añadir 2,5 volúmenes de etanol 96% a -20° C y 1/10 del volumen recuperado de la última centrifugación de acetato sódico 3 M, se incubó a -20° C durante al menos 15'. La mezcla se centrifugó 10' (4500 rpm o 3900g), se descartó el sobrenadante y el precipitado se lavó con 500 µL de etanol 70%. Se centrifugó 10' y cuando el precipitado estuvo seco se resuspendió incubándolo a 37° C durante 30' en 100-200 µL de TE 1X al que se le añadieron 5-10 µL de ARNasa 10.

Nota: Las soluciones 1, 2 y 3 se describen en el apartado 7,1.

7.3.- Extracción de ADN genómico de *S. cerevisiae*.

7.3.1.- Procedimiento con zimoliasa y β-mercaptoetanol.

Las células se cultivaron en tubos de ensayo de 25 mL conteniendo 5 mL del medio selectivo deseado. El cultivo en fase de crecimiento exponencial o estacionaria se centrifugó 5' en una centrífuga *ROTOFIX 32A (Hettich Zentrifugen)* a 3500 rpm (1400g). El precipitado se lavó con 5 mL de agua destilada y se volvió a centrifugar. El precipitado obtenido se resuspendió en 1 mL de agua destilada, se traspasó a un tubo eppendorf nuevo y se centrifugó 2' a 13000 rpm (16000g) en una centrífuga *Heraeus Biofuge Pico (Sorvall)*. Las células se resuspendieron en 320 µL de solución 1, se añadieron 3,2 µL de β-mercaptoetanol (10%) y 10 µL de zimoliasa 20T (15 g L⁻¹). La mezcla se incubó durante 1 h a 37° C tras lo cual se centrifugó 30'' a 13000 rpm (16000g). El precipitado se resuspendió mezclando 370 µL de solución 2 con 16 µL de SDS al 10%. Tras incubar la mezcla 30' a 65° C se añadieron 85 µL de acetato potásico 5 M y se incubó en hielo 1 h. Posteriormente se centrifugó 15' a 13000 rpm (16000g) y el sobrenadante, tras añadirle 1,2 mL de etanol 96%, se mantuvo a -20° C durante 30'. Se centrifugó 10' a 13000 rpm (16000g) y el precipitado obtenido, una vez seco, se resuspendió incubándolo en una mezcla de 300 µL de TE 1X y 15 µL de ARNasa 10 durante 30' a 37° C. Se añadieron 315 µL de fenol-cloroformo-álcool isoamílico en proporciones 25:24:1 y se agitó vigorosamente. La mezcla se centrifugó 5' a 13000 rpm (16000g), se recuperó la parte hidrofílica y el ADN se precipitó añadiendo 2,5 volúmenes de etanol y 1/10 del volumen de la mezcla de acetato sódico 3 M. Se incubó 2 h a -20° C y se centrifugó 10' a 13000 rpm (16000g). El precipitado

se lavó con etanol al 70%, se volvió a centrifugar el mismo tiempo y a la misma velocidad y, tras descartar el sobrenadante, el precipitado, una vez seco, se resuspendió en 50 μL de TE 1X.

Solución 1: contiene sorbitol 0,9 M, EDTA 0,1 M, pH 8.

Solución 2: contiene Tris-HCl pH8 50 mM, EDTA 20 mM pH 8.

ARNasa 10: ARNasa 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$.

Nota: Los volúmenes de soluciones y compuestos utilizados se escalan al volumen de cultivo inicial.

7.3.2.- Procedimiento con kit comercial.

Para la extracción de ADN genómico con el kit comercial *Master Pure yeast ADN purification kit* (Epicenter® Biotechnology madison WI, USA), se siguieron las instrucciones del fabricante.

7.4.- Extracción de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*.

Se centrifugaron 5' a 3500 rpm (1400g) en una centrífuga ROTOFIX 32A (Hettich Zentrifugen) 10 mL de un cultivo en fase estacionaria de células creciendo en medio selectivo. El precipitado se resuspendió en 10 mL de agua destilada y se volvió a centrifugar en las mismas condiciones. El precipitado se resuspendió en 640 μL de solución A. Se añadieron 6,4 μL de β -mercaptoetanol (1%) y 10 μL de zimoliasa 20T (15 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) y se incubó durante 1 h a 37° C. La mezcla se centrifugó 1' a 13000 rpm (16000g) en una centrífuga Heraeus Biofuge Pico (Sorvall) y al precipitado se le añadieron: 100 μL de solución 1 a 4° C, 200 μL de solución 2 y 150 μL de solución 3. Después de añadir cada solución se agitó la mezcla resultante y tras añadir la última se incubó en hielo 5'. Transcurrido este tiempo se centrifugó 5' a 13000 rpm (16000g) y el sobrenadante se traspasó a un eppendorf estéril. El ADN se precipitó con 2,5 volúmenes de etanol 96% y 1/10 del volumen recuperado tras la última centrifugación de acetato potásico 3 M. La mezcla se incubó a -20° C y tras 2 h se centrifugó 10' a 13000 rpm (16000g). El precipitado obtenido se lavó con etanol al 70%. Tras una nueva centrifugación de 5' a la misma velocidad el precipitado se dejó secar y se resuspendió incubándolo a 37° C en 25-30 μL de TE 1X.

Solución A: contiene sorbitol 0,9 M y EDTA 0,1M, pH 8.

Solución 1: contiene sacarosa 25 mM, EDTA 10 mM en tampón Tris-HCl 25 mM pH 8, 10 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ de ARNasa.

Solución 2: contiene NaOH 0,2 M y SDS 1 %. La solución se preparó justo antes de usarla.

Solución 3: contiene acetato potásico 3 M y ácido acético glacial 11,5 % (v/v).

Tampón TE 1X: contiene EDTA 1 mM y Tris-HCl 10 mM, pH 7,5.

7.5.- Extracción de ARN de *S. cerevisiae*.

Para la obtención de ARN total de levadura las células procedentes de cultivos en medios selectivos se recogieron mediante centrifugación durante 5' a 3500 rpm (1400g) en una centrífuga *ROTOFIX 32A (Hettich Zentrifugen)*. El precipitado se resuspendió en 10 mL de agua destilada, se centrifugó de nuevo, se congeló en N₂ líquido y se mantuvo a -80° C hasta su procesamiento.

7.5.1.- Procedimiento con fenol-cloroformo.

El precipitado obtenido en el apartado anterior se resuspendió en 400 µL de solución TES. Se añadieron 400 µL de fenol equilibrado (USB), se agitó y se incubó a 65° C durante 45' agitándolo a intervalos de 5-10'. Se centrifugó 5' a 13000 rpm (15500g) en una centrífuga *MIKRO 200R (Hettich Zentrifugen)* a 4° C. Se recuperó la fase hidrofílica, se volvió a añadir 400 µL de fenol equilibrado y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones de velocidad, temperatura y tiempo (este proceso se repitió hasta que la fase hidrofílica quedó totalmente limpia). Se le añadieron 400 µL de cloroformo, se agitó y se volvió a centrifugar otros 5' a 4° C y 13000 rpm (16000g). Se recuperaron 300 µL de la fase acuosa, se añadieron 30 µL de acetato potásico 3 M pH 5,3 y 1 mL de etanol 96% a -20° C y la mezcla resultante se incubó 1 h a -80° C. La suspensión se centrifugó 5' a 4° C, el precipitado se lavó con etanol al 70% y una vez seco se resuspendió en 50 µL de TE 1X.

Notas: Todas las soluciones y reactivos utilizados en este protocolo deben ser tratados con dietilpirocarbonato (DEPC), añadiendo 1 ml de este compuesto por cada litro de solución. A continuación se agitó enérgicamente para dispersar el producto y se autoclavó.

Fenol ácido: Se añade a una cantidad de fenol sólido (para análisis) agua destilada (DEPC). Se disuelve y se calienta a 55° C. Se repite el proceso hasta que el fenol esté saturado de agua.

Solución TES: contiene 0,5% SDS y 10 mM de EDTA en tampón Tris-HCl 10 mM a pH 7,5.

7.5.2.- Procedimiento mediante kit comercial.

En ocasiones las extracciones de ARN se realizaron utilizando el Kit comercial *Master Pure yeast ARN purification kit (Epicenter Biotechnology Madison WI, USA)*. Para la obtención de ARN de células procedentes de cultivos en medio YPD y vino a 10° en agitación en fase exponencial se siguió el protocolo definido por el fabricante. Sin embargo, si las células procedían de *velo de flor* o de cultivos en vino a 10° en agitación en fase

estacionaria el protocolo se modificó, añadiendo zimoliasa 20T ($10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) a la solución *Extraction Reagent* e incubando la mezcla 2 h a 30° C .

8.- Manipulación de ácidos nucleicos.

8.1.- Precipitación de ADN y ARN.

La precipitación de ácidos nucleicos se llevó a cabo mediante la adición a la solución que contenía el ácido nucleico de 1/10 volúmenes de acetato sódico 3 M y 2,5 volúmenes de etanol 96%. La mezcla se incubó un mínimo de 2 h a -20° C . Posteriormente se centrifugó la suspensión $5'$ a 4° C , el precipitado se lavó con etanol al 70% y el precipitado una vez seco se resuspendió en $50 \mu\text{L}$ de TE 1X.

Si el fragmento que se desea precipitar es de un tamaño inferior a 500 pb, el protocolo a seguir es igual salvo que a la solución de ADN se le añade la mitad del volumen de la solución que lo contiene de acetato amónico 7,5 M y se mantiene a -20° C durante un mínimo de 8 h.

8.2.- Digestión de ADN con enzimas de restricción.

Las digestiones se llevaron a cabo en el tampón y temperatura indicados por el fabricante añadiendo 1 U de enzima, para cantidades de ADN inferiores a 1 mg, o 5 U para cantidades superiores.

8.3.- Generación de extremos romos.

El rellenado de extremos $5'$ prominentes y la degradación de extremos $3'$ prominentes provocados por cortes de enzimas de restricción se realizaron usando la *polimerasa de Klenow (Roche)*. La reacción se llevó a cabo añadiendo, a la solución de ADN procedente de la digestión, 1 U de enzima por μg de ADN y dNTPs a una concentración final de $10 \mu\text{M}$. La reacción se incubó a 30° C durante $30'$. Posteriormente, se inactivó la enzima calentándola a 75° C durante $10'$.

8.4.- Desfosforilación de plásmidos.

Para la desfosforilación se añadió 1 U de *fosfatasa alcalina (Calf intestine phosphatase, Roche)* por cada 1-20 pg de ADN previamente digerido. Además se añadió tampón 10X, proporcionado por el fabricante a una concentración final de 1X. La mezcla se incubó a 37° C durante 1 h y la reacción se detuvo calentándola a 75° C durante $10'$.

8.5.- Ligación.

Para las ligaciones se utilizó la enzima *ligasa del fago T4* (Roche), añadiendo 1 U de enzima y utilizando el tampón proporcionado por el fabricante. La reacción se incubó al menos 12 h a una temperatura de 12-14° C, y se llevó a cabo en un volumen de 10 μL , intentando mantener una relación entre inserto y vector de 10:1. A las ligaciones con extremos romos se les añadieron 2 μL de PEG 8000 al 20% (p/v).

En el caso de realizar ligaciones de fragmentos de ADN con el vector pGEMt easy vector (*Promega*) se siguieron las instrucciones del fabricante.

8.6.- Tratamiento con ADNasa.

Para eliminar posibles restos de ADN en soluciones con ARN se añadieron 2 U de *DNAasa* (USB) ($2\text{U } \mu\text{L}^{-1}$) por cada μg de ARN. La reacción se llevó a cabo en un volumen de 10 μL y tras añadir el tampón proporcionado por el fabricante la mezcla se mantuvo durante 30' a 20-25° C. Para parar la reacción se añadió 1 μL de *stop solution* (USB) y se incubó 10' a 65° C.

8.7.- Cuantificación de ácidos nucleicos.

La concentración tanto de ADN como de ARN se determinó mediante espectrofotometría a $\text{D.O.}_{260\text{nm}}$ con un equipo *Nanodrop 1000*.

8.8.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

8.8.1.- Reacción convencional.

Estas reacciones se realizaron en un volumen final variable en función de la finalidad del experimento. Se mezclaron cebadores, dNTPS y tampón de la polimerasa a una concentración final de 0,5 μM , 0,5 mM y 1X respectivamente. Se añadió ADN molde a una concentración final de 5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (ADN genómico) y 0,5 $\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$ (ADN plasmídico), 1 U de *EcoTaq*® y agua *MilliQ* hasta el volumen final deseado. La concentración de MgCl_2 varió dependiendo del origen de la muestra de ADN. Sí era ADN genómico de levaduras la concentración final fue de 3 mM, mientras que sí se trató de un plásmido la concentración final fue de 1,5 mM.

8.8.2.- RAPD-PCR.

Para llevar a cabo este tipo de ensayo se utilizó el kit comercial *PureTaq Ready-To-Go PCR beads* (GE Healthcare Buckinghamshire UK) siguiendo las indicaciones del fabricante. Los

cebadores utilizados en este caso son comerciales (*Operon Technologies Primer Kit*) y se utilizaron a la misma concentración final descrita para una reacción de PCR convencional.

8.8.3.- Reacción con enzimas de alta fidelidad.

Se utilizó la enzima *Expand High Fidelity* (Roche) siguiendo las indicaciones del fabricante.

Estas tres reacciones se realizaron en un termociclador de gradiente térmico *TC-512* (techne) o bien en un termociclador *Progene* (Techne). Se realizó un primer ciclo a 94° C durante 2' y posteriormente 35 ciclos, cada uno de ellos con tres segmentos. El primero consiste en mantener la temperatura a 94° C durante 30", seguido de otro de 30" a una temperatura establecida empíricamente para cada pareja de cebadores, y, finalmente, otro de aproximadamente 1' por cada kilobase a amplificar a 72° C. Al final de estos 35 ciclos, se realiza un único ciclo de 7' a 72° C. La temperatura del último segmento en las reacciones con enzimas de alta fidelidad varía en función del tamaño del fragmento de ADN a amplificar, siendo esta de 68° C para tamaños superiores a 3 Kb.

8.8.4.- Reacción de rt-qPCR.

Para este tipo de reacciones se utilizó el método de un solo paso que consiste en la realización de la retrotranscripción del ARN a ADN copia y la PCR de forma consecutiva en un mismo pocillo de microplaca. Para ello el ARN purificado y diluido a una concentración de 100 ng · μL^{-1} se trató con *DNAse* (USB), según las indicaciones del fabricante. Una vez inactivada la ADNasa, se procedió a mezclar 100 ng de ARN, 1X *Brilliant® II SYBR® Green qPCR master mix* (Stratagene), 6,25 U de *MultiScribe™ Reverse Transcriptase* (Applied Biosystems), 1,25 U de *inhibidor de RNAsa* (Applied Biosystems) y 0,2 μM de cada uno de los cebadores en un volumen final de 20 μL de reacción. Las muestras se incubaron durante 30' a 48° C y a continuación se llevaron a cabo 40 ciclos de 15" a 95° C y 1' a 60° C para realizar las amplificaciones en un termociclador *AB 7500 system* (Applied Biosystems). Los datos se analizaron mediante el programa *Sequence Detection software v1.2.2* (Applied Biosystems). Cada señal de fluorescencia se normalizó con su correspondiente señal para el gen *ACT1* para eliminar posibles errores de carga.

También se utilizó el kit comercial *KAPA™ SYBR® FAST qPCR Kit. Master Mix* (2X) *AB Prism™* (KAPABIOSYSTEMS) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Del mismo modo se realizaron ensayos en otro termociclador, en este caso *LightCycler® 480II* (Roche). Este ofrece la posibilidad de analizar 384 muestras a la vez por lo

que los reactivos y volúmenes se ajustaron a las indicaciones del fabricante. Se utilizó el kit comercial *One Step SYBR[®] Prime Script[™] RT-PCR (Takara-bio INC)*. En un volumen final de 10 μL de reacción se mezclaron 50 ng de ARN purificado y tratado con *DNAse (USB)* con *2X One Step SYBR[®] RT-PCR Buffer* hasta una concentración final de 1X, 0,2 μL de *PrimeScript[™] RT enzyme Mix*, 1 U de *TaKaRa Ex Taq[™] HS (5 U \cdot μL^{-1})* y cada uno de los cebadores a una concentración final de 2 μM . Las muestras se incubaron durante 5' a 42° C y a continuación se llevaron a cabo 40 ciclos de 5" a 95° C y 20" a 60° C. Los datos se analizaron mediante el programa *LightCycler 480 software v1.5.0 SP3 (Roche)*. De nuevo se utilizó la señal del gen *ACT1* para normalizar los datos y eliminar errores de carga.

Los cebadores utilizados en estos experimentos de PCR se diseñaron con el programa *Primer Express[™] software v2.0.0 (Applied Biosystems)*.

8.9.- Obtención de ADN para cariotipos.

Se centrifugaron 15-20 mL de un cultivo de levadura creciendo en medio YPD en fase estacionaria durante 5' a 3500 rpm (1400g) en una centrífuga *ROTOFIX 32A (Hettich Zentrifugen)*. El precipitado de células se resuspendió en 5 mL de EDTA 50 mM pH 8 y se centrifugó de nuevo en las mismas condiciones. Al precipitado obtenido se añadieron 600 μL de tampón CPES y 600 μL de una solución de agarosa de bajo punto de fusión al 2% (p/v) en tampón CPE mantenida a 55° C. La mezcla se introdujo en los moldes para formar los tacos de agarosa y se dejó solidificar en hielo durante aproximadamente 5'. Una vez gelificados los tacos se pasaron a cajas de petri y se incubaron a 30° C durante 4 h cubiertos con tampón CPE. Posteriormente se desechó el tampón CPE, se cubrieron con 5 mL de tampón TESP y se incubaron durante toda la noche a 50° C. El tampón TESP se desechó y se realizaron tres lavados de 30' a 50° C y otros dos a temperatura ambiente, todos con 10 mL de tampón TE 1X. Tras el último lavado los tacos de agarosa se cubrieron con 10 mL de EDTA 50 mM pH 8 y se conservaron a 4° C hasta su uso.

Tampón CPE: contiene ácido cítrico 40 mM, fosfato sódico 120 mM y EDTA-Na 20 mM.

Tampón CPES: contiene ácido cítrico 40 mM, fosfato sódico 120 mM, EDTA-Na 20 mM, D-sorbitol 1,2 M, DTT 5 mM y zimoliasa 20T a 1 g \cdot L⁻¹. La zimoliasa se agregó justo antes de usar la solución.

Tampón TESP: contiene Tris-HCl 10 mM, EDTA-Na 450 mM, SDS 1% (p/v) y proteinasa K a 1 g \cdot L⁻¹. La proteinasa K se añadió después de calentar la solución a 50° C y justo antes de usarla.

8.10.- Separación de ácidos nucleicos.

8.10.1.- Electroforesis de ADN en geles de agarosa.

Los fragmentos de ADN se separaron mediante electroforesis en geles de agarosa a una concentración entre 0,8-1% (p/v), en función de los tamaños de los fragmentos a separar. La agarosa se añadió al volumen necesario de tampón TAE 1X, calentándose hasta que se disolvió en un microondas. Para poder visualizar el ADN, se añadió bromuro de etidio hasta una concentración final de $0,2 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ antes de que se produzca la gelificación de la solución. A las muestras se les añadió el volumen requerido de tampón de carga 6X. El gel con las muestras cargadas se sometió a un campo eléctrico de $5-12 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$.

TAE 1X: contiene EDTA 1 mM en Tris-acetato 40 mM pH 8.

Tampón de carga 6X: 0,25% (p/v) de Azul de bromofenol, 0,25% (p/v) xileno cianol FF y 15% Ficoll (PM = 400).

8.10.2.- Electroforesis de ADN en campo pulsante.

Los bloques de agarosa obtenidos en el punto 8.9 se cargaron en geles de agarosa al 0,9% (p/v) preparados en tampón TBE 0,5X. La electroforesis se llevó a cabo en una cubeta electroforética *CHEF- II (Bio-Rad)*, en la cual el tampón está circulando a través del sistema a una temperatura de 12°C . Las condiciones de voltaje fueron de 200 V ($6 \text{ V} \cdot \text{cm}^{-1}$) y las del tiempo de orientación del campo electromagnético dependieron del grado de separación deseado. Se utilizaron las siguientes programaciones: (I) un ciclo de 16 h con pulsos cada 70" seguido de otro ciclo de 12 h con cambios en el campo electromagnético cada 120" ó (II) un único ciclo de 28 h con un incremento gradual de los tiempos de cambio del campo que fueron desde los 70" hasta los 120". Sí se necesitó separar adecuadamente los cromosomas de alto peso molecular la programación se realizó en dos ciclos, el primero fue de 18 h con tiempos de cambio del campo eléctrico que fueron desde 240" hasta los 160", seguido de un nuevo ciclo de 22 h con cambios desde los 90" hasta los 60".

Una vez concluida la electroforesis se procedió a la tinción de los geles en una solución de bromuro de etidio $0,2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. La tinción se realizó durante 30', y posteriormente se realizaron varios lavados con agua destilada.

TBE 0,5X: contiene EDTA-Na 1 mM y Tris-borato 45 mM, pH 8.

8.11.- Purificación de ADN a partir de geles de agarosa.

La recuperación de ADN desde geles de agarosa o desde soluciones acuosas, se realizó con kits comerciales *GenElute® gel extraction kit (Sigma)*, *Axyprep DNA gel extraction kit (Axygen)* y *GFX™ (Amersham biosciences)* siguiendo las indicaciones del fabricante.

9.- Hibridación de sondas marcadas a ADN fijado en membrana.

9.1.- Transferencia de ADN a membranas.

9.1.1.- Transferencia de fragmentos de ADN.

El gel conteniendo los fragmentos de ADN se trató en un agitador *kf250 basic (Ika labortechnik)* a 50-75 rpm incubándolo durante 15' en solución de depurinización, 30' en solución desnaturizante y otros 30' en solución neutralizante. Entre soluciones se realizó un lavado con agua destilada. La transferencia se llevó a cabo mediante microcapilaridad. Sobre un soporte de metacrilato o cristal se colocaron dos tiras de papel *Whatman® 3MM* empapados en solución SSC 20X, quedando ambos extremos sumergidos en la misma solución. Sobre estas tiras se depositó el gel tratado, y sobre éste, una membrana *Hybond N (Amersham Pharmacia Biotech)* previamente humedecida con SSC 20X. Sobre la membrana y sin dejar burbujas se colocaron tres recortes de papel *Whatman® 3MM* humedecidos con SSC 20X del mismo tamaño que el gel, una pila de papel de filtro convencional del mismo tamaño del gel, y sobre estos, un peso aproximado de 500-1000 g. La transferencia se mantuvo más de 12 h, añadiendo un volumen de SSC 20X tal que evitó la evaporación total de los reservorios. Tras finalizar la transferencia se lavó la membrana con SSC 2X y se dejó secar. Para fijar el ADN a la membrana de forma covalente, ésta se irradió con luz ultravioleta ($70000 \mu\text{J} \cdot \text{cm}^{-2}$ *CrossLinker CL 1000, UVP*) una vez seca y se conservó hasta su utilización.

Solución de depurinización: contiene HCl 0,25 M.

Solución de desnaturización: contiene NaOH 0,5 M y NaCl 1,5 M.

Solución de neutralización: contiene Tris-HCl 1 M y NaCl 1,5 M, pH 7,5.

SSC20X: contiene citrato trisódico 0,3 M y cloruro sódico 3 M, pH 7-8.

9.1.2.- Transferencia de cromosomas.

El gel se trató de la misma forma que en el apartado anterior, pero el tiempo de incubación aumentó a 30' para la solución de depurinización y a 60' para las de desnaturización y neutralización. La composición de las soluciones no cambió salvo en el caso de la solución de neutralización.

Solución de neutralización: contiene Tris-HCl 0,5 M y NaCl 3 M. pH final de la solución a 7,5.

9.2.- Marcaje y cuantificación de sondas radiactivas.

13 μL de una solución conteniendo 25-50 ng de ADN sonda se incubó a 100° C durante 5'. Después se enfrió inmediatamente manteniéndola en hielo durante 2'. Se añadieron 2 μL de una mezcla de dATP, dGTP y dTTP a 0,5 mM de cada uno de ellos, 2 μL de un concentrado 10X de hexanucleótidos comerciales (*Roche*), 2 U de polimerasa de Klenow (*Roche*) y 2 μL de [α_{32}] dCTP (3000 $\text{C}_i \cdot \text{mmol}^{-1}$). Se incubó la mezcla un mínimo de 1 h a 37° C tras lo cual se procedió a eliminar los nucleótidos no incorporados haciendo pasar la muestra a través de una columna de *Sephadex G-50* (*Amersham*). Se tomó 1 μL de la solución recuperada y se depositó sobre una membrana *Millipore* en el fondo de un tubo de centelleo. Se añadieron 5 mL de solución de centelleo y se determinó el número de cpm de la sonda en un contador de centelleos (*Wallac 1409*). Una vez cuantificada, la sonda se desnaturalizó hirviéndola a 100° C durante 5' y se dejó enfriar en hielo durante 2'.

9.3.- Hibridación de ácidos nucleicos.

Las membranas con el ADN fijado se incubaron con 5 mL de solución de hibridación, durante 30' a 65° C con agitación en hornos de hibridación *HB-1000 Hibridizer* (*UVP Laboratory Products*). Seguidamente se añadió sonda hasta una cantidad mínima de radiactividad total de $10^6 \text{ cpm} \cdot \text{mL}^{-1}$ de solución de hibridación. La hibridación se realizó en agitación rotacional durante un mínimo de 12 h a 65° C. A continuación se retiró la solución de hibridación y se realizaron dos lavados de 5' a temperatura ambiente con 50 mL de solución de lavado, y un lavado de al menos 1 h con 50 mL de solución de lavado a 65° C y en agitación rotacional. La membrana se expuso en una película *Kodak Biomax MR* a -80° C en casetes de exposición evitando cualquier fuente de luz que no sea puramente roja.

Solución de hibridación: contiene tampón fosfato sódico 0,5 M a pH 7,5 y 7% de SDS.

Solución de lavado: contiene SSPE 0,1%, EDTA-Na 5 mM y SDS 0,5%.

Solución SSPE20X: contiene NaCl 3 M, NaH_2PO_4 0,2 M y EDTA 20 mM. Se mezclan los productos y se ajusta el pH a 7,4 con NaOH 10 M.

9.4.- Deshibridación de membranas.

En casos muy puntuales se procedió a la eliminación de la sonda fijada hirviendo el filtro en SDS 0,1% y SSPE 1X durante 10'. El proceso se repitió todas las veces necesarias hasta ser eliminada totalmente la señal.

10.- Citometría de flujo.

Se utilizaron dos equipos diferentes. Para medidas del contenido total de ADN se utilizó el modelo *Becton-Dickinson FACScalibur (BD and Company)* controlado a través del software *CellQuestPro* y para los ensayos de viabilidad, el citómetro modelo *Beckman Coulter, mod. CYTOMICS FC500-MPL* controlado a través del software *MXP*.

10.1.- Contenido en ADN.

Con objeto de determinar el contenido en ADN se centrifugó 1' a 13000 rpm (16000g) una solución conteniendo 10^7 - 10^8 células \cdot mL⁻¹ y se lavó dos veces con solución citrato. Se resuspendió en 1 mL de etanol 70%, y tras incubarse durante toda la noche a -20° C se tomaron 100 μ L de la suspensión de células fijadas y se centrifugaron de nuevo 1' a 13000 rpm (16000g). Se lavaron con 1 mL de solución citrato, se resuspendieron en 500 μ L de la misma solución y se añadieron 5 μ L de una solución de ARNasa 10. La mezcla se incubó durante toda la noche a 37° C sin agitación. Posteriormente se añadieron 25 μ L de una solución de proteinasa K y se volvió a incubar durante 1 h a 50° C. Se adicionó a la mezcla 0,1 μ L de *SYBR Green (SYBR Green I nucleic acid gel satín 10000x, Invitrogen S7585)* y se incubó toda la noche en oscuridad a 4° C. Antes de ser analizadas las muestras se sonicaron con varios pulsos de 3-4 segundos en un sonicador *Branson SONIFIER 250* para disgregar posibles complejos celulares.

Solución citrato: contiene citrato-Na 50 mM pH 7,8.

Solución ARNasa10: contiene ARNasa a 10 g \cdot L⁻¹.

Solución proteinasa K: contiene proteinasa K a 1 g \cdot L⁻¹.

10.2.- Viabilidad

Para determinar la viabilidad celular se lavó dos veces una suspensión conteniendo 10^6 – 10^7 células con agua destilada centrifugando durante 30" a 13000 rpm (16000g). El precipitado se resuspendió en 1 mL de agua destilada y se añadieron 3 μ L de solución de Oxonol. La mezcla se incubó durante 20' en oscuridad a temperatura ambiente tras lo cual se realizaron las medidas en el citómetro de flujo.

Solución de Oxonol: contiene Oxonol (*Invitrogen B438*) a $0,5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ diluido en DMSO al 99,9%. La solución se conservó en oscuridad a -20°C .

10.3.- Viabilidad tras la desecación.

Se centrifugaron 5 mL de cultivo de células creciendo en el medio selectivo deseado a 3500 rpm (1400g) durante 5' en una centrífuga *ROTOFIX 32A (Hettich Zentrifugen)*. El precipitado se lavó dos veces con 10 mL de agua destilada y se resuspendió en otros 10 mL de agua destilada los cuales se filtraron a través de filtros *Millipore* de un diámetro de poro igual a $0,45 \mu\text{m}$. Las pastillas de levadura filtrada obtenidas se introdujeron en cajas de petri y se incubaron toda la noche a 30°C . Al día siguiente se rehidrató una pequeña porción de la pastilla de levadura seca en un tubo eppendorf con 1 mL de agua destilada precalentada a 37°C y la solución se incubó durante 10' a 37°C . Las células se tiñeron con solución de Oxonol, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 10.2, tras lo cual se realizaron las medidas en el citómetro de flujo.

11.- Determinación de hidratos de carbono.

11.1.- Determinación de azúcares reductores.

11.1.1.- Procedimiento químico (Nelson, 1957 y Somogyi, 1952).

A 150 μL de muestra se le añadieron 150 μL de Reactivo de Somogyi. Se agitó suavemente y se incubó a 95°C durante 10'. La mezcla se incubó en hielo durante 15' tras lo cual se añadieron 150 μL de Reactivo de Nelson. Se agitó vigorosamente hasta eliminar todo el gas que se produce en la reacción, se adicionaron 1,5 mL de agua destilada y se incubó 15' a temperatura ambiente, tras lo cual se midió la absorbancia a 520 nm.

La cantidad de azúcares reductores se extrapola a partir de una recta realizada con cantidades crecientes de glucosa (entre 0 y 350 μg) en agua destilada.

Solución Somogyi I: 1 L de solución contiene $\text{C}_4\text{H}_4\text{KNaO}_6 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 50 mM, Na_2CO_3 0,3 M, NaHCO_3 0,2 M y 500 mL de Na_2SO_4 al 36% (p/v) desgasificado.

Solución Somogyi II: 250 mL de solución contienen $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 80 mM y Na_2SO_4 1,2 M.

Reactivo Somogyi: Se mezclan 4 partes de solución Somogyi I por una parte de solución Somogyi II justo antes de usar.

Reactivo de Nelson: 250 mL de solución contienen $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 40 mM, 10,5 mL de H_2SO_4 concentrado y $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,4 M. Se mantiene durante 48 h a 37°C . Este reactivo se almacena a temperatura ambiente, en recipientes protegidos de la luz. Debe manejarse con guantes debido a su toxicidad.

11.1.2.- Determinación mediante kit comercial.

En algunas ocasiones también se llevaron a cabo ensayos de cuantificación residual de azúcares reductores en microvinificaciones mediante un glucosímetro y el kit comercial *MegaQuant™ D-FRUCTOSE plus D-GLUCOSE Assay Kit (Megazyme Internacional Ireland Limited)* siguiendo las indicaciones del fabricante.

12.- Determinación de etanol, glicerol, acetaldehído y ácido acético.

Se procedió a su determinación mediante los kits comerciales *Ethanol, Glycerol, Acetaldehyde y Acetic acid assay (Boehringer Mannheim-R.biofarm.Roche)*. Se siguieron las instrucciones del fabricante salvo que se escalaron los volúmenes a la mitad.

13.- Determinación de asimilación y fermentación de azúcares.

Las pruebas de asimilación se realizaron en medio mínimo líquido suplementados con una solución de púrpura de bromocresol al 0,8% (v/v) y con 20 g·L⁻¹ de glucosa, galactosa, rafinosa, lactosa, maltosa y sacarosa en cada caso. Para las pruebas fermentativas las cepas se inocularon en medio líquido conteniendo extracto de levadura 20 g·L⁻¹ y 20 g·L⁻¹ de glucosa, galactosa, lactosa, maltosa o sacarosa o 40 g·L⁻¹ de rafinosa. La lactosa se usó como control negativo del ensayo y el púrpura de bromocresol como marcador de la capacidad de asimilación y fermentación; si las cepas crecían se produciría un cambio en el pH del medio lo que produciría un cambio en el color del indicador colorimétrico, pasando de púrpura a amarillo.

Solución de púrpura de bromocresol: púrpura de bromocresol 0,4% en etanol 96%.

14.- Determinación del contenido en aminoácidos.

14.1.- Obtención de muestras.

En función del volumen de la muestra, las células procedentes tanto de cultivos en medio SD como de cultivos en medios industriales (mosto) se centrifugaron 10' a 4500 rpm, 3500 rpm o 13000 rpm (3900, 1400 y 16000g respectivamente). El sobrenadante y el precipitado resultantes se utilizaron para la determinación de la concentración extracelular e intracelular de aminoácidos.

14.2.- Concentración extracelular.

El sobrenadante del punto anterior se incubó durante 15' a 100° C, tras lo cual se filtró a través de un filtro *Millipore* de un diámetro de poro de 0,45 µm y se congeló a -20° C hasta su determinación.

14.3.- Concentración interna.

El precipitado del punto 14.1 se lavó tres veces con agua *MilliQ* (con doble destilación). El precipitado se resuspendió en 1 mL agua *MilliQ* y se incubó durante 15' a 100° C. Se centrifugó a 13000 rpm (16000g) durante 15' y se recuperó el sobrenadante, el cual se congeló a -20° C hasta su uso.

14.4.- Derivatización de las muestras.

El derivatizante utilizado fue AQC (6-aminoquinolil-N-hidroxisuccinimildil carbamato), siguiendo las indicaciones del fabricante *Waters AccQ-Tag Chemistry Package Instruction Manual (Millipore)*.

14.5.- Condiciones de cromatografía.

La separación de los aminoácidos se realizó en un *HPLC Waters Alliance 2695*. Las muestras se inyectaron de forma automática y fueron separadas a través de una precolumna (*WAT044380*) y un columna de fase reversa *AccQ-Tag column 3.9 x 150 mm (WAT052885)*. Precolumna y columna se mantuvieron a 37° C, y el gradiente de solventes empleados (Tabla 5) permite la separación de los distintos aminoácidos. La detección se realizó mediante un detector de fluorescencia *Waters 474*. Para el control del sistema y el análisis de los resultados se utilizó el software *Millenium 32 v3.2* para PC.

Como patrones se utilizaron 5 diluciones de una solución equimolar de aminoácidos en HCl (*Amino Acid Standard H, Pierce*).

Tabla 5.- Gradiente aplicado para la separación de aminoácidos. El registro de cada cromatograma se extiende a lo largo de 47 minutos. Después del último cromatograma el gradiente se mantiene hasta el minuto 100, para mantener el equipo en espera.

Tiempo (min)	Flujo (mL · min ⁻¹)	% Solvente A ¹	% Solvente B ²	% Solvente C ³
0	1	100	0	0
0,5	1	99	1	0
18	1	95	5	0
19	1	91	9	0
29,5	1	83	17	0
35,00	1	0	60	40
38	1	100	0	0
60	1	0	60	40
100	1	0	60	40

¹ Eluyente A diluido 10 veces (*AccQ-Tag Wat052890*).

² Acetonitrilo puro y con grado HPLC (*Scharlau, AC03332500*).

³ H₂O *MilliQ*

15.- Determinación del contenido de compuestos volátiles.

15.1.- Determinación de ésteres superiores.

El instrumental analítico fue un Cromatógrafo de gases *HP 5890 Serie II* equipado para columnas capilares con inyector Split/Splitless y detector de ionización de llama. Inyector automático *Agilent G2916A* y columna tipo capilar en sílice fundida de fase *CP-WAX-57CB* específica para glicoles y alcoholes de 25 m de longitud con diámetro interior de 0,25 mm y espesor de película de 0,2 µm. Como patrón interno se utilizó una solución de Undecanoato de Etilo 1% (v/v) en etanol al 100%. Las muestras obtenidas tras la fermentación se destilaron, se pusieron en graduación alcohólica entre 50% y 55% (v/v) y se le adicionó solución de Undecanoato de Etilo 1% (v/v) al 2% (v/v). Las condiciones de trabajo se describen en la Tabla 6.

15.2.- Determinación de aldehídos, acetales, cetonas y alcoholes.

En este caso el instrumental analítico utilizado fue un cromatógrafo de gases *HP 5890 Serie II* equipado con inyector para columnas empaquetadas y detector de ionización de llama. Inyector automático *Agilent G2916A* y columna empaquetada de 3 m de longitud y 1/8 de pulgada 0,2% *CARBOWAX 1500* sobre *CARBOPACK C*. Como patrón interno se utilizó una solución de 3-Pentanol en etanol al 100% al 10% (v/v). Las muestras

obtenidas tras la fermentación se destilaron y se adicionó al 1% solución de 3-Pentanol al 10%. Las condiciones de trabajo se describen en la Tabla 6.

Tabla 6.- Condiciones de trabajo establecidas para la identificación de los diferentes compuestos involucrados en el aroma de mostos fermentados.

Condiciones de trabajo	Ésteres superiores	Aldehídos, cetonas, acetales y alcoholes
Temperatura inicial	45° C	50° C
Tiempo inicial	20 minutos	8 minutos
Rampa	3° C/minuto	6° C/minuto
Temperatura final	195° C	150° C
Tiempo final	10 minutos	16 minutos
Temperatura inyector	259° C	250° C
Temperatura detector	300° C	250° C
Gas portador	Nitrógeno	Nitrógeno
Flujo total de nitrógeno	80 mL/minuto	
Flujo de nitrógeno a través de la columna	2 mL/minuto	
Presión en la cabeza de la columna	12 PSI	
Flujo de nitrógeno como gas auxiliar	45 mL/minuto	
Flujo de nitrógeno en purga de septum	2 mL/minuto	
Flujo de nitrógeno en salida de Split/Splitless	76 mL/minuto	
Presión manorreductor de nitrógeno	6 Kg/cm ²	
Tipo de inyección	Splitless	
Tiempo de Splitless: apertura/cierre de válvula	1/0 minutos	
Volumen de inyección	0,5 µl	0,5 µl
Tipo de detector	Ionización de llama (FID)	Ionización de llama (FID)
Gases de la llama	Hidrógeno/Aire	Hidrógeno/Aire
Flujo de hidrógeno	40 mL/minuto	35 mL/minuto
Presión manorreductor de hidrógeno	2 Kg/cm ²	
Flujo de aire	400 mL/minuto	350 mL/minuto
Presión manorreductor de aire	3 Kg/cm ²	

La cuantificación se realiza mediante curvas de calibración de cada uno de los compuestos identificados por la adición de cantidades conocidas de los diferentes compuestos en soluciones al 50% etanol/agua a la cual se le adiciona 2% de la solución de Undecanoato de Etilo al 1% para ésteres superiores y un 1% de la solución de 3-Pentanol al 10% para aldehídos, acetales, cetonas y alcoholes.

Todos los análisis organolépticos fueron realizados por la empresa bodeguera Beam Global S.A.

16.- Determinación del contenido interno de glutatión.

Se procedió a su determinación mediante el kit comercial *ApoGSHTM Glutathione Colorimetric Detection Kit* (Biovision Research Products). Se siguieron las instrucciones del fabricante.

17.- Determinación de los niveles de peroxidación de lípidos de membrana.

Se procedió a su determinación mediante el kit comercial *OxiSelectTM TBARS Assay Kit (MDA Quantitation)* (Cell Biolabs, INC) siguiendo las indicaciones del fabricante.

18.- Determinación de la sensibilidad a zimoliasa.

Se realizó un preinoculo de una colonia de levadura en tubos de ensayo de 25 mL conteniendo 5 mL de YPD y se incubó a 30° C en agitación durante toda la noche. Se midió la D.O._{660nm} del cultivo y se reinoculó a D.O._{660nm} 0,1 en 5 mL del medio donde se quería estudiar el comportamiento celular (YPD o vino a 10°). Se incubó a 30° C en agitación y cuando el cultivo alcanzó la fase de crecimiento deseada (exponencial o estacionaria) se centrifugó 5' a 3500 rpm (1400g) en una centrífuga *ROTOFIX 32A (Hettich Zentrifugen)*. El precipitado se lavó dos veces con 5 mL de agua destilada, se resuspendió en 5 mL de solución 1 y se midió la D.O._{660nm}. Posteriormente se añadieron 190 µL de la solución 2 y se incubó a 30° C sin agitación. Se realizaron medidas periódicas de D.O._{660nm} y los valores obtenidos se relativizaron al valor de D.O._{660nm} inicial para cada cepa. La cepa será más resistente cuanto mayor sea el % de D.O._{660nm}.

Solución 1: contiene NaCl 150 mM, 5 mM de EDTA y 4% de PEG 8000 en tampón Tris-HCl 50 mM a pH 7,5.

Solución 2: contiene zimoliasa 20T a 8 mg · mL⁻¹.

19.- Obtención y manipulación de proteínas.

19.1.- Extracción de proteínas.

19.1.1.- Extractos totales.

Las células procedentes de los diferentes medios de cultivo y en las diferentes fases de crecimiento se centrifugaron 5' en una centrífuga *MIKO 200R (Hettich Zentrifugen)* a 3500 rpm (1100g) y 4° C. El precipitado se lavó varias veces con agua destilada y tras el último ciclo de centrifugación el volumen de células obtenido se resuspendió en 4 volúmenes de

agua *MilliQ* a 4° C, se centrifugó 5' a 1500 rpm (500g) y 4° C en la misma centrífuga y, tras desechar de nuevo el sobrenadante, el precipitado se resuspendió en 3 volúmenes de tampón de extracción. La mezcla resultante se incubó a 30° C un tiempo variable (40' si las células procedían de cultivos en medio YPD o en vino con 10° de etanol y en fase exponencial y 2 h si se había realizado en vino con 10° y las células se habían recogido en fase estacionaria o si procedían de *velo de flor*). Tras la incubación se añadieron 4 volúmenes de bolas de vidrio (*Glass Beads 425-600 micras (Sigma)*), se agitó en el *Fast Prep.-24 (MP_{TM}) 60"* a $6,5 \text{ m} \cdot \text{s}^{-1}$ y se incubó en hielo 2'. Tras repetir este paso otras 3 veces se dejó decantar la mezcla en hielo y se recuperó el sobrenadante. Al precipitado resultante se le añadieron 3 volúmenes de tampón de extracción, se agitó en un vortex durante 10', se dejó decantar de nuevo y se volvió a recuperar el sobrenadante. Dicho sobrenadante unido al obtenido anteriormente se centrifugó a 12000 rpm (13200g) y 4° C durante 1 h en una centrífuga *MIKO 200R (Hettich Zentrifugen)*. Se desechó el precipitado y el sobrenadante se mantuvo a -20° C.

Notas: 1 volumen corresponde a la diferencia (en mL) de peso existente entre el eppendorf con el precipitado de células y vacío.

Tampón de extracción: contiene Tris-HCl 20 mM pH 7,9, MgCl₂ 10 mM, EDTA 1mM, glicerol 5%, DTT 1 mM, Sulfato amónico 0,3 M, PMSF 1 mM, Proteasa inhibitor mix 1X (*Protease inhibitor cocktail tablets (CompleteTM Mni; Roche)*) y zimoliasa 20T 10 mg · mL⁻¹.

19.1.2.- Fracción mitocondrial.

La fracción proteica mitocondrial se obtuvo mediante el kit comercial *Mitochondrial/Cytosol Fractionation Kit (Vionvision Research Products)* siguiendo las indicaciones del fabricante. El sobrenadante obtenido se conservó a -20° C.

19.2.- Cuantificación de proteínas.

Las proteínas se cuantificaron siguiendo el método descrito por Bradford en 1976 utilizando el reactivo *BioRad Protein Assay, BioRad*.

A 100 µL de las muestras se le añadieron 700 µL de agua destilada y 200 µL de reactivo de Bradford. Tras incubar 10' a temperatura ambiente se midió la D.O._{595nm}. La concentración se determinó infiriéndola de una recta patrón realizada con seroalbúmina bovina (de 0 a 20 µg).

19.3.- Ensayos de actividad enzimática.

19.3.1.- Actividad catalasa, glutatión peroxidasa y glutatión reductasa.

Se procedió a su determinación mediante los kits comerciales *Catalase*, *Glutathione Peroxidase* y *Glutathione Reductase Assay Kit* (*Biovision Research Products*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

19.3.2.- Actividad superóxido dismutasa mitocondrial.

Se procedió a su determinación a partir de la fracción proteica mitocondrial mediante el kit comercial *Superoxide Dismutase Activity Assay Kit* (*Biovision Research Products*) siguiendo las indicaciones del fabricante.

19.3.3.- Actividad superóxido dismutasa citoplasmática.

Se procedió a su determinación a partir de extractos totales de proteínas mediante el kit comercial *SOD Determination kit* (*Sigma-Aldrich*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

20.- Cinética de formación de *velo de flor*.

A medida que se forma el *velo de flor* la absorbancia del cultivo aumenta, por lo que para realizar un análisis cuantitativo de la velocidad de formación de velo se realizaron medidas de D.O._{660nm} a cultivos en microplacas de 96 pocillos. En estos pocillos se inocularon 200 µl de vino con diferente grado alcohólico y concentraciones celulares iniciales. Las microplacas se incubaron sin agitación a 22 y 30° C y las lecturas de la absorbancia se realizaron con un lector *Microplate Reader Expert Plus* (*Asys Hitech GmbH Eugendorf Austria*). Los datos se procesaron con el software *DigiRed 2.0*.

Simultáneamente, se realizó un análisis visual de la formación del velo, asignando valores arbitrarios de 0,5 puntos (velo en islotes), 1 punto (velo liso o en pandereta), 2 puntos (velo rugoso).

21.- Obtención de cepas industriales auxótrofas para aminoácidos.

Para llevar a cabo dicho proceso se utilizó la técnica denominada “short flanking homology” (SHF) (Baudin et al, 1993; Guldener et al, 1996; Wach et al, 1994) con varias modificaciones. Ésta consiste en la eliminación de secuencias del genoma mediante transformaciones con casetes integrativos. Dichos casetes están compuestos por un gen marcador flanqueado por secuencias loxP y por secuencias de alrededor de 30-50 pb de ADN homólogo al locus que se quiere interrumpir. Como marcador de selección se

utilizan genes que confieren resistencia a antibióticos, normalmente el gen *KanMX4*, el cual confiere resistencia al antibiótico geneticina.

La obtención de los casetes se realiza utilizando un plásmido que contiene dicho gen de resistencia como molde en una reacción de PCR con los distintos cebadores diseñados para el casete. Estos cebadores poseen unas 20 pb de homología a los sitios loxP y 40 pb de homología a la zona definida para la recombinación homóloga (Figura 4).

El proceso consiste en la transformación de la cepa parental con el casete integrativo. Éste, por recombinación homóloga, sustituye la copia silvestre del gen por el gen marcador gracias a las regiones de homología presente en los extremos del casete, creando así una copia mutada no funcional del gen (Figura 4).

Para verificar la interrupción se llevan a cabo experimentos de PCR utilizando como molde de la reacción ADN genómico de cada candidato. Se diseñan pares de cebadores que hibridan fuera del gen a interrumpir (Figura 4; cebadores F1 y F2) y en el gen marcador (Figura 4; cebadores D1 y D2). Así, mediante experimentos de PCR usando combinaciones de estos cuatro cebadores se seleccionan clones que albergan la inserción de forma correcta.

Para eliminar el marcador del casete integrativo en los clones seleccionados se realiza una nueva transformación con el plásmido YEp351-cre-cyh (Figura 4).

La expresión de la recombinasa Cre en medio YPGal durante 4 h a 30° C provoca la escisión del gen marcador mediante recombinación entre las secuencias loxP (Figura 4). Los nuevos transformantes se seleccionan en medio suplementado con antibióticos y, mediante una nueva reacción de PCR con los mismos pares de cebadores usados anteriormente, se comprueba la ausencia del casete.

Tras las consiguientes comprobaciones moleculares y fisiológicas de los mutantes seleccionados, en cepas haploides el proceso finaliza en este punto, pero según el contenido total de ADN de la cepa utilizada en el estudio y el número de copias interrumpidas en un mismo suceso de transformación, existe la posibilidad de tener que repetir esta técnica varias veces.

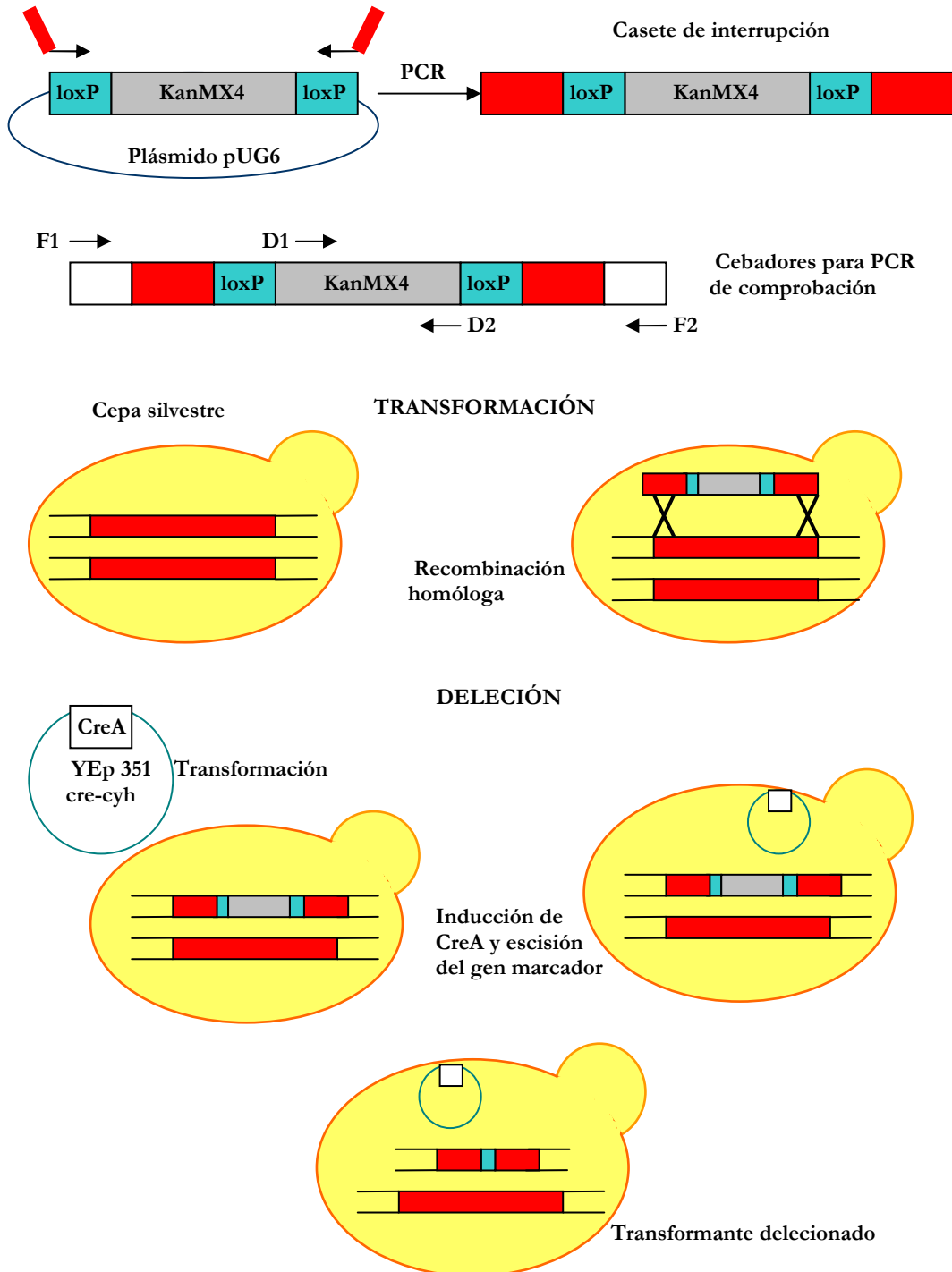


Figura 4.- Esquema representativo de la técnica SHF y localización de los cebadores para la PCR de comprobación. Adaptada de Uber-García G, 2005 tesis doctoral.

Capítulo I:
**Modificación genética de levaduras vínicas fermentativas para mejorar
el aroma (las propiedades organolépticas) en vinos de crianza
biológica.**

Introducción

1.- El aroma de los vinos.

1.1.- Generalidades.

Se define el aroma como “el conjunto de impresiones sensoriales tales como olor, sabor, incorporando además aspectos de textura, acidez, intensidad alcohólica, astringencia, dulzura, amargura, etc.” (Robinson, 1994).

En el vino, el aroma está determinado por varios cientos de compuestos volátiles de diversa naturaleza química. Entre ellos se han caracterizado alcoholes, ésteres, aldehidos, cetonas e hidrocarburos (Guadagni et al, 1963).

La concentración de estos compuestos en el producto final depende de numerosos factores asociados al cultivo de la uva tales como el clima, el suelo, el riego y el momento de la vendimia, así como de las numerosas variables del proceso de fermentación (pH, temperatura, nutrientes y microflora) y de las operaciones que integran la elaboración del vino como los procesos de filtración o clarificación entre otros.

Dependiendo del origen de los compuestos que lo constituyen, en el perfil de un vino encontramos tres aromas diferenciados; primario, secundario y terciario (Schreier, 1979; Rapp, 1998).

El denominado aroma “varietal o primario” está formado por componentes procedentes de la uva. Éstos son los que predominan en el mosto y son los responsables del aroma del mismo. Dependiendo de la variedad de uva y de las condiciones geográficas y climatológicas donde se haya cultivado la vid, las características del aroma y su intensidad pueden variar. Los compuestos volátiles que contribuyen al aroma de la uva son principalmente ésteres del ácido acético y monoterpenos tales como linalol, geraniol, nerol, citronerol, α -terpineol y hotrienol (Rapp & Mandery, 1986).

El “fermentativo o secundario” es el aroma que se produce como consecuencia del metabolismo de las levaduras o bacterias implicadas en la fermentación. En un proceso de fermentación alcohólica con la levadura *S. cerevisiae*, a una concentración inicial de azúcares reductores del 20% (p/v), el 4% de azúcar reductor se convierte, generalmente en compuestos de naturaleza volátil (Lambrechts & Pretorius, 2000), con dos tipos de compuestos relevantes, los alcoholes y los ésteres (Rapp & Mandery, 1986). Además, también sintetizan otros compuestos aromáticos minoritarios que incluyen aldehidos producidos por la oxidación de los alcoholes (acetaldehido), cetonas y ácidos orgánicos con un impacto sensorial muy débil (acetona, acetoína, 2, 3-pentadiona y ácido acético), fenoles procedentes del metabolismo de la microflora o bien de la hidrólisis de polifenoles

presentes en la uva (4-vinilfenol, 4-vinilguiacol), y compuestos orgánicos sulfurados derivados del metabolismo de aminoácidos azufrados (SH₂) (Lambrechts & Pretorius, 2000) (Figura I.1).

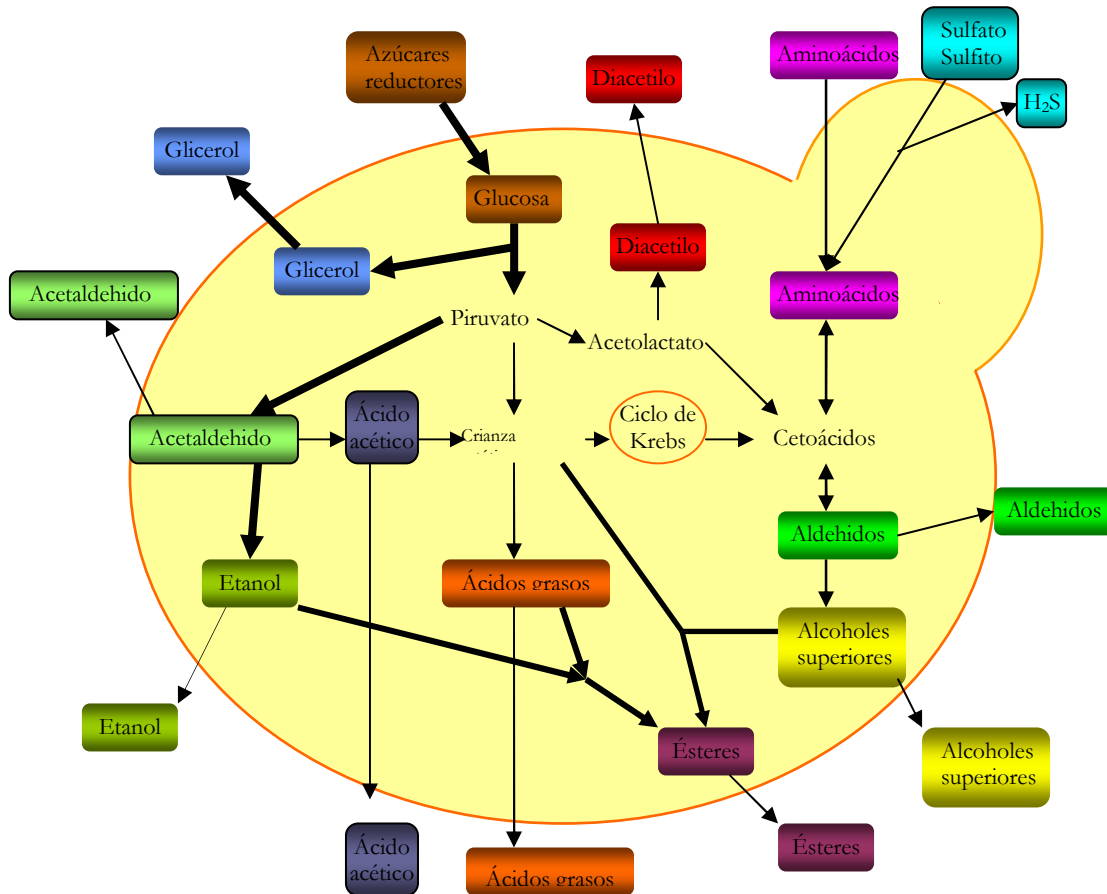


Figura I.1.- Esquema representativo de las distintas rutas metabólicas implicadas en la síntesis de compuestos aromáticos en levaduras. Adaptada de Swiegers & Pretorius, 2005.

Por último, el aroma “terciario, post-fermentativo o bouquet”, es consecuencia de la crianza biológica o fisicoquímica y del intercambio de componentes con la madera de las botas en las que se realiza la crianza. Según el envejecimiento se distinguen dos tipos de “bouquet”, el de oxidación, cuando el proceso tiene lugar en bodega de madera y el de reducción, característico del envejecimiento en botella. El primero es el que deriva de la síntesis de acetaldehídos y/o acetales y de la extracción de compuestos procedentes de la madera, así como de la difusión del oxígeno a través de los poros de la misma. Se forman así compuestos fenólicos que provienen de la degradación de la lignina de la madera, o lactonas como la 3-metil- ζ -octalactona (Masuda & Nishimura, 1971) (Apéndice I).

A pesar de esta diversidad de fuentes el aroma final y característico de cada tipo de vino se atribuye mayoritariamente a los compuestos sintetizados por la levadura vínica a lo largo de la fermentación alcohólica (Mauricio et al, 1993; Lilly et al, 2000).

1.2.- El aroma en los vinos tipo *Fino*.

Como consecuencia del proceso de elaboración (ver Introducción General), las propiedades organolépticas finales en este tipo de vino dependen de numerosos factores. En este caso el aroma “fermentativo” y “post-fermentativo” adquieren un papel fundamental. Una vez finalizada la fermentación las concentraciones de compuestos aromáticos en los vinos cambian debido a la crianza biológica a la que son sometidos (Chaves et al, 2007; Moreno et al, 2005; Moyano et al, 2009). La concentración de acetaldehído y sus derivados aumenta debido al consumo de etanol por parte de las levaduras formadoras de *velo de flor*. Éstas, además consumen glicerol, ácido acético, acetato de etilo, etc (Martínez De La Ossa et al, 1987; Mauricio et al, 1997; Martínez et al, 1998) causando cambios en las concentraciones de dichos compuestos y por tanto en el aroma final. Cada raza de levadura de flor tiene un metabolismo característico por lo que, además de factores ambientales, como la temperatura, la distribución de éstas en las diferentes bodegas es determinante en el aroma del producto final (Domecq, 1989). A esto hay que añadir los cambios organolépticos producidos por el intercambio de compuestos entre el vino y la madera de roble americano de las botas donde se realiza la crianza (Arapitsas et al, 2004).

Se han descrito más de cincuenta compuestos aromáticos presentes en este tipo de vino (Apéndice I). Entre ellos podemos diferenciar alcoholes, aldehídos, ácidos, ésteres, acetatos, lactosas, fenoles y acetaldehído con sus derivados (Moyano et al, 2009). De todos ellos, los ésteres volátiles con fragancias aromáticas y sus correspondientes precursores alcohólicos se consideran los más importantes, aunque el aroma final depende de la mezcla de todos ellos y la proporción en la que se encuentren (Pisarnitskii, 2001; Lambrechts & Pretorius, 2000; Verstrepen et al, 2003b; Verstrepen et al, 2003c).

2.- Principales compuestos aromáticos implicados en las propiedades organolépticas del vino tipo *Fino*: síntesis y regulación en la levadura fermentativa *S. cerevisiae*.

2.1.- Alcoholes superiores o alcoholes de fusel.

El término alcoholes superiores hace referencia a aquellos que poseen más de dos átomos de carbono y un peso molecular y punto de ebullición superiores al del etanol (Lambrechts & Pretorius, 2000). Cuantitativamente constituyen el primer grupo de compuestos aromáticos en las bebidas alcohólicas. Pueden alcanzar concentraciones elevadas ($100\text{-}300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$), pero cuando se superan los $400\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ el efecto en el aroma comienza a ser poco deseado (Rapp & Mandery, 1986). Se clasifican en dos grupos; alifáticos y aromáticos. Dentro de los alifáticos encontramos el propanol, isobutanol, hexanol e isoamil alcohol, siendo éste último el más importante cuantitativa y cualitativamente. Los alcoholes aromáticos incluyen el tirosol, el triptofol y el 2-feniletanol (Apéndice I). Además de la repercusión sobre las propiedades organolépticas del vino, que puedan tener por sí mismos, la importancia de estos alcoholes radica en ser los precursores de los ésteres de acetato.

La síntesis se produce por dos vías diferentes. Por catabolismo de aminoácidos a través de la ruta Ehrlich y por nueva síntesis, utilizando glucosa como sustrato. La ruta Ehrlich consiste en la transaminación del aminoácido, formando un α -cetoácido, que posteriormente se descarboxila. El aldehído formado se oxida o reduce, formándose el ácido o el alcohol correspondiente (Hazelwood et al, 2008). Una característica de esta ruta es la presencia de numerosas isoenzimas capaces de catalizar cada uno de los pasos de la misma. En total se han descrito 4 transaminasas, 4 descarboxilasas, 16 oxidasas y 6 reductasas (Figura I.2-A). La regulación de la mayoría de estas enzimas ocurre tanto a nivel trascricional como postraducciona. Por ejemplo, los genes que codifican las enzimas Aro9p y Aro10p están regulados por la actividad del factor transcricional Aro80p (Iraqi et al, 1999) y a nivel postraducciona tanto por fuente de carbono como por nitrógeno, ya que la sobreexpresión de Aro10p en un medio con glucosa y amonio no produce un aumento en la actividad enzimática. Sin embargo, en presencia de etanol y fenilalanina si se observa un incremento en dicha actividad (Vuralhan et al, 2005).

Los principales aminoácidos catabolizados son leucina, valina, isoleucina, metionina y aminoácidos aromáticos, y los alcoholes generados son el isoamílico (3-metilbutanol), isobutanol (2-metilpropanol), 2-metilbutanol, metionol, 2-feniletanol, tirosol y triptofol,

respectivamente (Dickinson et al, 1998; Dickinson et al, 1997; Dickinson et al, 2000; Dickinson et al, 2003; Hazelwood et al, 2008) (Apéndice I).

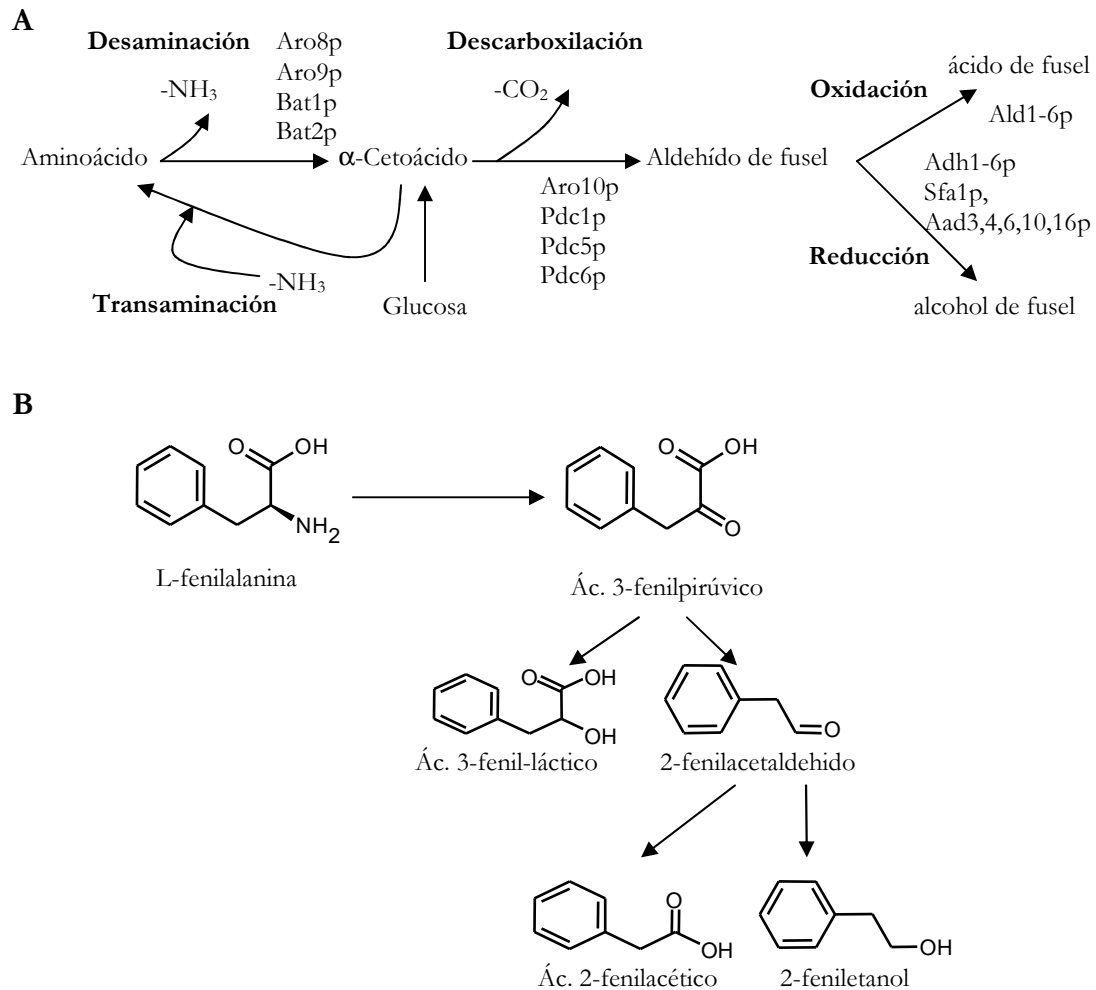


Figura I.2.- Esquema general de la síntesis de alcoholes de fusel y enzimas implicadas (A) y ruta de síntesis de 2-feniletanol en levaduras (B). Adaptada de Dueñas-Sánchez tesis doctoral, 2010.

De todos los alcoholes, uno de los más importantes en el aroma final es el 2-feniletanol. Debido a su aroma a rosas, el 2-feniletanol se utiliza en la industria como componente de cosméticos y perfumes, y como aditivo en helados, golosinas, etc (Huang et al, 2001; Etschmann et al, 2002). Enológica mente su presencia está relacionada con la calidad de vinos y destilados, ya que confiere un aroma floral deseable (Lambrechts & Pretorius, 2000). Este alcohol procede principalmente del catabolismo de la fenilalanina a través de la ruta Ehrlich (Figura I.2-B). La desaminación la realizan Aro8p ó Aro9p (Iraqi et al, 1998). Se genera fenilpiruvato, que posteriormente se descarboxila formando fenilacetaldehído. Esta reacción la lleva a cabo principalmente Aro10p, aunque también pueden estar implicadas Pdc1p, Pdc5p y Pdc6p, ya que un mutante con estas cuatro

descarboxilasas interrumpidas pierde la capacidad de sintetizar 2-feniletanol (Vuralhan et al, 2003). Por reducción del grupo cetónico, parte del 3-fenilpiruvato puede formar 3-fenil-lactato, aunque no se ha determinado cuál es la enzima responsable (Dickinson et al, 2003). Dependiendo del estado redox, a partir del fenilacetaldehído se produce o bien oxidación por las aldehído deshidrogenasas, generándose 2-fenilacetato o bien reducción, reacción catalizada por las alcohol deshidrogenasas (Vuralhan et al, 2003), formándose 2-feniletanol.

2.2.- Ésteres.

Los ésteres son compuestos volátiles que se producen durante la fermentación generando un aroma favorable en las bebidas alcohólicas. Se suelen agrupar en dos grandes grupos; ésteres polares y apolares (Baumes et al, 1986). Los primeros no contribuyen de forma significativa al aroma pero sí lo hacen en la textura, densidad y espesor, proporcionando cuerpo al vino. En este primer grupo encontramos el 2-etilhidroxipropionato, succinato de dietilo, etil-3-hidroxibutanoato, malato de dietilo o isopentil-2-hidroxipropionato (Apéndice I). El segundo grupo lo constituyen ésteres como el acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de 2-feniletilo, todos ellos formados a partir de alcoholes superiores. Dentro de este grupo también se engloban los denominados ésteres de etilo de ácidos grasos saturados, como el butanoato de etilo, octanoato de etilo, hexanoato de etilo o propanoato de etilo (Apéndice I). El aroma afrutado, floral y fresco de los vinos se asocia principalmente a los ésteres de acetatos de alcoholes superiores (Fujii et al, 1994; Marais, 1990). Normalmente se producen en pequeñas cantidades y contribuyen de forma sinérgica al aroma final (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Los ésteres son moléculas liposolubles, por lo tanto tras su formación difunden a través de la membrana hacia el medio. Se cree que se sintetizan mediante dos vías diferentes; por condensación química entre un alcohol superior y un ácido, aunque esta vía se considera poco probable ya que es demasiado lenta y la concentración de estos compuestos en las bebidas alcohólicas es bastante elevada; la otra vía es una reacción enzimática de esterificación de un alcohol superior con una molécula activa de acil-CoA, mayoritariamente acetil-CoA (Figura I.3-A). En función de los componentes de esta reacción se formarán un tipo de éster u otro. Cuando están implicados el acetil-CoA y un alcohol superior se forman los ésteres de acetato, mientras que si la reacción ocurre entre el etanol y otra molécula acil-CoA (normalmente ácidos grasos) el producto resultante son los ésteres de etilo (Lambrechts & Pretorius, 2000).

Las enzimas que regulan la concentración de estos compuestos al final de la fermentación son de dos tipos. Las alcohol acetiltransferasas (ATTasas), encargadas de su síntesis y las estearasas, responsables de su hidrólisis.

En *S. cerevisiae* se han descrito cuatro ATTasas, codificadas por los genes *ATF1*, *ATF2*, *EHT1* y *EEB1* (Fujii et al, 1994; Nagasawa et al, 1998; Yoshimoto et al, 1999; Lilly et al, 2000; Mason & Dufour, 2000). Además, existe una quinta ATTasa, codificada por el gen *LgATF1* (homólogo a *ATF1*) descrita en *S. carlsbergensis* (Fujii et al, 1996). Atf1p, Atf2p y LgAtf1p están implicadas en la formación de ésteres de acetatos (Lambrechts & Pretorius, 2000), mientras que las dos restantes lo están en la formación de los ésteres de etilo (Mason & Dufour, 2000; Saerens et al, 2006) (Figura I.3-B).

En la regulación del gen *ATF1* intervienen multitud de factores. Su expresión se induce en condiciones anaeróbicas y cuando el medio de cultivo contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento fermentativo, fuentes de carbono, nitrógeno y fosfato. Sin embargo, la presencia de oxígeno y ácidos grasos insaturados, especialmente aquellos con un doble enlace en la posición $\Delta 9$ reprimen su expresión (Fujiwara et al, 1999; Fujiwara et al, 1998; Fujii et al, 1997; Verstrepen et al, 2003a; Verstrepen et al, 2003c) (Figura I.3-B). La proteína Atf1p tiene un peso molecular de 57 kDa, se localiza anclada a partículas lipídicas (Mason & Dufour, 2000; Verstrepen et al, 2004) y es activa en la etapa final del crecimiento exponencial e inicio de la fase estacionaria (Malcorps et al, 1991; Malcorps & Dufour, 1992; Fujii et al, 1997; Yoshimoto et al, 2002).

ATF2 (Nagasawa et al, 1998) también contribuye a la producción de ésteres de acetato, aunque en menor medida y tiene una regulación similar a la de *ATF1*. Su transcripción está reprimida también por oxígeno, aunque no tanto por la presencia de ácidos grasos insaturados (Mason & Dufour, 2000). Atf2p tiene un peso molecular de 62 kDa y su concentración disminuye tras el agotamiento de nutrientes (Cauet et al, 1999). Presenta un máximo de actividad en la fase exponencial de crecimiento, disminuyendo paulatinamente a lo largo del cultivo (Molina et al, 2007). Presenta un 37% de homología con Atf1p observándose la presencia de un heptapéptido de secuencia WRLICLP en ambas proteínas que, supuestamente, constituye parte del centro activo de la actividad catalítica alcohol acetiltransferasa (Malcorps & Dufour, 1992; Cauet et al, 1999). El gen *EHT1* codifica la alcohol acetiltransferasa Eht1p. Cataliza la formación de caprilato de etilo, utilizando como sustratos etanol y hexanoil-CoA. Solo conserva un 17% de homología con el resto de alcohol acetiltransferasas mencionadas anteriormente, y no incluye el dominio

heptapéptido altamente conservado en las proteínas Atf1p, Atf2p y Lg-Atf1p (Malcorps & Dufour, 1992; Mason & Dufour, 2000, Verstrepen et al, 2003b).

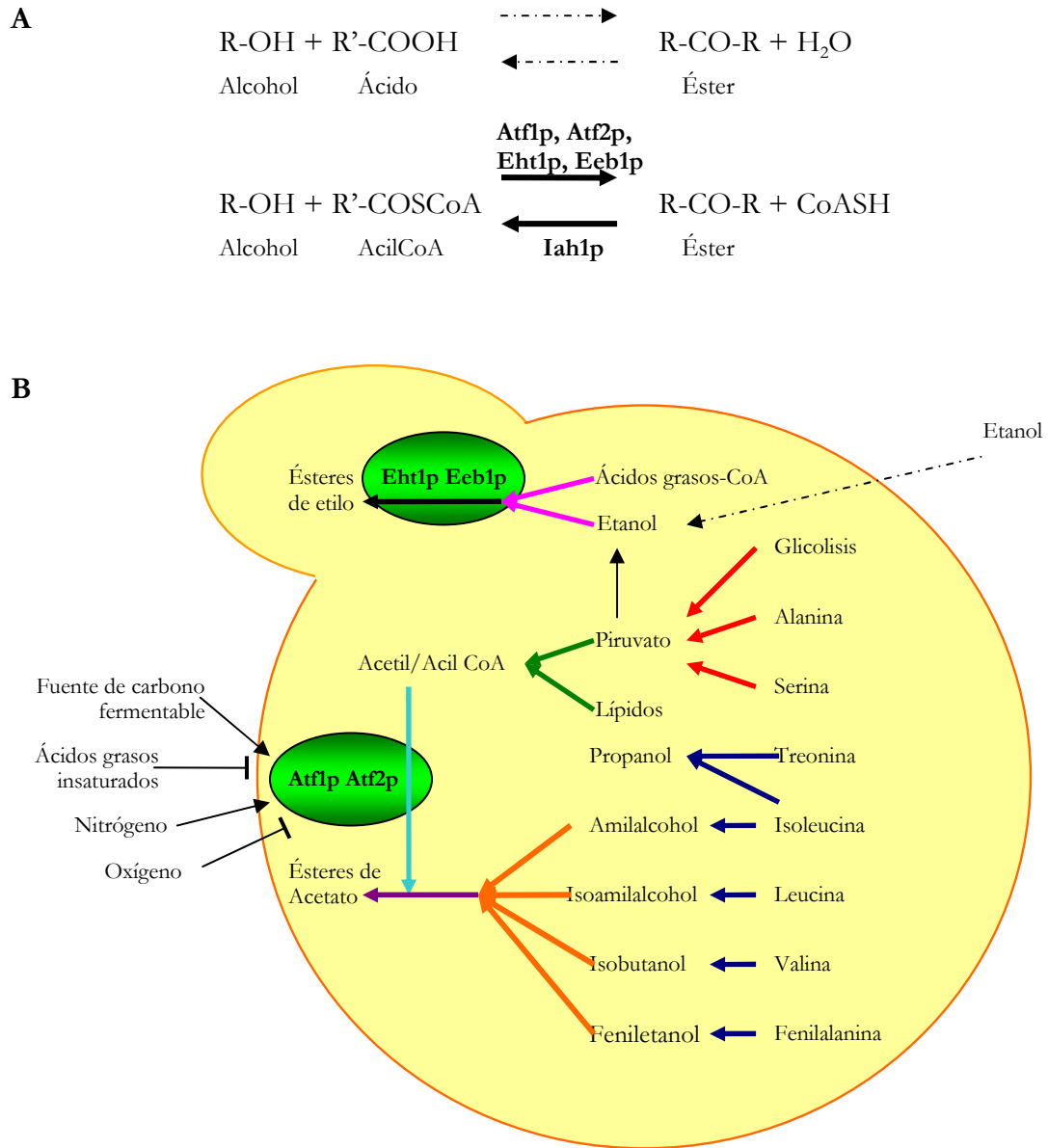


Figura I.3.- Esquema representativo de las reacciones de síntesis de ésteres aromáticos. Las flechas discontinuas representan una reacción de condensación espontánea mientras que las continuas representan una reacción catalizada a través de actividad enzimática (A). Rutas de síntesis, compuestos precursores y enzimas implicadas (B). Adaptado de Rossouw et al, 2008.

La sobreexpresión de *ATF1* o *ATF2* en una misma cepa produce perfiles organolépticos diferentes. Esto indica que, aunque tienen la misma actividad catalítica, cada una de ellas presenta distintos grados de afinidad y especificidad por los diferentes sustratos (Mason & Dufour, 2000; Lilly et al, 2000; Lilly et al, 2006; Verstrepen et al, 2003c).

La concentración final, tanto de los alcoholes de fusel como de los ésteres formados a partir de ellos, va a depender de numerosos factores: cepa de levadura utilizada, temperatura de fermentación, producción de etanol, contenido en azúcar y nitrógeno del medio, métodos de vinificación, crianza biológica, pH del mosto, aireación del cultivo y variedad de uva (Fleet, 1993; Beltran et al, 2008; Vilanova et al, 2007; Mendes-Ferreira et al, 2009; Herraiz & Ough, 1993; Houtman et al, 1980; Barbosa et al, 2009; Molina et al, 2007). A estos factores hay que añadir aquellos que afectan directamente a la regulación de las enzimas encargadas de su síntesis y de su hidrólisis (Inoue et al, 1997; Fukuda et al, 1998).

Uno de los factores más importantes es la disponibilidad de una fuente nitrógeno en el medio, ya que regula de forma positiva la mayoría de las enzimas que intervienen en su formación. Por otro lado la concentración o disponibilidad de aminoácidos en el medio es fundamental para la formación de los alcoholes de fusel aromáticos y en consecuencia de sus respectivos ésteres (Figura I.3-B). Por este motivo, la regulación y síntesis de aminoácidos por parte de *S. cerevisiae* es un aspecto destacable a comentar ya que afecta considerablemente a las propiedades organolépticas de los vinos *Finos*.

3.- Regulación y síntesis de aminoácidos en *S. cerevisiae*: efectos en el aroma del vino.

Los mostos son medios ricos en compuestos nitrogenados entre los que se encuentran los aminoácidos. En función de la variedad de uva de la que procede la concentración de cada uno de ellos será diferente (Huang & Ough, 1991; Garde-Cerdan et al, 2009).

Las levaduras vínicas son capaces de consumir una gran variedad de ellos, entre los que se encuentran el aspártico, glutámico, triptófano, la serina, treonina, histidina, alanina y arginina, siendo esta última la más utilizada (Goñi & Azpilicueta, 1999). Una vez transportados al interior celular, estos aminoácidos pueden ser directamente incorporados a la síntesis de nuevas proteínas, pueden almacenarse o pueden ser utilizados como fuente de nitrógeno y/o carbono. El grupo amino liberado puede utilizarse para la síntesis de otros compuestos nitrogenados y el esqueleto carbonado puede servir para la síntesis de alcoholes y ésteres (Large, 1986). Por este motivo la concentración de alcoholes y ésteres al final de la fermentación dependerá del balance entre las rutas de síntesis y degradación de los aminoácidos, así como de la capacidad de la célula de transportarlos al interior (Giudici et al, 1993; Keyzers & Boss, 2010).

La biosíntesis de los 20 aminoácidos constituyentes de proteínas se realiza únicamente cuando éstos no están presentes en el medio de cultivo o cuando su concentración es mínima (Zaman et al, 2008). La formación de estos compuestos depende de la capacidad de las levaduras de asimilar amonio como fuente de nitrógeno y de incorporarlo, mediante diferentes enzimas transaminasas, a esqueletos carbonados procedentes de la glucólisis, del ciclo de las pentosas fosfato, del ciclo de Krebs o del ciclo del glioxilato.

Las enzimas Gdh1p y Gdh2p (glutamato deshidrogenasa I y II, respectivamente) son las que incorporan el nitrógeno en forma de amonio al α -cetoglutarato generando glutamato. La glutamina sintetasa, codificada por el gen *GLN1*, añade otro amonio al glutamato, generando la glutamina. La transferencia de los grupos aminos donados por el glutámico, la glutamina, la alanina y la serina a otros esqueletos carbonados genera el resto de los aminoácidos. En levaduras la síntesis de lisina se realiza a partir de α -cetoglutarato en vez de oxalacetato (Bhattacharjee, 1983; Gasent-Ramirez & Benitez, 1997).

3.1.- Síntesis de aminoácidos aromáticos.

La ruta de biosíntesis de los aminoácidos aromáticos es de las más compleja debido a la gran cantidad de pasos y niveles de regulación que presenta y al gran gasto energético que conlleva (Braus, 1991). De todos ellos, el más importante es la fenilalanina, precursor del feniletanol y fenil acetato, todos ellos compuestos con aroma floral y afrutado deseable en los vinos.

La ruta tiene como precursores la eritrosa-4-fosfato y el fosfoenolpiruvato. La primera reacción la llevan a cabo dos isoenzimas, Aro3p y Aro4p, que catalizan la síntesis de 3-desoxi-D-arabinoheptusonato-7-fosfato (DAHP) (Figura I.4). Esta es una de las reacciones claves, ya que ambas enzimas presentan retroinhibición por producto final. Aro3p se inhibe por altas concentraciones de fenilalanina, mientras que Aro4p lo hace con tirosina (Braus, 1991). En cepas de laboratorio, tanto Aro3p como Aro4p presentan inhibición cruzada. Su actividad puede verse reducida por cualquiera de los tres aminoácidos producidos, aunque las concentraciones necesarias para dicho efecto varían de un aminoácido a otro (Helmstaedt et al, 2005). A continuación el DAHP sufre varias reacciones, catalizadas por las enzimas Aro1p y Aro2p, transformándose en corismato, el último intermediario común a todos los aminoácidos aromáticos. En este punto la ruta se bifurca, hacia la biosíntesis de triptófano por un lado y la de fenilalanina ó tirosina por otro (Braus, 1991) (Figura I.4).

En la ruta de síntesis de triptófano, la primera reacción es una transaminación catalizada por las enzimas Trp2p y Trp3p las cuales utilizan la glutamina como donador de grupos aminos. Como consecuencia se forma el antranilato, el cual tras una serie de cuatro reacciones previas sufre una condensación con la serina dando lugar al triptófano (Krappmann et al, 2000) (Figura I.4).

En el caso de la síntesis de fenilalanina y tirosina, el corismato se metaboliza a pufenato, gracias a la acción de la enzima Aro7p. Esta enzima presenta inhibición por tirosina, y una fuerte activación por triptófano (Krappmann et al, 2000), lo que permite redirigir la ruta en caso de exceso del mismo. A continuación la ruta vuelve a bifurcarse. Si el pufenato se metaboliza a través de Tyr1p, se producirá su descarboxilación y deshidrogenación generando p-hidroxifenilpiruvato, mientras que si se metaboliza por Pha2p se producirá su descarboxilación y deshidratación, generándose fenilpiruvato (Braus, 1991) (Figura I.4). A partir de estos dos últimos compuestos y por la acción de las transaminasas Aro8p y Aro9p se forman la tirosina y la fenilalanina respectivamente (Figura I.4). Ambas pueden utilizar distintos donadores y aceptores del grupo amino, presentando además distinto grado de afinidad por ellos. En este caso Aro8p utiliza principalmente el glutámico como donador de grupo amino, mientras que Aro9p utiliza la alanina (Kradolfer et al, 1982; Iraqui et al, 1998; Urrestarazu et al, 1998).

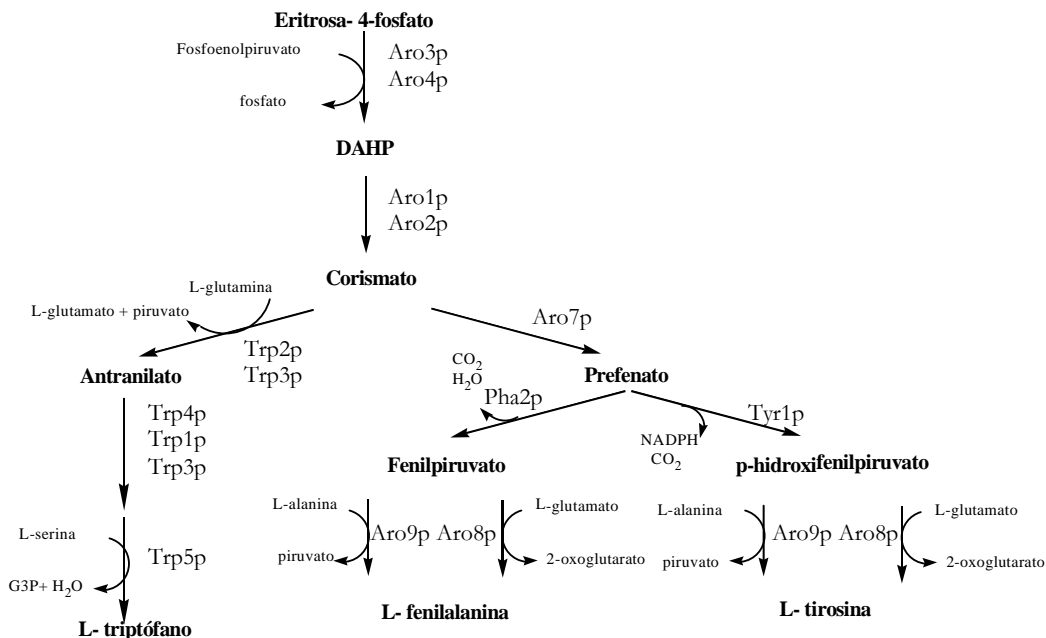


Figura I.4.- Esquema representativo de la síntesis de aminoácidos aromáticos y las principales enzimas implicadas en el proceso. Adaptada de Dueñas Sánchez tesis doctoral 2010.

3.2.- Regulación de la síntesis de aminoácidos.

Además de la regulación postraduccional de las diferentes actividades enzimáticas, también existe una regulación a nivel transcripcional de los genes que codifican tanto los transportadores como las enzimas implicadas en los diferentes pasos de las rutas.

En ausencia de aminoácidos en el medio, se produce la activación del control general de la biosíntesis, a través del activador transcripcional Gcn4p. El control sobre la expresión del gen *GCN4* se produce tanto a nivel transcripcional como traduccional. El mecanismo que controla la activación transcripcional aún se desconoce, sin embargo, la traduccional está muy estudiada. Ésta se realiza mediante 4 uORFs, que están presentes en el 5' UTR del transcrito de *GCN4*. Tienen un carácter inhibitorio de la traducción, excepto la uORF1, que actúa como un elemento regulador positivo. La concentración de aminoácidos se controla desde el interior de la célula, siendo los ARNt vacíos los que disparan la señal (Hinnebusch, 2005; Zaman et al, 2008).

Respecto a la regulación de la síntesis de aminoácidos aromáticos, de todas las enzimas implicadas en el proceso, Gcn4p controla la expresión de los genes *ARO1*, *ARO2*, *ARO3*, *ARO4*, *ARO8*, *TRP2*, *TRP3*, *TRP4* y *TRP5*. Además regula negativamente la expresión de genes implicados en la degradación de estos aminoácidos como *ARO10*, ya que estos presentan una fuerte inducción en mutantes *gcn4Δ* (Braus, 1991; Natarajan et al, 2001). También interviene otro factor transcripcional, Aro80p, el cual regula positivamente la expresión de los genes implicados en el catabolismo de aminoácidos (Iraqi et al, 1998).

A nivel postraduccional, muchas de las enzimas implicadas en las rutas metabólicas de síntesis de aminoácidos se encuentran sometidas a regulación por producto final. Este tipo de retroalimentación negativa retarda el flujo a través de la ruta cuando los productos comienzan a acumularse y es una manera importante de mantener la homeostasis celular. (Fukuda et al, 1991a)

4.- Mejora de las propiedades organolépticas del vino.

Existen numerosos estudios encaminados a la mejora de las propiedades organolépticas finales en productos fermentados, entre ellos el vino. Éstos se han centrado fundamentalmente en el uso de tres estrategias diferentes. Por un lado el uso de cultivos mixtos formados por diferentes especies de levaduras (*Saccharomyces* y no *Saccharomyces*) (Moreira et al, 2008; Viana et al, 2009; Rojas et al, 2001). Cada una de las especies utilizadas produce diferentes compuestos aromáticos, complementándose entre sí. Esta técnica conlleva el riesgo de que el producto final obtenido pierda alguna de sus propiedades más

importantes (grado alcohólico, contenido en glicerol, acidez volátil, etc.) debido al metabolismo de alguna de las especies utilizadas, perdiéndose así la identidad del producto.

Otra vía es la búsqueda de cepas superproductoras de aminoácidos precursores de compuestos aromáticos. Para ello se utilizan análogos tóxicos del aminoácido fisiológico con el fin de seleccionar mutantes espontáneos resistentes. Esta resistencia puede deberse a mutaciones en las permeasas de aminoácidos, mutaciones que confieran la capacidad de detoxificar el análogo y mutaciones que producen una dilución del tóxico por aumento de la concentración del aminoácido funcional. La mayoría de los casos de resistencia al tóxico es consecuencia de mutaciones puntuales en las enzimas de la ruta de síntesis sujetas a regulación por producto final. De este modo se vuelven insensibles a la retroalimentación negativa aumentando los niveles del aminoácido fisiológico (Fukuda et al, 1991a; Fukuda et al, 1991b). Este procedimiento se ha realizado en cepas de levaduras panaderas, cerveceras y productoras de *Sake* con resultados positivos (Gasent-Ramirez & Benitez, 1997; Martínez-Force & Benítez, 1992; Ramos & Calderon, 1992; Fukuda et al, 1991a; Fukuda et al, 1990).

Otra alternativa consiste en la sobreexpresión de genes heterólogos que codifican hidrolasas capaces de romper los enlaces glicosídicos que unen los azúcares a los terpenos (sustancias características de las distintas variedades de uva que se presentan unidas a azúcares y que en su forma libre contribuyen al aroma del vino) (Villanueva et al, 2000; Gil et al, 2005; Van Wyk & Divol, 2010).

Por último existen numerosos estudios donde el incremento de compuestos aromáticos se produce mediante sobreexpresión de genes que codifican para diferentes enzimas implicadas de alguna forma en la síntesis de estos compuestos. Las más importantes son las alcohol acetil transferasas codificadas por los genes *ATF1* y *ATF2*. Se han descrito aumentos en la formación de acetatos de ésteres por sobreexpresión de estos genes en cepas de *Sake* (Fukuda et al, 1998), cerveceras (Fujii et al, 1994; Verstrepen et al, 2003a; Verstrepen et al, 2003c), de destilería y vónicas (Dequin, 2001; Lilly et al, 2000).

Basándonos en los datos previos descritos en la bibliografía, para mejorar el perfil organoléptico en los vinos tipo *Fino* nos hemos centrado en dos estrategias diferentes. En primer lugar, la obtención de derivados de la cepa PDC (utilizada como pie de cuba) superproductores del aminoácido aromático fenilalanina mediante el uso del análogo tóxico p-fluoro-fenilalanina. Y en segundo lugar la sobreexpresión, en dicha cepa y en los derivados superproductores obtenidos, de los genes *ATF1* y *ATF2*.

Resultados

1.- Modificación del perfil organoléptico mediante el uso de nuevas cepas fermentativas superproductoras de aminoácidos aromáticos.

1.1.- Obtención de derivados resistentes a p-fluoro-DL-fenilalanina (PFP).

Se seleccionaron derivados superproductores de aminoácidos aromáticos de la cepa PDC mediante el aislamiento de clones con capacidad de crecer en cultivo discontinuo en medio líquido SDP suplementado con PFP, análogo tóxico de la L-fenilalanina (Fukuda et al, 1991). Se comenzó inoculando la cepa PDC en medio SDP suplementado con la concentración mínima del tóxico a la que crecía (0,2 mM). Cuando el cultivo alcanzó la fase estacionaria, una alícuota del mismo, se reinoculó en medio fresco suplementado con una concentración mayor del análogo. Cada vez que se aumentaba la concentración de PFP, se sembraba una alícuota del cultivo en cajas de medio SDP sólido con la misma cantidad de tóxico que el cultivo del que procedía. Estas fases se repitieron hasta que al reinocular el nuevo cultivo éste no fue capaz de crecer. Durante el proceso se eligieron cuatro derivados; P2.1, P2.6, P6.1 y P8.1, resistentes a 4mM, 6mM, 8mM y 10mM de PFP respectivamente.

1.2.- Cariotipo electroforético de los derivados.

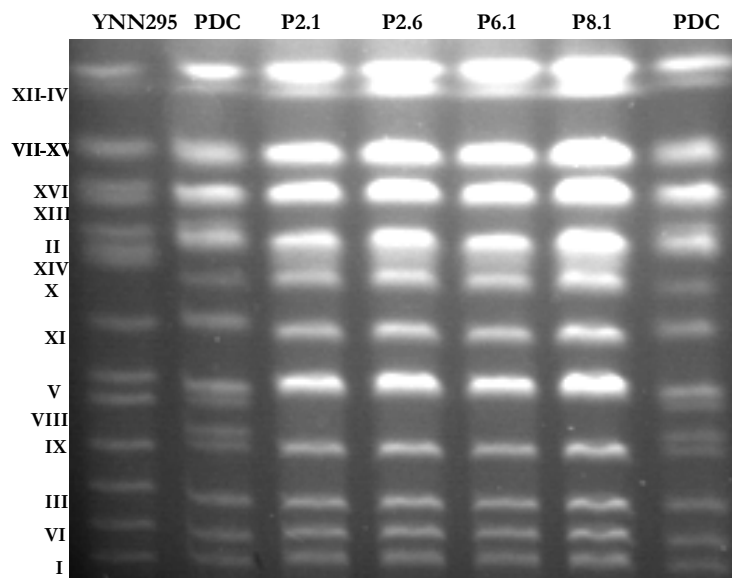


Figura I.5.- Patrón cromosómico de la cepa YNN295, PDC y los derivados resistentes a PFP.

El cariotipo electroforético de los cuatro derivados mostró pequeñas diferencias al compararlo con el del PDC. Concretamente, se observaron reorganizaciones a nivel de los cromosomas VIII y IX (Figura I.5).

1.3.- Determinación del contenido interno de aminoácidos.

Para comprobar si la resistencia al análogo PFP se traducían en un aumento de los niveles de L-fenilalanina se realizaron análisis del contenido interno de aminoácidos en todas las cepas creciendo en medio SD.

Los cuatro derivados presentaron incrementos en el contenido de L-fenilalanina, arginina y lisina, además de numerosas variaciones en la concentración de otros aminoácidos (Tabla I.1).

P2.1 presentó concentraciones similares al PDC en solo cinco aminoácidos. Para todos los demás los niveles fueron superiores (Tabla I.1).

Tabla I.1.- Concentración de aminoácidos de la cepa PDC y de los derivados resistentes a PFP en medio SD. Los datos que se presentan son valores medios de tres experimentos independientes con desviación estándar. La concentración se indica en nanomoles del aminoácido por microgramo de proteína.

Aminoácido	CEPAS				
	PDC	P2.1	P2.6	P6.1	P8.1
Aspártico	10,04±1,26	15,98±3,89	9,92±4,26	6,91±1,06	12,71±2,81
Serina	19,25±4,41	19,48±2,90	18,41±2,27	20,45±3,46	24,95±5,50
Glutámico	89,74±17,74	120,35±4,57	91,59±12,18	96,38±17,49	125,03±14,90
Glicina	11,10±1,77	16,12±5,06	7,43±2,15	9,96±1,62	10,45±1,70
Arginina	48,40±8,74	182,68±20,05	140,41±9,33	155,66±6,82	180,80±26,53
Treonina	26,05±3,94	24,27±0,80	22,22±3,94	30,55±2,67	26,55±6,16
Alanina	55,43±6,82	69,76±12,58	46,07±9,01	46,00±6,35	58,46±14,54
Prolina	4,61±0,57	5,92±1,72	2,22±1,21	3,68±0,34	3,71±0,56
Tirosina	1,00±0,25	1,58±0,26	1,37±0,48	1,93±0,40	1,59±0,36
Histidina	43,15±6,56	54,35±0,55	36,53±5,12	42,94±7,15	44,51±8,12
Valina	7,39±1,09	20,23±5,53	12,56±2,00	11,82±2,43	16,24±4,02
Metionina	1,46±0,40	2,32±0,60	1,10±0,27	1,72±0,26	1,62±0,77
Lisina	12,96±3,72	29,37±5,82	19,27±2,94	20,30±2,96	26,63±6,40
Isoleucina	3,51±1,17	7,86±2,79	4,11±2,28	4,11±1,36	5,19±1,59
Leucina	3,24±0,82	8,12±2,69	4,10±2,17	3,84±0,56	4,78±1,07
Fenilalanina	1,81±0,93	15,76±1,88	6,91±1,87	9,31±1,15	11,59±1,88

Para el derivado P2.6 la mayoría de los aminoácidos presentaron niveles similares a la cepa parental. Sin embargo, la concentración de glicina y prolina si variaron de forma significativa (Tabla I.1).

Los derivados P6.1 y P8.1 presentaron patrones aminoacídicos similares. Ambos mostraron aumentos respecto al PDC en los niveles de tirosina y valina, además de los comentados anteriormente (Tabla I.1). Destacan el descenso en aspártico en la cepa P6.1 y el aumento en leucina e isoleucina en el P8.1 (Tabla I.1).

1.4.- Caracterización fisiológica.

Para comprobar la viabilidad industrial de los derivados resistentes a PFP se realizaron ensayos de microvinificación en mosto (Materiales y Métodos). Se midió el contenido interno de aminoácidos además de parámetros importantes como la cinética de crecimiento, consumo de azúcares reductores y niveles de variables enológicas responsables de las propiedades organolépticas finales del vino como etanol, glicerol, ácido acético y numerosos compuestos aromáticos.

1.4.1.- Concentración interna de aminoácidos.

Al final de fermentación todos los derivados presentaron del orden de 2 veces más L-fenilalanina que el PDC (Tabla I.2). Además mostraron aumentos significativos en otros aminoácidos como glicina, arginina, lisina e isoleucina (Tabla I.2). En los demás aminoácidos las concentraciones fueron similares a las del PDC (Tabla I.2).

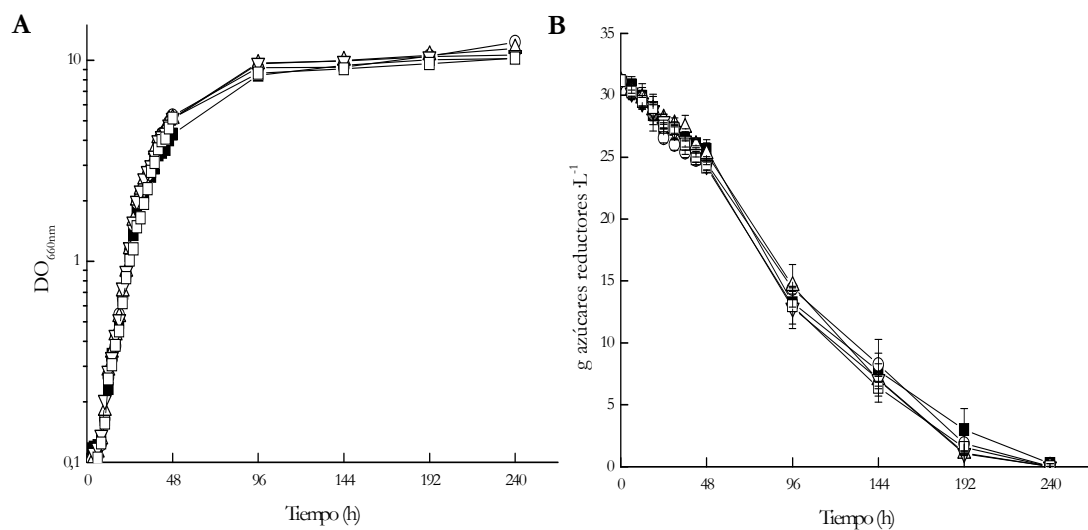
Tabla I.2.- Contenido de aminoácidos en el mosto de partida y en las cepas PDC y derivados resistentes a PFP al final de fermentación (azúcar residual $\leq 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Los datos que se presentan son valores medios de tres experimentos independientes con desviación estándar. La concentración interna para cada cepa se indica en nanomoles del aminoácido por microgramo de proteína.

Aminoácido	PDC	CEPAS				Mosto $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
		P2.1	P2.6	P6.1	P8.1	
Aspártico	0,67±0,05	0,75±0,21	0,57±0,24	0,49±0,03	0,72±0,04	4
Serina	1,49±0,35	1,18±0,28	1,32±0,43	1,36±0,41	1,31±0,30	8,5
Glutámico	4,66±1,35	5,91±1,53	8,31±0,99	8,85±0,86	6,92±1,16	13
Glicina	0,79±0,20	1,08±0,08	1,28±0,09	1,34±0,47	1,15±0,04	1,2
Arginina	1,91±0,30	4,75±0,28	3,81±0,25	2,91±0,11	4,97±0,33	242
Treonina	0,92±0,10	0,89±0,08	0,94±0,160	0,88±0,22	0,90±0,20	19
Alanina	15,34±5,04	16,98±2,39	17,74±2,23	14,30±2,99	13,58±2,44	50
Prolina	8,31±1,39	8,03±0,59	10,33±2,00	6,81±0,44	6,76±2,18	117,7
Tirosina	0,20±0,01	0,12±0,02	0,18±0,03	0,20±0,03	0,19±0,02	5
Histidina	1,49±0,12	1,51±0,60	1,88±0,36	1,77±0,83	1,13±0,15	18
Valina	0,59±0,03	0,55±0,06	0,62±0,15	0,64±0,12	0,67±0,06	16,3
Metionina	0,19±0,01	0,22±0,02	0,32±0,03	0,25±0,05	0,32±0,03	2
Lisina	1,74±0,48	2,85±0,26	3,25±0,24	2,54±0,19	2,52±0,32	2,1
Isoleucina	0,11±0,03	0,18±0,04	0,21±0,06	0,21±0,06	0,22±0,05	5,91
Leucina	0,26±0,07	0,25±0,03	0,30±0,03	0,32±0,01	0,34±0,03	7,03
Fenilalanina	0,21±0,03	0,37±0,10	0,39±0,01	0,39±0,04	0,42±0,02	13,4

1.4.2.- Crecimiento y consumo de azúcares reductores.

No se observaron diferencias significativas entre las cepas resistentes a PFP y el PDC en los valores de D.O._{660nm} (Figura I.6-A). Sin embargo, la tasa de crecimiento en los derivados fue un 10% más elevada que la parental (Figura I.6-C).

Respecto al consumo de azúcares las cepas superproductoras de fenilalanina son capaces de asimilar una mayor cantidad de azúcares que la cepa PDC. Prueba de ello fue, que al final de la fermentación del mosto, en los vinos jóvenes obtenidos por las cepas derivadas los niveles de azúcar residual fueron un 90% inferiores a los del PDC (Figura I.6-B y Apéndice II).



Periodo	PDC	P2.1	P2.6	P6.1	P8.1
0-24 h	0,1036	0,1151	0,1139	0,1144	0,1164
24-48 h	0,0531	0,0593	0,0577	0,0573	0,0596

Figura I.6.- Curva de crecimiento en mosto (A) y consumo de azúcares reductores durante el proceso fermentativo (B). Tasa de crecimiento en h⁻¹ durante las primeras 24 h y las 24 h siguientes (C). Los datos son valores medios de dos experimentos independientes con desviación estándar. Cuando ésta es menor al 5% no se indica. Se representan PDC (■) y los derivados superproductores de L-fenilalanina P2.1 (○), P2.6 (△), P6.1 (▽) y P8.1 (□).

1.4.3.- Producción de etanol, glicerol y ácido acético.

Quando se midió la concentración final de etanol en todos los mostos fermentados con las cepas resistentes a PFP los valores fueron superiores a los obtenidos con el PDC, pero estas diferencias fueron solo significativas en las cepas P8.1 y P2.6 (Figura I.7-A y Apéndice II).

El contenido en glicerol al final de la fermentación no mostró diferencias significativas entre cepas. Sin embargo, se observó un retraso en la producción de dicho

compuesto por la cepa PDC en comparación con los derivados resistentes (Figura I.7-B y Apéndice II).

Al determinar los niveles de ácido acético producidos, se observó una gran variabilidad dependiendo de la cepa. Las cepas P2.1 y P8.1 produjeron un 15% menos de ácido acético que la cepa PDC, frente al 20% y 25% menos producido por P2.6 y P6.1 respectivamente (Figura I.7-C y Apéndice II). Este descenso en la producción de ácido acético se tradujo en un leve aumento en el valor de pH de dichos vinos (Figura I.7-D y Apéndice II).

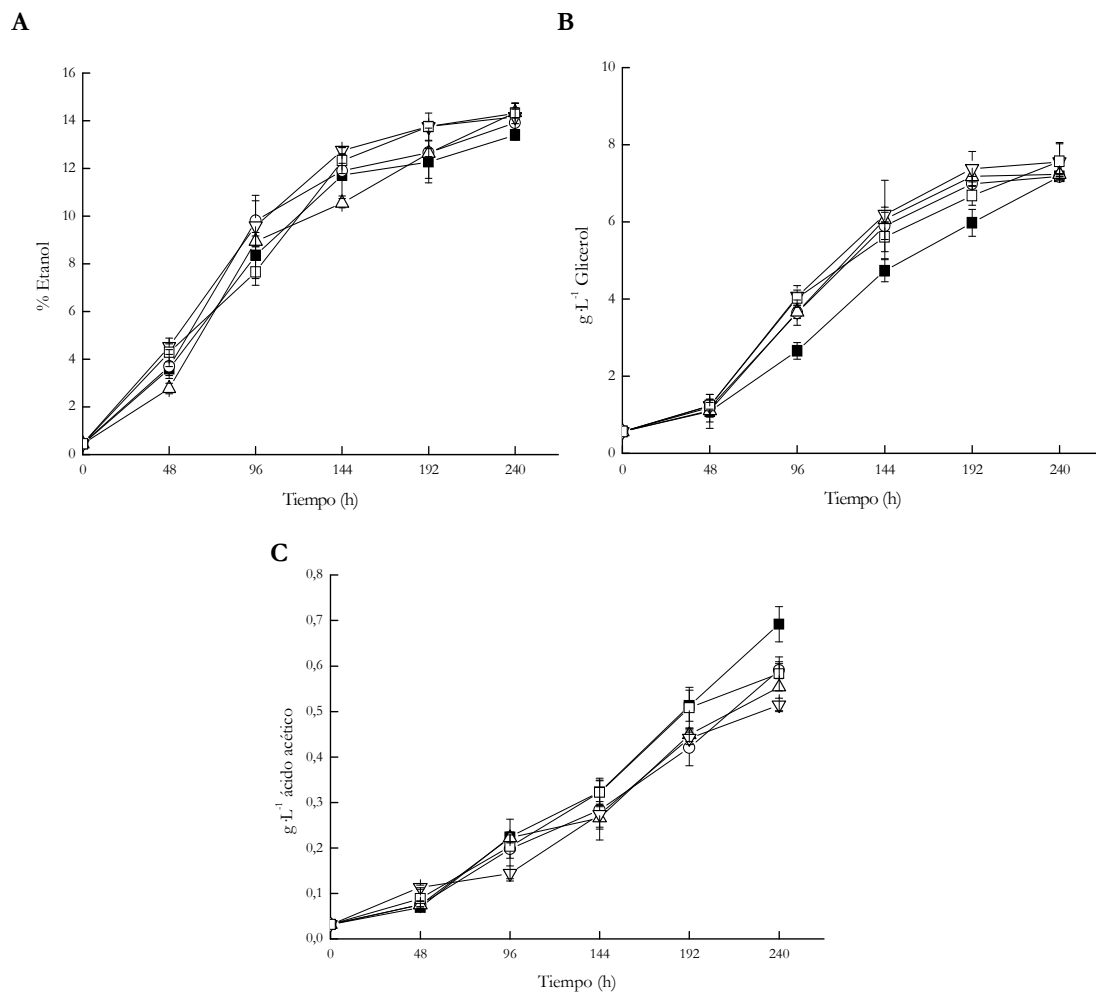


Figura I.7.- Producción de etanol (A), glicerol (B), acético (C) a lo largo del proceso fermentativo y medida final de pH (D) del PDC (■) y los derivados superproductores de L-fenilalanina P2.1(○), P2.6(△), P6.1(▽) y P8.1(□). Se representan valores medios de dos experimentos independientes con desviación estándar.

1.4.4.- Producción de compuestos aromáticos.

Tras finalizar el proceso de microvinificación se midieron los niveles de alcoholes superiores, ésteres y otros compuestos aromáticos en los vinos jóvenes obtenidos (Apéndice II).

Destacó el aumento en los niveles de 2 y 3-metilbutanol (amil e isoamil alcohol), 2-feniletanol, decanoato (caprato de etilo) y succinato de etilo en los mostos fermentados por los cuatro derivados (Figura I.8). De todos ellos destacó la producción de 2-feniletanol, cuyos niveles fueron alrededor de 30 veces superiores a los obtenidos con el PDC (Figura I.8). Por el contrario los niveles de acetaldehído, acetoína y N-butanol fueron en todos los casos inferiores a los encontrados en el vino elaborado con la cepa control (Apéndice II).

El derivado P2.1 produjo mayores niveles de lactato de etilo. Sin embargo, el hexanoato (caproato) de etilo detectado fue 1,5 veces inferior (Apéndice II). Los niveles de lactato de etilo fueron inferiores en los vinos elaborados con los otros tres derivados. Además se observó un descenso en las concentraciones de hexanoato de etilo en los elaborados con las cepas P6.1 y P8.1 y de octanoato de etilo con P2.6 y P8.1 (Apéndice II). En el resto de compuestos no se observaron diferencias significativas entre los vinos producidos por los derivados y la cepa PDC (Apéndice II).

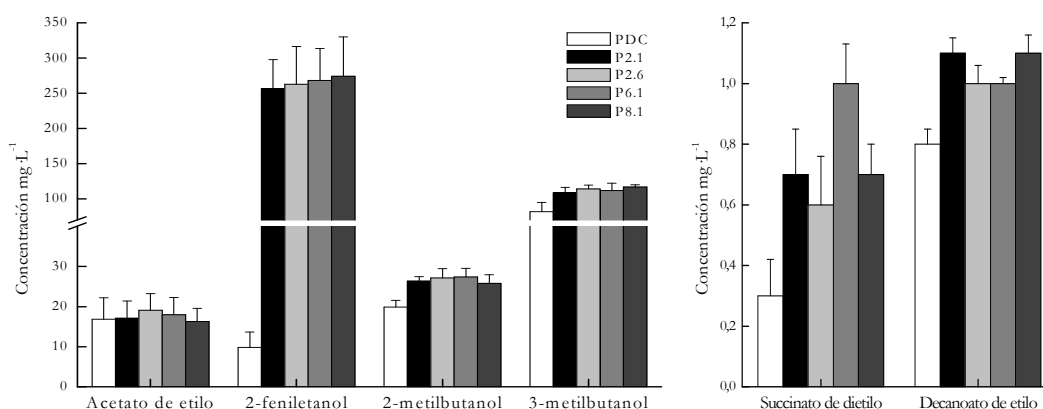


Figura I.8.- Concentración en mg·L⁻¹ de alcoholes superiores y ésteres aromáticos medidos en los vinos jóvenes obtenidos tras la fermentación. Los valores numéricos se dan en mg·L⁻¹ y son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

1.4.5.- Resistencia a desecación.

Las levaduras fermentativas suelen comercializarse en forma de levadura seca activa. Tras su obtención sufren un proceso de desecación o liofilización el cual facilita su posterior envasado y distribución. Esta manipulación produce estrés en la levadura, con una consecuente pérdida de viabilidad. Se ha descrito en la bibliografía que la acumulación de aminoácidos como la arginina o la prolina en el interior celular confiere a cepas panaderas industriales mayor resistencia a congelación y otros tipos de estrés (Shima & Takagi, 2009; Shima et al, 2003; Morita et al, 2002). De la misma forma, levaduras industriales implicadas en la elaboración de *Sake* también muestran una mayor viabilidad frente a desecación debida a la acumulación de prolina en su interior (Takagi et al, 2005; Takagi et al, 2000).

Los derivados resistentes a PFP presentan un aumento significativo en los niveles de algunos de estos aminoácidos. Por tanto, se comprobó la resistencia a desecación de los mismos. Para ello se realizaron cultivos de las cepas objeto de este estudio en medio YPD, SD y mosto. Las células se recogieron al final de la fermentación (mosto) y en fase estacionaria (YPD y SD) y se sometieron a un proceso de desecación y rehidratación, tras el cual se midió viabilidad (Materiales y Métodos).

No se observaron diferencias significativas en la viabilidad de los derivados superproductores comparados con la cepa parental en ninguno de los medios ensayados (Tabla I.3). La naturaleza del medio de cultivo parece tener una gran influencia en la viabilidad frente a desecación en estas cepas, ya que el porcentaje de células viables es muy superior cuando las células se cultivan en medios como YPD o mosto en comparación con los cultivos realizados en SD.

Tabla I.3.- Porcentaje de células viables tras desecación. Se muestran datos de tres experimentos independientes en YPD, SD y mosto con desviación estándar.

Medio de cultivo	CEPAS				
	PDC	P2.1	P2.6	P6.1	P8.1
YPD	51,62 ± 2,72	59,76 ± 1,68	55,38 ± 2,07	53,01 ± 1,69	57,63 ± 1,39
SD	25,99 ± 2,36	26,31 ± 3,29	24,87 ± 3,71	26,34 ± 3,67	25,83 ± 2,10
Mosto	46,81 ± 3,19	46,12 ± 3,05	47,05 ± 3,04	44,90 ± 2,43	45,16 ± 3,94

2.- Modificación del perfil organoléptico mediante la sobreexpresión de genes involucrados en la síntesis de compuestos aromáticos.

2.1.- Integración de los genes *ATF1* y *ATF2* en cepas vínicas fermentativas.

La amplificación de los genes *ATF1* y *ATF2* se realizó mediante PCR a partir de ADN molde de la cepa PDC. Se utilizaron los pares de cebadores A1SpeI.u/A1SalI.l y A2SpeI.u/A2SalI.l respectivamente (Materiales y Métodos). Los productos obtenidos se clonaron en los plásmidos pRD4F y pGDgpd (Materiales y Métodos) originándose los plásmidos pRD4F::*ATF1*, pRD4F::*ATF2*, pGD::*ATF1* y pGD::*ATF2* (Figura I.9). Para estudiar la repercusión de la sobreexpresión de estos dos genes en el perfil aromático final de los vinos se transformó en primer lugar la cepa Δ PDC, un derivado auxótrofo para leucina de la cepa silvestre PDC (Materiales y Métodos), el cual se obtuvo, en nuestro laboratorio por el doctorando Felipe Guevara, siguiendo el procedimiento SHF (Materiales y Métodos). De manera simultánea se transformaron las cepas P2.1 y P6.1 (Materiales y Métodos), ambos derivados superproductores de aminoácidos aromáticos. De este modo observaríamos el efecto no solo sobre la cepa silvestre sino también sobre las cepas superproductoras.

Los transformantes de la cepa Δ PDC se obtuvieron mediante integración del producto de PCR obtenido usando como molde los plásmidos pGD::*ATF1* y pGD::*ATF2* y el par de cebadores GL2.u/L2L.l (Materiales y Métodos). Ambos cebadores poseen secuencias de 40 pb de homología a la región 5' y 3' del gen *LEU2*, así se dirigió la integración a un locus específico. Las cepas obtenidas, transformadas con los genes *ATF1*, *ATF2* y *LacZ* se denominaron P1, P2 y PL respectivamente.

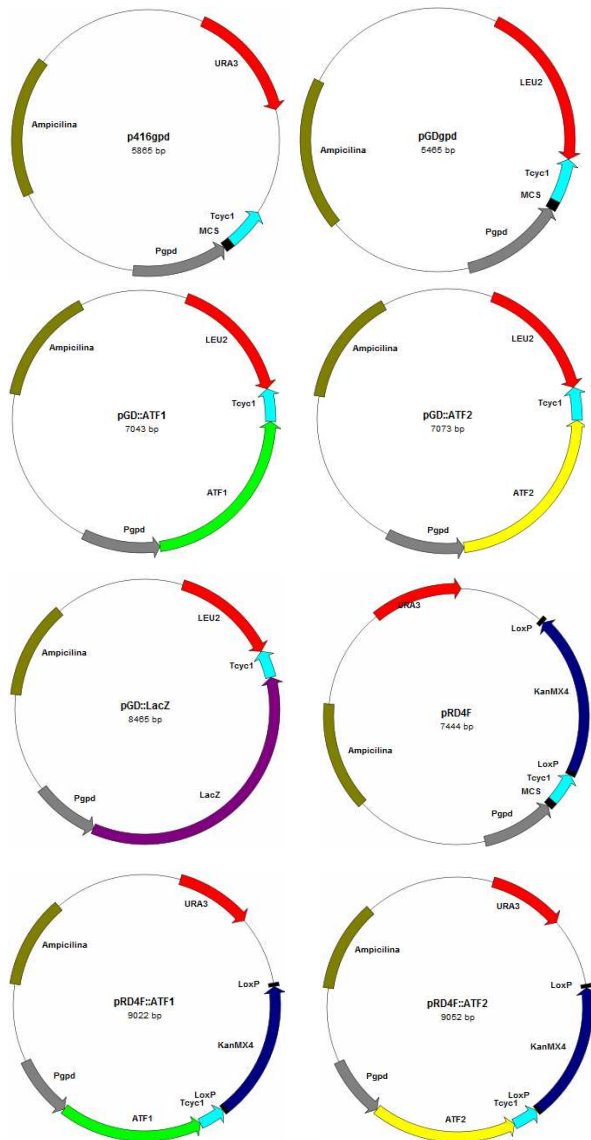


Figura I.9.- Esquema representativo de los plásmidos de origen y de los obtenidos tras las modificaciones para la obtención de las construcciones de integración. Todos ellos presentan un marcador de resistencia a Ampicilina y una secuencia centromérica para su segregación en levaduras

En el caso de las cepas P2.1 y P6.1 las transformaciones se llevaron a cabo con el producto de la PCR obtenido usando como molde los plásmidos *pRD4F::ATF1* y *pRD4F::ATF2* y el par de cebadores TU3.u/ULP2.1 (Materiales y Métodos). Ambos cebadores poseen secuencias de 40 pb de homología a la región 5' y 3' del gen *URA3*, así se dirigió la integración a un locus específico.

Tras la transformación se eliminó el gen de resistencia *KanMX4* transformando las cepas con el plásmido YEp351-cre-cyh, el cual se eliminó posteriormente (Materiales y Métodos).

De esta forma se obtuvieron las cepas P2.1.1, P2.1.2, P6.1.1 y P6.1.2, transformadas con los genes *ATF1* o *ATF2* respectivamente.

2.2.- Caracterización molecular de las cepas transformadas.

A todos los transformantes seleccionados se les realizó el cariotipo electroforético. Los resultados no mostraron cambios en el patrón cromosómico en ninguno de ellos en comparación a los de sus parentales (Figuras I.10-A y I.11-A)

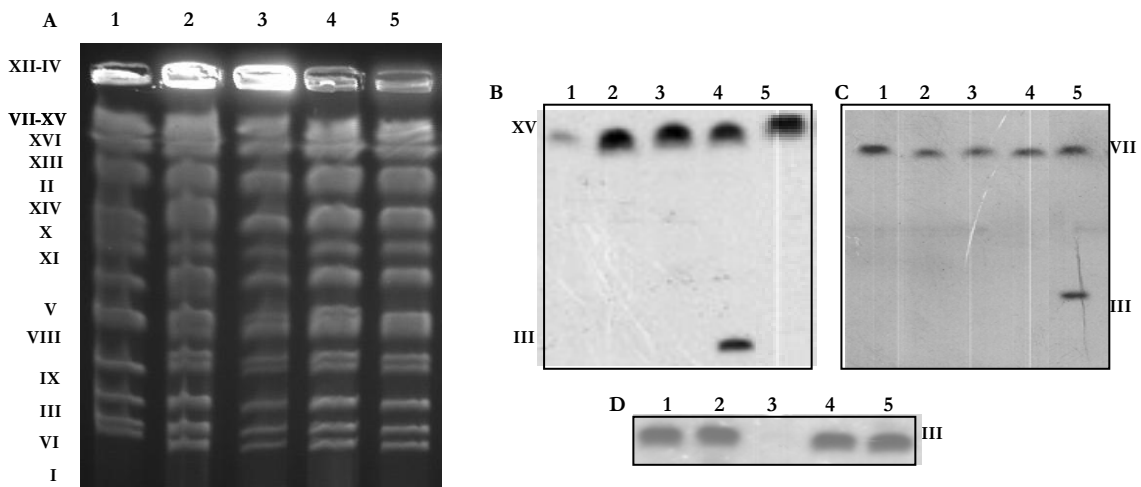


Figura I.10.- Patrón cromosómico de la cepa Δ PDC transformada con *ATF1* y *ATF2* (A). Southern blot sobre dichos cariotipos con sondas de los genes *ATF1* (B), *ATF2* (C) y *LEU2* (D). Se representan S288C (1), PDC (2), Δ PDC (3), P1 (4), P2 (5).

Se llevaron a cabo hibridaciones con sondas de los genes *ATF1* y *ATF2*. Los transformantes de la cepa auxótrofa para leucina mostraron una señal en el cromosoma correspondiente a la/s copia/as endógena/as del gen estudiado, y otra en el cromosoma III, correspondiente a la copia adicional integrada en *LEU2* (Figura I.10-B y I.10-C). La hibridación con la sonda del gen *LEU2* da como resultado una única banda en todos los transformantes localizada en el cromosoma III correspondiente a la copia del gen *LEU2* utilizado como marcador de selección (Figura I.10-D).

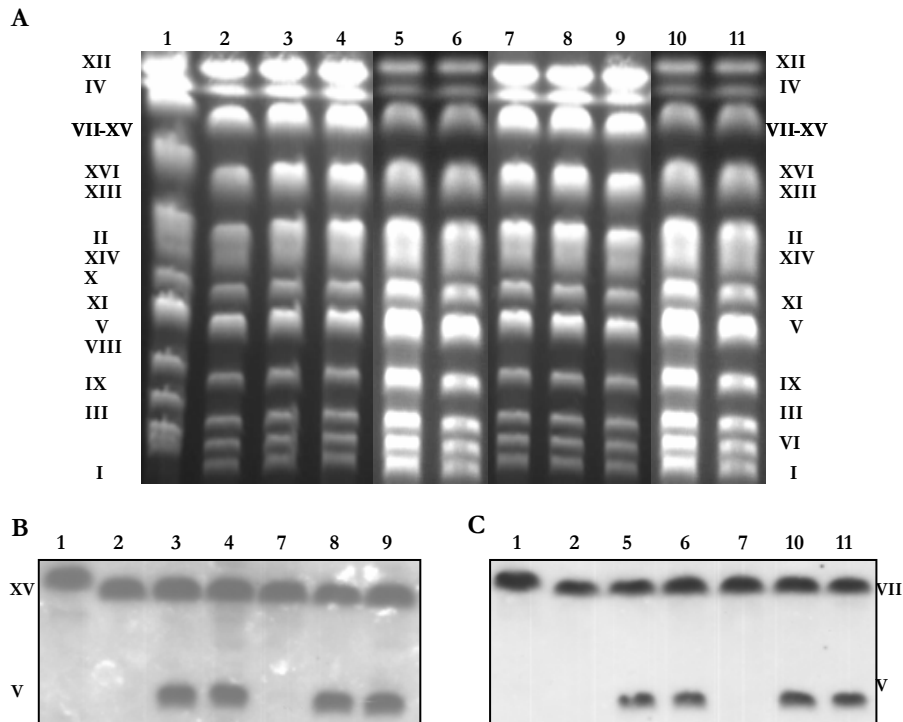


Figura I.11.- Patrón cromosómico de las cepas fermentativas superproductoras de aminoácidos aromáticos transformadas con *ATF1* y *ATF2* (A). Southern blot sobre dichos cariotipos con sondas de los genes *ATF1*(B) y *ATF2*(C). Se representan S288C (1), P2.1 (2), P2.1.1* (3), P2.1.1 (4), P2.1.2* (5), P2.1.2 (6), P6.1 (7), P6.1.1* (8), P6.1.1 (9), P6.1.2* (10) y P6.1.2 (11). * Cepas transformadas antes de la escisión del gen *KanMX4*.

En los transformantes de las cepas P2.1 y P6.1 las hibridaciones con las sondas de los genes *ATF1* y *ATF2* dan como resultado una señal que se corresponde con la/s copia/s endógena/s (cromosoma XV para *ATF1* o cromosoma VII para *ATF2*) y otra en el cromosoma V donde se encuentra el locus *URA3* al cual se dirigió la integración (Figura I.11-B y I.11-C).

Con objeto de descartar la presencia de integraciones múltiples en el mismo cromosoma se realizaron análisis del polimorfismo de restricción y Southern de los transformantes (Figuras I.12-A, I.13-A, I.14-A y I.15-A).

Al hibridar el ADN de los transformantes derivados del Δ PDC con sondas de los genes *ATF1* y *ATF2* se observaron las bandas correspondientes a las copias endógenas de dichos genes, con la adición de una nueva, correspondiente a la copia extra integrada (Figuras I.12-B y I.13-B). Para comprobar la integración en el locus correcto se realizó una hibridación con una sonda del gen *LEU2*.

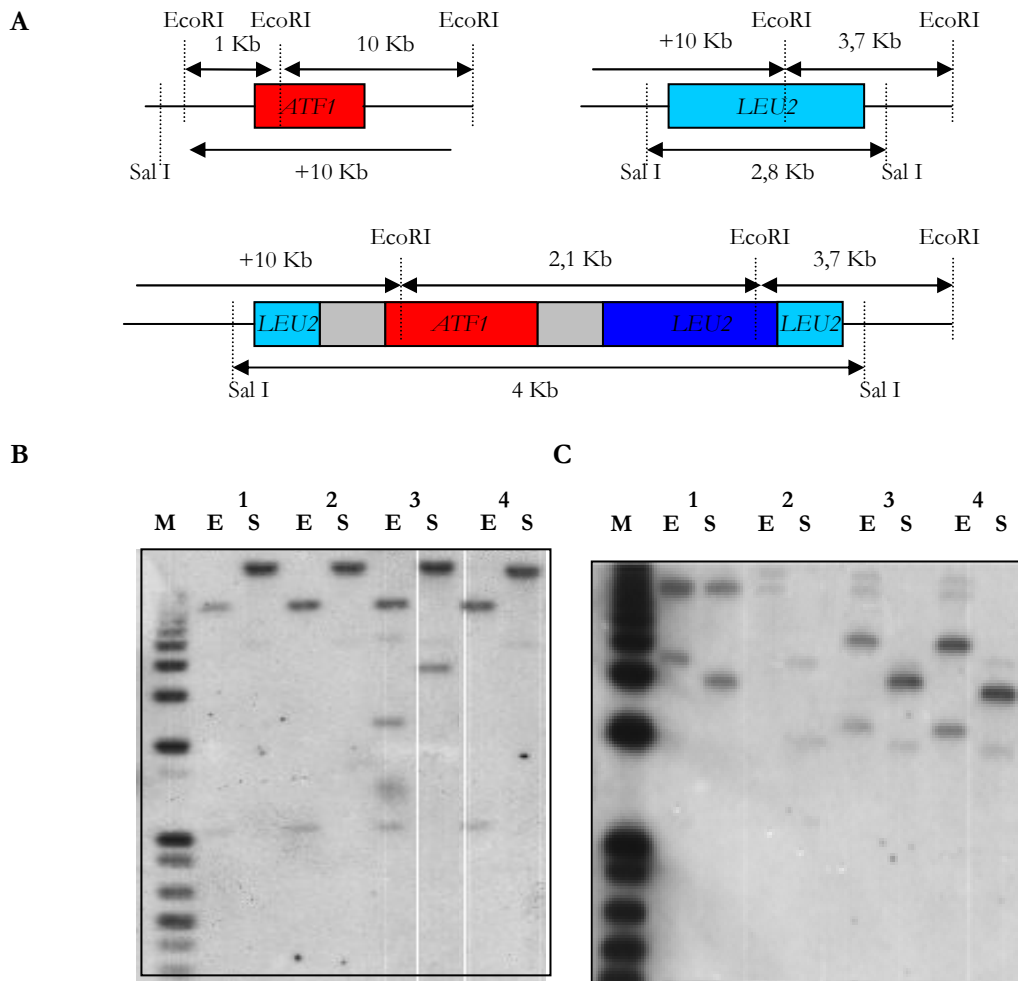


Figura I.12.- Esquema ilustrativo del patrón de restricción y los tamaños de bandas esperados (A), Southern blot de ADN genómico de las cepas transformadas con el gen *ATF1* y *ATF2* digerido con EcoRI (E) y SalI (H) e hibridado con una sonda del gen *ATF1* (B) y con una sonda del gen *LEU2* (C). Se representan PDC (1), Δ PDC (2), P1 (3) y P2 (4), siendo M el marcador de peso molecular.

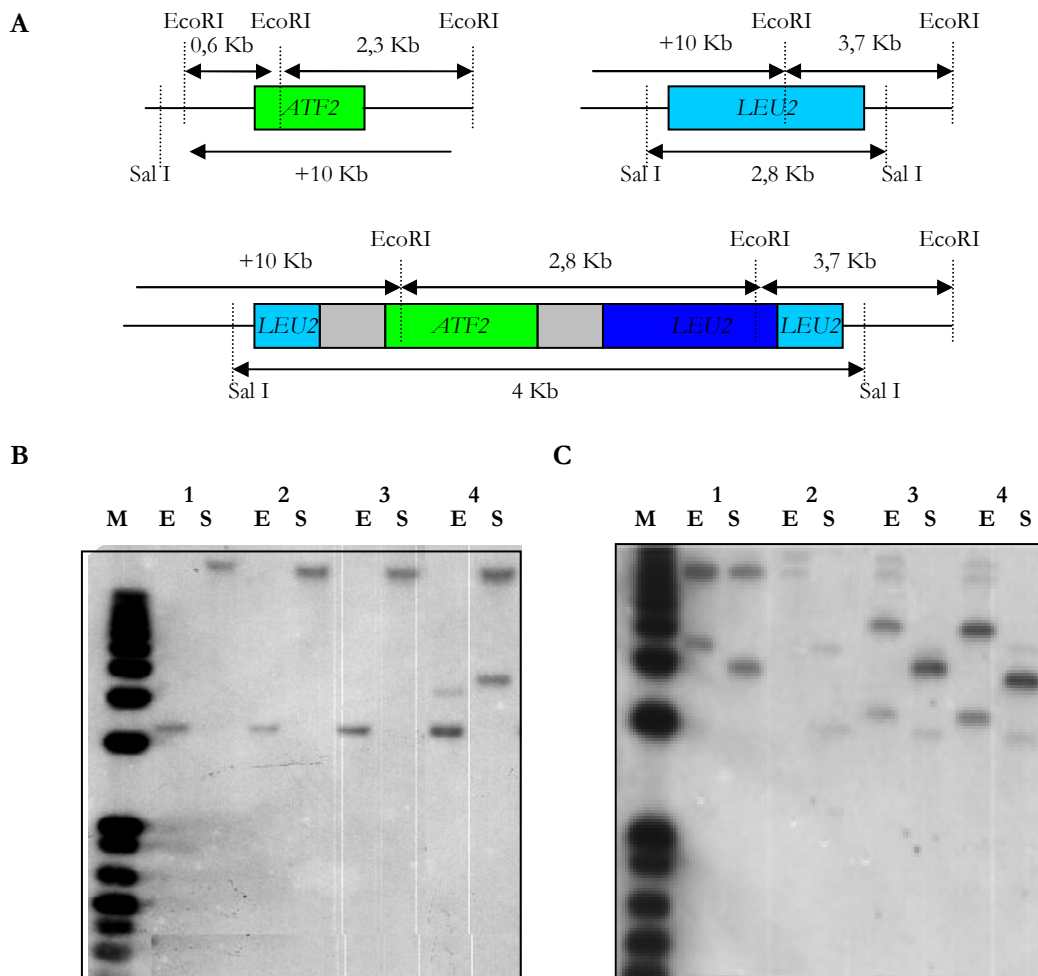


Figura I.13.- Esquema ilustrativo del patrón de restricción y los tamaños de bandas esperados (A), Southern blot de ADN genómico de las cepas transformadas con el gen *ATF1* y *ATF2* digerido con *EcoRI* (E) y *SalI* (H) e hibridado con una sonda del gen *ATF2* (B) y con una sonda del gen *LEU2* (C). Se representan PDC (1), ΔPDC (2), P1 (3), P2 (4), siendo M el marcador de peso molecular.

Los resultados de las hibridaciones sobre ADN de las cepas P2.1 y P6.1 transformadas con los genes de este estudio mostraron un patrón similar al de los casos anteriores. Se observan las bandas correspondientes a las copias endógenas, y por tanto idénticas a las de la cepa parental, más una banda adicional correspondiente a la copia exógena integrada (Figuras I.14-B y I.15-B). Como control del experimento se hibridó con una sonda del gen de resistencia *KanMX4* (Figura I.14-C y I.15-C). En todos los caso los tamaños y patrones de bandas obtenidos correspondieron a los esperados.

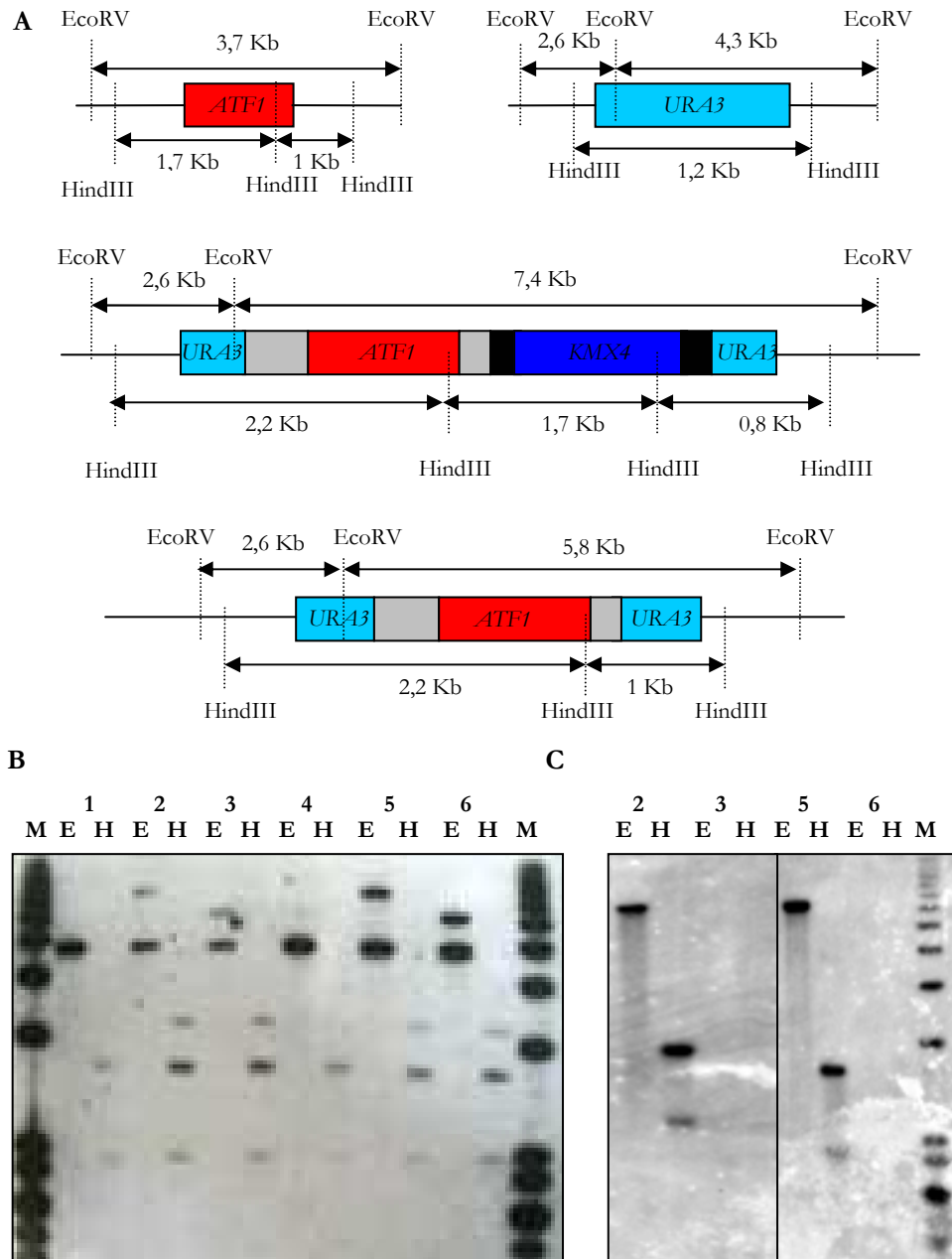


Figura I.14.- Esquema ilustrativo del patrón de restricción y los tamaños de bandas esperados (A), Southern blot de ADN genómico de las cepas transformadas con el gen *ATF1* digerido con EcoRV (E) y HindIII (H) e hibridado con una sonda del gen *ATF1* (B) y con una sonda del gen *KanMX4* (C). Se representan P2.1 (1), P2.1.1* (2), P2.1.1 (3), P6.1 (4), P6.1.1* (5) y P6.1.1 (6) siendo M el marcador de peso molecular. * Cepas transformadas antes de la escisión del gen *KanMX4*.

Los resultados de las pruebas moleculares no mostraron diferencias entre los dos transformantes seleccionados para cada gen analizado, por ese motivo todos los experimentos realizados a partir de este momento se llevaron a cabo con solo uno de ellos.

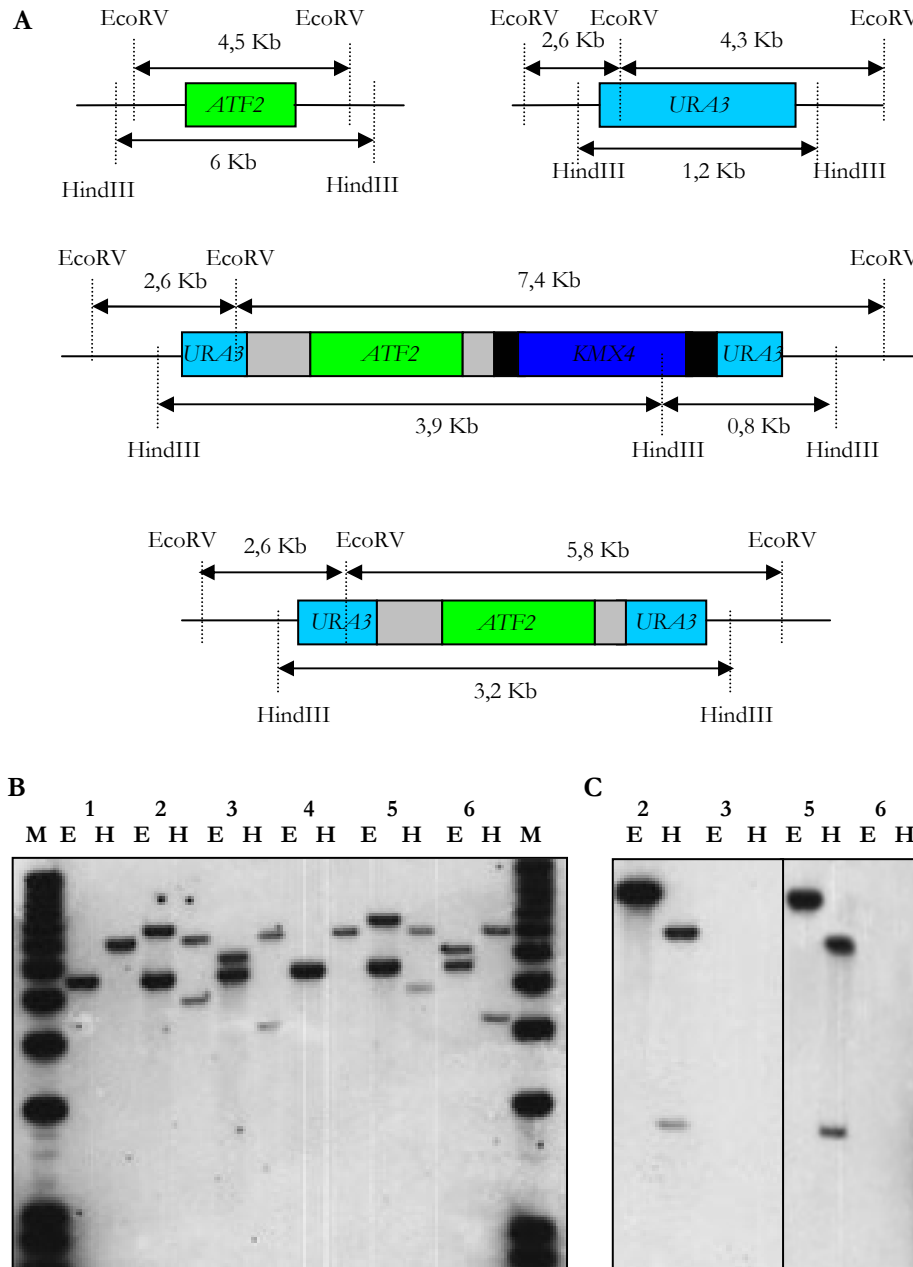


Figura I.15.- Esquema ilustrativo del patrón de restricción y los tamaños de bandas esperados (A), Southern blot de ADN genómico de las cepas transformadas con el gen *ATF2* digerido con *EcoRV* (E) y *HindIII* (H) e hibridado con una sonda del gen *ATF2* (B) y con una sonda del gen *KanMX4* (C). Se representan P2.1 (1), P2.1.2* (2), P2.1.2 (3), P6.1 (4), P6.1.2* (5) y P6.1.2 (6) siendo M el marcador de peso molecular. * Cepas transformadas antes de la escisión del gen *KanMX4*.

2.3.- Niveles de expresión de *ATF1* y *ATF2* en las cepas transformadas.

Con el fin de comprobar si en los transformantes los niveles de expresión aumentaron tras la integración de la copia extra del gen, se cuantificó la expresión de ambos genes en las cepas parentales y en los transformantes mediante rt-PCR (Materiales y

Métodos) a lo largo de la fermentación. Las cepas transformadas, bien con *ATF1* o con *ATF2*, mostraron mayor expresión de estos genes que la cepa PDC en todos los tiempos de fermentación ensayados (Figura I.16).

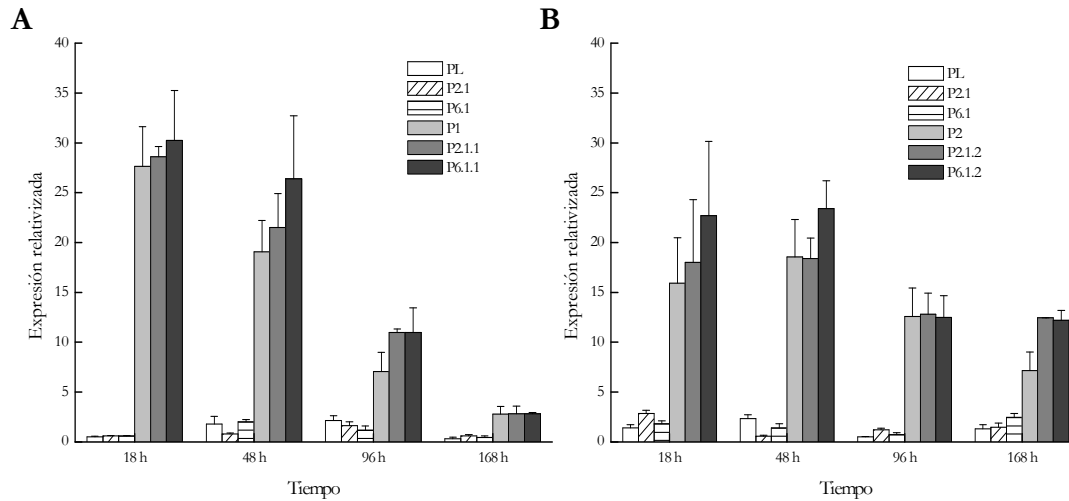


Figura I.16.- Expresión relativa de los genes *ATF1* (A) y *ATF2* (B) en las cepas transformadas durante la fermentación. Los valores que se representan están relativizados al obtenido en la cepa PDC.

2.4.- Caracterización fisiológica.

Para comprobar el posible uso industrial de todas las cepas transformadas obtenidas se realizaron fermentaciones de mosto de uva palomino. En este caso, y del mismo modo que en los derivados superproductores de fenilalanina, se realizaron medidas del contenido interno de aminoácidos, consumo de azúcares reductores, producción de etanol, glicerol y ácido acético y evolución del crecimiento celular. Finalmente se analizó el perfil organoléptico del vino obtenido.

2.4.1.- Concentración interna de aminoácidos.

En la cepa P1 (transformada con *ATF1*) se detectaron descensos significativos en el contenido de serina, leucina, alanina, prolina y fenilalanina, la cepa P2 (transformada con *ATF2*) también mostró descensos en la concentración de leucina, alanina, prolina, y fenilalanina, aunque en este caso el descenso en la concentración fue menos pronunciado (Tabla I.4). Para el resto de aminoácidos analizados los niveles en ambas cepas no mostraron diferencias significativas en comparación a los obtenidos en la cepa PDC (Tabla I.4)

Tabla I.4.- Contenido de aminoácidos en el mosto de partida y en las cepas PDC y derivados resistentes a PFP al final de fermentación (azúcar residual $\leq 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Los datos que se presentan son valores medios de tres experimentos independientes con desviación estándar. La concentración interna para cada cepa se indica en nanomoles del aminoácido por microgramo de proteína.

Aminoácido	CEPAS				Mosto $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
	PDC	PL	P1	P2	
Aspártico	0,71 ± 0,05	0,74 ± 0,02	0,63 ± 0,01	0,64 ± 0,01	5
Serina	2,46 ± 0,14	2,66 ± 0,07	1,62 ± 0,19	2,31 ± 0,12	10,4
Glutámico	4,35 ± 0,41	4,93 ± 0,13	3,65 ± 0,13	3,46 ± 0,21	15
Glicina	0,67 ± 0,08	0,58 ± 0,09	0,65 ± 0,02	0,78 ± 0,06	1
Arginina	1,82 ± 0,13	1,74 ± 0,12	3,25 ± 0,01	2,87 ± 0,11	253
Treonina	1,07 ± 0,14	1,53 ± 0,17	1,61 ± 0,04	1,03 ± 0,07	18,7
Alanina	15,75 ± 0,38	15,25 ± 0,37	3,90 ± 0,53	10,36 ± 0,12	48
Prolina	9,00 ± 0,04	8,83 ± 0,09	8,86 ± 0,01	8,00 ± 0,07	200
Tirosina	0,32 ± 0,01	0,31 ± 0,09	0,31 ± 0,04	0,49 ± 0,03	7,2
Histidina	1,46 ± 0,07	1,37 ± 0,06	1,65 ± 0,01	1,00 ± 0,04	20
Valina	1,16 ± 0,09	1,26 ± 0,08	1,09 ± 0,06	1,10 ± 0,02	13,5
Metionina	0,13 ± 0,02	0,12 ± 0,04	0,14 ± 0,02	0,16 ± 0,04	1,4
Lisina	1,96 ± 0,05	1,84 ± 0,07	1,63 ± 0,02	1,30 ± 0,05	2,5
Isoleucina	0,22 ± 0,09	0,18 ± 0,02	0,17 ± 0,07	0,21 ± 0,07	5,4
Leucina	0,38 ± 0,16	0,35 ± 0,15	0,08 ± 0,01	0,16 ± 0,07	7,2
Fenilalanina	0,17 ± 0,01	0,15 ± 0,04	0,05 ± 0,02	0,10 ± 0,02	10,3

Las cepas P2.1 y P6.1, derivados superproductores de fenilalanina de la cepa PDC, transformados con los genes *ATF1* y *ATF2* también mostraron descenso en los niveles de algunos aminoácidos con respecto a sus correspondientes cepas parentales (Tabla I.5).

Tabla I.5.- Contenido interno de cada aminoácido en las cepas resistentes a PFP P2.1 y P6.1 y los transformantes con los genes *ATF1* o *ATF2* al final de fermentación (azúcar residual $\leq 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$). Los datos que se presentan son valores medios de tres experimentos independientes con desviación estándar. La concentración se indica en nanomoles del aminoácido por microgramo de proteína.

Aminoácido	PDC	CEPAS					
		P2.1	P6.1	P2.1 1	P2.1 2	P6.1 1	P6.1 2
Aspártico	0,71 ± 0,05	0,74 ± 0,04	0,49 ± 0,02	0,70 ± 0,03	0,70 ± 0,02	0,44 ± 0,07	0,42 ± 0,04
Serina	2,46 ± 0,14	1,54 ± 0,13	1,05 ± 0,04	1,10 ± 0,03	1,33 ± 0,09	0,78 ± 0,07	1,29 ± 0,00
Glutámico	4,35 ± 0,41	5,01 ± 0,04	7,02 ± 0,04	4,26 ± 0,06	5,02 ± 0,14	6,93 ± 0,16	6,42 ± 0,24
Glicina	0,67 ± 0,08	0,91 ± 0,06	1,39 ± 0,06	1,05 ± 0,03	1,03 ± 0,09	1,53 ± 0,01	1,26 ± 0,09
Arginina	3,05 ± 0,13	4,54 ± 0,08	1,75 ± 0,07	4,41 ± 0,16	4,66 ± 0,10	2,19 ± 0,06	2,21 ± 0,01
Treonina	1,22 ± 0,14	0,96 ± 0,01	0,84 ± 0,04	0,98 ± 0,07	1,04 ± 0,09	0,79 ± 0,14	0,92 ± 0,05
Alanina	15,7 ± 0,38	16,3 ± 0,16	15,1 ± 0,20	5,57 ± 0,34	11,3 ± 0,16	5,02 ± 0,29	10,4 ± 0,51
Prolina	9,00 ± 0,04	8,2 ± 0,05	7,87 ± 0,04	7,59 ± 0,02	8,20 ± 0,08	8,01 ± 0,04	7,38 ± 0,31
Tirosina	0,32 ± 0,01	0,20 ± 0,05	0,38 ± 0,02	0,29 ± 0,05	0,31 ± 0,03	0,31 ± 0,06	0,35 ± 0,01
Histidina	1,46 ± 0,07	1,85 ± 0,12	1,96 ± 0,02	1,93 ± 0,03	1,59 ± 0,03	1,61 ± 0,02	1,70 ± 0,04
Valina	1,16 ± 0,09	0,98 ± 0,01	0,98 ± 0,04	0,75 ± 0,01	0,83 ± 0,01	0,77 ± 0,05	0,91 ± 0,00
Metionina	0,13 ± 0,02	0,15 ± 0,04	0,19 ± 0,02	0,20 ± 0,02	0,27 ± 0,07	0,25 ± 0,06	0,24 ± 0,03
Lisina	1,96 ± 0,05	2,91 ± 0,05	2,51 ± 0,04	2,45 ± 0,12	2,90 ± 0,02	2,42 ± 0,20	2,83 ± 0,11
Isoleucina	0,22 ± 0,09	0,25 ± 0,03	0,27 ± 0,02	0,45 ± 0,00	0,48 ± 0,02	0,46 ± 0,03	0,56 ± 0,01
Leucina	0,38 ± 0,16	0,40 ± 0,04	0,42 ± 0,04	0,88 ± 0,02	0,93 ± 0,07	0,93 ± 0,10	1,05 ± 0,09
Fenilalanina	0,17 ± 0,01	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,03	0,08 ± 0,01	0,24 ± 0,02	0,13 ± 0,07	0,25 ± 0,00

Como ya ocurriera en la cepa P1, la concentración de serina, alanina y fenilalanina en las cepas P2.1.1 y P6.1.1, ambos transformados con el gen *ATF1*, fue menor que en sus respectivos parentales, P2.1 y P6.1 (Tabla I.5). Además se observó un descenso en los niveles de valina y un aumento en los de leucina e isoleucina (Tabla I.5). Los derivados transformados con *ATF2* (P2.1.2 y P6.1.2) presentaron un perfil aminoacídico similar al que presentaron las cepas transformadas con *ATF1*, siendo en este caso menos pronunciados los descensos en las concentraciones (Tabla I.5). El resto de aminoácidos presentaron concentraciones similares a los obtenidos en las cepas parentales correspondientes (Tabla I.5).

2.4.2.- Crecimiento y consumo de azúcares reductores durante la fermentación.

Los valores de D.O._{660nm} de los cultivos de todas las cepas transformadas tanto con *ATF1* como con *ATF2* no mostraron diferencias significativas a los obtenidos por su correspondiente cepa parental (Figura I.17-A y I.17-B).

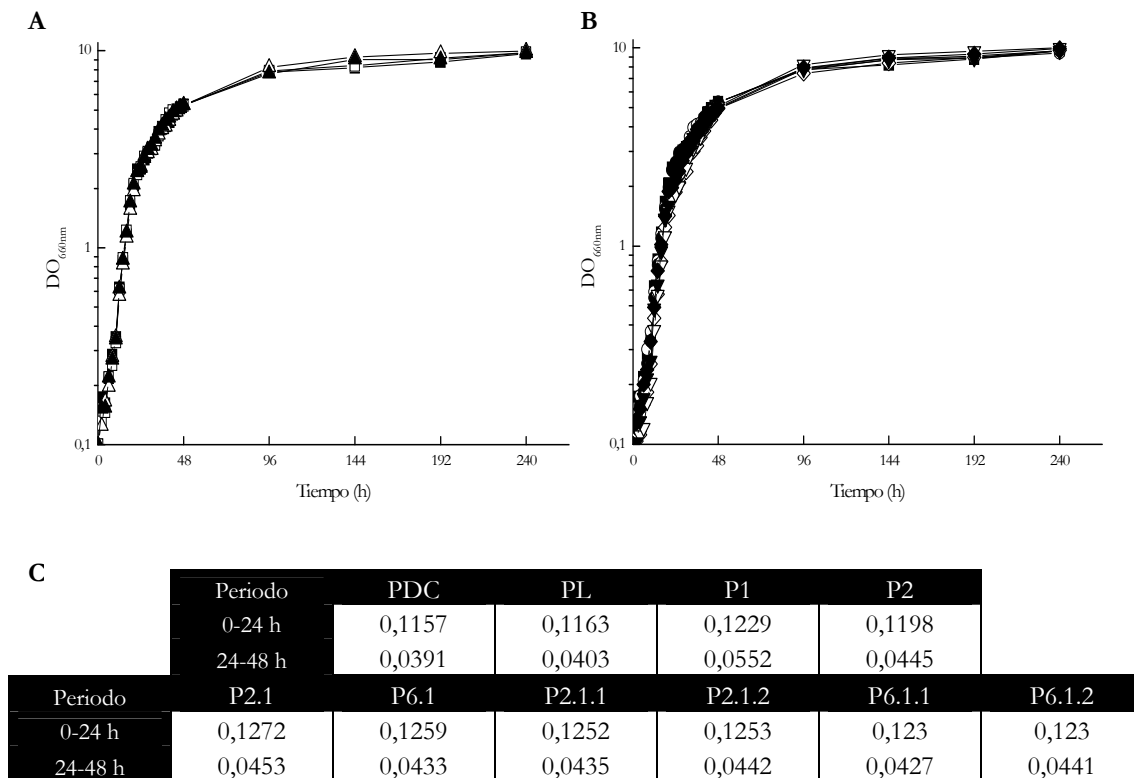


Figura I.17.- Cinética de crecimiento de las cepas derivadas del PDC auxótrofo transformadas con *ATF1* y *ATF2* (A) y de los superproductores P2.1 y P6.1 transformados con los mismos genes (B). Tasa de crecimiento de las cepas durante las primeras 24 h de fermentación y las siguiente 24 h (C). Los valores numéricos son media de dos experimentos independientes. En todos los casos las desviaciones fueron inferiores al 5%. Se representan las cepas PDC (■), PL (□) P2.1 (○), P6.1 (●), P1 (△), P2 (▲), P2.1.1 (◇), P2.1.2 (◆), P6.1.1 (▽) y P6.1.2 (▼).

Sin embargo al calcular la tasa de crecimiento en estas cepas ésta fue superior a la de las cepas sin transformar (Figura I.17-C).

Respecto al consumo de azúcares reductores todas las cepas transformadas fueron capaces de asimilar mayores niveles que sus respectivos parentales. Estas diferencias fueron más pronunciadas en el tramo final del proceso fermentativo (Figura I.18 y Apéndices III y IV).

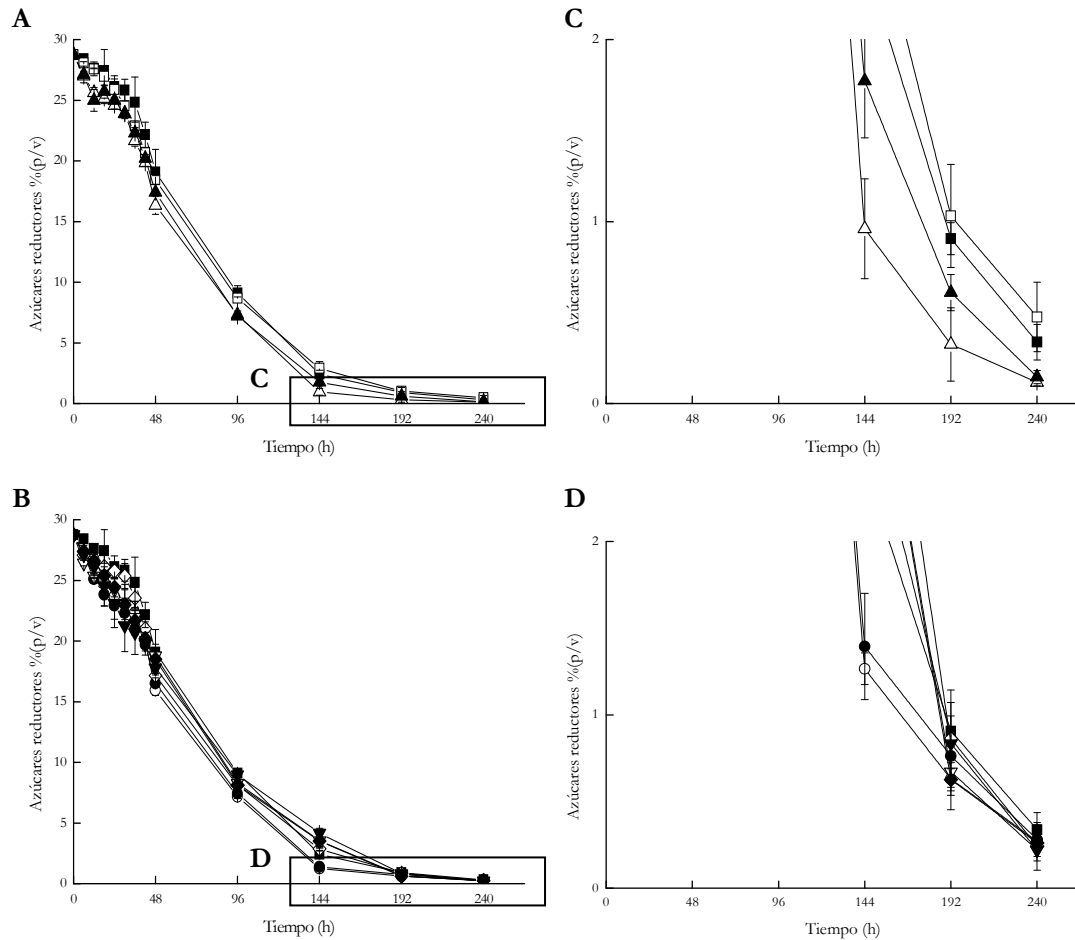
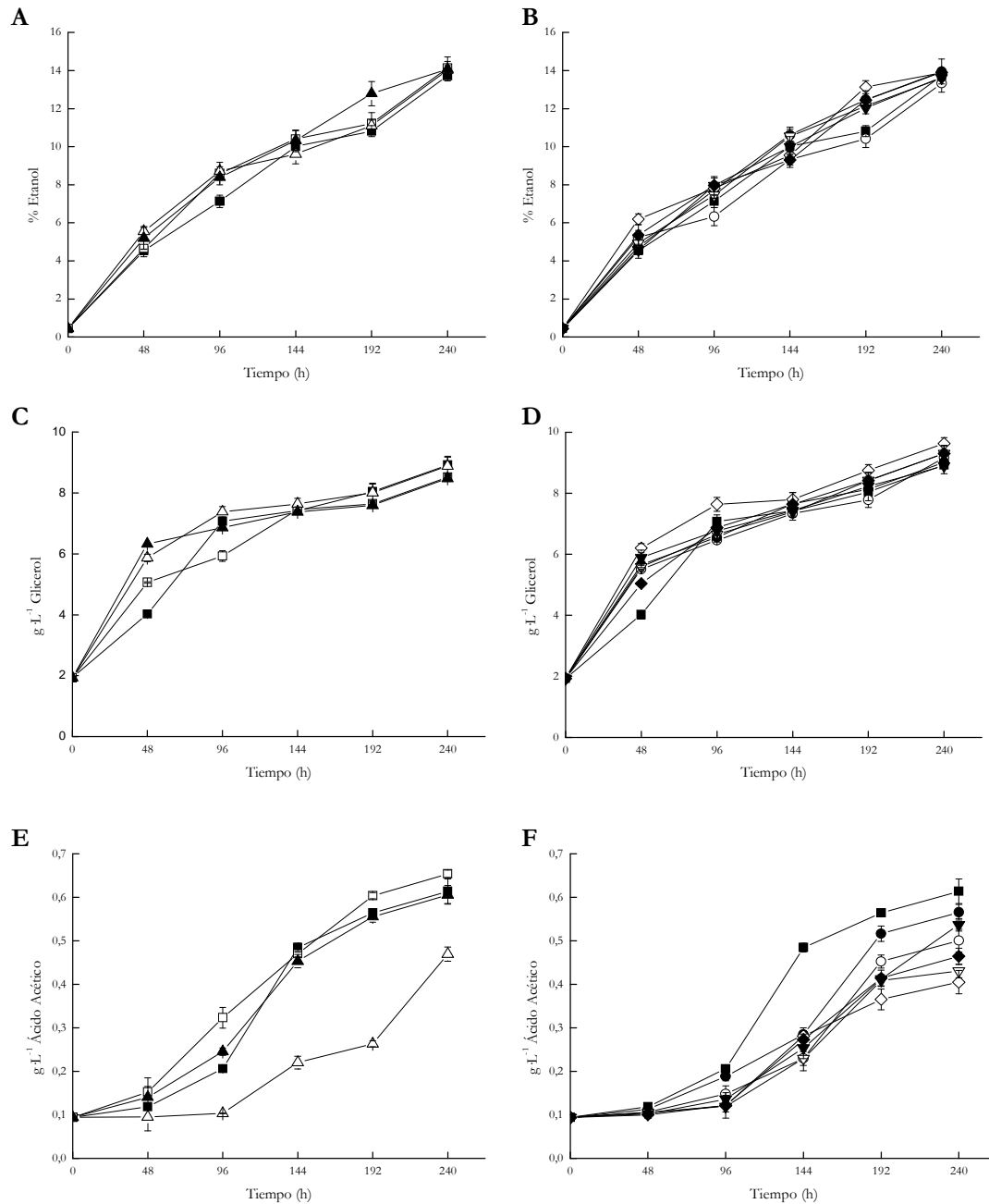


Figura I.18.- Consumo de azúcares reductores durante la fermentación en las cepas derivadas del PDC auxótrofo (A y C) y de los superproductores P2.1 y P6.1 (B y D). Los valores numéricos son media de dos experimentos independientes con desviación estándar. Se representan las cepas PDC (■), PL (□) P2.1 (○), P6.1 (●), P1 (△), P2 (▲), P2.1.1 (◇), P2.1.2 (◆), P6.1.1 (▽) y P6.1.2 (▼).

2.4.3.- Producción de etanol, glicerol y ácido acético.

La sobreexpresión de los genes *ATF1* o *ATF2* no afecta negativamente a la producción de etanol (Figura I.19-A y I.19-B) o glicerol (Figura I.19-C y I.19-D). En los vinos obtenidos tras la fermentación del mosto por parte de todas las cepas transformadas,

los niveles de etanol y glicerol fueron similares a los obtenidos en los producidos por las cepas parentales (Apéndices III y IV).



G

CEPA	PDC	PL	P1	P2
Valor de pH	3,10 ± 0,1	3,09 ± 0,08	3,30 ± 0,03	3,11 ± 0,03

CEPA	P2.1	P6.1	P2.1.1	P2.1.2	P6.1.1	P6.1.2
Valor de pH	3,19 ± 0,08	3,18 ± 0,09	3,25 ± 0,09	3,23 ± 0,03	3,21 ± 0,04	3,20 ± 0,06

Figura I.19.- Producción de etanol (A y B), glicerol (C y D) y ácido acético (E y F) en las cepas derivadas del PDC auxótrofo (A, C y E) y de los superproductores P2.1 y P6.1 (B, D y F). Valores de pH detectados en el vino al final de la fermentación (azúcar residual $\leq 5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) (G). Los valores numéricos son media de dos experimentos independientes con desviación estándar. Se representan las cepas PDC (■), PL (□) P2.1 (○), P6.1 (●), P1 (△), P2 (▲), P2.1.1 (◇), P2.1.2 (◆), P6.1.1 (▽) y P6.1.2 (▼).

Sin embargo, los niveles de ácido acético si se vieron alterados (Figura I.19-E, I.19-F y Apéndice III). En el caso de los vinos producidos por las cepas P1 y P2 mostraron ambos niveles inferiores en comparación con la cepa PDC, siendo este descenso más pronunciado en el derivado P1. Los transformantes derivados de las cepas P2.1 y P6.1 también mostraron concentraciones más bajas que sus respectivos parentales. Estos descensos en la producción de ácido acético se tradujeron en un leve aumento en el valor de pH en los vinos (Figura I.19-G).

2.4.4.- Producción de compuestos aromáticos.

Para comprobar el efecto de la sobreexpresión de *ATF1* y *ATF2* en el perfil organoléptico de los vinos se cuantificaron los compuestos aromáticos más característicos (Apéndices III y IV).

En los vinos base obtenidos con el PDC en comparación a los obtenidos con las cepas P1 y P2 se observó un descenso en los niveles tanto de acetaldehido como de 3-metilbutanol (isoamil alcohol) (Figura I.20). Por el contrario, la concentración de compuestos como el 2-feniletanol, y la mayoría de ésteres de etilo y de acetatos aumentó (Figura I.20). Estas diferencias son más acusadas en el vino producido por el transformante P1 que en el del P2 (Apéndice III). Para el resto de variables medidas no se obtuvieron diferencias significativas (Apéndice III).

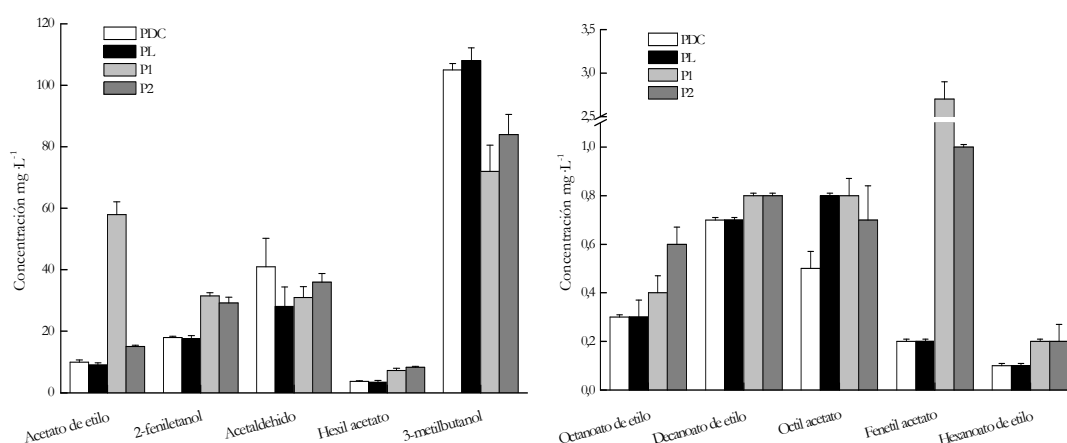


Figura I.20.- Concentración de alcoholes superiores y ésteres aromáticos medidos en los vinos jóvenes obtenidos tras la fermentación. Los valores numéricos se dan en mg·L⁻¹ y son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

En los vinos obtenidos por los transformantes P2.1.1, P2.1.2, P6.1.1 y P6.1.2 también se observó un descenso generalizado en los niveles de alcoholes superiores y un aumento en la concentración de ésteres en comparación a los producidos por las cepas P2.1 y P6.1 (Apéndice IV).

Cabe destacar el aumento detectado en los niveles de compuestos como el acetato de etilo o el fenil, hexil y octil acetato (Figura I.21). En este caso, de nuevo los transformantes con el gen *ATF1* mostraron diferencias más significativas que los transformantes con el gen *ATF2*.

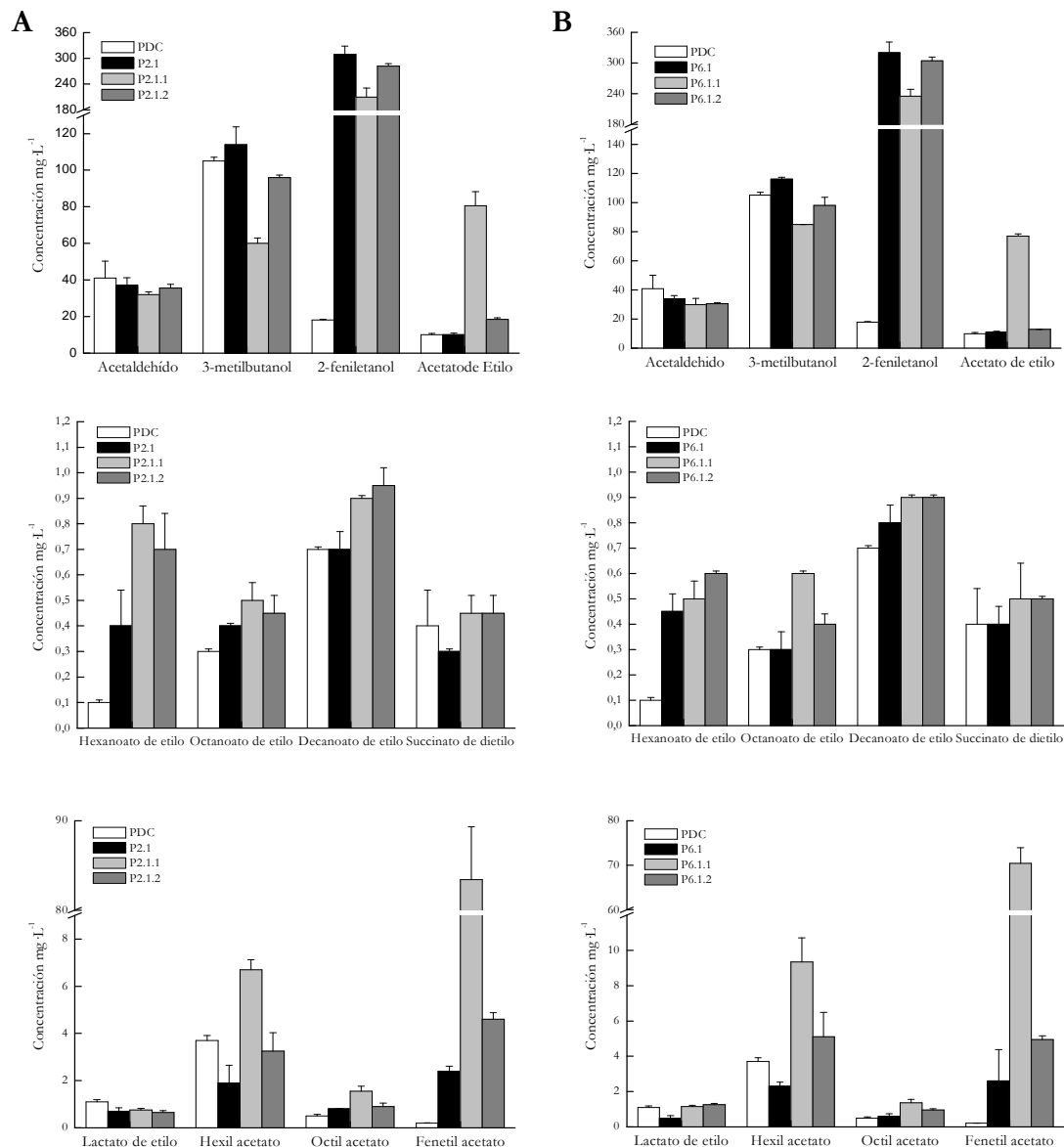


Figura I.21.- Concentración de alcoholes y ésteres aromáticos medidos en los vinos jóvenes obtenidos tras la fermentación con las cepas P2.1 (A) y P6.1 (B). Los valores numéricos se dan en $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ y son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

2.4.5.- Resistencia a desecación.

Como ya se hiciera con los derivados resistentes a PFP, se cultivaron las cepas transformadas con ambos genes en varios medios de cultivo y tras someterlas a desecación y rehidratación se midió la viabilidad celular. Los datos se compararon con los obtenidos para los respectivos parentales y no se encontraron diferencias significativas (Tabla I.6).

Tabla I.6.- Porcentaje de células viables tras desecación en las cepas transformadas con *ATF1* y *ATF2*. Se muestran datos de dos experimentos independientes en medio rico YPD, medio SD y al final de fermentación con desviación estándar.

Medio de cultivo	CEPAS			
	PDC	PL	P1	P2
YPD	51,62±2,72	47,45±5,22	50,9±2,74	58,1±2,03
SD	24,99±2,36	25,35±4,34	26,36±6,01	27,63±5,88
Mosto	45,11 ± 3,18	42,13 ± 1,56	45,50 ± 0,92	45,03 ± 2,95
	PDC	P2.1	P2.1.1	P2.1.2
YPD	51,62±2,72	59,76±1,68	54,78±2,46	54,62±1,33
SD	24,99±2,36	26,31±3,29	25,46±3,15	24,98±3,18
Mosto	45,11 ± 3,18	42,67 ± 3,05	44,47 ± 2,88	45,52 ± 5,26
	PDC	P6.1	P6.1.1	P6.1.2
YPD	51,62±2,72	55,38±2,07	57,9±2,38	57,11±2,28
SD	24,99±2,36	26,34±3,67	26,28±5,18	27,69±5,58
Mosto	45,11 ± 3,18	46,90 ± 3,04	44,90 ± 6,50	45,14 ± 6,51

Discusión

1.- Variaciones en la concentración interna de aminoácidos de cepas utilizadas como pie de cuba y sus consecuencias sobre las propiedades organolépticas del vino.

La exposición de la cepa parental PDC a concentraciones crecientes de PFP ha permitido aislar derivados resistentes a distintas concentraciones del tóxico. Dicha selección se realizó en medio mínimo en presencia de una fuente pobre de nitrógeno. De esta forma se seleccionan derivados que no presentan pérdida de función en la permeasa general de aminoácidos, lo que indica que la resistencia al tóxico no se debe a la incapacidad de transportarlo al interior celular. Se pretendía aislar mutantes espontáneos superproductores de fenilalanina que, probablemente hubieran perdido la retroinhibición por producto final. El aumento en la concentración de fenilalanina diluiría la concentración del tóxico en el interior celular haciendo a las cepas resistentes al mismo. En los derivados P2.1, P2.6, P6.1 y P8.1 la acumulación de fenilalanina puede deberse a mutaciones puntuales en las enzimas *Aro3p*, *Aro4p* o *Aro7p*, las cuales hacen que pierdan la retroinhibición (Fukuda et al, 1992; Luttkik et al, 2008; Schnappauf et al, 1998). También podría deberse a mutaciones en la enzima *Tyr1p* ya que la PFP actúa a nivel de dicha enzima (Fukuda et al, 1991b; Fukuda et al, 1991a), pero el contenido interno en aminoácidos en los derivados no muestra diferencias significativas en los niveles de tirosina y la concentración de triptófano no se ha podido determinar. Otras alternativas que expliquen el fenotipo observado en los superproductores podrían ser mutaciones que alteraran la expresión de los genes *ARO3* o *ARO4*, la desviación del flujo de síntesis hacia la producción de fenilalanina o, a la vista del cariotipo electroforético, cambios metabólicos no caracterizados, resultado de una pequeña reorganización a nivel de algún cromosoma (Figura I.5).

En general las cepas resistentes a PFP con variantes alélicas carentes de retroinhibición por producto final también muestran variaciones en las concentraciones de aminoácidos no aromáticos (Fukuda et al, 1991a; Luttkik et al, 2008). En nuestro caso las cepas derivadas muestran un aumento generalizado de arginina (Tabla I.1). Se ha descrito que la acumulación de este aminoácido, además de otros como la prolina, confieren resistencia a congelación y desecación en levaduras panaderas (Shima et al, 2003) y en cepas productoras de *Sake* (Takagi et al, 2005). Por este motivo se sometieron las cepas resistentes a PFP a un proceso de desecación, rehidratación y posterior medida de viabilidad. En ninguno de los derivados se obtuvo un aumento significativo en el porcentaje de células vivas comparado con el obtenido en la cepa PDC. Esto indicaría que

en este tipo de levaduras, al igual que ocurre en las de *Sake*, la arginina no tiene un efecto protector frente a desecación.

Para comprobar la aplicabilidad industrial de estos derivados espontáneos se realizaron una serie de análisis sobre propiedades importantes en este tipo de levaduras. En primer lugar se midió el contenido interno de aminoácidos al final de la fermentación. Los resultados muestran que todos los derivados siguen presentando niveles superiores de fenilalanina que la cepa parental. La concentración interna de los aminoácidos en estas condiciones son mucho menores que en medio mínimo, pero los valores no son comparables ya que en mosto la síntesis de aminoácidos se encuentra reprimida (Zaman et al, 2008). En estas condiciones las levaduras incorporan los aminoácidos del medio y cuando estos se empiezan a agotar comienzan a sintetizarlos, por lo que posiblemente los valores numéricos obtenidos corresponden a los aminoácidos sintetizados de novo por la célula (Goñi & Azpilicueta, 1999).

Respecto al crecimiento y consumo de azúcares todos los derivados producen un vino con menor cantidad de azúcar residual. Este descenso se ve reflejado en un leve aumento en la producción de etanol (Figura I.7). La disminución que se observa en los niveles de ácido acético posiblemente se deba a que dicho compuesto lo utilizan las levaduras como precursor en la síntesis de acetatos de ésteres, los cuales aumentan de forma significativa en algunos de los derivados (Apéndice IV).

Los perfiles organolépticos en los vinos producidos por los derivados muestran un aumento significativo en los niveles de varios alcoholes superiores como el feniletanol, 3-metilbutanol, 2-metilbutanol o isobutanol (Apéndice II y IV). El aumento en los niveles de feniletanol está determinado por el aumento en la concentración de fenilalanina en el interior celular. Sin embargo, los niveles de leucina, isoleucina y valina (aminoácidos precursores del resto de alcoholes que aumentan su concentración) no cambian de forma significativa, por lo que este incremento en la concentración puede deberse a otros factores tales como la capacidad por parte de los derivados de incorporar dichos aminoácidos del medio de cultivo.

La exposición de la cepa PDC a PFP ha originado cepas capaces de superproducir fenilalanina y otros aminoácidos. Estos derivados espontáneos tienen propiedades fisiológicas similares al parental respecto a la resistencia frente a desecación o producción de glicerol. Además, producen vinos con menores niveles de azúcar residual, lo cual dificulta posibles contaminaciones por microorganismos no deseados, y con mayores

niveles de compuestos aromáticos fundamentales como feniletanol, hexanoato de etilo, fenilacetato u octil acetato. Estos mutantes han sido seleccionados sin manipulación genética vía ADN recombinante, por lo que su uso industrial podría ser inmediato.

2.- Sobreexpresión en levaduras fermentativas de los genes *ATF1* y *ATF2* y su efecto en el perfil aromático de vinos jóvenes.

La sobreexpresión de los genes de este estudio mediante transformación con construcciones integrativas dirigidas a locus específicos ha permitido la obtención de cepas transformadas estables, las cuales no han sufrido ningún proceso de reorganización cromosómica (Figuras I.10 y I.11). Además, mediante hibridaciones tipo Southern de dicho patrón cromosómico y de ADN genómico se ha comprobado que la integración, de al menos una copia adicional, se ha producido en el locus al cual se dirigió, por lo que el efecto fisiológico observado en los transformantes posiblemente se deba a la sobreexpresión de los genes *ATF1* y *ATF2* y no a un efecto de posicionamiento de la construcción en zonas del genoma con mayor o menor expresión (Figuras I.12 a I.15).

Todas las cepas transformadas muestran, durante la fermentación del mosto, mayores niveles de expresión de los genes *ATF1* o *ATF2* con los que fueron transformadas. Además, esta expresión es similar en todos los casos, independientemente de si la cepa de la que procede el transformante es el Δ PDC o los resistentes a PFP P2.1 y P6.1 (Figura I.16). En todos los transformantes los genes *ATF1* y *ATF2* se encuentran bajo el control del promotor del gen TDH3 (*gpd*). Éste ya se ha utilizado en otros trabajos con levaduras vínicas (Puig & Perez-Ortin, 2000), y muestra expresión constitutiva tanto en medios con fuente de carbono fermentables como no fermentables (Kuroda et al, 1994). Por lo tanto, al estar la expresión en las cepas transformadas relativizada a la de la cepa PDC, los cambios en los niveles de expresión tanto de *ATF1* como de *ATF2* a lo largo de la fermentación seguramente se deben a la expresión diferencial de ambos genes a lo largo del proceso fermentativo.

Respecto a la formación de ésteres aromáticos, los aminoácidos más importantes son la fenilalanina, leucina, alanina, serina y valina. De estos, a través de la ruta Ehrlich derivan los alcoholes secundarios y demás metabolitos precursores de su síntesis (Dickinson et al, 2003; Dickinson et al, 1997; Dickinson et al, 2000; Dickinson et al, 1998). El último paso es una reacción catalizada tanto por *ATF1* como por *ATF2* (Nagasawa et al, 1998; Fujii et al, 1996; Fujii et al, 1994; Yoshimoto et al, 1999; Lilly et al, 2000; Mason & Dufour, 2000; Rossouw et al, 2008).

En las cepas P1 y P2 los niveles tanto de alanina como de serina son menores a los del PDC. Estos dos aminoácidos están involucrados en la formación de piruvato, el cual se transforma en acetaldehído y este en acetato y etanol. Este etanol junto con ácido acético y la acción de *ATF1* y *ATF2* se transforma en acetato de etilo (Rossouw et al, 2008). Esto se refleja en los resultados obtenidos donde se observa disminución de los niveles de estos aminoácidos y en los niveles de acetaldehído y aumento en la concentración de acetato de etilo (Apéndice III). El descenso en la concentración de acetaldehído seguramente se deba al aumento de actividad de las acetiltransferasas, las cuales demandan una mayor cantidad de sustrato para su reacción. También se ha descrito la preferencia de cada alcohol acetiltransferasas por uno u otro tipo de sustrato (Mason & Dufour, 2000; Lilly et al, 2000; Lilly et al, 2006; Verstrepen et al, 2003c), de modo que *ATF1* está mucho más implicada en la formación de este acetato que *ATF2* (Apéndice III). La disminución en los niveles de fenilalanina es mucho mayor en P1 que en P2, por lo que las concentraciones tanto de feniletanol como de fenilacetato son mayores en una cepa que en otra. La leucina está implicada en la formación de numerosos compuestos aromáticos. Interviene en la formación de isoamil alcohol a partir del cual se sintetiza el isoamil acetato. También influye en los niveles de dietil succinato, isobutanol, propanol, isobutil acetato y etil caprato (Rossouw et al, 2008). De todos ellos la sobreexpresión de *ATF1* o *ATF2* afecta a los niveles de los acetatos de ésteres y los alcoholes de los que proceden. Tanto P1 como P2 muestran un descenso en los niveles de leucina, el cual debería traducirse en un aumento en los niveles de 3-metilbutanol, isobutanol, propanol o dietil succinato. Los dos últimos no varían significativamente y los dos primeros disminuyen, posiblemente debido a la formación de los correspondientes isoamil e isobutil acetato. Dichos compuestos no se han podido medir en este trabajo, aunque seguramente sus niveles en las cepas transformadas serán superiores a los de la cepa PDC.

Del resto de compuestos aromáticos destaca el aumento de hexil y octil acetato y hexanoato y octanoato de etilo. El aumento en los acetatos se explica por la sobreexpresión de *ATF1* o *ATF2*, además, los niveles de hexanol (precursor del hexil acetato) disminuyen (Apéndice III). Por otro lado, la enzima Eht1p está implicada en la formación de ésteres de etilo como el hexanoato, octanoato, decanoato y laurato (Malcorps & Dufour, 1992; Mason & Dufour, 2000; Verstrepen et al, 2003c). En condiciones fisiológicas normales debe existir un equilibrio en la actividad de estos dos tipos de enzimas, pero puede que la sobreexpresión de los genes de este estudio tenga algún efecto sobre Eht1p, lo cual conduce a un aumento en la concentración de estos compuestos aromáticos.

Las cepas P2.1.1, P2.1.2, P6.1.1 y P6.1.2, al igual que P1 y P2 presentan una disminución en los niveles internos de serina y alanina, y un aumento en los niveles de acetato de etilo, producido por el aumento de la actividad de Atf1p y Atf2p. Los niveles de fenilalanina también son menores, pero al contrario de lo que ocurriera en las cepas P1 y P2, hay un descenso en los niveles de feniletanol. Este fenómeno posiblemente se deba a la capacidad de estas cepas de superproducir fenilalanina. Esto conlleva un aumento en la concentración de feniletanol, el cual es más que suficiente para cubrir el gasto del mismo requerido tanto por *ATF1* como por *ATF2* para la formación de fenilacetato. El descenso en estas cepas de los niveles de valina e isobutanol indican el posible aumento en la concentración de isobutil acetato. Esto no se puede demostrar puesto que el compuesto no se ha podido medir. Lo mismo ocurre con el isoamil acetato, que puede que presente valores superiores en los transformantes, ya que los niveles de isoamil alcohol son menores (Apéndice IV). Del mismo modo, la concentración de leucina e isoleucina debería ser menor, pero la concentración de ambos aminoácidos es superior. Tanto P2.1 y P6.1 son cepas que han sufrido pequeñas reorganizaciones cromosómicas y que posiblemente tengan la síntesis general de aminoácidos desregulada. El hecho es que los niveles de compuestos como el acetato de etilo, hexil acetato u octil acetato presentan un mayor aumento en estas cepas en proporción al experimentado en las cepas P1 y P2. Esto indica un mayor efecto de la sobreexpresión de estos genes en las cepas transformadas derivadas de los resistentes a PFP que en las derivadas de la cepa Δ PDC.

Los cambios en el resto de componentes aromáticos en estas cepas transformadas son similares a los experimentados por las cepas P1 y P2 por lo que dichos cambios siguen el mismo razonamiento.

Ninguno de los transformantes procedentes tanto de la cepa Δ PDC como de las cepas P2.1 y P6.1 muestra cambios significativos en el resto de variables fermentativas ensayadas, manteniendo la misma resistencia a desecación y produciendo niveles de etanol y glicerol similares. Sin embargo los niveles de acético en todos los transformantes, especialmente en los transformados con *ATF1* (P1, P2.1.1 y P6.1.1) son significativamente menores que en las cepas parentales, debido posiblemente al uso del mismo como precursor de varios compuestos aromáticos. Además son cepas capaces de incorporar y asimilar una mayor cantidad de azúcar del medio y producir más etanol, dando un vino con menos azúcar residual. Esto contribuye a evitar posibles contaminaciones de microorganismos no deseados en el vino durante la maduración.

Todas las cepas obtenidas carecen de marcadores de resistencia a antibióticos por lo que podrían ser utilizadas en un futuro a nivel industrial. Además su capacidad fermentativa y variables enológicas más significativas no han sufrido apenas cambio, por lo que el producto final obtenido no perdería su seña de identidad, únicamente presentaría un aroma más afrutado y floral.

Hay que tener en cuenta que los datos obtenidos son de los vinos jóvenes. Estos vinos se *encabezan* y someten a crianza biológica (Introducción General Figura 2), por lo que el perfil aromático del producto final puede verse sometido a cambios en su composición.

Se ha descrito que durante la crianza biológica los niveles de glicerol y acético pasan de 9 y 0,4 g · L⁻¹ respectivamente en el vino joven a 1 g · L⁻¹ de glicerol y entre 0- 0,05 g · L⁻¹ de acético en la *Solera*. Además, el acetaldehído aumenta hasta 300-400 mg · L⁻¹ y el etanol se mantiene más o menos constante (Berlenga et al, 2004; Martínez et al, 1993). La concentración de compuestos aromáticos importantes como el hexanol, feniletanol, acetato de etilo, lactato de etilo o decanoato de etilo aumenta durante la crianza biológica, mientras que la de la mayoría de ésteres de acetatos disminuye levemente (Moyano et al, 2009; Moreno et al, 2005). Todos los vinos jóvenes son sometidos al mismo proceso de maduración (mismo sistema de *criaderas* y *solera*, mismas cepas formadoras de velo, mismas botas de roble, etc), por lo que las diferencias (ya sean aumentos o descensos en la concentración) obtenidas en los niveles de compuestos aromáticos en los vinos jóvenes se mantendrán, en principio, hasta el final del proceso de crianza y por tanto en el producto final.

Capítulo II:
Caracterización molecular y fisiológica de levaduras formadoras *de velo*
***de flor* implicadas en crianza biológica.**

Introducción

1.- Características de levaduras implicadas en la maduración de vinos con crianza biológica.

1.1.- Características fisiológicas.

1.1.1.- Metabolismo respiratorio.

Al final del proceso fermentativo la concentración de azúcar en el vino base es mínima, así que para obtener energía estas cepas utilizan fuentes de carbono alternativas que si se encuentran presentes en el vino como el etanol o el glicerol. Estas levaduras metabolizan estos compuestos y obtienen intermediarios que incorporan a la cadena respiratoria mitocondrial para obtener energía en forma de ATP (Figura II.1). La expresión de los genes mitocondriales implicados en la respiración depende de la presencia de oxígeno (Schüller, 2003), por este motivo las levaduras se disponen en la superficie del vino, a fin de tener acceso al oxígeno presente en la porción de bota que se ha dejado vacía.

La síntesis de las enzimas implicadas en este tipo de metabolismo solo se produce cuando éstas son necesarias y su regulación ocurre casi exclusivamente a nivel transcripcional (Turcotte et al, 2010). La activación transcripcional se realizará en función de la fuente de carbono no fermentable disponible. Aparte de las enzimas implicadas en la incorporación y transformación del etanol y glicerol hacia compuestos que puedan ser utilizados para obtener energía, también se expresan aquellas enzimas implicadas en el ciclo de Krebs y en la cadena respiratoria mitocondrial.

La respiración del etanol comienza con su transformación en el citosol a acetaldehído por acción de la alcohol deshidrogenasa Adh2p. Éste resulta tóxico para la célula por lo que parte se expulsa al medio y parte se transforma en acetato por alguna de las dos aldehído deshidrogenasas citoplasmáticas codificadas por los genes *ALD6* o *ALD3* (Figura II.1). El acetato formará acetil-CoA mediante la acetil-CoA sintetasa Acs1p, siendo éste incorporado a la mitocondria y utilizado para iniciar el ciclo de Krebs.

La utilización del glicerol es un poco más compleja. Se incorpora al interior celular por simporte a través de la proteína Stl1p. Mediante dos reacciones catalizadas por Gut1p y Gut2p se formará dihidroxiacetona fosfato (DHAP), la cual entrará en el flujo glucolítico. Una vez se ha metabolizado hasta piruvato, puede seguir la ruta del acetato, anteriormente indicada, o bien ser transportado a la mitocondria, en donde la piruvato deshidrogenasa lo metabolizará en acetil-CoA (Figura II.1) (Pronk et al, 1996). Coincidiendo con la fase respiratoria, en levaduras se da la gluconeogénesis, proceso por el que se sintetiza trehalosa y glucógeno a partir de etanol y

glicerol (Figura II.1). Mediante la respiración y el metabolismo del glicerol se obtienen grandes cantidades de acetyl-CoA, precursor junto con el oxalacetato del ciclo de Krebs. Este ciclo tiene lugar en el interior de la mitocondria e incrementa la concentración de NADH en la matriz mitocondrial, el cual se usa como donador de electrones en la cadena transportadora de electrones, permitiendo la generación de un gradiente electroquímico de protones que posibilita la generación de energía en forma de ATP (Figura II.1).

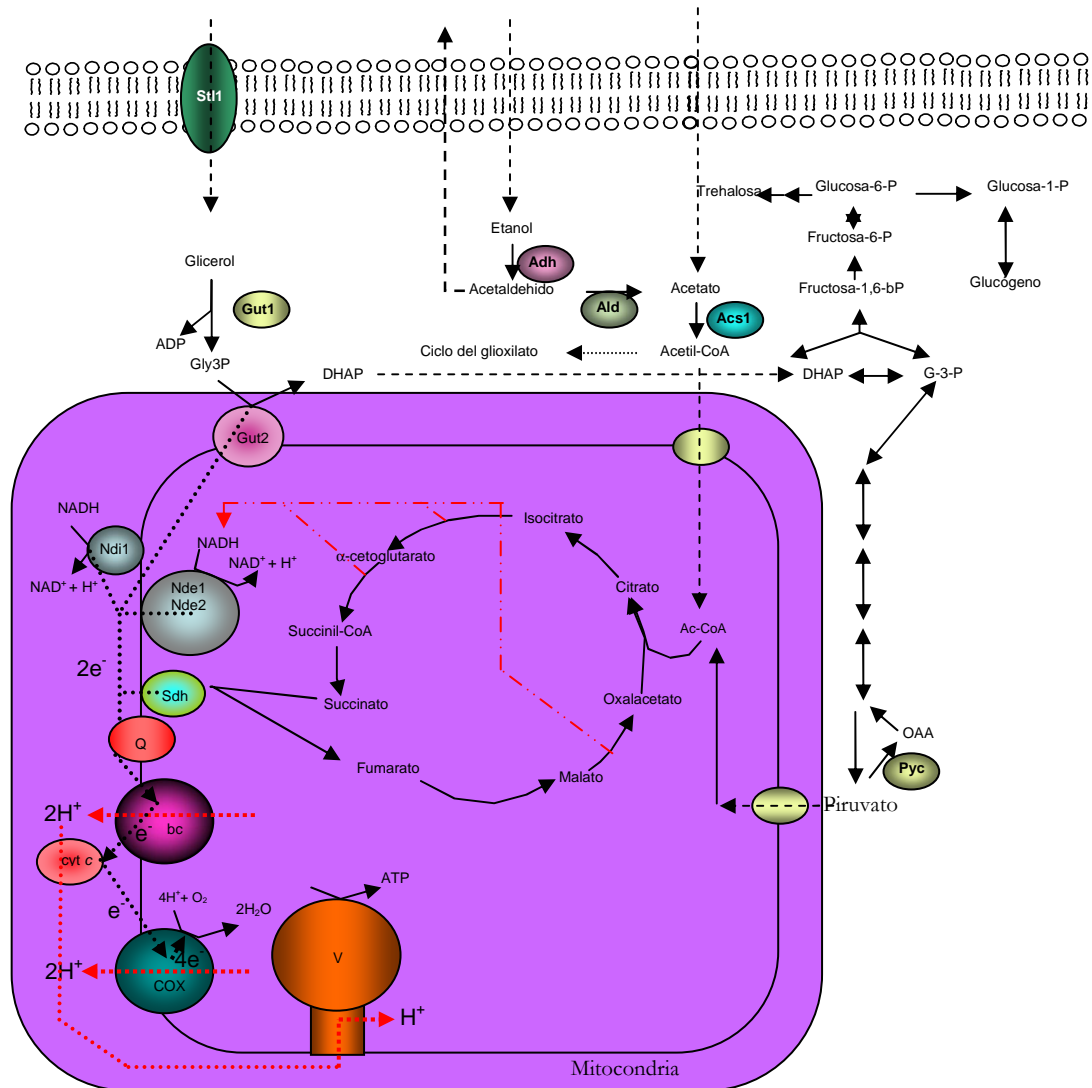


Figura II.1.- Rutas metabólicas en condiciones de fuentes de carbono no fermentables. Adaptada de Dueñas-Sánchez tesis doctoral 2010.

1.1.2.- Formación del *velo de flor*.

El *velo de flor* es una película blanca, gruesa y rugosa que se forma en la superficie del vino durante la crianza biológica a la que son sometidos los vinos tipo *Finos*, *Manzanilla* y

Amontillados. Está formado por levaduras capaces de crecer y sobrevivir en condiciones hostiles tales como altas concentraciones de etanol y acetaldehído, estrés oxidativo, estrés hídrico y fuentes de nitrógeno de difícil asimilación como la prolina. Frente a estas condiciones, el *velo* se considera un mecanismo de defensa y adaptación consistente en cambios en el tamaño, forma e hidrofobicidad de las células. El proceso de formación de *velo* no ocurre en presencia de fuentes de carbono fermentables ni en presencia de amonio, pero si en presencia de prolina como fuente de nitrógeno, y etanol, glicerol o acetato de etilo como fuente de carbono (Fidalgo et al, 2006; Martínez et al, 1997b).

Algunos autores han considerado la formación del *velo* consecuencia de la actividad lipogénica causada por el etanol (Bravo-Abad, 1986). Posteriormente, otros autores han encontrado que la adición de ácido oleico o ergosterol no afecta al proceso de formación del *velo*, mientras que la adición de proteasas lo disgrega y disminuye la hidrofobicidad (Martínez et al, 1997a) lo que indica que el proceso depende de proteínas hidrofóbicas. Esta hidrofobicidad hace que las células se agreguen, los agregados se unen a burbujas de gas originadas durante la respiración y el conjunto flota en la superficie del vino. También se ha comparado el fenómeno de formación de *velo* con una forma especial de floculación, y los genes responsables están también implicados en la formación de pseudohifas y en el crecimiento invasivo (Budroni et al, 1995; Lambrechts et al, 1996). La comparación con fenómenos de floculación y filamentación se debe a que también en estos casos las células incrementan sensiblemente su hidrofobicidad (Straver & Kijne, 1996) y los procesos se activan en condiciones de limitación de nitrógeno (Douglas et al, 2007; Ma et al, 2007).

Los genes responsables de la floculación (genes *FLO*) codifican proteínas de superficie llamadas adhesinas (Huang et al, 2009). Están formadas por regiones repetidas que se organizan de forma característica desde la membrana plasmática hasta la superficie de la célula, atravesando la pared celular (Douglas et al, 2007; van Mulders et al, 2009). Uno de los genes responsables de la agregación celular, *FLO11*, regula la floculación, formación de pseudomicelio, la formación de *velo* y el crecimiento invasivo en levaduras (Barrales et al, 2008; Fidalgo et al, 2006; Lambrechts et al, 1996; Lo & Dranginis, 1996; Palecek et al, 2000; Tamaki et al, 2000), fenómenos que van acompañados en todos los casos del incremento de la hidrofobicidad celular (Purevdorj-Gage et al, 2007). Condiciones adversas, tales como la presencia de etanol y acetaldehído, el bajo pH o la falta de nutrientes activan los genes que codifican las adhesinas, normalmente a través de rutas de señalización dependientes de MAPK u otros activadores como Rim20p (Barrales et al, 2008; van Dyk et al, 2005; Verstrepen & Klis, 2006). Sin embargo, a veces se dan efectos negativos sinérgicos, por

ejemplo alta temperatura y etanol, alargando el tiempo necesario para que el velo se forme o llegando incluso a la pérdida del mismo (Ibeas et al, 1997).

La posible relación entre floculación, formación de *velo* y crecimiento pseudomicelial (Ishigami et al, 2006) se han visto apoyadas por los altos niveles de expresión de los genes *FLO*, fundamentalmente del gen *FLO11*, durante la fase de *velo* (Infante et al, 2003).

Estudios recientes han demostrado que además de estas adhesinas, existen otras proteínas de pared implicadas en la formación del *velo de flor*, como es el caso de Ccw7p/Hsp150p (Kovacs et al, 2008). Del mismo modo, proteínas implicadas en la respuesta a estrés, como Hsp12p, o en el transporte intracelular también se encuentran relacionadas, directa o indirectamente, con este fenómeno (Zara et al, 2002; Espinazo-Romeu et al, 2008; Karreman et al, 2007).

1.2.- Características genéticas.

1.2.1.- Estructura genética de cepas de laboratorio e industriales.

Gran parte de las cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en los laboratorios de biología molecular son haploides. También se utilizan cepas diploides, originadas por el cruzamiento de dos haploides isogénicas de distinto sexo.

La cepa de laboratorio S288C tiene un total de 16 cromosomas con tamaños comprendidos entre los 200 y los 2200 Kb (Sherman, 2002) y un total de 6183 ORFs. También cabe destacar la presencia de secuencias de ADN repetido entre las que destacan ADN codificante de ARNr (7%), elementos *Ty* (3%) (Mieczkowski et al, 2006), ADN codificante de ARNt, ADN telomérico y subtelomérico y familias de genes con varias repeticiones (SGD y Gasent-Ramírez, 1997 tesis doctoral).

Por otro lado, las levaduras de uso industrial suelen presentar una estructura genómica más compleja ya que la mayoría de ellas son híbridos de dos o más especies. El primer genomio de levadura industrial disponible se corresponde con *S. pastorianus* Weihenstephan 34/75. Esta cepa es cervecera, de tipo Lager, híbrido entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus* (Nakao et al, 2009). Las cepas Lager son poliploides debido a una duplicación de todo el genomio. La existencia de aneuploidías en estas cepas son frecuentes, debido a un mal reparto mitótico (Querol & Bond, 2009). Además, es común observar la existencia de

cromosomas quiméricos resultantes de la recombinación entre cromosomas homeólogos (homólogos de distintas especies).

Las cepas panaderas suelen pertenecer a la especie *S. cerevisiae* (Rández-Gil et al, 2003) sin la aparición de híbridos, aunque este hecho no se ha comprobado. Gran parte de la información de este tipo de levaduras proceden de los trabajos que intentaban utilizar distintos tipos de técnicas moleculares para “etiquetarlas” (Codón & Benítez, 1995; Codón et al, 1998). Datos previos indican que las levaduras panaderas presentan en muchos casos un grado de ploidía superior a dos, con una fuerte tendencia a la presencia de aneuploidías (Codón et al, 1995; Codón et al, 2003).

Las cepas de levaduras vínicas responsables de la fermentación alcohólica pertenecen mayoritariamente a la especie *S. cerevisiae*. También se han encontrado cepas de las especies *S. bayanus var uvarum* en la elaboración de vinos cuya fermentación se produce a bajas temperaturas y de *Saccharomyces paradoxus* en vinos elaborados en Croacia (Querol & Bond, 2009; Naumov et al ,2002; Redzepović et al 2002). También podemos encontrar cepas híbridas, frecuentemente diploides, entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, (implicadas en la elaboración de vinos de Italia, Hungría o Francia), de *S. cerevisiae* y *S. kudriavzevii*, (responsables de la fermentación espontánea en vinos suizos) o alotriploides de *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii* y *S. bayanus var. uvarum* (involucradas en la elaboración de sidra en Francia) (Legras et al, 2007; Querol & Bond, 2009).

Las condiciones ambientales que soportan las levaduras industriales favorecen la selección de genomios estables, al menos, mitóticamente (Querol & Bond, 2009). Del mismo modo estas condiciones ambientales han fijado una serie de características fisiológicas particulares en las cepas, resultado de la presión selectiva a la que ha sido sometido su material genético.

Experimentos de micro y macroarrays han permitido comparar el genomio de células de levaduras de *velo de flor* y de laboratorio, detectando diferencias gen a gen. De esta forma se han podido identificar cromosomas, regiones de cromosomas o genes que afectan a fenómenos de aneuploidías, amplificaciones o deleciones y que son en parte responsables de la variabilidad genética encontrada y de las propiedades enológicas que presentan este tipo de levaduras (Hu et al, 2007; Infante et al, 2003).

1.2.2.- Características moleculares de levaduras formadoras de *velo de flor*.

El desarrollo de técnicas de biología molecular como alternativa a los métodos tradicionales ha permitido una clasificación más precisa de las levaduras vínicas y al reconocimiento de la enorme variabilidad existente entre las distintas cepas de *S. cerevisiae* (Fernández-Espinar et al, 2000; Martorell et al, 2005). Las pruebas metabólicas que se habían empleado tradicionalmente para caracterizar la flora microbiana fermentativa y la integrante del *velo de flor* en los vinos de crianza biológica sólo habían permitido distinguir entre distintas razas de *S. cerevisiae*, pero no la identificación inequívoca de distintas poblaciones pertenecientes a la misma raza (Martínez et al, 1995). Actualmente, para la identificación genética de cepas de flor se estudia el contenido en ADN mediante citometría de flujo, número y tamaño de cromosomas mediante electroforesis en campo pulsante y polimorfismo en el ADN mitocondrial (ADNmt) mediante RFLP (Querol et al, 1994; Martínez et al, 1995). También se aplican técnicas tales como RFLP a fragmentos correspondientes a espaciadores intergénicos en la región del ADN ribosómico 5.8S amplificada por PCR (Divol et al, 2006), además de la amplificación aleatoria de fragmentos de ADN mediante PCR (RAPD-PCR), técnica usada para la identificación de diferentes especies dentro de *Saccharomyces sensu stricto* y para hacer correlaciones geográficas de cepas vínicas (Martínez et al, 2007).

Gracias a estas investigaciones se ha confirmado que existe una gran heterogeneidad tanto en contenido total de ADN (entre 1.3 a 4.0 n) como en el número y tamaño de cromosomas entre levaduras fermentativas y formadoras de *velo de flor* (Valero et al, 2007). Además se ha observado que las que forman *velo* mantienen un patrón cromosómico similar entre razas, a su vez diferente al que presentan otras levaduras fermentativas como las panaderas o cerveceras (Infante-Viñolo, 2002; Benítez et al, 1996; Martínez et al, 1995).

Se ha descrito que el etanol y el acetaldehído son la principal fuente de variabilidad en los patrones cromosómicos (Benítez & Codón, 2002; Benítez et al, 2009; Castrejón et al, 2002), ya que producen roturas en el ADN cromosómico de células de levaduras (Ristow et al, 1995). En vinos *Finos* con altas concentraciones de etanol y acetaldehído las levaduras de flor deben sufrir numerosos cambios en las secuencias del ADN cromosómico debido a los errores inducidos durante los mecanismos de reparación por recombinación de roturas del ADN. Esto explicaría también la alta frecuencia de reorganizaciones cromosómicas y la

divergencia encontrada entre organizaciones cromosómicas de cepas de laboratorio y cepas vínicas y de flor (Infante et al, 2003; Pirino et al, 2004; Puig et al, 2000; Zara et al, 2008).

Un efecto adicional del etanol en el cariotipo de este tipo de levaduras podría ser la inducción de pérdida de cromosomas, debido a su papel como disolvente de membranas. Esto explicaría la alta frecuencia de aneuploides encontrada entre las levaduras vínicas de flor (Guijo et al, 1997; Martínez et al, 1995; Mesa et al, 1999; Naumova et al, 2005). El mantenimiento de aneuploidías y de reorganizaciones cromosómicas es ventajoso en las condiciones que toleran las levaduras vínicas de flor, al tiempo que juega un papel fundamental en el aislamiento reproductivo.

Esta variabilidad de los patrones cromosómicos también podría deberse a fenómenos de recombinación producidos durante el crecimiento vegetativo, seguido de fuertes restricciones impuestas por las condiciones hostiles en que se encuentran las levaduras (Infante et al, 2003). Algunas reorganizaciones cromosómicas parecen estar mediadas por elementos *Ty1* y las levaduras de crianza biológica caracterizadas poseen elementos *Ty1* localizados exclusivamente en el cromosoma XII. Aunque en cepas de laboratorio hay grandes restricciones para la movilidad y expresión de elementos *Ty1*, no se sabe si estas restricciones tienen lugar también en cepas vínicas (Nyswaner et al, 2008; Wu & Jiang, 2008).

Respecto a los patrones de ADNmt, estas levaduras presentan una gran variabilidad, no solo entre cepas pertenecientes a distintas razas, sino también entre aquellas clasificadas fisiológicamente dentro de la misma raza (Martínez et al, 1995). Por lo tanto, el análisis de restricción del ADNmt podría ser suficientemente inequívoco, rápido y simple como para permitir no sólo estudiar las poblaciones de levaduras presentes durante la fermentación y maduración del vino, sino también para realizar el seguimiento de cepas inoculadas y establecer si se imponen o no sobre la población indígena (Esteve-Zarzoso et al, 2001). La variabilidad del ADNmt podría resultar de la mutagenicidad provocada por las altas concentraciones de etanol y acetaldehído en que se encuentran las levaduras. Su efecto no se ha demostrado que sea directamente sobre el ADNmt, sino que correlaciona con la producción de especies reactivas de oxígeno en la mitocondria (ROS, del inglés Reactive Oxygen Species) (Abbott et al, 2009; Costa et al, 1997a; Du & Takagi, 2007; Gales et al, 2008; Landolfo et al, 2008; Longo et al, 1996; Piper, 1999; Raha & Robinson, 2000). Ante la generación de radicales hidroxilos del superóxido, el ADNmt probablemente sufre una alta tasa de mutagénesis provocada por el estrés oxidativo. La tolerancia de las

mitocondrias de las levaduras de flor podría deberse a su capacidad de atenuar el daño inducido por los radicales (Costa et al, 1997).

Las mitocondrias de las levaduras de flor son altamente resistentes a etanol, posiblemente por una mayor eficiencia de la superóxido dismutasa mitocondrial MnSOD, y de enzimas relacionadas con el metabolismo del glutatión y otros compuestos que protegen del daño oxidativo. De hecho los genes de las superóxido dismutasas se expresan mucho más en fase de velo que en otros estadíos de crecimiento (Castrejón et al, 2002; Infante et al, 2003). Puesto que el metabolismo de las levaduras en el *velo de flor* es oxidativo, se ha sugerido que existe una tasa de mutación del ADNmt muy alta, inducida por etanol, pero que la necesidad de mitocondrias funcionales elimina cualquier cambio que de lugar a genomioms mitocondriales no funcionales (Martínez et al, 1995). El acetaldehído y el etanol introducen por lo tanto cambios irreversibles en el ADNmt, alterando los patrones de restricción. Cepas con mitocondrias que hayan sufrido mutaciones que las hagan no funcionales, acabaran desapareciendo de la población, debido a la falta de fuente de carbono fermentable en el vino *Fino* (Castrejón et al, 2002).

Otra característica importante en estas levaduras es la incapacidad de formar productos meióticos viables tras la esporulación, debido en gran parte a la gran cantidad de aneuploidías que suelen presentar. Este aislamiento sexual evita la distribución al azar de las características metabólicas (Sancho et al, 1986; Jiménez & Benítez, 1988). Por tanto, la variabilidad genética en este tipo de levaduras se asocia a fenómenos de inestabilidad genética, recombinación mitótica, reparación y conversión génica ocurridos durante el crecimiento (Puig et al, 2000).

En lo que se refiere a la estructura genética, como se ha comentado anteriormente, las cepas vínicas de formadoras de *velo de flor* presentan numerosas aneuploidías, sobre todo un alto número de copias de los cromosomas V, VII y XIII. En este último, se encuentran localizados los genes de la alcohol y aldehído deshidrogenasas, fundamentales en el metabolismo de producción y consumo de etanol y acetaldehído (Turcotte et al, 2010). Este fenómeno al igual que ocurriera con otras cepas industriales como las panaderas, se han relacionado con translocaciones cromosómicas debidas a recombinación homóloga, asimétrica o ectópica entre secuencias de elementos Ty , δ o Y' , dando lugar a cepas mejor adaptadas a condiciones industriales específicas (Rachidi et al, 1999).

Por otro lado, el análisis de restricción de la región intergénica del rDNA 5.8S ha indicado la presencia de una delección de 24 pb fijada en mas de 150 cepas de *S. cerevisiae* de

flor analizadas, pero no en cepas de fermentación, lo que apoya la hipótesis de que las levaduras de fermentación y las de flor son genéticamente diferentes (Esteve-Zarzoso et al, 2001). Esta delección se ha encontrado también en cepas de *Saccharomyces aceti* y *Saccharomyces gaditensis* aisladas de velos de flor de Jerez, en cepas de *S. prostoserdovii* aisladas de velos de flor en Vernaccia de Oristano (Fernández-Espinar et al, 2000) y en la mayoría de cepas aisladas de velos de flor de vinos botritizados (Kovacs et al, 2008). Sin embargo, no se ha detectado en cepas de *S. cerevisiae* aisladas de velos de flor de Vinos Amarillos del Jura (Charpentier et al, 2009), indicando una posible divergencia filogenética en este tipo de levaduras. Aunque cada raza de *S. cerevisiae* confiere características específicas al vino, las descritas como mayoritarias en las levaduras de flor implicadas en la elaboración de vinos tipo *Fino* del marco de Jerez (*S. cerevisiae* var *beticus*, *montuliensis*, *cheresiensis* y *Zygosaccharomyces rouxii*) presentan el mismo patrón de restricción de esta región intergénica del rDNA 5.8S (Esteve-Zarzoso et al, 2004), por lo que las diferencias metabólicas (consumo de etanol, producción de acetaldehído, velocidad de formación de velo...) no son detectables a nivel molecular, al menos mediante esta técnica.

Además de las diferencias existentes entre cepas formadoras y no formadoras de velo, al analizar más detenidamente la estructura genómica de las razas formadoras de flor nombradas anteriormente, también se observan diferencias entre ellas. Al comparar una cepa de la raza *beticus* frente a una *montuliensis* se han observado aneuploidías en diferentes cromosomas, pero ninguna de ellas común para ambas (Mesa et al, 1999; Mesa et al, 2000). Del mismo modo presentan diferencias en el número de copias de al menos un 35% de las ORFs de su genomio (Infante et al, 2003).

La crisis económica que actualmente vive el sector vitivinícola en España se ha hecho especialmente patente en la denominación de origen Jerez, de manera que el mayor interés actual de las bodegas es el de “renovación” basada en la modernización de los procesos de producción para hacerlos más viables económicamente. Además, la mejora del proceso debe incluir la obtención de productos finales más adecuados a las nuevas tendencias de los consumidores. Todas estas características son en su mayoría consecuencia directa del metabolismo de las levaduras responsables del proceso de producción, por lo tanto constituyen la principal variable sobre la que actuar.

Una caracterización fisiológica de las cepas implicadas en la formación del *velo de flor* nos permitiría conocer parámetros muy importantes a nivel industrial tales como velocidad de formación del velo en diferentes condiciones de cultivo, o la producción y consumo de metabolitos enológicos fundamentales como etanol, acetaldehído, glicerol, acidez volátil o

compuestos aromáticos. Cada cepa tendrá un perfil determinado, y producirá un vino con unas características definidas, por lo que en función del producto final que la bodega quiera obtener, éste se podría obtener mediante crianza biológica dirigida a partir de cultivos puros o mixtos.

El desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha permitido diferenciar cepas de distintas especies de levaduras mediante sus características genéticas. Además estas técnicas también permiten diferenciar cepas de la misma raza, por lo que se podría realizar un seguimiento a lo largo de la crianza biológica en bodega para garantizar la implantación de la cepa seleccionada en la población formadora del velo y obtener así el vino esperado.

Una vez seleccionadas las cepas en función de sus características fisiológicas, éstas se podrían mejorar mediante técnicas de modificación génica.

Resultados

1.- Caracterización fisiológica.

1.1.- Asimilación y fermentación de azúcares.

Los patrones observados en las cepas FJF206, FJF414, B16 y SF se compararon con los ya conocidos de tres razas de levaduras formadoras de *velo* pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* además de *Z. rouxii* (Suárez-Lepe, 1997). Las cuatro cepas de este estudio fueron capaces de fermentar y asimilar rafinosa, sacarosa y glucosa, pero no maltosa, identificándolas como cepas de la raza *beticus* ya que los patrones de asimilación y fermentación coinciden completamente con los de esta raza. (Tabla II.1).

Tabla II.1.- Patrones de asimilación y fermentación de azúcares. + indica crecimiento y – indica no crecimiento.

CEPA	Asimilación/Fermentación Azúcar					
	Glucosa	Galactosa	Lactosa	Maltosa	Sacarosa	Rafinosa
FJF206	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
FJF414	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
B16	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
SF	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
<i>S.cerevisiae</i> var <i>beticus</i>	+/+	-/-	-/-	-/-	+/+	+/+
<i>S.cerevisiae</i> var <i>montuliensis</i>	+/+	-/-	-/-	-/-	+/-	-/-
<i>S.cerevisiae</i> var <i>cheresiensis</i>	+/+	-/-	-/-	+/+	+/+	+/+
<i>Zigosaccharomyces rouxii</i>	+/+	-/-	-/-	+/+	+/-	-/-

1.2.- Cinética de formación de *velo de flor*.

Con el fin de seleccionar condiciones para una rápida cinética de formación de *velo*, se llevaron a cabo ensayos con la cepa B16 con objeto de dilucidar el efecto de factores como la densidad celular inicial ($D.O_{660nm}$), el contenido en etanol del vino o la naturaleza del preinóculo en dicha cinética.

Para comprobar el efecto del preinóculo se cultivó la cepa B16 en vino con 5° y en medio YPG. Posteriormente se reinoculó vino con 10° de etanol a partir de estos precultivos a una $D.O_{660nm}$ inicial fija y se realizaron medidas de absorbancia a 660nm y formación de *velo* a lo largo del tiempo (Materiales y Métodos). Los resultados indicaron que el cultivo con células procedentes del precultivo en vino formó el *velo* 12 h antes que el procedente de células precultivadas en YPG (Figura II.2).

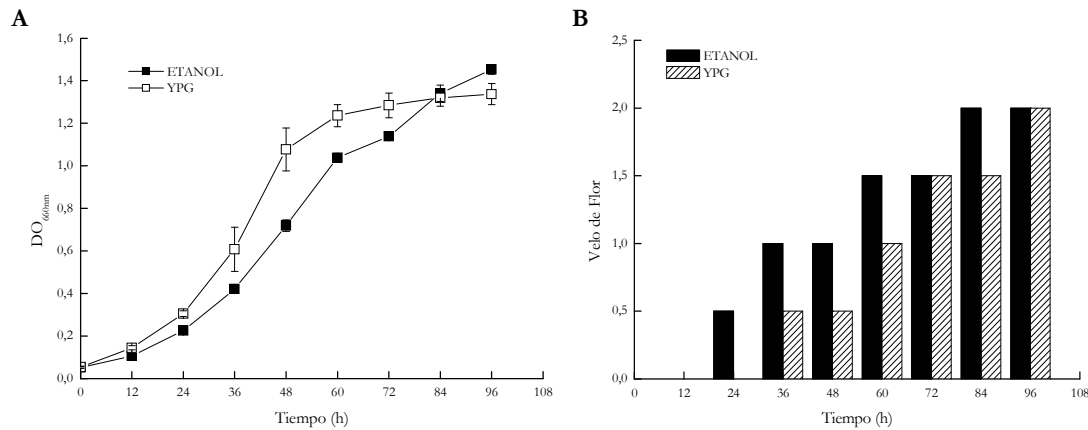


Figura II.2.- Cinética de crecimiento (A) y de formación de velo de flor (B) de la cepa B16 creciendo en vino a 10° de etanol procedente de un precultivo en vino a 5° de etanol o de medio YPG. Se representa la media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

Posteriormente se realizó un seguimiento de los cambios en la D.O._{660nm} y formación de velo en vino a diferentes concentraciones de etanol. El inóculo se realizó a una D.O._{660nm} inicial de 0,01 con células de la cepa B16 preculтивadas en YPG. Los resultados mostraron un aumento en la fase de latencia a medida que la concentración de etanol era mayor, reflejado en un retraso en la formación del velo a concentraciones crecientes de etanol (Figura II.3).

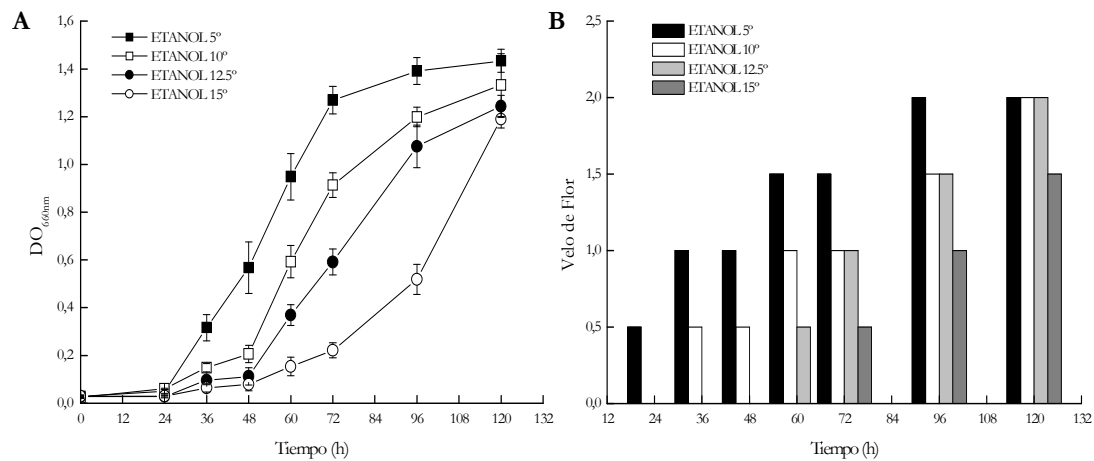


Figura II.3.- Cinética de crecimiento (A) y de formación de velo de flor (B) en la cepa B16 procedente de un precultivo en YPG creciendo en vino a diferentes grados alcohólicos. Se representan medias de dos experimentos con desviación estándar.

Un ensayo variando la densidad celular inicial y manteniendo constante la concentración de etanol (12,5°) mostró que a mayor D.O._{660nm} inicial del cultivo el velo tarda menos tiempo en formarse (Figura II.4). Así, en cultivos procedentes de un

preinóculo en YPG y cuya densidad celular era igual o mayor a 0,06 el velo aparecía a las 48 h mientras que en cultivos con $D.O_{660nm}$ inicial de 0,04 y 0,02 el velo no comenzaba a formarse hasta las 72 y 96 h respectivamente (Figura II.4).

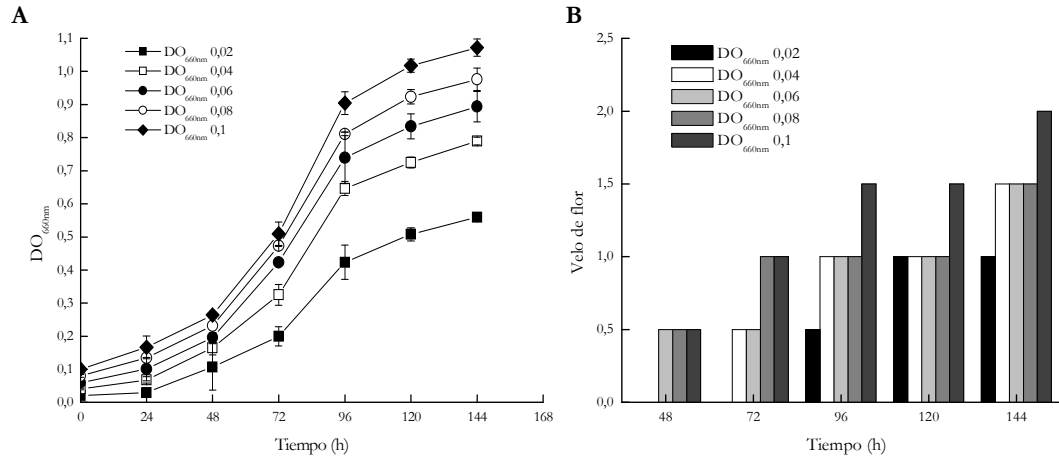


Figura II.4.- Cinética de crecimiento (A) y de formación de velo de flor (B) en la cepa B16 procedente de un preinóculo en YPG creciendo en vino con 12,5° de etanol y diferentes $D.O_{660nm}$. Se representan medias de dos experimentos con desviación estándar.

Se comparó posteriormente el comportamiento de las cepas de *velo de flor* FJF206, FJF414, B16 y SF entre sí. Se fijaron condiciones iniciales de cultivo de $D.O_{660nm}$ (0,06), preinóculo (YPG) y contenido en etanol del vino (12,5°) y se realizaron medidas periódicas de la variación en la absorbancia del cultivo y en la formación del velo a lo largo del tiempo de forma similar a los ensayos anteriores (Figura II.5).

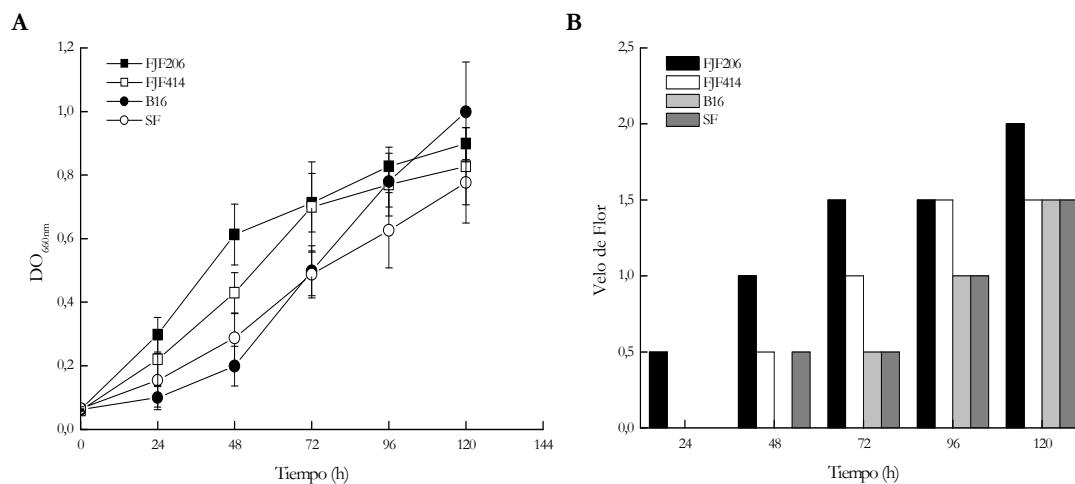


Figura II.5.- Cinética de crecimiento (A) y de formación de velo de flor (B) de las cepas FJF206, FJF414, B16 y SF creciendo en vino con 12,5° de etanol a una $D.O_{660nm}$ inicial de 0,06. Se representan medias de dos experimentos con desviación estándar.

Los resultados mostraron que la cepa FJF206 es la más rápida formando velo, seguida de las cepas FJF414 y SF, siendo la más lenta la cepa B16. Sin embargo, ésta alcanza niveles de $D.O_{660nm}$ más elevados que las otras cepas y valores del seguimiento visual de la formación de velo similares (Figura II.5).

1.3.- Medida de variables enológicas.

Se realizaron ensayos de crianza biológica mimetizando las condiciones de la bodega con las cepas objeto de este estudio. Se utilizó vino de sobretabla y transcurridos tres meses desde la aparición del velo se analizó el contenido de etanol, acidez volátil, glicerol y alcoholes superiores del vino obtenido, así como la viabilidad celular en el *velo de flor* (Tabla II.2). Los datos muestran que la cepa B16 produce el vino con menor acidez volátil, consume mayor cantidad de glicerina y produce menos acetaldehido, todas ellas propiedades deseables en el vino. Además es la que presenta mayor porcentaje de viabilidad. La cepa SF es la que produce un vino con mayor acidez y contenido de acetaldehido. Las cepas FJF206 y FJF414 muestran un comportamiento intermedio entre las dos anteriores, siendo FJF414 la que presenta mayor producción de alcoholes superiores. Ambas mantienen la viabilidad alrededor del 50% (Tabla II.2)

Tabla II.2.- Medida de variables enológicas en vinos obtenidos tras 3 meses de crianza biológica. Los datos se representan en %, siendo el 100% el dato más elevado tanto en consumo como en producción (Datos proporcionados por Cristina Lasanta Departamento Tecnología de Alimentos, Facultad de Ciencias, Universidad de Cádiz, España).

Variables	CEPAS			
	FJF206	FJF414	B16	SF
Consumo de etanol (%)	89,65	69,96	23,15	100
Producción de acidez volátil ($g \cdot L^{-1}$)(%)	32,43	81,08	-156,76	100
Consumo de glicerina ($g \cdot L^{-1}$)(%)	56,63	77,99	100	67,31
Producción de acetaldehido ($mg \cdot L^{-1}$)(%)	72,19	49,36	11,28	100
Producción de alcoholes superiores ($mg \cdot L^{-1}$)(%)	92,03	100	90,83	93,57
Viabilidad celular del <i>velo</i> (%)	49	53	83	72

1.4.- Resistencia a acetaldehido.

Para cuantificar la resistencia a este compuesto se cultivaron las diferentes cepas en vino con 10° de etanol ($80-100 \text{ mg} \cdot L^{-1}$ de acetaldehido inicial) suplementado con distintas concentraciones de acetaldehido. Como controles se utilizaron las tres razas formadoras de *velo de flor* pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* (*beticus*, *montuliensis* y *cheresiensis*) además de *Z. rouxii*.

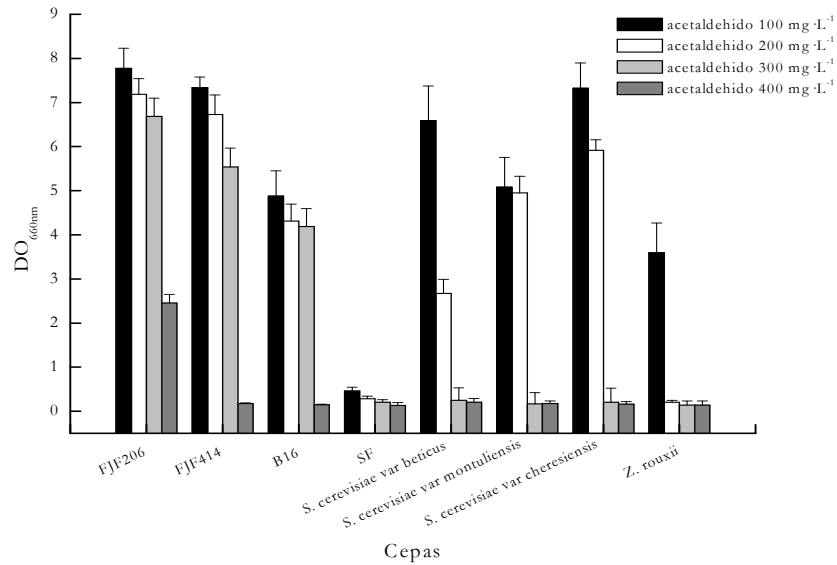


Figura II.6.- Niveles máximos de D.O._{660nm} alcanzados por las cepas formadoras de velo de flor creciendo en vino con 10° de etanol con diferentes concentraciones finales de acetaldehído. Se muestran datos de dos experimentos independientes con desviación estándar.

Los resultados indicaron que las razas *beticus*, *montuliensis* y *cheresiensis* son capaces de crecer en vinos donde la concentración final de acetaldehído se encuentra próxima a los 200 mg · L⁻¹, mientras que *Z. rouxii* tolera solo 100 mg · L⁻¹ (Figura II.6). Las cepas FJF206, FJF414 y B16 son capaces de crecer en vinos donde la concentración final alcanza los 300 mg · L⁻¹, llegando la cepa FJF206 a crecer en vinos con 400 mg · L⁻¹ de acetaldehído finales (Figura II.6). De todas las cepas estudiadas, la SF es la más sensible a este compuesto ya que presenta problemas de crecimiento incluso en vino sin suplementar (80-100 mg · L⁻¹ de acetaldehído) (Figura II.6).

2.- Caracterización molecular.

2.1.- Cariotipo electroforético.

Los resultados mostraron una gran similitud en los patrones cromosómicos de las cuatro cepas de velo analizadas. Como controles se utilizaron las tres razas formadoras de velo pertenecientes a la especie *S. cerevisiae* (*beticus*, *montuliensis* y *cheresiensis*) además de *Z. rouxii*. El cariotipo observado en las cepas objeto de este estudio fue muy parecido al que presentó la cepa *S. cerevisiae* raza *beticus* utilizada como control, lo que concuerda con los datos obtenidos en la caracterización fisiológica. Únicamente FJF414 presenta diferencias con las otras cepas ya que muestra dos bandas a nivel del cromosoma VIII, posiblemente homólogos de diferente tamaño (Figura II.7).

Por otro lado, los cariotipos de las cepas formadoras de *velo de flor* utilizadas como controles mostraron similitudes en los patrones dos a dos, siendo los de las razas *beticus* y *cheresiensis* similares entre si y diferentes al que presentaron la raza *montuliensis* y la especie *Z. roxii*. (Figura II.7).

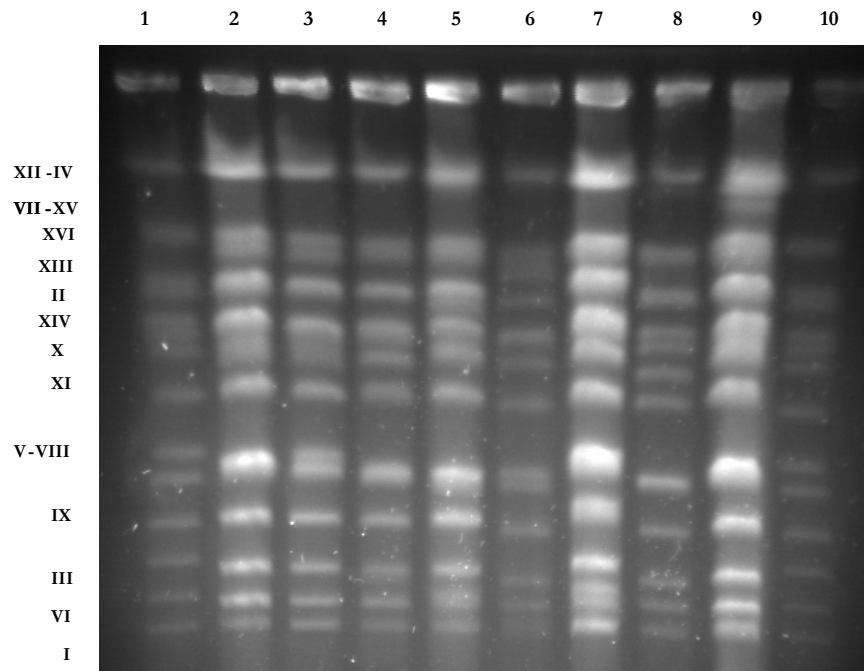


Figura II.7.- Patrón cromosómico de las cepas S288C (1 y 10), FJF206 (2), FJF414 (3), B16 (4), SF (5), *S. cerevisiae* var *beticus* (6), *S. cerevisiae* var *montuliensis* (7), *S. cerevisiae* var *cheresiensis* (8) y *Z. rouxii* (9).

2.2.- Restricciones de ADN mitocondrial (RFLP).

Se llevaron a cabo análisis del patrón de restricción de ADNmt utilizando seis enzimas de restricción diferentes. Solo con cuatro de ellas (AluI, RsaI, HinfI y DraI) se obtuvieron diferencias en los patrones obtenidos (Figura II.8). Dichos patrones permiten diferenciar las cepas en grupos de dos. FJF206 y FJF414 presentan patrones idénticos y diferentes de los que presentan B16 y SF (Figura II.8).

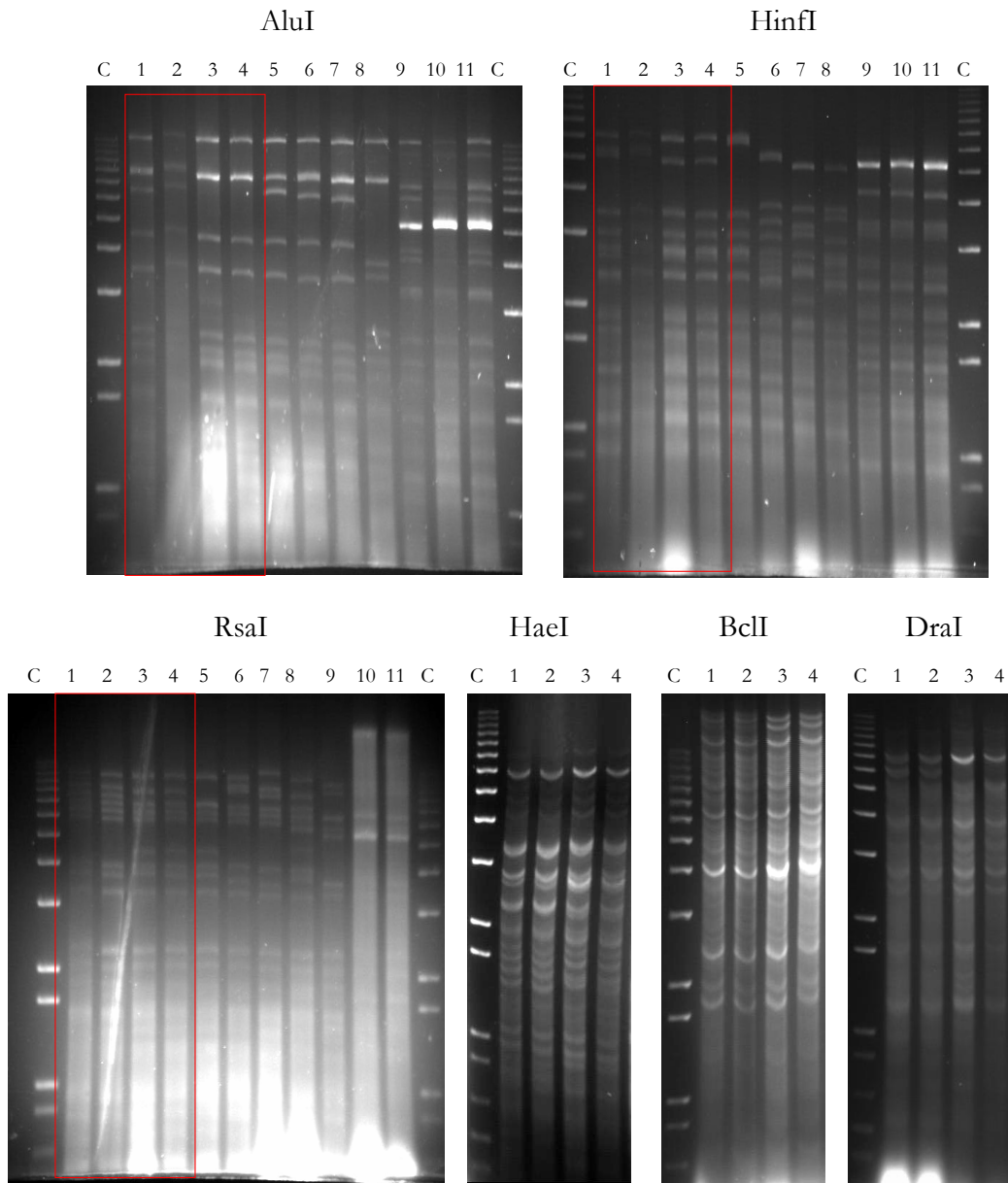


Figura II.8.- Patrones de restricción de ADN mitocondrial. Se representan las cepas FJF206 (1), FJF414 (2), B16 (3), SF (4), *S. cerevisiae* var *beticus* (5), *Z. rouxii* (6), *S. cerevisiae* var *montuliensis* (7), *S. cerevisiae* var *cheresiensis* (8), YNN295 (9), S288C (10) y DS81 (11), marcador de peso molecular (C).

2.3.- Amplificación aleatoria de fragmentos de ADN (RAPD).

Los ensayos de RAPD se realizaron utilizando 10 cebadores distintos, proporcionados por OPA (Materiales y Métodos). La mayoría de los cebadores utilizados no permitieron diferenciar las distintas cepas en estudio. Solo el cebador OPA 06 permitió identificar a las cuatro cepas inequívocamente, presentando cada una de ellas un patrón de bandas independiente y característico (Figura II.9).

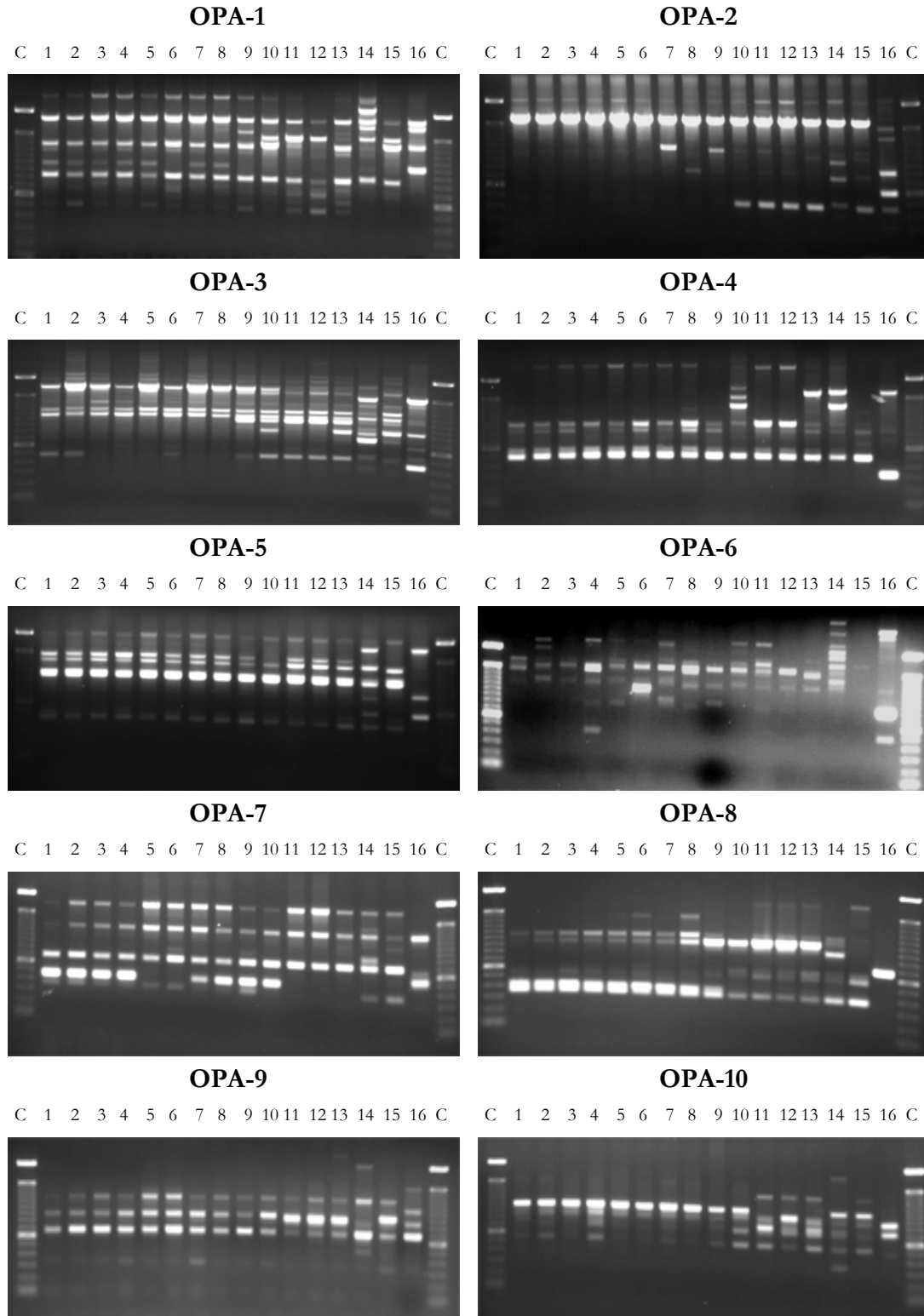


Figura II.9.- Patrones RAPD generados usando distintos cebadores OPA .Se usó ADN de las cepas FJF206 (1), FJF414 (2), B16 (3), SF (4), *S. cerevisiae* var *beticus* (5), *S. cerevisiae* var *montuliensis* (6), *S. cerevisiae* var *chereysiensis* (7), *Z. rouxii* (8), YNN295 (9), S288c (10), BY4741 (11), PDC(12), V1 (13), L12 (14), CECT1317 (15) y *S. bayanus* var. *uvarum* (16), marcador de peso molecular (C).

2.4.- Contenido en ADN.

Se determinó el contenido de ADN de las cepas de este estudio mediante citometría de flujo (Materiales y Métodos). Como controles del ensayo se utilizaron las cepas S288C y DS81 haploide y diploide respectivamente. Como controles adicionales se sumaron al estudio algunas cepas de levaduras industriales utilizadas en panadería. Los resultados mostraron que FJF206 y FJF414 tienen un contenido de ADN cercano a $3n$, mientras que el de las cepas B16 y SF se encuentra cercano a $5n$ (Tabla II.3). El grado de ploidía determinado para la cepa vínica fermentativa PDC y las cepas panaderas V1, V2 y V3 muestra valores cercanos a 2 o múltiplos de 2 (Tabla II.3).

Tabla II.3.- Contenido en ADN de varias cepas de *S. cerevisiae* utilizadas en laboratorio (L), panadería (P) y vínicas fermentativas (Vf) o formadoras de *velo de flor* (Vv). Se representan valores medios, de dos experimentos independientes con desviación estándar menor al 10%.

CEPA	Ploidía	CEPA	Ploidía
S288C (L)	1	FJF206 (Vv)	2,9
DS81 (L)	2	FJF414 (Vv)	2,9
V1 (P)	4,2	B16 (Vv)	5
V2 (P)	4,1	SF (Vv)	4,8
V3 (P)	2,2	PDC (Vf)	2,1

2.5.- Localización cromosómica de genes de interés enológico.

Se llevaron a cabo hibridaciones sobre los cariotipos cromosómicos de las cuatro cepas de este estudio y de las cuatro cepas control formadoras de velo. Se utilizaron sondas de genes de interés implicados en la asimilación y metabolismo de azúcares (*SUC2*, *MAL23*, *MEL1*, *AGT1/MEL11*, *GAL1*, *ADH1* y *ADH2*), resistencia a estrés oxidativo y metales (*SOD1*, *SOD2* y *CUP1*), capacidad de formación de velo (*MUC1/FLO11*), proteínas de estrés (*HSP12* y *HSP150*), elementos transponibles (*Ty1* y *Ty2*) y el promotor del gen *ADH1* (*ADC1*). Los resultados obtenidos mostraron que al hibridar con la sonda correspondiente a los genes *ADC1*, *SOD1*, *SOD2*, *CUP1*, *MUC1*, *HSP12*, *HSP150* y *SUC2* se obtiene solo una banda que localiza en el cromosoma correspondiente al descrito para dichos genes en S288C (Figura II.10).

Las sondas de los genes *ADH1* y *ADH2*, hibridaron en dos cromosomas, mientras que la de los genes *CUP1*, *GAL1*, *MAL23* o *AGT1* lo hacen en tres o más localizaciones cromosómicas diferentes. Esto sugiere posibles duplicaciones de los mismos en el genoma de las cepas estudiadas (Figuras II.10 y II.11).

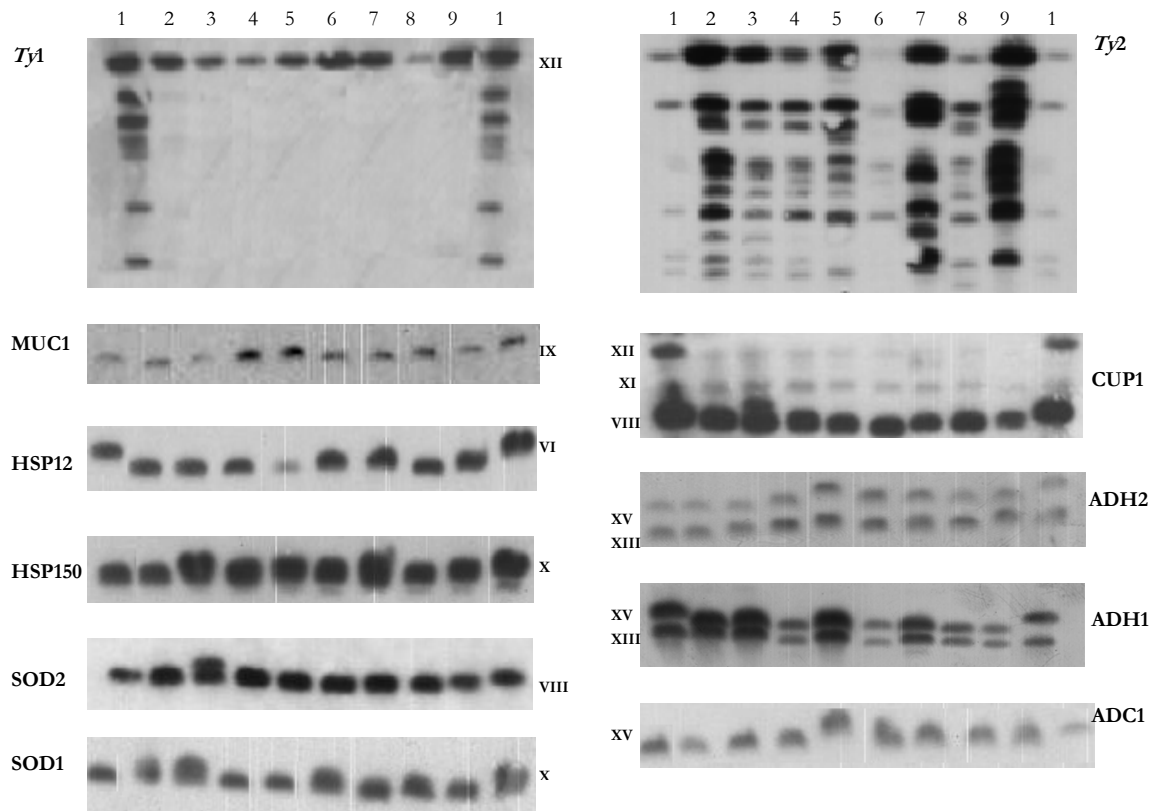


Figura II.10.- Southern blot con sondas de genes de interés sobre el cariotipo de las cepas FJF206 (2), FJF414 (3), B16 (4), SF (5), *S. cerevisiae var beticus* (6), *S. cerevisiae var montuliensis* (7), *S. cerevisiae var cheresiensis* (8), *Z. rouxii* (9) y S288C (1).

No se detectó señal en ninguna de las cepas vínicas cuando se utilizó la sonda del gen *MEL1*, solamente la cepa cervecera (CECT1317), utilizada como control positivo, presentó una banda a nivel del cromosoma II (Figura II.11).

El máximo número hibridaciones localizadas en distintos cromosomas se produjo al utilizar la sonda del elemento transponible *Ty2*. Además se observó que el patrón de hibridación difiere de una cepa a otra. En cambio, el patrón de hibridación de todas las cepas de velo con *Ty1* fue de una única señal en el cromosoma XII. Esto no se repitió en cepas de laboratorio, que presentaron numerosas bandas localizadas en diferentes cromosomas (Figura II.10).

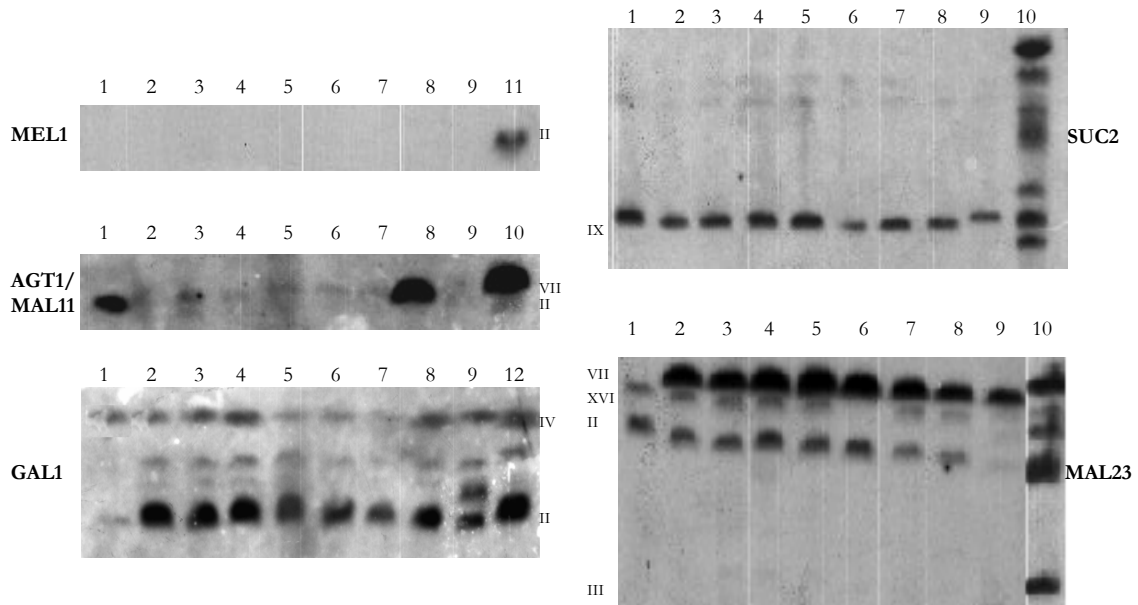


Figura II.11.- Southern blot con sondas de genes de interés sobre el cariotipo de las cepas FJF206 (2), FJF414 (3), B16 (4), SF (5), *S. cerevisiae var beticus* (6), *S. cerevisiae var montuliensis* (7), *S. cerevisiae var cheresiensis* (8), *Z. rouxii* (9), S288C (1), BY4741 (12), V1 (10) y CECT1317 (11).

Discusión

1.- Selección de una cepa de crianza biológica en función de sus características fisiológicas.

Antes de realizar un estudio comparativo de la cinética de formación de *velo* entre las cepas objeto de este estudio, se hizo una prueba con la cepa B16 para dilucidar hasta que punto factores como la naturaleza y cantidad del inóculo o la concentración de etanol afectaban a la formación del *velo*. Cuando se hizo el inóculo en vino con células procedentes de un precultivo en etanol el *velo de flor* se formaba antes que cuando dicho precultivo se realizaba en medio YPG (Figura II.2). Estas diferencias posiblemente se deban a que las células creciendo en etanol con 5° ya han superado un periodo de adaptación a condiciones hostiles en el que han activado genes implicados en la respuesta a estrés a etanol.

La densidad celular inicial del cultivo también está implicada en esta cinética, ya que a medida que ésta aumenta, el *velo* aparece antes (Figura II.4). Parece además que hay una densidad crítica ($D.O_{660nm}$ 0,3) y el *velo* no comienza a formarse hasta que ésta no se alcanza. El desarrollo del *velo* comienza con cambios en la forma, tamaño e hidrofobicidad de las células para que se formen los agregados celulares. Éstos, unidos a burbujas de gas procedentes de la respiración se disponen en la superficie del vino (Martínez et al, 1997a). Seguramente los agregados no sean estables hasta alcanzar una concentración mínima de células, de ahí la importancia de la densidad celular.

El etanol a altas concentraciones resulta letal para las levaduras. Los resultados muestran que, a pesar de que las levaduras de flor resisten altas concentraciones de este compuesto, a medida que aumenta su concentración el efecto sobre la cepa (en este caso B16) es más severo, retrasando la formación del *velo* (Figura II.3). A mayores concentraciones las células tardan más en adaptarse, dividirse y por tanto en alcanzar la densidad mínima necesaria para comenzar a agregarse y flotar en la superficie del vino.

La mayoría de las cepas de flor se clasifican en tres razas pertenecientes a la especie *S. cerevisiae*, *beticus*, *cheresiensis*, *montuliensis* y una cuarta perteneciente a la especie *Zygosaccharomyces*, denominada *rouxii*. A pesar de que todas presentan metabolismo oxidativo, se distinguen entre sí por la capacidad de asimilar y fermentar diferentes azúcares y/o la producción y consumo de ciertos metabolitos (Figura II.1) (Suárez-Lepe, 1997). Las razas *beticus* y *cheresiensis* asimilan y fermentan sacarosa, y son más eficientes reduciendo la acidez volátil que las razas *montuliensis* y *Z. rouxii*, que no utilizan la sacarosa, consumen más etanol y producen más acetaldehído (Tabla II.1) (Martínez de la Ossa et al, 1987; Martínez et al, 1993; Martínez et al, 1998). También se diferencian en la velocidad de formación del *velo*. Las levaduras pertenecientes a las razas *beticus* y *cheresiensis* son más rápidas en formar el *velo*

que las de las razas *montuliensis* y *Z. rouxii* (Martínez et al, 1997a). Las cuatro cepas formadoras de *velo de flor* objeto de este estudio, FJF206, FJF414, B16 y SF, pertenecen todas a la raza *beticus*, según se deduce de los patrones de asimilación y fermentación de azúcares (Tabla II.1), pero presentan diferencias entre sí tanto en la cinética de formación de velo como en el consumo y producción de compuestos enológicos importantes (Figura II.5 y Tabla II.2).

La cepa FJF206 tiene el metabolismo más rápido, y es la primera en formar velo, seguida de FJF414 y SF. Es la que produce el segundo vino con mayor contenido en acetaldehído y presenta la viabilidad celular del velo más baja al final del proceso de crianza. Esto no concuerda con los datos de resistencia a acetaldehído obtenidos para esta cepa (Figura II.6), seguramente debido a que dicho experimento se realizó en cultivo con agitación y con una concentración menor de etanol (las cepas en cultivos sumergidos no crecen en vinos con una concentración mayor a 10° de etanol) por lo que los resultados no pueden ser comparados. Las cepas FJF414 y SF tienen un comportamiento similar y tardan un poco más que FJF206 en formar el velo. FJF414 produce vinos con la mitad de acetaldehído que los obtenidos con la cepa SF, que presenta la mayor concentración de este compuesto. Sin embargo la viabilidad del velo es mayor en la cepa SF que en FJF414 (Tabla II.2). Los datos de resistencia a acetaldehído muestran que SF es muy sensible en cultivos sumergidos incluso a bajas concentraciones, pero formando velo es más viable que cualquiera de las dos cepas FJF. Este comportamiento puede deberse a que la cepa SF presente una adaptación muy a favor de la formación del velo en contra de otras condiciones de cultivo. Esta cepa presenta los niveles más altos de consumo de etanol, producción de acetaldehído y también produce el vino con la mayor acidez volátil, carácter nada deseable en vinos *Finos*.

La cepa B16 es la última en formar velo, posiblemente debido a un metabolismo más ralentizado. Presenta mayor consumo de glicerol, ya que produce vinos donde el contenido en etanol es elevado en detrimento del contenido en glicerina. El velo formado por esta cepa es un velo vivo al final de la crianza que alcanza los valores más altos de densidad óptica y viabilidad, lo cual favorece la estabilidad y la resistencia a cambios de temperatura (típicos en bodega durante los meses de verano) (Tabla II.2). Todas estas características junto con la capacidad de producir vinos con niveles de acidez volátil más bajos al final de la crianza hacen de esta cepa una excelente candidata para realizar crianza dirigida.

2.- Caracterización de las cepas de *velo de flor* FJF206, FJF414, B16 y SF mediante técnicas moleculares.

Las levaduras de *velo* presentan menos polimorfismo cromosómico que otras levaduras vínicas posiblemente porque las condiciones en las que se desarrollan son muy severas y tienden a seleccionar un genotipo óptimo casi único (Martínez et al, 1995; Naumova et al, 2005). Esta relativa uniformidad se ve favorecida por el aislamiento sexual descrito durante la fermentación y maduración (Sancho et al, 1986), que impediría la recombinación meiótica, por la escasez de elementos *Ty1* (Ibeas & Jiménez, 1996; Nyswaner et al, 2008), por la poca movilidad de los elementos *Ty2*, lo que reduciría sensiblemente reorganizaciones y cambios cromosómicos en mitosis (Rachidi et al, 1999; Wu & Jiang, 2008) y por la abundancia de aneuploidías (Martínez et al, 1995) que haría inviable a la mayoría de los productos de las meiosis.

Muchos autores asocian diferentes patrones cromosómicos y mitocondriales a características enológicas (Infante-Viñolo, 2002). En otros trabajos se han observado correlación entre cepas y/o razas con patrones cromosómicos específicos y escalas de envejecimiento (Mesa et al, 2000; Martínez et al, 1997b). Esto es lo que ocurre con los patrones cromosómicos de las cepas control *S. cerevisiae var beticus* y *cheresiensis* o *S. cerevisiae var montuliensis* y *Z. rouxii*, que poseen cariotipos idénticos entre ellas y diferentes a las otras dos (Figura II.7). Estas variaciones posiblemente estén relacionadas con la capacidad de formar *velo*, consumir más etanol y producir más acetaldehído (Martínez et al, 1997a). En este trabajo, las cuatro cepas formadoras de *velo de flor* caracterizadas presentan patrones cromosómicos casi idénticos. Únicamente la cepa FJF414 presenta diferencias en el patrón cromosómico a nivel del cromosoma VIII, posiblemente debidas a la presencia de dos cromosomas homólogos de distinto tamaño (Figura II.7).

Se han identificado cepas de *velo de flor* con el mismo cariotipo pero distinto patrón de restricción del ADNmt y viceversa (Cardazzo et al, 1998; Ibeas & Jiménez, 1996). Este es el caso de las cepas FJF206, FJF414, B16 y SF. Todas presentan patrones cromosómicos idénticos pero el análisis de restricción del ADNmt permite clasificarlas en dos grupos, uno compuesto por las dos cepas FJF y el otro por las dos restantes, B16 y SF (Figura II.8). Esto podría sugerir diferente origen filogenético para cada grupo o mismo origen pero posterior agrupamiento debido a la presión selectiva ejercida sobre ellas. Este agrupamiento también se observa en los resultados obtenidos en la medida del contenido total de ADN (Tabla II.3) presentando cada grupo el mismo nivel de ploidía.

Los ensayos de PCR con cebadores aleatorios (RAPD) se han utilizado con resultados positivos para identificar especies diferentes dentro del complejo *Saccharomyces sensu stricto* y realizar filogénias con distintas cepas pertenecientes a la misma especie (Fernández-Espinar et al, 2003; Martínez et al, 2007) (Figura II.9). En este estudio se utilizaron diez cebadores aleatorios y solo con uno de ellos se obtuvieron patrones distintos para las cuatro cepas.

Para caracterizar más en profundidad las cepas se realizaron hibridaciones de genes con el patrón cromosómico. Se ensayaron genes con gran expresión en velo (Castrejón & Benítez, 2000; Infante-Viñolo, 2002) y para la mayoría de ellos se obtuvo una única señal de hibridación, en el cromosoma donde se describe su localización (*SOD1*, *SOD2*, *ADC1* o *MUC1*) (Figura II.10). Existen genes que presentan señal en dos cromosomas diferentes, por similitud de secuencias. Esto ocurre con los genes *ADH1* (cromosoma XV) y *ADH2* (cromosoma XIII), que presentan más de un 80% de similitud en sus secuencias (Figura II.10). Al hibridar con la sonda del gen *CUP1* además de la banda correspondiente al cromosoma VIII en el que se describe su localización para la cepa S288c también se observaron hibridaciones de menor intensidad en los cromosomas XI y XII posiblemente debido a homologías de secuencias o a duplicaciones del gen como ya se observara en otras cepas industriales (Codón et al, 1998).

Las cepas de velo son incapaces de asimilar galactosa. Sin embargo, la sonda del gen *GAL1* hibrida con el cromosoma II, donde se localiza *GAL1* en cepas de laboratorio, y en el cromosoma IV donde se localiza el gen *GAL3*, con el que comparte un 70% de la secuencia. Estas hibridaciones indicarían la presencia de pseudogenes (Figura II.11).

La sonda del gen *MAL23* no hibridó en el cromosoma III, pero si lo hizo en los cromosomas II y VII donde se localizan los genes *MAL33* y *MAL13*. Además se observa una banda más débil en el cromosoma XVI (Figura II.11). Estos resultados parecen indicar la ausencia en las cepas de velo analizadas del loci *MAL2* y la presencia de *MAL1* y *MAL3*.

Los resultados obtenidos con la sonda *AGT1/MAL11* (Alves et al, 2008), coinciden con los observados con la sonda *MAL23*, ya que en todas las cepas de velo estudiadas solo se observó una banda a nivel del cromosoma VII donde se encuentra el loci *MAL1*. La sonda del gen *AGT1/MAL11* se amplificó a partir de ADN de una cepa cervecera, por lo que es posible que existan diferencias en la secuencia de ADN de estos genes entre las cepas de velo y la cervecera, lo que explicaría la baja intensidad detectada. Sin embargo se obtiene una banda de gran intensidad sobre el cariotipo de la raza *S*.

cerevisiae var cheresiensis lo que indicaría la presencia de numerosas copias del gen o una gran homología con la sonda (Figura II.11).

A diferencia de lo que ocurre en cepas panaderas (Codón et al, 1998) las cepas de velo presentan una única localización cromosómica para el gen que codifica la enzima invertasa, *SUC2*. Esta localización se encuentra a nivel del cromosoma IX, tal y como ocurre para S288C. Estas diferencias son debidas a los diferentes procesos de adaptación ya que las cepas panaderas se cultivan en melazas de remolacha donde el azúcar principal es la sacarosa. De forma similar a lo descrito para levaduras panaderas y vínicas de la especie *S. cerevisiae* en ninguna de las cepas de velo analizadas se detectó la presencia del gen *MEL1* (cromosoma II), el cual codifica para la enzima encargada de la hidrólisis de melibiosa (Naumov et al, 1990) (Figura II.11). Este azúcar no se encuentra presente en ningún tipo de uva por lo posiblemente las cepas de velo nunca hayan tenido genes *MEL* o han perdido este locus durante el proceso evolutivo (Figura II.11).

El gen *HSP150* localizado en el cromosoma X codifica para una proteína de choque térmico perteneciente a la familia de proteínas PIR (proteínas con repeticiones internas), la cual se secreta y se une de forma covalente a la pared celular. Este tipo de genes se han utilizado con éxito en la caracterización molecular de muchas cepas industriales mediante técnicas de VNTR (Variable Number of Tandem Repeat) (Marinangeli et al, 2004). Todas las cepas estudiadas presentan una señal bastante intensa en el cromosoma X, donde además de este gen también se localiza otro gen con el que tiene un 70% de similitud (*CIS3* que codifica para una glicoproteína de pared celular perteneciente también a la familia de las PIR), lo que podría explicar la intensidad detectada (Figura II.10).

Los elementos transponibles *Ty1* y *Ty2* suelen encontrarse en múltiples localizaciones cromosómicas en cepas no isogénicas. En levaduras formadoras de velo se han descrito múltiples localizaciones del elemento *Ty2* y escasas de *Ty1* (Ibeas & Jiménez, 1996). La similitud en los patrones de hibridación con *Ty2* en cepas vínicas está directamente relacionada con la similitud en los patrones cromosómicos, lo que indica que existe poca diversidad en este tipo de levaduras. Los datos obtenidos tras hibridar las cepas formadoras de *velo de flor* de este estudio con la sonda del elemento *Ty2* coinciden con esto último, ya que los patrones obtenidos son prácticamente idénticos. Las secuencias *Ty1* se relacionan con translocaciones de genes a otros cromosomas. En cepas panaderas se ha observado la presencia de muchos de estos elementos en múltiples localizaciones, lo que se podría relacionar con las numerosas duplicaciones y translocaciones de muchos genes en

este tipo de levaduras. La inexistencia de translocaciones de genes a otros cromosomas en cepas vínicas de *velo* podría deberse a la escasa presencia de *Ty1* (Figura II.10).

Las cepas formadoras de velo han mejorado sus características fisiológicas y han adaptado su metabolismo para sobrevivir a las condiciones hostiles en las que crecen y para formar velos más viables, estables, etc. Así, en estas cepas, la alta producción de acetaldehído (consecuencia del metabolismo de etanol) y la capacidad de formar el *velo de flor* se correlaciona inversamente con la viabilidad de las esporas y la capacidad de asimilar azúcares como galactosa o maltosa (Budroni et al, 2005). El acetaldehído produce rotura de doble cadena durante la meiosis, lo cual produce reorganizaciones cromosómicas. Estas reorganizaciones, además de otros procesos como translocaciones, duplicaciones, etc serían las causas de las aneuploidias típicas de estas cepas. Esto se traduciría en una baja viabilidad de las esporas tras la meiosis seguramente por un reparto no equitativo de cromosomas (Budroni et al, 2005).

Tras caracterizar fisiológicamente las cepas FJF206, FJF414, B16 y SF hemos observado que, a pesar de pertenecer todas a la misma raza, producen vinos *Finos* con diferentes características enológicas, es decir, producen cada una un vino característico y único. En función de la demanda, la bodega podría realizar crianza biológica dirigida utilizando una u otra cepa en función de las propiedades finales del vino que se quiera comercializar. Además, mediante el uso de diferentes técnicas moleculares cada una de estas cuatro cepas de velo se pueden diferenciar de manera inequívoca dentro de una población. Esto resulta muy útil a la hora de realizar un seguimiento en la bodega de la implantación de la cepa seleccionada para realizar dicha crianza biológica.

Además de la raza o especie de levadura que realiza la crianza biológica, existen muchos factores que afectan al mantenimiento de las propiedades enológicas del vino hasta el embotellado final. El número de *Criaderas*, sistemáticas en las *sacas* y *rocíos* de las escalas, relación superficie/volumen del cultivo y condiciones climáticas (Martínez et al, 1993) son algunos de ellos. A pesar de todas las variables, y gracias al sistema de criaderas y soleras, las bodegas producen cada año un producto único, idéntico al del año anterior.

Capítulo III:
Sobreexpresión de genes implicados en la respuesta a estrés en
levaduras formadoras de *velo de flor* involucradas en crianza biológica.

Introducción

1.- Tipos de estrés a los que se encuentran sometidos las levaduras formadoras de *velo de flor* durante la crianza biológica.

Las levaduras implicadas en la maduración de vinos de crianza biológica se encuentran sometidas a distintos tipos de estrés. En primer lugar, su desarrollo y crecimiento se produce en vinos con graduaciones alcohólicas comprendidas entre 14,5° y el 15,5°. Además, el etanol es la principal fuente de carbono en el vino, el cual debe ser oxidado mediante respiración. Como consecuencia del metabolismo respiratorio se producen especies reactivas de oxígeno (ROS) responsables del estrés oxidativo. Por último y también como consecuencia del metabolismo del etanol se producen grandes cantidades de acetaldehído (Turcotte et al, 2010). Este compuesto, primordial para las propiedades organolépticas de este tipo de vinos, resulta altamente tóxico para las levaduras, provocando daños en el ADN (Castrejón et al, 2002).

En levaduras existe un fenómeno denominado *protección cruzada*, el cual sugiere una integración de los mecanismos moleculares que detectan y responden a diferentes formas de estrés. El resultado de someter a una levadura a estrés térmico es la adaptación de la misma no solo a mayores dosis del mismo estrés sino también al producido por otros agentes como el etanol, altas concentraciones de sal o especies reactivas de oxígeno (ROS) (Costa et al, 1993; Lewis et al, 1995; Steels et al, 1994). La respuesta general a estrés (STRE) se considera el sistema por el cual se coordinan la regulación de cientos de genes implicados en la respuesta celular a diferentes tipos de estrés, tanto metabólicos como ambientales. Durante este proceso se reprimen genes relacionados con el crecimiento, ciclo celular y metabolismo de ARNs mensajeros y se inducen aquéllos relacionados con el ensamblaje de proteínas, desintoxicación de especies ROS, reparación de daños en el ADN, modificación de la pared celular, metabolismo y producción de proteínas estabilizadoras así como carbohidratos de reserva. (Stanley et al, 2010a). Un ejemplo a nivel molecular de este fenómeno sería la activación de las proteínas de choque térmico (*HSPs*) bajo condiciones de falta de nutrientes o la activación del gen *CCT1*, que codifica para una catalasa, bajo choque térmico (Kurtz et al, 1986; Wieser et al, 1991).

La respuesta celular a estrés ocurre a través de varias rutas de transducción de señales. La primera y principal es la ruta de la proteína quinasa dependiente de AMPc (PKA) (Figura III.1). Esta ruta se denomina ruta de respuesta general a estrés y también está implicada en la respuesta a otros tipos de estrés como el oxidativo o el producido por acetaldehído. Además actúa en la señalización de otros procesos celulares como la proliferación celular y la disponibilidad de nutrientes.

Otra ruta de señalización implicada es la HOG-MAP kinasa (HOG-MAPK). Ésta se activaría como consecuencia indirecta del estrés causado sobre las células expuestas a altas concentraciones de etanol (Alexandre et al, 2001) (Figura III.1). Esta ruta se encuentra además interconectada con otra ruta MAPK, la de la integridad de la pared celular (CWI), muy importante en la respuesta celular a este tipo de estrés (Rodríguez-Peña et al, 2010).

La última ruta de señalización implicada se encuentra regulada por la proteína Ira1p/2p (Figura III.1). La activación se produce como respuesta a la acidificación intracelular producida por el etanol.

1.1.- Estrés producido por etanol.

El etanol tiene muchos efectos negativos sobre la fisiología de las levaduras. A concentraciones altas aumenta la muerte celular y a bajas concentraciones inhibe el crecimiento, la división y el volumen celular (Birch & Walker, 2000). Además altera procesos vitales en la célula (Tabla III.1).

Tabla III.1.- Efectos del etanol en la fisiología de la levadura. (Modificada de Stanley et al, 2010a).

Función celular y efecto	Fuente
Viabilidad celular y crecimiento	
Inhibición del crecimiento, división y viabilidad celular	(Stanley et al, 1997)
Descenso en el volumen celular	(Birch & Walker, 2000)
Metabolismo	
Descenso en los niveles de ARNm y proteínas	(Chandler et al, 2004; Hu et al, 2007)
Desnaturalización de proteínas y reducción de la actividad de enzimas glicolíticas	(Hallsworth et al, 1998)
Inducción de proteínas de choque térmico y otras proteínas de respuesta a estrés	(Plesset et al, 1982)
Acumulación intracelular de trehalosa	(Lucero et al, 2000)
Estructura y función de la membrana celular	
Alteración de la morfología vacuolar	(Teixeira et al, 2009)
Inhibición de la endocitosis	(Lucero et al, 2000)
Incremento de la relación ácidos grasos insaturados/saturados en la membrana.	(You et al, 2003; Sajbidor & Grego, 1992)
Incremento del contenido de ergosterol en la membrana	(Swan & Watson, 1998)
Perdida del gradiente electroquímico	(Petrov & Okorokov, 1990)
Inhibición de los procesos de transporte	(Leao & van Uden, 1984)
Inhibición de la actividad H ⁺ ATPasa y acidificación celular	(Cartwright et al, 1986; Alexandre et al, 1998; Walters & Cowley, 1998)
Incremento de la fluidez de la membrana	(Mishra & Prasad, 1989)

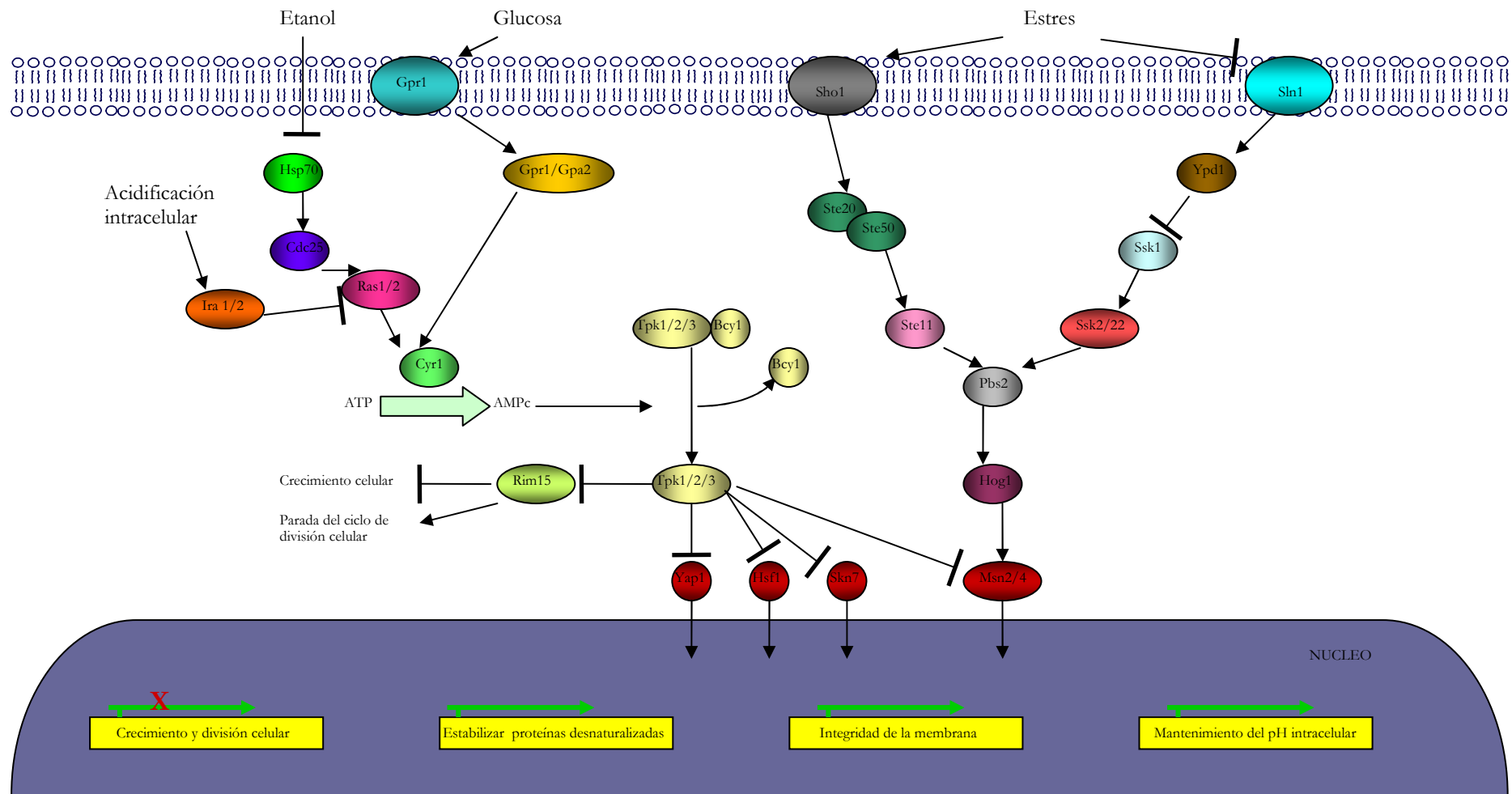


Figura III.1.- Diagrama esquemático donde se muestran las diferentes rutas de transducción de señales involucradas en la respuesta celular a estrés producido por etanol.

1.1.1.- Respuesta transcripcional y fisiológica.

Existen más de 300 genes implicados en la respuesta transcripcional a este tipo de estrés los cuales se agrupan en más de 70 categorías diferentes. La mayoría están implicados en más de un proceso celular (Ma & Liu, 2010) (Tabla III.2) y todos se encuentran regulados por la acción de tres factores transcripcionales, Mns2p/4p, Yap1p y Hsf1p (Estruch F, 2000).

Fisiológicamente, la célula responde al estrés producido por etanol aumentando: la síntesis de componentes de la membrana para aumentar la integridad y rigidez de la misma (Auesukaree et al, 2009; Teixeira et al, 2009; Yoshikawa et al, 2009; Aguilera et al, 2006; Ma & Liu, 2010) y los niveles de expresión tanto de genes implicados en la síntesis de componentes estructurales, ensamblaje y regulación de la vacuola como de genes involucrados en la síntesis de la ATPasa vacuolar (V-ATPasa) (Inoue et al, 2005), además de los implicados en la respuesta a estrés producido por choque térmico (*HSP*) (Tabla III.2). Las proteínas codificadas por estos últimos actúan como chaperonas, manteniendo el estado conformacional correcto de las proteínas de nueva síntesis y reensamblando aquellas que han sido desnaturalizadas por acción del etanol (McClellan et al, 2007; Gong et al, 2009).

1.2.- Estrés producido por acetaldehído.

El acetaldehído es un metabolito producido durante la fermentación alcohólica. También se forma como consecuencia del uso del etanol como fuente de carbono no fermentable por parte de las levaduras de crianza biológica (Turcotte et al, 2010). La concentración de acetaldehído que podemos encontrarnos varía desde 0,3-0,4 g · L⁻¹ hasta 1 g · L⁻¹ (Martínez et al., 1997b). Parte es oxidado a acetato para la obtención de energía a través de la cadena respiratoria y parte es expulsado de la célula. Éste va acumulándose en el vino *Fino* proporcionándole el aroma y sabor que lo caracteriza (Martínez et al, 1998).

El acetaldehído es una molécula muy polar, por eso su paso a través de la capa hidrofóbica de la membrana es lento (Stanley & Pamment, 1993). Como consecuencia, y a pesar del flujo metabólico, el acetaldehído tiende a acumularse en el interior de la célula. Se considera un agente altamente tóxico, incluso más que el etanol (Yeralan & Jones, 1990). Inhibe numerosos procesos metabólicos, retrasando e incluso deteniendo el crecimiento celular. También actúa sobre el ADN, como agente mutagénico (Castrejon et al, 2002; Ristow et al, 1995).

Debido a los altos niveles de acetaldehído, tanto internos como externos, a los que estas levaduras están sometidas se produce una situación de estrés a la cual la célula responde alterando el patrón de expresión de determinados genes.

Tabla III.2.- Genes más relevantes que aumentan su expresión como respuesta celular a diferentes tipos de estrés.

	ESTRÉS		
	ETANOL	ACETALDEHIDO	OXIDATIVO
Componentes de membrana	<i>ETR1, OAR1, SUR4, FEN1, HTD2, COQ1, CDS1, KCS1, ARG82, AYR1, LCB5, LIP5, PDX3, HAC1, PEX15, OLE1</i>		
Homeostasis del pH	<i>VMA1, VMA4, VMA8, VMA13, VMA16, YPH1, CUP5, RAV1, FABI, MEH1, VAC14, VAM1, VAM3, VPS6, VPS15, VPS22, VPS29, VPS34, VPS38,</i>		
Proteínas de choque térmico	<i>LHS1, CRP6, APJ1, SSE1, HSP32, HSP12, HSP26, HSP30, HSP31, HSP32, HSP42, HSP78, HSP82, HSP104, HSP150</i>	<i>HSP12, HSP30, HSP26, HSP104, HSP42, HSP90, HSP78</i>	<i>HSP12, HSP26, HSP104, HSP70/SSA1, HSP78, HSP82</i>
Metabolismo oxidativo		<i>ALD2, ALD3, ALD4, ALD5, ALD6</i>	
Metabolismo del azufre		<i>SRE3, SUL2, MUP1, MUP3, SAM3, MET1, MET3, MET2, MET10, MET14, MET16, MET25, GTT2, MET28, AGP3, MMP1</i>	
Desintoxicación especies ROS	<i>PRX1, GRX1, GRX2, GRX4, HSP12, NQM1, SOD2, MCR1, AHP1, GRE2</i>	<i>CTT1</i>	<i>SOD1, SOD2, CTA1, CTT1, GSH1, GSH2, TRX1, TRX2, TRR1, TRR2, TRX3, PRX1, CCP1, GPX1, GPX2, GLR1, GRX1, GRX2, TPX1, TPX2, TPX3</i>

1.2.1.- Respuesta transcripcional y fisiológica.

Como consecuencia de la acumulación de acetaldehído la célula aumenta la expresión de genes relacionados fundamentalmente con tres procesos biológicos.

En primer lugar se produce el aumento de expresión de genes *HSP* (Aranda et al, 2002; Glover & Lindquist, 1998; Toogun et al, 2008). Destaca *HSP12*, el cual está involucrado en la protección de la integridad de la membrana plasmática y en la adhesión celular (Sales et al, 2000) (Tabla III.2).

En segundo lugar aumenta la expresión de los genes *ADH* y *ALD* los cuales codifican para alcohol y aldehído deshidrogenasas. Estas enzimas son las encargadas de transformar el etanol en acetaldehído y éste en acetato para posteriormente incorporarlo a la cadena respiratoria y obtener energía (Aranda & del Olmo, 2003) (Tabla III.2).

Por último, la célula pone en funcionamiento un sistema de destoxificación consistente en el aumento de expresión de genes que codifican para proteínas que actúan como transportadores de membrana y bombas de expulsión de drogas y compuestos tóxicos para la célula (Sa-Correia & Tenreiro, 2002) (Tabla III.2). Además el acetaldehído puede reaccionar de forma espontánea con el azufre o con compuestos azufrados como por ejemplo algunos aminoácidos, formando agregados no tóxicos, los cuales también son expulsados (Aranda & del Olmo, 2004).

1.3.- Estrés oxidativo.

El estrés oxidativo al que están sometidas las levaduras de velo se produce debido a la presencia de altas concentraciones de etanol y acetaldehído en el medio y al incremento de la actividad respiratoria en las mitocondrias como consecuencia del metabolismo de fuentes de carbono no fermentables (Landolfo et al, 2008).

En condiciones fisiológicas normales en la célula existe un equilibrio entre la producción de especies reactivas de oxígeno o ROS y los sistemas antioxidantes de protección. Este tipo de estrés se produce cuando se rompe este equilibrio, normalmente por un aumento en los niveles de especies ROS en el interior celular o por la exposición directa en el medio a alguna de estas moléculas reactivas.

La cadena transportadora de electrones mitocondrial es la mayor fuente de producción de ROS. La más importante es el anión superóxido (O_2^-). A partir de él se produce peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el cual es reducido a agua (H_2O) por numerosas catalasas y peroxidasas. Sin embargo, en presencia de metales de transición reducidos el H_2O_2 se convierte en $^{\bullet}OH$ (radical hidroxilo), uno de los mayores agentes oxidantes de la naturaleza (Herrero et al, 2008). Cuando el hierro es el metal involucrado en el proceso la reacción se conoce como *Reacción Fenton* (Figura III.2).

En eucariotas el complejo I (ubiquinona oxidoreductasa) y el complejo III (complejo citocromo *bc1*) de la cadena respiratoria son los máximos responsables de la generación del anión O_2^- (Turrens, 1997; Raha & Robinson, 2000; Barja, 1999). En *S. cerevisiae* no encontramos el complejo I (Fang & Beattie, 2003), pero sí tres NADH deshidrogenasas, situadas todas en la membrana interna mitocondrial (Bakker et al, 2001)

(Figura III.2). El metabolismo de las levaduras formadoras de velo produce NADH a partir de la reducción de etanol a acetato, además del procedente del ciclo de Krebs. Este NADH es oxidado por la NADH deshidrogenasa localizada en la zona de la matriz mitocondrial y codificada por el gen *NDI1*. Por lo tanto los niveles de O_2^- que encontramos en este tipo de levaduras es consecuencia de la acción de las dos NADH deshidrogenasas situadas en el espacio intermembrana y del complejo citocromo *bc1* (Figura III.2).

Las especies reactivas de oxígeno actúan oxidando proteínas estructurales, sistemas enzimáticos y receptores de membrana. El mayor efecto y más perjudicial para la célula es la carbonilación de proteínas. Este efecto lo produce el radical hidroxilo oxidando residuos de aminoácidos formando derivados carbonilos (Levine et al, 1994).

Otra molécula sobre la que se produce daño oxidativo es el ADN. La oxidación de nucleótidos producida por cualquier ROS produce rotura en las cadenas de ácido nucleico y recombinaciones intracromosómicas (Lee & Park, 1998).

El daño ocasionado sobre los lípidos se denomina peroxidación. Como consecuencia se producen ácidos grasos hidroperoxidados, los cuales se descomponen generando varias moléculas reactivas (alcanos, aldehidos y epóxidos) que pueden causar daños en el ADN o en proteínas. Este efecto parece estar asociado a un descenso de los niveles de glutatión y de vitamina E (Coenzima Q) (Do et al, 1996).

1.3.1.- Respuesta transcripcional y fisiológica.

La acumulación de moléculas oxidadas, de ROS y el estrés oxidativo producido por la respiración mitocondrial están directamente relacionados con la muerte celular (Costa & Moradas-Ferreira, 2001; Orrenius, 2007). La respuesta celular a este tipo de estrés se centra en reducir la cantidad de estas moléculas a través de la inducción de genes implicados fundamentalmente en dos procesos biológicos. En primer lugar la célula incrementa la expresión de genes *HSP*, así como la de aquellos que codifican para catalasas, superóxido dismutasas y peroxidadas, relacionadas todas ellas con el procesamiento de las ROS hacia su transformación en especies no reactivas (Tabla III.2).

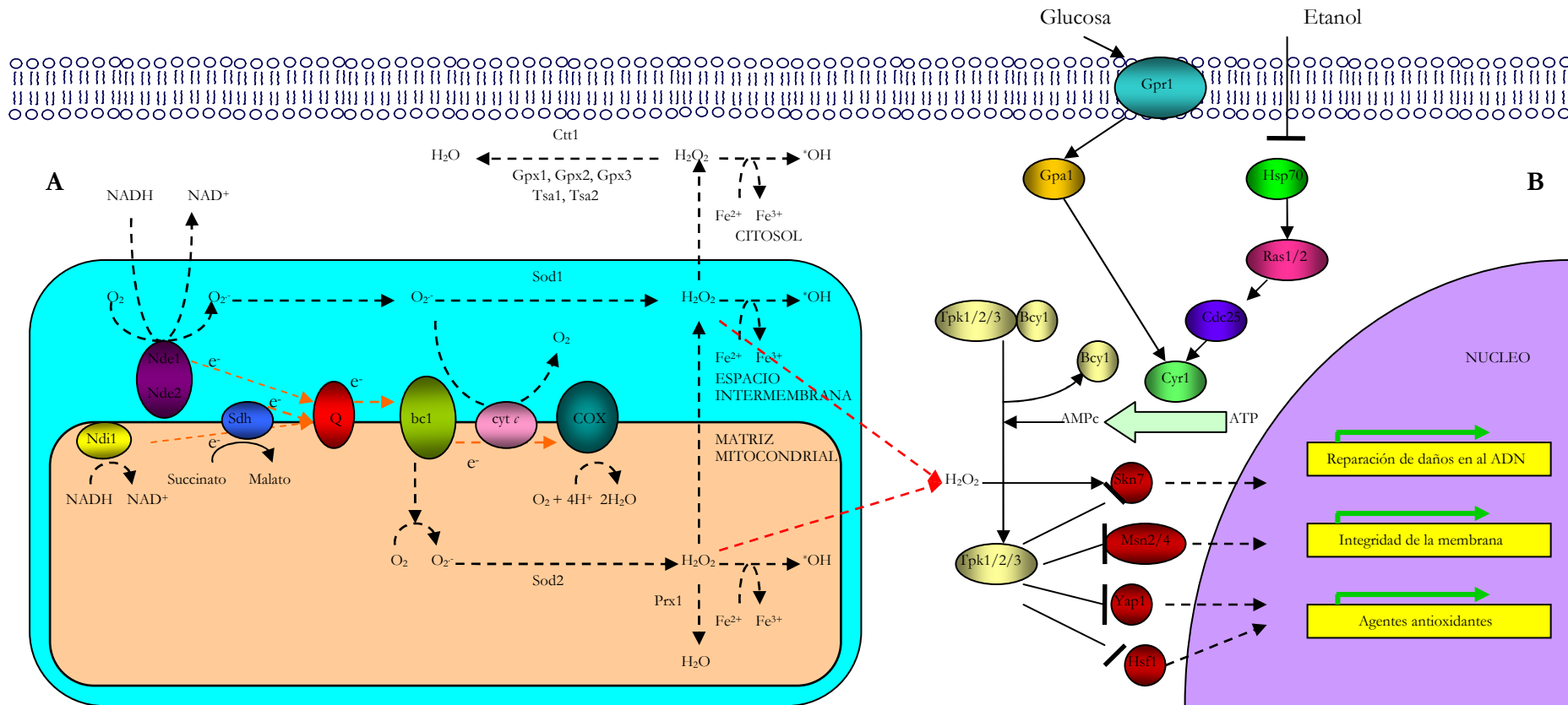


Figura III.2.- Esquema representativo de la cadena respiratoria mitocondrial incluyendo los sitios de generación de especies ROS y las enzimas antioxidantes más importantes. Sod1, superóxido dismutasa citoplasmática; Sod2, superóxido dismutasa mitocondrial; bc1, complejo citocromo bc (complejo III); cyt c, citocromo c; COX, citocromo c oxidasa (complejo IV); Ctt1, catalasa citoplasmática; Gpx, glutatión peroxidasa; Nde, NADH deshidrogenasa externa; Ndi1, NADH deshidrogenasa interna; Tsa, tioredoxin peroxidasa citoplasmática; Prx1 tioredoxin peroxidasa mitocondrial; Q, ubiquinona (Coenzima Q); Sdh, Complejo succinato deshidrogenasa (complejo II) (A). Ruta de transducción implicada en la respuesta a estrés oxidativo producido como consecuencia del metabolismo respiratorio. La ausencia de glucosa y presencia de etanol en el medio producen una inhibición en las vías de activación de la adenilato ciclasa (Cyr1p). Se reducen los niveles de AMPc, la PKA (dímero Tpk1/2/3 y Bcy1) no se activa y los factores transcripcionales se liberan. Éstos se desplazan al interior del núcleo activando la transcripción de los genes implicados en la respuesta a este tipo de estrés (B).

SOD1 y *SOD2* son dos de los genes que muestran una mayor inducción en respuesta a este tipo de estrés. Éstos codifican para dos superóxidos dismutasas, enzimas que intervienen en la detoxificación del anión O_2^- generado en la cadena respiratoria transformándolo en H_2O_2 . Tienen la misma función pero difieren en los metales que usan como cofactores y en la localización celular. Sod1p utiliza Cu y Zn y se localiza tanto en el citoplasma como en el espacio intermembrana de la mitocondria. Sod2p se encuentra exclusivamente en la matriz mitocondrial y utiliza Mn como cofactor.

Se ha descrito que mutantes Δ sod2 son hipersensibles a etanol, e hiperoxia y son incapaces de crecer en condiciones respiratorias (Costa et al, 1997). Sod2p al actuar como agente desintoxicante desempeña un papel esencial en la supervivencia y longevidad celular como respuesta a este tipo de estrés (Fabrizio et al, 2003).

Sod1p además del papel protector frente a agentes oxidantes, tiene numerosas implicaciones. Mutantes en esta enzima presentan pérdida de viabilidad en fase estacionaria y auxotrofías para aminoácidos como la lisina, metionina o cisteína (Longo et al, 1996; Wallace et al, 2004). Además muestran hipersensibilidad a estrés osmótico, cambios de temperatura, agentes oxidantes externos como paracuat y desestabilizadores de la pared celular (Garay-Arroyo et al, 2003; Zhang et al, 2003; Liu et al 2010). La actividad enzimática de esta proteína no solo está regulada a nivel transcripcional, sino que además sufre regulación postraduccional. Así factores como el nivel de Cu o la expresión del gen *CCS1*, juegan un papel fundamental en su activación (Leitch et al, 2009; Harris et al, 2005; Furukawa et al, 2004).

En *S. cerevisiae* las peroxidasas son enzimas que actúan sobre los peróxidos orgánicos e inorgánicos formados por acción del radical hidroxilo (OH) (Figura III.3). Existen dos clases fundamentales de peroxidasas dependiendo de la molécula que usen como agente donador de electrones. Ambas desempeñan la misma función; la reducción de los peróxidos a los correspondientes alcoholes mediante la transferencia de electrones por parte del glutatión (glutatión peroxidasas o GPX) o de la tiorredoxina (tiorredoxin peroxidasas, peroxirredoxinas o TPX) (Park et al, 2000; Avery & Avery, 2001).

Estos dos compuestos son reducidos de nuevo a partir de la oxidación del NADPH, reacción catalizada por la glutathion y tiorredoxin reductasas (tiorredoxinas y glutarredoxinas) (Figura III.3). Estas enzimas, además de controlar el estado redox de la célula, también actúan revertiendo los daños producidos por las ROS en proteínas, lípidos, etc (Grant, 2001; Herrero et al, 2008).

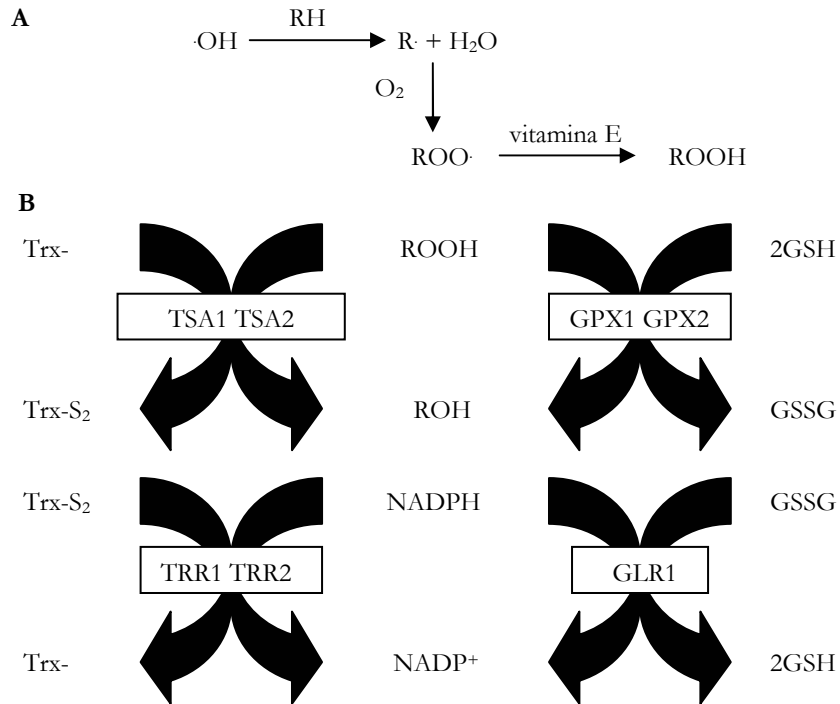


Figura III.3.- Formación de peróxidos a partir del radical hidroxilo (A). Actuación del glutathion y la tiorredoxina en la respuesta a estrés oxidativo. Gpx1p, Gpx2p; glutathion peroxidasas, Glr1p; glutathion reductasa, Tsa1p, Tsa2p, Prx1p; tiorredoxina peroxidasas, Trr1p, Trr2p; tiorredoxinas reductasas, GSH; glutathion, GSSG; glutathion oxidado, Trx-(SH)₂; tiorredoxina, Trx-S₂; tiorredoxina oxidada (B).

En este capítulo se describe la obtención de cepas de levaduras formadoras de *velo de flor* que sobreexpresan genes involucrados en la resistencia a diferentes tipos de estrés como son *SOD1*, *SOD2* y *HSP12*. La sobreexpresión de genes implicados directamente en la capacidad de formación del *velo de flor* o que confieran resistencia a distintos tipos de estrés generarían cepas capaces de producir vino con las mismas características que la cepa original, pero en menos tiempo ya que estas producirían un *velo* estructuralmente más resistente y metabólicamente más activo. Esto supondría un beneficio económico para la industria bodeguera ya que mantendría la calidad de los vinos reduciendo el tiempo necesario de crianza biológica.

Resultados

1.- Obtención de cepas vínicas auxótrofas para uracilo.

Como paso previo a la transformación de las cepas de *velo de flor*, en este trabajo se optó por deletar todas las copias del gen *URA3* presentes en las cepas FJF206, FJF414 y B16 para así obtener cepas auxótrofas para uracilo. Estos derivados auxótrofos permiten utilizar para la transformación construcciones que contienen el gen de interés y como marcador el gen *URA3*. Para ello se utilizó una modificación de la técnica SHF (Materiales y Métodos).

Resultados previos de esta tesis (Resultados Capítulo II) parecen indicar que las cepas de este estudio son poliploides y, posiblemente, posean más de una copia del gen *URA3*. Por ese motivo se diseñaron seis construcciones de integración diferentes. Cada una de ellas posee distintas regiones de homología con el gen *URA3* (Figura III.4).

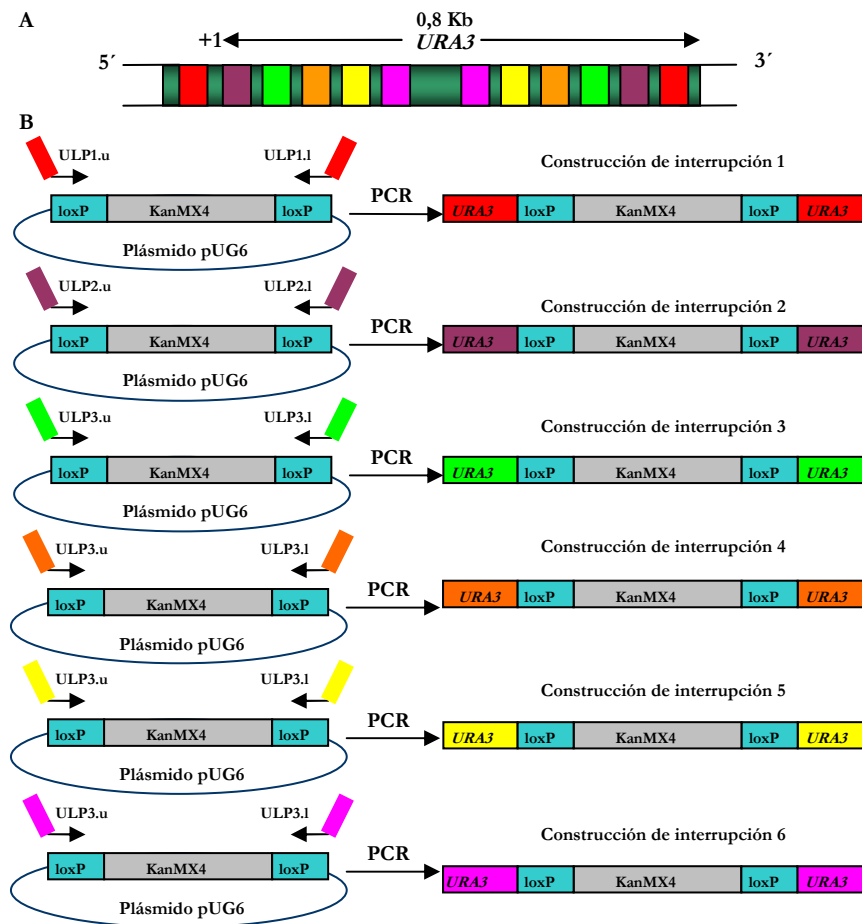


Figura III.4.- Esquema representativo del gen *URA3* donde se indica, mediante código de colores, la localización de las regiones de homología escogidas para cada construcción de integración. La posición +1 representa el inicio de la ORF (A). Sistema de obtención de dichas construcciones mediante reacción de PCR usando como molde ADN del plásmido pUG6 y los cebadores ULP (B).

Esta estrategia asegura la delección de una copia diferente del gen con cada integración. Todas las construcciones se obtuvieron mediante PCR, usando cebadores diseñados específicamente para cada construcción (cebadores ULP1-6.u/U LP1-6.l, Materiales y Métodos) y como ADN molde el plásmido pUG6 (Materiales y Métodos) (Figura III.4).

En el caso de las cepas FJF206 y FJF414 se necesitaron dos transformaciones con las construcciones 1 y 2 para conseguir los derivados auxótrofos, lo que indicaría la presencia de al menos dos copias del gen *URA3* en estas cepas. Para la obtención del derivado auxótrofo de la cepa B16 fue necesario repetir el proceso de transformación cinco veces, lo que concuerda con los datos de contenido en ADN de esta cepa (Tabla II.3).

De esta forma se obtuvieron los derivados auxótrofos de uracilo F6U, F4U y B16U a partir de las cepas formadoras de *velo de flor* FJF206, FJF414 y B16 respectivamente. (Figura III.5).

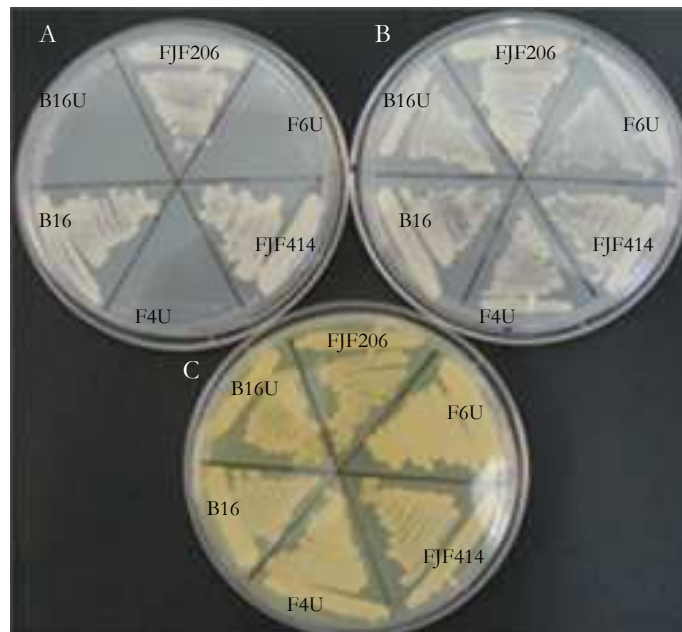


Figura III.5.- Crecimiento de las cepas silvestres y los derivados auxótrofos para uracilo en medio SD (A), SD+ura (B) e YPD (C).

Para comprobar que no se habían producido reorganizaciones cromosómicas durante las distintas rondas de transformación que fueron necesarias para la obtención de los derivados auxótrofos se realizó el cariotipo electroforético de los mismos, no observándose cambios destacables en ninguno de los derivados respecto a su correspondiente cepa parental (Figura III.6).

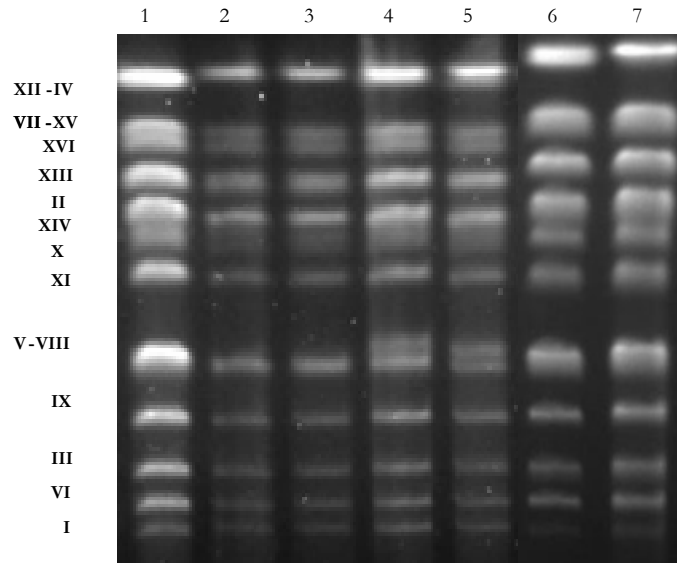


Figura III.6.- Patrón cromosómico de las cepas S288C (1), FJF206 (2), F6U (3), FJF414 (4), F4U (5), B16 (6) y B16U (7)

La correcta delección de todas las copias del gen *URA3* en los derivados auxótrofos de uracilo se comprobó mediante hibridación tanto del cariotipo electroforético como del ADN genómico digerido con las enzimas apropiadas con la sonda del mismo gen *URA3* (Figura III.7).

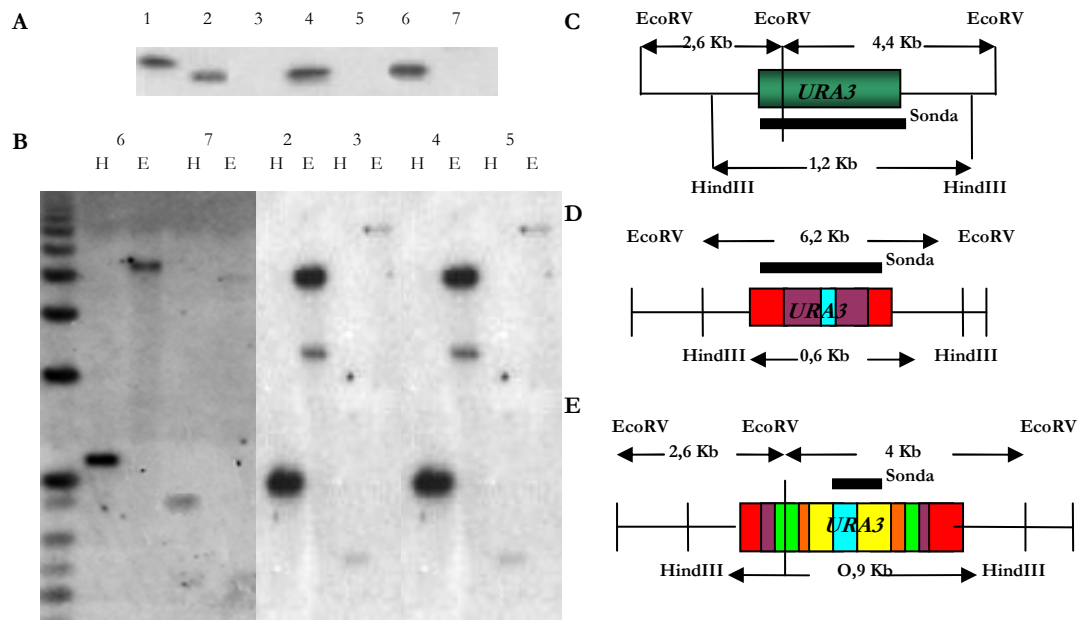


Figura III.7.- Southern blot sobre el cariotipo (A) y el ADN genómico (B) digerido con las enzimas de restricción HindIII (H) y EcoRV (E) de las cepas S288C (1), FJF206 (2), F6U (3), FJF414 (4), F4U (5), B16 (6) y B16U (7) utilizando la sonda del gen *URA3*. Esquema representativo de los sitios de restricción y tamaños de bandas esperados en las cepas silvestres (C) y en las cepas transformadas con dos (D) o cinco (E) construcciones.

Las hibridaciones sobre el ADN genómico de las dos cepas FJF y sus correspondientes derivados auxótrofos se realizaron con una sonda correspondiente a la ORF completa del gen *URA3* (Figura III.7). En las hibridaciones de la cepa B16 y B16U se optó por utilizar una sonda del gen *URA3* correspondiente a la región central de la ORF (Figura III.7). Los patrones de bandas obtenidos tanto en las cepas parentales como en los derivados transformados coinciden con los esperados.

2.- Estrategia para la integración de los genes *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* en cepas auxótrofas para uracilo formadoras de *velo de flor*.

Para obtener las distintas construcciones para la transformación se modificó el plásmido p416gpd y p416::*LacZ* (Materiales y Métodos). La modificación consistió en eliminar un fragmento de ADN bacteriano contenido entre el terminador y el gen marcador *URA3* para dar lugar al plásmido pJF3 y pJF3::*LacZ* respectivamente (Figura III.8).

La amplificación de los genes *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* se realizó mediante PCR a partir de ADN molde de la cepa B16. Se utilizaron los pares de cebadores S1BamHI.u/S1SalI.l, S2BamHI.u/S2SalI.l y H12SpeI.u/H12SalI.l respectivamente (Materiales y Métodos). Tras ser digeridas con las enzimas apropiadas los fragmentos se clonaron en pJF3 para generar los plásmidos pJF3::*SOD1*, pJF3::*SOD2* y pJF3::*HSP12* respectivamente (Materiales y Métodos) (Figura III.8).

Para obtener las diferentes construcciones de integración se realizaron amplificaciones mediante PCR usando como molde ADN de cada uno de los plásmidos obtenidos anteriormente y el par de cebadores GL2.u/U3L2.l (Materiales y Métodos). Éstos poseen secuencias de 40 pb de homología a la región 5' y 3' del gen *LEU2*, así dirigamos la construcción a un locus específico.

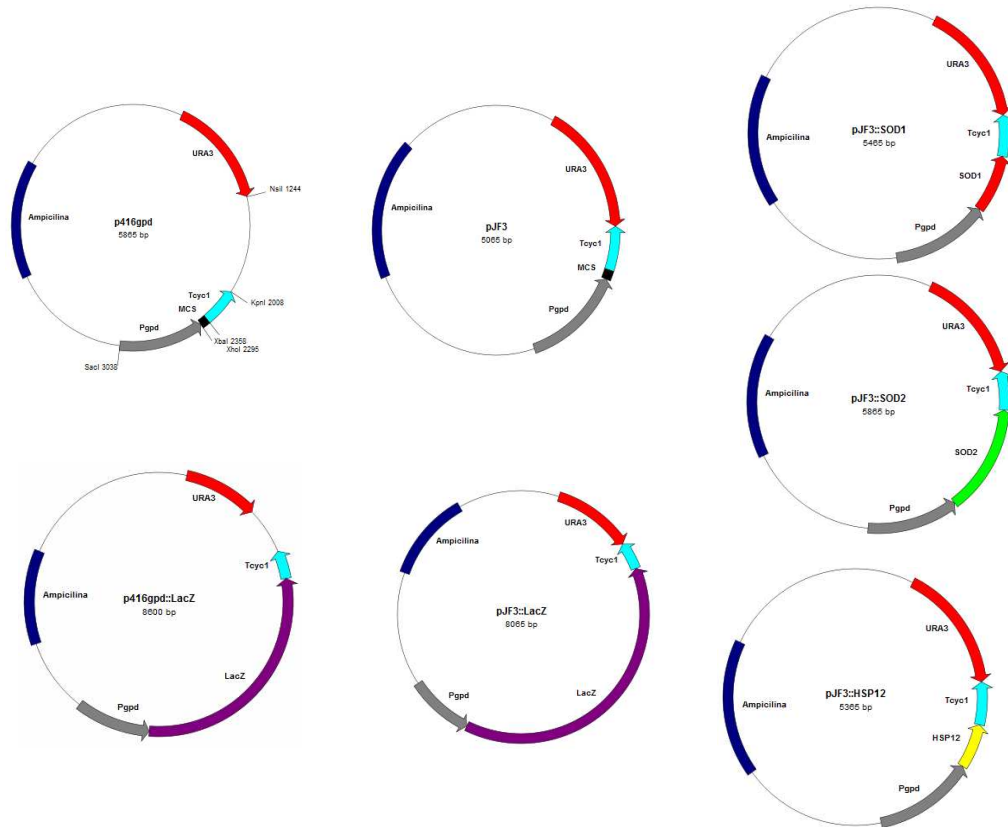


Figura III.8.- Esquema representativo de los plásmidos usados para la obtención de los casetes de integración. Todos ellos presentan un marcador de resistencia a Ampicilina y una secuencia centromérica para su segregación en levaduras.

Tras transformar las cepas F6U, F4U y B16U con las diferentes construcciones de integración se obtuvieron los transformantes F6L, F61, F62, F612, F4L, F41, F42, F412, BL, B1, B2 y B12 los cuales contienen el gen *LacZ*, *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* respectivamente.

3.- Caracterización molecular de los transformantes.

Para comprobar que los transformantes no habían sufrido ninguna reorganización cromosómica durante el proceso de transformación y selección se realizó el cariotipo de todos ellos (Figura III.9-A). No se observaron cambios en los patrones cromosómicos, independientemente de la construcción integrada.

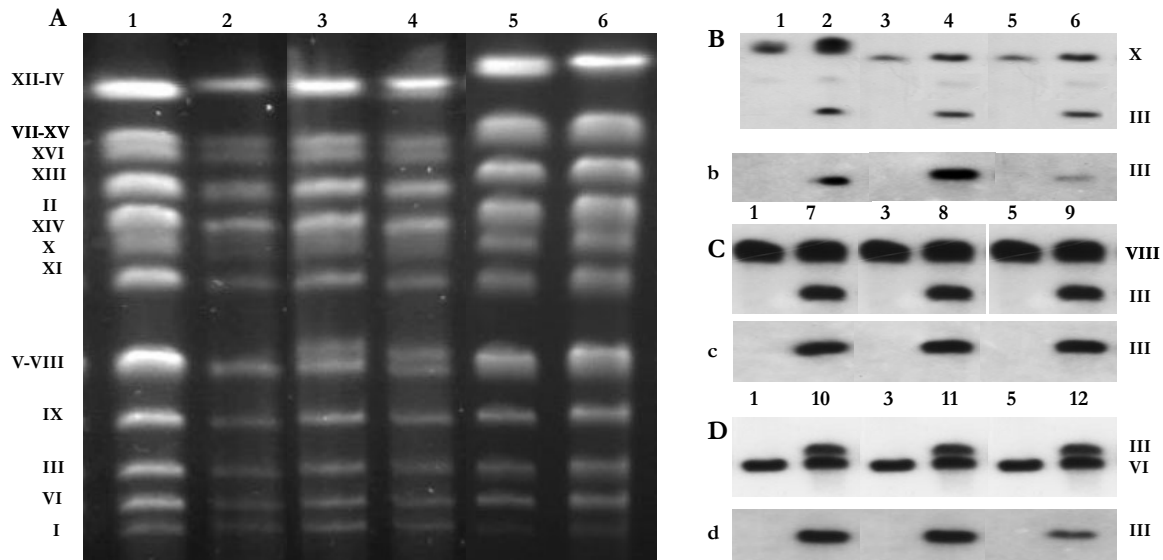


Figura III. 9.- Patrón cromosómico (A) y Southern blot sobre dichos cariotipos con sondas de los genes *SOD1*(B), *SOD2*(C) y *HSP12* (D). Las letras minúsculas (b, c y d) corresponden a los mismos cariotipos hibridados con la sonda del gen *URA3*. Se representan F6U (1), F4U (4), B16U (7), F61 (2), F41 (4), B1 (6), F62 (7), F42 (8), B2 (9), F612 (10), F412 (11) y B12 (12).

La hibridación del cariotipo electroforético con sondas de los genes *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* mostró que todos los transformantes presentaron una banda en el cromosoma correspondiente a la/s copia/s endógena/s del gen estudiado, y otra en el cromosoma III, correspondiente a la copia adicional integrada en *LEU2* (Figura III.9-B, C y D). Al realizar la hibridación con una sonda el gen *URA3* solo se observa una señal a nivel del cromosoma III correspondiente a la copia del gen *URA3* presente en la construcción de integración (Figura III.9-b, c y d).

Para estimar el número de copias integradas se realizó un ensayo de Southern blot sobre el ADN genómico de los transformantes digeridos con las enzimas *EcoRV* y *Sall*. Según la secuencia de la cepa S288C *EcoRV* no corta en la ORF de ninguno de los genes del estudio pero si lo hace en la ORF del gen *LEU2* y *URA3* Por su parte *Sall* no corta en ninguna de las ORF de los genes utilizados en el ensayo (Figuras III.10-A 11-A y 12-A).

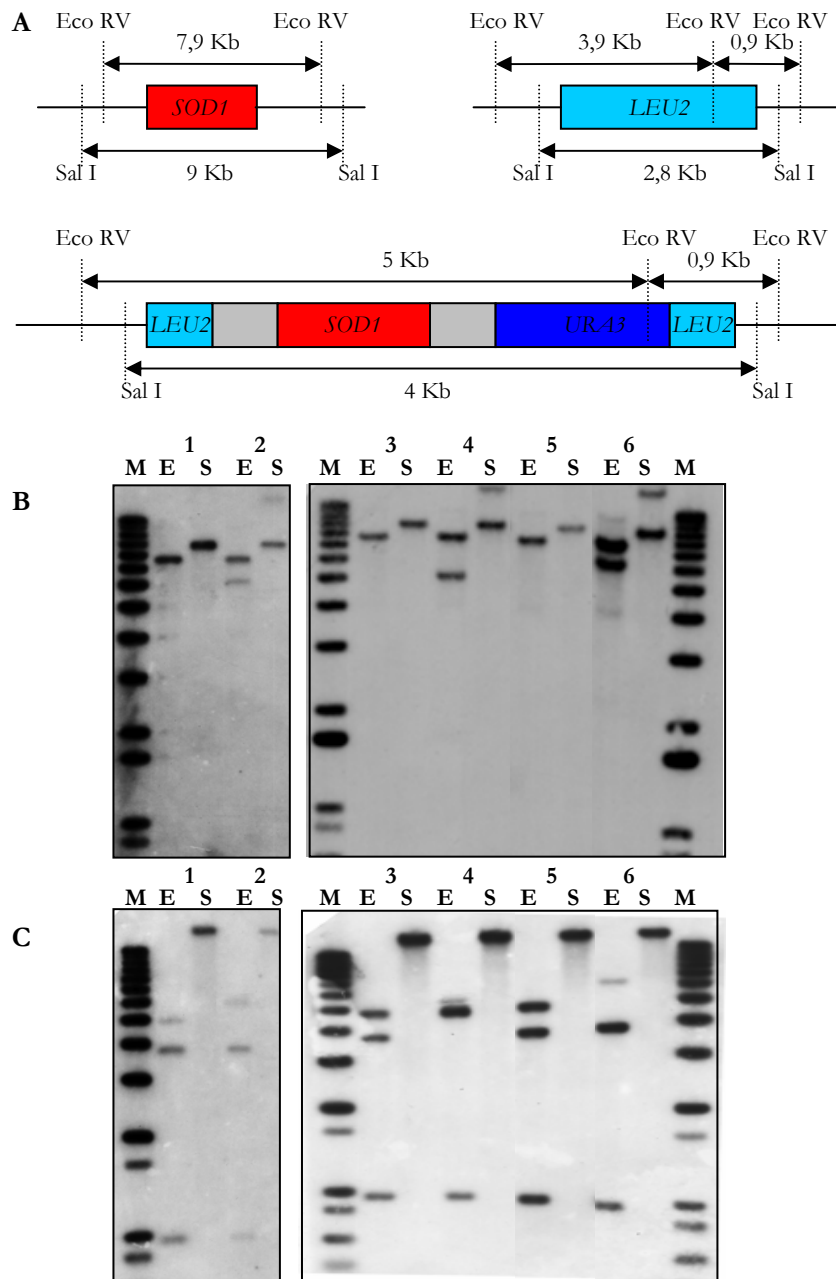


Figura III.10.- Esquema ilustrativo de las regiones de corte de las enzimas de restricción usadas en el Southern y los tamaños de bandas esperados (A), Southern blot de ADN genómico de las cepas transformadas con el gen *SOD1* digerido con EcoRV (E) y SalI (S) e hibridado con una sonda del gen *SOD1* (B) y con una sonda del gen *LEU2* (C). Se representan B16 (1), B1 (2), FJF206 (3), F61 (4), FJF414 (5), F41 (6), siendo M el marcador de peso molecular.

La presencia de una sola banda en todas las cepas parentales y de dos bandas en todos los transformantes independientemente del gen analizado (*SOD1*, *SOD2* o *HSP12*) confirma la integración de una sola copia de la construcción integrativa en las cepas transformadas (Figura III.10-B, 11-B y 12-B)

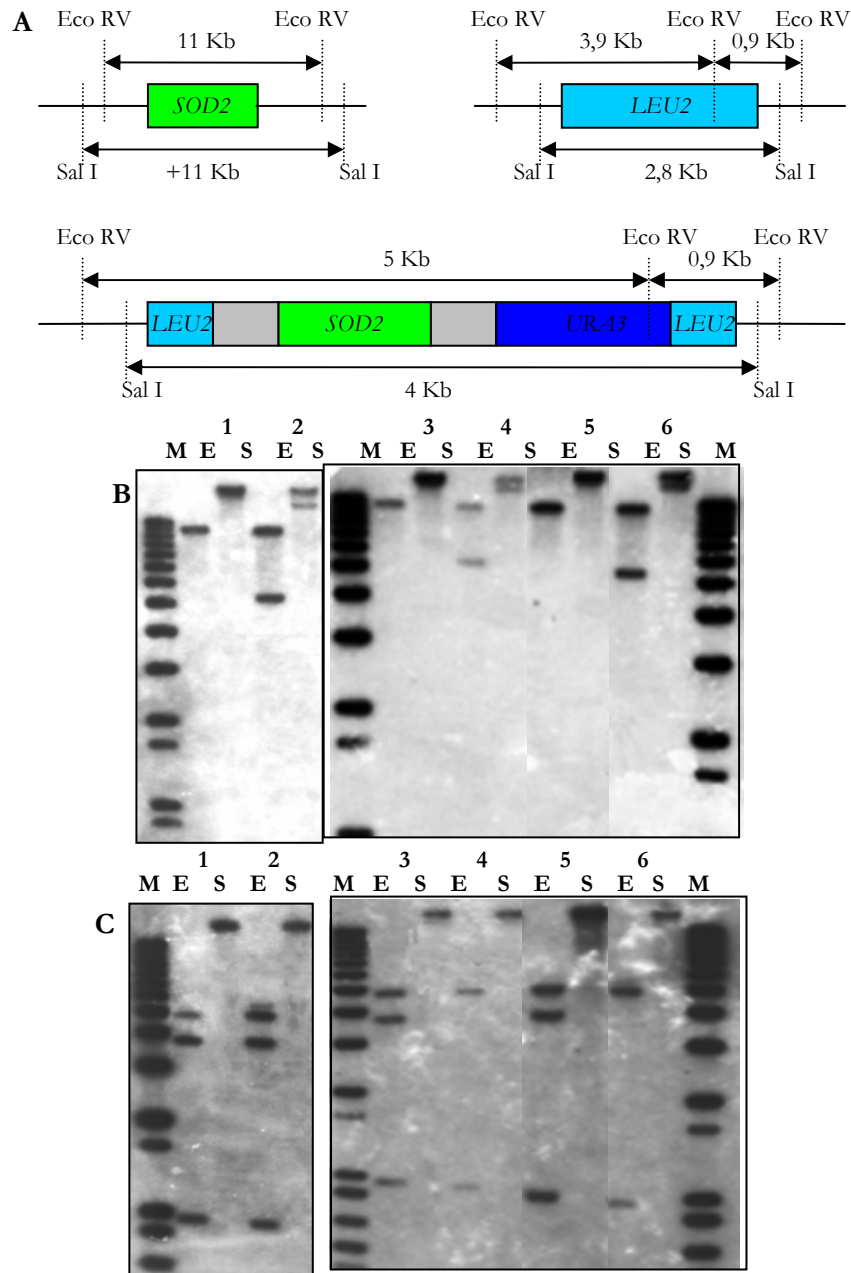


Figura III.11.- Esquema ilustrativo de las regiones de corte de las enzimas de restricción usadas en el Southern y los tamaños de bandas esperados (A). Southern blot de ADN genómico de las cepas transformadas con el gen *SOD2* digerido con EcoRV (E) y SalI (S) e hibridado con una sonda del gen *SOD2* (B) y con una sonda del gen *LEU2* (C). Se representan B16 (1), B2 (2), FJF206 (3), F62 (4) FJF414 (5) y F42 (6), siendo M el marcador de peso molecular

Las diferencia de tamaño observadas en la banda correspondiente a la copia extra en algunos de los transformantes podría indicar que en cada uno de ellos la construcción se ha integrado en un locus *LEU2* diferente ya que las cepas transformadas son poliploides y por tanto poseen varias copias del gen *LEU2*. Las regiones adyacentes a estos loci, donde cortan las enzimas de restricción utilizadas, pueden presentar variaciones en la secuencia.

Esto explicaría las diferencias observadas en los tamaños de las bandas (Figura III.10-C, 11-C y 12-C).

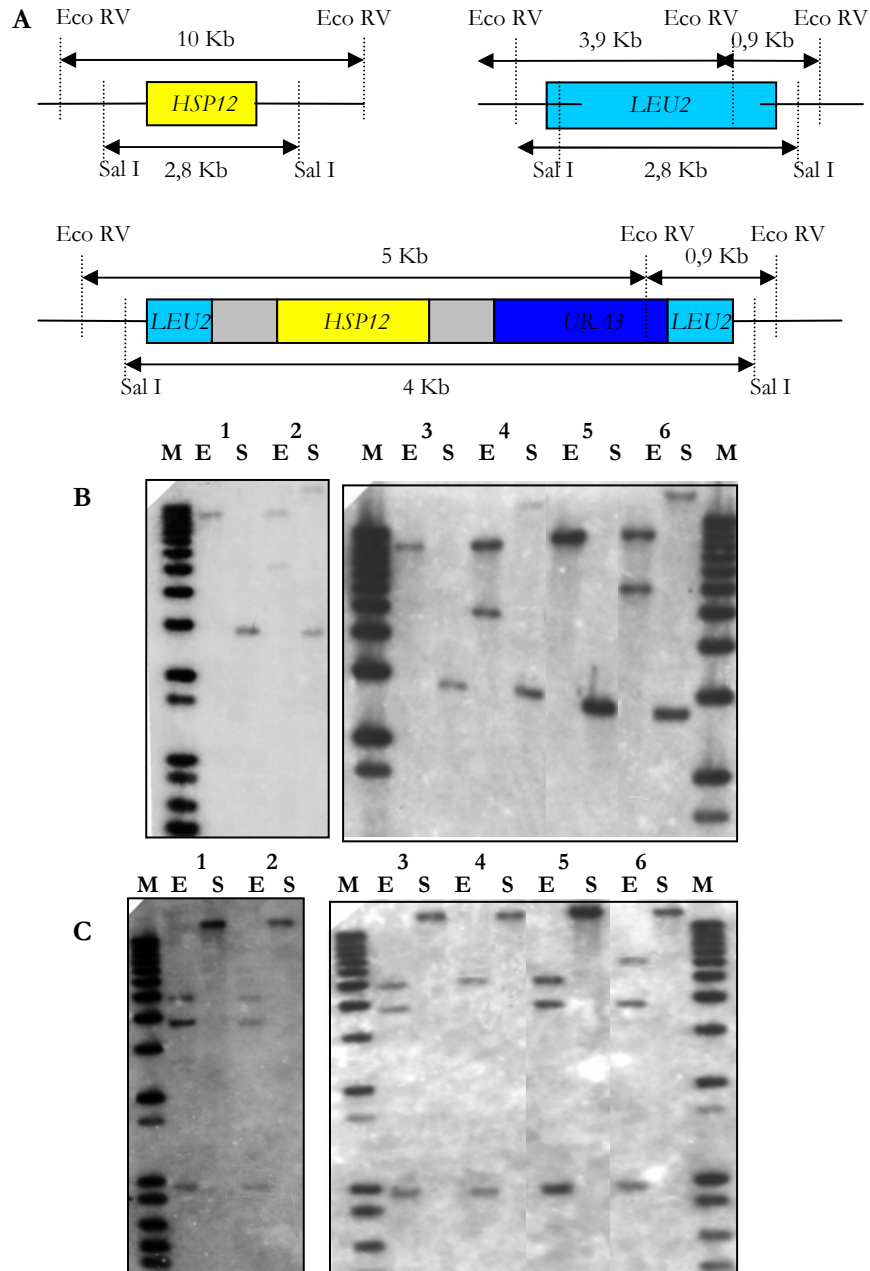


Figura III.12.- Esquema ilustrativo de las regiones de corte de las enzimas de restricción usadas en el Southern y los tamaños de bandas esperados (A), Southern blot de ADN genómico de las cepas transformadas con el gen *HSP12* digerido con EcoRV (E) y SalI (S) e hibridado con una sonda del gen *HSP12* (B) y con una sonda del gen *LEU2* (C). Se representan B16 (1), B12 (2), FJF206 (3), F612 (4), FJF414 (5) y F412 (6), siendo M el marcador de peso molecular.

4.- Niveles de expresión de *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* en las cepas transformadas.

Para analizar los niveles de expresión de los genes *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* en las cepas transformadas y en los parentales se recogieron muestras en diferentes condiciones de cultivo:

- Células creciendo en medio YPD líquido recogidas en fase exponencial (YPDexp) o estacionaria (YPDest).
- Células creciendo en vino con 10° de etanol en fase exponencial (VINOexp) o estacionaria (VINOest).
- Células formando *velo de flor* en su fase inicial de desarrollo (formando islotes sobre la superficie).

Los niveles de expresión de los transformantes se relativizaron a los niveles obtenidos en las correspondientes cepas parentales para cada uno de los medios de cultivo utilizados. Así, en medio YPD los niveles de expresión de *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* en los transformantes fueron del orden de 3-4 veces superior a los obtenidos en las cepas parentales (Figura III.13-A y B). Esta diferencia de expresión fue disminuyendo al cambiar el medio de cultivo, así en vino a 10° el aumento fue de alrededor de 1,5 a 2 veces y en *velo de flor* de 1,3 a 1,5 veces (Figura III.13-C, D y E). Esta disminución en los niveles de expresión en los transformantes es, probablemente, consecuencia del aumento de expresión del correspondiente gen endógeno (Figura III.13-F). Al presentarse los datos relativizados a la expresión en la cepa parental, a mayor expresión del gen endógeno menores serán las diferencias de expresión detectadas en los transformantes. La expresión tanto de *SOD1* como de *SOD2* y *HSP12* se midió en las tres cepas objeto de este estudio relativizándose en todos los casos a la expresión obtenida para cada gen en medio YPDexp. Los patrones de expresión para los tres genes en las tres cepas fueron idénticos.

En todos los casos, el aumento en los niveles de expresión del gen sobreexpresado no produce un aumento en los niveles de expresión de los otros dos genes objeto de este estudio (Figura III.13-A, B, C, D y E).

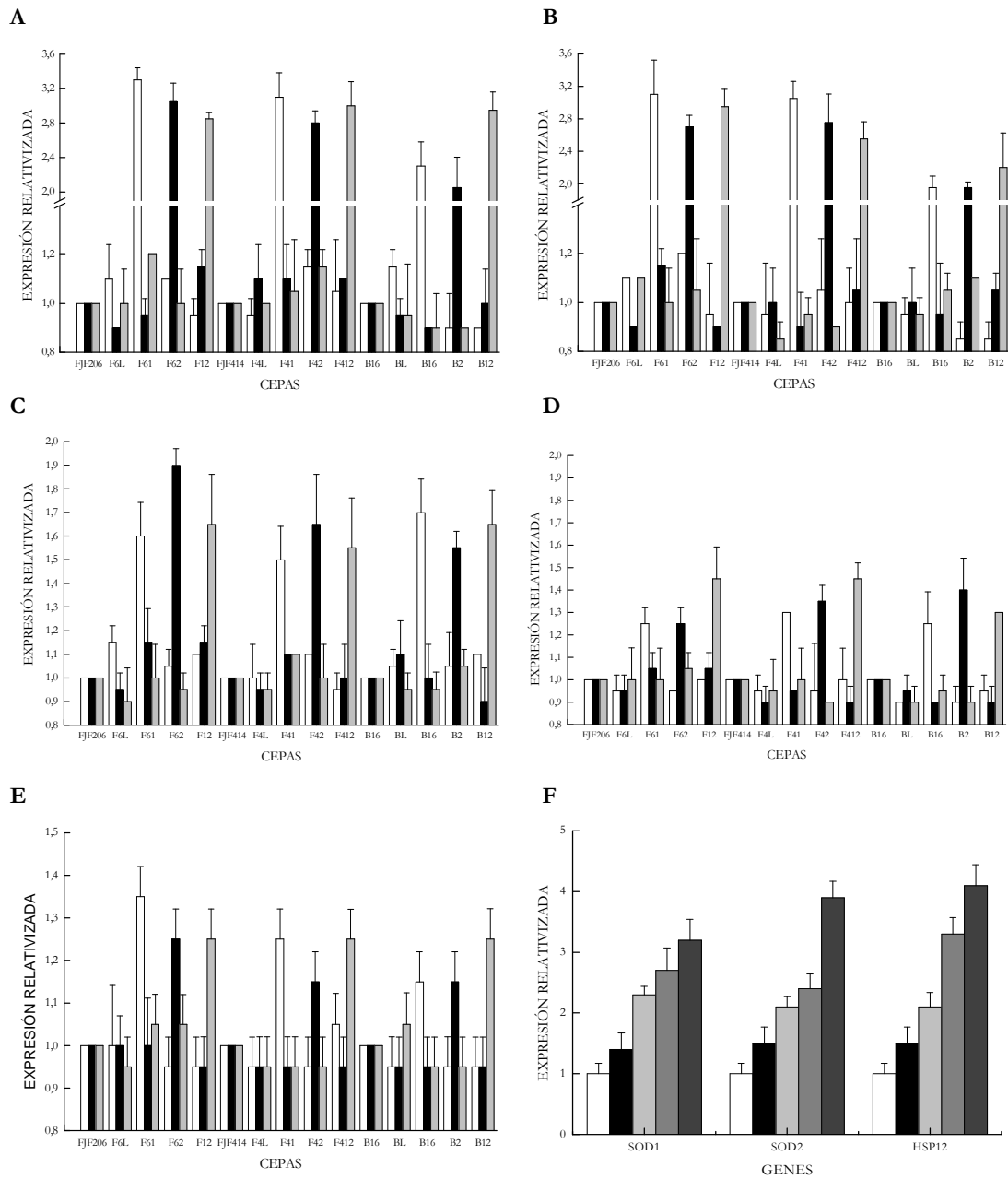


Figura III.13.- Expresión relativa de *SOD1* (columna blanca), *SOD2* (columna negra) y *HSP12* (columna gris) en células creciendo en YPDexp (A), YPDest (B), VINOexp (C), VINOest (D) y en *velo de flor* (E). Expresión de *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* (F) en la cepa B16 en medio YPDexp (columna blanca), YPDest (columna negra), VINOexp (columna gris claro), VINOest (columna gris) y en *velo de flor* (columna gris oscuro).

5.- Caracterización fisiológica.

Para la caracterización fisiológica de las cepas objeto de este estudio se utilizaron las mismas condiciones de cultivo descritas en el apartado anterior.

5.1.- Medida de actividades enzimáticas.

Se realizaron ensayos de actividad enzimática de las proteínas codificadas por los genes *SOD1* y *SOD2*. Se incluyeron también medidas de otras enzimas implicadas en la respuesta a estrés oxidativo como catalasa citoplasmática y mitocondrial, glutatión reductasa y glutatión peroxidasa. (Introducción Capítulo III). En YPD se observó un aumento de la actividad superóxido dismutasa citoplasmática (Act*SOD1*) en los transformantes con *SOD1*, superóxido dismutasa mitocondrial (Act*SOD2*) en los transformados con *SOD2* y de la actividad catalasa (ActCat), glutatión peroxidasa (ActGP) y glutatión reductasa (ActGR) en los transformantes de ambos genes (Tabla III.3 y III.4). Estas diferencias se observaron tanto en fase exponencial como estacionaria (Tabla III.3 y 4).

Los transformantes con el gen *HSP12* solo mostraron aumentos en la ActGP y ActGR, aunque en algunas cepas las diferencias no fueron significativas (Tabla III.3 y III.4).

Tabla III. 3.- Medidas de actividades enzimáticas en cepas formadoras de *velo de flor* obtenidas tras su crecimiento en YPD_{exp}. Los valores numéricos se muestran en U · mg⁻¹ de proteína y son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

Cepas	Catalasa	Glutacion peroxidasa	Glutacion reductasa	Superóxido dismutasa citoplasmática <i>SOD1</i>	Superóxido dismutasa mitocondrial <i>SOD2</i>
FJF206	0,14 ± 0,01	0,37 ± 0,02	5,70 ± 0,13	1,32 ± 0,11	1,05 ± 0,01
F6L	0,14 ± 0,01	0,40 ± 0,09	5,53 ± 0,07	1,47 ± 0,20	1,03 ± 0,12
F61	0,29 ± 0,02	0,67 ± 0,11	5,62 ± 0,45	2,60 ± 0,24	1,20 ± 0,14
F62	0,28 ± 0,02	0,83 ± 0,02	6,26 ± 0,50	1,84 ± 0,38	1,80 ± 0,14
F612	0,19 ± 0,02	0,86 ± 0,02	6,97 ± 0,45	1,03 ± 0,25	1,21 ± 0,17
FJF414	0,12 ± 0,01	0,87 ± 0,02	3,08 ± 0,36	1,38 ± 0,26	0,26 ± 0,16
F4L	0,13 ± 0,01	0,87 ± 0,02	2,43 ± 0,21	0,73 ± 0,14	0,49 ± 0,06
F41	0,18 ± 0,01	1,22 ± 0,02	3,16 ± 0,27	3,75 ± 0,20	0,41 ± 0,13
F42	0,16 ± 0,01	0,99 ± 0,03	4,52 ± 0,15	1,18 ± 0,07	0,89 ± 0,14
F412	0,14 ± 0,01	0,99 ± 0,10	4,31 ± 0,06	1,08 ± 0,05	0,26 ± 0,12
B16	0,14 ± 0,02	0,86 ± 0,09	4,23 ± 0,50	1,15 ± 0,14	0,55 ± 0,07
BL	0,13 ± 0,02	0,81 ± 0,10	4,91 ± 0,44	1,10 ± 0,18	0,46 ± 0,09
B1	0,23 ± 0,01	1,28 ± 0,06	6,96 ± 0,58	6,56 ± 0,27	0,64 ± 0,06
B2	0,21 ± 0,01	1,06 ± 0,08	5,61 ± 0,29	3,36 ± 0,29	0,90 ± 0,01
B12	0,16 ± 0,02	1,17 ± 0,08	6,03 ± 0,66	2,51 ± 0,16	0,57 ± 0,03

Tabla III.4.- Medidas de actividades enzimáticas en cepas formadoras de *velo de flor* obtenidas tras su crecimiento en YPDest. Los valores numéricos se muestran en U · mg⁻¹ de proteína y son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

Cepas	Catalasa	Glutation peroxidasa	Glutation reductasa	Superóxido dismutasa citoplasmática <i>SOD1</i>	Superóxido dismutasa mitocondrial <i>SOD2</i>
FJF206	0,30 ± 0,03	1,43 ± 0,06	10,39 ± 0,24	2,25 ± 0,16	0,24 ± 0,01
F6L	0,28 ± 0,01	1,28 ± 0,41	10,74 ± 0,36	2,48 ± 0,06	0,22 ± 0,02
F61	0,44 ± 0,02	4,43 ± 0,04	11,38 ± 0,35	3,97 ± 0,14	0,19 ± 0,05
F62	0,43 ± 0,02	2,50 ± 0,08	12,02 ± 0,36	2,93 ± 0,12	0,76 ± 0,05
F612	0,32 ± 0,02	2,39 ± 0,03	13,94 ± 0,52	2,47 ± 0,34	0,18 ± 0,01
FJF414	0,31 ± 0,01	1,93 ± 0,03	10,37 ± 0,40	2,95 ± 0,10	0,38 ± 0,06
F4L	0,37 ± 0,01	1,92 ± 0,05	11,70 ± 0,33	2,81 ± 0,30	0,46 ± 0,02
F41	0,43 ± 0,02	2,57 ± 0,13	12,17 ± 0,09	4,31 ± 0,18	0,68 ± 0,18
F42	0,44 ± 0,01	2,96 ± 0,13	12,05 ± 0,13	2,22 ± 0,24	1,33 ± 0,14
F412	0,36 ± 0,01	2,47 ± 0,15	12,22 ± 0,44	2,84 ± 0,36	0,66 ± 0,08
B16	0,39 ± 0,02	0,85 ± 0,09	21,34 ± 0,36	3,78 ± 0,26	0,26 ± 0,08
BL	0,41 ± 0,02	0,86 ± 0,08	22,49 ± 0,50	3,61 ± 0,14	0,25 ± 0,06
B1	0,49 ± 0,01	1,78 ± 0,15	22,72 ± 0,26	5,32 ± 0,09	0,36 ± 0,03
B2	0,52 ± 0,02	2,55 ± 0,18	23,80 ± 0,34	4,20 ± 0,09	1,02 ± 0,13
B12	0,38 ± 0,03	1,42 ± 0,13	21,91 ± 0,09	3,78 ± 0,10	0,30 ± 0,01

Los resultados obtenidos al realizar los ensayos en cepas creciendo en VINOexp y VINOest mostraron que las medidas de Act*SOD1*, Act*SOD2*, ActCat y ActGP fueron superiores en la mayoría de las cepas transformadas con las construcciones que contenían los genes *SOD1* y *SOD2* (Tabla III.5 y 6).

En fase exponencial también se observó un aumento en la ActGP de los transformantes F612, F412 y B12 y en la ActGR de las cepas F41, F42, B1 y B2 (Tablas III.5). En fase estacionaria solo las cepas B1 y B2 presentaron aumentos significativos en los niveles de ActGR (Tabla III.6).

En último lugar se ensayaron las medidas de actividades enzimáticas en células formando *velo de flor*. Las cepas F62, F42 y B2 aumentaron la Act*SOD2*, ActCat, ActGP y ActGR. En las transformadas con *SOD1*, además de las actividades mencionadas anteriormente, también se encontraron valores superiores de Act*SOD1* (Tabla III.7).

Tabla III.5.- Medidas de actividades enzimáticas en cepas formadoras de *velo de flor* obtenidas tras su crecimiento en VINOexp. Los valores numéricos se muestran en U · mg⁻¹ de proteína y son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

Cepas	Catalasa	Glutation peroxidasa	Glutation reductasa	Superóxido dismutasa citoplasmática <i>SOD1</i>	Superóxido dismutasa mitocondrial <i>SOD2</i>
FJF206	0,37 ± 0,01	0,74 ± 0,14	12,59 ± 0,14	2,66 ± 0,38	1,01 ± 0,06
F6L	0,36 ± 0,01	0,64 ± 0,07	12,39 ± 0,44	2,13 ± 0,18	1,08 ± 0,04
F61	0,51 ± 0,01	2,69 ± 0,26	15,85 ± 0,24	5,92 ± 0,16	1,14 ± 0,10
F62	0,51 ± 0,01	2,32 ± 0,21	15,50 ± 0,18	3,58 ± 0,27	2,69 ± 0,16
F612	0,41 ± 0,01	2,03 ± 0,33	15,26 ± 0,99	2,90 ± 0,26	1,05 ± 0,13
FJF414	0,51 ± 0,02	1,15 ± 0,25	6,79 ± 0,51	2,53 ± 0,06	0,54 ± 0,07
F4L	0,49 ± 0,01	1,50 ± 0,12	6,06 ± 0,40	2,61 ± 0,14	0,54 ± 0,22
F41	0,62 ± 0,01	3,91 ± 0,14	10,87 ± 0,86	4,09 ± 0,09	0,65 ± 0,09
F42	0,63 ± 0,02	2,30 ± 0,12	15,74 ± 0,59	2,79 ± 0,07	2,01 ± 0,10
F412	0,53 ± 0,01	2,13 ± 0,18	7,08 ± 0,35	1,74 ± 0,11	0,55 ± 0,10
B16	0,35 ± 0,03	1,62 ± 0,09	17,41 ± 0,18	1,02 ± 0,44	1,93 ± 0,08
BL	0,35 ± 0,04	1,90 ± 0,10	16,17 ± 0,26	0,92 ± 0,10	1,69 ± 0,12
B1	0,72 ± 0,08	3,67 ± 0,32	26,11 ± 0,94	4,70 ± 0,18	2,53 ± 0,12
B2	0,82 ± 0,02	4,95 ± 0,58	28,85 ± 0,45	1,27 ± 0,14	6,21 ± 0,17
B12	0,37 ± 0,02	2,62 ± 0,20	18,31 ± 0,86	1,24 ± 0,09	1,10 ± 0,07

Tabla III.6.- Medidas de actividades enzimáticas en cepas formadoras de *velo de flor* obtenidas tras su crecimiento en VINOest. Los valores numéricos se muestran en U · mg⁻¹ de proteína y son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

Cepas	Catalasa	Glutation peroxidasa	Glutation reductasa	Superóxido dismutasa citoplasmática <i>SOD1</i>	Superóxido dismutasa mitocondrial <i>SOD2</i>
FJF206	0,61 ± 0,06	8,76 ± 0,23	10,60 ± 0,85	3,38 ± 0,23	0,49 ± 0,15
F6L	0,69 ± 0,05	9,08 ± 0,58	11,81 ± 0,62	2,65 ± 0,23	0,50 ± 0,11
F61	0,90 ± 0,02	18,38 ± 0,55	12,68 ± 0,75	6,59 ± 0,23	0,44 ± 0,13
F62	0,92 ± 0,06	31,89 ± 0,88	13,75 ± 0,19	4,78 ± 0,23	1,84 ± 0,19
F612	0,69 ± 0,09	17,92 ± 0,80	15,44 ± 0,72	4,42 ± 0,23	0,90 ± 0,08
FJF414	0,43 ± 0,02	5,47 ± 0,70	11,59 ± 0,42	4,16 ± 0,23	0,78 ± 0,06
F4L	0,43 ± 0,03	4,48 ± 0,44	13,60 ± 0,26	4,99 ± 0,23	0,56 ± 0,14
F41	0,55 ± 0,01	10,76 ± 0,63	13,24 ± 0,39	6,29 ± 0,23	0,89 ± 0,03
F42	0,64 ± 0,03	7,03 ± 0,30	14,21 ± 0,46	5,57 ± 0,23	1,49 ± 0,11
F412	0,55 ± 0,03	6,61 ± 0,64	13,14 ± 0,26	3,81 ± 0,23	0,91 ± 0,10
B16	0,42 ± 0,02	1,47 ± 0,28	16,33 ± 0,19	4,47 ± 0,23	0,49 ± 0,08
BL	0,33 ± 0,10	1,87 ± 0,39	17,79 ± 0,30	3,25 ± 0,23	0,38 ± 0,10
B1	0,53 ± 0,03	2,88 ± 0,35	23,95 ± 0,34	6,66 ± 0,23	0,81 ± 0,05
B2	0,57 ± 0,01	2,93 ± 0,33	24,43 ± 1,11	4,16 ± 0,23	1,51 ± 0,08
B12	0,39 ± 0,03	3,39 ± 0,85	22,87 ± 0,69	4,20 ± 0,23	0,31 ± 0,02

Tabla III. 7.- Medidas de actividades enzimáticas en cepas de crianza biológica recogidas en estado de *velo de flor*. Los valores numéricos se muestran en $U \cdot mg^{-1}$ de proteína y son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

Cepas	Catalasa	Glutacion peroxidasa	Glutacion reductasa	Superóxido dismutasa citoplasmática <i>SOD1</i>	Superóxido dismutasa mitocondrial <i>SOD2</i>
FJF206	1,25 ± 0,06	1,88 ± 0,09	10,44 ± 0,43	5,40 ± 0,28	1,96 ± 0,08
F6L	0,85 ± 0,02	1,62 ± 0,06	7,01 ± 0,64	3,18 ± 0,30	1,52 ± 0,03
F61	2,35 ± 0,01	3,20 ± 0,19	14,98 ± 0,26	11,12 ± 0,24	2,80 ± 0,09
F62	2,3 ± 0,01	3,72 ± 0,16	16,75 ± 0,36	5,30 ± 0,34	5,60 ± 0,10
F612	1,3 ± 0,06	2,12 ± 0,15	17,26 ± 0,41	4,66 ± 0,09	1,76 ± 0,12
FJF414	1,11 ± 0,02	1,82 ± 0,15	9,60 ± 1,67	4,48 ± 0,30	1,12 ± 0,07
F4L	1,05 ± 0,02	1,24 ± 0,14	11,97 ± 1,99	3,64 ± 0,58	1,68 ± 0,05
F41	2,25 ± 0,01	4,32 ± 0,36	20,34 ± 0,81	14,34 ± 0,17	1,98 ± 0,16
F42	2,25 ± 0,01	3,16 ± 0,24	21,49 ± 2,74	5,00 ± 0,31	3,40 ± 0,24
F412	1,15 ± 0,01	2,48 ± 0,28	13,62 ± 2,65	5,46 ± 0,09	1,00 ± 0,14
B16	1,45 ± 0,04	1,68 ± 0,25	23,86 ± 0,36	5,26 ± 0,58	1,64 ± 0,07
BL	1,35 ± 0,05	1,90 ± 0,39	24,76 ± 0,35	4,96 ± 0,24	2,01 ± 0,08
B1	2,85 ± 0,09	3,82 ± 0,21	36,33 ± 2,02	10,94 ± 0,48	2,60 ± 0,17
B2	3,05 ± 0,1	3,72 ± 0,31	37,43 ± 2,33	6,76 ± 0,32	5,92 ± 0,34
B12	2,02 ± 0,05	2,12 ± 0,43	30,13 ± 0,81	5,00 ± 0,30	2,36 ± 0,09

5.2.- Medida de la sensibilidad a enzimas líticas de pared celular.

Para comprobar el efecto que la sobreexpresión del gen *HSP12* puede tener en la integridad de la pared celular se realizó una prueba de sensibilidad a zimoliasa en las cepas parentales y los correspondientes transformantes (Materiales y Métodos). Tanto F612 como F412 y B12 resultaron ser más resistentes al efecto de la zimoliasa que los respectivos parentales (Figura III.14).

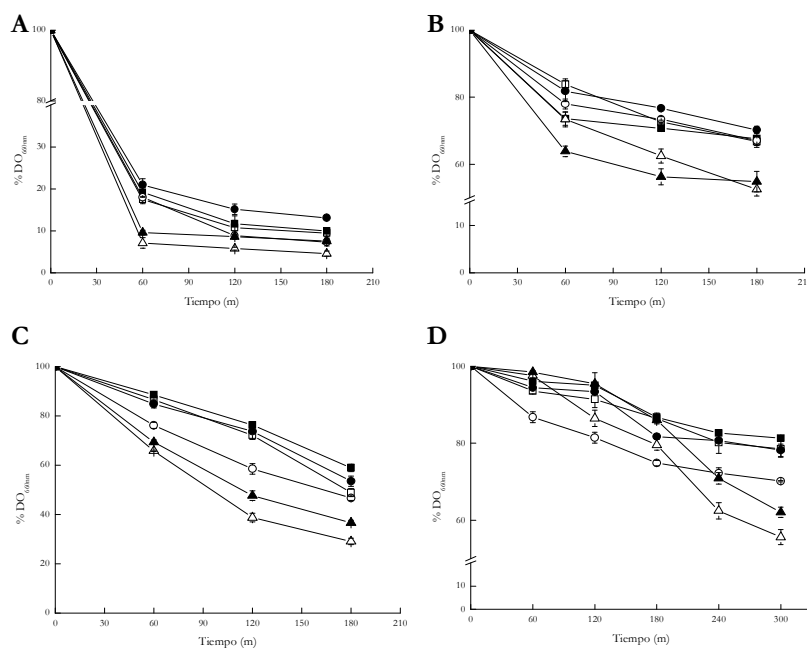


Figura III.15.- Sensibilidad a zimoliasa de las cepas FJF206 (□), F612 (■), FJF414 (○), F412 (●), B16 (△) y B12 (▲) creciendo en YPDexp(A), YPDest (B), VINOexp (C) y VINOest (D). Se representan valores de tres experimentos independientes con desviación estándar.

5.3.- Niveles internos de glutatión.

Aunque la concentración de glutatión depende de la cepa analizada, del medio de cultivo utilizada y de la fase de crecimiento, en todas las condiciones ensayadas los transformantes mostraron niveles superiores a los encontrados en sus respectivas cepas parentales. Estas diferencias fueron siempre superiores cuando las células se recogieron en fase exponencial de crecimiento (Figura III.15).

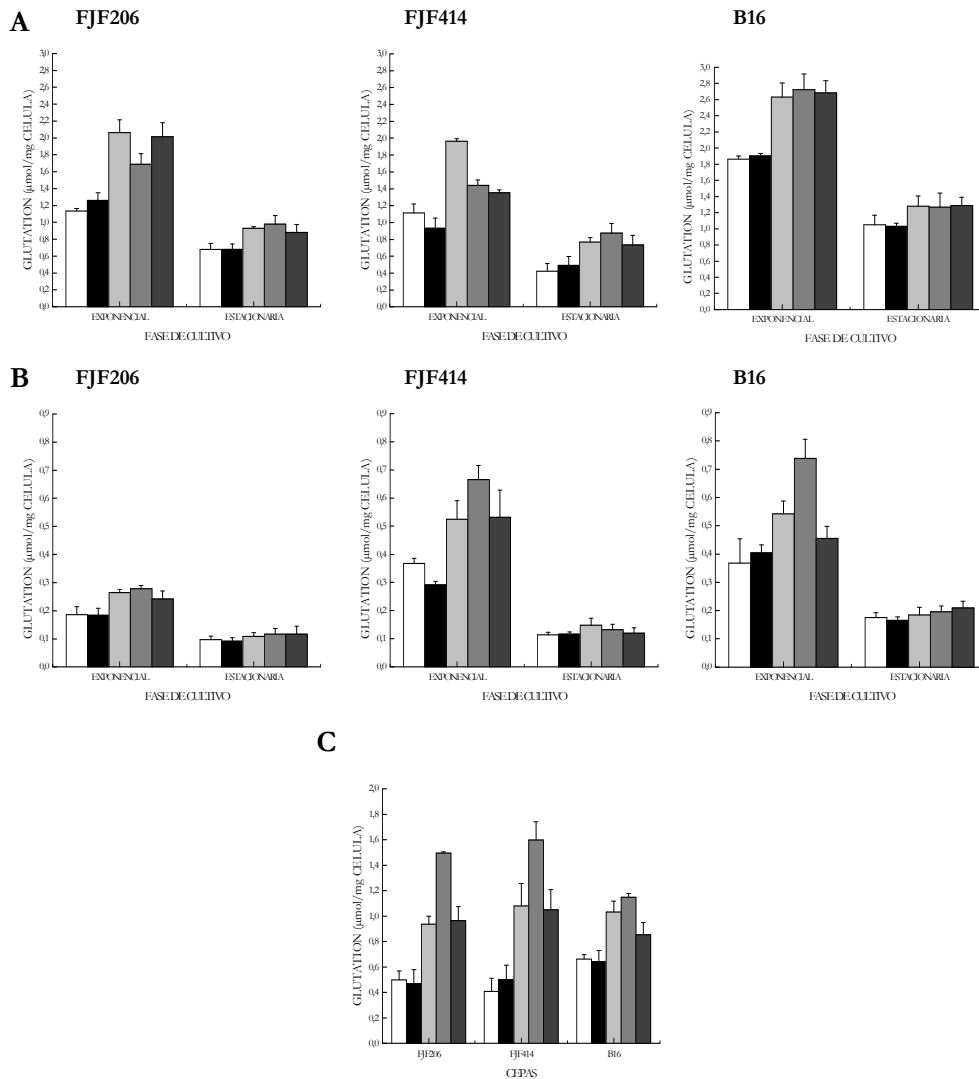


Figura III.15.- Contenido de glutatión en medio YPD (A), vino a 10° (B) y *velo de flor* (C). Se muestran las cepas parentales (columna blanca) y los transformantes con los genes *LacZ* (columna negra), *SOD1* (columna gris claro), *SOD2* (columna gris) y *HSP12* (columna gris oscuro). Se representan valores medios de dos experimentos independientes con desviación estándar.

En vino a 10° los niveles descendieron alrededor de un 80% en comparación a los obtenidos en YPD (Figura III.15). Este descenso fue mucho menor cuando se comparó con el contenido en células procedentes de *velo de flor* en formación (Figura III.15)

5.3.- Peroxidación de lípidos de membranas biológicas.

Al igual que ocurre con el glutation, los niveles de peroxidación de lípidos son dependientes de cepa y del medio de cultivo utilizado. Aún así todos los transformantes presentan niveles inferiores de peroxidación en todas las condiciones de cultivo ensayadas respecto a sus parentales (Figura III.16).

Los niveles de peroxidación fueron mínimos en las células cultivadas en medio YPD y máximos en las células en fase de *velo de flor*, éstos fueron en algunos casos hasta ocho veces más que los obtenidos en YPD (Figura III.16). A pesar de esto, los niveles se redujeron considerablemente en todos los transformantes en fase de *velo de flor*, llegando a ser del 80% en los transformantes derivados de la cepa B16 (Figura III.16-C)

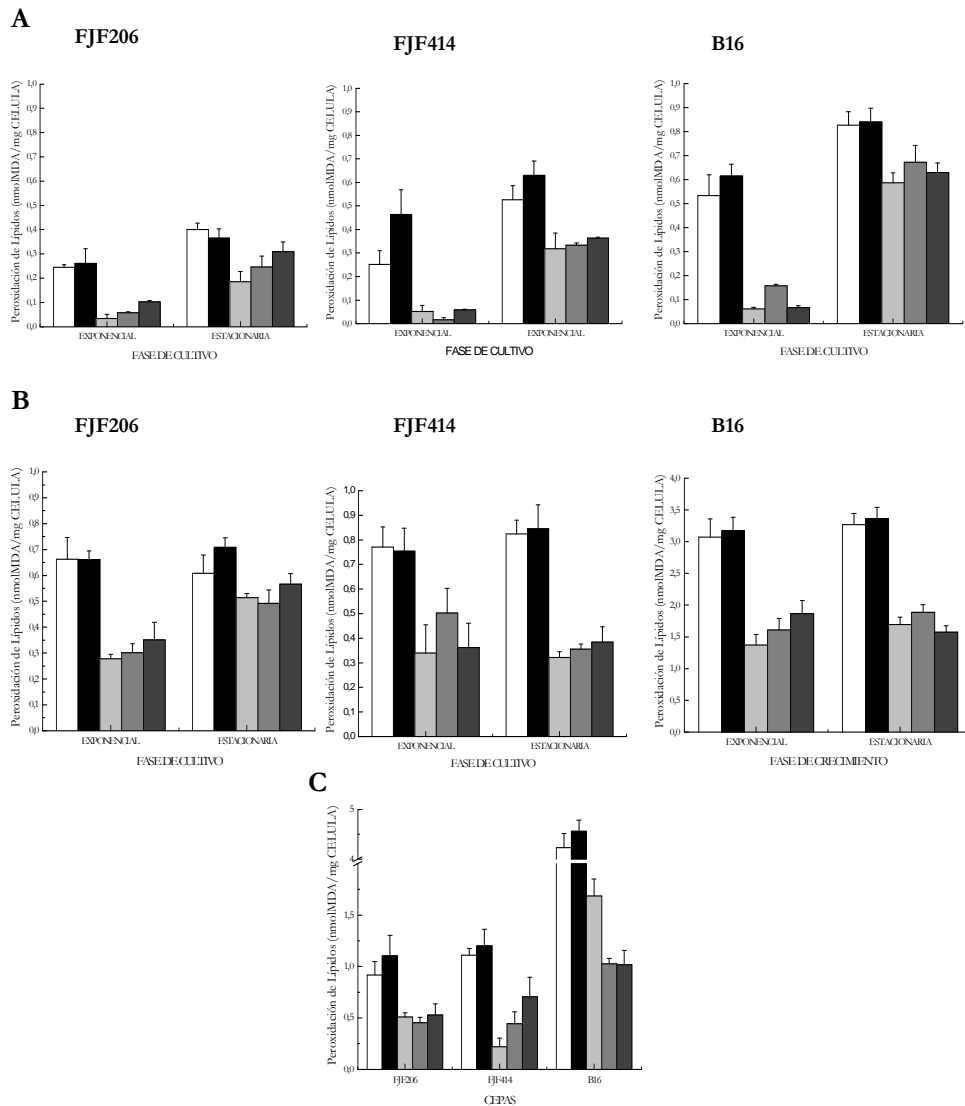


Figura III.16.- Niveles de peroxidación de lípidos en medio YPD (A), vino a 10° (B) y *velo de flor* (C). Se muestran las cepas parentales (columna blanca) y los transformantes con los genes *LacZ* (columna negra), *SOD1* (columna gris claro), *SOD2* (columna gris) y *HSP12* (columna gris oscuro). Se representan valores medios de dos experimentos independientes con desviación estándar.

Independientemente del medio de cultivo en el que se ha realizado el ensayo, la cepa B16 presenta los niveles de peroxidación de lípidos más elevados. Esto indicaría una gran sensibilidad por parte de esta cepa al estrés oxidativo responsable de la formación de estas moléculas reactivas.

5.4.- Cinética de crecimiento y formación de *velo de flor*.

Los transformantes derivados de las cepas FJF206 y FJF414 no presentaron diferencias significativas con sus respectivos parentales al analizar el crecimiento en medio YPD o en vino a 10° de etanol (Figura III.17).

Sin embargo, los transformantes B1, B12 y BL, derivados de la cepa B16, presentaron en todos los casos un retraso en el crecimiento, el cual, en la mayoría de los casos fue causado por un aumento en la fase de latencia. Este retraso fue mucho más acusado en los cultivos en vino a 10° de etanol. Sin embargo, el derivado B2 presentó en todas las condiciones ensayadas una cinética de crecimiento similar a B16 (Figura III.17).

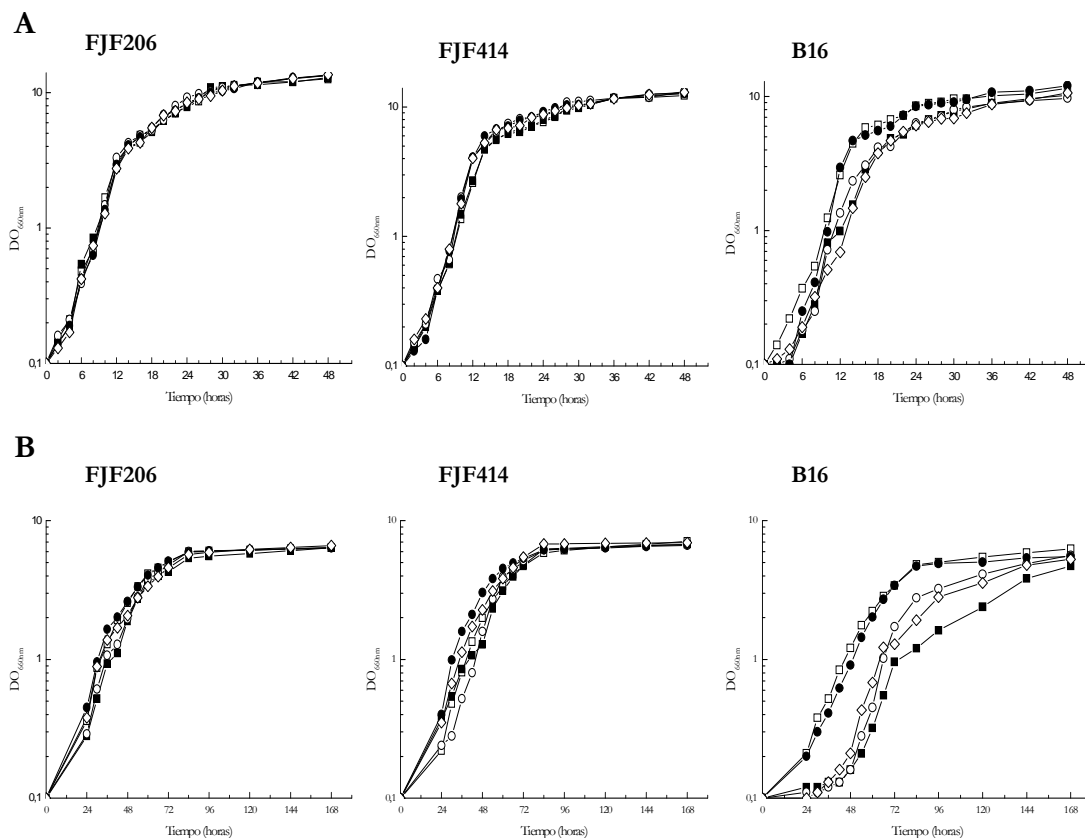


Figura III.17.- Curva de crecimiento de las cepas formadoras de *velo de flor* creciendo en medio YPD (A) y vino a 10° de etanol (B). Se muestran las cepas parentales (□) y las transformada con los genes *LacZ* (■), *SOD1* (○), *SOD2* (●) y *HSP12* (◇). Se presentan valores medios de dos experimentos independientes. En todos los casos las desviaciones fueron inferiores al 5%.

Se analizó la cinética de formación de *velo de flor* por las distintas cepas objetos de este estudio en vinos con distinta graduación alcohólica (10, 12,5 y 15° de etanol). Esta cinética se realizó mediante un análisis cuantitativo de la velocidad de formación del *velo* realizando medidas periódicas de la D.O._{660nm} a cultivos en microplacas. Simultáneamente, se realizó un seguimiento visual de la formación del *velo* (Materiales y Métodos).

A medida que aumentó el contenido de etanol en los vinos utilizados para el ensayo aumentó la fase de latencia de crecimiento, disminuyó la D.O._{660nm} máxima alcanzada por los cultivos y la formación del *velo de flor* se retrasó en el tiempo en todas las cepas objeto de este estudio (Figura III.18 y III.19).

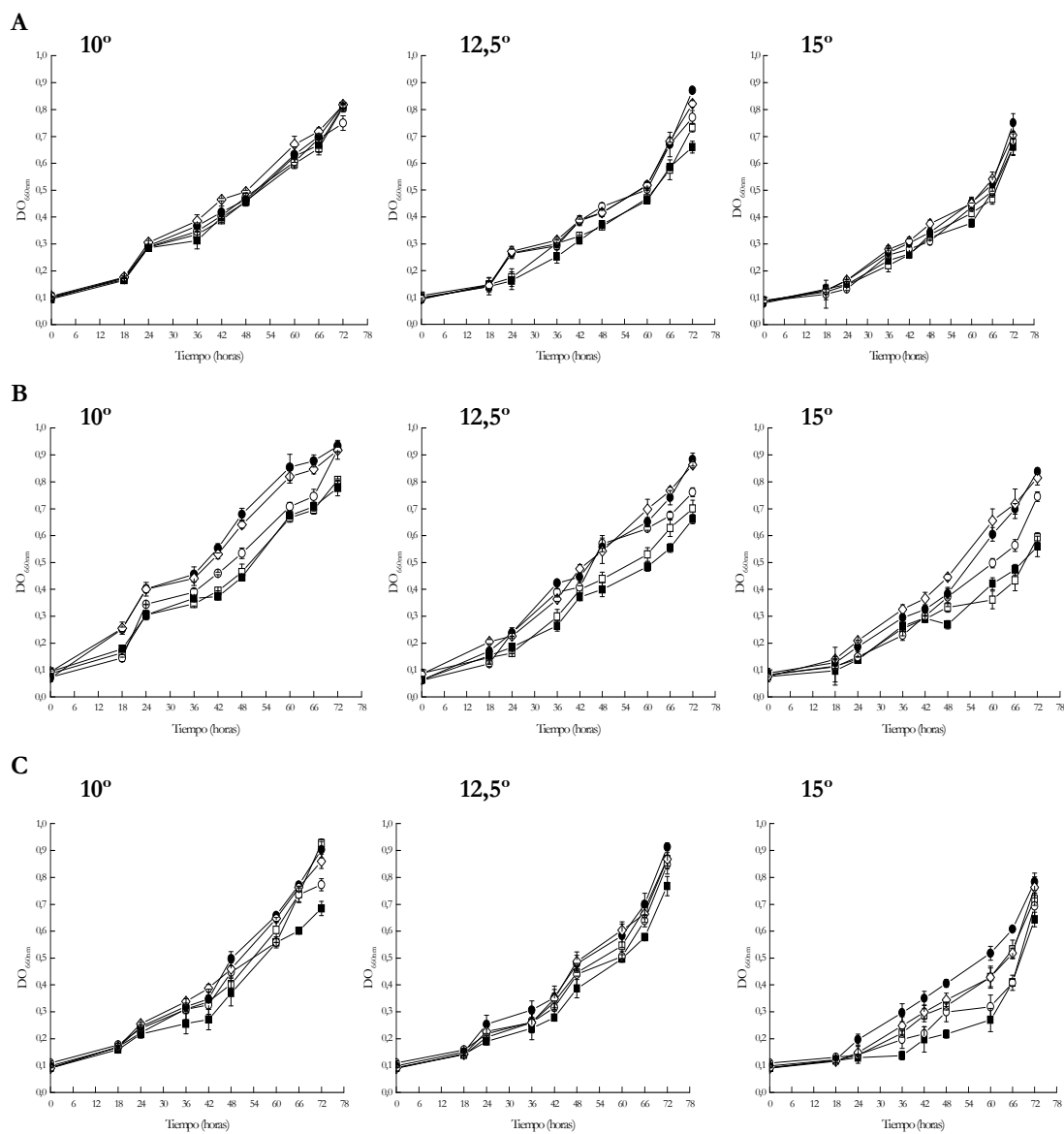


Figura III.18.- Curva de crecimiento de las cepas formadoras de *velo de flor* FJF206 (A), FJF414 (B) y B16 (C). Se muestran las cepas parentales (□) y las transformada con los genes *LacZ* (■), *SOD1* (○), *SOD2* (●) y *HSP12* (◇). Se presentan valores medios de dos experimentos independientes.

Aún así, los transformantes derivados de las cepas FJF206 y FJF414 mostraron mayor crecimiento en todas las graduaciones alcohólicas ensayadas, siendo estas diferencias más acusadas en los derivados transformados de la cepa FJF414 (Figura III.18). Sin embargo, solo el derivado B2 presentó mayor crecimiento respecto a su cepa parental independientemente de la graduación alcohólica del vino utilizado (Figura III.18).

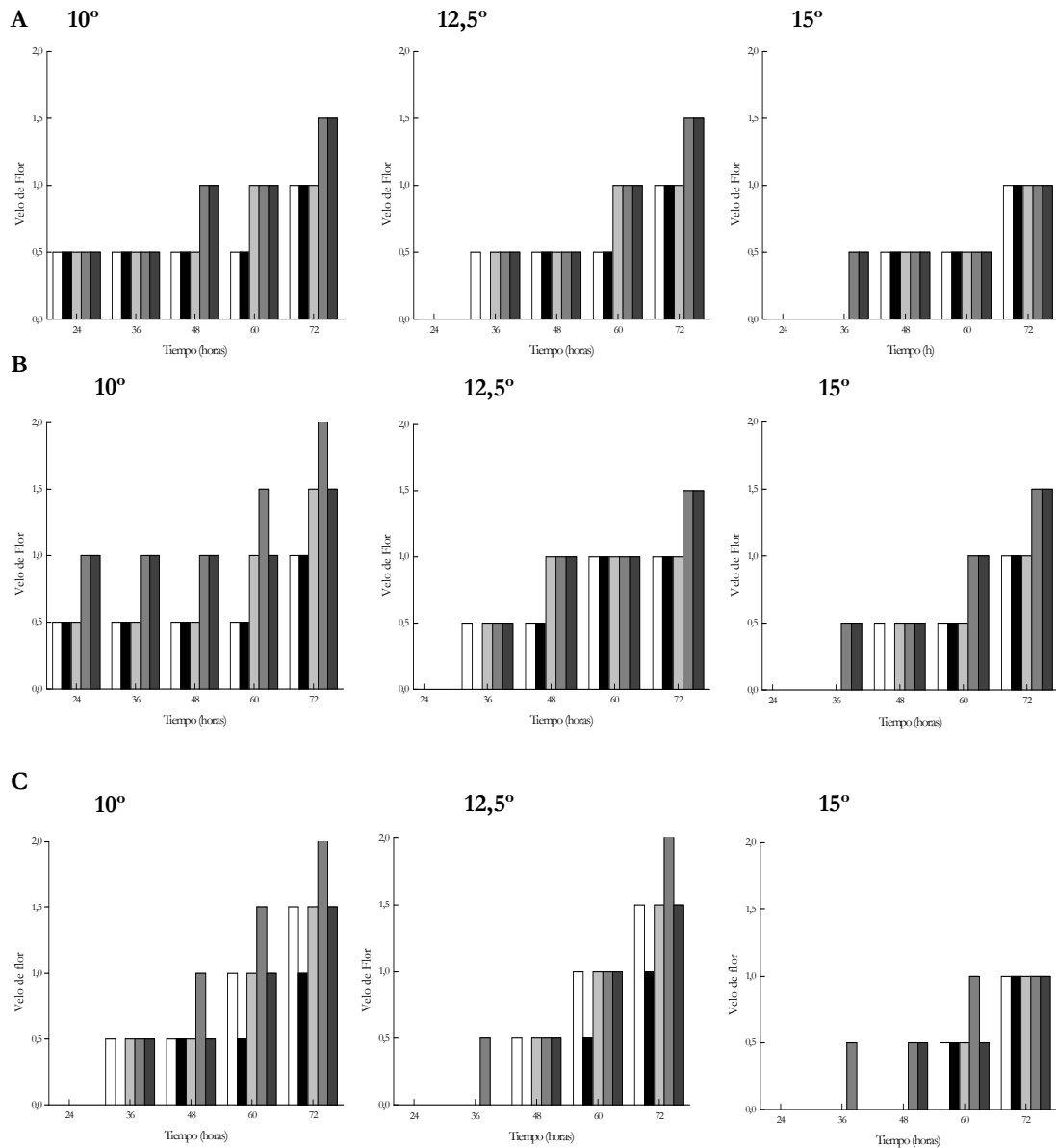


Figura III.19.- Seguimiento visual de la formación de *velo de flor* en las cepas FJF206 (A), FJF414 (B) y B16 (C). Se muestran las cepas parentales (columna blanca) y las cepas transformadas con los genes *LacZ* (columna negra), *SOD1* (columna gris claro), *SOD2* (columna gris) y *HSP12* (columna gris oscuro). Los valores de *velo* representan *velo* en islotos (0,5), en pandereta (1) y rugoso (1,5-2). Se presentan valores medios de dos experimentos independientes.

Del mismo modo, al realizar la cinética de formación de *velo de flor* y el seguimiento visual del mismo se observó que los derivados F62, F42 y B2 presentaron valores visuales de velo al final del cultivo superiores respecto a los que presentaron sus respectivos parentales en vinos con 10 y 12,5° de etanol (Figura III.19 y III.20). Además, también fueron capaces de formar en vinos con 15° de etanol el *velo de flor* antes que sus parentales (Figura III.19).

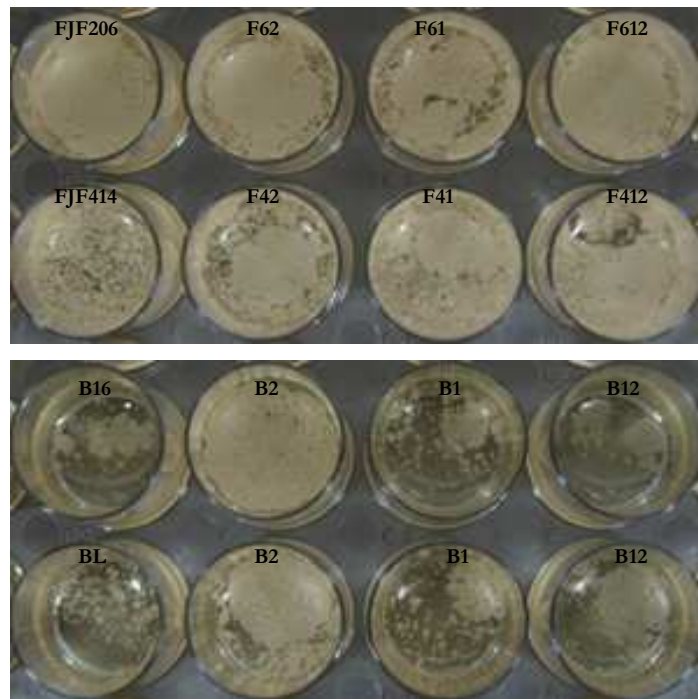


Figura III.22.- Formación de *velo de flor* en cultivos con 15° de etanol de las distintas cepas y sus derivados. La foto se tomó a las 60 h desde el inóculo.

5.5.- Viabilidad celular.

Aunque la viabilidad celular depende de la cepa analizada, del medio de cultivo utilizado y de la fase de crecimiento, en todas las condiciones ensayadas los transformantes mostraron mayores porcentajes de células viables que sus respectivas cepas parentales. Estas diferencias fueron superiores cuando las células se recogieron en fase estacionaria de crecimiento y a medida que aumentaban los meses de crianza biológica bajo *velo de flor* (Tabla III.8).

Tabla III. 8.- Viabilidad celular de las cepas formadoras de *velo de flor*. Los valores numéricos se expresan en % y son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

Medio de cultivo	Cepas				
	FJF206	F6L	F61	F62	F612
YPDexp	98,6 ± 0,71	98,97 ± 0,37	99,35 ± 0,10	99,29 ± 0,20	99,25 ± 0,30
YPDest	94,93 ± 0,13	91,65 ± 0,19	98,38 ± 0,10	97,15 ± 0,10	98,15 ± 0,20
VINOexp	79,90 ± 0,32	78,72 ± 0,40	82,30 ± 0,41	81,06 ± 0,66	81,11 ± 1,10
VINOest	83,13 ± 2,91	82,46 ± 3,37	91,85 ± 0,22	94,90 ± 0,50	92,81 ± 0,23
<i>velo de flor</i> 1 mes	54,90 ± 0,70	54,40 ± 0,90	55,85 ± 0,90	55,40 ± 0,50	55,70 ± 0,10
<i>velo de flor</i> 2 meses	25,00 ± 1,10	28,50 ± 0,80	33,15 ± 0,43	33,37 ± 1,55	33,54 ± 0,25
<i>velo de flor</i> 3 meses	0,85 ± 0,48	1,01 ± 0,45	15,50 ± 4,20	30,50 ± 2,00	8,50 ± 3,20
	FJF414	F4L	F41	F42	F412
YPDexp	98,04 ± 0,13	98,29 ± 0,19	99,34 ± 0,14	98,93 ± 0,10	98,88 ± 0,10
YPDest	80,73 ± 0,77	77,95 ± 3,71	92,75 ± 0,89	90,65 ± 0,86	89,85 ± 1,01
VINOexp	54,41 ± 1,21	45,96 ± 0,92	71,91 ± 0,90	62,70 ± 0,40	63,89 ± 0,27
VINOest	76,00 ± 0,13	69,85 ± 0,40	93,10 ± 0,30	93,20 ± 0,40	94,00 ± 0,40
<i>velo de flor</i> 1 mes	52,85 ± 1,20	53,40 ± 0,40	54,60 ± 0,20	54,55 ± 0,80	55,50 ± 0,40
<i>velo de flor</i> 2 meses	26,18 ± 1,00	26,15 ± 0,86	35,10 ± 0,25	35,30 ± 1,30	35,05 ± 0,85
<i>velo de flor</i> 3 meses	0,89 ± 0,10	0,70 ± 0,40	4,80 ± 0,40	10,30 ± 0,90	5,55 ± 1,30
	B16	BL	B1	B2	B12
YPDexp	92,46 ± 0,67	92,30 ± 0,07	94,60 ± 0,35	97,26 ± 0,07	95,30 ± 0,33
YPDest	93,17 ± 0,36	92,23 ± 1,02	96,26 ± 0,22	97,55 ± 0,25	97,25 ± 0,10
VINOexp	65,28 ± 0,11	64,97 ± 0,10	71,88 ± 0,60	74,38 ± 0,90	70,20 ± 1,03
VINOest	78,90 ± 1,65	77,45 ± 3,20	93,26 ± 1,52	89,55 ± 0,40	89,10 ± 0,40
<i>velo de flor</i> 1 mes	51,00 ± 0,70	51,10 ± 0,20	52,90 ± 0,10	56,70 ± 1,90	53,70 ± 1,10
<i>velo de flor</i> 2 meses	25,24 ± 0,65	26,14 ± 0,80	34,80 ± 0,95	31,10 ± 2,10	30,50 ± 1,15
<i>velo de flor</i> 3 meses	13,00 ± 1,20	14,00 ± 1,40	40,80 ± 4,20	33,90 ± 1,50	23,45 ± 2,65

5.6.- Medida de variables enológicas.

Los niveles de etanol, glicerol, ácido acético y de acetaldehído que observamos en el vino obtenido dependen del metabolismo de la cepa formadora de *velo de flor* bajo la cual se esté realizando la crianza biológica. Aún así, todos los vinos elaborados por las cepas derivadas transformadas presentaron menor contenido en etanol y glicerol y mayor en acetaldehído en comparación con los niveles de estos mismos compuestos obtenidos en los vinos elaborados con las respectivas cepas parentales, incluso tras dos meses de crianza biológica (Tablas III.9 y III.10). Esto indica una mayor actividad metabólica en los *velos de flor* formados por las cepas transformadas.

Tabla III. 9.- Medidas de variables enológicas en el vino inicial y en el obtenido tras un mes de crianza biológica. Los datos de glicerol y ácido acético se muestran en $g \cdot L^{-1}$, los de acetaldehído en $mg \cdot L^{-1}$ y los de etanol en grado alcohólico ($^{\circ}$). Los valores numéricos son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

	Compuesto			
	Glicerol	Etanol	A. acético	Acetaldehído
VINO 15°	8,89	14,51	0,069	42,54

CEPAS	COMPUESTO			
	Glicerol	Etanol	A. acético	Acetaldehído
FJF206	6,82 ± 0,13	7,83 ± 0,04	0,067 ± 0,001	48,32 ± 0,4
F6L	6,94 ± 0,04	7,71 ± 0,05	0,068 ± 0,001	47,12 ± 0,2
F61	6,50 ± 0,01	7,40 ± 0,08	0,059 ± 0,001	53,23 ± 0,2
F62	6,43 ± 0,04	7,52 ± 0,01	0,061 ± 0,001	54,65 ± 0,4
F612	6,58 ± 0,02	7,57 ± 0,04	0,063 ± 0,001	53,33 ± 0,2
FJF414	6,70 ± 0,07	8,17 ± 0,04	0,062 ± 0,001	47,76 ± 0,3
F4L	6,97 ± 0,31	7,75 ± 0,05	0,066 ± 0,003	46,34 ± 0,4
F41	6,44 ± 0,07	7,42 ± 0,02	0,062 ± 0,001	55,11 ± 0,5
F42	6,33 ± 0,08	7,24 ± 0,04	0,061 ± 0,001	52,09 ± 0,2
F412	6,38 ± 0,12	7,32 ± 0,06	0,061 ± 0,002	54,19 ± 0,3
B16	6,77 ± 0,13	9,50 ± 0,08	0,068 ± 0,001	45,23 ± 0,1
BL	6,71 ± 0,08	9,32 ± 0,12	0,069 ± 0,001	46,58 ± 0,2
B1	6,39 ± 0,02	6,97 ± 0,23	0,063 ± 0,004	51,81 ± 0,2
B2	6,63 ± 0,09	7,78 ± 0,04	0,064 ± 0,001	50,92 ± 0,4
B12	6,18 ± 0,08	7,70 ± 0,05	0,067 ± 0,001	52,22 ± 0,1

Tabla III. 10.- Medidas de variables enológicas en el vino obtenido tras dos meses de crianza biológica. Los datos de glicerol y ácido acético se muestran en $g \cdot L^{-1}$, los de acetaldehído en $mg \cdot L^{-1}$ y los de etanol en grado alcohólico ($^{\circ}$). Los valores numéricos son media de dos experimentos independientes con desviación estándar.

CEPAS	COMPUESTO			
	Glicerol	Etanol	A. acético	Acetaldehído
FJF206	5,80 ± 0,02	5,83 ± 0,01	0,065 ± 0,002	50,12 ± 0,1
F6L	5,78 ± 0,04	6,05 ± 0,08	0,065 ± 0,001	51,23 ± 0,1
F61	5,72 ± 0,02	5,48 ± 0,04	0,058 ± 0,004	55,09 ± 0,1
F62	5,73 ± 0,02	5,40 ± 0,01	0,060 ± 0,001	58,15 ± 0,2
F612	5,72 ± 0,02	5,12 ± 0,07	0,062 ± 0,001	56,31 ± 0,2
FJF414	5,79 ± 0,02	6,57 ± 0,08	0,059 ± 0,001	51,34 ± 0,8
F4L	5,79 ± 0,01	6,44 ± 0,02	0,064 ± 0,001	50,87 ± 0,3
F41	5,71 ± 0,02	5,28 ± 0,02	0,060 ± 0,001	57,28 ± 0,1
F42	5,73 ± 0,01	5,64 ± 0,06	0,060 ± 0,004	57,13 ± 0,4
F412	5,72 ± 0,02	5,78 ± 0,03	0,062 ± 0,003	56,02 ± 0,3
B16	5,74 ± 0,01	8,05 ± 0,54	0,065 ± 0,001	49,38 ± 0,2
BL	5,74 ± 0,02	7,85 ± 0,44	0,066 ± 0,001	48,53 ± 0,2
B1	5,72 ± 0,02	5,38 ± 0,05	0,062 ± 0,002	55,76 ± 0,1
B2	5,75 ± 0,02	5,37 ± 0,06	0,062 ± 0,001	56,69 ± 0,1
B12	5,75 ± 0,02	5,39 ± 0,02	0,065 ± 0,002	54,47 ± 0,3

Discusión

1.- Obtención de cepas formadoras de *velo de flor* auxótrofas.

En los años 90 se desarrolló un método por el cual mediante un solo experimento de PCR se obtenía una construcción de integración completa sin necesidad de clonar los diferentes fragmentos en sucesivos pasos. Consistía en diseñar unos cebadores compuestos de dos zonas diferenciadas; una correspondiente al gen que se quiere amplificar e introducir en el genoma y otra correspondiente a la región donde se quiere insertar la construcción. Posteriormente se utilizó dicha técnica para crear construcciones de interrupción con el gen heterólogo *KanMX4* y por último se modificó insertando regiones loxP a ambos lados del gen *KanMX4*. Así se podría escindir el gen de resistencia y volver a utilizarlo en una nueva construcción (Baudin et al, 1993; Guldener et al, 1996; Wach et al, 1994). La metodología resultante se denominó SHF (Figura 4 Materiales y Métodos).

En cepas industriales, debido a las características de sus genomas, ha sido necesario realizar algunas modificaciones. Las poliploidías son muy comunes en cepas industriales por lo que es normal encontrarse con más de dos cromosomas homólogos, y por tanto, con más de dos copias del mismo gen (Querol et al, 2009). Esto nos ha obligado al desarrollo de varias construcciones de integración, las cuales se van diseñando cada vez con regiones de homología más internas del gen. De esta forma evitamos volver a interrumpir una copia que ya ha sido delecionada (Figura III.4).

Esta técnica se puede usar no solo para delecionar genes específicos y ver su función, sino también como una herramienta molecular para obtener cepas auxótrofas para algún metabolito esencial, creando la posibilidad de poder trabajar genéticamente con ellas sin tener que hacer uso de marcadores de resistencia a antibióticos o de genes heterólogos. Mediante sobreexpresión de genes incluidos en casetes de integración con marcadores que reviertan el fenotipo de auxotrofia podemos mejorar la funcionalidad industrial de estas levaduras.

El uso de esta técnica ha permitido obtener derivados auxótrofos para uracilo de las cepas formadoras de *velo de flor* objeto de este estudio, sobre los cuales se estudió el efecto de la sobreexpresión de los genes *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* mediante transformación con construcciones integrativas (Figuras III.5, 6 y 7).

Respecto al número de copias del gen *URA3* en las cepas FJF206 y FJF414 podemos concluir que presentan al menos dos copias debido a la necesidad de utilizar dos construcciones de integración diferentes para obtener los derivados auxótrofos F6U y F4U. En el caso de B16 fue necesario el uso de cinco casetes por lo que posiblemente dicha cepa presente al menos cinco copias del gen *URA3*. Existe la posibilidad de que durante el

mismo suceso de transformación se deleccionaran más de una copia a la vez por lo que no podemos deducir el número exacto de copias presentes en las cepas.

Actualmente en nuestro grupo se está desarrollando una nueva técnica para definir el número de copias de cada cromosoma que posee una cepa por cuantificación de centrómeros mediante RT-PCR (Dueñas-Sánchez, 2010 tesis doctoral). De forma similar se podría concretar el número de copias de un gen específico.

2.- Incremento de la viabilidad en levaduras formadoras de *velo de flor* y su efecto industrial.

Dos de los tres genes utilizados en este estudio están directamente relacionados con la respuesta a estrés oxidativo, *SOD1* y *SOD2* (Costa & Moradas-Ferreira, 2001; Herrero et al, 2008). El tercero, *HSP12*, también interviene en la respuesta a estrés producido por etanol y otros compuestos como el acetaldehído (Aranda & del Olmo, 2004; Costa & Moradas-Ferreira, 2001; Ma & Liu, 2010).

Los niveles de expresión de los genes objeto de este estudio observados en las cepas transformadas fueron superiores a los de las cepas parentales. Aumentos en la expresión de genes no siempre se traduce en un aumento de la actividad de las proteínas que codifican ya que el ARN mensajero resultante puede estar sujeto a regulación postranscripcional y la proteína resultante a regulación postraduccional. Por este motivo se realizaron medidas de actividad enzimática en los derivados transformados.

Los niveles de actividad de las diferentes enzimas ensayadas son dependientes de la cepa y del medio de cultivo en el que se realiza el ensayo, aumentando dichos niveles a medida que aumenta el contenido de etanol en el medio utilizado, siendo máximo en células creciendo en *velo de flor* (Tablas III.3, III.5 y III.7). En todas las cepas transformadas con los genes *SOD1* y *SOD2* los niveles de Act*SOD1*, Act*SOD2*, ActCat y ActGP fueron superiores a los que presentaron las correspondientes cepas parentales. El aumento de la Act*SOD1* y Act*SOD2* se debe seguramente al aumento de expresión de los correspondientes genes, mientras que los de ActCat y ActGP puede que estén directamente relacionados con el aumento del nivel interno de H₂O₂ producido por la acción de las proteínas Sod1p y Sod2p (Figura III.2).

El glutatión actúa en la respuesta de la célula al estrés oxidativo. Además interviene en el mantenimiento del estado redox. Del mismo modo que ocurriera para los niveles de actividades enzimáticas, el contenido interno de glutatión dependen tanto de la cepa como de las condiciones del medio utilizado y la fase de crecimiento, disminuyendo a medida que

aumenta el etanol en el medio, siendo estos niveles mínimos en células procedentes de cultivos en vino con 10° de etanol (Figura III.15).

En todos los transformantes los niveles internos de glutathion fueron superiores a los de las respectivas cepas parentales (Figura III.15), indicando una mayor resistencia de estas cepas a condiciones de estrés. Este aumento puede producirse como resultado del aumento de la ActGR, enzima encargada de reducir la forma oxidada del glutathion para que éste vuelva a ser utilizado por las peroxidases y glutarredoxinas (Avery & Avery, 2001) (Tablas III.3-III.7). En los transformantes con el *HSP12* el aumento en el contenido de glutathion también podría deberse a un aumento en la estabilidad de la membrana y la pared celular de estas cepas, ya que este gen está directamente relacionado con estos procesos (Sales et al, 2000). Este efecto de protección a nivel de la membrana hace a los transformantes más resistentes a los diferentes tipos de estrés.

La peroxidación de lípidos de membrana es un daño molecular característico de cepas expuestas a estrés oxidativo, ya que está directamente relacionado con la presencia de ROS (Do et al, 1996). Los niveles de lípidos peroxidados observados variaron en función de la cepa y el medio de cultivo, siendo estos niveles superiores a medida que el medio de cultivo cambiara de fermentativo a respiratorio, siendo máximos en células procedentes de cultivos en forma de *velo de flor* (Figura III.16). Destacan los altos niveles de peroxidación observados en la cepa B16, lo que podría indicar la presencia en esta cepa de un sistema de detoxificación menos eficiente respecto al que presentan la FJF206 y FJF414. El efecto de la sobreexpresión de los genes *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* en los transformantes provoca un descenso de las ROS en las células y un aumento en la dificultad de estas especies reactivas para interactuar con sus dianas principales (fosfolípidos de membrana), lo que produce la disminución de estos compuestos en estas cepas (Figura III.17).

La mayoría de los transformantes presentaron un crecimiento similar al de sus cepas parentales, independientemente del medio de cultivo utilizado en el ensayo. Aún así, todos ellos resultaron ser cepas más viables, ya que el porcentaje de células vivas observado fue superior en todos los casos a los presentados por sus correspondientes cepas parentales (Tabla III.8). Únicamente las cepas B1 y B12 mostraron menor crecimiento respecto a la cepa B16, siendo las diferencias más acusadas en cultivos en vino a 10° de etanol. (Figura III.17). Al transformar cepas auxótrofas todas las cepas obtenidas presentan una única copia del gen *URA3*. Al realizar los ensayos, los resultados obtenidos se comparan con los de las cepas parentales, las cuales poseen al menos dos y cinco copias del gen *URA3*. Las diferencias de crecimiento observadas en los transformantes podría ser consecuencia de

esta diferencia en el número de copias del gen *URA3*. La cepa B2 mostró un crecimiento similar a B16 (Figura III.17). Esto podría ser consecuencia directa de la sobreexpresión del gen *SOD2* o de la presencia en el genoma de más de un casete integrado en varios locus *LEU2* y por lo tanto más de una copia del *URA3*. Además, también resultó ser más viable que B16 (Tabla III.8). El aumento de viabilidad observado en todos los transformantes podría ser el resultado de una mejor adaptabilidad de las cepas a los diferentes tipos de estrés a los que se encuentran sometidas, consecuencia de la sobreexpresión de los tres genes objeto de este estudio, *SOD1*, *SOD2* y *HSP12*.

Esta mayor adaptabilidad de las cepas transformadas también se vio reflejada en los ensayos de cinética de formación de *velo de flor* realizados. En la mayoría de las condiciones de cultivo ensayadas los transformantes fueron capaces de formar velos que alcanzaron valores superiores a los que formaron las respectivas cepas parentales en el análisis visual realizado, llegando alguno de estos transformantes a formarlo incluso antes que su parental (Figura III. 19). Además, en todos los casos, los velos formados por las cepas que sobreexpresaban *SOD1*, *SOD2* o *HSP12* presentaron mayores porcentajes de células viables (Tabla III.8) y por tanto mayor actividad metabólica. Este aumento de actividad metabólica se vio reflejada en los cambios de las concentraciones de compuestos como el etanol, glicerol y acetaldehído observados en los vinos producidos por los transformantes en comparación a los producidos por las correspondientes cepas parentales (Tablas III.9 y III.10).

Los datos obtenidos en el laboratorio tanto de viabilidad como de variables enológicas no son comparables a los que podrían obtenerse en bodega. En éstas, el periodo de envejecimiento o crianza es mucho más dinámico (debido a las diferentes *sacas* y *rocíos* que se producen durante el mismo) y dura mucho más tiempo (Martínez et al, 1995). Aún así no existen evidencias para pensar que el comportamiento de los transformantes obtenidos en este capítulo sea diferente en la bodega por lo que el *velo de flor* formado por los mismos en las botas seguiría presentando mayor porcentaje de células vivas y seguiría siendo metabólicamente más activo. Esto se traduciría en beneficios económicos para la empresa bodeguera ya que producirían vinos *Finos* con las mismas concentraciones en las variables enológicas (etanol, glicerol, acetaldehído...) que los producidos por las correspondientes cepas parentales pero elaborados en menos tiempo.

Conclusiones

1. El uso de PFP ha permitido el aislamiento de cepas fermentativas superproductoras de fenilalanina que conservan las propiedades fermentativas de la cepa parental, produciendo vinos con mayores concentraciones de alcoholes superiores.
2. La sobreexpresión de los genes *ATF1* y *ATF2* da lugar a un aumento en la concentración de acetatos de ésteres aromáticos en los vinos producidos. Esta sobreexpresión no afecta a otras propiedades importantes en cepas fermentativas como tasa de crecimiento, consumo de azúcares o producción de etanol, glicerol y acidez volátil.
3. Técnicas como RFLP o RAPD permiten la diferenciación e identificación de cepas formadoras de *velo de flor* pertenecientes a diferentes especies, diferentes razas de una misma especie y de cepas pertenecientes a la misma raza, lo que permitiría realizar un seguimiento en bodega de la implantación de una cepa determinada.
4. De acuerdo con la caracterización fisiológica y molecular, las cepas formadoras de *velo de flor*, FJF206, FJF414, B16 y SF pertenecen a la especie *S cerevisiae var beticus*.
5. La velocidad de formación de *velo de flor* depende de la capacidad de la cepa de alcanzar una $D.O_{660nm}$ mínima. Factores que afectan directamente a la tasa de crecimiento, como la naturaleza del preinóculo, la concentración de etanol o la $D.O_{660nm}$ inicial del cultivo afectan a la aparición del mismo.
6. La sobreexpresión de los genes *SOD1*, *SOD2* o *HSP12* en cepas formadoras de *velo de flor* aceleran la velocidad de formación de velo y aumentan la viabilidad de las células que lo componen debido a un aumento en la resistencia de las mismas frente a las condiciones hostiles a las que se encuentran sometidas durante la crianza biológica.
7. Tanto las cepas derivadas superproductoras de aminoácidos como las que sobreexpresan los genes *ATF1*, *ATF2*, *SOD1*, *SOD2* y *HSP12* carecen de marcadores de resistencia a antibióticos, por lo que podrían ser utilizadas en la industria bodeguera.

Apéndices

Apéndice I: Diferentes compuestos aromáticos detectados en vinos tipo *Fino*

Compuesto	Umbral de percepción	Descripción aromática
1,1-Dietoxietano	1	Regaliz, Fruta ácida
1-Butanol	820	Medicinal
1-Decanol	5	Floral, afrutado, grasa, cera
1-Hexanol	8	Herbáceo, madera
1-Heptanol	2,5	
1-Octanol	10	Jazmín, limón
1-Propanol	830	Alcohol, fruta madura
2,3-Butanodiol	668	Afrutado
2,3-butanodiona	0,1	
2,3-pentanodiona	1	Grasiento
2-Butanol	1000	Alcohol, solvente
3-Etoxi-1-propanol	50	Afrutado
3-Metil-1-pentanol	50	Herbáceo, picante
Ácido 3-Metilbutanoico	3	Queso, rancio
4-Etilguaiacol	0,046	Ahumado, pan tostado, clavo, picante
4-Etilfenol	140	
4-Metil-1-pentanol	50	
5-Metilfurfural	16	
Acetaldehído	10	Manzana ácida, picante
Acetoina	30	Mantequilla, crema
Ianona	0,005	Balsámico, rosas, violeta, baya, fenol
β -Citronelol	0,1	Rosas
Benzaldehído	5	
Benzil alcohol	900	Asado, tostado
Butandiona	0,1	
Ácido butanoico	10	Queso, rancio
Butil lactato	10	
γ -Butirolactona	100	Caramelo, pastel, dulce, coco,
γ -Decalactona	1	Melocotón
Decanal	1	
Ácido decanoico	15	Grasa, rancio
Dietil malato	760	Afrutado
Dietil Succinato	100	Afrutado
E-3-hexenol	1	Herbáceo, amargo, grasa
E-nerolidol	1	Manzana, cera, rosa, hiervas, madera
2-furoato de etilo	1	
3-hidroxi-butanoato de etilo	67	Uvas
Etil Acetato	7,5	Piña, barniz, balsamo
Etil Benzoato	5	
Etil Butanoato	0,02	Plátano, piña, fresas, floral
Etil Decanoato/Caprato de etilo	0,51	Afrutado
Etil Heptanoato	0,3	Afrutado, brandy

Etil Hexanoato/Caproato de etilo	0,005	Manzana ácida, plátano, brandy
Etil Isobutanoato	0,015	Fresa, piña
Etil Lactato	100	Creimoso, dulce, afrutado
Etil Laurato/Dodecanoato de etilo	0,5	Afrutado, floral, herbáceo
Etil Miristato	494	Cera, jabonoso
Etil Octanoato/Caprilato de etilo	0,002	Dulce, floral, plátano, pera, brandy
Etil Palmitato	1	Cera
Etil Oropanoato	5	Plátano, manzana
Etil piruvato	100	Vegetal, caramelo
Eugenol	0,005	Canela, clavo, madera
E-oak lactona	0,122	
Farnesol	5	
Furfural	15	
Furfuril alcohol	15	Solvente
Ácido Hexanoico	3	Grasa, queso
Hexil Acetato	1	Plátano, manzana
Isoamil Acetato	0,03	Plátano, pera, dulce
Isoamil alcoholes	30	Alcohol, esmalte, mazapán
Ácido Isobutanoico	20	Grasa, rancio
Isobutanol	40	Medicinal, fenol
Isobutil Acetato	1,6	Plátano, manzana, afrutado, dulce
Isobutil lactato	340	Afrutado, balsámico, vegetal
Etil Isovalerato/Isopentanoato de etilo		Afrutado, manzana
Ácido Laurico	10	
Linalol	0,015	Cítrico, floral, dulce, uvas
Metanol	668	Alcohol
Metionol	0,5	Patata cocida, heno
Metil butanoato	1	
Monoetil succinato	1000	
Neral	0,5	Afrutado
Nerol	0,5	Floral, herbáceo
Octanal	0,64	Miel, herbáceo, grasa
Ácido Octanoico	8,8	Rancio, queso, grasa
Octil Acetato	0,05	Manzana, rosas
Pantolactona	500	Licor, ahumado, pan tostado
p-Cymene	66	
Fenetil Acetato	0,25	Floral, afrutado, miel
Fenetil alcohol	10	Rosas, floral
Fenetil octanoato	10	
Propil Acetato	65	Apio
Propil butanoato	0,1	Picante, rancio
Terpineol	5	Lirio, dulce, pastel
Tirosol		
Triptofol		Cera de abeja, miel
Z-3-hexenol	1	Herbáceo, amargo, grasa
Z-Nerolidol	64	Rosa, manzana, herbáceo, cítrico, madera
Z-oak lactona	0,035	
Z-Whisky lactona	0,035	

Apéndice II.- Compuestos aromáticos en los vinos jóvenes obtenidos tras la fermentación con la cepa PDC y derivados resistentes a PFP. Los valores son media de dos experimentos independientes con desviación estándar. El umbral de percepción y la descripción aromática para cada compuesto se especifican en el Apéndice I de esta tesis.

NOTA: Los valores numéricos que se muestran en esta tabla no son comparables a los obtenidos en el Apéndice IV de esta tesis para las mismas cepas, ya que el mosto a partir del cual se realizó la fermentación era de diferente composición (Resultados Capítulo I; Tablas I.3 y I.6). Aún así, el comportamiento de las cepas si fue el mismo respecto a los compuestos que aumentaron o disminuyeron su concentración.

Compuesto	CEPAS				
	PDC	P2.1	P2.6	P6.1	P8.1
Etanol (°)	13,4±0,20	13,9±0,60	14,3±0,20	14,2±0,60	14,3±0,40
Acidez volátil (g ·L ⁻¹ de acético)	0,69±0,03	0,59±0,02	0,55±0,05	0,51±0,01	0,58±0,04
Glicerol (g ·L ⁻¹)	7,20±0,06	7,20±0,01	7,20±0,01	7,60±0,50	7,60±0,50
Azúcar residual (mg ·L ⁻¹)	0,25±0,01	0,02±0,002	0,03±0,004	0,01±0,00	0,00±0,00
Acetaldehido (mg ·L ⁻¹)	74,5±6,00	62,8±4,19	58,4±10,18	62,2±7,05	57,4±10,25
Acetoína (mg ·L ⁻¹)	9,20±1,65	7,60±1,68	6,50±1,58	6,20±2,00	5,80±1,72
Dietil acetil (mg ·L ⁻¹)	6,00±1,41	6,50±0,77	5,9±1,19	7,00±1,83	6,00±1,04
Metanol (mg ·L ⁻¹)	52,0±4,58	56,2±4,15	52,5±4,84	55,2±4,61	51,1±4,13
N-propanol (mg ·L ⁻¹)	20,5±2,95	19,5±2,12	18,5±0,70	19,5±2,12	15,0±1,41
Isobutanol (mg ·L ⁻¹)	47,3±2,79	76,3±3,50	73,3±2,03	71,3±3,50	70,1±3,02
N-butanol (mg ·L ⁻¹)	0,30±0,14	0,20±0,14	0,15±0,07	0,10±0,00	0,25±0,07
Hexanol (mg ·L ⁻¹)	0,50±0,07	0,60±0,04	0,50±0,00	0,50±0,04	0,50±0,00
2-feniletanol (mg ·L ⁻¹)	9,80±3,82	256,2±41,4	262,8±53,7	268,3±45,2	274,2±55,7
2-metilbutanol (mg ·L ⁻¹)	19,9±3,65	26,3±5,16	27,1±5,35	27,4±6,1	25,8±6,14
3-metilbutanol (mg ·L ⁻¹)	81,75±13,08	108,5±7,70	113,9±5,51	111,6±10,4	116,5±3,53
Acetato de etilo (mg ·L ⁻¹)	16,8±5,37	17,1±4,31	19,1±4,14	18,0±4,24	16,3±3,25
Lactato de etilo (mg ·L ⁻¹)	1,50±0,07	2,30±0,19	0,80±0,07	1,20±0,14	1,10±0,21
Hexanoato de etilo (mg ·L ⁻¹)	0,30±0,06	0,20±0,05	0,30±0,06	0,20±0,00	0,20±0,06
Octanoato de etilo (mg ·L ⁻¹)	0,70±0,11	0,90±0,00	0,40±0,07	0,70±0,11	0,50±0,18
Decanoato de etilo (mg ·L ⁻¹)	0,80±0,05	1,10±0,05	1,00±0,05	1,00±0,02	1,10±0,06
Succinato de dietilo (mg ·L ⁻¹)	0,30±0,11	0,70±0,15	0,60±0,16	1,00±0,13	0,70±0,10

Apéndice III.- Compuestos aromáticos en los vinos jóvenes obtenidos tras la fermentación con la cepa PDC y los transformantes con los genes *ATF1* y *ATF2*. Los valores numéricos son media de dos experimentos independientes con desviación estándar. El umbral de percepción y la descripción aromática para cada compuesto se especifican en el Apéndice I de esta tesis.

Compuesto	CEPAS			
	PDC	PL	P1	P2
Etanol (°)	13,73 ± 0,29	14,13 ± 0,57	14,02 ± 0,45	14,06 ± 0,19
Acidez volátil (g · L ⁻¹ de acético)	0,61 ± 0,02	0,65 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,61 ± 0,02
Glicerol (g · L ⁻¹)	8,92 ± 0,28	8,52 ± 0,10	8,89 ± 0,29	8,48 ± 0,10
Azúcar residual (mg · L ⁻¹)	3,38 ± 0,97	4,76 ± 1,90	1,18 ± 0,20	1,46 ± 0,36
Acetaldehído (mg · L ⁻¹)	41,00 ± 9,19	28,00 ± 6,36	31,00 ± 3,54	36,00 ± 2,83
Acetoína (mg · L ⁻¹)	1,50 ± 0,07	1,60 ± 0,08	1,10 ± 0,21	1,40 ± 0,21
Dietil acetal (mg · L ⁻¹)	1,00 ± 0,21	0,70 ± 0,28	0,20 ± 0,02	0,10 ± 0,05
Metanol (mg · L ⁻¹)	46,00 ± 2,12	43,00 ± 2,05	43,00 ± 0,71	44,00 ± 0,71
N-propanol (mg · L ⁻¹)	14,00 ± 2,83	18,00 ± 0,91	12,00 ± 2,12	15,00 ± 1,89
Isobutanol (mg · L ⁻¹)	47,00 ± 1,21	62,00 ± 0,89	40,00 ± 3,56	45,00 ± 1,56
Butanol (mg · L ⁻¹)	0,30 ± 0,05	0,30 ± 0,02	0,10 ± 0,01	0,30 ± 0,02
Hexanol (mg · L ⁻¹)	0,90 ± 0,01	0,90 ± 0,07	0,10 ± 0,01	1,00 ± 0,06
2-Fenil Etanol (mg · L ⁻¹)	18,00 ± 0,35	17,50 ± 1,06	31,50 ± 1,03	29,20 ± 1,84
2-metilbutanol (mg · L ⁻¹)	19,00 ± 1,41	21,00 ± 1,24	23,00 ± 0,71	22,00 ± 1,78
3-metilbutanol (mg · L ⁻¹)	105,00 ± 2,12	108,00 ± 4,25	72,00 ± 5,49	84,00 ± 6,57
Acetato de etilo (mg · L ⁻¹)	10,00 ± 0,71	9,00 ± 0,71	58,00 ± 4,06	15,00 ± 0,45
Lactato de etilo (mg · L ⁻¹)	1,10 ± 0,09	0,70 ± 0,08	1,20 ± 0,07	1,30 ± 0,04
Hexanoato de etilo (mg · L ⁻¹)	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,07
Octanoato de etilo (mg · L ⁻¹)	0,30 ± 0,01	0,30 ± 0,07	0,40 ± 0,07	0,60 ± 0,07
Decanoato de etilo (mg · L ⁻¹)	0,70 ± 0,01	0,70 ± 0,01	0,80 ± 0,01	0,80 ± 0,01
Succinato de dietilo (mg · L ⁻¹)	0,40 ± 0,14	0,20 ± 0,07	0,30 ± 0,07	0,40 ± 0,07
Laurato de Etilo (mg · L ⁻¹)	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,07
Hexil Acetato (mg · L ⁻¹)	3,70 ± 0,21	3,40 ± 0,61	7,20 ± 0,78	8,30 ± 0,35
Octil Acetato (mg · L ⁻¹)	0,50 ± 0,07	0,40 ± 0,04	0,80 ± 0,07	0,70 ± 0,14
Fenil Acetato (mg · L ⁻¹)	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	2,70 ± 0,20	1,00 ± 0,04

Apéndice IV.- Compuestos aromáticos medidos en los vinos jóvenes obtenidos tras la fermentación con la cepa PDC y los derivados resistentes a PFP transformantes con los genes *ATF1* y *ATF2*. Los valores numéricos son media de dos experimentos independientes con desviación estándar. El umbral de percepción y la descripción aromática para cada compuesto se especifican en el Apéndice I de esta tesis.

Compuesto	CEPAS						
	PDC	P2.1	P6.1	P2.1.1	P6.1.1	P2.1.2	P6.1.2
Etanol (°)	13,33 ± 0,29	13,73 ± 0,46	13,95 ± 0,65	13,88 ± 0,07	13,60 ± 0,03	13,91 ± 0,16	13,63 ± 0,10
Acidez volátil (g ·L ⁻¹ de acético)	0,61 ± 0,02	0,50 ± 0,02	0,57 ± 0,02	0,40 ± 0,03	0,43 ± 0,01	0,46 ± 0,02	0,53 ± 0,02
Glicerol (g ·L ⁻¹)	8,92 ± 0,28	9,16 ± 0,24	9,01 ± 0,09	9,63 ± 0,19	9,30 ± 0,25	9,30 ± 0,28	8,89 ± 0,09
Azúcar residual (mg ·L ⁻¹)	3,38 ± 0,97	2,71 ± 0,18	2,81 ± 0,44	2,42 ± 1,38	2,21 ± 1,05	2,62 ± 1,04	2,20 ± 0,40
Acetaldehido (mg ·L ⁻¹)	41,00 ± 9,19	37,00 ± 4,24	34,00 ± 2,12	32,00 ± 1,41	30,00 ± 4,24	35,50 ± 2,12	30,50 ± 0,71
Acetoína (mg ·L ⁻¹)	1,50 ± 0,07	0,60 ± 0,13	1,10 ± 0,07	1,05 ± 0,07	1,20 ± 0,14	0,95 ± 0,07	1,25 ± 0,07
Dietil acetil (mg ·L ⁻¹)	1,00 ± 0,21	0,30 ± 0,07	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,14	0,10 ± 0,14	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Metanol (mg ·L ⁻¹)	46,00 ± 2,12	43,00 ± 0,71	44,00 ± 0,71	45,00 ± 1,21	46,00 ± 2,83	42,50 ± 0,71	44,50 ± 0,71
N-propanol (mg ·L ⁻¹)	14,00 ± 2,83	19,00 ± 2,95	15,00 ± 2,83	14,00 ± 2,83	11,00 ± 1,41	14,00 ± 1,41	14,00 ± 0,71
Isobutanol (mg ·L ⁻¹)	47,00 ± 1,21	61,00 ± 1,85	65,00 ± 2,83	46,50 ± 0,71	61,00 ± 1,41	58,00 ± 2,83	63,50 ± 6,33
Butanol (mg ·L ⁻¹)	0,30 ± 0,05	0,40 ± 0,13	0,50 ± 0,07	0,60 ± 0,14	0,55 ± 0,12	0,90 ± 0,10	1,00 ± 0,12
Hexanol (mg ·L ⁻¹)	0,90 ± 0,01	0,80 ± 0,07	0,80 ± 0,01	0,05 ± 0,01	0,40 ± 0,14	0,80 ± 0,01	0,90 ± 0,04
2-Fenil Etanol (mg ·L ⁻¹)	18,00 ± 0,35	309,00 ± 19,62	320,10 ± 20,85	209,50 ± 20,97	234,65 ± 14,07	281,50 ± 6,22	304,10 ± 7,64
2-metilbutanol (mg ·L ⁻¹)	19,00 ± 1,41	27,00 ± 2,83	27,00 ± 0,07	21,50 ± 0,71	32,00 ± 1,41	29,00 ± 0,71	31,00 ± 0,71
3-metilbutanol(mg ·L ⁻¹)	105,00 ± 2,12	114,00 ± 9,70	116,00 ± 1,41	60,00 ± 2,83	125 ± 1,41	96,00 ± 1,41	138,00 ± 5,66
Acetato de etilo (mg ·L ⁻¹)	10,00 ± 0,71	10,00 ± 0,94	11,00 ± 0,71	80,50 ± 7,78	77,00 ± 1,41	18,50 ± 0,71	13,00 ± 0,14
Lactato de etilo (mg ·L ⁻¹)	1,10 ± 0,09	0,70 ± 0,14	0,50 ± 0,14	0,75 ± 0,07	1,15 ± 0,21	0,65 ± 0,07	1,25 ± 0,14
Hexanoato de etilo (mg ·L ⁻¹)	0,10 ± 0,01	0,40 ± 0,14	0,45 ± 0,07	0,80 ± 0,07	0,50 ± 0,07	0,70 ± 0,14	0,60 ± 0,01
Octanoato de etilo (mg ·L ⁻¹)	0,30 ± 0,01	0,40 ± 0,01	0,30 ± 0,07	0,50 ± 0,07	0,60 ± 0,14	0,45 ± 0,07	0,40 ± 0,04
Decanoato de etilo (mg ·L ⁻¹)	0,70 ± 0,01	0,70 ± 0,07	0,80 ± 0,07	0,90 ± 0,01	0,90 ± 0,01	0,95 ± 0,04	0,90 ± 0,07
Succinato de dietilo (mg ·L ⁻¹)	0,40 ± 0,14	0,30 ± 0,01	0,40 ± 0,07	0,45 ± 0,07	0,50 ± 0,14	0,45 ± 0,07	0,50 ± 0,04
Laurato de Etilo (mg ·L ⁻¹)	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,20 ± 0,01	0,25 ± 0,07	0,20 ± 0,01	0,25 ± 0,01
Hexil Acetato (mg ·L ⁻¹)	3,70 ± 0,21	1,90 ± 0,75	2,30 ± 0,23	6,70 ± 0,42	9,35 ± 1,37	3,25 ± 0,78	5,10 ± 1,14
Octil Acetato (mg ·L ⁻¹)	0,50 ± 0,07	0,80 ± 0,01	0,60 ± 0,07	1,55 ± 0,21	1,35 ± 0,21	0,90 ± 0,14	0,95 ± 0,07
Fenetil Acetato (mg ·L ⁻¹)	0,20 ± 0,01	2,40 ± 0,21	2,60 ± 1,77	83,40 ± 5,94	70,45 ± 3,49	4,60 ± 0,28	4,95 ± 0,21

Bibliografía

- Abbott DA, Suir E, Duong GH, de Hulster E, Pronk JT, van Maris AJ (2009) Catalase overexpression reduces lactic acid-induced oxidative stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **75**: 2320-2325
- Aguilera F, Peinado RA, Millan C, Ortega JM, Mauricio JC (2006) Relationship between ethanol tolerance, H⁺-ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. *Int J Food Microbiol* **110**: 34-42
- Alexandre H, Ansanay-Galeote V, Dequin S, Blondin B (2001) Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **498**: 98-103
- Alexandre H, Plourde L, Charpentier C, Francois J (1998) Lack of correlation between trehalose accumulation, cell viability and intracellular acidification as induced by various stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **144 (Pt 4)**: 1103-1111
- Alves SL, Jr., Herberts RA, Hollatz C, Trichez D, Miletto LC, de Araujo PS, Stambuk BU (2008) Molecular analysis of maltotriose active transport and fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* reveals a determinant role for the *AGT1* permease. *Appl Environ Microbiol* **74**: 1494-1501
- Aranda A, del Olmo ML (2004) Exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to acetaldehyde induces sulfur amino acid metabolism and polyamine transporter genes, which depend on Met4p and Haa1p transcription factors, respectively. *Appl Environ Microbiol* **70**: 1913-1922
- Aranda A, del Olmo MI M (2003) Response to acetaldehyde stress in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* involves a strain-dependent regulation of several ALD genes and is mediated by the general stress response pathway. *Yeast* **20**: 747-759
- Aranda A, Querol A, del Olmo M (2002) Correlation between acetaldehyde and ethanol resistance and expression of HSP genes in yeast strains isolated during the biological aging of sherry wines. *Arch Microbiol* **177**: 304-312
- Arapitsas P, Antonopoulos A, Stefanou E, Dourtoglou VG (2004) Artificial aging of wines using oak chips. *Food Chemistry* **86**: 563-570
- Auesukaree C, Damnernsawad A, Kruatrachue M, Pokethitiyook P, Boonchird C, Kaneko Y, Harashima S (2009) Genome-wide identification of genes involved in tolerance to various environmental stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Genet* **50**: 301-310
- Avery AM, Avery SV (2001) *Saccharomyces cerevisiae* expresses three phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidases. *J Biol Chem* **276**: 33730-33735
- Bakker BM, Overkamp KM, van Maris AJ, Kotter P, Luttik MA, van Dijken JP, Pronk JT (2001) Stoichiometry and compartmentation of NADH metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **25**: 15-37
- Barbosa C, Falco V, Mendes-Faia A, Mendes-Ferreira A (2009) Nitrogen addition influences formation of aroma compounds, volatile acidity and ethanol in nitrogen deficient media fermented by *Saccharomyces cerevisiae* wine strains. *J Biosci Bioeng* **108**: 99-104

- Barja G (1999) Mitochondrial oxygen radical generation and leak: sites of production in states 4 and 3, organ specificity, and relation to aging and longevity. *J Bioenerg Biomembr* **31**: 347-366
- Barrales RR, Jiménez J, Ibeas JI (2008) Identification of novel activation mechanisms for *FLO11* regulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **178**: 145-156
- Baudin A, Ozier-Kalogeropoulos O, Denouel A, Lacroute F, Cullin C (1993) A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* **21**: 3329-3330
- Baumes R, Cordonnier R, Nitz S, Drawert F (1986) Identification and determination of volatile constituents in wines from different vine cultivars. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **37**: 927-943
- Beltran G, Novo M, Guillamon JM, Mas A, Rozes N (2008) Effect of fermentation temperature and culture media on the yeast lipid composition and wine volatile compounds. *Int J Food Microbiol* **121**: 169-177
- Benítez T, Codón AC (2002) Genetic diversity of yeasts in wine production. In *Applied mycology and biotechnology*, Khachatourians GG, Arora DK (eds), Vol. 2, pp 19-44. Amsterdam: Elsevier Science B. V.
- Benitez T, Martínez P, Codon AC (1996) Genetic constitution of industrial yeast. *Microbiología* **12**: 371-384
- Benítez T, Rincón AM, Codón AC (2009) Yeasts associated with production of fortified wines. In *Yeasts in the production of wines*, Romano A, Fleet GH (eds). En prensa: Springer
- Berlanga TM, Peinado R, Millán C, Mauricio JC, Ortega JM (2004) Influence of Blending on the Content of Different Compounds in the Biological Aging of Sherry Dry Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 2577-2581
- Betz C, Schlenstedt G, Bailer SM (2004) Asr1p, a novel yeast ring/PHD finger protein, signals alcohol stress to the nucleus. *J Biol Chem* **279**: 28174-28181
- Bhattacharjee JK (1983) *The lysine biosynthesis in Eukaryotes*, US: Addison Wesley Publishing Co.
- Birch RM, Walker GM (2000) Influence of magnesium ions on heat shock and ethanol stress responses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Enzyme Microb Technol* **26**: 678-687
- Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-254
- Braus GH (1991) Aromatic amino acid biosynthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for the regulation of a eukaryotic biosynthetic pathway. *Microbiol Rev* **55**: 349-370
- Bravo-Abad F (1986) Crianza biológica de vino: Procedimiento tradicional de vinos finos de D.O. Jerez y D.O. Montilla-Moriles. *Enología y Enotecnia*: 15-19

- Budroni M, Roggio T, Pinna G, Pretti L, Farris GA (1995) Which factors favour the formation of a biofilm by *Saccharomyces cerevisiae*. In *International Conference in Yeast Genetics and Molecular Biology*.
- Budroni M, Zara S, Zara G, Pirino G, Mannazzu I (2005) Peculiarities of flor strains adapted to Sardinian sherry-like wine ageing conditions. *FEMS Yeast Res* **5**: 951-958
- Cardazzo B, Minuzzo S, Sartori G, Grapputo A, Carignani G (1998) Evolution of mitochondrial DNA in yeast: gene order and structural organization of the mitochondrial genome of *Saccharomyces uvarum*. *Curr Genet* **33**: 52-59
- Cartwright CP, Juroszek J, Beavan MJ, Ruby FMS, de Morais SMF, Rose AH (1986) Ethanol dissipates proton-motive force across the plasma membrane of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol*: 369-377
- Castrejon F, Benitez T (2000) *Mejora de cepas de Saccharomyces cerevisiae utilizables en la elaboración de vinos de Jerez*, Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Castrejón F, Codón AC, Cubero B, Benítez T (2002) Acetaldehyde and ethanol are responsible for mitochondrial DNA (mtDNA) restriction fragment length polymorphism (RFLP) in flor yeasts. *Syst Appl Microbiol* **25**: 462-467
- Cauet G, Degryse E, Ledoux C, Spagnoli R, Achstetter T (1999) Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism. *Eur J Biochem* **261**: 317-324
- Codón AC, Benítez T (1995) Variability of the physiological features and of the nuclear and mitochondrial genomes of bakers' yeasts. *Syst Appl Microbiol* **18**: 343-352
- Codón AC, Benítez T, Korhola M (1998) Chromosomal polymorphism and adaptation to specific industrial environments of *Saccharomyces* strains. *Appl Microbiol Biotechnol* **49**: 154-163
- Codón AC, Gasent-Ramirez JM, Benitez T (1995) Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts. *Appl Environ Microbiol* **61**: 630-638
- Codón AC, Rincón AM, Moreno-Mateos MA, Delgado-Jarana J, Rey M, Limón C, Rosado IV, Cubero B, Penate X, Castrejon F, Benitez T (2003) New *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast displaying enhanced resistance to freezing. *J Agric Food Chem* **51**: 483-491
- Costa V, Amorim MA, Reis E, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P (1997) Mitochondrial superoxide dismutase is essential for ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* in the post-diauxic phase. *Microbiology* **143**: 1649-1656
- Costa V, Moradas-Ferreira P (2001) Oxidative stress and signal transduction in *Saccharomyces cerevisiae*: insights into ageing, apoptosis and diseases. *Mol Aspects Med* **22**: 217-246

- Costa V, Reis E, Quintanilha A, Moradas-Ferreira P (1993) Acquisition of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the key role of the mitochondrial superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* **300**: 608-614
- Chandler M, Stanley GA, Rogers P, Chambers PJ (2004) A genomic approach to defining the ethanol stress response in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol*: 427-454
- Charpentier C, Colin A, Alais A, Legras JL (2009) French Jura flor yeasts: genotype and technological diversity. *Antonie Van Leeuwenhoek* **95**: 263-273
- Chaves M, Zea L, Moyano L, Medina M (2007) Changes in Color and Odorant Compounds during Oxidative Aging of Pedro Ximenez Sweet Wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **55**: 3592-3598
- Delneri D, Tomlin GC, Wixon JL, Hutter A, Sefton M, Louis EJ, Oliver SG (2000) Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-loxP system. *Gene* **252**: 127-135
- Dequin S (2001) The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **56**: 577-588
- DeRisi JL, Iyer VR, Brown PO (1997) Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* **278**: 680-686
- Díaz Alonso AL (1989) Técnicas de crianza de los vinos generosos andaluces. *Alimentación: Equipos y Tecnología*: 61-64
- Dickinson JR, Harrison SJ, Dickinson JA, Hewlins MJ (2000) An investigation of the metabolism of isoleucine to active Amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 10937-10942
- Dickinson JR, Harrison SJ, Hewlins MJ (1998) An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**: 25751-25756
- Dickinson JR, Lanterman MM, Danner DJ, Pearson BM, Sanz P, Harrison SJ, Hewlins MJ (1997) A ¹³C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **272**: 26871-26878
- Dickinson JR, Salgado LE, Hewlins MJ (2003) The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **278**: 8028-8034
- Divol B, Miot-Sertier C, Lonvaud-Funel A (2006) Genetic characterization of strains of *Saccharomyces cerevisiae* responsible for 'refermentation' in Botrytis-affected wines. *J Appl Microbiol* **100**: 516-526
- Do TQ, Schultz JR, Clarke CF (1996) Enhanced sensitivity of ubiquinone-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae* to products of autoxidized polyunsaturated fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 7534-7539
- Domecq B (1989) Sherry: State of art on a very special fermentation product. In *Proc. XIII Int. Symp. Yeasts*, pp 15-35. Belgium

- Douglas LM, Li L, Yang Y, Dranginis AM (2007) Expression and characterization of the flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein with homotypic properties of adhesion. *Eukaryot Cell* **6**: 2214-2221
- Du X, Takagi H (2007) N-Acetyltransferase Mpr1 confers ethanol tolerance on *Saccharomyces cerevisiae* by reducing reactive oxygen species. *Appl Microbiol Biotechnol* **75**: 1343-1351
- Dueñas-Sánchez R, Codon AC, Rincon AM, Benitez T (2010) Increased biomass production of industrial bakers' yeasts by overexpression of Hap4 gene. *Int J Food Microbiol* **143**: 150-160
- Dueñas-Sánchez R, Codon AC, Benitez T (2010) *Caracterización y mejora de levaduras panaderas*. Tesis Doctoral Universidad de Sevilla.
- Dufour JP, Verstrepen KJ, Derdelinckx G (2003) Brewing yeast. In *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*, Boekhout T, Robert V (eds), pp 347-388. Cambridge: Woodhead Pub. ; Boca Raton : CRC Press
- Espinazo-Romeu M, Cantoral JM, Matallana E, Aranda A (2008) Btn2p is involved in ethanol tolerance and biofilm formation in flor yeast. *FEMS Yeast Res* **8**: 1127-1136
- Esteve-Zarzoso B, Fernández-Espinar MT, Querol A (2004) Authentication and identification of *Saccharomyces cerevisiae* 'flor' yeast races involved in sherry ageing. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**: 151-158
- Esteve-Zarzoso B, Peris-Torán MJ, García-Maiquez E, Uruburu F, Querol A (2001) Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines. *Appl Environ Microbiol* **67**: 2056-2061
- Estruch F (2000) Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast. *FEMS Microbiol Rev* **24**: 469-486
- Etschmann, Bluemke, Sell, Schrader (2002) Biotechnological production of 2-phenylethanol. *Applied Microbiology and Biotechnology* **59**: 1-8
- Fabrizio P, Liou LL, Moy VN, Diaspro A, Valentine JS, Gralla EB, Longo VD (2003) SOD2 functions downstream of Sch9 to extend longevity in yeast. *Genetics* **163**: 35-46
- Fahrasmane, Ganou P (1998) Microbial flora of rum fermentation media. *Journal of Applied Microbiology* **84**: 921-928
- Fang J, Beattie DS (2003) External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radic Biol Med* **34**: 478-488
- Fernández-Espinar MT, Barrio E, Querol A (2003) Analysis of the genetic variability in the species of the *Saccharomyces sensu stricto* complex. *Yeast* **20**: 1213-1226
- Fernández-Espinar MT, Esteve-Zarzoso B, Querol A, Barrio E (2000) RFLP analysis of the ribosomal internal transcribed spacers and the 5.8S rRNA gene region of the genus

- Saccharomyces*: a fast method for species identification and the differentiation of flor yeasts. *Antonie Van Leeuwenhoek* **78**: 87-97
- Fidalgo M, Barrales RR, Ibeas JI, Jiménez J (2006) Adaptive evolution by mutations in the *FLO11* gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 11228-11233
- Fleet GH (1990) Yeasts in dairy products. *J Appl Bacteriol* **68**: 199-211
- Fleet GH (1993) *Wine microbiology and biotechnology*, Chur ; Reading: Harwood Academic Publishers.
- Fleet GH (1998) Microbiology of alcoholic beverages. In *Microbiology of fermented foods*. Wood BJB (ed), 2nd ed. edn, pp 217-262. London: Blackie Academic & Professional
- Fleet GH (2003) Yeast interactions and wine flavour. *Int J Food Microbiol* **86**: 11-22
- Fleet GH (2007) Wine. In *Food microbiology : fundamentals and frontiers*, Doyle MP, Beuchat LR (eds), 3rd ed. edn, pp 863-890. Washington, D.C.: ASM Press
- Frohlich-Wyder MT (2003) Yeast in dairy products. In *Yeasts in food : beneficial and detrimental aspects*, Boekhout T, Robert V (eds), pp 209-237. Cambridge: Woodhead Pub. ; Boca Raton : CRC Press
- Fujii T, Kobayashi O, Yoshimoto H, Furukawa S, Tamai Y (1997) Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Appl Environ Microbiol* **63**: 910-915
- Fujii T, Nagasawa N, Iwamatsu A, Bogaki T, Tamai Y, Hamachi M (1994) Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl Environ Microbiol* **60**: 2786-2792
- Fujii T, Yoshimoto H, Nagasawa N, Bogaki T, Tamai Y, Hamachi M (1996) Nucleotide sequences of alcohol acetyltransferase genes from lager brewing yeast, *Saccharomyces carlsbergensis*. *Yeast* **12**: 593-598
- Fujiwara D, Kobayashi O, Yoshimoto H, Harashima S, Tamai Y (1999) Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* ATF1 gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast* **15**: 1183-1197
- Fujiwara D, Yoshimoto H, Sone H, Harashima S, Tamai Y (1998) Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, *ATF1* and delta-9 fatty acid desaturase gene, *OLE1* by unsaturated fatty acids. *Yeast* **14**: 711-721
- Fukuda K, Asano K, Ouchi K, Takasawa S (1992) Feedback-insensitive mutation of 3-deoxy-d-arabino-hepturosonate-7-phosphate synthase caused by a single nucleotide substitution of *ARO4* structural gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **74**: 117-119
- Fukuda K, Watanabe H, Asano K, Ueda H, Ohta S (1990) Breeding of brewing yeast producing a large amount of β -Phenylethyl Alcohol and β -Phenylethyl Acetate. *Agric Biol Chem*: 269-271

- Fukuda K, Watanabe M, Asano K, Ouchi K, Takasawa S (1991a) Isolation and genetic study of p-fluoro-DL-phenylalanine-resistant mutants overproducing beta-phenethyl-alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **20**: 449-452
- Fukuda K, Watanabe M, Asano K, Ouchi K, Takasawa S (1991b) A mutated *ARO4* gene for feedback-resistant DAHP synthase which causes both o-fluoro-DL-phenylalanine resistance and beta-phenethyl-alcohol overproduction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **20**: 453-456
- Fukuda K, Yamamoto N, Kiyokawa Y, Yanagiuchi T, Wakai Y, Kitamoto K, Inoue Y, Kimura A (1998) Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Appl Environ Microbiol* **64**: 4076-4078
- Furukawa Y, Torres AS, O'Halloran TV (2004) Oxygen-induced maturation of *SOD1*: a key role for disulfide formation by the copper chaperone CCS. *EMBO J* **23**: 2872-2881
- Gales G, Penninckx M, Block JC, Leroy P (2008) Role of glutathione metabolism status in the definition of some cellular parameters and oxidative stress tolerance of *Saccharomyces cerevisiae* cells growing as biofilms. *FEMS Yeast Res* **8**: 667-675
- Gan ZR (1991) Yeast thioredoxin genes. *J Biol Chem* **266**: 1692-1696
- Garay-Arroyo A, Lledias F, Hansberg W, Covarrubias AA (2003) Cu,Zn-superoxide dismutase of *Saccharomyces cerevisiae* is required for resistance to hyperosmosis. *FEBS Lett* **539**: 68-72
- García Maiquez E (1995) Sherry wine microorganisms. *Microbiologia* **11**: 51-58
- Garde-Cerdan T, Lorenzo C, Lara JF, Pardo F, Ancin-Azpilicueta C, Salinas MR (2009) Study of the evolution of nitrogen compounds during grape ripening. application to differentiate grape varieties and cultivated systems. *J Agric Food Chem* **57**: 2410-2419
- Gasent-Ramirez JM, Benitez T (1997) Lysine-overproducing mutants of *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast isolated in continuous culture. *Appl Environ Microbiol* **63**: 4800-4806
- Gasent-Ramírez JM, Benítez T (1997) *Mejora genética del rendimiento y de las propiedades nutritivas de las levaduras de panadería* Sevilla: Universidad de Sevilla.
- Gietz RD, Woods RA (2002) Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Methods Enzymol* **350**: 87-96
- Gil JV, Manzanares P, Genoves S, Valles S, Gonzalez-Candelas L (2005) Over-production of the major exoglucanase of *Saccharomyces cerevisiae* leads to an increase in the aroma of wine. *Int J Food Microbiol* **103**: 57-68
- Giudici P, Zambonelli C, Kunkee RE (1993) Increased Production of n-Propanol in Wine by Yeast Strains Having an Impaired Ability to Form Hydrogen Sulfide. *Am J Enol Vitic* **44**: 17-21

- Glover JR, Lindquist S (1998) Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell* **94**: 73-82
- Gobbetti M, Cagno RD, De Angelis M (2010) Functional microorganisms for functional food quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* **50**: 716-727
- Gong Y, Kakihara Y, Krogan N, Greenblatt J, Emili A, Zhang Z, Houry WA (2009) An atlas of chaperone-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*: implications to protein folding pathways in the cell. *Mol Syst Biol* **5**: 275
- Goñi DT, Azpilicueta CA (1999) Use of Nitrogen Compounds in Spontaneous and Inoculated Wine Fermentations. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **47**: 4018-4024
- Grant CM (2001) Role of the glutathione/glutaredoxin and thioredoxin systems in yeast growth and response to stress conditions. *Mol Microbiol* **39**: 533-541
- Guadagni DG, Buttery RG, Okano S, Burr HK (1963) Additive Effect of Sub-Threshold Concentrations of Some Organic Compounds Associated with Food Aromas. *Nature* **200**: 1288-1289
- Guijo S, Mauricio JC, Salmon JM, Ortega JM (1997) Determination of the relative ploidy in different *Saccharomyces cerevisiae* strains used for fermentation and 'flor' film ageing of dry sherry-type wines. *Yeast* **13**: 101-117
- Guldener U, Heck S, Fielder T, Beinhauer J, Hegemann JH (1996) A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519-2524
- Hallsworth JE, Nomura Y, Iwahara M (1998) Ethanol-induced water stress and fungal growth. *Journal of Fermentation and Bioengineering* **86**: 451-456
- Hammes WP, Brandt MJ, Francis KL, Rosenheim J, Seitter MFH, Vogelmann SA (2005) Microbial ecology of cereal fermentations. *Trends in Food Science & Technology* **16**: 4-11
- Hanya Y, Nakadai T (2003) Yeast and soy products. In *Yeasts in food: beneficial and detrimental aspects*, Boekhout T, Robert V (eds), pp 413-428. Cambridge: Woodhead Pub. ; Boca Raton : CRC Press
- Harris N, Bachler M, Costa V, Mollapour M, Moradas-Ferreira P, Piper PW (2005) Overexpressed Sod1p acts either to reduce or to increase the lifespans and stress resistance of yeast, depending on whether it is Cu(2+)-deficient or an active Cu,Zn-superoxide dismutase. *Aging Cell* **4**: 41-52
- Hazelwood LA, Daran JM, van Maris AJ, Pronk JT, Dickinson JR (2008) The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. *Appl Environ Microbiol* **74**: 2259-2266
- Hedbacker K, Carlson M (2008) SNF1/AMPK pathways in yeast. *Front Biosci* **13**: 2408-2420

- Helmstaedt K, Strittmatter A, Lipscomb WN, Braus GH (2005) Evolution of 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase-encoding genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**: 9784-9789
- Herraiz T, Ough CS (1993) Formation of Ethyl Esters of Amino Acids by Yeasts During the Alcoholic Fermentation of Grape Juice. *Am J Enol Vitic* **44**: 41-48
- Herrero E, Ros J, Belli G, Cabisco E (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 1217-1235
- Hinnebusch AG (2005) Translational regulation of *GCN4* and the general amino acid control of yeast. *Annu Rev Microbiol* **59**: 407-450
- Houtman AC, Marais J, Du Plessis CS (1980) Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and the aroma composition of wines. Grape maturity, sugar, inoculum concentration, aeration, juice turbidity and ergosterol. *Vitis*: 37-54
- Hu XH, Wang MH, Tan T, Li JR, Yang H, Leach L, Zhang RM, Luo ZW (2007) Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **175**: 1479-1487
- Huang C, Jr., Lee S-L, Chou C-C (2001) Production of 2-phenylethanol, a flavor ingredient, by *Pichia fermentans* L-5 under various culture conditions. *Food Research International* **34**: 277-282
- Huang G, Dougherty SD, Erdman SE (2009) Conserved WCPL and CX4C domains mediate several mating adhesin interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **182**: 173-189
- Huang Z, Ough CS (1991) Amino Acid Profiles of Commercial Grape Juices and Wines. *Am J Enol Vitic* **42**: 261-267
- Ibeas JI, Jimenez J (1996) Genomic complexity and chromosomal rearrangements in wine-laboratory yeast hybrids. *Curr Genet* **30**: 410-416
- Ibeas JI, Lozano I, Perdigonés F, and Jiménez J (1996). Detection of *Dekkera-Brettanomyces* strains in sherry by a nested PCR method. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 998-1003.
- Ibeas JI, Lozano I, Perdigonés F, and Jiménez J (1997) Effects of ethanol and temperature on the biological aging of Sherry wines. *Am. J. Enol. Vitic.* **48**, 71-74.
- Ibeas JI, Jiménez J (1997) Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeasts. *Appl Environ Microbiol* **63**: 7-12
- Infante-Viñolo JJ (2002) *Aplicación de métodos de biología molecular para la caracterización y mejora genética de levaduras de flor responsables de la crianza biológica de los vinos de Jerez*, Cádiz: Universidad de Cádiz.
- Infante JJ, Dombek KM, Rebordinos L, Cantoral JM, Young ET (2003) Genome-wide amplifications caused by chromosomal rearrangements play a major role in the adaptive evolution of natural yeast. *Genetics* **165**: 1745-1759

- Inoue T, Wang Y, Jefferies K, Qi J, Hinton A, Forgac M (2005) Structure and regulation of the V-ATPases. *J Bioenerg Biomembr* **37**: 393-398
- Inoue Y, Trevanichi S, Fukuda K, Izawa S, Wakai Y, Kimura A (1997) Roles of Esterase and Alcohol Acetyltransferase on Production of Isoamyl Acetate in *Hansenula mrakii*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 644-649
- Iraqui I, Vissers S, Andre B, Urrestarazu A (1999) Transcriptional induction by aromatic amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **19**: 3360-3371
- Iraqui I, Vissers S, Cartiaux M, Urrestarazu A (1998) Characterisation of *Saccharomyces cerevisiae* ARO8 and ARO9 genes encoding aromatic aminotransferases I and II reveals a new aminotransferase subfamily. *Mol Gen Genet* **257**: 238-248
- Ishigami M, Nakagawa Y, Hayakawa M, Imura Y (2006a) *FLO11* is the primary factor in flor formation caused by cell surface hydrophobicity in wild-type flor yeast. *Biosci Biotechnol Biochem* **70**: 660-666
- Jenson I (1998) Bread and baker's yeast. In *Microbiology of fermented foods*, Wood BJB (ed), 2nd ed. edn, pp 172-198. London: Blackie Academic & Professional
- Jimenez J, Benitez T (1988) Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentrations depends on the mitochondrial genome. *Curr Genet* **13**: 461-469
- Karahalil B, Girard PM, Boiteux S, Dizdaroglu M (1998) Substrate specificity of the Ogg1 protein of *Saccharomyces cerevisiae*: excision of guanine lesions produced in DNA by ionizing radiation- or hydrogen peroxide/metal ion-generated free radicals. *Nucleic Acids Res* **26**: 1228-1233
- Karreman RJ, Dague E, Gaboriaud F, Quiles F, Duval JF, Lindsey GG (2007) The stress response protein Hsp12p increases the flexibility of the yeast *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. *Biochim Biophys Acta* **1774**: 131-137
- Kawai F (2010) The Biochemistry and Molecular Biology of Xenobiotic Polymer Degradation by Microorganisms. *Biosci Biotechnol Biochem*
- Keyzers RA, Boss PK (2010) Changes in the volatile compound production of fermentations made from musts with increasing grape content. *J Agric Food Chem* **58**: 1153-1164
- Kovacs M, Stuparevic I, Mrsa V, Maraz A (2008) Characterization of Ccw7p cell wall proteins and the encoding genes of *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains: relevance for flor formation. *FEMS Yeast Res* **8**: 1115-1126
- Kradolfer P, Niederberger P, Hutter R (1982) Tryptophan degradation in *Saccharomyces cerevisiae*: characterization of two aromatic aminotransferases. *Arch Microbiol* **133**: 242-248
- Krappmann S, Lipscomb WN, Braus GH (2000) Coevolution of transcriptional and allosteric regulation at the chorismate metabolic branch point of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**: 13585-13590

- Kuroda S, Otaka S, Fujisawa Y (1994) Fermentable and nonfermentable carbon sources sustain constitutive levels of expression of yeast triosephosphate dehydrogenase 3 gene from distinct promoter elements. *J Biol Chem* **269**: 6153-6162
- Kurtz S, Rossi J, Petko L, Lindquist S (1986) An ancient developmental induction: heat-shock proteins induced in sporulation and oogenesis. *Science* **231**: 1154-1157
- Lahlali R, Hijri M (2010) Screening, identification and evaluation of potential biocontrol fungal endophytes against *Rhizoctonia solani* AG3 on potato plants. *FEMS Microbiol Lett*
- Lambrechts MG, Bauer FF, Marmur J, Pretorius IS (1996) Muc1, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 8419-8424
- Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Yeast and its importance to wine aroma. A review. *S Afr J Enol Vitic*: 97-129
- Landolfo S, Politi H, Angelozzi D, Mannazzu I (2008) ROS accumulation and oxidative damage to cell structures in *Saccharomyces cerevisiae* wine strains during fermentation of high-sugar-containing medium. *Biochim Biophys Acta* **1780**: 892-898
- Large PJ (1986) Degradation of organic nitrogen compounds by yeasts. *Yeast* **2**: 1-34
- Leao C, van Uden N (1984) Effects of ethanol and other alkanols on the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **26**: 403-405
- Lee SM, Park JW (1998) A yeast mutant lacking thiol-dependent protector protein is hypersensitive to menadione. *Biochim Biophys Acta* **1382**: 167-175
- Legras JL, Merdinoglu D, Cornuet JM, Karst F (2007) Bread, beer and wine: *Saccharomyces cerevisiae* diversity reflects human history. *Mol Ecol* **16**: 2091-2102
- Leitch JM, Jensen LT, Bouldin SD, Outten CE, Hart PJ, Culotta VC (2009) Activation of Cu,Zn-superoxide dismutase in the absence of oxygen and the copper chaperone CCS. *J Biol Chem* **284**: 21863-21871
- Levine RL, Williams JA, Stadtman ER, Shacter E (1994) Carbonyl assays for determination of oxidatively modified proteins. *Methods Enzymol* **233**: 346-357
- Lewis JG, Learmonth RP, Watson K (1995) Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141 (Pt 3)**: 687-694
- Lilly M, Bauer FF, Lambrechts MG, Swiegers JH, Cozzolino D, Pretorius IS (2006) The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast* **23**: 641-659
- Lilly M, Lambrechts MG, Pretorius IS (2000) Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Appl Environ Microbiol* **66**: 744-753

- Liu X, Zhang X, Zhang z (2010) Cu,Zn-superoxide dismutase is required for cell wall structure and for tolerance to cell wall-perturbing agents in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS lett* **584**: 1245-1250
- Lo WS, Dranginis AM (1996) FLO11, a yeast gene related to the STA genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J Bacteriol* **178**: 7144-7151
- Longo VD, Gralla EB, Valentine JS (1996a) Superoxide dismutase activity is essential for stationary phase survival in *Saccharomyces cerevisiae*. Mitochondrial production of toxic oxygen species in vivo. *J Biol Chem* **271**: 12275-12280
- Lucero P, Penalver E, Moreno E, Lagunas R (2000) Internal trehalose protects endocytosis from inhibition by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **66**: 4456-4461
- Lucke FK (1998) Fermented sausages. In *Microbiology of fermented foods*, Wood BJB (ed), Vol. 1, 2nd ed. edn, pp 441-483. London: Blackie Academic & Professional
- Luttik MA, Vuralhan Z, Suir E, Braus GH, Pronk JT, Daran JM (2008) Alleviation of feedback inhibition in *Saccharomyces cerevisiae* aromatic amino acid biosynthesis: quantification of metabolic impact. *Metab Eng* **10**: 141-153
- Ma J, Jin R, Jia X, Dobry CJ, Wang L, Reggiori F, Zhu J, Kumar A (2007) An interrelationship between autophagy and filamentous growth in budding yeast. *Genetics* **177**: 205-214
- Ma M, Liu ZL (2010) Mechanisms of ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **87**: 829-845
- Malcorps P, Cheval JM, Jamail S, Dufour JP (1991) A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Am Soc Brew Chem*: 47-53
- Malcorps P, Dufour JP (1992) Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem* **210**: 1015-1022
- Marais J (1990) Wine aroma composition. *Food Rev*: 18-21
- Marinangeli P, Angelozzi D, Ciani M, Clementi F, Mannazzu I (2004) Minisatellites in *Saccharomyces cerevisiae* genes encoding cell wall proteins: a new way towards wine strain characterisation. *FEMS Yeast Res* **4**: 427-435
- Martínez-Force E, Benítez T (1992) Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. *Current Genetics* **21**: 191-196
- Martínez-Llopis M, Mijares MI, Chirbes R (1992) *Historia del vino español*, Madrid: Vinoselección.
- Martínez C, Cosgaya P, Vasquez C, Gac S, Ganga A (2007) High degree of correlation between molecular polymorphism and geographic origin of wine yeast strains. *J Appl Microbiol* **103**: 2185-2195

- Martínez de la Ossa E, Pérez L, Caro I (1987) Variation of the major volatiles through aging of sherry. *Am J Enol Vitic* **38**: 293-297
- Martínez P, Codón AC, Pérez L, Benítez T (1995) Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast* **11**: 1399-1411
- Martínez P, Pérez L, Benítez T (1997a) Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino sherry wine. *Am J Enol Vitic* **48**: 160-168
- Martínez P, Pérez L, Benítez T (1997b) Factors which affect velum formation by flor yeast isolated from sherry wine. *Syst Appl Microbiol* **20**: 154-157
- Martínez P, Perez Rodriguez L, Benitez T (1997c) Velum Formation by Flor Yeasts Isolated From Sherry Wine. *Am J Enol Vitic* **48**: 55-62
- Martínez P, Valcárcel MJ, González P, Benítez T, Pérez L (1993) Consumo de etanol, glicerina y aminoácidos totales en vinos finos durante la crianza biológica bajo "velo de flor". In *Alimentación: Equipos y Tecnología*, pp 61-65.
- Martínez P, Valcárcel MJ, Pérez L, Benítez T (1998) Metabolism of *Saccharomyces cerevisiae* flor yeasts during fermentation and biological aging of fino sherry: by-products and aroma compounds. *Am J Enol Vitic* **49**: 240-250
- Martorell P, Querol A, Fernández-Espinar MT (2005) Rapid identification and enumeration of *Saccharomyces cerevisiae* cells in wine by real-time PCR. *Appl Environ Microbiol* **71**: 6823-6830
- Mason AB, Dufour JP (2000) Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast* **16**: 1287-1298
- Masuda M, Nishimura K (1971) Branched nonalactones from some *Quercus* species. *Phytochem*: 1401-1402
- Mauricio JC, Moreno JJ, Ortega JM (1997) In Vitro Specific Activities of Alcohol and Aldehyde Dehydrogenases from Two Flor Yeasts during Controlled Wine Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 1967-1971
- Mauricio JC, Moreno JJ, Valero EM, Zea L, Medina M, Ortega JM (1993) Ester formation and specific activities of in vitro alcohol acetyltransferase and esterase by *Saccharomyces cerevisiae* during grape must fermentation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **41**: 2086-2091
- McClellan AJ, Xia Y, Deutschbauer AM, Davis RW, Gerstein M, Frydman J (2007) Diverse cellular functions of the Hsp90 molecular chaperone uncovered using systems approaches. *Cell* **131**: 121-135
- McGovern PE, Hartung U, Radler Vr, Glusker DL, Exner LJ (1997) The beginnings of winemaking and viticulture in the Ancient East and Egypt. *Expedition*: 3-21
- McNabb DS, Pinto I (2005) Assembly of the Hap2p/Hap3p/Hap4p/Hap5p-DNA complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell* **4**: 1829-1839

- Meeusen S, Tieu Q, Wong E, Weiss E, Schieltz D, Yates JR, Nunnari J (1999) Mgm101p is a novel component of the mitochondrial nucleoid that binds DNA and is required for the repair of oxidatively damaged mitochondrial DNA. *J Cell Biol* **145**: 291-304
- Mendes-Ferreira A, Barbosa C, Falco V, Leao C, Mendes-Faia A (2009) The production of hydrogen sulphide and other aroma compounds by wine strains of *Saccharomyces cerevisiae* in synthetic media with different nitrogen concentrations. *J Ind Microbiol Biotechnol* **36**: 571-583
- Meroth CB, Hammes WP, Hertel C (2003) Identification and population dynamics of yeasts in sourdough fermentation processes by PCR-denaturing gradient gel electrophoresis. *Appl Environ Microbiol* **69**: 7453-7461
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L, Cantoral JM (1999) Characterization of yeasts involved in the biological aging of sherry wines. *Lebensm Wiss Technol* **32**: 114-120
- Mesa JJ, Infante JJ, Rebordinos L, Sánchez JA, Cantoral JM (2000) Influence of the yeast genotypes on enological characteristics of sherry wines. *Am J Enol Vitic* **51**: 15-21
- Mishra P, Prasad R (1989) Relationship between ethanol tolerance and fatty acyl composition of *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology* **30**: 294-298
- Molina AM, Swiegers JH, Varela C, Pretorius IS, Agosin E (2007) Influence of wine fermentation temperature on the synthesis of yeast-derived volatile aroma compounds. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 675-687
- Moreira N, Mendes F, Guedes de Pinho P, Hogg T, Vasconcelos I (2008) Heavy sulphur compounds, higher alcohols and esters production profile of *Hanseniaspora uvarum* and *Hanseniaspora guilliermondii* grown as pure and mixed cultures in grape must. *International Journal of Food Microbiology* **124**: 231-238
- Moreno-Mateos MA, Delgado-Jarana J, Codon AC, Benitez T (2007) pH and Pac1 control development and antifungal activity in *Trichoderma harzianum*. *Fungal Genet Biol* **44**: 1355-1367
- Moreno JA, Zea L, Moyano L, Medina M (2005) Aroma compounds as markers of the changes in sherry wines subjected to biological ageing. *Food Control* **16**: 333-338
- Morita Y, Nakamori S, Takagi H (2002) Effect of proline and arginine metabolism on freezing stress of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biosci Bioeng* **94**: 390-394
- Moyano L, Zea L, Moreno J, Medina M (2002) Analytical Study of Aromatic Series in Sherry Wines Subjected to Biological Aging. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 7356-7361
- Moyano L, Zea L, Villafuerte L, Medina M (2009) Comparison of odor-active compounds in sherry wines processed from ecologically and conventionally grown Pedro Ximenez grapes. *J Agric Food Chem* **57**: 968-973
- Mukhtar K, Asgher M, Afghani S, Hussain K, Zia-Ul-Hussain S (2010) Comparative study on two commercial strains of *Saccharomyces cerevisiae* for optimum ethanol production on industrial scale. *J Biomed Biotechnol* **2010**: 419586

- Mumberg D, Muller R, Funk M (1995) Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* **156**: 119-122
- Muñoz D, Peinado R, Medina M, Moreno J (2006) Higher alcohols concentration and its relation with the biological aging evolution. *European Food Research and Technology* **222**: 629-635
- Muñoz D, Peinado RA, Medina M, Moreno J (2005) Biological Aging of Sherry Wines Using Pure Cultures of Two Flor Yeast Strains under Controlled Microaeration. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 5258-5264
- Nagasawa N, Bogaki T, Iwamatsu A, Hamachi M, Kumagai C (1998) Cloning and nucleotide sequence of the alcohol acetyltransferase II gene (ATF2) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. *Biosci Biotechnol Biochem* **62**: 1852-1857
- Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, Shimonaga T, Hattori M, Ashikari T (2009) Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Res* **16**: 115-129
- Natarajan K, Meyer MR, Jackson BM, Slade D, Roberts C, Hinnebusch AG, Marton MJ (2001) Transcriptional profiling shows that Gcn4p is a master regulator of gene expression during amino acid starvation in yeast. *Mol Cell Biol* **21**: 4347-4368
- Naumova ES, Ivannikova Iu V, Naumov GI (2005) Genetic differentiation of the sherry yeasts *Saccharomyces cerevisiae*. *Prikl Biokhim Mikrobiol* **41**: 656-661
- Naumov GI, Turakamen H, Naumova ES, Aho S, Korhola M. (1990) A new family of polymorphic genes in *Saccharomyces cerevisiae*: alpha-galactosidase genes *MEL1-MEL7*. *Mol Gen Genet* **224**: 119-128.
- Naumov GI, Naumova ES, Lantto RA, Louis EJ, Korhola M. (1992) Genetic homology between *Saccharomyces cerevisiae* and its sibling species *S. paradoxus* and *S. bayanus*: electrophoretic karyotypes. *Yeast* **8**:599-612
- Naumov GI, Naumova ES, Antunovics Z, Sipiczki M. (2002) *Saccharomyces bayanus* var. *uvarum* in Tokaj wine-making of Slovakia and Hungary. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**:727-30.
- Nelson NJ (1957) Colorimetric analysis of sugars. *Methods Enzymol* **3**: 85-86
- Nguyen DT, Alarco AM, Raymond M (2001) Multiple Yap1p-binding sites mediate induction of the yeast major facilitator FLR1 gene in response to drugs, oxidants, and alkylating agents. *J Biol Chem* **276**: 1138-1145
- Orrenius S (2007) Reactive oxygen species in mitochondria-mediated cell death. *Drug Metab Rev* **39**: 443-455
- Owsiak A, Bartosz G, Bilinski T (2010) Oxidative stress during aging of the yeast in a stationary culture and its attenuation by antioxidants. *Cell Biol Int* **34**: 731-736

- Palecek SP, Parikh AS, Kron SJ (2000) Genetic analysis reveals that *FLO11* upregulation and cell polarization independently regulate invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **156**: 1005-1023
- Park SG, Cha MK, Jeong W, Kim IH (2000) Distinct physiological functions of thiol peroxidase isoenzymes in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **275**: 5723-5732
- Peinado RA, Moreno J, Medina M, Mauricio JC (2004) Changes in volatile compounds and aromatic series in sherry wine with high gluconic acid levels subjected to aging by submerged flor yeast cultures. *Biotechnol Lett* **26**: 757-762
- Pérez L (1982) Consideraciones técnicas en la elaboración del Jerez. In *II Jornadas universitarias sobre el Jerez*, pp 167-197. Universidad de Cádiz
- Petrov VV, Okorokov LA (1990) Increase of the anion and proton permeability of *Saccharomyces carlsbergensis* plasmalemma by n-alcohols as a possible cause of its de-energization. *Yeast* **6**: 311-318
- Piper PW (1999) Yeast superoxide dismutase mutants reveal a pro-oxidant action of weak organic acid food preservatives. *Free Radic Biol Med* **27**: 1219-1227
- Pirino G, Zara S, Pinna G, Farris GA, Budroni M (2004) Diversity of Y region at HML locus in a *Saccharomyces cerevisiae* strain isolated from a Sardinian wine. *Antonie Van Leeuwenhoek* **85**: 29-36
- Pisarnitskii AF (2001) Formation of Wine Aroma: Tones and Imperfections Caused by Minor Components (Review). *Applied Biochemistry and Microbiology* **37**: 552-560
- Plesset J, Palm C, McLaughlin CS (1982) Induction of heat shock proteins and thermotolerance by ethanol in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **108**: 1340-1345
- Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**: 675-729
- Pronk JT, Yde Steensma H, Van Dijken JP (1996) Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **12**: 1607-1633
- Puig S, Perez-Ortin JE (2000) Expression levels and patterns of glycolytic yeast genes during wine fermentation. *Syst Appl Microbiol* **23**: 300-303
- Puig S, Querol A, Barrio E, Pérez-Ortín JE (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Appl Environ Microbiol* **66**: 2057-2061
- Purevdorj-Gage B, Orr ME, Stoodley P, Sheehan KB, Hyman LE (2007) The role of *FLO11* in *Saccharomyces cerevisiae* biofilm development in a laboratory based flow-cell system. *FEMS Yeast Res* **7**: 372-379
- Querol A, Barrio E, Ramon D (1994) Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation. *Int J Food Microbiol* **21**: 315-323

- Querol A, Bond U (2009) The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiol Lett* **293**: 1-10
- Rachidi N, Barre P, Blondin B (1999) Multiple *Ty*-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **261**: 841-850
- Raha S, Robinson BH (2000) Mitochondria, oxygen free radicals, disease and ageing. *Trends Biochem Sci* **25**: 502-508
- Ramos C, Calderon IL (1992) Overproduction of threonine by *Saccharomyces cerevisiae* mutants resistant to hydroxynorvaline. *Appl Environ Microbiol* **58**: 1677-1682
- Rández-Gil F, Aguilera J, Codon AC, Rincon AM, Estruch F, Prieto JA (2003) Baker's yeast: challenges and future prospects. In *Functional genetics of industrial yeasts*, Winde JHd (ed), pp 360-367. Berlin ; London: Springer
- Rapp A (1998) Volatile flavour of wine: correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung* **42**: 351-363
- Rapp A, Mandery H (1986) Wine Aroma. *Experientia*: 873-884
- Redzepović S, Orlić S, Sikora S, Majdak A, Pretorius IS. (2002) Identification and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces paradoxus* strains isolated from Croatian vineyards. *Lett Appl Microbiol*. **35**:305-10.
- Ristow H, Seyfarth A, Lochmann ER (1995) Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutat Res* **326**: 165-170
- Robinson J (1994) *The Oxford companion to wine*, Oxford: Oxford University Press.
- Rodríguez-Peña JM, García R, Nombela C, Arroyo J (2010) The high-osmolarity glycerol (HOG) and cell wall integrity (CWI) signalling pathways interplay: a yeast dialogue between MAPK routes. *Yeast* **27**: 495-202
- Rojas V, Gil JV, Piñaga F, Manzanares P (2001) Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeasts. *International Journal of Food Microbiology* **70**: 283-289
- Rossouw D, Naes T, Bauer FF (2008) Linking gene regulation and the exo-metabolome: a comparative transcriptomics approach to identify genes that impact on the production of volatile aroma compounds in yeast. *BMC Genomics* **9**: 530-542
- Sa-Correia I, Tenreiro S (2002) The multidrug resistance transporters of the major facilitator superfamily, 6 years after disclosure of *Saccharomyces cerevisiae* genome sequence. *J Biotechnol* **98**: 215-226
- Saerens SM, Verstrepen KJ, Van Laere SD, Voet AR, Van Dijck P, Delvaux FR, Thevelein JM (2006) The *Saccharomyces cerevisiae* EHT1 and EEB1 genes encode novel enzymes with

medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *J Biol Chem* **281**: 4446-4456

Sajbidor J, Grego J (1992) Fatty acid alterations in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol stress. *FEMS Microbiol Lett* **72**: 13-16

Sales K, Brandt W, Rumbak E, Lindsey G (2000) The LEA-like protein HSP 12 in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochim Biophys Acta* **1463**: 267-278

Sambrook J, Russell DW (2001) *Molecular cloning : a laboratory manual*, 3rd edn. Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory Press.

Samelis J, Sofos JN (2003) Yeast in meat and meat products. In *Yeasts in food : beneficial and detrimental aspects*, Boekhout T, Robert V (eds), pp 239-266. Cambridge: Woodhead Pub. ; Boca Raton : CRC Press

Sancho ED, Hernández E, Rodríguez-Navarro A (1986) Presumed sexual isolation in yeast populations during production of sherrylike wine. *Appl Environ Microbiol* **51**: 395-397

Schnappauf G, Hartmann M, Kunzler M, Braus GH (1998) The two 3-deoxy-D-arabino-heptulosonate-7-phosphate synthase isoenzymes from *Saccharomyces cerevisiae* show different kinetic modes of inhibition. *Arch Microbiol* **169**: 517-524

Schreier P (1979) Flavor composition of wines: a review. *CRC Crit Rev Food Sci Nutr* **12**: 59-111

Schuller HJ (2003) Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **43**: 139-160

Schwan RF, Wheals AE (2003) Mixed microbial fermentation of chocolate and coffee. In *Yeasts in food : beneficial and detrimental aspects*, Boekhout T, Robert V (eds), pp 429-449. Cambridge: Woodhead Pub. ; Boca Raton : CRC Press

Schwan RF, Wheals AE (2004) The microbiology of cocoa fermentation and its role in chocolate quality. *Crit Rev Food Sci Nutr* **44**: 205-221

Sherman F (2002) Getting started with yeast. *Methods Enzymol* **350**: 3-41

Sherman F, Fink GR, Hicks JB, Cold Spring Harbor Laboratory. (1986) *Laboratory course manual for methods in yeast genetics*, New York, N.Y.: Cold Spring Harbor Laboratory.

Shima J, Sakata-Tsuda Y, Suzuki Y, Nakajima R, Watanabe H, Kawamoto S, Takano H (2003) Disruption of the CAR1 gene encoding arginase enhances freeze tolerance of the commercial baker's yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 715-718

Shima J, Takagi H (2009) Stress-tolerance of baker's-yeast (*Saccharomyces cerevisiae*) cells: stress-protective molecules and genes involved in stress tolerance. *Biotechnol Appl Biochem* **53**: 155-164

Sipiczki M (2008) Interspecies hybridization and recombination in *Saccharomyces* wine yeasts. *FEMS Yeast Res* **8**: 996-1007

- Somogyi M (1952) Notes on sugar determination. *J Biol Chem* **195**: 19-23
- Stanley D, Bandara A, Fraser S, Chambers PJ, Stanley GA (2010a) The ethanol stress response and ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Appl Microbiol* **109**: 13-24
- Stanley D, Chambers PJ, Stanley GA, Borneman A, Fraser S (2010b) Transcriptional changes associated with ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **88**: 231-239
- Stanley GA, Hobley TJ, Pamment NB (1997) Effect of acetaldehyde on *Saccharomyces cerevisiae* and *Zymomonas mobilis* subjected to environmental shocks. *Biotechnol Bioeng* **53**: 71-78
- Stanley GA, Pamment NB (1993) Transport and intracellular accumulation of acetaldehyde in *saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol Bioeng* **42**: 24-29
- Steels EL, Learmonth RP, Watson K (1994) Stress tolerance and membrane lipid unsaturation in *Saccharomyces cerevisiae* grown aerobically or anaerobically. *Microbiology* **140**: 569-576
- Straver MH, Kijne JW (1996) A rapid and selective assay for measuring cell surface hydrophobicity of brewer's yeast cells. *Yeast* **12**: 207-213
- Suarez-Lepe JA (1997) *Levaduras vínicas, funcionalidad y uso en bodega.*, 1ª Edición, Ediciones Mundi-Prensa, Madrid.
- Swan TM, Watson K (1998) Stress tolerance in a yeast sterol auxotroph: role of ergosterol, heat shock proteins and trehalose. *FEMS Microbiol Lett* **169**: 191-197
- Swiegers JH, Pretorius IS (2005) Yeast modulation of wine flavor. *Adv Appl Microbiol* **57**: 131-175
- Takagi H, Sakai K, Morida K, Nakamori S (2000) Proline accumulation by mutation or disruption of the proline oxidase gene improves resistance to freezing and desiccation stresses in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett* **184**: 103-108
- Takagi H, Takaoka M, Kawaguchi A, Kubo Y (2005) Effect of L-proline on sake brewing and ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 8656-8662
- Tamaki H, Miwa T, Shinozaki M, Saito M, Yun CW, Yamamoto K, Kumagai H (2000) *GPR1* regulates filamentous growth through *FLO11* in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **267**: 164-168
- Teixeira MC, Raposo LR, Mira NP, Lourenco AB, Sa-Correia I (2009) Genome-wide identification of *Saccharomyces cerevisiae* genes required for maximal tolerance to ethanol. *Appl Environ Microbiol* **75**: 5761-5772
- Thammajaruk N, Sriubolmas N, Israngkul D, Meevootisom V, Wiyakrutta S (2010) Optimization of culture conditions for mycoepoxydiene production by *Phomopsis* sp. Hant25. *J Ind Microbiol Biotechnol*

- Thevelein JM (1991) Fermentable sugars and intracellular acidification as specific activators of the RAS-adenylate cyclase signalling pathway in yeast: the relationship to nutrient-induced cell cycle control. *Mol Microbiol* **5**: 1301-1307
- Toogun OA, Dezwaan DC, Freeman BC (2008) The hsp90 molecular chaperone modulates multiple telomerase activities. *Mol Cell Biol* **28**: 457-467
- Turcotte B, Liang XB, Robert F, Soontorngun N (2010) Transcriptional regulation of nonfermentable carbon utilization in budding yeast. *FEMS Yeast Res* **10**: 2-13
- Turrens JF (1997) Superoxide production by the mitochondrial respiratory chain. *Biosci Rep* **17**: 3-8
- Uber-García G (2005) Modificación genética de levaduras vínicas industriales para mejorar la producción de aroma secundario. Tesis Doctoral, Universidad de Valencia. ISBN 84-370-6481-3.
- Urrestarazu A, Vissers S, Iraqui I, Grenson M (1998) Phenylalanine- and tyrosine-auxotrophic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* impaired in transamination. *Mol Gen Genet* **257**: 230-237
- Valero E, Cambon B, Schuller D, Casal M, Dequin S (2007) Biodiversity of *Saccharomyces* yeast strains from grape berries of wine-producing areas using starter commercial yeasts. *FEMS Yeast Res* **7**: 317-329
- van Dyk D, Pretorius IS, Bauer FF (2005) Mss11p is a central element of the regulatory network that controls *FLO11* expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **169**: 91-106
- van Mulders SE, Christianen E, Saerens SM, Daenen L, Verbelen PJ, Willaert R, Verstrepen KJ, Delvaux FR (2009) Phenotypic diversity of Flo protein family-mediated adhesion in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**: 178-190
- van Wyk H, Divol B (2010) Recovery of endo-polygalacturonase activity in wine yeast and its effect on wine aroma. *FEMS Yeast Research* **10**: 58-71
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour JP, Winderickx J, Pretorius IS, Thevelein JM, Delvaux FR (2003a) The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene *ATF1* is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast Res* **4**: 285-296
- Verstrepen KJ, Derdelinckx G, Dufour JP, Winderickx J, Thevelein JM, Pretorius IS, Delvaux FR (2003b) Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *J Biosci Bioeng* **96**: 110-118
- Verstrepen KJ, Klis FM (2006) Flocculation, adhesion and biofilm formation in yeasts. *Mol Microbiol* **60**: 5-15
- Verstrepen KJ, Reynolds TB, Fink GR (2004) Origins of variation in the fungal cell surface. *Nat Rev Microbiol* **2**: 533-540

- Verstrepen KJ, Van Laere SD, Vanderhaegen BM, Derdelinckx G, Dufour JP, Pretorius IS, Winderickx J, Thevelein JM, Delvaux FR (2003c) Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1*, and *ATF2* control the formation of a broad range of volatile esters. *Appl Environ Microbiol* **69**: 5228-5237
- Viana F, Gil JV, Vallés S, Manzanares P (2009) Increasing the levels of 2-phenylethyl acetate in wine through the use of a mixed culture of *Hanseniaspora osmophila* and *Saccharomyces cerevisiae*. *International Journal of Food Microbiology* **135**: 68-74
- Vilanova M, Ugliano M, Varela C, Siebert T, Pretorius IS, Henschke PA (2007) Assimilable nitrogen utilisation and production of volatile and non-volatile compounds in chemically defined medium by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**: 145-157
- Villanueva A, Ramón D, Vallés S, Lluch MA, McCabe AP (2000) Heterologous expression in *Aspergillus nidulans* of a *Trichoderma longibrachiatum* endoglucanase of enological relevance. *J Agric Food Chem* **48**: 951-957
- Vuralhan Z, Luttk MA, Tai SL, Boer VM, Morais MA, Schipper D, Almering MJ, Kotter P, Dickinson JR, Daran JM, Pronk JT (2005) Physiological characterization of the ARO10-dependent, broad-substrate-specificity 2-oxo acid decarboxylase activity of *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **71**: 3276-3284
- Vuralhan Z, Morais MA, Tai SL, Piper MD, Pronk JT (2003) Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Environ Microbiol* **69**: 4534-4541
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1994) New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **10**: 1793-1808
- Walker GM (1998) *Yeast physiology and biotechnology*, Chichester: J. Wiley.
- Walters D, Cowley T (1998) Polyamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae* exposed to ethanol. *Microbiol Res* **153**: 179-184
- Wallace MA, Liou LL, Martins J, Clement MH, Bailey S, Longo VD, Valentine JS, Gralla EB (2004) Superoxide inhibits 4Fe-4S cluster enzymes involved in amino acid biosynthesis. Cross-compartment protection by CuZn-superoxide dismutase. *J Biol Chem* **279**: 32055-32062
- Wieser R, Adam G, Wagner A, Schuller C, Marchler G, Ruis H, Krawiec Z, Bilinski T (1991) Heat shock factor-independent heat control of transcription of the CTT1 gene encoding the cytosolic catalase T of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **266**: 12406-12411
- Wu X, Jiang YW (2008) Overproduction of non-translatable mRNA silences. The transcription of *Ty1* retrotransposons in *S. cerevisiae* via functional inactivation of the nuclear cap-binding complex and subsequent hyperstimulation of the TORC1 pathway. *Yeast* **25**: 327-347
- Yeralan O, Jones JM (1990) Effects in vitro of ethanol and acetaldehyde on natural killer activity from rats. *Prog Clin Biol Res* **325**: 165-172

- Yoshikawa K, Tanaka T, Furusawa C, Nagahisa K, Hirasawa T, Shimizu H (2009) Comprehensive phenotypic analysis for identification of genes affecting growth under ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Yeast Res* **9**: 32-44
- Yoshimoto H, Fujiwara D, Momma T, Tanaka K, Sone H, Nagasawa N, Tamai Y (1999) Isolation and characterization of the ATF2 gene encoding alcohol acetyltransferase II in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* **15**: 409-417
- Yoshimoto H, Fukushige T, Yonezawa T, Sone H (2002) Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl Microbiol Biotechnol* **59**: 501-508
- You HJ, Swanson RL, Harrington C, Corbett AH, Jinks-Robertson S, Senturker S, Wallace SS, Boiteux S, Dizdaroglu M, Doetsch PW (1999) *Saccharomyces cerevisiae* Ntg1p and Ntg2p: broad specificity N-glycosylases for the repair of oxidative DNA damage in the nucleus and mitochondria. *Biochemistry* **38**: 11298-11306
- You KM, Rosenfield CL, Knipple DC (2003) Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Appl Environ Microbiol* **69**: 1499-1503
- Zaman S, Lippman SI, Zhao X, Broach JR (2008) How *Saccharomyces* responds to nutrients. *Annu Rev Genet* **42**: 27-81
- Zara G, Mannazzu I, Sanna ML, Orro D, Farris GA, Budroni M (2008) Exploitation of the semi-homothallic life cycle of *Saccharomyces cerevisiae* for the development of breeding strategies. *FEMS Yeast Res* **8**: 1147-1154
- Zara S, Antonio Farris G, Budroni M, Bakalinsky AT (2002) HSP12 is essential for biofilm formation by a Sardinian wine strain of *S. cerevisiae*. *Yeast* **19**: 269-276
- Zhang L, Onda K, Imai R, Fukuda R, Horiuchi H, Ohta A (2003) Growth temperature downshift induces antioxidant response in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **307**: 308-314

Abreviaturas y siglas

' ó min minuto(s)	HPLC <i>High pressure liquid chromatography</i> (Cromatografía líquida de alta presión)
“ segundo(s).	Kb Kilobase
°C grado celsius	L Litro
% tanto por ciento	LB Medio Luria-Bertani
ADN Acido desoxirribonucleico	LTR Long terminal repeats (Repeticiones terminales largas)
ADNc ADN complementario	M Molar
ADNr ADN ribosómico	NAD(H) dinucleótido de nicotinamida adenina
ARN Ácido ribonucleico	NADP(H) nicotinamida adenina dinucleótido fosfato
ARNasa Ribonucleasa	ORF Open reading frame (Marco abierto de lectura)
ARNm ARN mensajero	p/v Peso/volumen
ARNr ARN ribosómico	pb pares de base
ARNt ARN transferente.	PCR Polimerase chain reaction (Reacción en cadena de la polimerasa)
ATP trifosfato de adenosina	qPCR PCR cuantitativa
AMPc Adenosin monofosfato cíclico	rt-qPCR PCR en transcripción reversa cuantitativa
BSA Seroalbumina bovina	PEG polietilenglicol
CHEF contour-clamped homogeneous electric field	PFP p-Fluoro-DL-fenilalanina
dATP 2'-desoxiadenin-5'-trifosfato	rpm Revoluciones por minuto
dTTP 2'-desoxitimidin-5'-trifosfato	SDS dodecil sulfato sódico
dCTP 2'-desoxicitidin-5'-trifosfato	SGD <i>Saccharomyces</i> genome database
dGTP 2'-desoxiguanidin-5'-trifosfato	Tris Tri-(hidroximetil)-aminometano
dNTPs Desoxirribonucleótidos trifosfatos	TR Tiempo de retención
Agua MilliQ Agua bidestilada	U unidad de actividad enzimática
DNasa Desoxirribonucleasa	UFC Unidad formadora de colonia
DMSO dimetil sulfóxido	UV Ultravioleta
DO Densidad óptica	v/v Volumen/volumen
DTT ditioneitol	X Número de veces de concentración
EDTA ácido etilendiaminotetraacético	YNB Yeast nitrogen base
EtBr Bromuro de etidio	
EtOH Etanol	
g aceleración de la gravedad	
g gramo	
G418 Geneticina	
GC <i>Gas chromatography</i> (cromatografía gaseosa)	
Glc Glucosa	
h hora	