

R.19.087

TD 460



UNIVERSIDAD DE SEVILLA
FACULTAD DE BIOLOGÍA
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

UNIVERSIDAD DE SEVILLA
NEGOCIADO DE TESIS

Queda registrado este Título de Doctor al
folio...32..... número...384..... del libro
correspondiente. **03 AGO. 2000**
Sevilla,.....

El Jefe del Negociado.

MEJORA DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae*
UTILIZABLES EN LA ELABORACIÓN DE
VINOS DE JEREZ

Francisco Castrejón Márquez

TESIS DOCTORAL

Sevilla, Julio de 2000

**MEJORA DE CEPAS DE *Saccharomyces cerevisiae* UTILIZABLES EN LA
ELABORACIÓN DE VINOS DE JEREZ**

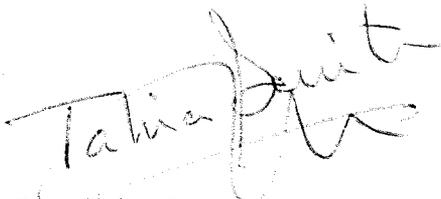
Trabajo realizado en el Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla, para optar al grado de Doctor en Biología por el Licenciado

Francisco Castrejón Márquez



Sevilla, Julio de 2000

Directora:



Dra. Tahía Benítez Fernández

Catedrática de Genética

Universidad de Sevilla

A Carmen y Pedro, mis padres

Índice

Introducción	10
1. Proceso de vinificación en la elaboración de los vinos de Jerez	11
1.1. Fases previas a la fermentación	11
1.2. Fermentación	12
1.3. Fases postfermentativas	12
1.3.1. Sistema de añadas	14
1.3.2. Sistema de soleras y criaderas	15
2. Las levaduras de los vinos de Jerez	15
2.1. Fermentación	16
2.2. Crianza biológica	16
3. Mejora genética de levaduras de los vinos de Jerez	18
3.1. Mejora del pie de cuba	19
3.2. Mejora de la flor	20
Materiales y Métodos	24
1. Microorganismos utilizados	25
2. Mantenimiento del material biológico	26
2.1. Bacteriófagos	26
2.2. Bacterias	27
2.3. Levaduras	27
3. Medios y condiciones de cultivo	27
3.1. Medios de cultivo para bacterias	27
3.2. Medios de cultivo para levaduras	27
3.2.1. Medios de laboratorio	27
3.2.2. Medios industriales	29
3.3. Condiciones de cultivo	29
4. Fermentación de mosto de uva	29
5. Determinaciones analíticas sobre mosto o vino.	30
5.1. Densidad	30
5.2. pH	30
5.3. Cationes	30
5.4. Viabilidad celular	30
5.5. Sólidos totales en suspensión (STS)	30

5.6. Turbidez	30
5.7. Absorbancia	31
5.8. Grado Baumé	31
5.9. Acidez total	31
5.10. Acidez volátil	31
5.11. Glicerina	32
5.12. Azúcares reductores	32
5.13. Ácidos orgánicos (cítrico, tartárico, succínico)	32
5.14. Alcoholes superiores y ésteres	32
5.15. Etanol	32
5.16. Acetaldehído, acetato de etilo, n-propanol, i-butanol y alcoholes isoamílicos	33
6. Vectores utilizados	33
7. Manipulación enzimática del ADN	33
7.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción	33
7.2. Generación de extremos romos	33
7.2.1. Relleno de extremos 5' prominentes	34
7.2.2. Degradación de extremos 3' prominentes	34
7.3. Desfosforilación de plásmidos.	24
7.4. Ligación de ADN.	34
8. Electroforesis de ADN en gel de agarosa	35
8.1. Plásmidos y fragmentos de ADN de menos de 30 kb	35
8.2. Cromosomas	35
8.2.1. Descripción del equipo de electroforesis	35
8.2.2. Preparación de muestras	35
8.2.3. Electroforesis de campo pulsante	36
9. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa	36
9.1. Extracción con Geneclean®	36
9.2. Extracción con silicagel	37
9.3. Electroelución	37
9.4. Filtración	37
10. Cálculo de la concentración del ADN	37
11. Transferencia de ADN a filtro (Southern)	37

11.1. Transferencia con tampón altamente salino	38
11.2. Transferencia alcalina	38
11.2.1. Preparación del gel	38
11.2.2. Transferencia	39
11.2.3. Neutralización	39
12. Marcaje de sondas	39
12.1. Marcaje de sondas radiactivas	39
12.2. Marcaje de sondas no radiactivas	39
13. Hibridación de ácidos nucleicos	40
13.1. Hibridación de filtros con sonda radiactiva	40
13.2. Hibridación de filtros con sonda no radiactiva	40
14. Deshibridación de ácidos nucleicos	41
14.1. Sondas radiactivas	41
14.1.1 Por ebullición	41
14.1.2. Método alcalino	42
14.2. Sondas no radiactivas	42
15. Extracción de proteínas de superficie por sonicación	42
16. Detección de actividad proteasa en gel de caseína	42
17. Cuantificación de proteínas	42
17.1. Método de Bradford	42
17.2. Método de Lowry	43
18. Concentración y precipitación de proteínas	43
18.1. Eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones proteicas	43
18.2. Precipitación de pequeños volúmenes de proteínas	43
18.3. Precipitación de grandes volúmenes de proteínas	44
18.4. Concentración de proteínas	44
19. Cromatografía de filtración en gel	44
20. Purificación de proteínas aglutinantes	45
21. Electroforesis de proteínas	45
21.1. SDS-PAGE	45
21.2. Tris-Tricina	46
22. Tinción de geles de proteínas	46
22.1. Tinción con azul de Coomassie	46
22.2. Tinción con nitrato de plata	46

23. Manipulación de genotecas de fagos	47
23.1. Preparación de <i>E. coli</i> LE392 para transducción	47
23.2. Infección de células de <i>E. coli</i> con el bacteriófago lambda	47
23.3. Multiplicación del bacteriófago lambda en medio sólido	47
23.4. Extracción de ADN de fagos	48
24. Extracción de ADN plasmídico de <i>E. coli</i>	48
25. Preparación de bacterias competentes para transformación	49
25.1. Método mediado por TSS	49
25.2. Método mediado por CaCl ₂	49
26. Transformación de bacterias	50
27. Curvas de crecimiento de levaduras	50
28. Viabilidad celular en cultivos de levadura	50
28.1. Siembra en caja	50
28.2. Tinción con azul de metileno	50
29. Conjugación de levaduras	51
30. Fusión de protoplastos	51
31. Transferencia de mitocondrias	51
32. Esporulación de levaduras	52
33. Tinción diferencial de esporas y células vegetativas de levaduras	52
34. Micromanipulación de esporas	52
35. Mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS)	53
36. Transformación de levaduras mediada por acetato de litio	53
37. Extracción de ADN de levaduras	53
38. Polimorfismo de restricción de ADN mitocondrial	54
39. Cuantificación de ADN por citometría de flujo	55
40. Mapeo cromosómico de marcadores recesivos	55
41. Medida de hidrofobicidad superficial	56
41.1. Método del tolueno	56
41.2. Método basado en la unión a poliestireno	56
42. Ensayos de aglutinación sobre levaduras	57
43. Curvas de acidificación	57
Resultados	58

1. Selección y mejora de una cepa vínica para fermentación	59
1.1. Microvinific. de mostos de 1ª yema con las cepas vínicas IFI256 e IFI256-1978	61
1.2. Caracterización genética de la cepa vínica IFI256.	63
1.2.1. Esporulación de la cepa vínica IFI256	63
1.2.2. Constitución cromosómica y contenido en ADN de la cepa vínica IFI256	66
1.2.3. Micromanipulación de esporas de IFI256	68
1.2.4. Constitución cromosómica y contenido en ADN de las esporas de IFI256	69
1.2.5. Conjugación de IFI256 con cepas de laboratorio	71
1.2.6. Esporulación de los híbridos IFIMMY	72
1.2.7. Micromanipulación de esporas del híbrido IFIMMY	72
1.2.8. Mapeo cromosómico del alelo apomictico de IFI256	72
1.2.9. Conjugación de IFI256 con cepas Spo	73
1.2.10. Transformación de la cepa IFI256 con el gen SPO12 de <i>S. cerevisiae</i>	75
2. Caracterización y mejora de una cepa vínica para crianza biológica	75
2.1. Pérdida del ADN mitocondrial inducido por etanol y acetaldehído	76
2.2. Utilización de distintas fuentes de carbono por la cepa vínica B16	79
2.3. Conjugación de la cepa vínica B16 con IM1-8b	80
2.4. Micromanipulación de esporas de B16IM1	80
2.5. Conjugación de la cepa vínica B16 con cepas de laboratorio	81
2.6. Micromanipulación de esporas de B16YNN	82
2.7. Micromanipulación de esporas de B16GT	83
2.8. Selección de esporas de B16GT buenas formadoras de velo	84
2.9. Tratamiento de velo de flor con proteasas	85
2.10. Aglutinación sobre distintas cepas de <i>S. cerevisiae</i>	86
2.11. Hidrofobicidad superficial en la cepa B16	88
2.12. Efecto de la adición de cicloheximida en la formación de velo de flor	88
2.13. Acidificación del medio de crecimiento producida por B16	90
2.14. Resistencia de la cepa formadora de velo B16 a distintos tipos de estrés	90
2.15. Incremento de la resistencia a etanol por adición de SOB F	93
2.16. Purificación de la proteína aglutinante	93
2.17. Extracción de proteínas superficiales de velo de bodega.	94
2.18. Determinación del tamaño molecular de la proteína aglutinante en estado nativo.	95
2.19. Solubilización diferencial de proteínas de tipo hidrofobina	96

2.20. Electroforesis	97
2.21. Secuenciación de péptidos internos de la proteína aglutinante	97
Discusión	99
1. Selección y mejora de una cepa vínica para fermentación	100
2. Caracterización y mejora de una cepa vínica para crianza biológica	106
Conclusiones	115
Bibliografía	118
Apéndice de tablas	131
Agradecimientos	139

Introducción

1. Proceso de vinificación en la elaboración de los vinos de Jerez

1.1. Fases previas a la fermentación

En la elaboración de los vinos de Jerez, el proceso de vinificación se inicia con la recogida y prensado selectivo de la uva para obtener los distintos mostos (Figura I-1). A la primera fracción de mosto, obtenida ejerciendo una presión de prensado baja (1 Kg/cm^2), se le denomina *mosto de 1ª yema*, constituye aproximadamente el 65% del volumen total del mosto y se destina fundamentalmente a la producción de vinos *Finos* y *Manzanillas*. Con una presión de 4 Kg/cm^2 se obtiene una segunda fracción que constituye el 23% del volumen total, a la que se denomina *mosto de 2ª yema*, y con una presión de $6-7 \text{ kg/cm}^2$ se obtiene la última fracción del mosto llamada *pressas* (12 %), que se utiliza para la destilación de etanol tras su fermentación (Pérez, 1982, 1984).

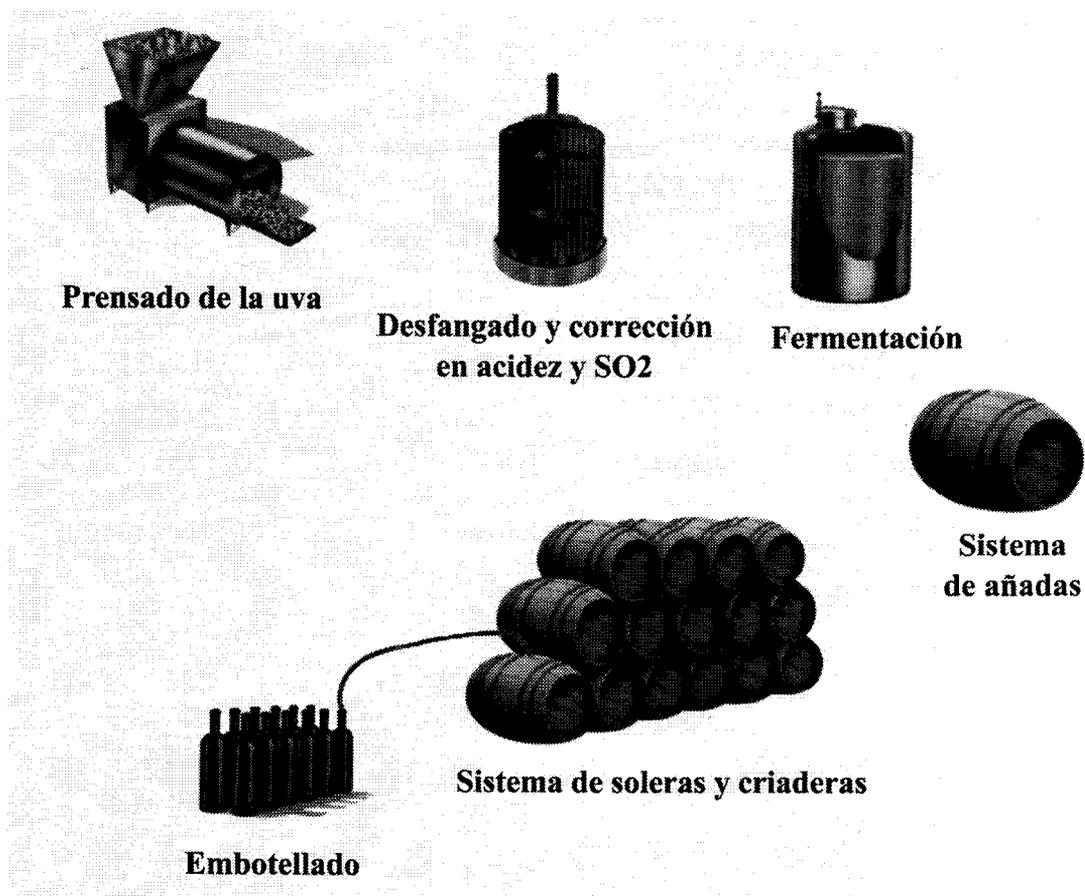


Figura I-1 Esquema del proceso de elaboración de los vinos de Jerez

Tras la operación del desfangado, consistente en la separación de los sólidos en suspensión por sedimentación durante unas 24 h, los mostos de 1ª y 2ª yema son filtrados y corregidos en acidez con la adición de $1,5 \text{ g/l}$ de ácido tartárico. Además se

les añaden 80 mg/l de anhídrido sulfuroso, que actúa como antioxidante (inhibiendo oxidasas presentes en el mosto) y como antiséptico selectivo (impidiendo el crecimiento bacteriano y de algunas levaduras indeseables).

1.2. Fermentación

La fermentación del mosto desfangado y corregido se lleva a cabo en depósitos de 40000 l de capacidad con temperatura controlada. Se lleva a cabo una fermentación dirigida, utilizando como pie de cuba una levadura autóctona, de la especie *Saccharomyces cerevisiae*, seleccionada en base a una serie de características deseables, como la capacidad para fermentar con rapidez mostos con 20-25% de azúcar, alta tolerancia a etanol, CO₂, SO₂ y altas temperaturas, baja producción de metabolitos indeseables (acidez volátil, H₂S, diacetilo, etc.) y capacidad para producir metabolitos que contribuyan favorablemente en la apreciación organoléptica del vino, como el acetaldehído y otros compuestos volátiles (Degré, 1993).

La utilización de una levadura seleccionada como pie de cuba acelera por tanto el proceso fermentativo y al aumentar rápidamente el grado alcohólico, se reduce la posibilidad de infección bacteriana y el desarrollo desmedido de otras levaduras presentes en el mosto. La fermentación finaliza al cabo de unos treinta días, momento en el que el mosto fermentado ha adquirido una graduación alcohólica aproximada de 12% (v/v) (Suárez e Iñigo, 1990).

Si la inoculación se realizara con una cepa muy distinta a la habitual de la flora autóctona (por su origen, naturaleza, etc.), las características del vino podrían variar notablemente, por lo que la selección de la levadura apropiada se convierte en un proceso crítico en la fermentación dirigida.

En este punto se realizan análisis de las características organolépticas y físico-químicas que determinarán el tipo de envejecimiento que sufrirá cada vino. Normalmente los fermentados más finos y ligeros, procedentes de mostos de 1ª yema se destinan a vinos de crianza biológica (Finos y Amontillados) y aquellos de mayor cuerpo y color, generalmente procedentes de mostos de 2ª yema, a Olorosos.

1.3. Fases postfermentativas

La fase postfermentativa comienza con la operación denominada fortificación o encabezado, que consiste en la adición de etanol destilado de vino para elevar la graduación alcohólica, que quedará aproximadamente al 15% en los vinos dedicados a

crianza biológica y al 18% en aquellos dedicados a envejecimiento físico-químico. El proceso de envejecimiento determinará el tipo de vino resultante. Así, se obtienen *Finos* y *Manzanillas* después de un envejecimiento llevado a cabo exclusivamente mediante crianza biológica. Son vinos muy finos de color oro pajizo a muy pálido, de aroma punzante y delicado, ligeros, secos y poco ácidos, con graduación alcohólica entre 15 y 17%. Los *Amontillados* tienen una primera fase de crianza biológica y una posterior de envejecimiento físico-químico. Son vinos de color ámbar, aroma punzante atenuado, suaves y llenos al paladar, secos y con graduación alcohólica comprendida entre 16 y 18%. Los *Olorosos* tienen una cortísima fase de crianza biológica, previa al encabezado y a partir de entonces el envejecimiento es exclusivamente físico-químico. Son vinos de color oro, muy aromáticos y de mucho cuerpo (nuez), secos o ligeramente abocados y con graduación alcohólica entre 18 y 20%.

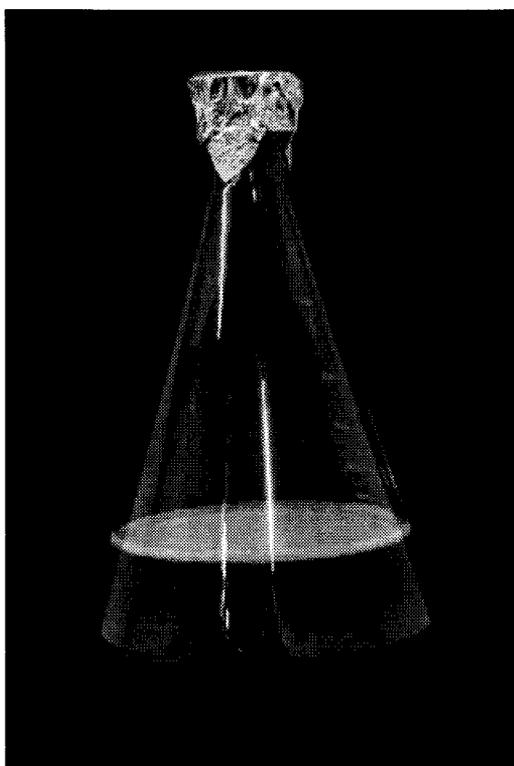


Figura I-2. Cultivo de la cepa vínica B16 en fase de velo de flor

La crianza biológica de los vinos finos y amontillados en la zona de Jerez constituye una etapa fundamental en su singular elaboración, ya que sufren una evolución muy marcada durante esta fase, al producirse numerosos cambios físico-químicos que son determinantes para las características organolépticas del producto final.

Las levaduras responsables de este tipo de envejecimiento crecen sobre la superficie del vino formando una gruesa capa denominada velo de flor (Figura I-2). Las levaduras del velo llevan a cabo una importante actividad metabólica, de manera que por un lado se consumen muchos componentes del vino y por otro se originan otros nuevos que dan caracteres organolépticos diferenciadores y peculiares a estos vinos, de manera que el vino va adquiriendo con el tiempo su estructura característica. Por otro lado el consumo de oxígeno del vino, motivado por el carácter oxidativo del metabolismo de las levaduras, y el aislamiento que produce el velo de flor con respecto al oxígeno atmosférico motiva que en el vino persista un carácter marcadamente reductor y evita la evolución oxidativa del mismo, rasgo muy peculiar y determinante en las características finales del vino fino.

Independientemente de si se da crianza biológica o no, el envejecimiento de todos estos vinos se lleva a cabo en dos fases, una estática o de envejecimiento en *añadas* y otra dinámica o de sistema de *soleras* y *criaderas* (Figura I-3).

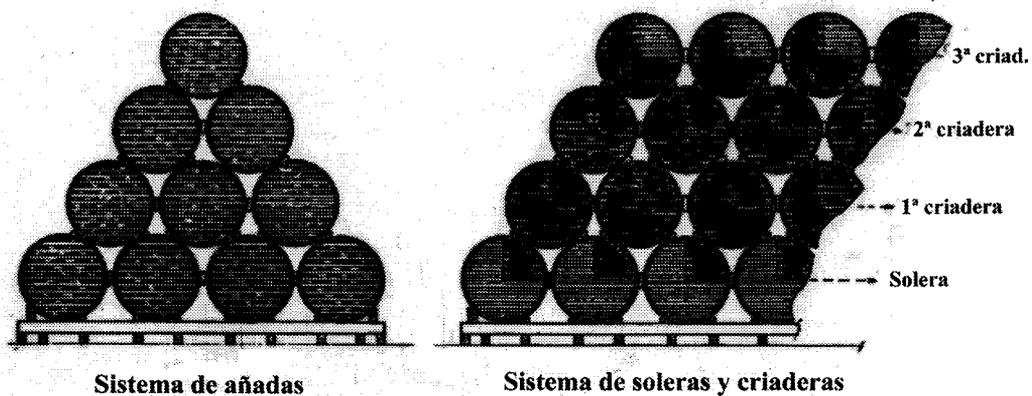


Figura I-3. Esquema del sistema de envejecimiento de los vinos con crianza biológica

1.3.1. Sistema de añadas

En la fase estática, el vino almacenado se identifica por la cosecha de la que procede y se denomina *sobretablas*. Este vino permanece en botas de madera de roble de 500 l de capacidad, con una sexta parte de su capacidad sin llenar. Esto permite que exista una gran superficie sobre la que se desarrolla la capa de levadura responsable de la crianza biológica. El vino permanece en esta fase durante un tiempo variable, que dependerá de la categoría y tipo de vino. Así, para Finos y Manzanillas esta fase dura entre uno y dos años y para los Olorosos puede llegar a durar hasta diez años.

1.3.2. Sistema de soleras y criaderas

La fase dinámica esta compuesta por varias *escalas*, cada una formada por un cierto numero de botas, todas conteniendo vino del mismo tipo y en el mismo grado de crianza. La escala que contiene el vino más envejecido se sitúa sobre el suelo, y por ello es denominada *solera*. Sobre ésta se sitúan varias escalas, cada una conteniendo vino de menor vejez, y a las que se denominan *criaderas*, enumerándose según su orden de antigüedad con respecto a la solera (1ª criadera, 2ª criadera, etc.).

A partir de la solera o escala de mayor vejez se extrae el vino destinado al embotellado para el consumo. Este vaciado parcial se denomina *saca* y el vacío producido se completa con vino extraído de la escala anterior (1ª criadera), operación denominada *rocío*. El volumen extraído de la 1ª criadera se repone con vino de la 2ª criadera y así sucesivamente, hasta la criadera más joven, que se completa con vino procedente del sistema de añadas. El vino que se saca de todas las botas de una misma escala se mezcla antes de rociar las botas de la siguiente, consiguiendo así una mayor uniformidad. Este proceso de saque y rocío exige un elevado cuidado ya que no se debe alterar la flor ni remover los sedimentos que existen en la bota.

Este sistema de envejecimiento hace de la solera una mezcla compleja que permite mantener constante la calidad del producto, independientemente del año de la cosecha.

2. Las levaduras de los vinos de Jerez

Las levaduras han intervenido en la fabricación de alimentos y bebidas desde hace más de 8000 años (Robinson, 1994), aunque no se supo de su existencia, gracias a las observaciones de Louis Pasteur, hasta el año 1863. En la fabricación de vinos y cervezas las fermentaciones se realizaban de forma espontánea por levaduras presentes en el mosto o en las instalaciones utilizadas para esos fines, hasta que en 1883 se utilizó por vez primera un cultivo puro para la fermentación de malta en la cervecera Calsberg, con una levadura a la que se denominó *Saccharomyces calbergensis* (Hansen, 1888). Hacia 1890, Müller-Thurgau, de Geisenheim, aplicó por primera vez este procedimiento para la fabricación de vino. Este tipo de procedimientos ha permitido desde entonces una gran velocidad y constancia en las características de las distintas fermentaciones.

Aunque en las fermentaciones espontáneas existe una sucesión de diversas especies de levadura, las propiedades organolépticas que confieren al producto, el

rendimiento alcohólico, la tolerancia a etanol, o la tasa de fermentación, ha llevado a seleccionar cepas de *Saccharomyces* como las levaduras más adecuadas para llevar a cabo las fermentaciones dirigidas (Pretorius, 2000).

2.1. Fermentación

Son pocos los estudios encaminados al conocimiento y mejora de las levaduras que participan en el proceso de vinificación de los vinos de Jerez. La fase fermentativa está dirigida por una cepa seleccionada (pie de cuba) en base a una serie de características de interés comentadas anteriormente. La importancia cuantitativa de este inóculo, junto con la alta capacidad fermentativa de la estirpe utilizada como pie de cuba hacen que esta cepa sea altamente competitiva frente a otras levaduras minoritarias presentes en el mosto, por lo que las características del mosto fermentado dependerán exclusivamente de la cepa que se use como pie de cuba y de ahí la importancia que tiene la utilización de una determinada cepa y no otra en esta fase. Diferentes cepas llevarán a cabo la fermentación con mayor o menor rapidez, y además de metabolizar los azúcares presentes en el mosto para su conversión en etanol y CO₂, conferirán distintas características organolépticas al mosto fermentado gracias a la transformación metabólica de compuestos químicos presentes en el mosto o a la síntesis de otros nuevos (Suárez e Iñigo, 1990).

2.2. Crianza biológica

Las especies que intervienen en la crianza biológica de los vinos de Jerez, en las fases estática y dinámica, y que están formando parte del velo, pertenecen al género *Saccharomyces*, y han sido descritas como perteneciente a cuatro razas distintas. *S.beticus* (Marcilla et al., 1936), *S. montuliensis* (Iñigo, 1964), *S. cheresiensis* (descrita por Protoserdow y Afrikian en 1933), las tres pertenecientes a *S. cerevisiae*, según Barnett et al, 1990., y *S. rouxii* (descrita por Boutroux en 1883), clasificada como *Zygosaccharomyces rouxii*, según Barnett et al (1990). Las distintas propiedades enológicas que tienen estos tipos de levaduras, en cuanto a que diferentes razas producen diferentes niveles de compuestos importantes para la apreciación organoléptica del vino, hacen que en la industria del vino se mantenga la nomenclatura original para diferenciarlas. Además del importante efecto protector que ejercen las levaduras al formar la barrera física que constituye el velo, éstas llevan a cabo multitud de efectos sobre la composición química del vino bajo crianza biológica. En general se

produce un consumo acusado de etanol, utilizado en esta fase como la principal fuente de carbono. El etanol se oxida hasta acetaldehído, reacción catalizada por la alcohol deshidrogenasa, en presencia de NAD^+ , y posteriormente a acetil-CoA que pasa a formar parte del ciclo de Krebs (Saavedra y Garrido, 1963; Cabezudo et al, 1967).

También se produce un consumo considerable y constante de glicerina, posiblemente a través de una ruta anabólica para la síntesis de fosfolípidos (Saavedra, 1959; Bravo, 1984; Martínez de la Ossa et al., 1987a, 1987b).

Un importante efecto se produce sobre el ácido acético y uno de sus derivados, el acetato de etilo. Es el componente principal de la acidez volátil del vino y es metabolizado, bien vía acetil-CoA hasta el ciclo de Krebs, bien vía de síntesis de ácidos grasos (Cabezudo et al., 1967; Saavedra y Garrido, 1962, 1963). El acetato de etilo, principal derivado del ácido acético, también disminuye progresivamente durante la crianza (Pérez, 1991; Martínez de la Ossa et al., 1987b) por lo que las levaduras de velo, al desacetificar el vino y teniendo en cuenta que crecen a concentraciones de hasta 3g/l de ácido acético, previenen la picadura acética del vino con gran eficacia.

A la vez que se consumen unos compuestos se sintetizan otros que son determinantes para la valoración organoléptica del vino. Así, las levaduras de velo son responsables de la oxidación de etanol a acetaldehído, que generalmente se produce en concentraciones de 300-400 mg/l, y que representa el compuesto más típico y diferenciador de los vinos de Jerez. Otros compuestos importantes para el aroma y que se sintetizan en menor medida a partir de acetaldehído vía piruvato son la acetoina y el 2,3-butanodiol (Fornachon, 1953, Saavedra, 1959). Ambos aumentan durante la crianza. Por último se produce un aumento considerable de los alcoholes superiores (n-propanol, iso-butanol e iso-amílicos), ligados a las rutas anabólicas de aminoácidos y piruvato, y que pueden sufrir un aumento del 20% a lo largo del sistema dinámico de envejecimiento (Martínez et al.,1995).

Etanol y acetaldehído son dos compuestos químicos producidos en altas concentraciones en los vinos de Jerez y a la vez son una fuente muy importante de estrés químico para las levaduras. Los principales puntos de actuación del etanol incluyen a las membranas celulares y proteínas citosólicas hidrofílicas. Las respuestas adaptativas de las levaduras a este tipo de estrés abarcan desde modificaciones químicas de las membranas (incremento en la proporción de ácidos grasos insaturados de cadena larga, descenso de los saturados, como el palmítico o aumento del *ratio* fosfolípido:proteína en las mismas), hasta el aumento de la síntesis de trehalosa (que neutraliza los daños del

etanol en las membranas) o estimulación de la síntesis de enzimas destoxicantes (como la superóxido dismutasa), de proteínas de estrés, o de la alcohol deshidrogenasa, aumento del metabolismo del etanol, etc (Boulton et al, 1996). Todos estos datos hacen que se pueda especular con la idea de que al menos 250 genes distintos están implicados en el control de la tolerancia a etanol en levaduras.

3. Mejora genética de levaduras de los vinos de Jerez

Los estudios encaminados a la mejora de los vinos de Jerez se han centrado fundamentalmente en la selección y mejora de la variedad de uva empleada, así como en un control físico-químico de la fermentación (temperatura, pH, etc.) y son pocos los estudios encaminados al conocimiento y mejora de la levadura, que es en definitiva el elemento encargado de la vinificación, tanto en la fermentación como en la crianza biológica de estos vinos.

Por tanto, el conocimiento a niveles bioquímico y genético de las levaduras industriales en general y de estas levaduras vínicas en particular es muy limitado. Entre las levaduras vínicas encontramos con suma facilidad levaduras poliploides o aneuploides, homotéticas y que no conjugan ni esporulan, o lo hacen pobremente y con una viabilidad de esporas muy escasa. En ciertas ocasiones se da una esporulación denominada apomictica (Grewal y Miller, 1972) en la que las levaduras esporulan sin realizar una de las dos divisiones meióticas, y que se puede dar en ausencia de recombinación, con lo que la estabilidad genética está asegurada incluso ante las condiciones más desfavorables. Estas características genéticas hacen, por tanto, que los fenotipos de estas levaduras no cambien fácilmente. La causa podría radicar en que el hombre ha estado seleccionando durante milenios alimentos y bebidas fermentados con una serie de características y ha procurado mantener constante la calidad cuando el producto era de su agrado. Esto ha ejercido una fuerte selección a favor de organismos cuyos fenotipos no cambian fácilmente. Actualmente el hombre está tratando de mejorar estas cepas industriales para obtener nuevos y mejores productos, encontrándose con dificultades a la hora de modificar o analizar genéticamente las cepas que previamente ha seleccionado en base a su estabilidad genética. Las características antes mencionadas son tan generales en levaduras vínicas que cabe pensar que sean ventajosas en su medio (Barre et al., 1993), pero reducen las posibilidades de mejora utilizando técnicas clásicas de cruzamiento y selección y técnicas moleculares.

Las cepas utilizadas en la industria enológica deben poseer una serie de requisitos encaminados a obtener un producto final que posea unas características organolépticas deseadas por el productor y por el consumidor y además deben poseer características que las hagan competitivas en los procesos en los que tienen que intervenir.

3.1. Mejora del pie de cuba

La naturaleza de los compuestos químicos que determinan la apreciación organoléptica de un vino es muy variada. Muchos de estos compuestos están formando parte de la composición química de la uva, como productos de metabolismo secundario de *Vitis vinifera*, pero son necesarias ciertas actividades enzimáticas que degradan las paredes celulares del fruto para liberar estos compuestos al vino. La adición de enzimas fúngicas a los mostos para resolver problemas de filtración e incrementar el aroma de los vinos resultantes de la fermentación (pectinasas, celulasas) ha sido una práctica frecuente en la elaboración de vinos, pero son prácticas incontroladas, en el sentido de que las preparaciones son mezclas heterogéneas y poco reproducibles de diversas actividades y además encarecen mucho la elaboración. Una alternativa relativamente reciente ha consistido en la transformación de las levaduras fermentativas con los genes que codifican estas enzimas (González-Candelas et al., 1995; van Rensburg et al., 1996; Villanueva et al., 2000). En algún caso, los vinos elaborados con las levaduras transformadas presentaron un carácter aromático más acentuado (González-Candelas et al., 1995). Otros compuestos se encuentran en formas no volátiles, por lo que es necesaria su modificación química para liberar las formas volátiles que contribuyan al aroma del vino. De forma análoga a la utilización de hidrolasas, se han transformado levaduras vínicas con β -glucosidasas heterólogas (Pérez-González et al., 1993; Van Rensburg et al., 1996; Van Rensburg et al., 1997; Van Rensburg et al., 1998) y los vinos producidos con estas levaduras presentaron mayores niveles de aromas afrutados (Pérez-González et al., 1993). Por otro lado es necesaria la eliminación, o la reducción de la concentración, de otros compuestos no deseables, como por ejemplo la disminución de acidez en ciertos vinos por descarboxilación del ácido málico a ácido láctico. Tradicionalmente, la desacidificación de los vinos ha sido llevada a cabo por la bacterias acidolácticas, pero el empleo de cultivos puros de levadura en fermentación de mostos ha impulsado una vía alternativa, consistente en el empleo de levaduras recombinantes, que coexpresan los genes de la permeasa del ácido málico de

Schizosaccharomyces pombe y del enzima maloláctico de *Lactococcus lactis* o de *S. pombe*, consiguiéndose una conversión efectiva de ácido malico en ácido láctico (Volschenk et al., 1997).

Las levaduras, además, contribuyen de forma muy importante a las características organolépticas del vino gracias a la formación de diversos productos del metabolismo que llevan a cabo durante estos procesos. En este sentido se ha descrito que un incremento en la concentración de glicerol, por conversión de etanol, incrementa la sensación de dulzor en el vino y un incremento de la concentración de alcoholes superiores y sus respectivos ésteres, contribuye de manera importante a los rasgos frutales del aroma en los vinos (Pretorius, 2000). Por todo ello, la manipulación del metabolismo de las levaduras para incrementar la concentración de estos y otros compuestos deseables podría ser una alternativa de mejora de las características organolépticas de los vinos.

3.2. Mejora de la flor

Por otro lado, en el caso de los vinos con crianza biológica, la flor es esencial para el proceso de envejecimiento, tanto en aspectos metabólicos como en aspectos físicos de barrera frente al oxígeno, por lo que la pérdida de flor que se produce en bodega, observada muy frecuentemente en el periodo estival, en el que se produce un aumento considerable de la temperatura (las bodegas sufren variaciones de temperatura que oscilan en el vino a lo largo del año entre 11°C de mínima y 25°C de máxima), aparece como uno de los mayores problemas durante la crianza. Cuando la temperatura se encuentra en valores medios (otoño y primavera), la flor se presenta en su mejor estado, manteniéndose con una apariencia rugosa y un color blanco-amarillento. Con valores mínimos de temperatura, la flor se mantiene también en buen estado pero se produce una ralentización del metabolismo y de la tasa de crecimiento; los valores máximos del verano son los que provocan que en algunas botas la flor se deteriore llegando a desaparecer totalmente de la superficie del vino, fenómeno que afecta muy negativamente a la crianza.

Una vez perdida la flor, ésta puede recuperarse por sí sola cuando desciende de nuevo la temperatura. En otros casos es necesaria la inoculación de flor de otra bota, o de flor preparada en tanques especiales para este propósito. En verano, la revisión y reinoculación de botas que han perdido la flor es un arduo y costoso trabajo. Aunque los primeros trabajos indicaban que la formación de velo de flor estaba bajo el control

de un solo gen que segregaba de acuerdo con las leyes mendelianas en ascas de levaduras de velo (Santa María y Vidal, 1973), actualmente parece improbable que un solo gen dominante controle este fenómeno, de manera que varias proteínas hidrofóbicas de pared celular podrían estar involucradas (Martínez et al., 1995). Además hemos de recordar la importancia de la presencia de mitocondrias funcionales para que se forme el velo. Dependiendo de la consistencia de una u otra hipótesis la formación de velo podría ser mejorada en último término modificando la expresión del gen responsable del fenómeno o mediante hibridación de cepas y selección de variantes con alta capacidad para formar velo (si el carácter fuese poligénico).

Existen numerosos trabajos que describen, en condiciones de laboratorio, el efecto de la temperatura sobre las levaduras, efecto que se potencia en presencia de etanol (van Uden, 1984). El contenido alcohólico del vino durante la crianza se mantiene en valores muy altos, entre 14.6-15.5%, próximos al límite de tolerancia de la propia levadura, y muy por encima del de otras levaduras y bacterias indeseables. Así, en estas condiciones de bodega próximas al límite, una subida de temperatura en verano puede hacer que éste límite se sobrepase, causando la pérdida de la flor. Las altas concentraciones de acetaldehído que encontramos en los vinos con crianza puede ser un factor añadido que contribuye a la pérdida de la flor.

La pérdida total o parcial del genomio mitocondrial (mutantes petite o rho⁻) se produce de forma espontánea en levaduras con una frecuencia en torno al 1% (varía de unas cepas a otras) (Piskur, 1994). En laboratorio, se ha demostrado que el etanol y la temperatura son mutagénicos para este ADNmit, incrementando en más de diez veces la frecuencia de mutantes rho⁻, sin afectar al genomio nuclear (Bandas y Zakharov, 1980; Brown et al., 1984; Jiménez y Benítez, 1988). Tanto los espontáneos como los inducidos por etanol y temperatura son mutantes irreversibles, ya que la mutación suele consistir en una deleción del ADNmit (Zamaroczy, 1983). Sorprendentemente estos mutantes se vuelven más sensibles al etanol (Aguilera y Benítez, 1985) y además pierden la capacidad para formar velo (Jiménez y Benítez, 1988). Además, difieren en el metabolismo de los lípidos y la síntesis de alcoholes superiores o de otros compuestos importantes para el aroma del vino (Walker, 1998). Bajo estas premisas cabe pensar que la aparición de mutantes "petite" es particularmente desfavorable durante la elaboración del vino de Jerez, ya que la caída de la flor en verano podría ser consecuencia de una alta producción de mutantes rho⁻ inducidos por el aumento de la temperatura en medio alcohólico, lo que generaría una alta proporción de la población con mayor sensibilidad



al etanol del vino e incapaces de formar flor, con el consiguiente deterioro de ésta.

Teniendo en cuenta todo lo anterior, un proceso de mejora genética debe empezar por la selección de cepas apropiadas para el proceso fermentativo, entre las aisladas de las fermentaciones espontáneas o de los sistemas de envejecimiento, y se debe contemplar la posibilidad de mejora basada en cruzamientos de cepas seleccionadas o la modificación puntual de genes mediante transformación, dependiendo de la naturaleza de la propiedad a mejorar. El empleo de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como modelo experimental eucariota para el conocimiento básico de los procesos bioquímicos, genéticos y metabólicos de las células vivas ha propiciado el desarrollo de multitud de técnicas de genética clásica y molecular, que pueden ser también aplicadas para la mejora de las levaduras industriales (Botsein et al., 1988; Oda y Ouchi., 1989). Esta mejora mediante manipulación genética se puede llevar a cabo bien modificando zonas concretas de su ADN o modificando todo su genomio.

En las levaduras vínicas existe una imposibilidad práctica de realizar mutagénesis (sería fácil perjudicar sus características industriales). La existencia de poliploidías y aneuploidías, y la falta de esporulación y conjugación, hacen que la mejora genética sea compleja. Para evitar estos problemas, se están aplicando actualmente en levaduras industriales técnicas de clonación de genes y transformación (Pretorius y van der Westhuien, 1991). Para la manipulación de genomios completos de la levadura, o de gran parte de éstos, el sistema más eficaz es el cruzamiento, seleccionando híbridos, o esporas de éstos, que posean las características deseadas. La esterilidad, así como la escasa capacidad de esporular mostrada por las levaduras industriales hace necesario aplicar técnicas de hibridación alternativas como el "rare-mating" o apareamiento forzado (Tubb y Hamond, 1987), consistente en seleccionar cigotos que se originan muy esporádicamente en cepas que en principio no son capaces de conjugarse, o mediante fusión de protoplastos (van Solingen y van der Platt, 1977), consistente en fundir células de dos levaduras a las que previamente se les ha eliminado su pared. Estos dos sistemas permiten también, mediante el empleo de mutantes kar^- , incapaces de fusionar sus núcleos (Conde y Fink, 1976), el trasvase de material genético citoplasmático sin alteración del genomio nuclear, y así introducir el sistema Killer en una cepa que no lo posea (Seki et al., 1985; Yokomori et al., 1989) o el intercambio de ADN mitocondrial entre dos o más cepas (Jiménez y Benítez, 1988).

En este trabajo nos proponemos una mejora del proceso de elaboración de los vinos con crianza biológica de Jerez, mediante la modificación de propiedades de

interés enológico en las cepas que intervienen en el proceso. Para ello nos ayudaremos de las técnicas y procedimientos bioquímicos y genéticos disponibles para el análisis y modificación de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*.

Materiales y Métodos

1. Microorganismos utilizados

Los microorganismos que han sido utilizados en este trabajo se encuentran descritos en la Tabla M-1.

Tabla M-1. Microorganismos utilizados en esta tesis

Cepa	Especie	Genotipo	Origen
IFI256	<i>S. cerevisiae</i>		IFI ⁽¹⁾
IFI256-1978	<i>S. cerevisiae</i>		TB ⁽²⁾
IFI256-1977	<i>S. cerevisiae</i>		TB
PDC	<i>S. cerevisiae</i>		DQ ⁽³⁾
YNN295	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa ura3 lys2 ade1 ade2 his trp1Δ1</i>	BR ⁽⁴⁾
S288C	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα SUC1 mal mel gal2 CUP1</i>	YGSC ⁽⁵⁾
DS81	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa/MATα SUC1/SUC1 mal/mal mel/mel gal2/gal2 CUP1/CUP1</i>	TB
K5-5c	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα his4Δ-15 ade2-1 can1 kar1-1 Cyh^R</i>	TB
MMY1	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ura3-52 Cyh^r</i>	RB ⁽⁶⁾
MMY2	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa ura3-52 Cyh^r</i>	RB
B7588	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV ⁽⁷⁾
B7170 (II)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7171 (III)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7589 (IV)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7590 (V)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7591 (VI)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2</i>	TGV
B7173 (VII)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7174 (VIII)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7175 (IX)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7593 (X)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2</i>	TGV
B7178 (XI)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7595 (XII)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7255 (XIII)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV

B7596 (XIV)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7180 (XV)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 his3-Δ1 met2 cyhR</i>	TGV
B7598 (XVI)	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa cir^o ura3-52 leu2-3,112 trp1-289 met2 cyhR</i>	TGV
REE2315	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ade2 cyh2 his3-11,15 leu1-c met13-c trp1-1 tyr1-2 ura3-1</i>	REE ⁽⁸⁾
REE2379	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ade2 cyh2 his3-11,15 leu1-c met13-c spo12::HIS3B trp1-1 tyr1-2 ura3-1</i>	REE
REE2972	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ade2 cyh2 his3-11,15 leu1-c met13-c spo13::hisG::spo13 trp1-1 tyr1-2 ura3-1</i>	REE
REE2986	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ade2 cyh2 his3-11,15 leu1-c met13-c spo12::HIS3B spo13::hisG trp1-1 tyr1-2 ura3-1</i>	REE
AWI-1b	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ade2 leu2 ura3 his3 trp1 can1-1</i>	TB
B16	<i>S. cerevisiae</i>		DQ
IM1-8b	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa leu2-3,112 his4 sta0 sta10 FLO1</i>	TGV
GT153-6a	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα ade1 gal7 leu2 ura3 his2 leu1 arg4 his6 ilv3 met14 asp5 lys7 lys9 met2 aro3</i>	YGSC
F4	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATa thr4</i>	TB
F15	<i>S. cerevisiae</i>	<i>MATα thr1 arg4</i>	TB
DH5α	<i>E. coli</i>	F80dlac ZDM15, <i>rec A1, end A1, gyr A96, thi-1, hsd R17 (rk-, mk+), sup E44, rel A1, deo R, D (lac ZYA-argF) U169.</i>	PG ⁽⁹⁾

⁽¹⁾ Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid, España

⁽²⁾ Dra. Tahía Benítez Fernández, Dpto. de Genética, Univ. de Sevilla, España

⁽³⁾ Domecq, S.A., Jerez de la Frontera, Cádiz, España

⁽⁴⁾ Bio-Rad Lab., EEUU

⁽⁵⁾ Yeast Genetic Stock Center, Berkeley, California, EEUU

⁽⁶⁾ Dr. Richard Bailey, Solar Energy Research Institute, Golden, Colorado, EEUU

⁽⁷⁾ Dr. Tomás González Villa, Dpto. de Microbiología, Univ. Santiago de Compostela, España

⁽⁸⁾ Dra. Rochelle Easton Esposito, Universidad de Chicago, EEUU

⁽⁹⁾ Promega, EEUU

2. Mantenimiento del material biológico

2.1. Bacteriófagos

A corto plazo, los fagos se mantuvieron a 4°C en tampón SM con 0.1% (v/v) de cloroformo. Para el mantenimiento a largo plazo, se guardaron a -80°C utilizándose tampón SM con un 7 % de dimetilsulfóxido (DMSO).

Tampón SM: Gelatina 0.01 % (p/v); MgSO₄ 10 mM; NaCl 100 mM; Tris-HCL 50 mM pH 7.5.

2.2. Bacterias

Para el mantenimiento a corto plazo (2-3 semanas), las cepas se conservaron a 4°C en cajas de Petri selladas con Parafilm™. Para el mantenimiento a largo plazo se prepararon suspensiones al 20 % de glicerol (v/v), y se almacenaron a -80°C.

2.3. Levaduras

Para el mantenimiento a corto plazo (2-3 semanas), las cepas se conservaron a 4°C en placas de Petri selladas con Parafilm™. Para el mantenimiento a largo plazo se prepararon suspensiones al 15 % de glicerol (v/v), y se almacenaron a -80°C.

3. Medios y condiciones de cultivo

3.1. Medios de cultivo para bacterias

Medio Luria Bertani (LB): 5 g/l de extracto de levadura; 10 g/l de bacto-triptona; 10 g/l de NaCl.

Medio LB+ampicilina: Para la selección de bacterias portadoras de plásmidos con resistencia a ampicilina se añadió al medio ampicilina sódica, a una concentración final de 100 mg/l.

3.2. Medios de cultivo para levaduras

3.2.1. Medios de laboratorio

Medio rico YPD: 10 g/l de extracto de levadura; 20 g/l de bacto-peptona; 20 g/l de glucosa.

Medio rico YPAD: Medio rico YPD suplementado con 20 mg/l de adenina. Se utilizó cuando se trabajó con estirpes auxótrofas para adenina.

Medio YPG: 10 g/l de extracto de levadura; 20 g/l de bacto-peptona; 3% (v/v) glicerol. Medio rico con fuente de carbono no fermentable que no permite el crecimiento de mutantes deficientes en respiración.

Medio YPDG: 10 g/l de extracto de levadura; 20 g/l de bacto-peptona; 3% (v/v) glicerol; 0.1% glucosa. Medio rico que permite diferenciar colonias "petite" (deficientes en respiración) de las que no lo son.

Medio YPDE: Medio rico YPD suplementado con etanol. La concentración de etanol en el medio se indica en el nombre del mismo. A modo de ejemplo, YPDE8 es YPD suplementado

con etanol al 8% (v/v).

Medio YPDac: Medio rico YPD suplementado con acetaldehído. La concentración de acetaldehído en el medio se indica en el nombre del mismo. A modo de ejemplo, YPDac0,1 es YPD suplementado con etanol al 0,1% (p/v).

Medio mínimo SD: 1.7 g/l de base nitrogenada (YNB) sin aminoácidos ni sulfato amónico; 5 g/l de sulfato amónico; 20 g/l de glucosa. Alternativamente a la glucosa se usaron otras fuentes de carbono, como maltosa 2% (medio SM), fructosa 2% (medio SF), rafinosa 2% (medio SR), melibiosa 2% (medio SMe), lactosa 2% (SL), sacarosa (SS), galactosa 2% (SGa) y glicerol 3% (SG).

Medio completo SC: Medio SD suplementado con 20 mg/l de adenina, 20 mg/l de uracilo, 20 mg/l de L-triptófano, 20 mg/l de L-histidina-HCl, 20 mg/l de L-arginina-HCl, 20 mg/l de L-metionina, 30 mg/l de L-tirosina, 30 mg/l de L-leucina, 30 mg/l de L-isoleucina, 30 mg/l de L-lisina-HCl, 50 mg/l de L-fenilalanina, 100 mg/l de ácido L-glutámico, 100 mg/l de ácido L-aspártico, 150 mg/l de L-valina, 200 mg/l de L-treonina y 400 mg/l de L-serina (Sherman *et al.*, 1986). Se especifican aquellos casos en los que uno o más de estos requerimientos se ha omitido del medio. Así, SC-ura indica medio completo sin uracilo.

Medio FOA: Este medio se usa para seleccionar positivamente clones *ura3*. Se autoclava, por un lado, un matraz con 250 ml de H₂O y 10 g de agar (matraz A), y por otro un matraz de 1 l conteniendo 0.85 g de base nitrogenada (YNB) sin aminoácidos ni sulfato amónico, 10 g de glucosa, 0.5 g de prolina, 5 mg de uracilo, 250 ml de H₂O y un agitador magnético (matraz B). Cuando la temperatura del medio baje a 60°C, se añaden al matraz B 250 mg de ácido 5-fluororótico y se agita hasta disolverlos completamente. Se añade entonces el contenido del matraz A, se mezcla y se reparte en cajas de Petri. Este medio se complementa con los requerimientos necesarios si se va a sembrar una cepa auxótrofa, según las concentraciones expresadas para el medio SC.

Medio de preesporulación PSP: 8 g/l de extracto de levadura; 3 g/l de bacto-peptona; 100 g/l de glucosa, suplementado con 20 mg/l de adenina cuando se trabajó con estirpes auxótrofas de adenina.

Medio de esporulación SPO: 10 g/l de acetato potásico; 1 g/l de extracto de levadura; 0.5 g/l de glucosa. Cuando se trabajó con cepas auxótrofas, este medio se suplementó con los requerimientos necesarios descritos para el medio SC, pero a la mitad de concentración. En algunos experimentos se emplearon medios de esporulación diferentes (las modificaciones se

indicarán en cada caso).

Nota: En todos los casos, para conseguir medio sólido, se añadieron 20 g/l de agar.

3.2.2. Medios Industriales

Mosto: Medio industrial procedente del prensado de uva de la variedad Palomino Fino. Las características del mosto se especificarán en cada experimento.

Vino: El vino joven, con menos de un año de crianza, se denominó sobretablas. El vino con una crianza mínima de 4 años, procedente de la solera de los solerajes industriales de crianza biológica, se denominó solera. Ambos tipos de vino tienen un grado alcohólico aproximado a 15% y otras características que se especificarán en cada experimento.

3.3. Condiciones de cultivo

Las estirpes de levaduras se incubaron a 30°C y las estirpes de bacterias a 37°C, excepto en aquellos casos en los que se indique expresamente. Los medios líquidos se incubaron con agitación constante horizontal a 300 rpm, excepto en los experimentos de formación de velo de flor y en los de fermentación de mosto de uva, en los que se incubó sin agitación.

4. Fermentación de mosto de uva

Las pruebas de fermentación y de análisis de los mostos fermentados se realizaron en colaboración con miembros del departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz. La fermentación se llevó a cabo en fermentadores de 1 l de capacidad y por duplicado, empleando en cada caso 800 ml de mosto desfogado, corregido con ácido tartárico hasta pH 3,2 y acondicionado en SO₂ hasta 60 mg/l.

Las cepas con las que se llevaron a cabo las pruebas de fermentación se acondicionaron previamente, cultivándolas en este mismo mosto hasta fase estacionaria de crecimiento. Posteriormente se procedió a inocular los fermentadores con estos cultivos, siendo el inóculo un 4% (v/v) con respecto al volumen de mosto a fermentar.

A lo largo del proceso se tomaron muestras periódicas en las que se determinó densidad del medio y viabilidad celular. Una vez concluida la fermentación, se realizó una prueba analítica completa de los distintos vinos con el fin de comparar los resultados obtenidos y estos con el mosto de partida.

5. Determinaciones analíticas sobre mosto o vino.

5.1. Densidad

Se filtró una muestra de 5 ml de mosto a través de una membrana de 0.45 μm y se midió la densidad con un densímetro modelo DMA48.

5.2. pH

Se determinó mediante medida directa sobre la muestra, con micropHmetro 2001, Crison, provisto de electrodo selectivo (Cat, 52-02, Crison) y compensador automático de temperatura.

5.3. Cationes

Se determinaron por absorción atómica mediante un equipo PYE UNICAM SP9 Atomic absorption Spectrophotometer (Philips). Los patrones de calibración se prepararon a partir de disoluciones de concentración 1000 ppm.

5.4. Viabilidad celular

La determinación de biomasa total y viable se llevó a cabo de forma directa por recuento de células en cámara Bürker. Las células fueron previamente sometidas a tinción con azul de metileno, según se especifica en el apartado “Viabilidad celular en cultivos de levadura” de estos Materiales y Métodos.

5.5. Sólidos totales en suspensión (STS)

Se pasaron 50 ml de muestra a través de un filtro P40 previamente pesado, y se mantuvo durante 24 h, a 110°C.

5.6. Turbidez

Se determinó mediante un método nefelométrico consistente en la medida de la turbidez de la muestra en UNT (unidades nefelométricas de turbidez) a una longitud de onda de 400 nm. Previamente se preparó una recta de calibrado a partir de una suspensión de Formacina.

Suspensión de formacina: Se mezclan 5 ml de las soluciones A (sulfato de hidracina 1% (p/v)) y B (hexametilotetramina 10% (p/v)) en un matraz aforado de 100 ml. Se deja reposar la mezcla durante 24 h a temperatura ambiente y al cabo de ese tiempo se habrá formado un precipitado blanco. Se completan los 100 ml con agua destilada, obteniéndose una suspensión que se conoce como Formacina y a la que se

asignan 400 UNT. A partir de esta disolución se preparan los patrones de distinta concentración para obtener la recta de calibrado, empleando como blanco agua destilada.

5.7. Absorbancia

Se determinó mediante espectrofotometría a distintas longitudes de onda. Se utilizó un espectrofotómetro Multipurpose Recording Spectrophotometer MPS-2000 (Shimadzu).

5.8. Grado Baumé

La determinación del °Bé se realizó a partir del mosto, una vez centrifugado a 5000 rpm durante 5 min. La medida se realizó añadiendo 500 ml de mosto en una probeta termostaticada a 20°C. Cuando la muestra alcanzó los 20°C, se introdujo un areómetro de escala adecuada a la muestra, realizando la medida por encima del menisco.

5.9. Acidez total

Se determinó mediante volumetría, tomando 25 ml de muestra centrifugada, que se valoraron con NaOH 0.1 N hasta viraje (utilizando fenolftaleína como indicador) o hasta pH=7 (utilizando el pHmetro). Si el volumen de NaOH utilizado no fue mayor de 10 ml de incrementó el volumen de muestra a 50 ml. El resultado se expresa en g de ácido tartárico/l de muestra, según la fórmula:

$$\text{Acidez total (g TH}_2\text{/l)} = (V_{\text{NaOH gastado}} \times N_{\text{real (NaOH)}}) \times 75 / V_{\text{muestra}}$$

5.10. Acidez volátil

Se realizó mediante volumetría con destilación previa por arrastre de vapor (método Cazenave-Ferrer).

Se introdujeron 10 ml de muestra en el borboteador de arrastre de vapor con un cristal de ácido tartárico y unos 200 ml de agua destilada en el calderín. Se colocó un matraz enlenmeyer a la salida del refrigerante, abriendo el agua refrigerante y encendiendo la manta calefactora para iniciar la destilación. Al empezar a hervir el agua se cerró el escape del calderín (comienza la destilación). Se detuvo el proceso una vez que se hubieron recogido unos 100 ml en el matraz situado a la salida del refrigerante. Se añadió entonces al destilado unas gotas de fenolftaleína y fue valorado con NaOH 0.1 N hasta el viraje a color rosa (el volumen de NaOH empleado es V_0). Una vez realizada la primera valoración, se añadió 1 ml de HCl al 50% y 1 ml de engrudo de almidón al 1%. Se valoró de nuevo, esta vez con yodo

0.02 N hasta viraje azulado (el volumen de yodo utilizado en la nueva valoración se denomina V_1). Se añadió NaHCO_3 hasta decoloración y se volvió a valorar con yodo 0.02 N hasta viraje azulado (el volumen empleado es V_2).

El cálculo de la acidez volátil viene dado por la siguiente expresión (g ácido acético/l de muestra):

$$\text{Acidez volátil (g AcH/l)} = V_0 - ((V_1/10) + (V_2/20)) \cdot 0.6$$

5.11. Glicerina

Se determinó mediante una prueba enzimática sobre la muestra, previamente centrifugada y filtrada a través de un tamaño de poro de $0.45 \mu\text{m}$, siguiendo las instrucciones de uso del fabricante (Boehringer Mannheim).

5.12. Azúcares reductores

Se realizó la determinación por cromatografía líquida utilizando como detector un refractómetro diferencial Waters 410 y una columna ION-300 (30 cm de largo x 0.7 cm de diámetro interno). El disolvente utilizado fue H_2SO_4 0,005 M, la temperatura fue de 50°C y el flujo utilizado 0.3 ml/min.

5.13. Ácidos orgánicos (cítrico, tartárico, succínico)

Se determinaron por cromatografía líquida en las mismas condiciones que los azúcares reductores, pero utilizando en este caso un detector PDA Waters 996 (Photodiode Array Detector).

5.14. Alcoholes superiores y ésteres

Se determinaron por cromatografía gaseosa, con un equipo Hewlett Packard, modelo 5890 Serie II y detector de ionización de llama (FID). Se utilizó una columna CP-WAX 57CB de Chrompack (Middelburg, Holanda). La temperatura inicial fue de 35°C y la final de 100°C , con una rampa de $5^\circ\text{C}/\text{min}$. Los tiempos inicial y final fueron de 5 min. Se utilizó como patrón interno 4-metil-2-pentanol, H_2 y N_2 a presión de 4 bares y aire a 2 bares.

5.15. Etanol

En mostos fermentados el contenido en etanol se determinó de acuerdo con la Sociedad Americana de Enólogos, 1972. En vinos se cuantificó usando un analizador Infra

Analyzer (Technicon, Nueva York) o por cromatografía de gases, usando un cromatógrafo Perkin-Elmer Sigma 3B y una columna para la separación de alcoholes (Technokroma) con Carbowax 1500 como fase fija. Cien μ l de muestra se diluyen en 9,97 ml ml de isobutanol y 30 μ l de 3-metil butanol como patrón interno. El detector utilizado fue un doble FID, la temperatura del detector y del inyector de 250°C, la del horno 90°C, el gas transportador nitrógeno y el flujo 30 ml/min.

5.16 Acetaldehído, acetato de etilo, n-propanol, i-butanol y alcoholes isoamílicos

Se determinaron por cromatografía de gases como en el anterior apartado, usando 4-metil pentanol como control interno

6. Vectores utilizados

p(SPO13)8: Se ha sustituido el fragmento BamHI/SalI del vector Ycp50 por un fragmento cromosómico BamHI/XhoI de 1.4 kb que contiene el gen *SPO13*. Vector centromérico, que confiere resistencia a ampicilina en bacterias y permite el crecimiento de mutantes *ura3* de levaduras en medios sin uracilo.

pSL1: Vector pRS316 con un inserto de 1.4 kb en la diana SmaI. El inserto es un fragmento cromosómico HindII/PvuII que contiene el gen *SPO12*. Vector centromérico, que confiere resistencia a ampicilina en bacterias y permite el crecimiento de mutantes *ura3* de levaduras en medios sin uracilo.

7. Manipulación enzimática del ADN

7.1. Digestión del ADN con enzimas de restricción

Las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo fueron suministradas por las casas comerciales Boehringer Mannheim, Pharmacia, New England Biolabs y Promega Biotech. Las reacciones se realizaron siguiendo las condiciones recomendadas por los fabricantes. Las digestiones normalmente se llevaron a cabo usando 0.5 U de enzima durante 1 h 30 min en un volumen de 20 μ l.

7.2. Generación de extremos romos

7.2.1. Relleno de extremos 5' prominentes

La ADN polimerasa I de *E. coli* es capaz de rellenar extremos 5' prominentes gracias a su actividad ADN-polimerasa 5'→3'. Tras la digestión del ADN con la enzima de restricción adecuada y la inactivación de ésta, se añadieron 1 µl de dNTPs 0.5 mM y 1 µl de Klenow (2 U), y se incubó a 30°C durante 15 min. La enzima se inactivó por calentamiento a 75°C durante 10 min o bien con EDTA 0.01 M pH 8.0 y un volumen de fenol:cloroformo:isoamílico (25:24:1).

Tampón de Klenow: Tris-HCl 0.4 M pH 7.5; MgCl₂ 0.2 M; NaCl 0.5 M.

7.2.2. Degradación de extremos 3' prominentes

Los extremos 3' prominentes se hicieron romos con la polimerasa de ADN del bacteriófago T4. La reacción se llevó a cabo mezclando en un volumen final de 20-50 µl los 4 dNTPs a una concentración final de 100 mM, 1-2 U de la polimerasa de ADN de T4 y 0.2-2 µg de ADN. La solución se incubó durante 15 min a 12°C. La inactivación del enzima se realizó como en el caso anterior.

7.2.3. Desfosforilación de plásmidos.

Se utilizó para eliminar los grupos fosfato de los extremos 5' de vectores que se usaron para clonar, con el fin de evitar su religación. Tras haber linearizado el plásmido con las enzimas de restricción apropiadas, se incubaron 5-10 µg de plásmido con fosfatasa alcalina de intestino de vaca (CIP) (Boehringer Mannheim). Se añadió 1 unidad de fosfatasa alcalina por cada 100 pmoles de vector y la reacción se incubó 1 h a 37°C. La enzima se inactivó calentando a 65°C durante 10 min o añadiendo EDTA 0.01 M pH 8.0. Seguidamente se realizó electroforesis en gel de agarosa y se aisló el plásmido mediante GeneClean®.

Tampón de fosfatasa 10x: Tris-HCl 0.5 M pH 8.0; EDTA 1 mM pH 8.0.

7.2.4. Ligación de ADN.

Las reacciones de ligación se llevaron a cabo con la ligasa de ADN del bacteriófago T4 (Boehringer Mannheim). Se mezclaron unos 200 ng de vector con una cantidad de inserto unas 5 veces superior. Se añadió 1 µl de tampón de ligasa 10X, 1 U de ligasa T4 y se completó con H₂O hasta un volumen final de 10 ó 20 µl. La ligación de extremos cohesivos se realizó incubando durante 2 h a 25°C. Para la ligación de extremos romos se incubó durante 12-16 h a 12°C. En algunos casos se añadió a la mezcla de reacción PEG a una

concentración final del 5 % para facilitar la ligación.

Tampón de ligasa 10X: Tris-HCl 0.5 M pH 7.8; MgCl₂ 0.2 M; DTT 0.2 M; ATP 10 mM; BSA 500µg/ml.

8. Electroforesis de ADN en gel de agarosa

8.1. Plásmidos y fragmentos de menos de 30 kb

Los fragmentos de ADN se separaron en función de su tamaño por electroforesis en geles de agarosa en tampón TAE (entre 0.6 y 1.5 %, dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar). Para preparar geles preteñidos se añadían 0.5 µg/ml de bromuro de etidio (EtBr) antes de que solidificara el gel. El ADN se sometió a un campo eléctrico constante de 5 V/cm. El ADN se cargó en los pocillos del gel resuspendido en tampón de carga.

Para teñir el gel una vez terminada la electroforesis (si no es preteñido), éste se sumergía en una solución de EtBr a 0.5 µg/ml durante al menos 5 min y se lavaba durante al menos 15 min en H₂O, hasta distinguirse claramente las bandas a la luz U.V.

Como patrones de peso molecular, se empleó ADN del bacteriófago lambda digerido con *Hind*III y/o *Eco*RI. También se utilizaron marcadores comerciales como la escalera de 1 kb (BRL).

TAE 50 X: Tris-acetato 2 M; EDTA 0.05 M pH 8.0.

Tampón de carga 6 X: 0.25 % de azul de bromofenol; 30 % glicerol.

8.2. Cromosomas

8.2.1. Descripción del equipo de electroforesis

El equipo utilizado fue un aparato CHEF-DR[®] II (Bio-Rad Laboratories, EEUU). Está formado por una cubeta de electroforesis con 24 electrodos dispuestos en una figura hexagonal exterior al gel. Los cromosomas de *S. cerevisiae* se separan por alternancia de un campo eléctrico entre los grupos de electrodos que ofrecen un ángulo de 120°. El equipo consta, además, de un modulo de programación de los pulsos eléctricos, un módulo programador de voltaje, un módulo que distribuye los pulsos a los distintos electrodos y un módulo que mantiene constante la temperatura del tampón.

8.2.2. Preparación de muestras

Se inocularon las estirpes en medio rico YPD y se incubaron a 30° C con agitación hasta fase estacionaria temprana. Se recogieron las células centrifugando durante 5 min a 4000 rpm entre 7 y 10 ml de cada uno de los cultivos anteriores. Se lavó el precipitado con 10

ml de EDTA 50 mM pH 8.0. Se centrifugó y se añadió al precipitado 1 ml de solución CPES con Zimoliasa (0.2 mg/ml) y 1 ml de solución CPE con agarosa de bajo punto de fusión al 1%. Se rellenaron los moldes de metacrilato con esta mezcla y se guardó a 4° C hasta que solidificaron (10 min). Los tacos de agarosa formados en los moldes se pusieron en tubos de plástico de 10 ml y se añadieron 6 ml de solución CPE. Se incubó durante 4 h a 30° C. A continuación se eliminó la solución anterior y se añadieron 5 ml de solución TESP a 50° C que llevaba 5 mg de proteinasa K. Se dejó al menos 15 h a 50° C y posteriormente se realizaron 3 lavados con 10 ml de TE a 50° C, intercalando 30 min entre cada dos lavados, seguidos de otros tres con 10 ml de TE a temperatura ambiente, intercalando otros 30 min entre cada dos lavados. Finalmente se cargó el gel con las muestras o se guardaron a 4° C en 10 ml de EDTA 50mM pH 8.0 (las muestras se pueden conservar así durante varios meses).

CPE: Ácido cítrico 40mM pH 6.0; tampón fosfato sódico 120mM pH 6.0; EDTA-Na₂ 20mM

CPES: Ácido cítrico 40mM pH 6.0; tampón fosfato sódico 120mM pH 6.0; EDTA-Na₂ 20mM; D-sorbitol 1.2 M; ditiotreitol 5mM. Se añaden 0.2 mg/ml de Zimoliasa 20T antes de usar.

TESP: Tris-HCl 10 mM pH 8.0; EDTA-Na₂ 450 mM pH 8.0; SDS 10 g/l. A temperatura ambiente se forma un precipitado que se disuelve a 50°C. Se añade 1mg/ml de Proteínasa K inmediatamente antes de usar.

TE 10x: Tris-HCl 0.1 M-EDTA 0.01 M pH 7.5. Se esteriliza por filtración.

8.2.3. Electroforesis de campo pulsante

El tampón de electroforesis es TBE 0.5x y el gel se prepara al 1% (p/v) de agarosa en este mismo tampón. La electroforesis se corre a 14°C y a 200V, pulsando cada 60 s durante las primeras 16 h y cada 120 s durante las restantes 12 h. El gel se tiñe posteriormente con bromuro de etidio para visualizar las bandas cromosómicas con luz ultravioleta.

9. Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa

9.1. Extracción con GeneClean®

Se utilizó el kit comercial de GeneClean® (BIO101, EEUU). La banda del gel de agarosa con el fragmento de ADN correspondiente se incubó a 55°C con 2-3 volúmenes de solución NaI 6 M (600 µl) hasta que se fundió el gel. Se añadieron 5 µl de solución de "Glassmilk" y se mantuvo en hielo 5 min para favorecer la unión del ADN. La mezcla se centrifugó y el precipitado se lavó tres veces con 500 µl de tampón de lavado New Wash. Posteriormente se resuspendió en 7-20 µl de H₂O y se incubó 10 min a 55°C, tras los que se centrifugó para separar el precipitado del ADN que permanecía en el sobrenadante

NaI 6M: NaI 45% (p/v) saturado con 5 g de Na₂SO₃. Se agita durante 1 h y se filtra, sin airear demasiado, para eliminar los cristales de sulfitos no disueltos. Se mantiene a 4°C en oscuridad.

Tampón de lavado (New Wash): Tris-HCl 20 mM pH 7.2, NaCl 0.2 M, EDTA 2 mM pH 8.0, etanol 53%.

9.2. Extracción con silicagel

Una variante de este protocolo consiste en usar silicagel o filtros de microfibras de vidrio triturados (Whatman GF/F o GF/C) en H₂O (1g/ml), en lugar del producto comercial. Se preparó sílica (Sigma, S-5631) en tampón PBS a una concentración final de 100 mg/ml y se dejó decantar durante unas 2 h. Tras decantar se centrifugó a 2000 g durante 2 min y se eliminó el sobrenadante. Se resuspendió en NaI 3 M hasta una concentración de 100 mg/ml.

Tampón PBS: NaCl 130 mM; tampón fosfato sódico 10 mM pH 7.2.

9.3. Electroelución

Se cortó una banda de gel inmediatamente por debajo del fragmento que se quería aislar. Este hueco se llenó con PEG 8000 15% en TAE 1X y se prosiguió con la electroforesis. Cuando el fragmento de interés entró en el pocillo se recogió la solución y se trató con un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1). Finalmente, se precipitó el ADN con 0.1 volúmenes de NaAc 3 M y dos volúmenes de etanol absoluto, se lavó con etanol 70 % y se resuspendió en 5-7 µl de H₂O.

9.4. Filtración

La banda con el fragmento de interés se cortó del gel de agarosa, se introdujo en una columna Wizard (Promega, Madison, Wisconsin, EEUU) acoplada a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó a 13000 rpm durante 1 min, filtrándose el ADN y el tampón y quedando retenida la agarosa en el filtro de la columna.

10. Cálculo de la concentración del ADN

Se asumió que 1 unidad de DO₂₆₀ de ADN de doble cadena equivalía a una concentración de 50 µg de ADN/ml.

También se cuantificó mediante la intensidad de las bandas en geles de agarosa comparando con la intensidad de una cantidad conocida de marcador λ HindIII.

11. Transferencia de ADN a filtro (Southern)

11.1. Transferencia con tampón altamente salino

El ADN a transferir (plásmidos o cromosomas) se separa por electroforesis, según apartado 8 de Materiales y Métodos. Una vez finalizada la electroforesis, el ADN del gel se visualizó con luz UV y se fotografió. Los marcadores de tamaño se señalaron en el gel, con una aguja impregnada en tinta china. A continuación, se sumergió el gel con agitación durante 15 min en una solución de HCl 25 mM, que facilita la transferencia rompiendo los fragmentos de gran tamaño. Se lavó con H₂O y se sumergió el gel en solución desnaturizante durante otros 15 min, con agitación. Tras lavar el gel con H₂O se trata de la misma manera con la solución neutralizante. Y finalmente se sumerge en tampón de transferencia hasta que ésta se realice. Tras los tratamientos anteriores, el ADN se transfirió a un filtro de nylon (HybondTM-N, Amersham) por capilaridad. Para ello, el gel se colocó sobre un puente de papel de filtro Whatman 3 MM, cuyos extremos se sumergieron en tampón de transferencia SSC 20X. Sobre el gel se colocaron sucesivamente una membrana de nylon del tamaño del gel, 2 papeles Whatman 3MM, y una pila de papel absorbente. Sobre el conjunto, se colocaron unos 500 g de peso y se mantuvo como mínimo 8 h. Una vez realizada la transferencia, el filtro se dejó secar a temperatura ambiente, y el ADN se fijó covalentemente al filtro irradiando con luz ultravioleta (70000 $\mu\text{J}/\text{cm}^2$ en un cross-linker CL 1000 (UVP, San Gabriel, EEUU)

Alternativamente, la transferencia a membrana se realizó mediante el sistema de vacío con un TransVac TE80 (Hoeffer), durante 1 h. Una vez realizada la transferencia, el ADN se fijó al filtro como en el caso anterior.

Solución desnaturizante (Southern I): NaOH 0.5 M; NaCl 1.5 M.

Solución neutralizante (Southern II): Tris-HCl 1 M pH 7.5; NaCl 1.5 M; EDTA 1 mM.

Tampón de transferencia SSC 20 X: NaCl 3 M; citrato trisódico 0.3 M. Ajustar a pH 7.0 con HCl.

11.2. Transferencia alcalina

11.2.1. Preparación del gel

Una vez finalizada la electroforesis, el ADN del gel se visualizó con luz UV y se fotografió. Los marcadores de tamaño se señalaron en el gel, con una aguja impregnada en tinta china. A continuación, se sumergió el gel dos veces en solución desnaturizante durante 15 min cada vez. Tras lavar el gel con H₂O se trató durante 10 min en tampón de transferencia alcalina con la solución neutralizante. Y finalmente se sumergió en tampón de transferencia



hasta que ésta se llevó a cabo.

11.2.2. Transferencia

Tras los tratamientos anteriores, el ADN se transfirió a un filtro de nylon (HybondTM-N, Amersham) por capilaridad. Para ello, encima de una superficie plana y sólida se coloca una pila de papel absorbente, 5 hojas de papel Whatman 3 MM 5cm más anchas y largas que el gel, las dos superiores humedecidas en tampón de transferencia alcalina, la membrana de nylon, 2cm más ancha y larga que el gel, humedecida en H₂O, el gel con los pocillos hacia arriba, otras 3 hojas de papel Whatman 3 MM del tamaño del gel y finalmente otras dos hojas de papel Whatman 3 MM, empapadas en tampón de transferencia alcalina y que actúan como puente a un recipiente conteniendo este mismo tampón. Se deja la transferencia durante al menos 1.5 h.

11.2.3. Neutralización

Se sumergió con cuidado la membrana durante 10 min en tampón fosfato sódico 0.2 M, pH 7.0 y se dejó secar a temperatura ambiente.

Solución desnaturalizante (Southern I): NaOH 0.5 M, NaCl 1.5 M.

Tampón de transferencia alcalina: NaCl 3M, NaOH 8 mM, pH 11.4

12. Marcaje de sondas

12.1. Marcaje de sondas radiactivas

Las sondas se prepararon con 50-100 ng de ADN, siguiendo el método de cebadores al azar descrito por Feinberg y Volgelstein (1983). Se usaron los kits comerciales de Boehringer o Pharmacia, siguiendo las instrucciones del fabricante. La polimerasa Klenow utiliza los cebadores aleatorios como inicio de la síntesis de la cadena complementaria en presencia de dATP, dTTP, dGTP y [α^{32} P]dCTP (3000 Ci/mmol) (Amersham). Se usaron 10-50 μ Ci totales de radiactividad, según el experimento. Los nucleótidos no incorporados se separaron por cromatografía de exclusión molecular en columnas de Sephadex G-50. La sonda se desnaturalizó hirviéndola durante 10 min y enfriándola inmediatamente en hielo.

12.2. Marcaje de sondas no radiactivas

Se marcaron unos 150 ng como máximo de ADN lineal de doble cadena mediante el mismo método que para las sondas radiactivas. El fragmento a marcar se desnaturalizó en

H₂O hirviendo durante 10 min y se enfrió rápidamente en hielo, para evitar la renaturalización. Se añadieron 2 µl de mezcla de hexanucleótidos 10X (Boehringer Mannheim), 2 µl de mezcla de dNTPs de marcaje de digoxigenina 10X (Boehringer Mannheim) y 1 µl de enzima Klenow (2U), hasta un volumen final de 20 µl. Esta mezcla se incubó durante al menos 1 h, pero se dejó hasta 20 h si se quería obtener un mejor rendimiento. Finalmente, la reacción se paró añadiendo 1 µl de EDTA 0.5 M, pH 8.8.

13. Hibridación de ácidos nucleicos

13.1. Hibridación de filtros con sonda radiactiva

Las membranas se prehibridaron durante 1-4h a 42°C con agitación constante. Los tubos de hibridación se colocaron en un horno HybaidTU micro-4, con 5-15 ml de solución de hibridación, y se incubaron durante al menos 1 h

El fragmento de ADN marcado radiactivamente y desnaturalizado se añadió a la solución de hibridación, donde se siguió incubando el filtro a 42°C, durante 12-18 h. Tras la hibridación, se retiró la sonda y el filtro se lavó durante 5 min a temperatura ambiente con la solución de lavado I, y durante 20 min a 65°C con la misma solución. Posteriormente se hicieron dos lavados de 20 min a 65°C, con la solución de lavado II. Después se envolvieron los filtros con una película transparente, para evitar que se secan. Finalmente, se expusieron a películas de autorradiografía Kodak X-OMAT K100 con pantallas intensificadoras, a una temperatura de -80°C.

Solución de hibridación: SSPE 5X; ficoll 400 0.2 %; polivinilpirrolidona 0.2 %; SDS 0.1 %; BSA 0.2 %; 50 % formamida.

Solución de lavado I: SSPE 2X; SDS 1 %.

Solución de lavado II: SSPE 0.2X; SDS 0.1 %.

SSPE 20X: NaCl 3 M; NaH₂PO₄ 0.2 M; EDTA 20 mM.

Nota: En experimentos de hibridación en condiciones menos restrictivas, el porcentaje de formamida usado en la solución de hibridación fue del 35 %

13.2. Hibridación de filtros con sonda no radiactiva

Se calentó la solución de prehibridación a 42°C y se añadió a un tubo de hibridación con la membrana. El tubo se mantuvo en agitación constante a 42°C durante 2 h como mínimo.

La sonda se desnaturalizó hirviéndola 10 min en H₂O y se paso rápidamente a hielo para enfriarla. La sonda se añadió a la solución de prehibridación y se hibridó durante toda la

noche a 42°C en agitación constante.

La membrana se lavó durante 5 min en solución de lavado I a temperatura ambiente. Seguidamente se lavó 15 min en solución de lavado II.

Se equilibró la membrana durante 1 min en tampón de lavado, y posteriormente, se pasó a un recipiente limpio con unos 70 ml de solución bloqueante, en la que se mantuvo durante 30-60 min. Transcurrido este tiempo, se eliminó la solución de bloqueante y se añadió el anticuerpo anti-DIG (3µl de anti-DIG en 30 ml de solución de bloqueo). Tras 30 min de incubación se eliminó el anticuerpo y se lavó la membrana 3 veces con tampón de lavado. Para la detección, se eliminó el tampón de lavado y se equilibró en tampón de detección durante 2 min. Seguidamente, la membrana se colocó en una lámina de acetato, se añadieron 30 µl de CSPD en 3 ml de tampón de detección y se tapó con otra lámina durante 5 min. De nuevo, la membrana se pasó a dos acetatos limpios, se sellaron con cinta adhesiva y se incubaron durante 15 min a 37°C. Pasado este tiempo, se expuso con películas Kodak X-OMAT K100 con pantallas intensificadoras, a -80°C.

Tampón maleico 10X: Ácido maleico 1 M; NaCl 1.5 M, pH 7.5

Reactivo de bloqueo 10X: Reactivo de bloqueo (Boehringer) al 10 % en tampón maleico. Se autoclava y se guarda a 4°C.

Solución de prehibridación: Formamida 50 %; SSC 5X; SDS 0.02 %; Reactivo de bloqueo 2 %.

Solución de lavado I: SSC 2X; SDS 0.1 %.

Solución de lavado II: SSC 0.5 %; SDS 0.1 %.

Tampón de lavado: Tampón maleico 100 mM; Tween[®]20 al 0.3 %.

Solución bloqueante: Reactivo de bloqueo 1 % (p/v) en tampón maleico 100 mM pH 7.5.

Solución de detección: Tris-HCl 100 mM pH 9.5; NaCl 100 mM.

14. Deshibridación de ácidos nucleicos

14.1. Sondas radiactivas

14.1.1. Por ebullición

Para rehibridar una membrana con una nueva sonda se eliminó la sonda con la que anteriormente se había hibridado ésta. Para ello se lavó con solución de deshibridación hirviendo, durante 15 min en agitación. En todo momento se evitó que se pudiera secar la membrana. Se repitió el lavado con solución nueva hirviendo, durante otros 15 min. Finalmente se lavó con SSC 0.01 X a temperatura ambiente. Para comprobar que la sonda se había eliminado, se envolvía la membrana húmeda en una hoja fina de plástico y se exponía a una película de rayos X.

Solución de deshibridación: Se calentó una solución de SSC 0.5 X; EDTA 0.01 M y una vez que hirvió

se añadió SDS hasta una concentración final de 0.1 %.

14.1.2. Método alcalino

Las membranas se lavaron 2 veces con SSPE 2X a temperatura ambiente durante 10 min. Luego se hicieron otros 2 lavados de 10 min a temperatura ambiente con tampón de deshibridación. Y para terminar, se volvieron a lavar 2 veces las membranas con SSPE 2X a temperatura ambiente durante 10 min.

Tampón de deshibridación: NaOH 0.1 M; SDS 0.1 %; Tris-HCl 10 mM; EDTA 1 mM.

14.2. Sondas no radiactivas

Las membranas se lavaron durante 1 min en H₂O y seguidamente se incubaron 2 veces en solución alcalina a 37°C, durante 10 min, para eliminar la sonda. Finalmente, la membrana se lavó enérgicamente con SSC 2X.

Solución alcalina: NaOH 0.2 M; SDS 0.1 %.

15. Extracción de proteínas de superficie por sonicación

Se rehidrata en H₂O 1 g de levadura de velo liofilizada y se lavan las células tres veces en tampón fosfato potásico 0.1 M, pH 7.5. A continuación se sonicán a 40 W, a 4°C durante 8 pulsos de 1 min, intercalando 1.5 min de pausa entre dos pulsos para que la temperatura no suba por encima de 50 °C. Se separan las células por centrifugación y se filtra el sobrenadante a través de filtros Millipore de 0.20 µm de diámetro de poro (este sobrenadante se denominó SOB F).

16. Detección de actividad proteasa en gel de caseína

Se preparan cajas de Petri con leche desnatada en polvo al 2.4% en tampón Tris-HCl 50 mM, gelificada con agarosa al 1.5%. Se coloca sobre el gel una gota del sobrenadante en el que se quiere detectar si existe actividad proteasa y se incuba durante 1 h. La actividad proteasa produce un halo de clareamiento en el medio.

17. Cuantificación de proteínas

17.1. Método de Bradford

La concentración de proteínas se midió por el método de Bradford (1976), usando el reactivo de tinción de proteínas de Bio-Rad. Se siguió el procedimiento de microensayo (1 a 20 µg proteína/ml) recomendado por dicha firma comercial. Como patrones de concentración

se usaron soluciones de seroalbúmina bovina (Sigma) 1-20 µg/ml. Se tomaron 200 µl de reactivo de Bradford, el volumen de muestra a medir y se completó con H₂O hasta 1 ml. Esta mezcla se incubó de 10 a 15 min a temperatura ambiente y se midió la absorbancia a 595 nm.

17.2. Método de Lowry

La determinación de proteína también se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Lowry *et al.* (1951) y modificado por Markwell *et al.* (1978). Se mezclaron: 500 µl de muestra o patrón; 150 µl de H₂O; 200µl de NaOH 1N; 1500µl de solución Lowry (9A:1B). Se incubó durante 15 min a 30°C y se añadieron 150 µl de solución fresca Reactivo de fenol según Folin-Ciocalteu (Merck, Alemania): H₂O (1:1). Se incubó durante 30 min a 30°C y seguidamente se midió la absorbancia a 750 nm. Como patrón se usó BSA desde 0 a 100 µg.

Solución A de Lowry: Na₂CO₃ 0.6 %; Tartrato sódico potásico tetrahidratado 0.075 %

Solución B de Lowry: CuSO₄·5·H₂O al 0.0644 %

18. Concentración y precipitación de proteínas

18.1. Eliminación de sales y moléculas pequeñas de las preparaciones proteicas

Las sales y moléculas pequeñas se eliminaron de las preparaciones proteicas mediante diálisis, utilizando membranas de celulosa Sigma de diámetro de poro medio de 2.4 nm y límite de exclusión de 8 a 15 kDa. Las membranas se hirvieron durante 10 min en una solución de NaHCO₃ 30 mM que contenía Na-EDTA 0.5 mM y se lavaron exhaustivamente con H₂O antes de su utilización.

Alternativamente y para volúmenes de hasta 2 ml se usaron columnas HiTrap™ (Pharmacia Biotech, Suecia), de Sephadex® G-25, una matriz de exclusión molecular para moléculas mayores de 5 kDa.

18.2. Precipitación de pequeños volúmenes de proteínas

La precipitación de pequeños volúmenes de proteínas se realizó en tubos Eppendorf añadiendo 1/10 de volumen de una solución de TCA al 100% (p/v) en H₂O a 4°C. La mezcla se incubó 10 min a 4°C y posteriormente se centrifugó en una centrífuga Eppendorf a su máxima velocidad durante 10 min. Se retiró el sobrenadante y el precipitado se lavó y centrifugó sucesivamente con etanol absoluto, etanol:éter dietílico 1:1 y etanol:éter dietílico 1:3, las tres soluciones a -20°C. El último precipitado se secó en una campana de flujo laminar. Generalmente estas precipitaciones se realizaron como paso previo a posteriores

electroforesis, por lo que el último precipitado se resuspendió en el volumen deseado de tampón de muestra, descrito en el apartado "Electroforesis de proteínas".

18.3. Precipitación de grandes volúmenes de proteínas

A la solución que se deseaba precipitar se le añadió sulfato amónico sólido hasta alcanzar un 80% de saturación a 4°C (51.6 g por cada 100 ml de solución) y la solución se dejó agitándose a esta temperatura 30 min después de alcanzar una completa disolución del sulfato amónico. El precipitado formado se recogió por centrifugación a 12000 g durante 30 min, y se resuspendió en el mínimo volumen posible de H₂O. La solución fue posteriormente dializada frente a 2 litros del tampón en el que se deseaba tener la preparación, a 4°C. La diálisis duró 24 h y a lo largo de ese tiempo se llevaron a cabo tres cambios del tampón.

18.4. Concentración de proteínas

Se usaron dos métodos para concentrar proteínas. Por un lado se utilizó la centrifugación y filtración simultáneas a través de filtros Centricon (Amicon Inc., EEUU) de menor tamaño de poro que las proteínas de interés. Por otro lado se liofilizaron muestras proteicas, previamente dializadas, reduciendo el volumen de la solución hasta el nivel deseado.

19. Cromatografía de filtración en gel

Se empleó una columna de vidrio calibrado K9/30 (Pharmacia, Suecia) conteniendo un lecho de 1 x 27 cm de Sephacril S-300HR (Pharmacia, Suecia). La columna se equilibró con tampón 20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 100mM NaCl. Las muestras, de 0.1 ml, se aplicaron directamente con la ayuda de una pipeta Pasteur tras haber llevado el menisco del eluyente hasta el límite superior del lecho. Una vez que la muestra había penetrado en el gel, la columna se volvía a completar con el eluyente y la cromatografía descendente, a 4°C, se desarrollaba a un flujo de 24 ml/min proporcionado por succión mediante una bomba peristáltica LKB Pump 1 (Pharmacia, Suecia) conectada a la salida de la columna. Se recogieron fracciones de 0.25 ml de forma automática, determinándose el volumen exacto de elución de cada muestra (V_e) por el peso del líquido correspondiente. El volumen de vacío (V_0) se estimó como el volumen de elución de una muestra conteniendo azul dextrano al 1% y el volumen total (V_t) con el de una muestra de flavín-mononucleótido (FMN) al 0.02%. Las proteínas utilizadas como marcadores de peso molecular para calibrar la columna fueron:

ferritina de páncreas de caballo (440 kDa), catalasa de hígado bovino (232 kDa), aldolasa de músculo de conejo (158 kDa), seroalbúmina bovina (67 kDa) y ovoalbúmina de gallina (45 kDa). Todos los marcadores se localizaron en las fracciones recogidas por su absorbancia a 280 nm. Para estimar el peso molecular de proteínas desconocidas, se procesaron los datos obtenidos de la cromatografía, representando $(-\log K_{av})^{1/2}$, donde $K_{av}=(V_e-V_o)/(V_t/V_o)$, en función del peso molecular.

20. Purificación de proteínas aglutinantes

Se partió de 200 ml de SOB F (ver apartado "Extracción de proteínas de superficie por sonicación") y se mezclaron enérgicamente con aire en una batidora Vitamix (Moulinex, España) hasta producir una espuma abundante. Se recogió la espuma en un tubo de vidrio (Corex, EEUU) y se centrifugó durante 20 min a 10000 rpm. Se recogió el sobrenadante y se dializó durante 24 h frente a 2,5 l de H₂O a 4°C, sustituyendo el H₂O cada 8 h. Seguidamente se liofilizó el sobrenadante dializado. Se trató el producto dializado con 1 ml de ácido trifluoroacético (TFA) y tras eliminarlo burbujeando N₂ sobre la muestra se resuspendió el precipitado en etanol al 60% (10 mg de producto en 3 ml de etanol al 60%) y se incubó a temperatura ambiente durante 12 h. Se centrifugó a 10000 rpm durante 20 min y se recogió el sobrenadante. A continuación se evaporó el etanol en una centrífuga de vacío. El precipitado se guardó a -20°C hasta su posterior utilización o se resuspendió en ácido trifluoroacético (TFA) para desagregar las proteínas purificadas. Finalmente se volatilizó el TFA burbujeando N₂ sobre la muestra. Antes de resuspender en tampón de muestra para correr electroforesis se neutralizó el pH con vapores de NH₄OH.

21. Electroforesis de proteínas

21.1. SDS-PAGE

Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, según el método descrito por Laemmli (1970). La separación de proteínas se llevó a cabo en un sistema discontinuo consistente en un gel de apilamiento al 4% y en un gel de separación al 12% de acrilamida. Las muestras se resolvieron a voltaje constante de 200 V en un equipo Mini Protean (Bio-Rad, EEUU) hasta que el azul de bromofenol alcanzó el borde inferior del gel (aproximadamente 45 min).

Solución concentrada A/B (acrilamida/bis-acrilamida): (30% T, 2.67% C) 29.2% acrilamida; 0.8% bisacrilamida. Se filtró, se desgasificó 15 min y se guardó en oscuridad, a 4°C.

Gel de apilamiento (4%): Tris-HCl 125 mM pH 6.8; SDS 0.1%; A/B 4% (3.8% acrilamida, 0.2%

bisacrilamida); APS 0.05%; TEMED 0.1%.

Gel de separación (12%): Tris-HCl 375 mM pH 8.8; SDS 0.1%; A/B 12% (11,68% acrilamida, 0.32% bisacrilamida); APS 0.05%; TEMED 0.05%.

Tampón de electroforesis: Tris 25 mM; glicina 194 mM; SDS 0.1%

Tampón de muestra (2x): Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8; glicerol 25%; SDS 2%; azul de bromofenol 0.1%; β -mercaptoetanol 5%

21.2. Tris-Tricina

Para la separación de proteínas de pequeño peso molecular se usó el método de electroforesis en Tris-Tricina descrito por Schägger y von Jagow (1987) Las proteínas se separaron en geles de poliacrilamida en presencia de SDS, en un sistema discontinuo consistente en un gel de apilamiento al 4% y en un gel de separación al 9,8% de acrilamida. Las muestras se resolvieron a voltaje constante de 150 V en un equipo SE410 (Amersham-Pharmacia Biotech, EEUU) hasta que el azul de Coomassie alcanzó el borde inferior del gel (4 ó 5 h)

Solución concentrada A/B (acrilamida/bis-acrilamida): (30% T, 2.67% C) 29.2% acrilamida; 0.8% bisacrilamida. Se filtró, se desgasificó 15 min y se guardó en oscuridad, a 4°C.

Gel de apilamiento (4%): Tris-HCl 0.75 M pH 8.45; SDS 0.1%; A/B 4%; APS 0.05%; TEMED 0.1%.

Gel de separación (9.8%): Tris-HCl 1 M pH 8.45; SDS 0.1%; glicerol 4% (p/v); A/B 9.8%; APS 0.05%; TEMED 0.05%.

Tampones de electroforesis: Tampón catódico (5x): Tris 0.5 M; tricina 0.5 M. Se añade SDS hasta 0.1% antes de usar. **Tampón anódico:** Tris-HCl 0.2 M pH 8.9.

Tampón de muestra: Tris-HCl 50 mM pH 6.8; glicerol 12%; SDS 4%; azul de Coomassie 0.1%; β -mercaptoetanol 2%.

22. Tinción de geles de proteínas

22.1. Tinción con azul de Coomassie

Inmediatamente después de la electroforesis, los geles se bañan durante 30 min en una solución de Azul de Coomassie (Coomassie brillant blue R-250) 0.25% en 40% metanol, 10% ácido acético a temperatura ambiente. Los geles se destiñen con varios lavados en 40% metanol, 10% ácido acético, durante 1 a 3 h.

22.2. Tinción con nitrato de plata

Inmediatamente después de la electroforesis, los geles se bañan secuencialmente en las siguientes soluciones: durante 30 min en una solución 50% metanol, 10% ácido acético; durante 30 min en una solución 10% etanol, 5% ácido acético; durante 5 min en solución de

dicromato potásico (0.08% dicromato potásico, 0.018% ácido nítrico); cuatro veces durante 2 min en H₂O. A continuación se tiñe el gel durante 20 ó 30 min en una solución de 0.2% nitrato de plata. Después de lavar durante 30 s en H₂O, el gel se revela en tres lavados con solución 3% Na₂CO₃, 0.05% formaldehído. El revelado se detiene bañando el gel en solución de ácido acético al 7%.

23. Manipulación de genotecas de fagos

23.1. Preparación de *E. coli* LE392 para transducción

Se cultivó *E. coli* LE392 en 3 ml de medio LB durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente, se inocularon 100 ml de LB suplementado con MgSO₄ 10 mM y maltosa 0.2 % con 1 ml de preinóculo, y se incubaron a 37°C hasta que el cultivo alcanzó una OD₆₀₀= 0.3-0.4. Se centrifugó durante 10 min a 4000 rpm y el precipitado de células se resuspendió en 25ml de MgSO₄ 10 mM frío y se guardó a 4°C. Las células se pudieron utilizar para la infección durante las dos semanas siguientes.

23.2. Infección de células de *E. coli* con el bacteriófago lambda

Para realizar la infección se pusieron en contacto 100 µl de la suspensión de células LE392 preparadas según se describe en el apartado anterior, con 50 µl de fagos convenientemente diluidos en tampón SM. Esta mezcla se incubó a 37°C durante 30 min. Una vez transcurrido este tiempo, la mezcla de infección se añadió a tubos con 3 ml de LB con 0.7% de agarosa precalentado a 45°C. Los tubos se mezclaron bien y se extendieron como agar de cobertera sobre cajas de Petri con medio LB suplementado con maltosa y MgSO₄. Estas cajas se incubaron invertidas a 37°C hasta que aparecieron las calvas de lisis (10-15 h).

23.3. Multiplicación del bacteriófago lambda en medio sólido

Con la parte más estrecha de una pipeta Pasteur se recortó el fragmento de agar que llevaba la placa de lisis que se deseaba amplificar y se introdujo en un tubo Eppendorf con 500 µl de tampón SM y 10 µl de cloroformo. Se agitó en un agitador de mesa y se mantuvo a 4°C durante 2-4 h para permitir la difusión de los fagos. Una vez que hubieron difundido, se infectaron 100 µl de bacterias como se describe en el apartado anterior. A las placas con calvas confluyentes se le añadieron 10 ml de tampón SM si eran de 15 cm de diámetro y 5 ml

si se trataban de cajas de 10 cm. Las cajas se agitaron suavemente durante al menos 5 h a 4°C, para permitir la difusión de los fagos al tampón, aunque normalmente, se dejaron toda la noche en agitación. El tampón SM recogido de la amplificación se pasó a un tubo de centrifuga de 40 ml. Se añadió cloroformo al 2% (v/v), se mezcló bien y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min. El sobrenadante obtenido se tituló mediante infección de la cepa LE392 con diluciones seriadas de la suspensión de fagos.

23.4. Extracción de ADN de fagos

La suspensión de fagos obtenida en la amplificación se trató con ARNasa y ADNasa a una concentración final de 1µg/ml y 10 µg/ml, durante 30 min a 37°C, para eliminar todos los restos de ácidos nucleicos de bacterias. Los fagos se precipitaron incubando en hielo con 1 volumen de PEG-NaCl durante al menos 1 h y posteriormente centrifugando a 11000 rpm a 4°C, durante 20 min. Se eliminó el sobrenadante y se secó el precipitado dejando el tubo invertido sobre papel absorbente. El precipitado se resuspendió en 1 ml de tampón TNM por cada 10 ml de lisado de partida y se lavaron bien las paredes del tubo agitando suavemente. Se extrajo el ADN añadiendo 1 volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25:24:1), se mezcló y se centrifugó a 5000 rpm. Se volvió a fenolizar la fase acuosa y se añadió 1 volumen de isopropanol, dejando la mezcla durante 20 min a -80°C. Tras centrifugar 10 min a 12000 rpm y 4°C, se lavó con etanol 70%. El precipitado se dejó secar y se resuspendió en 50-100 µl de TE.

PEG-NaCl: PEG 8000 al 20% y NaCl 2 M. Se disuelven ambos compuestos en H₂O a 60°C.

Tampón SM: Gelatina 0.01 % (p/v); MgSO₄ 8 mM; NaCl 100 mM; Tris-HCL 50 mM pH 7.5.

Tampón TNM: Tris-HCl 20 mM pH 7.5; NaCl 100 mm; MgSO₄ 10 mM

24. Extracción de ADN plasmídico de *E. coli*.

Se realizó siguiendo el protocolo descrito por Bolívar y Backman (1979). Se partió de 1.5 ml de cultivo bacteriano. Las células se recogieron por centrifugación y resuspendieron en 100 µl de Solución I. Tras 5 min a temperatura ambiente se añadieron 200 µl de Solución II, se mezcló el tubo varias veces por inversión y se incubó durante 5 min en hielo. Seguidamente se añadieron 150 µl de Solución III y se mantuvo la mezcla durante 5 min en hielo. Los restos celulares se eliminaron por centrifugación y el sobrenadante se mezcló con un volumen de fenol: cloroformo: isoamílico (25: 24: 1). El ADN presente en la fase acuosa se precipitó con NaCl 0.3 M y dos volúmenes de etanol 96%, se lavó con etanol 70 % y se

resuspendió en 50 μ l de TE 1X.

Solución I: Glucosa 50 mM; Tris 25 mM pH 8.0 y EDTA 10 mM pH 8.0.

Solución II: NaOH 0.2 M; SDS 1 %.

Solución III: Acetato potásico 3 M; ácido acético glacial 11.5%.

25. Preparación de bacterias competentes para transformación

25.1. Método mediado por TSS

Se prepararon los cultivos siguiendo el protocolo descrito por Chung *et al.* (1989) que permite obtener niveles suficientemente elevados de competencia para manipulaciones sencillas. Este método se utilizó fundamentalmente cuando se querían transformar cepas bacterianas distintas de *E. coli* DH5 α . Se partió de un cultivo de 100 ml de *E. coli*. Una vez las bacterias alcanzaron una DO_{600nm} de 0.5 se enfriaron rápidamente y se recogieron por centrifugación a 5000 rpm a 4°C, durante 10 min. Las células se resuspendieron en 10 ml de TSS y se repartieron en alícuotas de 400 μ l/tubo. Las células competentes pueden ser usadas inmediatamente o conservarse a -70°C, congelándose rápidamente con N₂ líquido.

TSS: Medio LB suplementado con PEG 3350 ó 8000 al 10 % (p/v); DMSO 5 % (v/v); MgCl₂ 20-50 mM.

El pH se ajusta a 6.5 con HCl o NaOH.

25.2. Método mediado por CaCl₂

Se inocularon 3 ml de medio LB con la cepa DH5 α y se dejó crecer durante toda la noche a 37°C. Al día siguiente se diluyó 1 ml de preinóculo en 200 ml de medio SOB precalentado a 22°C y se incubaron a 22°C hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.6 (de 18 a 20 h). El medio se dejó enfriar en hielo durante 10 min. Las células se centrifugaron a 4000 rpm, a 4°C, 10 min, en tubos de centrífuga preenfriados. Las células precipitadas se resuspendieron suavemente en 20 ml de TB frío. Seguidamente se añadieron 60 ml de TB frío, se mezcló y se dejó en hielo durante 10 min. Pasado este tiempo, las células se centrifugaron a 4000 rpm, 10 min, 4°C y se resuspendieron suavemente en 20 ml de TB frío. Una vez resuspendidas se añadió muy lentamente y mezclando 1.5 ml de DMSO (dimetilsulfóxido). Finalmente, las células competentes se dejaron en hielo durante 10 min, se repartieron en alícuotas de 200 μ l que se congelaron con nitrógeno líquido y se guardaron a -80°C.

SOB: Bacto-triptona 20 g/l; extracto de levadura 5 g/l; NaCl 0.5% (p/v), pH 7.5. Inmediatamente antes de ser utilizado se añaden 20 ml de MgSO₄ 1 M.

TB: PIPES 10 mM; CaCl₂.2H₂O 10 mM; KCl 250 mM; Se ajusta a pH 6.7 (con KOH ó HCl según el tipo de PIPES); MnCl₂.4H₂O 55 mM. Se esteriliza por filtración.

26. Transformación de bacterias

Se realizó siguiendo el método descrito por Hanahan (1983) y modificado por Inoué *et al.* (1990). Las células competentes se descongelaron lentamente en hielo. Una vez descongeladas, se mezclaron 90 μl de células competentes con 50-100 ng de ADN (en un volumen máximo de 10 μl) y se incubaron en hielo durante 20 min, tras los cuales se dió un choque térmico a 42°C durante 45 seg. A continuación se enfriaron rápidamente en hielo durante unos 2 min. Para permitirles desarrollar la resistencia al antibiótico, si el marcador de resistencia lo requiere, se añadieron 800 μl de medio LB a las células y se incubaron durante 45 min, a 37°C y agitación a 250 rpm. Se sembraron alícuotas de distinto volumen en placas de medio LB con el antibiótico adecuado y se incubaron a 37°C hasta que se observaron colonias.

Concentración de stock de antibióticos: 100 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de ampicilina

27. Curvas de crecimiento de levaduras

Se inocularon tubos de 25 ml conteniendo 10 ml del medio de cultivo utilizado en cada caso a $\text{DO}_{660\text{nm}} = 0.05$ y se incubaron a la temperatura deseada. Se siguió el incremento de la $\text{DO}_{660\text{nm}}$ hasta que el cultivo alcanzó la fase estacionaria. La tasa máxima de crecimiento (μ) se determinó a partir del tiempo medio de duplicación (tiempo de generación, τ) durante el aumento exponencial de la turbidez, donde $\mu = \ln 2 / \tau$

28. Viabilidad celular en cultivos de levadura

28.1. Siembra en caja

A partir del conteo de células totales en cámara de conteo Bürker, se diluyeron los cultivos para sembrar entre 250-500 células por caja. Una vez esparcidas las células, se incubaron las cajas a 30°C hasta que se observaron las colonias a simple vista (normalmente 2 días). La viabilidad celular se estimó como porcentaje de unidades formadoras de colonias (UFC) respecto del total de células sembradas.

28.2. Tinción con azul de metileno

Las levaduras se tiñeron con azul de metileno, añadiendo a la suspensión celular un volumen de solución de azul de metileno 0.2 g/l en tampón fosfato sódico-potásico pH 4.5 (KH_2PO_4 6 g/l; Na_2HPO_4 0.071 g/l) y se observaron rápidamente al microscopio óptico.

29. Conjugación de levaduras

Para llevar a cabo la conjugación de cepas haploides de distinto sexo se mezcló una colonia de cada cepa con un asa de siembra sobre una caja de medio rico YPD y se incubó a 30°C al menos durante 5 h. Para seleccionar el conjugante, se sembraron células aisladas sobre medio selectivo para el diploide y se incubó a 30°C hasta la aparición de colonias. Cuando alguna de las cepas a conjugar no era haploide y de sexo opuesto al otro parental se alargó el tiempo de conjugación en YPD hasta 24 h, dando tiempo a que se produzcan algunos eventos de conjugación (apareamiento forzado).

30. Fusión de protoplastos

Alternativamente al apareamiento forzado se intentó la fusión de protoplastos como método de conjugación. Se inocula cada cepa en 100 ml de medio rico YPD y se incuban a 30°C hasta $DO_{660nm} = 0.5-0.7$, se recogen las células centrifugando durante 5 min a 6000 rpm. Se lavan los cultivos con H₂O y se resuspenden en 10 ml de sorbitol 1 M. Se añaden 500 µl de β-mercaptoetanol y se incuban a 30°C y agitación suave durante 15 min. A continuación se lavan y resuspenden las células en 10 ml de sorbitol 1 M. Se añaden 150 µl de sorbitol 1 M conteniendo 0.5 mg de Zimoliasa 20T y se incuban a 30°C y agitación suave durante 30-45 min. Se recogen las células centrifugando a 2000 rpm durante 7 min y se lavan con 10 ml de sorbitol 1 M. Se resuspenden juntas las células de las dos cepas a conjugar en 2 ml de solución de fusión y se incuban a 30°C y agitación suave durante 30 min. Seguidamente se recogen las células por centrifugación a 2000 rpm durante 7 min, se lavan en sorbitol 1 M y se resuspenden e incuban a 30°C y agitación suave durante 90 min en 0.5 de medio SOS-Cl₂Ca. Finalmente se siembran alícuotas de 100 µl sobre cajas de medio selectivo para el conjugante, osmoestabilizado con sorbitol 1 M, mediante 5 ml de agar de cobertera, también osmoestabilizado y mantenido a 45°C.

Solución de fusión: 40% PEG 4000; 10 mM Cl₂Ca; 10mM Tris-HCl pH 7.5. Se disuelven 40 g de PEG4000 en 89 ml de H₂O y se autoclava. Se añaden 10 ml Cl₂Ca 100 mM y 1 ml Tris-HCl 1 M pH 7.5

Medio SOS-Cl₂Ca: Extracto de levadura 1%; bacto-peptona 2%; glucosa 2%; 10 mM Cl₂Ca; 1 M sorbitol.

31. Transferencia de mitocondrias

La transferencia de mitocondrias a las esporas rho⁻ de la cepa IFI256 se llevó a cabo mediante conjugación de cada espora con la cepa K5-5c (*MATα his4Δ-15 ade2-1 can1*

kar1-1 Cyh^R), portadora de las mitocondrias a transferir y deficiente en cariogamia (esta cepa porta las mitocondrias de la cepa de laboratorio S288C). Como producto de la conjugación (por apareamiento forzado) se formaron heterocariontes, que fueron seleccionados en medio mínimo SG, a partir del cual se seleccionaron clones heteroplasmontes (por su incapacidad para crecer en medio mínimo SG con cicloheximida 2 mg/ml) que contenían el núcleo de las esporas de IFI256 y las mitocondrias de la cepa K5-5c.

32. Esporulación de levaduras

Se inoculó cada estirpe en 5 ml de medio de preesporulación (ver apartado "Medios de cultivo") y se incubaron a 30° C hasta fase estacionaria temprana (12-18 h). Se lavaron los cultivos con H₂O y se transfirieron a 5 ml de medio de esporulación, incubándose a 22° C hasta la aparición de ascas (a partir de los 3 días). Alternativamente se usaron medios sólidos y en este caso se transfirió una colonia directamente desde el medio de preesporulación al de esporulación, con la ayuda de un palillo estéril. Los medios de preesporulación y esporulación variaron, dependiendo de la estirpe a esporular y se indicará oportunamente en cada caso.

33. Tinción diferencial de esporas y células vegetativas de levaduras

Se siguió el protocolo descrito por Sherman *et al.*, (1986). Se extendió una gota de la suspensión de levaduras en el portaobjetos y se dejó secar. Se incubó 1 min en una solución de verde malaquita al 5 % en un baño a 70-80°C. Se lavó con H₂O y seguidamente se incubó durante otro min a temperatura ambiente en una solución de safranina O al 0.5 %. Se lavó de nuevo con H₂O, y se cubrió con un cubreobjetos, observándose al microscopio antes de que se secase la preparación.

34. Micromanipulación de esporas

Para llevar a cabo la micromanipulación de esporas se utilizó un sistema MSM Serie 200 (Singer Instruments, Reino Unido), que consta de microscopio y sistema de micromanipulación automático. Los cultivos esporulados sobre medio sólido se incubaron de 2 a 4 min en una solución 2mg/ml de Zimoliasa 20T (US Biological, EEUU), para llevar a cabo la digestión de la pared del asca. Se para la digestión diluyendo el cultivo en 10 volúmenes de H₂O. Se extiende una gota sobre la caja de micromanipulación (medio YPAD) y tras micromanipular las esporas se incubaba a 30°C hasta la aparición de colonias visibles.

35. Mutagénesis con etilmetanosulfonato (EMS)

Se cultivó la cepa a mutagenizar en 10 ml de medio rico YPD y se incubó a 30° C hasta fase estacionaria. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron y se resuspendieron en 2 ml de tampón fosfato sódico 0.1 M pH 7.0. Se determinó la viabilidad del cultivo por siembra en caja y a 1 ml de la suspensión celular se añadieron 30 µl de EMS. La mezcla se incubó a 30° C durante 1 h con agitación ocasional. Para detener el efecto mutagénico del EMS se añadieron 5 ml de tiosulfato sódico al 5% por cada 0.55 ml de suspensión con EMS. Se hicieron diluciones 10^{-2} , 10^{-3} y 10^{-4} y se sembraron 0.1 ml de estas diluciones en cajas del medio apropiado para seleccionar los mutantes de interés.

36. Transformación de levaduras mediada por acetato de litio

Se realizó siguiendo el método de Ito *et al.* (1983) con las modificaciones de Schiestl y Gietz (1989). Las células competentes se obtuvieron a partir de cultivos de *S. cerevisiae* incubados hasta una DO_{660nm} de 0.4-0.6. Las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con H₂O y con una solución de acetato de litio (LiAc-TE) preparada en el momento a partir de TE 10x y LiAc 10x, para resuspenderse finalmente en solución LiAc-TE a una concentración de 2×10^9 células/ml. La transformación se realizó añadiendo a 50 µl de células competentes 50-100 ng de ADN plasmídico y 5 µl de ADN de esperma de salmón (10 mg/ml). A esta mezcla se le añadieron 0.3 ml de PEG4000 40 % (p/v) en LiAc-TE. Tras incubar 30 min a 30°C con agitación, se dio un choque térmico a 42°C durante 15 min. Finalmente las células se lavaron dos veces con H₂O y sembraron en el medio selectivo adecuado.

TE 10x: Tris-HCl 0.1 M; EDTA 0.01 M pH 7.5. Se esteriliza por filtración.

LiAc 10x: LiAc 1 M. Ajustar a pH 7.5 con ácido acético. Se esteriliza por filtración.

PEG 40 % en LiAc-TE: Preparada en el momento a partir de PEG 4000 al 50 % en H₂O, TE 10x y LiAc 10x.

ADN de esperma de salmón: El ADN de esperma de salmón (Sigma D-1626 tipo III) se deja a una concentración de 10 mg/ml en TE y a 4°C durante toda la noche para que se disuelva. Se sonica con dos pulsos de 9 seg a 100 W para obtener fragmentos de un tamaño medio de 7 kb, en un intervalo de 15 a 2 kb). Se trata una vez con fenol y otra vez con cloroformo. Se precipita con 1/10 de volumen de NaAc pH 6.0 y 2 volúmenes etanol. Se resuspende en TE hasta una concentración final de 10 mg/ml. Finalmente, se reparte en alícuotas y se desnaturaliza, hirviendo durante 10 min y enfriando rápidamente en hielo.

37. Extracción de ADN de levaduras

Se siguió el protocolo descrito por Sherman *et al.* (1986). Se partió de 5 ml de cultivo en fase estacionaria temprana. Se recogieron las células por centrifugación, se lavaron con H₂O y se resuspendieron en 0.32 ml de solución de 0.9 M sorbitol, 0.1 M EDTA. Después se añadieron 3.2 µl de β-mercaptoetanol y 10 µl de Zimoliasa 20-T 15 mg/ml. Tras incubar 60 min a 37°C, la mezcla se centrifugó 20 seg y el precipitado se resuspendió en 0.37 ml de Solución cóctel a la cual se añadieron 16 µl de SDS 10 % y 1 µl de dietil-pirocarbonato (DEPC). Tras incubar 30 min a 65°C, los restos de membranas celulares se precipitaron añadiendo 85 µl de solución III e incubando durante al menos 1 h en hielo. Tras centrifugar 15 min y recuperar el sobrenadante, el ADN se trató con ribonucleasa y, tras fenolización, se precipitó con 1/10 del volumen de NaCl 2.5 M y 2.5 volúmenes de etanol 96 %, se lavó con etanol 70 % y se resuspendió en 50 µl de TE.

Solución de sorbitol: Sorbitol 0.9 M; EDTA 0.1 M pH 8.0.

Solución cóctel: EDTA 20 mM pH 8.0; Tris-HCl 50 mM pH 8.0.

Solución III: Acetato potásico 3 M, ácido acético glacial 11.5%.

38. Polimorfismo de restricción de ADN mitocondrial

Se inocularon 5 ml de medio rico YPD con cada una de las cepas a tratar y se incubaron a 26-28°C toda la noche. Se centrifugaron los cultivos durante 10 min a 3000 rpm y se retiró el sobrenadante. Se lavaron los precipitados con H₂O. Se resuspendió el precipitado en 500 µl de Solución I (sorbitol 0,9 M, 0,1 M EDTA), se añadieron 30 µl de Zimoliasa 20T 1mg/ml y se pasó a un tubo Eppendorf de 2 ml. Se incubó 20 min a 37°C y tras centrifugar 1 min a 7000 rpm se desechó el sobrenadante. Se añadió al precipitado 0.5 ml de solución II (Tris 50 mM, EDTA 20 mM pH 7.5) y se resuspendió con la ayuda de una pipeta automática. Se añadieron 13 µl de SDS 10%, se homogenizó en agitador de mesa y se incubó durante 5 min a 65°C. Se añadieron 200 µl de acetato potásico 5 M y se incubó en hielo durante 5 min. Se centrifugó durante 15 min a 13000 rpm a 4°C y se pasó el sobrenadante (700 µl) a un nuevo Eppendorf que contenía 700 µl de isopropanol. Se agitó suavemente y se mantuvo 10 min a temperatura ambiente. Se centrifugó 10 min a 13000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se añadieron 0.5 ml de etanol 70 % enfriado a -20°C, se centrifugó 5 min a 13000 rpm y se eliminó el sobrenadante. Se secó el precipitado al vacío o en campana de flujo laminar y se resuspendió en 30 µl de TE pH 8.0. Las reacciones de restricción se llevaron a cabo durante 12 h a 37°C (10 µl solución ADN; 10 U de enzima de restricción; 2 µl tampón de restricción 10x; 7 µl H₂O).

Solución I: D-sorbitol 1 M; EDTA 100 mM pH 7.5

Solución II: Tris 50 mM; EDTA 20 mM pH 7.5

39. Cuantificación de ADN por citometría de flujo

Se tomó 1 ml de un cultivo en fase exponencial de crecimiento ($DO_{660nm} = 0.5$), se centrifugaron las células, se lavaron en H_2O y se resuspendieron en 1 ml de etanol al 70%, incubándose a $-20^{\circ}C$ durante 30 min. Se tomaron 20 μl de esta muestra y se resuspendieron en 1 ml de citrato sódico 50 mM, se centrifugó y el precipitado se resuspendió en 0.5 ml del mismo tampón, conteniendo ribonucleasa A (100 $\mu g/ml$). Después de incubar durante 2 h a $37^{\circ}C$ se añadió a la muestra 0.5 ml de citrato sódico 50 mM conteniendo ioduro de propidio (4 $\mu g/ml$) (Sigma, España) y se incubó a temperatura ambiente durante 30 min. A continuación se sonicaron las células brevemente para desagregarlas y se midió el contenido en ADN, utilizando para ello un equipo FACScan (Becton & Dickinson, EEUU). El contenido en ADN se determinó midiendo la fluorescencia emitida por el ioduro de propidio intercalado en el mismo, al ser excitado por el láser del citómetro de flujo.

40. Mapeo cromosómico de marcadores recesivos

Para poder localizar un alelo recesivo en un determinado cromosoma de *S. cerevisiae* se utilizó un sistema basado en Falco et al (1983). El método utiliza un conjunto de cepas cir° , cada una de ellas conteniendo ADN plasmídico integrado en el centrómero de un cromosoma diferente. Este ADN deriva del plásmido YEp24, y contiene el gen URA3, las secuencias repetidas invertidas del plásmido de 2μ , secuencias del plásmido pBR322 y diferentes fragmentos de regiones centroméricas del cromosoma en el que se produce la integración. Este ADN permanece integrado en las cepas cir° , dado que al no poseer plásmido de 2μ , carecen del gen FLP necesario para la recombinación específica entre las secuencias repetidas de la integración. La pérdida específica del ADN plasmídico junto con el cromosoma donde está integrado se induce en un diploide cir°/cir^{+} , gracias a que la integración ocurre en el centrómero del cromosoma (Falco et al. 1982, 1983) y a que la función FLP aportada por el parental cir^{+} cataliza el evento de recombinación necesario. Un clon de cada diploide se cultiva en medio no selectivo (SC-Ura) para permitir la pérdida del cromosoma que lleva la integración y se siembran varios cientos de colonias aisladas, que posteriormente se replican a medio selectivo para la expresión de la mutación a mapear. Cada diploide pierde uno de los 16 cromosomas del parental cir° con alta frecuencia, pero la mutación recesiva solamente se manifiesta en el diploide que contiene la cepa cir° en la que la

integración se da en el mismo cromosoma que el gen a mapear.

41. Medida de hidrofobicidad superficial

41.1. Método del tolueno

Se cultivaron las cepas hasta el estado fisiológico en el que se pretenda conocer la hidrofobicidad superficial y se lavaron los cultivos en tampón fosfato potásico 0.5 M, pH 7.5 (previamente a cualquier tratamiento se lavaron las células en el tampón en el que éste se llevaría a cabo). Se sometieron las muestras a los tratamientos de pared previstos, se agitaron las muestras y se centrifugaron para desechar los sobrenadantes. Se lavaron los precipitados con 5 ml de tampón fosfato potásico 0.5 M, pH 7.5 y se resuspendieron en ese tampón a $DO_{660nm} = 0.5$.

Se tomaron 2 ml de cada muestra para cada determinación de hidrofobicidad y se pusieron en un tubo resistente a solventes orgánicos. Se añadieron sin mezclar con la fase acuosa 2 ml de tolueno. Para cada condición se hicieron tres o cuatro determinaciones con el fin de calcular la media de todas ellas. Se agitó durante 2 min en un agitador de mesa (las condiciones de agitación se determinaron empíricamente para conseguir unos valores de hidrofobicidad no demasiado extremos y se aplicaron entonces para todas las muestras a comparar). Se tomó con una pipeta Pasteur al menos 1 ml de la fase acuosa inferior y se determinó la DO_{660nm} de la muestra recogida.

Se calculó el porcentaje de hidrofobicidad superficial como $100 \times (1 - DO_r / DO_i)$, donde, DO_r es la media de las determinaciones de DO_{660nm} de las fases acuosas después de agitar con el tolueno y DO_i es la DO_{660nm} de la muestra, antes del tratamiento con tolueno.

41.2. Método basado en la unión a poliestireno

Se cultivó la cepa hasta el estado fisiológico en el que se pretendía conocer la hidrofobicidad superficial y se lavaron los cultivos en tampón fosfato potásico 0.5 M, pH 7.5 (previamente a cualquier tratamiento se lavaron las células en el tampón en el que éste se llevaría a cabo). Se sometieron las muestras a los tratamientos de pared previstos, se agitaron las muestras y se centrifugaron para desechar los sobrenadantes. Se lavaron los precipitados con 5 ml de tampón fosfato potásico 0.5 M, pH 7.5 y se resuspendieron en ese tampón a $DO_{660nm} = 0.5$.

Se tomó 1 ml de cada muestra para cada determinación de hidrofobicidad y se depositó sobre una caja de poliestireno cristalino (caja de Petri). Se dejaron decantar las células durante 5

min y se recogió el sobrenadante. Se añadió 1 ml de tampón en el lugar donde se depositaron las células y se sometió a agitación orbital durante 5 min. Finalmente se recogió el sobrenadante y se midió la densidad óptica residual (DO_r). Para cada condición se hicieron tres o cuatro determinaciones con el fin de calcular la media de todas ellas. Se determina la hidrofobicidad superficial de la misma forma que con el método anterior.

42. Ensayos de aglutinación sobre levaduras

Se cultivó la cepa que se deseaba ensayar en medio rico YPD hasta fase de crecimiento adecuada, se lavó con tampón fosfato potásico 0.1 M. pH 7.5 y se resuspendió en este mismo tampón a una concentración celular aproximada de 1.5×10^9 cel/ml. Para el ensayo de aglutinación se hizo una dilución 1:50 de esta suspensión en el sobrenadante cuya capacidad aglutinante se quiere comprobar (usualmente se diluyeron 10 μ l de la suspensión celular en 500 μ l del sobrenadante).

43. Curvas de acidificación

Se cultivó la levadura hasta las fases de crecimiento adecuadas en las condiciones descritas previamente. Se centrifugaron los cultivos, se lavaron 2 veces con H_2O y se resuspendieron los precipitados en 3 ml de H_2O . Se tomaron 0.5 ml de la suspensión y se mezclaron en un tubo de vidrio de 20 ml con 0.5 ml de glucosa al 20 % y 4 ml de H_2O o de etanol al 2.5, 5, 7.5, 10% para concentraciones finales de 0, 2, 4, 6 y 8% de etanol. La mezcla se incubó a 30°C con agitación y se midió el pH de la mezcla de manera continua durante los primeros 8 min de incubación. Al cabo de 2 h de incubación se midió el pH de la mezcla (pH_f). Para determinar el peso seco de la suspensión se tomó 0.5 ml y se secó sobre un trozo de papel de aluminio previamente tarado, durante 12 h y a 105°C.

Con las medidas de pH a lo largo de los primeros 8 min se representaron las curvas de acidificación para cada cepa y medio de cultivo.

Con las medidas de pH_f frente a los porcentajes de etanol en los ensayos de acidificación se representaron las rectas de regresión para cada cepa en los diferentes medios de cultivo.

Resultados

1. Selección y mejora de una cepa vínica para fermentación

En el proceso de elaboración de los vinos de Jerez se pueden distinguir dos fases bien diferenciadas en las que intervienen distintas cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*. Como ya se describió en la introducción de este trabajo, la primera fase (la fermentación del mosto de uva) es dirigida por una cepa seleccionada que se usa como pie de cuba. En esta fase es fundamental que la cepa utilizada inicie con rapidez la fermentación y lleve a cabo la misma con gran velocidad. A la vez, es necesario que produzca toda una serie de metabolitos secundarios importantes para las características organolépticas del vino, y es interesante destacar en esta fase la formación de alcoholes superiores como el n-propanol (originado a partir del ácido acético y del ácido pirúvico), iso-butanol e iso-amílicos (procedentes de los cetoácidos correspondientes originados en las vías de síntesis o degradación de los aminoácidos) (Pérez, 1979).

La introducción de una nueva cepa en la fermentación dirigida de los mostos de Jerez, distinta en origen, en características metabólicas, etc. a las utilizadas habitualmente como pie de cuba, daría como resultado un vino con un perfil organoléptico muy distinto al obtenido actualmente. En este hecho se basa la primera parte del trabajo, consistente en la selección, mejora y prueba de vinificación de una nueva cepa vínica para la fermentación de mosto de 1ª yema de uva de la variedad Palomino Fino. El perfil organoléptico de los vinos "jóvenes" de Jerez es relativamente bajo y necesitan largos periodos de crianza para adquirir las características por las que son apreciados. La introducción de una cepa productora de mayores cantidades de los compuestos secundarios que son valorados positivamente en las características del vino, podría hacer que el tiempo de crianza fuera menor o incluso podría permitir la comercialización de un vino joven, sin crianza, añadiéndose a los comercializados actualmente.

Como punto de partida y formando parte de un trabajo anterior a esta tesis, se procedió por parte de otros miembros del grupo a la selección y mejora de una levadura vínica adecuada para los fines pretendidos. Las características más destacables de la cepa vínica IFI256 se muestran en la Tabla R-1. Esta cepa es un aislamiento natural de la fermentación de vino de denominación de origen Albariño en el Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid. Como características destacables presenta una alta tasa de crecimiento en medios YPD e YPF (Martínez-Force y Benítez, 1995), cuyas fuentes de carbono son glucosa y fructosa respectivamente, y que son a la vez los dos azúcares principales del mosto de uva. Esta cepa tiene además bajas frecuencias, tanto espontánea como inducida, de

aparición de mutantes “petite”(Jiménez y Benítez, 1988) y produce altas concentraciones de etanol tanto a 22 como a 37°C (Benítez et al., 1983). Por último, presenta buena resistencia a altas temperaturas, de manera que puede seguir dividiéndose por encima de 40°C en medio rico YPD y por encima de 27°C en medio YPD suplementado con 10% de etanol (Jiménez y Benítez, 1988).

Tabla R-1 Características fisiológicas de la cepa vínica IFI256

Característica	Medio de cultivo	Valor	Referencia⁽¹⁾
Tasa máxima de crecimiento (μ)	YPD	0.42	1
Tasa máxima de crecimiento (μ)	YPF	0.41	1
Producción de etanol a 22°C (%)	YPD+50% sacarosa	13.6-14	2
Producción de etanol a 37°C (%)	YPD+50% sacarosa	11.8	2
Mutantes “petite” (%)	YPD	0.5	3
Mutantes “petite” (%)	YPDE8	2.9	3
T ^a máxima de crecimiento (°C)	YPD	40.5	3
T ^a máxima de crecimiento (°C)	YPDE10	27.7	3

⁽¹⁾1, Martínez-Force y Benítez, 1995; 2, Benítez et al., 1983; 3, Jiménez y Benítez, 1988

A partir de la cepa vínica IFI256 se obtuvieron por cultivo continuo cepas superproductoras de aminoácidos de cuyas rutas derivan alcoholes superiores importantes para las características organolépticas del vino (Martínez-Force y Benítez, 1992). Estas cepas superproductoras se denominan IFI256-1977 e IFI256-1978. Tanto las cepas como el método de obtención de las mismas se encuentran bajo la patente “Procedimiento para la selección de levaduras superproductoras de aminoácidos”, número de registro P9301641.

Tabla R-2 Concentraciones intracelulares (mM) de aspártico, homoserina, treonina, metionina y S-adenosil metionina en las cepas IFI256 e IFI256-1978

	IFI256	IFI256-1978⁽¹⁾
Asp	3,2 (1)	2,9 (0,91)
Hom	<0,1 (1)	142 (1420)
Thr	5,8 (1)	214 (37)
Ile	1,2 (1)	5,1 (4,2)
Met	0,2 (1)	3,5 (17,5)
Ado-Met	3,1 (1)	5,3 (1,7)

⁽¹⁾ Entre paréntesis aparecen los valores relativos de la cepa IFI256-1978 con respecto a los de la cepa silvestre

Como puede verse en la Tabla R-2, la cepa IFI256-1978 sintetiza mayores cantidades de los aminoácidos treonina e isoleucina que la cepa de partida IFI256, y de las rutas de

síntesis y degradación de estos aminoácidos derivan el isobutanol y los alcoholes isoamílicos (Figura R-1), compuestos secundarios que confieren características organolépticas deseables a los vinos.

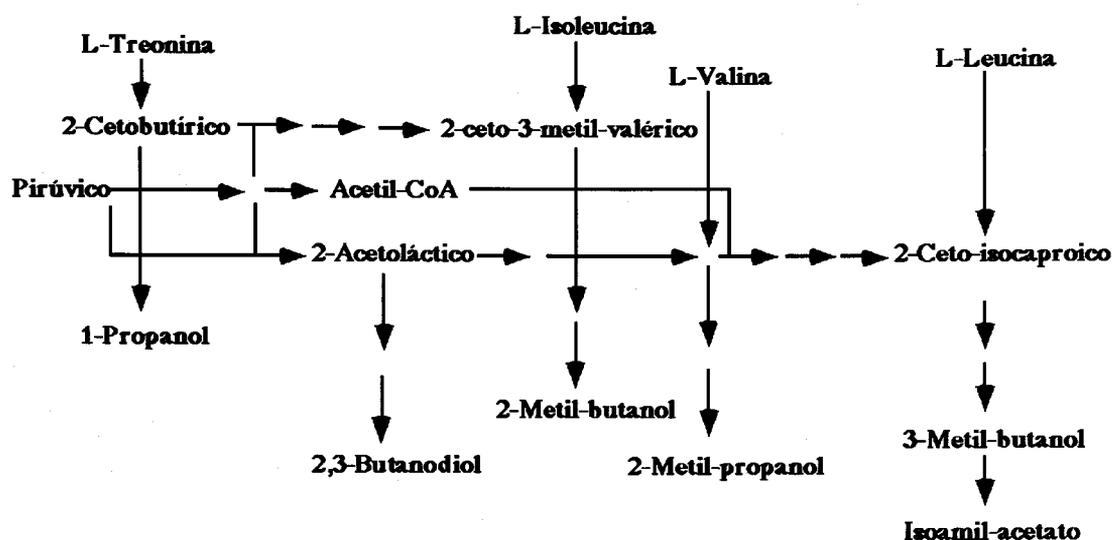


Figura R-1 Rutas anabólicas de los aminoácidos treonina e isoleucina en *S. cerevisiae*

1.1. Microvinificación de mostos de 1ª yema con las cepas vínicas IFI256 e IFI256-1978

Como parte de este trabajo, y con el fin de obtener vinos jóvenes con mayor carácter aromático, se realizaron una serie de ensayos de vinificación a escala de laboratorio, empleando mosto de 1ª yema de uva Palomino Fino, que fueron fermentados por las cepas IFI256 e IFI256-1978 (descritas en los apartados anteriores) y la cepa utilizada como pie de cuba industrial (PDC).

Tabla R-3 Características del mosto utilizado para microvinificación

Parámetro	Valor	Parámetro	Valor
Densidad (g/ml)	1,0813	Ac. Total (g TH ₂ /l)	3,77
pH	3,2	Ac. Volátil (g AcH/l)	-
°Bé	11	Absorbancia a 420nm	0,145
Etanol (% v/v)	-	Absorbancia a 340nm	2,551
SO ₂ (mg/l)	60	Absorbancia a 280nm	2,623

Las pruebas de fermentación, en colaboración con el grupo del Dr. Luis Pérez, en el Departamento de Ingeniería Química de la Facultad de Ciencias de la Universidad de Cádiz, se realizaron en fermentadores de 1 l de capacidad y por duplicado, empleando en cada caso 800 ml de mosto desfangado, corregido con ácido tartárico hasta pH 3,2 y acondicionado en SO₂ hasta 60 mg/l, cuyo análisis se muestra en la Tabla R-3. Después de esterilizar al baño

María, durante 2 h, a 50°C, se inoculó con la levadura previamente cultivada en este mismo medio hasta fase estacionaria de crecimiento (el inóculo fue un 4% del volumen de mosto a fermentar). La fermentación ocurrió a temperatura ambiente (19°C) con agitación ocasional. A lo largo del proceso se tomaron medidas periódicas de las densidades del medio y del cultivo, así como de la viabilidad celular (Tablas A1, A2 y A3) y, una vez concluida, se realizó una prueba analítica completa de los distintos vinos, con el fin de comparar entre sí los resultados obtenidos y estos con el mosto de partida. Los resultados obtenidos se muestran en la Tabla A-4. Tanto la cepa IFI256 como la superproductora de aminoácidos IFI256-1978 inician la fermentación con la misma rapidez que la cepa utilizada habitualmente como pie de cuba y continúan la misma a una velocidad similar, tan solo un poco mas lentamente que el pie de cuba industrial (Figura R-2). Ambas cepas se dividen a niveles comparables a los de la cepa pie de cuba, presentando, además, porcentajes de viabilidad superiores a los de la cepa utilizada en la industria (Tablas A1, A2 y A3 y Figura R-2).

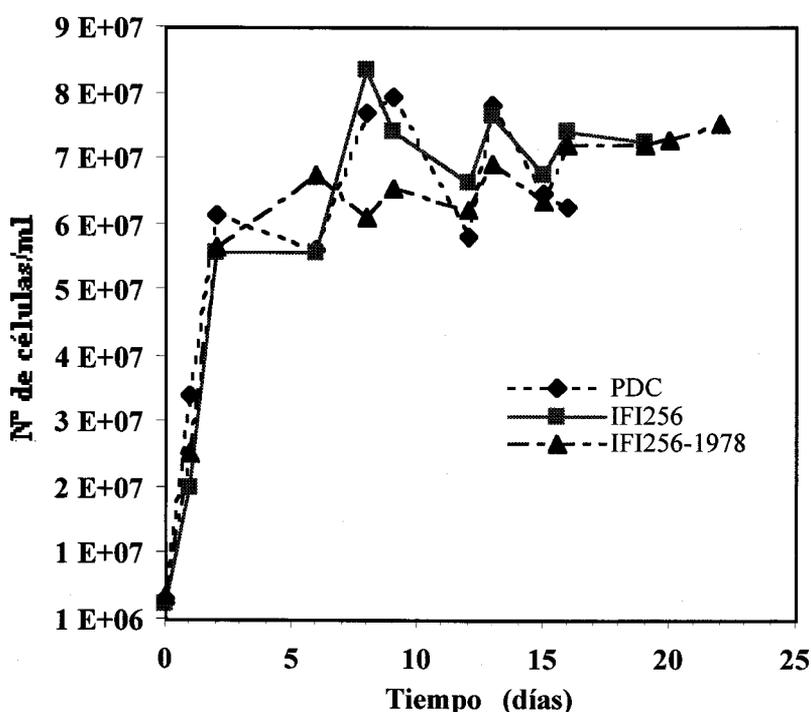


Figura R-2 Curvas de crecimiento de las cepas fermentadoras durante la microvinificación

Del análisis de los vinos obtenidos con las tres cepas utilizadas se desprende que la cepa IFI256 y, sobre todo, IFI256-1978 produce mayores niveles de compuestos apreciados organolépticamente que la cepa utilizada como pie de cuba industrial destacando la cepa IFI256-1978 por los niveles de alcoholes superiores producidos (Tabla A-4 y Figura R-3). A su vez la producción de acetaldehído se ve considerablemente reducida en los vinos de estas

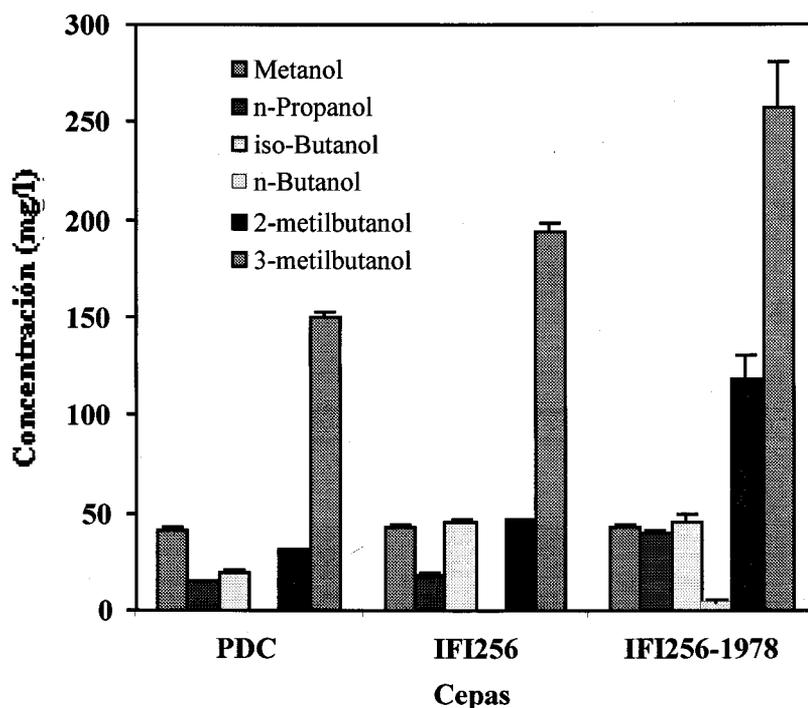


Figura R-3 Niveles de alcoholes producidos por IFI256 e IFI256-1978 durante la microvinificación

dos cepas y el grado alcohólico de los mismos es sensiblemente menor que en el caso del pie de cuba, por lo que estos nuevos vinos pierden en parte las dos características principales del vino producido con el pie de cuba industrial (alto grado alcohólico y elevado nivel de acetaldehído) y ganan en compuestos importantes para el carácter aromático, como se muestra en los datos de producción de los distintos alcoholes superiores (Tabla A-4, Figura R-3).

En el caso de IFI256-1978 la producción de compuestos secundarios importantes para el aroma es excesiva, de acuerdo con los primeros análisis sensoriales realizados, y habría que estudiar en el futuro la posibilidad de utilizar una mezcla de las cepas silvestre y superproductora de aminoácidos en proporciones adecuadas.

Los resultados obtenidos en la fermentación con la cepa IFI256 y las posibilidades de mejora por manipulación genética pasan por el análisis genético y la caracterización de esta cepa.

1.2. Caracterización genética de la cepa vínica IFI256.

1.2.1. Esporulación de la cepa vínica IFI256

Se llevó a cabo la esporulación de la cepa vínica IFI256 con los medios y

temperaturas de preesporulación y esporulación para cepas de laboratorio y los resultados obtenidos se muestran en las Figuras R-4, R-5, R-6 y R-7 (Tablas A-5, A-6, A-7, A-8).

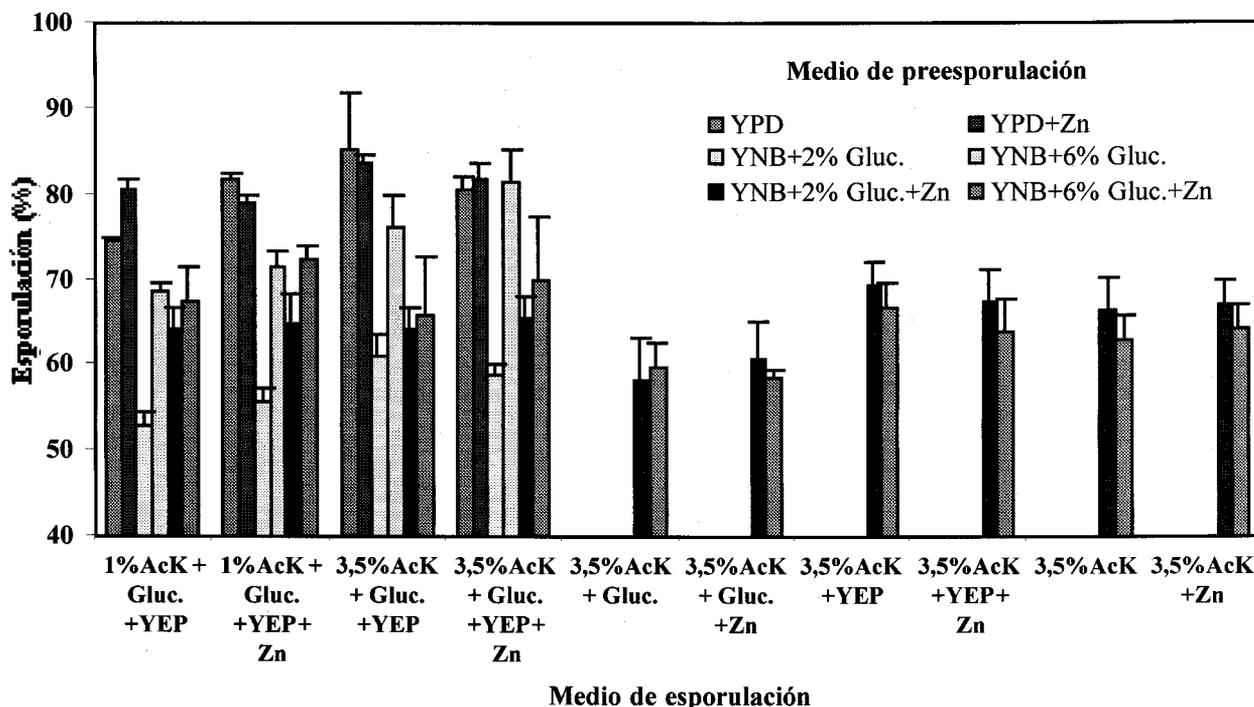


Figura R-4 Porcentajes de esporulación en IFI256

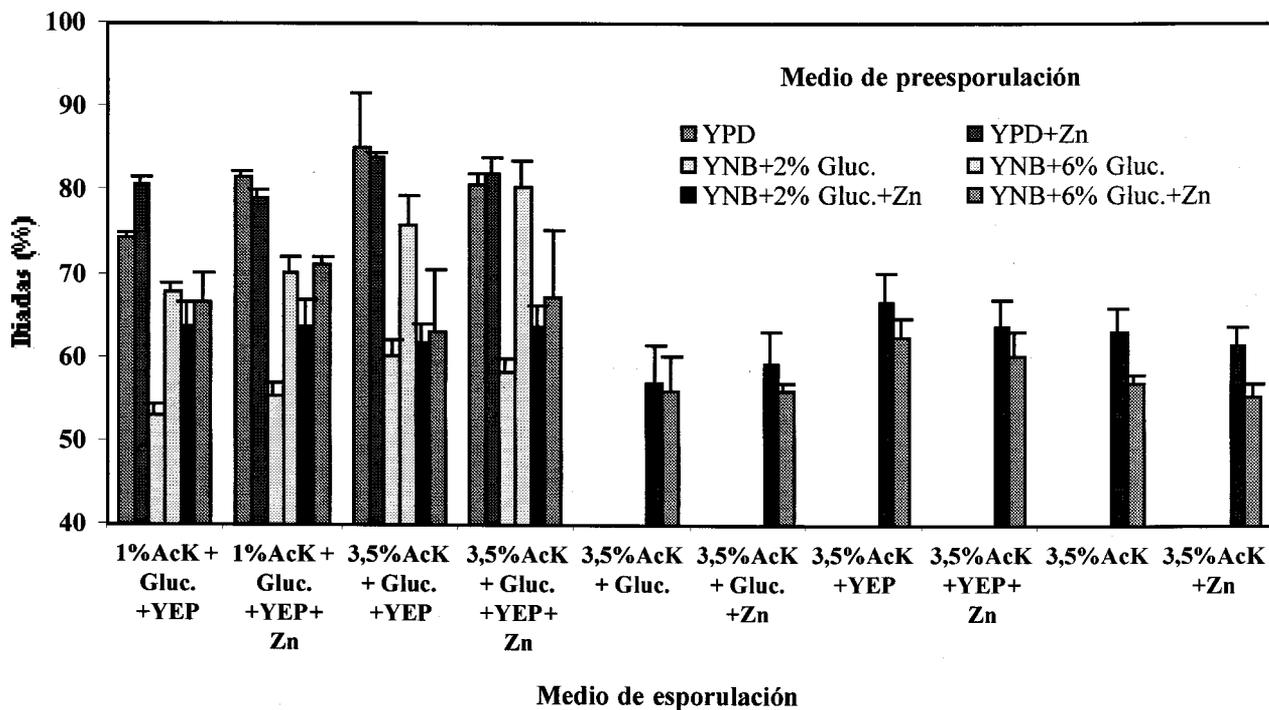


Figura R-5 Porcentajes de diadas tras la esporulación de IFI256

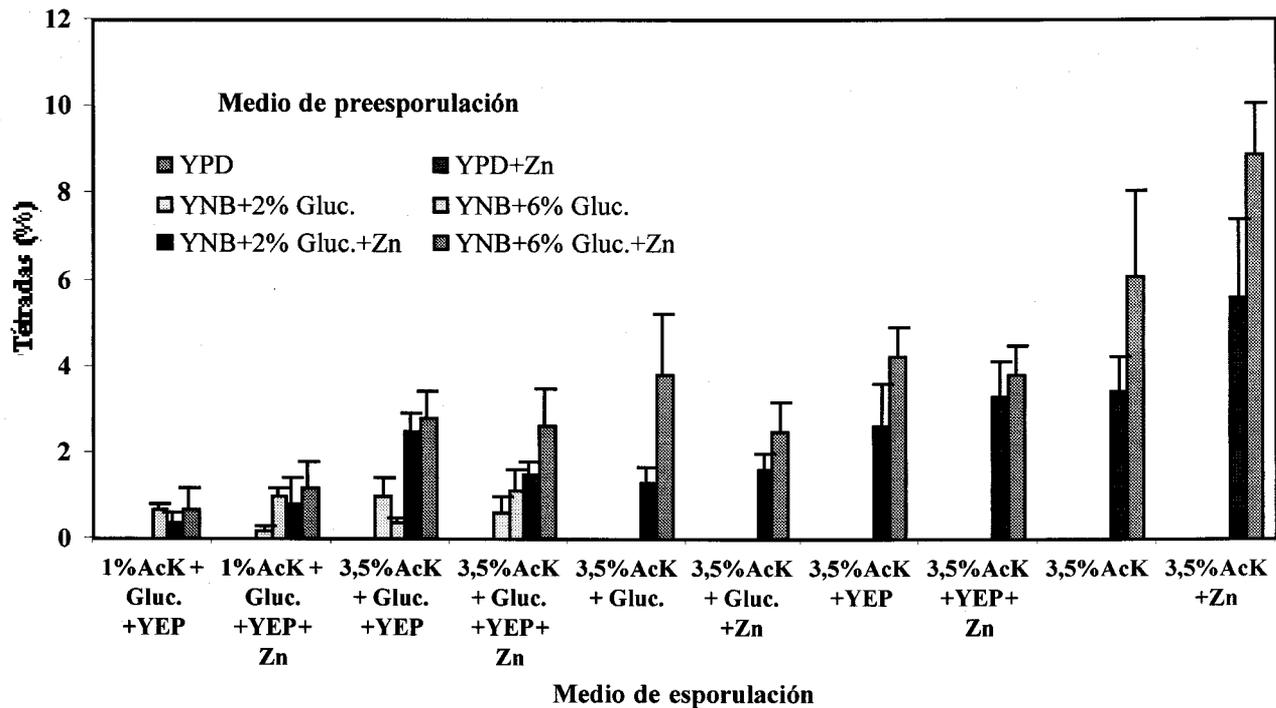


Figura R-6 Porcentajes de tétradas tras la esporulación de IFI256

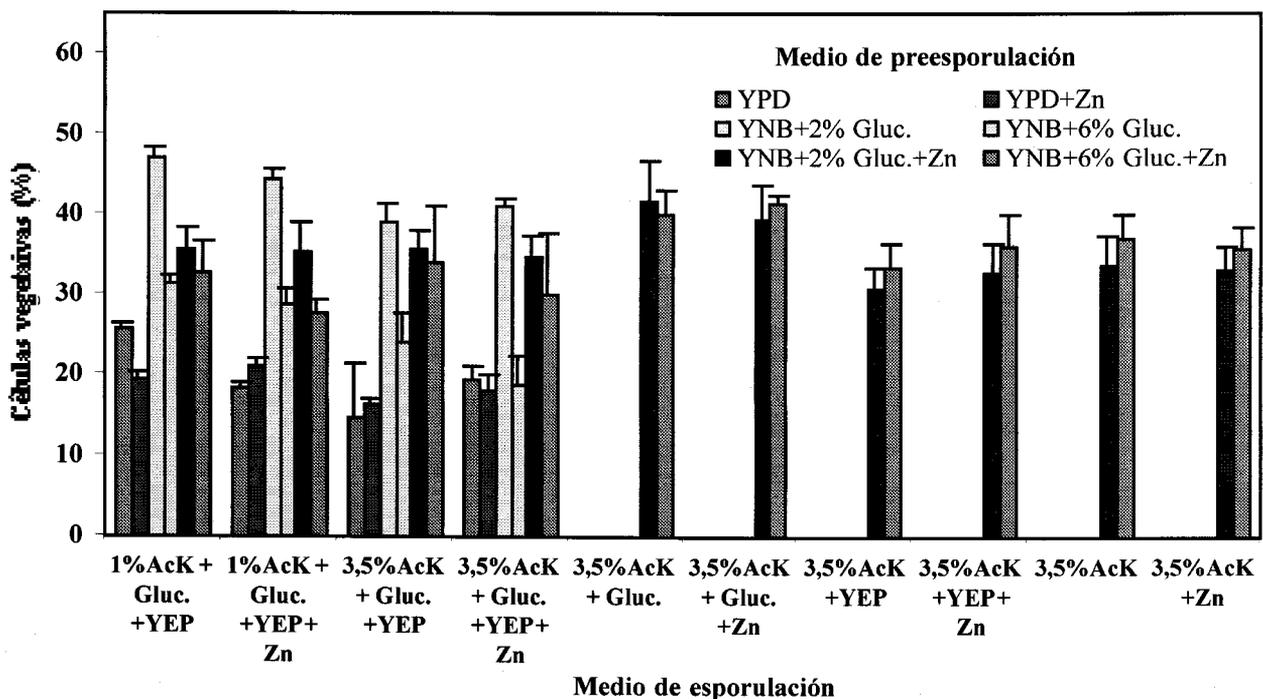


Figura R-7 Porcentajes de células vegetativas tras la esporulación de IFI256

La cepa IFI256 esporuló dando solamente ascas que contenían una o dos esporas (Figura R-8) y no da lugar a ascas con tres o cuatro esporas. Este fenotipo se ha descrito en varias cepas industriales de *S. cerevisiae* y al mismo se ha llamado esporulación apomíctica (Grewal y Miller, 1972). Se han identificado algunos genes cuyas mutaciones dan lugar a este fenotipo, como consecuencia de un fenómeno de no

disyunción en una de las dos divisiones meióticas (Klapholz y Esposito, 1980; Klapholz y Esposito, 1980b). Las esporas de las diadas apomícticas tienen, por tanto, el mismo contenido en ADN que la cepa parental.

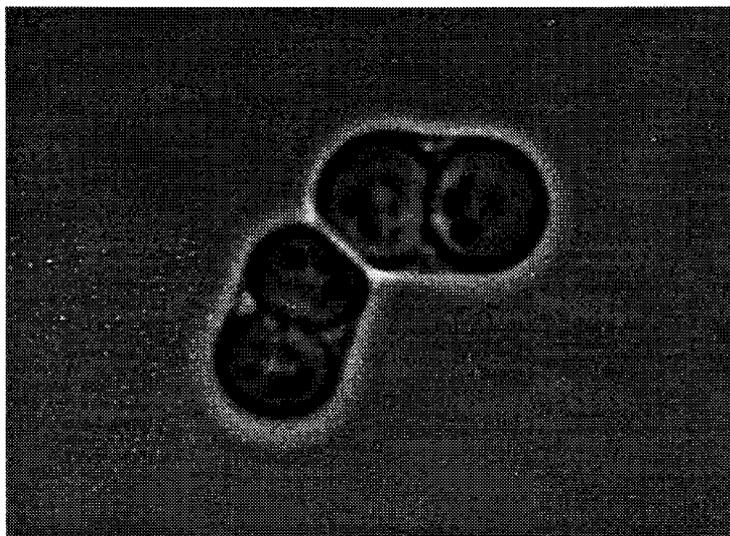


Figura R-8 Diadas de la cepa vínica IFI256

Se han descrito en la literatura algunas modificaciones nutricionales en los medios de preesporulación y esporulación que producen una reversión parcial de este fenotipo, de manera que las cepas apomícticas esporulaban dando lugar a un considerable porcentaje de ascas con tres y cuatro esporas (Bilinsky y Miller, 1980). En este sentido se sustituyeron los medios de preesporulación y esporulación convencionales por medios definidos, con altas concentraciones de glucosa (en el medio de preesporulación) y de acetato potásico (en el de esporulación), como únicas fuentes de carbono y se modificaron ambos medios con la adición de sulfato de zinc (25 µg/ml).

Se probaron estas condiciones de esporulación en IFI256 y a pesar de que el porcentaje de esporulación disminuyó considerablemente, se obtuvo hasta un 8,9 % de ascas con cuatro esporas (Tabla A-7)

1.2.2. Constitución cromosómica y contenido en ADN de la cepa vínica IFI256

Se llevaron a cabo electroforesis de cromosomas de la cepa IFI256 con el equipo CHEF-DR® II (Bio-Rad Laboratories, EEUU) descrito en Materiales y Métodos, obteniéndose un patrón definido de 19 bandas cromosómicas de diferente tamaño. Como marcador de cromosomas de tamaño molecular conocido se utilizó la cepa comercial YNN295 (Bio-Rad Laboratories, EEUU) y el resultado se muestra en la Figura R-9. La preparación de las muestras y las condiciones de electroforesis fueron las

descritas en Materiales y Métodos. Este resultado, teniendo en cuenta el contenido en ADN medido posteriormente (1.7c), indica que IFI256 posee cromosomas homólogos de diferente tamaño.

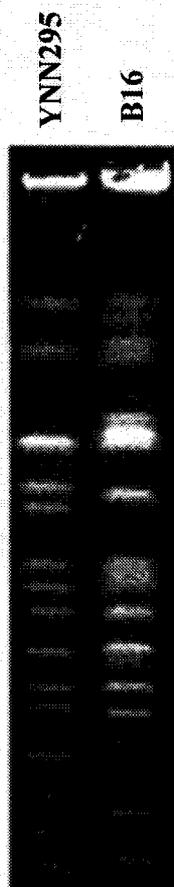


Figura R-9 Electroforesis de cromosomas de la cepa IFI256

El contenido en ADN cromosómico en la cepa IFI256 se determinó por citometría de flujo con un equipo FACScan (Becton & Dickinson, EEUU), utilizando las cepas de laboratorio S288C y DS81 como controles haploide y diploide, respectivamente. Como muestra la Figura R-10, IFI256 tiene un contenido en ADN de aproximadamente 1,7c, valor intermedio entre los de los controles haploide y diploide. Una meiosis correcta daría lugar a esporas de una reducidísima viabilidad, dado el escaso contenido en ADN de la cepa parental.

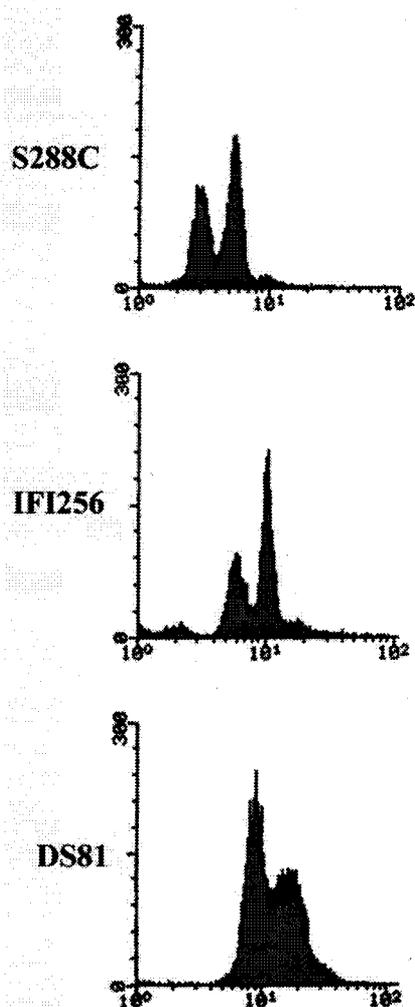


Figura R-10 Citometría de flujo de la cepa IFI256

1.2.3. Micromanipulación de esporas de IFI256

Se llevó a cabo la esporulación de IFI 256 en condiciones de producción de diadas y en las condiciones en las que se producen mayor porcentaje de tétradas. Se llevó a cabo la digestión de las ascas y la micromanipulación de las esporas contenidas en diadas y tétradas. En la nomenclatura de las esporas, la letra “D” significa que procede de una diada, la letra “T” que procede de una tétrada, el “número” es el número de orden del asca micromanipulada y “a”, “b”, “c” y “d” son las letras que identifican a las esporas de un mismo asca. Se produjo un 100% de viabilidad en las ascas micromanipuladas (11 diadas y 12 tétradas), por lo que parece que no se está dando una división reduccional en las meiosis que dan lugar a las ascas de cuatro esporas. Ninguna de las esporas presentaba auxotrofías (Tabla R-4), y solamente las esporas T-10a y T-10b presentaron incapacidad para esporular y deficiencia en respiración. Para comprobar si estas esporas eran “petite” nucleares o mitocondriales, se procedió a la transferencia de mitocondrias de la cepa de laboratorio K5-

5c, que porta la mutación recesiva *kar1-1*, impidiendo la fusión de núcleos en un 90-95% de los apareamientos, aunque sólo es necesario que uno de los núcleos presente dicha mutación (Conde y Fink, 1976; Rose y Fink, 1987). Se comprobó que dicha transferencia revertía el fenotipo "petite" y ambas esporas recuperaban la capacidad para esporular, produciendo únicamente ascas con dos esporas en porcentajes del 54% y 67%. Por tanto, no existe incompatibilidad núcleo-citoplasmática para la respiración o la esporulación de estas esporas cuando se les transfieren mitocondrias de la cepa de laboratorio K5-5c. Por otra parte se demuestra que la incapacidad para esporular se debía a un defecto de respiración por alteración del genomio mitocondrial.

Tabla R-4 Características de las esporas de IFI256

Característica	Segregación ⁽¹⁾							
	Diadas			Tétradas				
	2 ⁺ :0 ⁻	1 ⁺ :1 ⁻	0 ⁺ :2 ⁻	4 ⁺ :0 ⁻	3 ⁺ :1 ⁻	2 ⁺ :2 ⁻	1 ⁺ :3 ⁻	0 ⁺ :4 ⁻
Viabilidad	11	0	0	12	0	0	0	0
Prototrofia	11	0	0	12	0	0	0	0
"Petite"	0	0	11	0	0	1	0	11
Esporulación	11	0	0	11 ⁽²⁾	0	1	0	0
Conjugación	a	0	0	11	0	0	0	12
	α	0	0	11	0	0	0	12

⁽¹⁾ +: presencia del carácter; -: ausencia

⁽²⁾ La generación F₂ también muestra una segregación 4⁺:0⁻ con respecto a la esporulación

1.2.4. Constitución cromosómica y contenido en ADN de las esporas de IFI256

Se llevaron a cabo electroforesis de cromosomas y determinaciones de ADN para las esporas descritas en el apartado anterior. Tanto las esporas procedentes de diadas (apomíticas) como las procedentes de tétradas (meióticas) presentaron el mismo patrón cromosómico (Figura R-11) y la misma cantidad en ADN (Figura R-12) que la cepa parental IFI256.

La falta de segregación en los productos meióticos de la diadas (auxotrofías, sexo, capacidad para esporular, respiración, contenido en ADN, cariotipo electroforético) indica que en la esporulación apomítica de la cepa IFI256 no se da la primera división meiótica y parece haber ausencia de recombinación meiótica. Otros autores (Esposito y Klapholz, 1981; Malone y Esposito, 1981) han demostrado previamente que la esporulación apomítica se puede dar incluso en ausencia de recombinación meiótica, como ocurre en cepas apomíticas *sp11* o *rad52-1*.

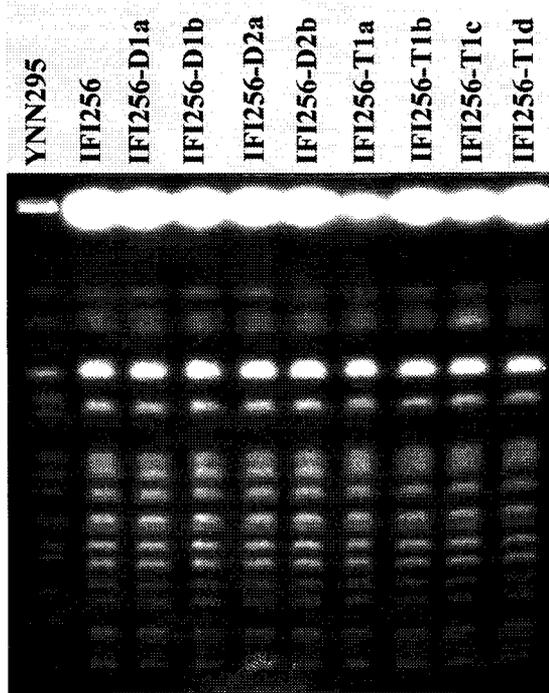


Figura R-11 Electroforesis de cromosomas de las esporas de la cepa IFI256

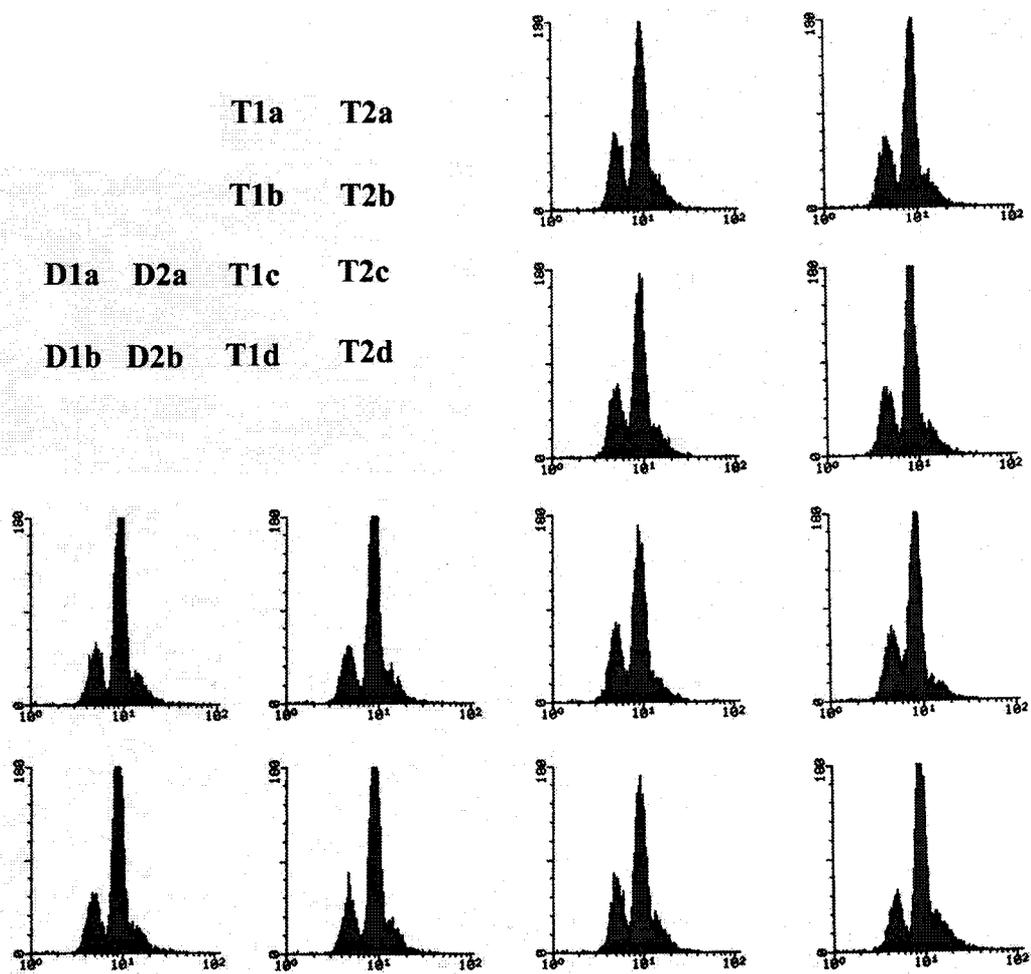


Figura R-12 Citometría de flujo de las esporas de la cepa IFI256

Por otro lado, a pesar de que el contenido en ADN de la cepa IFI256 es 1,7 n, las esporas de las tétradas presentan 100% de viabilidad. Además presentan el mismo contenido en ADN que la cepa parental y su mismo patrón electroforético. Todo ello sugiere la hipótesis de que las variaciones nutricionales ensayadas en los medios de preesporulación y esporulación provocan un determinado porcentaje de sucesos de endomitosis, seguidos de esporulación apomítica en cada uno de los núcleos formados. Descartamos la posibilidad de que los clones derivados de las esporas “meióticas” dupliquen su contenido en ADN por ser homotáticas, debido a que la viabilidad de tales esporas sería prácticamente nula si se diera una verdadera división reduccional, dada la pequeña cantidad de ADN de la cepa parental

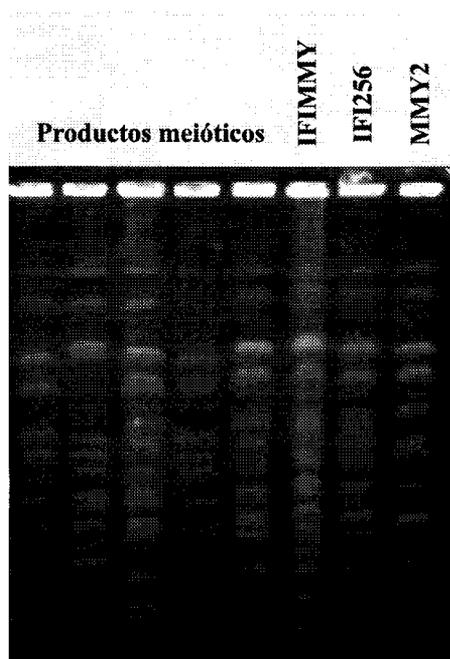


Figura R-13 Electroforesis de cromosomas de IFIMMY y esporas

1.2.5. Conjugación de IFI256 con cepas de laboratorio

Se deseaba determinar si los alelos responsables de la esporulación apomítica son recesivos con respecto al gen presente en cepas que esporulan normalmente. Para ello se llevó a cabo la conjugación de la cepa IFI256 con cepas de laboratorio. IFI256 no conjuga en condiciones normales con cepas de laboratorio haploides, por lo que se llevo a cabo el procedimiento de apareamiento forzado con las cepas MMY1 y MMY2, seleccionando los híbridos en medio mínimo SD con cicloheximida 1µg/ml. Se corrieron electroforesis para comprobar que los clones que crecían en el medio selectivo eran verdaderos híbridos. La Figura R-13 muestra que éstos tienen un patrón cromosómico mezcla de los de las cepas parentales (IFI256 y MMY1 o MMY2).



1.2.6. Esporulaci3n de los h3bridos IFIMMY

Para determinar si las mutaciones de IFI256 son dominantes o recesivas, posteriormente se llev3 a cabo la esporulaci3n de los h3bridos en las condiciones normales de esporulaci3n, en las que IFI256 no produce ascas de cuatro esporas. Como muestra la Figura R-14 (Tabla A-9), los h3bridos producen ascas con cuatro esporas, por lo que las mutaciones de la cepa IFI 256 son recesivas.

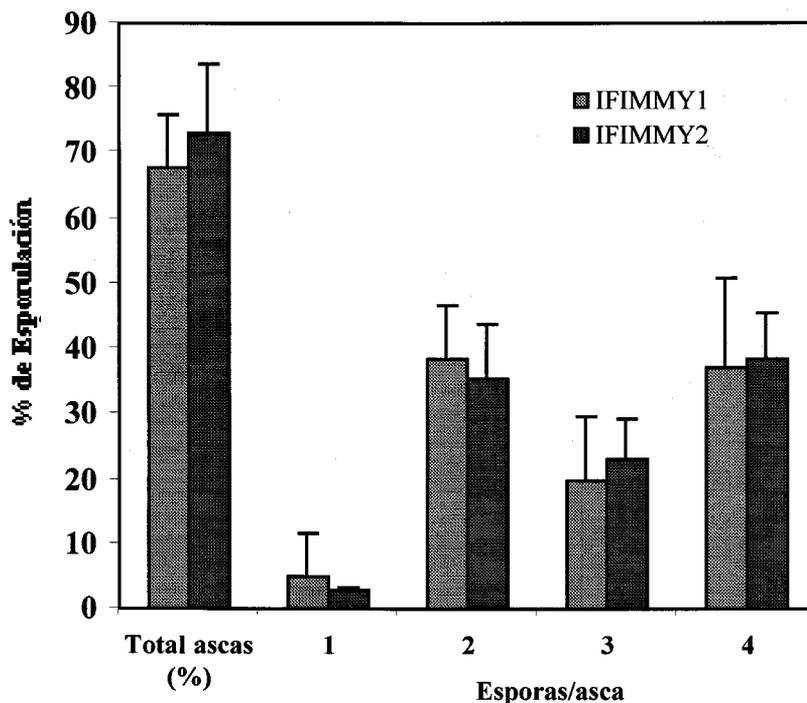


Figura R-14 Esporulaci3n de los conjugantes IFIMMY

1.2.7. Micromanipulaci3n de esporas del h3brido IFIMMY

Se hicieron esporular los h3bridos IFIMMY bajo condiciones normales de esporulaci3n para llevar a cabo la micromanipulaci3n de t3tradas. Se micromanipularon 15 t3tradas, obteni3ndose tan s3lo 10 esporas viables (16,6 % de viabilidad), que presentaron segregaci3n en el patr3n electrofor3tico de cromosomas (Figura R-13), por lo que parece que estas t3tradas son el resultado de meiosis en las que se han dado las dos divisiones mei3ticas.

1.2.8. Mapeo cromos3mico del alelo apom3ctico de IFI256

Para poder localizar en un determinado cromosoma de *S. cerevisiae* el o los alelos recesivos causantes de la apomixia en IFI256 se utiliz3 el sistema basado en Falco (Falco et al, 1982, 1983) y descrito en Materiales y M3todos en el apartado "Asignaci3n de marcadores recesivos a cromosomas concretos".

Previamente, como se describe en Materiales y Métodos, se obtuvo un mutante *ura3* de IFI256 por mutagénesis con EMS y selección en medio FOA. Se obtuvo un clon resistente a ácido 5-fluororótico 0.5 mg/l y posteriormente se homocigotizó la mutación cultivando el mutante en medios con concentración creciente de ácido fluororótico (desde 1 hasta 3mg/ml). Se comprobó este último extremo por incapacidad del mutante para crecer en medio SC-Ura. Posteriormente se transformó el mutante con el plásmido Ycp50, que lleva el gen *URA3* de *S. cerevisiae*. El plásmido complementó la mutación del mutante *Ura⁻* de la cepa IFI256, es decir, el transformante fue capaz de crecer en medio SC-Ura, por lo que el gen mutado en este mutante es *URA3*.

Se llevó a cabo el apareamiento forzado del mutante *ura3* de IFI256 con cada una de las 16 cepas *cir^o*, seleccionando los conjugantes en medio mínimo SD. Posteriormente se confirmó que todos ellos mostraban un patrón electroforético de cromosomas mezcla de los de las cepas parentales (datos no mostrados).

A continuación se llevo a cabo la esporulación de los 16 híbridos en condiciones normales de esporulación y se confirmó la formación de ascas de cuatro esporas en todos ellos (el medio de esporulación carece de uracilo, para minimizar la pérdida de cromosomas durante la esporulación). La pérdida específica del ADN plasmídico junto con el cromosoma donde está integrado se facilita cultivando posteriormente los diploides en medio rico YPAD. Los clones que han perdido cada cromosoma se seleccionan sembrando en medio selectivo para clones resistentes a ácido fluororótico (medio FOA).

Finalmente se pusieron a esporular los clones que han perdido su cromosoma, en las mismas condiciones que antes de permitir la pérdida de cada cromosoma, y se miró en cual de los híbridos ha dejado de producirse ascas con cuatro esporas. Este sería el clon que ha perdido el cromosoma donde se encuentran los alelos que complementan la mutación de la cepa IFI256. Tras la esporulación, todos los clones siguen dando ascas con cuatro esporas, salvo el clon IFIB7174, que es aquel que pierde selectivamente el cromosoma VIII de *S. cerevisiae*.

1.2.9. Conjugación de IFI256 con cepas *Spo*

Los genes *SPO12* y *SPO13* están localizados en el cromosoma VIII de *S. cerevisiae* cuyas mutaciones *spo12-1* y *spo13-1* provocan esporulación apomictica en la cepa portadora (Klapholz y Esposito, 1980; Klapholz y Esposito, 1980b). Se llevaron a cabo experimentos de conjugación del mutante *ura3* de la cepa IFI256 con cepas defectivas en estos genes con objeto de determinar si la cepa IFI256 también era defectiva en ellos.

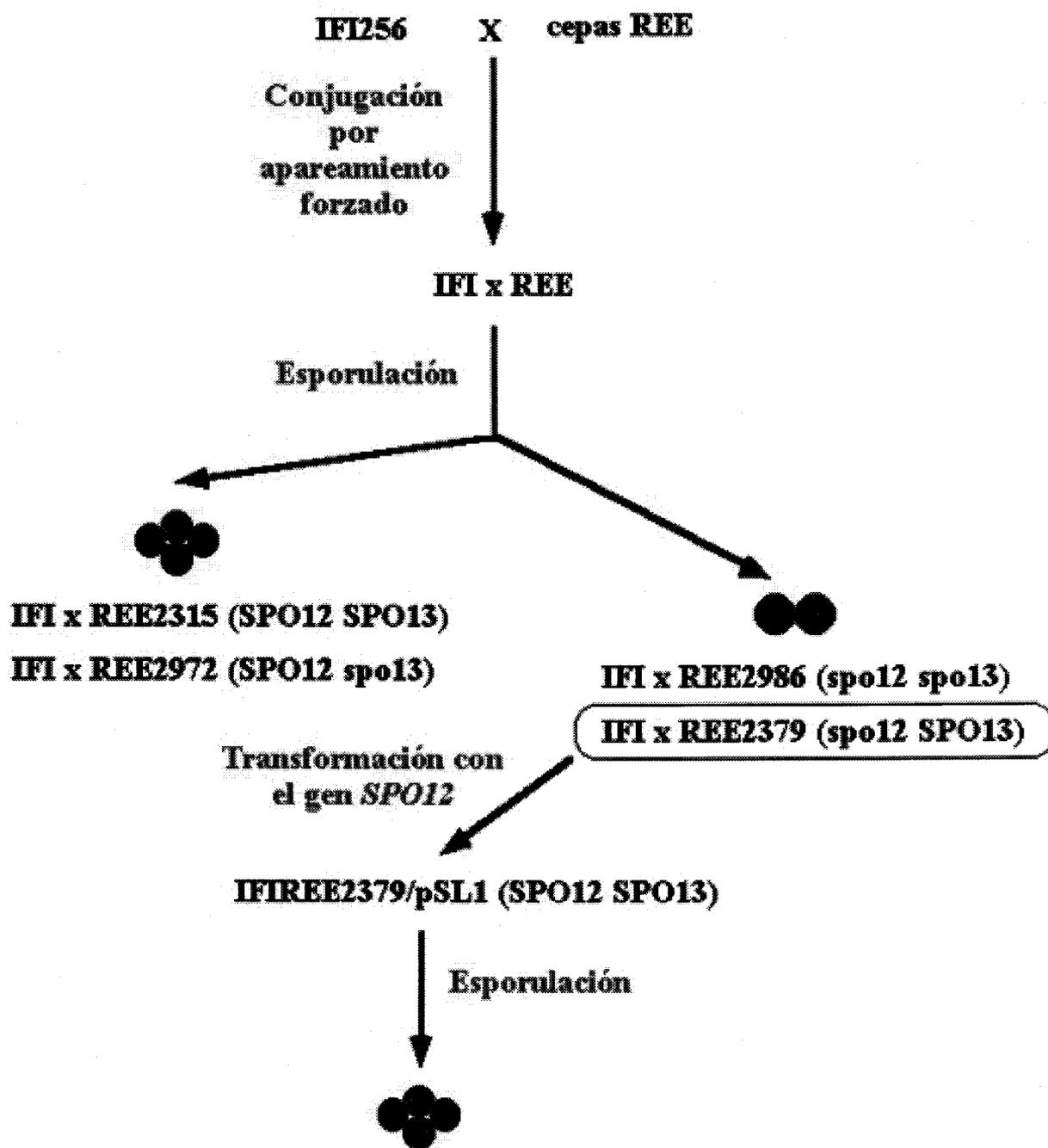


Figura R-15 Esporulación de los conjugantes IFIREE

Tanto las cepas REE (mutantes *spo*) como los plásmidos con los genes *SPO12* y *SPO13* fueron amablemente cedidos por la Dra. Rochelle Easton Esposito (Universidad de Chicago, EEUU). En la Figura R-15 se esquematizan los resultados obtenidos tras la esporulación de los conjugantes. Éstos siguen dando sólo ascas con dos esporas si el parental REE es *spo12* y aparecen diferentes porcentajes de ascas con cuatro esporas si el parental REE es *SPO12*, en ambos casos independientemente de que a la vez sea *spo13* o *SPO13*, por lo que podemos decir que la cepa IFI256 tiene un genotipo *spo12 SPO13*.

1.2.10. Transformación de la cepa IFI256 con el gen *SPO12* de *S. cerevisiae*

Se transformó la cepa IFI256 con un plásmido que llevaba el gen *SPO12* de *S. cerevisiae* (pSL1), con el fin de complementar la mutación *spo12* de esta cepa y revertir el fenotipo apomítico de la misma.

Se llevaron a cabo algunas modificaciones sobre el método de transformación descrito en Materiales y Métodos, ya que con el protocolo descrito para las cepas de laboratorio no se obtuvieron transformantes. Así, antes de resuspender las células para llevar a cabo la mezcla de transformación, se incuban con agitación a 30°C durante 30 min, resuspendidas en 1 ml solución de acetato de litio (LiAc-TE). La mezcla de transformación se incubaba durante 60 min sin agitación y el choque térmico se reduce a 5 min a 42 °C. Con estas modificaciones se obtuvieron frecuencias de $1,5 \times 10^5$ transformantes/ μ g de ADN, frecuencias similares a las obtenidas para cepas de laboratorio.

La cepa transformada continuó dando solamente ascas con dos esporas (Figura R-15), por lo que supusimos la existencia de al menos una nueva mutación en el cromosoma VIII, además de la localizada sobre *SPO12*, y que impedía una esporulación normal en la cepa IFI256 transformada con el gen *SPO12*. Se está tratando de identificar un segundo gen que pudiera estar afectado, mediante la transformación de IFI256 con una minigenoteca del cromosoma VIII de *S. cerevisiae*, pero hasta el momento no se han obtenido resultados positivos. En conclusión, IFI256 presenta al menos dos mutaciones distintas localizadas en el cromosoma VIII, una de ellas afectando al gen *SPO12*, y que le confieren la característica para esporular apomíticamente. Presumiblemente éste es un mecanismo adaptativo que permite, pese a su bajo contenido en ADN, la supervivencia de su descendencia en condiciones que desencadenan la esporulación.

2. Caracterización y mejora de una cepa vínica para crianza biológica

En la segunda fase de la elaboración de los vinos de Jerez (fase de crianza biológica) intervienen nuevas cepas de *Saccharomyces* ausentes en la fase fermentativa. La población existente en los velos de flor en los sistemas de crianza biológica se compone fundamentalmente de distintas razas de *Saccharomyces cerevisiae*, con un notable predominio de *S. beticus*, seguida de *S. montuliensis* y en menor medida de *S. cheresiensis* y *S. rouxii* (Martínez et al., 1995).

Estas cepas están presentes en las botas de los sistemas de añadas y solerajes y han sido seleccionadas de manera empírica por los productores de vinos en base a las

características organolépticas que conferirían al vino durante la crianza. Son cepas que forman velo de flor, presumiblemente como un mecanismo adaptativo que permite a las levaduras crecer en un medio con elevado grado alcohólico y donde las únicas fuentes de carbono utilizables son respirables.

2.1. Pérdida del ADN mitocondrial inducido por etanol y acetaldehído

El alto contenido alcohólico del vino fino y la ausencia de fuentes de carbono respirables habría favorecido un único tipo de mitocondrias especialmente adaptado a esas condiciones. Sin embargo, se ha observado un patrón de restricción de ADNmit tremendamente variable para las distintas cepas de levadura de flor analizadas, pero constante para la misma cepa. Se ha querido determinar si la variabilidad es inducida por algún compuesto que tenga efectos mutagénicos sobre el ADNmit y que se encuentre presente en el vino, como por ejemplo etanol y acetaldehído, cuyas concentraciones en los vinos finos de la Denominación de Origen de Jerez son inusualmente altas (Martínez et al., 1995).

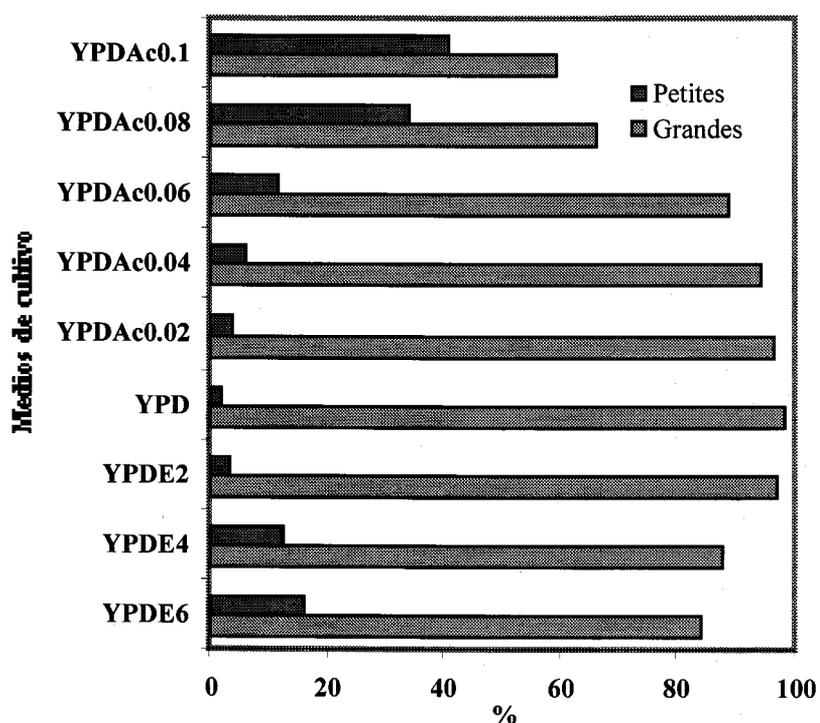


Figura R-16 Cultivo de levaduras en medios con etanol o acetaldehído

Se cultivó la cepa AWI-1b en medio YPD suplementado con etanol o acetaldehído, a las concentraciones indicadas en la Figura R-16, hasta final de la fase exponencial de crecimiento. Entonces se recogieron muestras y se sembraron diluciones adecuadas en cajas de medio YPDG, para obtener entre 100 y 250 colonias por caja. Se midió la frecuencia de

aparición de mutantes "petite" y se seleccionaron azarosamente algunos de ellos para llevar a cabo análisis de polimorfismos de restricción de ADNmit. Los resultados muestran una proporcionalidad directa entre las concentraciones de etanol o acetaldehído utilizadas en el medio de cultivo y las frecuencias de aparición de mutantes "petite" (Figura R-16).

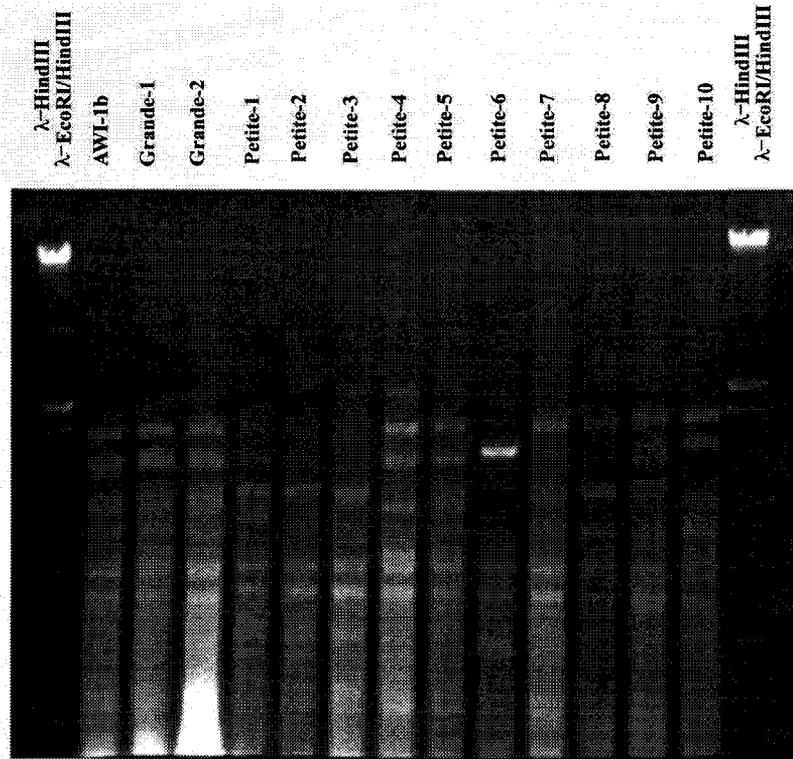


Figura R-17 Electroforesis de ADNmit de los mutantes "petite" aparecidos en medio con etanol en fase exponencial de crecimiento

Las Figuras R-17 (medio con etanol) y R-18 (medio con acetaldehído) muestran además el gran polimorfismo encontrado en los patrones de restricción de ADN mitocondrial, de manera que la inmensa mayoría de mutantes "petite" encontrados son ρ^- , es decir sus mitocondrias no son funcionales pero aún conservan DNA mitocondrial

Algunos de estos mutantes fueron reinoculados en el mismo medio en el que fueron seleccionados y se incubaron en las mismas condiciones durante 10 días. Al cabo de ese tiempo se procedió a sembrar colonias aisladas en medio YPDG y se realizó análisis RFLP de algunos clones "petite". Como muestran las Figura R-19 (etanol) y R-20 (acetaldehído), muchos de los clones derivados del "petite" original han perdido completamente el DNAmít, es decir aparecen "petites" ρ^0 a partir de un "petite" original ρ^- .

El vino fino es un medio de cultivo con un alto contenido en etanol y acetaldehído (Martínez et al., 1995) y estos compuestos están ejerciendo un efecto mutagénico constante sobre las mitocondrias de las levaduras responsables del envejecimiento biológico del mismo.

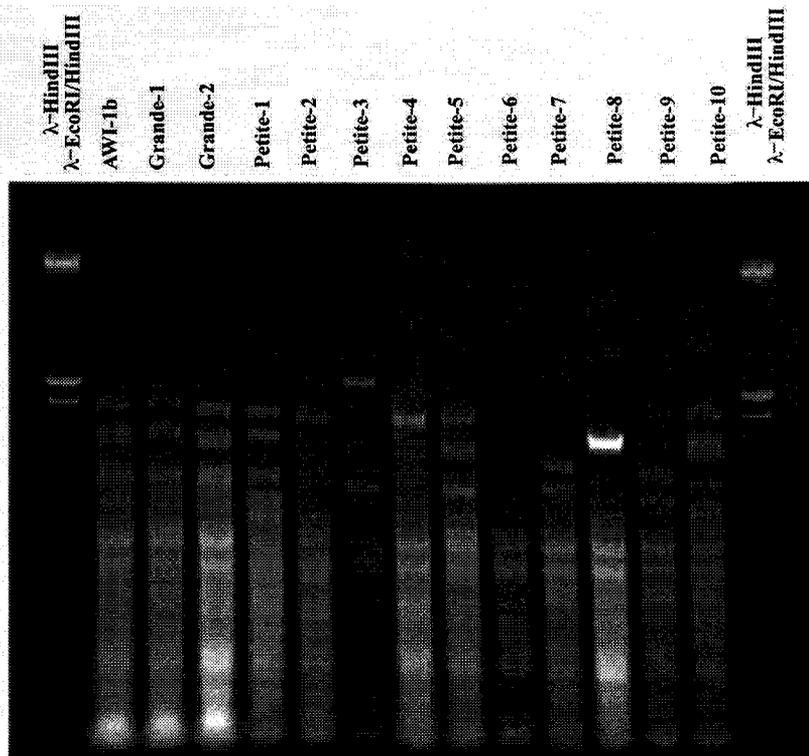


Figura R-18 Electroforesis de ADNmit de los mutantes “petite” aparecidos en medio con acetaldehído en fase exponencial de crecimiento

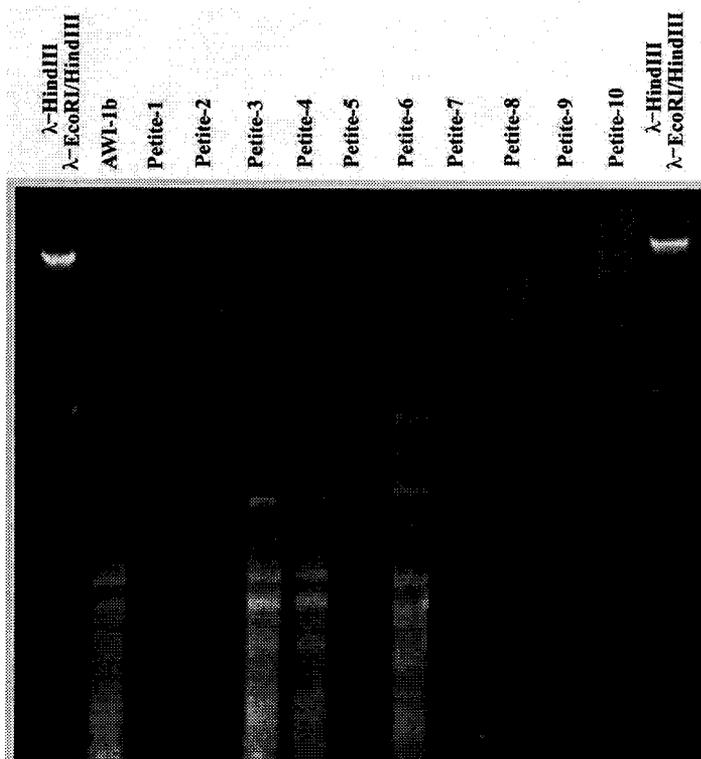


Figura R-19 Electroforesis de ADNmit de los mutantes “petite” aparecidos en medio con etanol tras diez días de cultivo

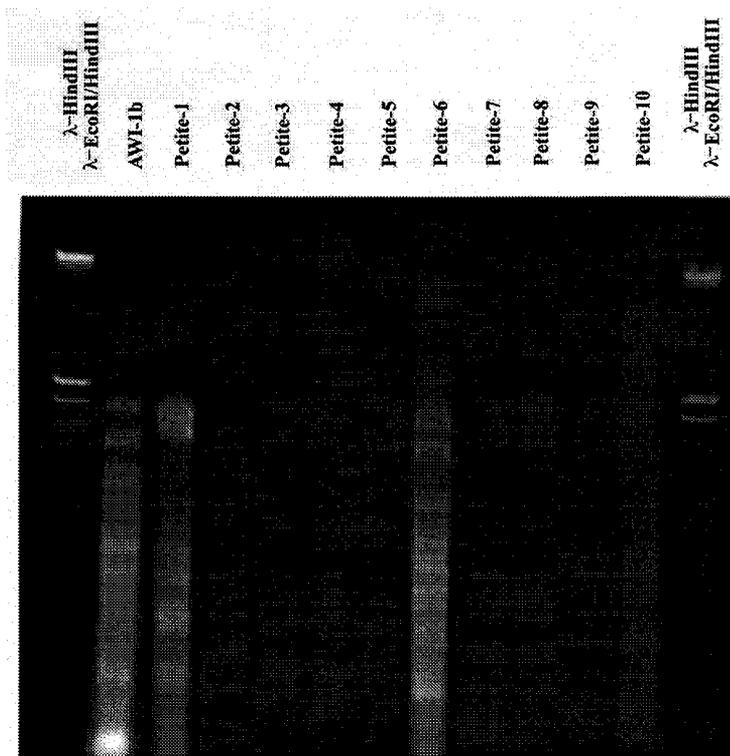


Figura R-20 Electroforesis de ADNmit de los mutantes “petite” aparecidos en medio con acetaldehído tras diez días de cultivo

Muchos de estos mutantes son incapaces de sobrevivir en el vino debido a que la única fuente de carbono utilizable, el etanol, es sólo respirable, con lo que están fuertemente contraseleccionados. Por el contrario los clones "grandes" de una misma cepa presentan reiterativamente el mismo patrón de RFLP. Estos datos, junto a la reiteración de patrones mitocondriales encontrados en cada levadura de velo de flor nos indican un importante proceso de selección de ciertos genomios mitocondriales, extraordinariamente eficientes en las condiciones de cultivo que encontramos en los vinos finos.

2.2. Utilización de distintas fuentes de carbono por la cepa vínica B16

Las cepas pertenecientes a *S. beticus* y *S. cheresiensis* son más rápidas formando velo que *S. montuliensis* y *S. rouxii*, y a su vez son las que presentan mayor viabilidad y menor frecuencia inducida de formación de petites (Martínez et al., 1995). En base a estas características, se utilizó la cepa B16, perteneciente a *S. beticus*, para tratar de caracterizar y mejorar el proceso de formación de velo de flor en los vinos finos de Jerez.

Con el fin de buscar un marcador que permitiese la selección de conjugantes de la levadura de flor B16 con otras cepas se comprobó la capacidad de la cepa B16 para utilizar diferentes fuentes de carbono cultivándola en medios SL, SGa, SM, SR, SS y SD. B16 fue

capaz de utilizar glucosa, sacarosa y rafinosa y no así maltosa, galactosa ni lactosa.

2.3. Conjugación de la cepa vínica B16 con IM1-8b

Para determinar si los genes responsables de los fenómenos de agregación celular que se dan en la floculación y en la formación de velo de flor son los mismos, se llevó a cabo la conjugación de la cepa vínica formadora de velo B16 con la cepa floculante IM1-8b. El método de conjugación utilizado fue apareamiento forzado y el medio de selección medio mínimo SM, dado que IM1-8b presenta varias auxotrofías y utiliza maltosa como fuente de carbono y B16 es protótrofa e incapaz de utilizar la maltosa como fuente de carbono.

Se seleccionó un clon capaz de crecer en medio selectivo (B16IM1) del que se comprobó que poseía un patrón electroforético de cromosomas mezcla de los de las dos cepas parentales (Figura R-21). Esta cepa fue capaz de aglutinar en medio rico YPD, alcanzando el mayor grado de floculación al final de fase estacionaria, al igual que el parental IM1-8b (Sieiro et al., 1995; Sieiro et al., 1997). También fue capaz de formar velo cuando se cultivó a 22°C en vino sobretabla, después de llegar a fase estacionaria en medio rico YPD. Por tanto ambos fenotipos son dominantes.

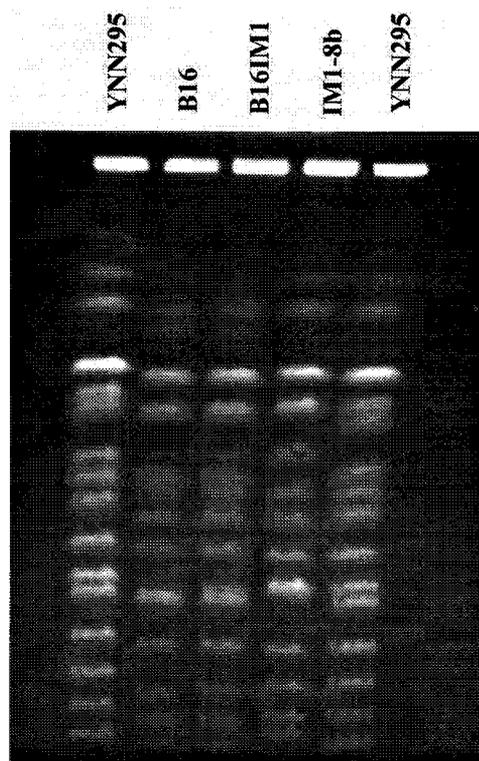


Figura R-21 Electroforesis de cromosomas de la cepa B16IM1

2.4. Micromanipulación de esporas de B16IM1

Para llevar a cabo un análisis genético del fenómeno de formación de velo de flor en

la cepa B16IM1, se llevó a cabo la esporulación y micromanipulación de tétradas. Se micromanipularon 37 tétradas distintas y no se obtuvo ninguna de ellas con las cuatro esporas viables. Se obtuvo una viabilidad del 23,6 % (35 esporas viables) y en la Tabla R-5 se resumen los datos encontrados para el fenotipo de floculación y de formación de velo en vino sobretabla, y en vino sobretabla diluido con agua hasta obtener una concentración de etanol del 5%. El hecho de que encontremos esporas capaces de formar velo a la vez que carecen de capacidad para flocular y viceversa nos indica que al menos alguno de los genes necesarios para el proceso de formación de velo es específico de este proceso y no participa en el fenómeno de agregación celular que conduce a la floculación. Lo mismo se puede decir de, al menos, alguno de los genes necesarios para que ocurra la floculación.

Tabla R-5 Segregación de la floculación y de la formación de velo en esporas de B16IM1

Cepa	Floculación en medio YPD	Formación de velo en vino sobretabla	Nº de esporas	Floculación en medio YPD	Formación de velo en vino diluido	Nº de esporas
B16	-	+		-	+	
IM1-8b	+	-		+	-	
B16IM1	+	+		+	+	
Esporas	+	+	5	+	+	11
	+	-	9	+	-	3
	-	+	8	-	+	19
	-	-	13	-	-	2

2.5. Conjugación de la cepa vínica B16 con cepas de laboratorio

Para conocer la estructura cromosómica de la cepa vínica B16 y tratar de mejorar el proceso de formación de velo de flor, se llevó a cabo la conjugación de esta cepa con las cepas de laboratorio YNN295 y GT153-6a. Estas cepas portan numerosos marcadores genéticos de utilidad para el análisis meiótico de los conjugantes y es ésta la razón por la que fueron utilizados. El método de conjugación utilizado fue apareamiento forzado y el medio de selección medio mínimo SM, dado que las cepas de laboratorio presentan varias auxotrofías y pueden utilizar maltosa como fuente de carbono. B16, por el contrario, es protótrofa e incapaz de utilizar maltosa como fuente de carbono.

Se seleccionaron clones capaces de crecer en medio selectivo y se comprobó que poseían patrones electroforéticos de cromosomas mezcla de los de las dos cepas parentales (datos no mostrados). Las cepas conjugantes (B16YNN y B16GT) fueron capaces de formar velo cuando se cultivaron a 22°C en vino sobretabla diluido con H₂O hasta 5% (v/v) de

etanol, después de llegar a fase estacionaria en medio rico YPD.

Tabla R-6 Segregación de marcadores en las esporas de la cepa B16YNN

Segregación	Marcadores de auxotrofia						
	Ade+/Ade-	Ura+/Ura-	Trp+/trp-	His+/His-	Lys+/Lys-	Gal+/Gal-	Mal+/Mal-
	CHR I	CHR V	CHR IV	CHR II	CHR II		CHR VII
Tétradas completas							
4:0	7	8	8	7	9	2	4
3:1	1	0	0	2	0	1	1
2:2	1	1	1	0	0	6	3
1:3	0	0	0	0	0	0	1
0:4	0	0	0	0	0	0	0
Total esporas	33/3 92%:8%	34/2 94%:6%	34/2 94%:6%	34/2 94%:6%	36/0 100%:0%	23/13 64%:36%	26/10 72%:28%
Incompletas	74/8 90%:10%	81/1 98%:2%	79/3 96%:4%	77/5 94%:6%	76/6 93%:7%	72/10 88%:12%	73/9 89%:11%
Total	107/11 90%:10%	115/3 97%:3%	113/5 97%:3%	111/7 94%:6%	112/6 95%:5%	95/23 80%:20%	99/19 84%:16%

2.6. Micromanipulación de esporas de B16YNN

Se llevó a cabo la esporulación y micromanipulación de tétradas del conjugante B16YNN con objeto de llevar a cabo un análisis meiótico que proporcionara información acerca del número de cromosomas de la cepa B16 y el número de genes implicados en la formación de velo de flor. Se micromanipularon 60 tétradas distintas y se obtuvieron 9 de ellas con las cuatro esporas viables. La viabilidad del conjunto de esporas micromanipuladas fue del 49,2 % (118 esporas viables). En la Tabla R-6 se resumen las segregaciones encontradas para los marcadores de auxotrofia, tanto para las tétradas completas como para las incompletas. Las frecuencias de auxótrofos que cabrían esperar si hubiesen 1, 2 ó 3 copias del cromosoma único homólogo al portador del alelo de cada auxotrofia serían del 50%, 81% (Figura R-22) ó 96%, respectivamente, y dado que aparecen esporas auxótrofas en muy baja proporción, podríamos indicar que B16 posee varias copias (tres en la mayoría de los casos) de cada uno de los cromosomas en los que se encuentran los marcadores de auxotrofia. En la Tabla R-7 se muestra la segregación encontrada para la formación de velo de flor en las esporas de tétradas completas. La proporción de esporas formadoras de velo se aproxima a una proporción $2/3^+ : 1/3^-$. La gran cantidad de ascas incompletas nos indica que en las meiosis de este conjugante se están produciendo frecuentes pérdidas de cromosomas que

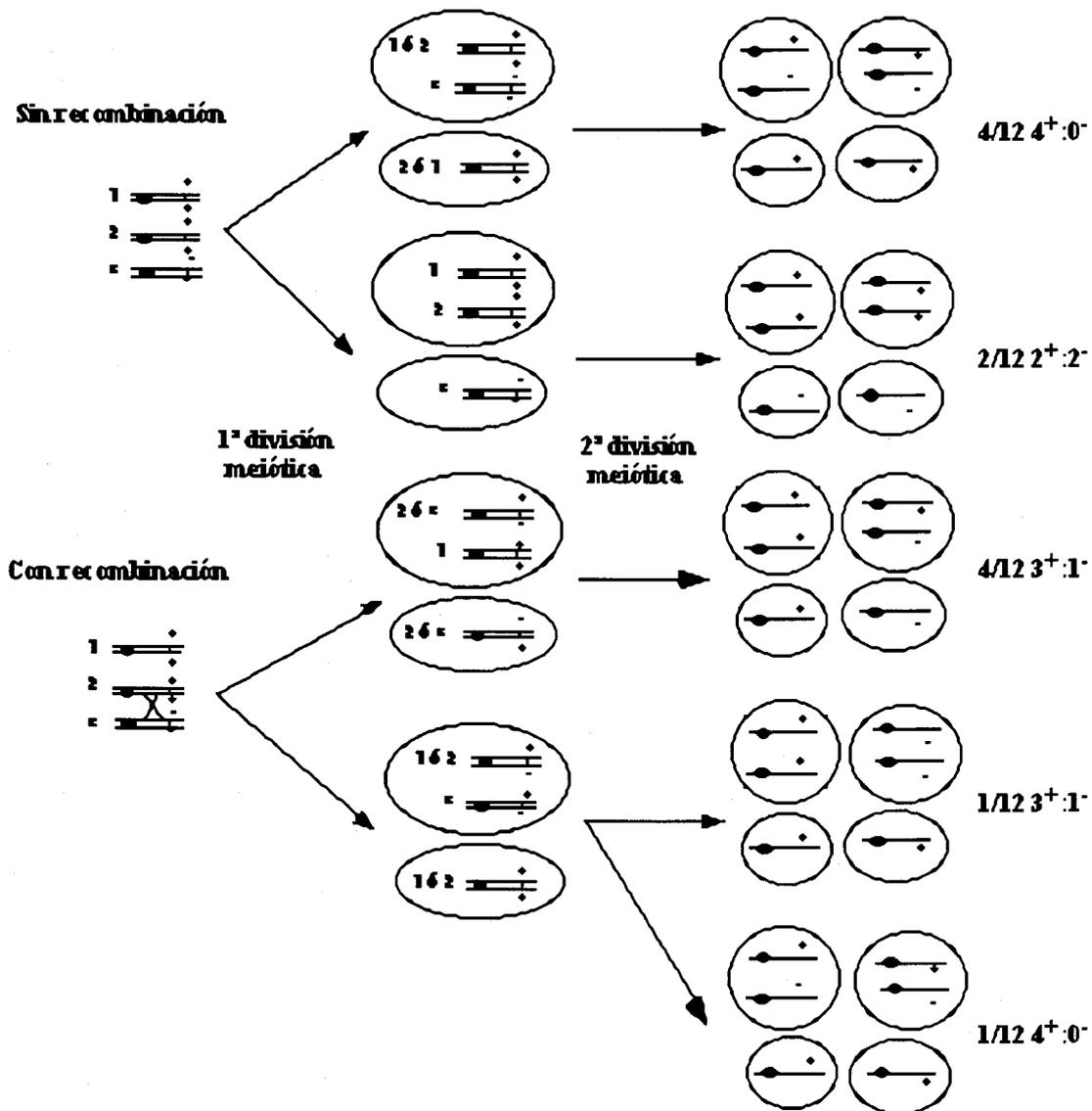


Figura R-22 Esquema de la segregación esperada para un marcador recesivo situado en una de las copias de un cromosoma trisómico

reducen la viabilidad de las esporas y hacen difícil un análisis meiótico que permita establecer el número de genes implicados en el fenómeno de formación de velo. Sin embargo, la frecuencia de esporas que forman velo (2/3) y la presencia de tétradas 3⁺:1⁻ y 1⁺:3⁻ indican que son necesarios varios genes

2.7. Micromanipulación de esporas de B16GT

La cepa GT153-6a posee un marcador recesivo distinto en 14 de sus 16 cromosomas por lo que es útil para tratar de establecer de una forma muy precisa, mediante análisis meiótico, el nivel de ploidía aproximado de la cepa B16 y tratar de asignar el o los genes responsables de la formación de velo a cromosomas concretos. A pesar de haber micromanipulado 110 tétradas del conjugante B16GT, no se obtuvo ninguna con 4 esporas

Tabla R-7 Formación de velo de flor por esporas de tétradas completas de la cepa B16YNN

Esporas	Tétradas									
	30	32	42	43	45	56	60	65	74	
A	+	-	+	+	+	+	+	+	+	
B	+	-	+	+	-	+	-	-	+	
C	+	+	-	-	-	-	+	+	+	
D	+	-	-	-	+	+	+	+	+	
Flor⁺:Flor⁻	4:0	1:3	2:2	2:2	2:2	3:1	3:1	3:1	4:0	Total
										24:12

viables. Se obtuvieron un total de 105 esporas viables, que representa un 23,8 % de viabilidad. En la Tabla R-8 se muestran los porcentajes de esporas auxótrofas para los distintos marcadores utilizados y el porcentaje de esporas con capacidad para formar velo en vino sobretaba diluido con H₂O hasta un porcentaje de etanol del 5% (v/v). La probabilidad de encontrar una espora protótrofa si la cepa B16 fuera haploide sería igual a $6 \cdot 10^{-5}$ ($0,5^{14}$). Esta probabilidad sería de 0,09 ($0,83^{14}$) y 0,56 ($0,96^{14}$) si B16 aportara 2 ó 3 copias de cada cromosoma, respectivamente. Al haber obtenido un porcentaje de protótrofos del 42%, podemos decir que el nivel de ploidía aproximado de la cepa B16 es 3n.

Tabla R-8 Segregación de auxotrofias y formación de velo en esporas de la cepa B16GT

Marcador	Cromosoma	Fenotipo	Nº de esporas	%
-	-	Flor ⁺	54	51
ade1	I	ade ⁻	3	3
gal2	II	gal ⁻	19	18
leu1	VII	leu ⁻	47	45
leu2	III	leu ⁻	47	45
aro3	IV	aro ⁻	3	3
ura3	V	ura ⁻	0	0
his2	VI	his ⁻	2	2
his6	IX	his ⁻	2	2
arg4	VIII	arg ⁻	2	2
ile3	X	ile ⁻	1	1
met14	XI	met ⁻	3	3
asp5	XII	asp ⁻	1	1
lys7	XIII	lys ⁻	3	3
lys9	XIV	lys ⁻	3	3
-	-	Protótrofos	44	42

2.8. Selección de esporas de B16GT buenas formadoras de velo

Se llevó a cabo un proceso de selección de esporas del conjugante B16GT que fueran resistentes a altas concentraciones de etanol y que formaran velo rápida y abundantemente. Para ello se cultivaron las esporas viables en YPD hasta fase estacionaria temprana y se

pusieron a formar velo en vino sobretablas y vino sobretablas diluido en H₂O hasta una concentración en etanol del 5% (v/v). Se incubaron los inóculos a 22°C, sin agitación y se seleccionaron aquéllos que formaron un velo abundante y lo hicieron a igual o mayor velocidad que la cepa B16. De entre las esporas seleccionadas se conjugaron entre sí aquellas que eran de distinto sexo y que tenían marcadores de auxotrofia complementarios, con el fin de obtener conjugantes en medio mínimo SD. Así se seleccionaron los conjugantes BGT249, BGT269 y BGT409, procedentes de los cruces de la espora BGT-9a (*MAT α ade⁻*) con las esporas BGT-24b (*MAT α leu⁻*), BGT-26a (*MAT α leu⁻ asp⁻*), BGT-40a (*MAT α leu⁻ ilv⁻*), respectivamente. Se llevaron a cabo experimentos de inhibición del crecimiento de estos conjugantes en medios con concentración creciente de etanol y de formación de velo en vino sobretablas. Los tres conjugantes tienen mayores tasas de crecimiento que la cepa B16 en todos los medios probados (Figura R-23 y Tabla A-11) y dos de ellos (BGT249 y BGT409) forman velo de flor con mayor rapidez que esta cepa (Figura R-24). El tercer conjugante (BGT269) no llega a formar velo en vino sin diluir.

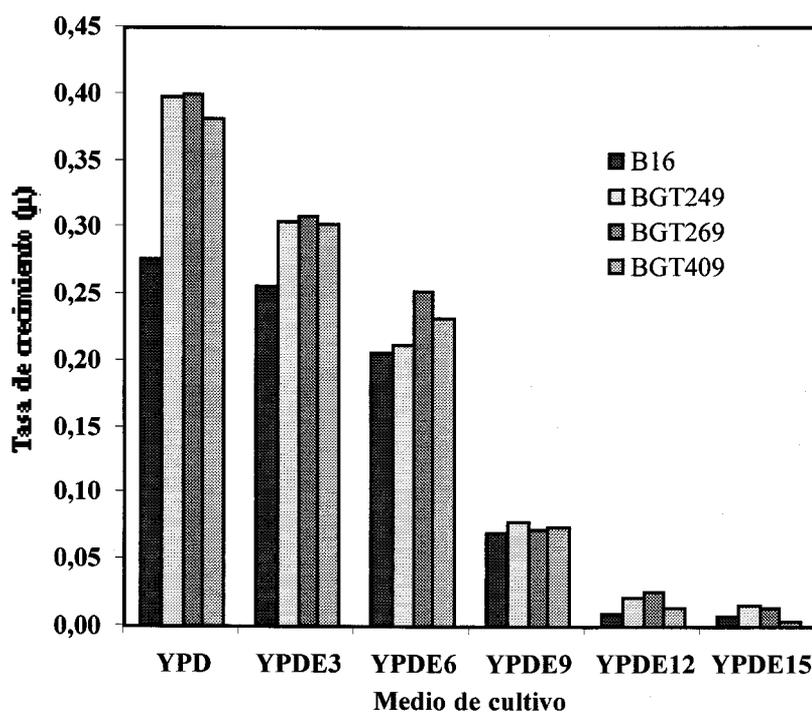


Figura R-23 Crecimiento de los conjugantes de esporas BGT en medios con etanol

2.9. Tratamiento de velo de flor con proteasas

Para determinar si la naturaleza de los componentes superficiales responsables de la formación de velo eran proteínas, se sometió a la cepa B16 en fase de formación de velo a tratamientos con distintas proteasas. Se cultivó la cepa vínica B16 en medio rico YPD, se

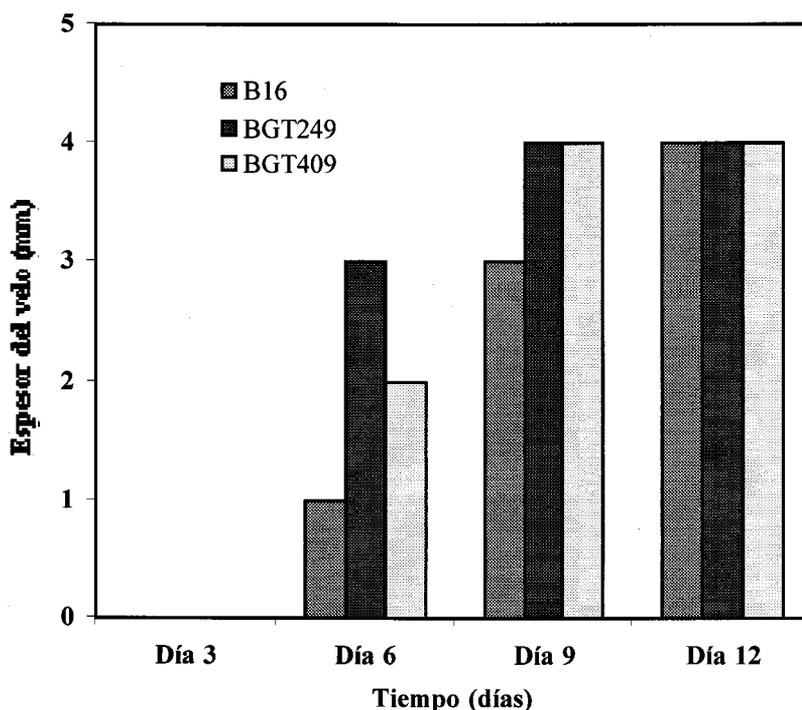


Figura R-24 Formación de velo de flor por los conjugantes de esporas BGT

lavó el cultivo con H₂O y se resuspendió en vino sobretablas. Se incubó a 22°C hasta la formación de un velo abundante (10 días). Se recogió el velo con la ayuda de un asa de siembra y se transfirió con mucho cuidado sobre la superficie del tampón en el que se iba a llevar a cabo el tratamiento con proteasas. Se incubó durante 3 h a 30°C y se midió periódicamente la desagregación producida por los tratamientos con proteasas, determinándose la DO_{660nm} del tampón. Con la acción de las Proteasas I y IV se liberan células al tampón con lo que se da un incremento de la DO_{660nm}. Como se puede ver en la Figura R-25, el tratamiento con proteinasa K produce un descenso de la DO_{660nm}, debido a que las células que se desprenden del velo por la acción de la proteasa, agregan inmediatamente y descienden como agregados al fondo del tubo.

2.10. Aglutinación sobre distintas cepas de *S. cerevisiae*

Para ensayar el posible efecto aglutinante del sobrenadante obtenido por tratamiento de la cepa B16 con proteinasa K, sobre distintas cepas de *S. cerevisiae*, se añadió a éste el inhibidor de proteasas PMSF y se resuspendió en el mismo un cultivo de dichas cepas. Previamente se cultivó cada cepa en medio rico YPD hasta fase estacionaria, se lavaron los cultivos en tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7.5 y se concentraron 20 veces. A continuación se diluyeron las células en los sobrenadantes que se habían obtenido tras tratar velo de la cepa B16 con proteinasa K durante 120 min (DO_{660nm} = 0,4) y se midió el grado de agregación

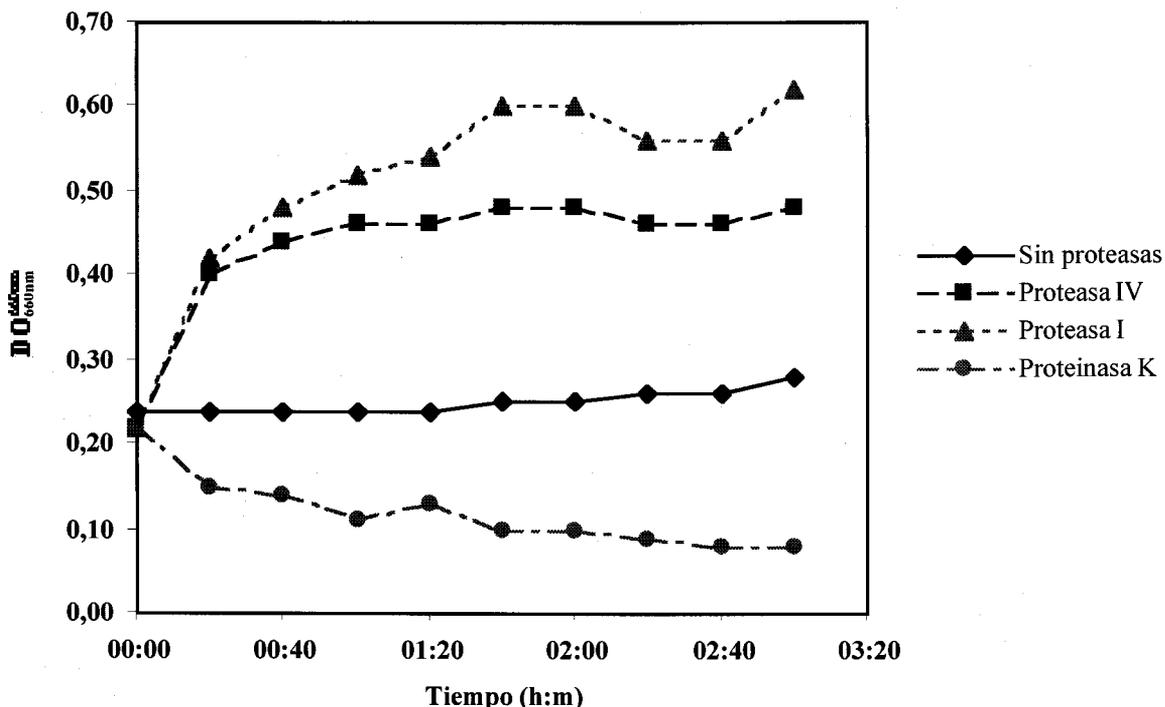


Figura R-25 Aumento de células libres por tratamiento de velo con proteasas

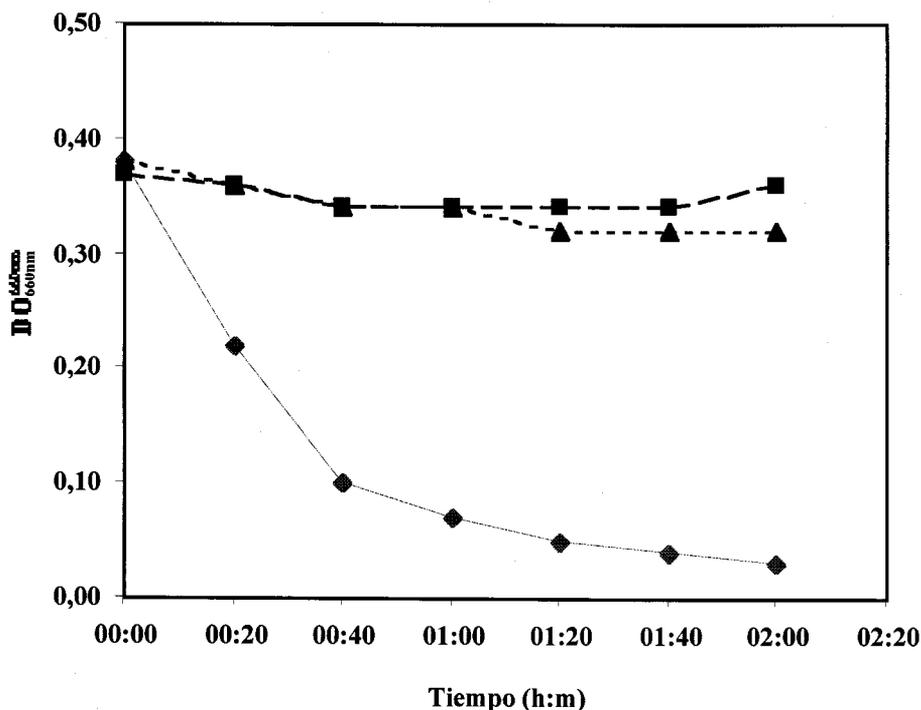


Figura R-26 Aglutinación de distintas cepas de *S. cerevisiae*

sobre cada cepa determinando periódicamente la DO_{660nm} en el medio. La Figura R-26 muestra que solamente se produce aglutinación en la cepa formadora de velo B16 y no en la cepa vínica IFI256 ni en la cepa de laboratorio S288C. Además, se ensayó la capacidad aglutinante de distintos sobrenadantes sobre la cepa B16, pudiéndose observar en la Figura

R-27 que hay una proporcionalidad directa entre la duración del tratamiento del velo con proteinasa K y la capacidad aglutinante de los sobrenadantes obtenidos sobre células de B16, con lo que parece que se están liberando paulatinamente al sobrenadante fragmentos proteicos con capacidad para inducir la aglutinación sobre un cultivo de células de la cepa formadora de velo B16.

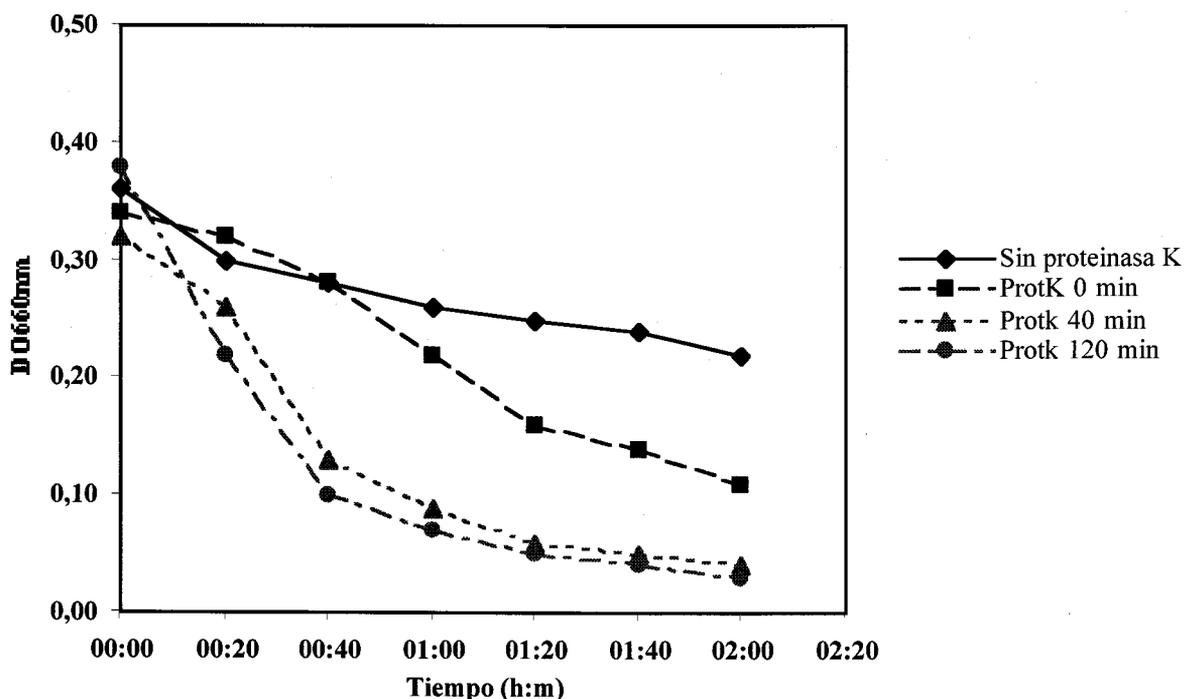


Figura R-27 Aglutinación de B16 con distintos sobrenadantes

2.11. Hidrofobicidad superficial en la cepa B16

Se determinó la hidrofobicidad superficial en distintas fases de crecimiento de la cepa formadora de velo B16 (fase exponencial y fase estacionaria en medio rico YPD y fase de formación de velo en vino sobretabla). Se observó un aumento gradual de la hidrofobicidad de manera que las células doblan prácticamente su hidrofobicidad al pasar de fase exponencial en YPD a fase de velo en vino sobretabla. La hidrofobicidad disminuye drásticamente tras el tratamiento del velo con proteinasa K 1mg/ml durante 120 min. Los resultados se muestran en la Figura R-28 (Tabla A-12).

2.12. Efecto de la adición de cicloheximida en la formación de velo de flor

Se trató de comprobar si la inhibición de la síntesis proteica repercutiría sobre la formación de velo o el mantenimiento del mismo una vez formado. Para ello se tomó un cultivo de la cepa B16 al principio de fase estacionaria de crecimiento y se transfirió a vino

sobretablas diluido previamente con H₂O hasta un contenido en etanol del 5% (v/v). Se incubó sin agitación y a 22°C y se añadió cicloheximida al medio, a una concentración final de 1µg/ml, a los tiempos indicados en la Tabla R-9. Se observó la evolución del velo durante cinco días, y al cabo de este tiempo se determinó la hidrofobicidad superficial. Se observó que la cicloheximida inhibe la formación de velo en los cultivos donde no se ha iniciado y en aquéllos en los que ya se había formado velo antes de la adición del inhibidor, el velo deja de crecer para al cabo del tiempo deteriorarse y caer. Además no se detecta el aumento de hidrofobicidad superficial en las células en fase de velo que habían sido tratadas con cicloheximida.

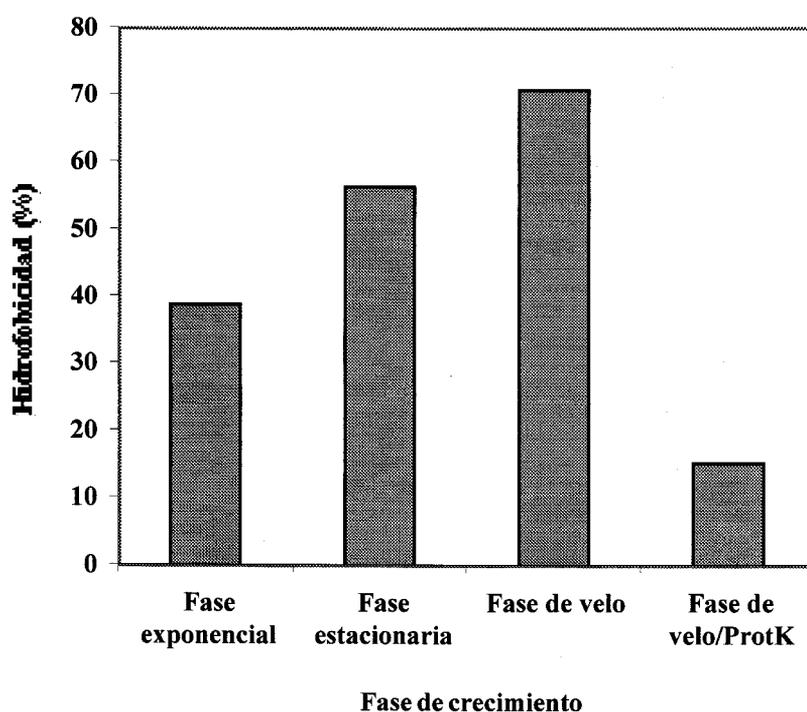


Figura R-28 Hidrofobicidad superficial en la cepa B16

Tabla R-9 Hidrofobicidad y formación de velo en la cepa B16 tratada con cicloheximida

Fase de crecimiento	Adición de cicloheximida	Velo	Hidrofobicidad
Exponencial en YPD	-		12,7 ± 3,0
Estacionaria en YPD	-		19,7 ± 1,1
Velo en vino	-	+++++	38,3 ± 0,5
Velo en vino	Día 2	+	13,1 ± 0,8
Velo en vino	Día 3	+++	22,0 ± 5,7
Velo en vino	Día 4	+++	20,2 ± 0,8
Velo en vino	Día 5	+++++	23,3 ± 1,9

2.13. Acidificación del medio de crecimiento producida por B16

Para comprobar el efecto de distintas concentraciones de etanol sobre la integridad de la membrana celular de la cepa B16 en distintas condiciones de crecimiento, se llevaron a cabo experimentos en los que se cultivó la cepa en medio YPD hasta las fases exponencial y estacionaria de crecimiento. Después de alcanzar esta fase se pasaron a formar velo de flor en vino sobretablas. Se tomaron muestras del cultivo en estos tres estados fisiológicos y se realizaron los experimentos de acidificación descritos en Materiales y Métodos (Jiménez y Benítez, 1987). Los resultados se muestran en la Figura R-29, donde podemos ver que la cepa B16 preadaptada a un medio con etanol (fase estacionaria de crecimiento y fase de velo) posee una membrana mejor adaptada a la presencia de este compuesto, ya que las pendientes de las rectas de regresión formadas por el pH final de los distintos medios de acidificación son menores que la que encontramos para la cepa en fase exponencial de crecimiento. Además, los valores absolutos de pH_f son mucho menores cuando la cepa ha sido preadaptada en fase de velo, en relación a los que encontramos en las dos fases de crecimiento sumergido.

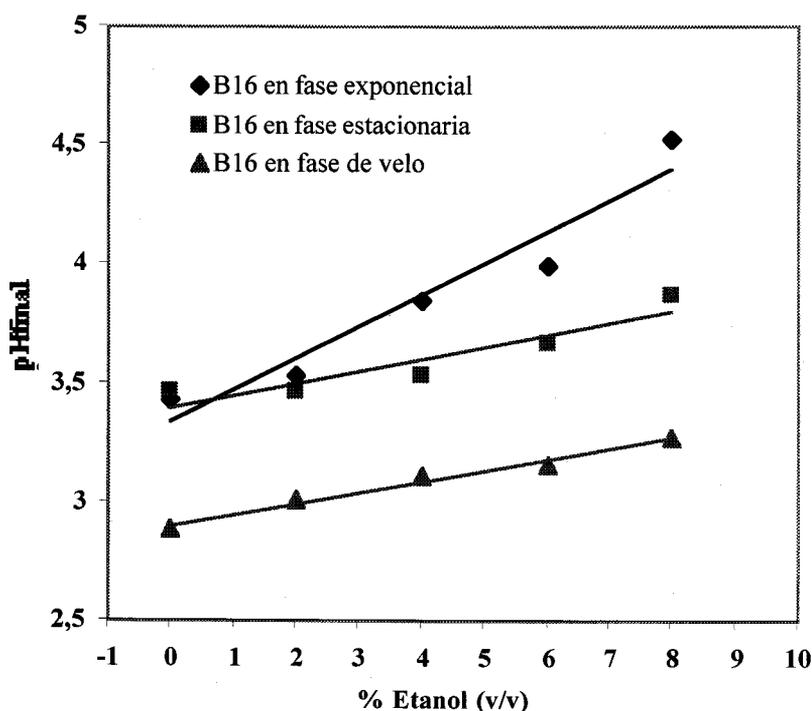


Figura R-29 Pendientes de la acidificación producida por B16 en distintos medios de cultivo.

2.14. Resistencia de la cepa formadora de velo B16 a distintos tipos de estrés

Se ha demostrado que la cepa B16 sufre un aumento de hidrofobicidad superficial considerable al pasar de fase exponencial de crecimiento a fase formadora de velo. Igual

mente se ha demostrado la existencia de proteínas superficiales altamente hidrofóbicas implicadas en ese fenómeno de agregación que conduce a la formación del velo. Con esta serie de experimentos pretendíamos averiguar si en esta fase de cultivo la cepa B16 posee una envuelta celular que le permita tener mayor resistencia a diferentes agentes estresantes, como solventes orgánicos (etanol), altas temperaturas o sonicación.

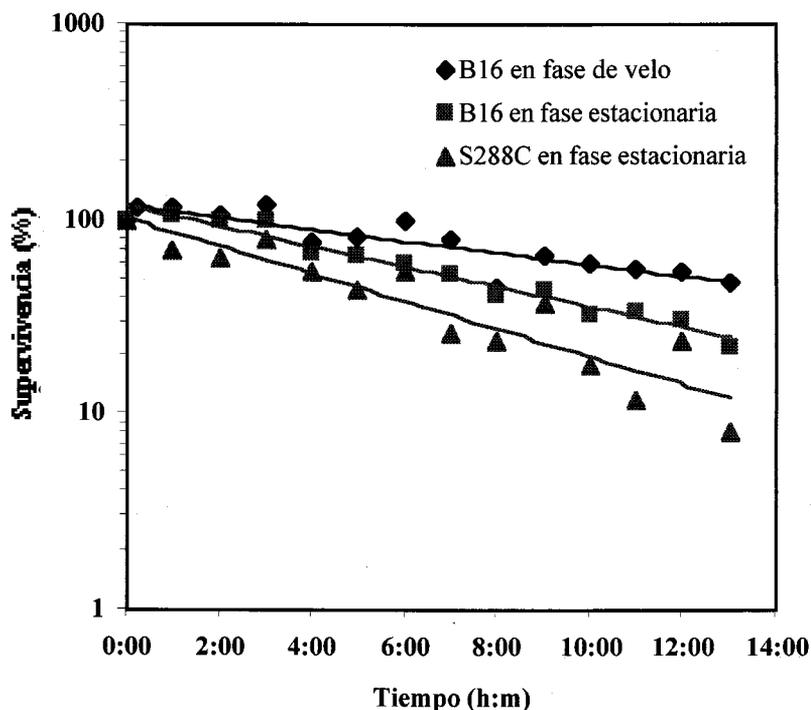


Figura R-30 Resistencia de B16 a alta concentración de etanol

Para ello se recogieron cultivos de la cepa B16 en fases exponencial y estacionaria de crecimiento en medio YPD y en fase de velo en vino sobretabla. Se lavaron con tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7.5 y se resuspendieron en este mismo tampón para llevar a cabo los distintos tratamientos. El tratamiento con alta concentración de etanol consistió en incubar la cepa en etanol al 20% (v/v) y 25°C durante tiempos que variaron entre 1 y 13 horas. El tratamiento con alta temperatura consistió en incubar la cepa B16 a 50°C durante tiempos que variaron entre 5 y 60 minutos. El último tratamiento consistió en sonicar la cepa B16 a 40W durante tiempo que variaron entre 1 y 6 minutos. La resistencia a estos tratamientos se determinó como supervivencia celular, calculando el número de UFC en medio rico YPD, con respecto al número total de células sembradas después de cada tratamiento. Los resultados se muestran en las Figuras R-30 (resistencia a etanol), R-31 (resistencia a alta temperatura) y R-32 (resistencia a sonicación). Se puede observar un incremento significativo de resistencia a los distintos tratamientos al pasar de fase estacionaria a fase de velo. La cepa,

además, es mucho más sensible a cualquiera de los tratamientos en fase exponencial de crecimiento. La formación de velo de flor se podría interpretar como un fenómeno de adaptación y supervivencia a las condiciones extremas en que se forma (vino con alto contenido en etanol).

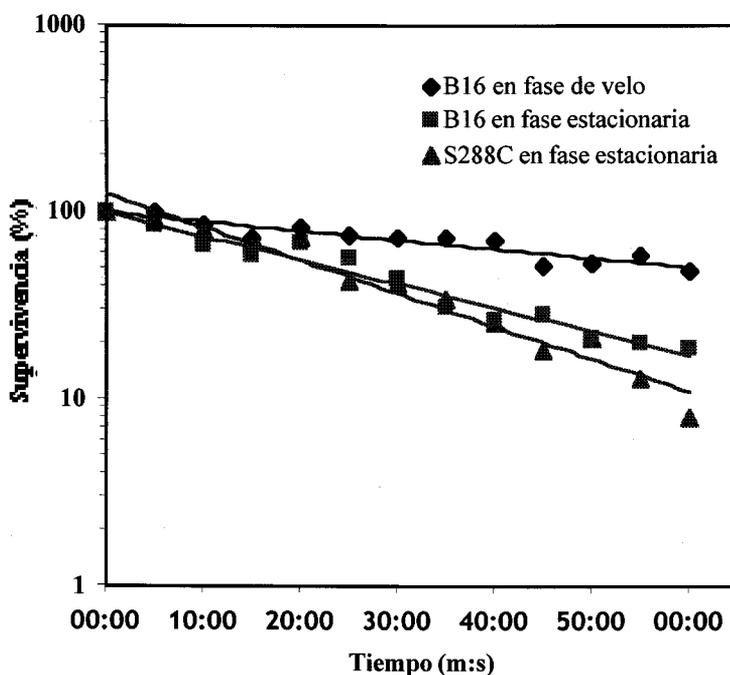


Figura R-31 Resistencia de B16 a alta temperatura

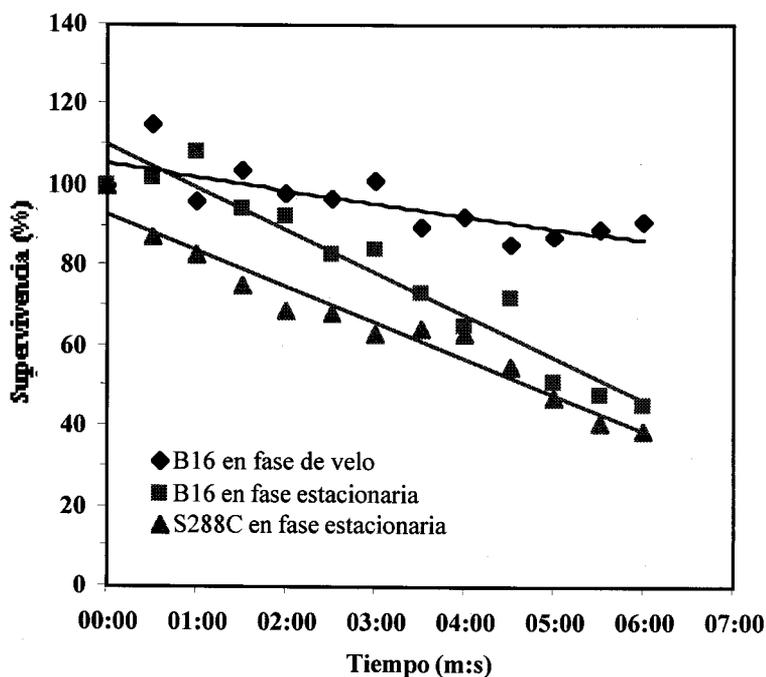


Figura R-32 Resistencia de B16 a sonicación

2.15. Incremento de la resistencia a etanol por adición de SOB F

Se llevaron a cabo experimentos para determinar si el sobrenadante SOB F, que tiene capacidad para inducir la agregación de un cultivo de la cepa B16 en medio YPD, también provoca un aumento de la resistencia a etanol. Para ello se recogió un cultivo de la cepa B16 en fase exponencial de crecimiento y se resuspendió en sobrenadante SOB F y en tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7.5. Ambas suspensiones celulares se incubaron a temperatura ambiente hasta la formación de agregados en el medio SOB F y a continuación se les añadió etanol hasta una concentración final de 20% (v/v). Se incubó durante los periodos de tiempo indicados en la Figura R-33 y se tomaron muestras que, previa dilución, se sembraron en cajas de medio rico YPD. Se incubaron las cajas a 30°C hasta la formación de colonias y se midieron los porcentajes de supervivencia celular. La Figura R-33 muestra que no hay diferencias significativas entre el cultivo resuspendido en SOB F y el resuspendido en tampón, por lo que debemos concluir que las proteínas presentes en el sobrenadante SOB F no tienen capacidad para incrementar la resistencia de B16 a etanol, cuando son añadidas a un cultivo de esta cepa.

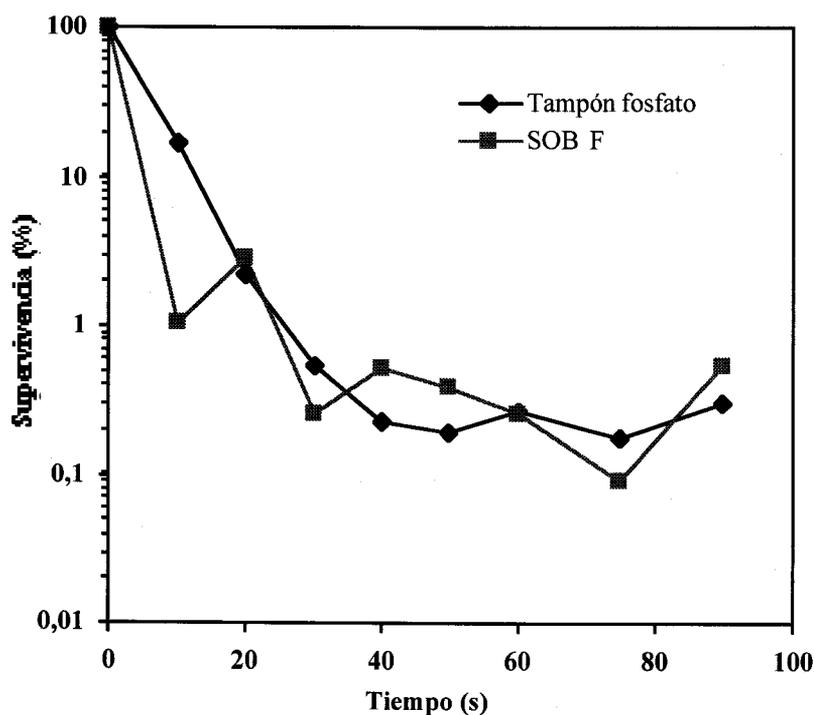


Figura R-33 Resistencia de B16 a 20% etanol por adición de SOB F

2.16. Purificación de la proteína aglutinante

De los tratamientos de la cepa B16 con proteinasa K se pudo deducir que es posible extraer una proteína superficial que provoca el fenómeno de agregación celular que conduce



a la formación de velo. Partiendo de este hecho se intentó la purificación de esta proteína haciendo uso del ensayo de agregación sobre B16 como prueba de la existencia de la proteína de interés en el sobrenadante que se iba obteniendo en el proceso de purificación.

2.17. Extracción de proteínas superficiales de velo de bodega.

Como primer paso hacia la purificación de la proteína estructural responsable del fenómeno de agregación que conduce a la formación de velo de flor se intentaron diversos métodos de extracción de proteínas superficiales de levadura. Se probaron métodos utilizados anteriormente por otros autores para la solubilización de manoproteínas de pared (Valentín et al., 1984) y todos los intentos resultaron infructuosos, al menos para recuperar un sobrenadante que contuviera a la proteína de interés funcionalmente activa. Los tratamientos se realizaron sobre velo recogido de solera de vino fino en las bodegas de Domecq, S.A..

Se trató 1 g de velo liofilizado rehidratado y resuspendido en 10 ml de tampón fosfato potásico 0.1 M pH 7.5, 1mM PMSF. Los tratamientos recibidos se resumen en la Tabla R-10. Los sobrenadantes obtenidos fueron dializados y liofilizados para concentrarlos y ensayar la existencia de actividad aglutinante sobre células de B16.

Tabla R-10 Tratamientos de velo para la extracción de proteínas de superficie

Tratamiento	Tiempo (min)	Temperatura (°C)
2% Triton X-100	20	25
1% SDS	20	25
1% SDS	4	100
5mM EDTA	20	25
6 M Urea	20	25
Tris-HCl	20	25
Autoclave	60	120

Posteriormente se probó un método de extracción menos agresivo y que resultó adecuado por la extracción de la proteína de interés. Es el método descrito en Materiales y métodos como "Extracción de proteínas de superficie por sonicación". Las condiciones de sonicación se establecieron empíricamente, de forma que se eligieron unas condiciones con las que, como muestra la Figura R-34, se extraía un reducido número de proteínas distintas (esto se estimó importante para facilitar la posterior purificación) y entre las cuales se encontraba la actividad aglutinante, comprobado por ensayos de aglutinación sobre la cepa B16.

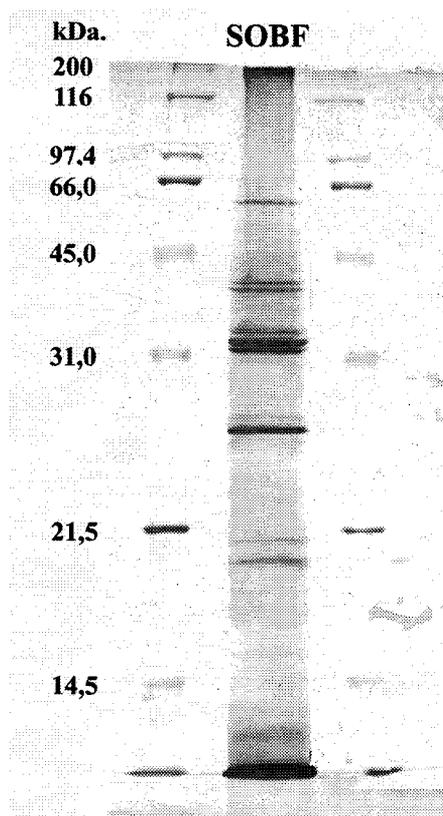


Figura R-34 Electroforesis de proteínas de sobrenadante SOB F

2.18. Determinación del tamaño molecular de la proteína aglutinante en estado nativo.

Para llevar a cabo la determinación del peso molecular de la proteína aglutinante y la separación de otras proteínas del sobrenadante se llevó a cabo una cromatografía de filtración en gel Sephacril S-300HR. El volumen de vacío de la columna fue $V_0 = 9,2$ y el volumen total $V_t = 23,4$. Al representar $(-\log K_{av})^{1/2}$ de las proteínas usadas como patrón de calibrado en función de su peso molecular se obtuvo un ajuste a una recta de regresión con $r^2 = 0,996$, por lo que la columna se encontraba bien empaquetada y calibrada. Se eluyeron $100 \mu\text{l}$ de SOB F dializado y concentrado 20 veces por liofilización y se recogieron fracciones de un volumen aproximado de $0,5 \text{ ml}$ en las que se ensayó la capacidad aglutinante sobre células de B16. Únicamente la fracción n° 18, correspondiente a un volumen de elución de $9,01-9,54 \text{ ml}$, fue capaz de inducir la aglutinación sobre B16. Este resultado indica que la proteína con capacidad aglutinante tiene en estado nativo un tamaño superior a 1500 kDa , o que, más probablemente presenta un estado de oligomerización que hace que presente este gran tamaño.

Las proteínas de la fracción con capacidad aglutinante fueron precipitadas con ácido tricloroacético antes de separarlas en una electroforesis de proteínas en condiciones desnaturizantes. El resultado se muestra en la Figura R-35. Aparece un patrón de bandas de

diferente tamaño, patrón no repetitivo en cuanto a tamaño y número de bandas en diferentes electroforesis de diferentes fracciones eluidas por cromatografía de filtración.

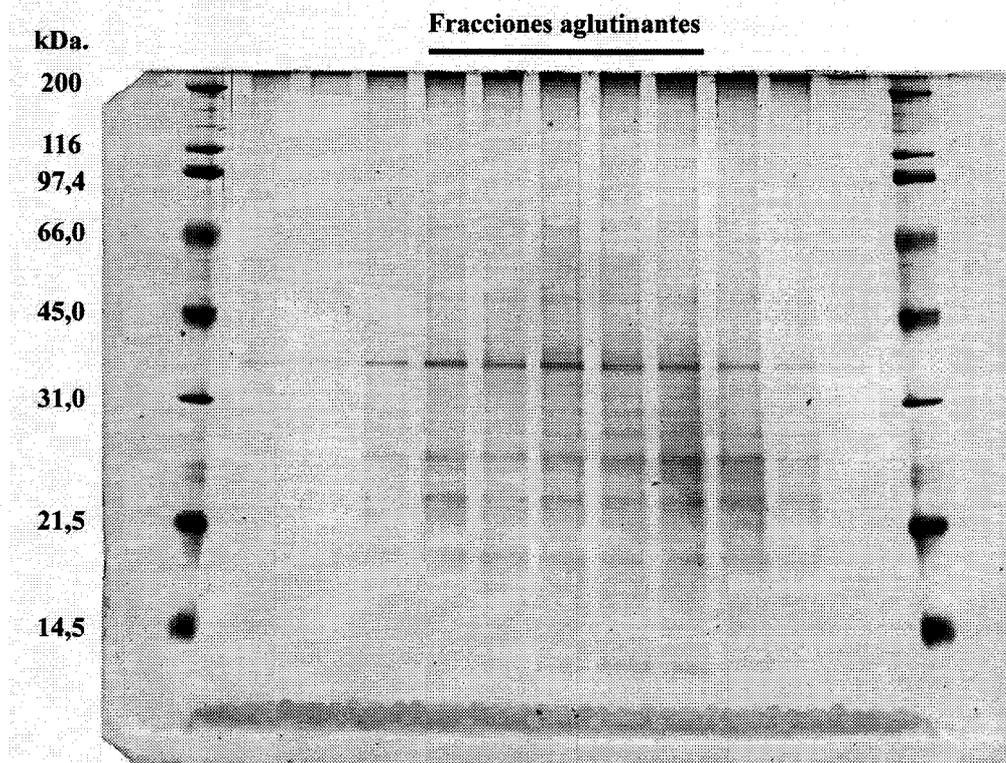


Figura R-35 Electroforesis de proteínas de fracción aglutinante

2.19. Solubilización diferencial de proteínas de tipo hidrofobina

Algunas características de la proteína responsable de la formación de velo coinciden con las descritas para un tipo de proteínas presentes en hongos filamentosos y que se agrupan bajo la denominación de hidrofobinas (Wösten et al., 1999; Wessels et al., 1991; de Vries et al., 1993). Estas son proteínas de bajo peso molecular (100 ± 25 aminoácidos) con alto grado de hidrofobicidad. Se excretan al medio extracelular y tienen la capacidad de autoagregar, formando una película protéica anfipática en interfases hidrofóbicas-hidrofílicas como, por ejemplo, una interfase aire-agua. Estos complejos solo pueden disociarse en ácido fórmico puro o ácido trifluoroacético (TFA).

Se utilizó un método de purificación descrito anteriormente para hidrofobinas de hongos filamentosos y que aprovecha las propiedades de agregación en interfases aire-agua, desagregación en TFA y solubilidad en etanol 60%, para separar estas proteínas de otras presentes en el sobrenadante. Es el método descrito en el apartado "Purificación de proteínas aglutinantes" de Materiales y métodos.

La proteína de interés tiene un comportamiento de hidrofobina Tipo II, en tanto que forma agregados inestables tras la formación de espuma, de manera que al centrifugar no

precipitan y quedan suspendidos en el sobrenadante (Wessels, 1997). A partir de aquí se desagregó con TFA y se solubilizaron los monómeros en etanol 60%, para posteriormente resolver la muestra en electroforesis en condiciones desnaturalizantes.

Durante todo el proceso se comprobó la existencia de la proteína aglutinante en las distintas fracciones por ensayo de aglutinación sobre células de la cepa formadora de velo B16.

2.20. Electroforesis

Se llevaron a cabo electroforesis de la fracción proteica aglutinadora obtenida en el proceso de purificación anterior y el resultado se muestra en la Figura R-36. Aparece una única banda electroforética con un peso molecular aparente de 20.5 kDa, esta fracción presenta capacidad aglutinadora de células de B16, por lo que podemos decir que esa banda electroforética se corresponde con la proteína aglutinadora de células de la cepa B16.

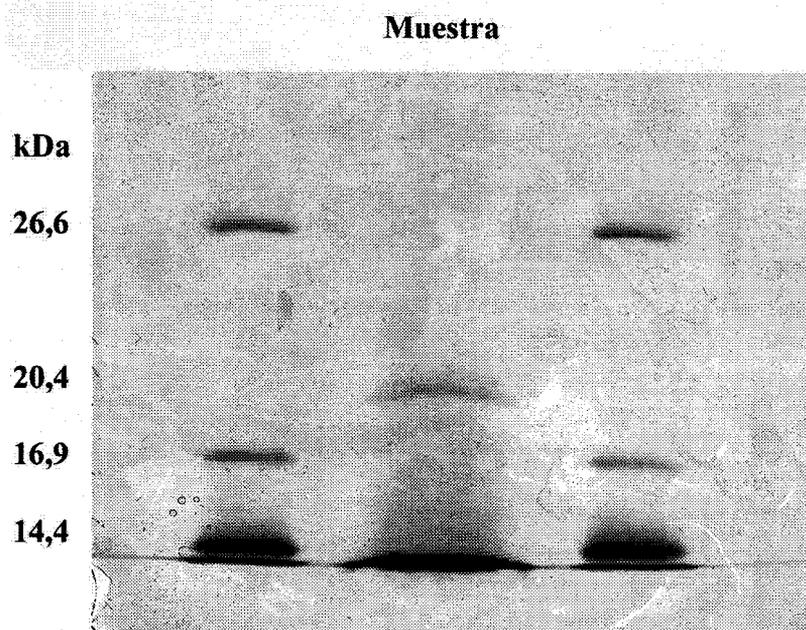


Figura R-36 Electroforesis de la proteína aglutinante de velo

2.21. Secuenciación de péptidos internos de la proteína aglutinante

Se purificó 1 nanomol de proteína aglutinante (20 μ g aproximadamente) y se corrió en una electroforesis preparativa de Tris-Tricina, al objeto de tener una cantidad de proteína suficiente para la determinación de secuencias de péptidos internos. La secuenciación se encargó a la empresa Eurosequence (Groningen, Holanda), donde, a partir de un fragmento del gel de acrilamida conteniendo la proteína, se llevó a cabo la digestión de la proteína con tripsina, seguida de extracción, purificación de los fragmentos resultantes por cromatografía

líquida de alta resolución en fase reversa (RP-HPLC) y análisis de secuencia de dos péptidos internos, llevado a cabo según la reacción de degradación de Edman (Edman, 1956; Ilse y Edman, 1963).

```

1      VQAVAVLKGD AGVSGVVKFE QASESEPTTV SYEIAGNSPN
      .. .....
      FE QASESEPTTV
      Phe Glu Gln Ala Ser Glu Ser Glu Pro Thr Thr Val

40     AERGFHIHEF G DATNGCVSA GPHFNPFKKT HGAPTDEV RH
      .....
      GFHIHEF G DAT
      Gly Phe His Ile His Glu Phe Gly Asp Ala Thr

80     VGDMGNVKT D ENGVAKGSFK DSLIKLIGPT SVVGRSVVIH

120    AGQDDLKGD TEESLKTGNA GPRPACGVIG LTN
      ....
      TGN? GPRPA?G
      Thr Gly Asn ??? Gly Pro Arg Pro Ala ??? Gly
  
```

Figura R-37 Determinación de la secuencia de péptidos internos de la proteína aglutinante

Las secuencias de los dos péptidos analizados fueron FEGASESEPTTV y GFHIHEFGDAT. Como se puede ver en la Figura R-37, estas secuencias muestran 100% de identidad con la secuencia de aminoácidos de la superóxido dismutasa (SOD) de *Saccharomyces cerevisiae* codificada por el gen *SOD1*. También se alinea una tercera secuencia, determinada a partir de una señal minoritaria, y que, aunque muestra dos indeterminaciones, también tiene un 100% de identidad con la secuencia de la SOD.

Discusión

Discusión

1. Selección y mejora de una cepa vínica para fermentación

La fase fermentativa de la elaboración de los vinos de Jerez es dirigida por una cepa seleccionada que se usa como pie de cuba. En esta fase es fundamental que la cepa utilizada inicie con rapidez la fermentación y lleve a cabo la misma con gran velocidad y eficacia. Por tanto, el primer paso en una estrategia de mejora es contar con una cepa que convierta el 98% de los azúcares del mosto en etanol y CO₂, y que lo haga a gran velocidad. Sin embargo, el factor más importante en la elaboración de vinos es la calidad organoléptica del producto final.

El *bouquet* de un vino está determinado por la presencia de compuestos y metabolitos de sabor deseable y por la ausencia de otros no deseables. Son muchas las variables que contribuyen al sabor y aroma particulares de un determinado vino. Así, la variedad de uva, las prácticas de viticultura o las prácticas enológicas están entre otros muchos factores a tener en cuenta (Cole y Noble, 1995). El sabor de la variedad de uva está principalmente determinado por la acumulación de compuestos del metabolismo secundario de *Vitis vinifera* (Henschke, 1997). Sin embargo, un alto porcentaje de estos compuestos se encuentran en forma no volátil O-glicosídica, que no contribuyen, por tanto, al aroma del vino.

Algunos estudios han mostrado que la hidrólisis enzimática de estos precursores intensifican el carácter aromático de los vinos gracias a la liberación de terpenoides de la uva. La rotura de enlaces glucosídicos ha sido una vía de mejora explotada en varios casos, primero utilizando preparaciones enzimáticas con β -glucosidasas de *Aspergillus* u otras especies fúngicas, que se añaden al mosto fermentado o al vino joven (Canal-Llauberes, 1993). Estas glucosidasas fueron posteriormente sustituidas por glucosidasas más activas, producidas por ciertas cepas de *S.cerevisiae* y otras especies de levaduras asociadas a la elaboración de vino, como *Candida*, *Hansenula* o *Pichia*. Esta estrategia mostraba un inconveniente económico importante y la expresión de estas actividades enzimáticas por las levaduras fermentativas se impuso como alternativa. Estas glucosidasas están normalmente ausentes en las cepas que se utilizan como pie de cuba por lo que la transformación con glucosidasas heterólogas ha sido una solución que se ha mostrado exitosa en varios casos (Pérez-González et al., 1993; Van Rensburg et al., 1996; Van Rensburg et al., 1997; Van Rensburg et al., 1998), en los que la utilización de pies de cuba transformados han mejorado el carácter aromático de los vinos producidos. La adición de enzimas fúngicas a los mostos para incrementar el aroma de los vinos resultantes de la fermentación (pectinasas, celulasas)

ha sido una práctica frecuente en la elaboración de vinos, pero la reproducibilidad de los resultados es escasa y resulta económicamente poco rentable. Una alternativa relativamente reciente ha consistido en la transformación de las levaduras fermentativas con los genes que codifican estas enzimas (González-Candelas et al., 1995; van Rensburg et al., 1996). En algún caso, los vinos elaborados con las levaduras transformadas presentaron un carácter aromático más acentuado (González-Candelas et al., 1995). En nuestro caso, la adición de preparados enzimáticos de cepas de *Thichoderma* cultivadas en medios con distintas fuentes de carbono (con objeto de obtener diversas combinaciones de actividades enzimáticas), o la adición de preparados enzimáticos comerciales no tuvo repercusión en la composición química de los vinos producidos a partir de los mostos tratados, aunque el proceso de desfangado se vio sustancialmente acelerado.

El perfil volátil de un vino está dominado por los compuestos a los que nos hemos referido anteriormente y por otros que se forman durante la fermentación (y la crianza biológica, caso de existir), como productos del metabolismo de las levaduras (Gómez et al., 1994). En este sentido, una alternativa de mejora de las propiedades organolépticas del vino consiste en el incremento de la concentración de ciertos alcoholes superiores y sus respectivos ésteres, que son producidos por las levaduras vínicas y que contribuyen de manera importante a los rasgos frutales del aroma en los vinos (Pretorius, 2000). Los alcoholes superiores provienen de las rutas anabólicas de ciertos aminoácidos y sus ésteres se sintetizan gracias a la actividad de distintas acetil transferasas que esterifican los alcoholes con el grupo acetilo del acetil-CoA, derivado del piruvato o del acetaldehído. En este trabajo se ha pretendido mejorar las características de un vino joven producido a partir de mosto de uva de la variedad Palomino Fino, utilizando una cepa vínica superproductora de los aminoácidos que actúan como precursores de los alcoholes superiores y los respectivos ésteres y que contribuyen a las características frutales del vino.

Las cepa IFI256 y la cepa superproductora de aminoácidos llevan a cabo la fermentación del mosto algo más lentamente que la cepa PDC y los vinos obtenidos mediante el empleo de estas cepas tienen niveles generales de alcoholes superiores a los de los vinos fermentados con el pie de cuba habitual (Figura R-3). Sin embargo en el caso de IFI256-1978, la producción de compuestos secundarios importantes para el aroma es excesiva, de acuerdo con los primeros análisis sensoriales realizados, y los vinos resultantes no tienen un perfil aromático adecuado para el consumo. Aún así, se demuestra que las modificaciones sobre el metabolismo de las levaduras con vistas a producir mayores cantidades o distintas proporciones de compuestos deseables es una alternativa de mejora de la fermentación, sobre

todo en aquellos casos en los que el perfil aromático de los vinos jóvenes es escaso. Habría que estudiar en el futuro la posibilidad de utilizar una mezcla de las cepas silvestre y superproductora de aminoácidos en proporciones adecuadas, o utilizar cepas superproductoras que produzcan menor cantidad de dichos compuestos.

La utilización de cepas vnicas distintas en origen a las cepas utilizadas normalmente hace variar completamente las características del vino producido. En este caso, la producción de acetaldehído se ve considerablemente reducida en los vinos de estas dos cepas y el grado alcohólico de los mismos es menor que en el caso del pie de cuba (Tabla A-4), por lo que estos nuevos vinos pierden en parte las dos características principales del vino producido con el pie de cuba industrial (alto grado alcohólico y elevado nivel de acetaldehído) y ganan en compuestos importantes para el carácter aromático, como se muestra en los datos de producción de los distintos alcoholes superiores (Figura R-3).

La cepa IFI256 esporula dando ascas que contienen solamente una o dos esporas con el mismo contenido en ADN que la cepa parental y no da lugar a ascas con tres o cuatro esporas (esporulación apomítica). La esporulación apomítica fue descrita en tres aislamientos independientes de cepas industriales (vnicas) de *Saccharomyces cerevisiae* (19e1, ATCC417 y ATCC4098) (Grewal y Miller, 1972). Otros autores (Klapholz y Esposito, 1980; Klapholz y Esposito, 1980b) identificaron los alelos que daban lugar a apomixia en estas cepas (*spo12-1* y *spo13-1*), y que resulta de un fenómeno de no disyunción cromosómica en la primera división meiótica. Las esporas de las diadas apomíticas tienen, por tanto, el mismo contenido en ADN que la cepa parental. El gen *SPO13* es epistático sobre *SPO12* y actúa antes que éste en una misma ruta responsable de la segregación de centrómeros homólogos en la primera división meiótica (Esposito y Kapholz, 1981; Wagstaff et al., 1982).

Los mutantes *cdc5* y *cdc14* de *S. cerevisiae*, también producen ascas con dos esporas a temperatura semi-permisiva (Schild y Byers, 1980) y Dahmann y Fitcher (1995) describen mutantes en ciclinas (mutantes *clb1 clb4*) que producen ascas con dos esporas al no llevar a cabo la segunda división de la meiosis. La esporulación apomítica ha sido descrita también en otros microorganismos, como *Lipomyces* (Henninger, 1974) o *S. pombe* (Nakaseko et al., 1984).

La falta de segregación en los productos meióticos de la cepa IFI256 (auxotrofías, sexo, capacidad para esporular, respiración, contenido en ADN, cariotipo electroforético) indica que en la esporulación apomítica de la cepa IFI256 no se da la primera división

meiótica y parece haber ausencia de recombinación meiótica. Otros autores (Esposito y Klapholz, 1981; Malone y Esposito, 1981) han demostrado previamente que la esporulación apomíctica se puede dar incluso en ausencia de recombinación meiótica, como ocurre en cepas apomícticas *spo11* o *rad52-1*.

Trabajos anteriores de nuestro grupo han demostrado que se pueden modificar las condiciones ambientales y nutricionales durante la esporulación para aumentar sustancialmente la frecuencia de esporulación en levaduras industriales (Codón et al., 1995) y se han descrito, más concretamente, algunas modificaciones nutricionales en los medios de preesporulación y esporulación que producen una reversión parcial de la apomixia en la cepa 19e1 (*spo12*), de manera que las cepa apomíctica esporula dando lugar a un considerable porcentaje de ascas con tres y cuatro esporas (Bilinsky y Miller, 1980). Se ha comprobado además que estas tétradas son el resultado de verdaderas meiosis ya que las esporas son haploides y el análisis meiótico de las mismas muestra una segregación del 50% en un marcador de auxotrofia de la cepa parental (Marmirolli y Bilinski, 1985)

En este trabajo se sustituyeron los medios de preesporulación y esporulación convencionales por medios definidos, con altas concentraciones de glucosa (en el medio de preesporulación) y de acetato potásico (en el de esporulación), como únicas fuentes de carbono y se modificaron ambos medios con la adición de sulfato de zinc (25 µg/ml). Al probar estas condiciones de esporulación en la cepa IFI256 se obtuvo hasta un 9% de ascas con cuatro esporas (Figura R-6), pero el análisis de las esporas "meióticas" mostró que, a pesar de que el contenido en ADN de la cepa IFI256 es 1,7 n, el 100% de las esporas son viables. Además no se produce la reducción meiótica típica en el contenido en ADN (Figura R-10) y las esporas presentan un cariotipo electroforético idéntico al de la cepa parental (Figura R-11). Todo ello sugiere la hipótesis de que las variaciones nutricionales ensayadas en los medios de preesporulación y esporulación provocan con frecuencia sucesos de endomitosis, seguidos de esporulación apomíctica en cada uno de los núcleos formados, en lugar de favorecer una verdadera meiosis como ocurre cuando se ensayan estas condiciones en la cepa 19e1 (Marmirolli y Bilinski, 1985). Descartamos la posibilidad de que los clones derivados de las esporas "meióticas" resulten de duplicar su contenido en ADN por ser homotáticas, ya que la viabilidad de tales esporas sería prácticamente nula si se diera una verdadera meiosis (dada la pequeña cantidad de ADN de la cepa parental). Esto impediría el cambio de sexo y la conjugación necesarias para que se diera la duplicación de la dotación cromosómica.

El aumento de la concentración de la fuente de carbono en los medios de pre y esporulación podría mejorar la toma de zinc por las células. El zinc lleva a cabo muy variadas funciones en la célula y algunas de ellas podrían afectar al correcto funcionamiento de la meiosis, ya que interacciona con las membranas nucleares, participa en la organización polimérica de distintas macromoléculas (Chvapil, 1973), promueve la polimerización de la tubulina (Hopper et al., 1974), afecta a la configuración de la cromatina (Kvist, 1980) y se acumula en el nucleolo (Fujii, 1954). El aumento en la concentración de zinc permite esporular correctamente a un porcentaje de la población de la cepa 19e1, pero en nuestro caso ese mismo aumento conduce aparentemente a una desincronización que hace que se produzca la meiosis "apomictica" en un cierto porcentaje de células binucleadas, dando lugar a tétradas con cuatro esporas apomicticas.

IFI 256 presenta al menos una mutación *spo* adicional a aquella que afecta al gen *SPO12* en la cepa 19e1 y que impide que se produzca una meiosis correcta, por lo que un exceso en la toma de zinc podría tener un efecto distinto al descrito para la cepa 19e1. Ashraf y Miller (1977, 1978) atribuyen a una causa similar a la de IFI256 la aparición de ascas con más de dos esporas cuando añaden el herbicida amitrol al medio de esporulación de una cepa apomictica de *Saccharomyces cerevisiae*. En *Ascobolus equinus* (Björling, 1944) el único núcleo haploide del asca joven lleva a cabo tres mitosis sucesivas para dar lugar a un asca con ocho esporas y en *Podospora arizonensis* (Mainwaring y Wilson, 1968) el asca joven es binucleada, y cada núcleo se divide dos veces mitóticamente para dar lugar a un asca con otras ocho esporas.

La conjugación de IFI256 con cepas de laboratorio ha permitido complementar el fenotipo apomictico y concluir que la mutación o las mutaciones que pueda presentar IFI256 son recesivas (Tabla A-9). Los experimentos de mapeo mitótico han permitido asignar la localización de este o estos alelos en el cromosoma VIII, donde previamente han sido mapeados los dos alelos causantes de la apomixia de la cepa ATCC 4117 (Klapholz y Esposito, 1980; Riles et al., 1993). Por esta razón se llevaron a cabo experimentos de conjugación y transformación que confirman que la cepa IFI256 es un mutante *spo12 SPO13*, que posee al menos una nueva mutación de apomixia sin identificar y que hace que la cepa IFI256 transformada con el gen *SPO12* continúe esporulando apomicticamente.

Los genes *SPO12* y *SPO16* tienen una zona complementaria en el genoma, pero esta complementariedad no es necesaria para la función de cada uno de ellos (Malavasic y Elder, 1990). Una mutación en *SPO12* impide la separación de cromosomas homólogos en meiosis y

una en *SPO16* hace que disminuya drásticamente el porcentaje de esporulación, aunque no afecta a la proporción de tipos de ascas. El ARNm de *SPO12* muestra máximos niveles en los momentos en que se dan las divisiones nucleares meióticas (Chu et al, 1998) y la proteína Spo12 interacciona en un sistema dos híbridos con la proteína del gen *MEC3*, que tiene un papel conocido como punto de control de daño en DNA, y posiblemente en el punto de control de la recombinación meiótica (Weinert et al, 1994; Lydall et al, 1996; Lydall y Weinert, 1997)

Otros autores (Toyn y Johnston, 1993) han demostrado que la proteína Spo12 también juega un papel en mitosis. Interacciona con las quinasas de ciclo celular codificadas por los genes *DBF2* y *DBF20*, que están involucradas en disyunción de cromátidas en mitosis. Estas quinasas tienen funciones redundantes, de manera que una delección del gen *DBF2* o *DBF20* no tiene ninguna consecuencia y la delección de ambas a la vez es letal. Sin embargo una mutación puntual en *DBF2* hace que la proteína no funcional secuestre el producto de *SPO12* y que el mutante sea letal. Este fenotipo se revierte insertando una sola copia extra del gen *SPO12*. El gen *SPO12* en multicopia suprime los efectos pleiotrópicos de la mutación *lyt1*, que da lugar a un mutante autolítico de tipo *cdc*. (Molero et al., 1993). El nivel de la proteína Spo12 en el núcleo de células vegetativas es máximo en el paso de G2 a M y una mutación *spo12* es sintéticamente letal en células vegetativas con una mutación en *HCT1*, un gen necesario para la salida de mitosis (Grether y Herskowitz, 1999)

Por otro lado se ha propuesto un papel del producto de *SPO13* en un retraso temporal de la entrada en la primera división de la meiosis que permita a los cromosomas sufrir las modificaciones necesarias para sufrir una división reduccional, ya que una ralentización de la meiosis (bajada de la temperatura, adición de HU) suprime el efecto de la mutación *spo13* (McCarroll y Esposito, 1994). Estos autores proponen un segundo papel tras completarse la primera división de la meiosis, impidiendo la terminación de la meiosis y la entrada en mitosis antes de que ocurra la segunda división meiótica, ya que la superexpresión de *SPO13* suprime el efecto de la mutación *cdc28-1*, que impide que se lleve a cabo la segunda división meiótica (McCarroll y Esposito, 1994). Las funciones de *SPO12* y *SPO13* guardan una estrecha relación aún sin dilucidar, ya que la superexpresión de *SPO13* y *BNS1* (un gen homólogo a *spo12*) suprime el fenotipo meiótico causado por una mutación *spo12* y la de *SPO13* suprime el de un doble mutante *spo12 bns1* (Grether y Herskowitz, 1999)

La identificación del alelo o alelos adicionales de apomixia de IFI256 podría ayudar a profundizar en el papel de estos genes durante la meiosis. Se está tratando de clonar este nuevo gen por transformación con una minigenoteca del cromosoma VIII de *S. cerevisiae*

formada por 52 clones solapados que cubren el 100% de la secuencia de este cromosoma (Riles et al., 1993; Erickson y Johnston, 1992). Hasta el momento, ninguno de los clones analizados complementa esta mutación.

La apomixia en particular y la reproducción asexual en general pueden tener ciertas ventajas frente a la reproducción sexual. No se necesita de otro individuo para la reproducción y esto es una gran ventaja en situaciones de poblaciones de baja densidad o en colonizaciones de nuevos habitats. Un genotipo fortuito particularmente bien adaptado a un determinado habitat, no se verá "destruido" por la recombinación y los poliploides e híbridos que muestren heterosis de valor competitivo se estabilizan y propagan rápidamente. Se ha demostrado que si se construye una serie de cepas homocigóticas y heterocigóticas con ploidía de 1 a 8, se encuentra que los heterocigotos triploides y tetraploides son más eficientes en fermentación que los homocigotos de mayor y menor ploidía (Hammond, 1996) por lo que la heterosis y la poliploidía mejoran la eficacia en fermentación. Como desventaja tenemos la escasísima variabilidad genética y la baja tasa de evolución, basada exclusivamente en la mutación. Por otro lado las ascosporas presentan mucha más resistencia que las células vegetativas a toda una serie de tipos de estrés ambiental (etanol, dietil-éter, altas y bajas temperaturas, congelación y descongelación, desecación, daño mecánico, falta de nutrientes, radiación, etc) (Miller, 1989). En este sentido la esporulación apomíctica puede conceder en determinadas situaciones una serie de ventajas selectivas frente a la esporulación meiótica, ya que la esporulación apomíctica es menos dependiente de temperatura y es menos sensible a la inhibición por glucosa (Grewal y Miller, 1972; Bilinski y Miller, 1980; Marmirolli y Bilinski, 1985). Además, las nuevas apoesporas pueden volver a esporular apomícticamente ante condiciones desfavorables mientras que esto no es posible si la esporulación es meiótica (Bilinski et al., 1987) La esporulación apomíctica permite a las cepas, por tanto, soportar condiciones adversas en forma de ascosporas, sin la necesidad de llevar a cabo divisiones meióticas sensibles a estrés y que desestabilizarían unos genotipos bien adaptados a determinados ambientes. Probablemente, la abundancia de fenotipos apomícticos entre las levaduras vínicas sea una consecuencia de la selección artificial que ha ejercido el hombre al tratar de mantener constantes las características de los vinos que producía cuando éstos eran de buena calidad, seleccionando cepas con características genéticas que aportan estabilidad genómica.

2. Caracterización y mejora de una cepa vínica para crianza biológica

La crianza biológica de los vinos de Jerez es llevada a cabo por cepas de *Saccharomyces cerevisiae* ausentes en la fase fermentativa y que se pueden dividir en cuatro razas: *S. beticus*, seguida de *S. montuliensis* y en menor medida de *S. cheresiensis* y *S. rouxii* (Martínez et al., 1995).

Las levaduras se desarrollan durante esta fase formando una gruesa capa que tapiza la superficie del vino (velo de flor), presumiblemente como un mecanismo adaptativo que permite a las levaduras crecer en un medio con elevado grado alcohólico y donde las únicas fuentes de carbono utilizables son respirables (Martínez et al., 1995). La presencia de este velo es determinante para las características finales de los vinos producidos, ya que mantiene un ambiente fuertemente reductor en el vino y modifica las características organolépticas del mismo gracias a la actividad metabólica de las levaduras (Pérez, 1991).

El vino fino es un medio de cultivo con un alto contenido en etanol y acetaldehído (Martínez et al., 1995) y estos compuestos están ejerciendo un efecto tóxico constante sobre las levaduras responsables del envejecimiento biológico del mismo. La base fisiológica de esta toxicidad es compleja y no muy bien conocida. Los principales sitios de acción del etanol son las membranas celulares, proteínas hidrofóbicas de la membrana mitocondrial y proteínas citosólicas hidrofílicas (Walker, 1998). Entre las respuestas que exhiben las células encontramos diferentes cambios en la composición lipídica de las membranas, elevados niveles de trehalosa y síntesis de diferentes proteínas anti estrés, entre las que encontramos la superóxido dismutasa (SOD), que neutraliza los radicales libres que se sintetizan por efecto del metabolismo oxidativo del etanol (Walker, 1998). Etanol y acetaldehído son las principales fuentes de carbono durante la crianza biológica y al utilizarse mediante un metabolismo respiratorio causan un estrés oxidativo importante sobre las levaduras. Las dianas moleculares de las radicales libres derivados del oxígeno son el ADN, el ARN, las proteínas y los lípidos. Estos últimos son la principal diana durante el estrés oxidativo. Los radicales libres atacan directamente a los ácidos grasos poliinsaturados de las membranas, iniciándose su peroxidación, cuyo primer efecto es una reducción de la fluidez de las membranas. Este efecto actúa como un amplificador. Se forman más radicales libres y los ácidos grasos se degradan dando lugar a una variedad de compuestos, entre los que se encuentran distintos aldehídos muy reactivos y que causan daño oxidativo sobre las proteínas (Humpries y Sweda, 1998). El ADN es otra diana importante, ya que los radicales libres atacan tanto a las bases como a los azúcares, produciendo roturas de simple y doble cadena y uniones covalentes con otras moléculas cuyo resultado son bloqueos de la replicación (Sies, 1993; Sies y Menck, 1992) o la incorporación de mutaciones. Las altas concentraciones de

etanol causan efectos deletereos tanto sobre el ADN cromosómico (Ristow et al., 1995) como en el mitocondrial (Ibeas y Jiménez, 1997), bien directamente o bien a través de su conversión en acetaldehído. De todo esto se deduce que la resistencia a etanol es un carácter marcadamente poligénico y muy complejo.

La ADN polimerasa mitocondrial no tiene actividad correctora, por lo que la tasa de mutación y la variabilidad en el genomio mitocondrial inducida por etanol o los radicales libres debe ser mucho más alta que en la nuclear. (Guérin, 1991). Los mutantes mitocondriales son incapaces de sobrevivir en el vino fino debido a que la principal fuente de carbono utilizable, el etanol, es sólo respirable, con lo que estos mutantes están fuertemente contraseleccionados. Por el contrario, los clones "grandes" presentan reiterativamente el mismo patrón de RFLP (Figuras R-16 y R-17). Estos datos, junto a la reiteración de patrones mitocondriales encontrados en cada levadura de velo de flor nos indican un importante proceso de selección de ciertos genomios mitocondriales, extraordinariamente eficientes en las condiciones de cultivo que encontramos en los vinos finos.

Al someter a una levadura a altas concentraciones de etanol o acetaldehído encontramos que se incrementa fuertemente la aparición de mutantes petite, primero por acumulación de mutaciones en el ANDmit (ρ^-) (Figuras R-16 y R-17) y después carentes de ADNmit (ρ^0) (Figuras R-18 y R-19). Esto se debe posiblemente a la incapacidad de propagación de las mitocondrias mutantes, debido a su vez a la acumulación excesiva de mutaciones mitocondriales o a la desestabilización de las membranas.

Las cepas de flor probablemente posean genomios mitocondriales muy seleccionados y muy adaptados a las altas concentraciones de etanol y acetaldehído que encontramos en los vinos finos y la mayoría de las variantes producidas por el efecto mutagénico de estos compuestos da lugar a mitocondrias menos eficientes que las seleccionadas.

En la segunda parte del trabajo hemos intentado profundizar en otros mecanismos de adaptación al vino fino, aparte de las mitocondrias y el metabolismo respiratorio. Concretamente hemos estudiado tanto la estructura genética de una cepa formadora de velo, B16, como las bases genética y molecular del fenómeno de formación de velo. Se ha intentado la esporulación de la cepa B16 variando las condiciones nutricionales y ambientales de la cepa sin conseguir un resultado positivo, por lo que se estimó conveniente la formación de híbridos capaces de esporular para llevar a cabo un análisis meiótico que arrojara información acerca de la constitución genética de la cepa B16 y de la formación de velo.

Entendemos la formación de velo de flor como un fenómeno con características comunes a otro fenómeno de agregación celular ampliamente estudiado en levaduras: la

floculación. En este fenómeno de agregación también se produce un aumento notable de la hidrofobicidad celular asociado a la floculación (Bossier et al., 1997; Straver et al., 1993a; Straver et al., 1993b; Smit et al., 1992), se induce por un aumento de la concentración de etanol (Dengis et al., 1995) o la limitación de nutrientes (Smit et al., 1992) y está mediada por proteínas superficiales de la célula (Kobayashi et al., 1998; Bony et al., 1997)

Al cruzar la cepa B16 con una cepa floculante obtuvimos híbridos con capacidad para llevar a cabo ambos fenómenos de agregación, dependiendo de las condiciones de cultivo. La segregación de ambos caracteres en las esporas de uno de los híbridos nos indica que al menos alguno de los genes implicado en cada proceso no participa en el otro (Tabla R-5), por lo que podemos concluir que formación de velo y floculación son fenómenos de agregación celular con una base genética distinta. El hecho de que la formación de velo no se vea impedida por la adición del agente quelante de Ca^{2+} EDTA (datos no mostrados) apoya nuestra conclusión.

Se ha realizado el análisis genético de dos híbridos resultantes del cruce de la cepa B16 con dos cepas de laboratorio, al objeto de determinar su nivel de ploidía y tratar de discernir el número de genes implicados en el fenómeno de formación de velo. De los resultados obtenidos se pueden extraer varias conclusiones. B16 es aproximadamente triploide, ya que partiendo de la hipótesis de que B16 tiene este nivel de ploidía, deberíamos encontrar entre las esporas del conjugante B16GT un porcentaje de auxótrofos del 56%, que se aproxima al porcentaje obtenido (42%) (Tabla R-8). Para determinar el número aproximado de genes necesarios para la formación de velo hemos hecho uso de la segregación de este fenotipo en las ascas completas del conjugante B16YNN, que son el subconjunto de ascas en el que se han dado las meiosis de forma más equilibrada. De los resultados obtenidos (2/3 de las esporas forman velo) (Tabla R-7) y teniendo en cuenta que la cepa B16 es aproximadamente triploide, podemos decir que B16 posee aproximadamente seis productos génicos ausentes en la cepa GT153-6a necesarios para la formación de velo. Basándonos en el mismo razonamiento que utilizamos para determinar el nivel de ploidía de la cepa B16, la probabilidad de encontrar seis de estos genes no ligados en una espora es de $(0.94)^n = 0.69$, donde $n=6$ y este es el valor que más se aproxima al porcentaje encontrado (67%).

Dos de los híbridos de la cepa B16, B16IM1 y B16GT presentan una viabilidad muy escasa pero de valor muy parecido (23,6 y 23,8%, respectivamente) (Tabla A-9) mientras que este valor es bastante más elevado en el tercer híbrido, B16YNN: En éste se alcanza un 49,2% de viabilidad, y donde un 15% de las ascas micromanipuladas posee las cuatro esporas viables.

Teniendo en cuenta que, aunque la formación de velo es un fenotipo dominante, también es poligénico, inicialmente descartamos la posibilidad de clonar por transformación y selección un hipotético gen estructural responsable de la agregación celular de B16 con vistas a un proceso de mejora

Como alternativa procedimos a la selección de variantes mejoradas obtenidas tras la esporulación del conjugante B16GT y la conjugación entre esporas, para obtener cepas que formen el velo de flor con mayor velocidad que la cepa de partida. Se obtuvieron así dos conjugantes (BGT249 y BGT409) que cumplen la característica buscada (Figura R-24). Sólo uno de los dos conjugantes que forman el velo de flor rápidamente muestra mayor tasa de crecimiento que la cepa B16 en medios con distintas concentraciones de etanol. Éste resultado indica que la mayor rapidez en formar velo no es sólo el resultado de una mayor tasa de crecimiento de la cepa. Muy probablemente las características organolépticas de los vinos envejecidos con estas cepas hagan que no sean adecuados para el consumo, ya que aproximadamente un 25% de su ADN proviene del parental de laboratorio. Este inconveniente puede ser eliminado por sucesivas rondas de esporulación del conjugante, selección de los mejores formadores de velo y retrocruzamiento con la cepa B16. De esta forma, tras solamente tres retrocruzamientos dispondríamos de una cepa con más del 99% de ADN del parental B16, con lo que sería de esperar que las características de los vinos producidos por esta cepa fueran adecuadas.

Los experimentos con proteasas (Figura R-25) nos indican que los componentes estructurales responsables de la formación de velo de flor son proteínas y las determinaciones de hidrofobicidad (Figura R-28) que estas proteínas confieren un alto grado de hidrofobicidad superficial a las células. El empleo del inhibidor de la síntesis protéica cicloheximida impide la formación de velo (o la detiene) e impide a la vez el aumento de hidrofobicidad que sufren las células en fase de velo (Tabla R-9), sin que podamos decir que ambos efectos están directamente relacionados.

El tratamiento de la cepa B16 con proteinasa K rompe los agregados celulares que forman el velo pero las células liberadas vuelven a agregar en el fondo del tubo, de ahí que observemos un descenso de DO en los cultivos tratados con esta proteasa (Figura R-25). Los sobrenadantes obtenidos con los tratamientos con proteinasa K tienen capacidad para inducir la aglutinación de la cepa B16 cultivada hasta fase exponencial o estacionaria de crecimiento (Figura R-26) y el efecto aglutinante es mayor cuando se alarga el tratamiento de velo con

proteínasa K (Figura R-27). Estos datos parecen indicar que se están liberando fragmentos proteicos al sobrenadante y éstos mantienen la capacidad para producir la agregación celular en la cepa formadora de velo. Es posible que algún componente de la pared de esta cepa sea necesario para que se dé la agregación ya que no obtenemos el mismo resultado cuando se intenta la aglutinación sobre cepas no formadoras de velo (Figura R-26).

Se ha descrito que una cepa altamente tolerante a etanol mejora la integridad estructural de su membrana plasmática si ésta ha sido previamente adaptada en un medio de crecimiento con etanol, de forma que presenta mayor tolerancia frente a este compuesto, y ese fenómeno es dependiente de síntesis proteica (Jiménez y Benítez, 1987). Nuestros resultados confirman la mejora de la tolerancia a etanol en la cepa B16, que muestra una integridad de membrana mayor si ha sido cultivada en fase de velo sobre vino sobretablas (Figura R-29).

El velo de flor es una estructura que se forma sobre la superficie del vino en condiciones en que las levaduras soportan altos niveles de estrés oxidativo (las únicas fuentes de carbono son respirables), hídrico (el velo está en contacto con el aire), así como altas concentraciones de etanol y acetaldehído. El aumento de hidrofobicidad superficial que acompaña a la formación de esta estructura podría ser un mecanismo adaptativo que permita la supervivencia en estas condiciones. Por todo ello se han llevado a cabo experimentos en los que se demuestra que la levadura de velo B16 muestra un aumento significativo de tolerancia a distintos tipos de estrés, como altas concentraciones de etanol y altas temperatura o resistencia a la rotura mecánica, cuando pasa de estar cultivada en fase sumergida en medio rico YPD a formar velo de flor en vino (Figuras R-30, R-31 y R-32). Debemos concluir que el estado fisiológico de la célula en fase de formación de velo protege frente a distintas condiciones de estrés.

Se ha tratado de incrementar la resistencia a etanol de la cepa B16 cultivada hasta fase exponencial de crecimiento por adición de sobrenadantes con capacidad aglutinante, pero los resultados han sido negativos (Figura R-33). Cabe la posibilidad de que la proteína responsable de la aglutinación en B16 no pueda conferir la resistencia a etanol al ser añadida desde el exterior o bien puede ocurrir que debido a que, como se ha descrito, el carácter de la tolerancia a etanol es poligénico y puede ser necesaria la participación de otros muchos factores para que se refleje un aumento de la tolerancia a este compuesto en las células que se encuentran en fase exponencial de crecimiento.

Tanto las proteínas responsables de la agregación que conduce a la formación de velo como el grupo de proteínas fúngicas denominadas bajo el nombre genérico de hidrofobinas

confieren un alto grado de hidrofobicidad a la superficie celular, tienen la capacidad de agregar y se encuentran en la superficie celular en situaciones en las que las células están expuestas al contacto con el aire (velo de flor en nuestro caso e hifas aéreas en el caso de las hidrofobinas fúngicas) (Wösten et al., 1999; Wessels et al., 1991). Además, la aireación de un sobrenadante SOBF produce la formación de la misma espuma que se produce cuando se airean sobrenadantes que contienen proteínas de tipo hidrofobina, como resultado de la agregación de estas proteínas en interfases aire- agua (de Vries et al., 1993).

Estos datos preliminares nos condujeron a utilizar un protocolo de purificación de hidrofobinas, basado en la propiedad de este tipo de proteínas para agregar en interfases aire-agua, a fin de llevar a cabo la identificación de la actividad aglutinante de los sobrenadantes obtenidos por sonicación de velo. Se utilizó velo de bodega para facilitar la obtención de grandes cantidades de material de partida. La actividad aglutinante no precipita tras la aireación del cultivo, y en este sentido tiene un comportamiento de solubilidad más parecido al de la hidrofobinas de tipo II, que forman agregados mas inestables que las de tipo I (Wessels, 1997). Tras el ultimo paso de purificación se obtiene un precipitado con capacidad aglutinante sobre B16 que contiene una única proteína con un tamaño molecular aparente de 20,5 kDa. Las secuencias de aminoácidos de tres péptidos internos de esta proteína tienen un 100% de similaridad con las secuencias descritas para una de las actividades superóxido dismutasa de *Saccharomyces cerevisiae* (EC 1.15.1.1) (Johansen et al, 1979; Steinman, 1980) y el péptido GFHIHEFGDAT, contiene los dos residuos de histidina implicados en la unión del ion Cu^{2+} , uno de los cofactores de la proteína.

La superóxido dismutasa de Cu-Zn (CuZnSOD) descrita en levaduras es una proteína citosólica que protege a la célula del estrés oxidativo modificando compuestos reactivos generados por la presencia de cobre o a consecuencia del metabolismo respiratorio. Su transcripción es inducida en trans por el factor de transcripción Ace1p, que sensa las altas concentraciones de cobre y se une a los promotores de los genes *SOD1* (Gralla et al,1991), *CUP1* y *CRS5* . Estos dos últimos genes codifican dos metalotioneínas que detoxifican secuestrando directamente por molécula varios átomos de cobre del medio (Kagi y Schaffer, 1988; Kagi, 1991). Otros autores apuntan a la localización extracelular de una actividad CuZnSOD en *S.cerevisiae* y *N. crassa* a partir de estudios bioquímicos (Munkres, 1990). En bacterias se ha encontrado una tercera SOD en el espacio periplásmico, con propiedades parecidas a la CuZnSOD eucariótica (Benov y Fridovich, 1994). Existe otra familia de proteínas con actividad superóxido dismutasa que no guarda homología con la familia de las

CuZnSOD. Utilizan Mn^{2+} y Fe^{3+} como cofactores y su localización es típicamente mitocondrial (Natvig et al., 1996).

Mutantes defectivos en los genes *SOD1* (CuZnSOD) y *SOD2* (MnSOD) muestran intolerancia al oxígeno y sensibilidad a los compuestos generadores de radicales libres tanto en procariotas como en eucariotas (Gralla y Kosman, 1992). En levaduras, los mutantes *sod1* son auxótrofos de lisina, cisteína y metionina en condiciones aeróbicas de crecimiento y muestran sensibilidad a concentraciones atmosféricas de oxígeno y a compuestos generadores de iones superóxido, como el paraquat y la menadiona (Gralla y Valentine, 1991). Estos mutantes tienen elevadas tasas de mutación espontánea, posiblemente como consecuencia del daño oxidativo en el ADN (Gralla y Valentine, 1991) y son incapaces de crecer en medios con fuentes de carbono no fermentables. Los genes *SOD1* y *SOD2* de *S. cerevisiae* muestran un incremento de su expresión en fuentes de carbono no fermentables, en comparación a los niveles de expresión en glucosa. (Galiazzo y Labbe-Bois, 1993). Todo ello indica que el papel de la CuZnSOD en la protección frente a daño oxidativo es de especial importancia para la integridad celular.

Se han realizado con éxito algunos experimentos de complementación heteróloga entre organismos procarióticos y eucarióticos. Así, la CuZnSOD de humanos complementa mutantes de *E. coli* deficientes en superóxido dismutasas, y revierte el fenotipo de sensibilidad a oxígeno de un mutante carente de FeSOD y MnSOD (Natvig et al., 1987) o en *S. cerevisiae*, donde la MnSOD de *Bacillus stearothermophilus* también complementa la mutación *sod1* (Bowler et al., 1990).

En mamíferos se ha descrito una actividad CuZnSOD adicional, distinta a las SOD descritas anteriormente, en secuencia y peso molecular. Ésta es una proteína de marcado carácter hidrofóbico, se localiza extracelularmente y se presenta normalmente en forma tetramérica (Marklund, 1982). La secuencia de cDNA de la CuZnSOD extracelular de humanos tiene un contenido muy alto en G+C y un péptido señal de 18 aminoácidos, que precede a los 222 aminoácidos de la proteína madura. Los primeros 95 aminoácidos no muestran homología con ninguna otra proteína secuenciada y la secuencia 96-193 muestra 50% homología con los dos tercios finales de todas las CuZnSOD eucarióticas conocidas (Hjalmarsson, 1987). La secuencia 194-222 en la región carboxi terminal es altamente hidrofílica, contiene nueve aminoácidos cargados positivamente y está implicada en la unión del enzima a heparina (Karlsson et al., 1989; Lookene et al., 2000), que es una mezcla heterogénea de cadenas de polisacáridos sulfatados, formados por unidades repetidas de D-glucosamina y ácido L-idurónico o D-glucurónico.

De manera similar a la CuZnSOD extracelular bovina, la de humanos muestra una marcada resistencia a alta temperatura, pH extremos y alta concentración de urea. Esta similitud sugiere un papel importante de la porción homóloga (que incluye al sitio activo) para la integridad estructural de estos isoenzimas (Tibell et al., 1993). La CuZnSOD extracelular de humanos existe predominantemente como homotetrámero, formado por dos dímeros unidos por un puente disulfuro. Sin embargo se ha descrito que puede formar mayores multímeros que tienen mayor estabilidad termodinámica (Oury et al, 1996). La proteína se une a células de mamífero en cultivo formando un equilibrio entre las células y el medio, la unión aparentemente ocurre al glicocalix de las superficies celulares y a la matriz intercelular producida por las células (Karlsson y Marklund, 1989).

La proteína que produce la aglutinación de la cepa formadora de velo B16 presenta una similitud del 100% en la secuencia de los tres péptidos secuenciados, pero en el resto de las características que presenta se asimila a la superóxido dismutasa extracelular de mamíferos (Hjalmarsson, 1987): es una proteína extracelular hidrofóbica, forma agregados de alto peso molecular y presenta una gran estabilidad frente a condiciones extremas. La proteína de humanos tiene capacidad de unión a polisacáridos y lleva a cabo su función en la cara externa de la pared celular. El protocolo de extracción de proteínas utilizado en este trabajo mantiene el 99% de las células intactas y se recupera un número muy reducido de proteínas distintas, por lo que la localización extracelular de nuestra proteína no parece ser consecuencia del método de extracción. Esta proteína posiblemente se encuentre unida a la pared celular y es allí donde lleva a cabo su función. El fenómeno de agregación celular que provoca puede ser consecuencia de su capacidad para formar agregados de alto peso molecular y de su hipotética capacidad para interactuar con polisacáridos de la pared, de manera que podría ser el nexo de unión entre las distintas células en el fenómeno de agregación que conduce a la formación de velo.

Conclusiones

Las levaduras IFI256 e IFI256-1978 son potencialmente utilizables para la modificación y mejora de las características aromáticas de los vinos de Jerez.

Estas levaduras fermentan con rapidez el mosto de 1ª yema de la variedad de uva *Palomino Fino* y muestran alta viabilidad durante el proceso.

Los vinos producidos con las cepas IFI256 y el superproductor de aminoácidos IFI256-1978 contienen mayores concentraciones de compuestos aromáticos que los producidos con el pie de cuba tradicional. IFI256-1978 produce los mayores niveles de compuestos aromáticos derivados de los aminoácidos de los que es superproductora: treonina e isoleucina.

IFI256 tiene un contenido en ADN de 1,7 n y esporula dando ascas con dos esporas con la misma ploidía que el parental a consecuencia de la no disyunción de los cromosomas homólogos en la primera división meiótica.

Este fenotipo es el resultado de mutaciones recesivas que se acumulan en el cromosoma VIII, una de las cuales se localiza en el gen *SPO12*.

El etanol y el acetaldehído provocan altas tasas de mutación en el genomio mitocondrial de levaduras, que se traducen primero, en variaciones en el patrón RFLP y después en la pérdida total de ADN mitocondrial.

Existen varios genes implicados en el fenómeno de formación de velo, por lo que se descarta la mejora de esta característica por transformación con un solo gen

Se ha seleccionado una cepa de velo de flor, B16, cuyo contenido en ADN es próximo a la triploidía

Se han seleccionado descendientes de un híbrido entre la cepa B16 y una cepa no isogénica que tienen mayores tasas de crecimiento en medios con alto grado alcohólico y forman el velo de flor con mayor rapidez que la cepa parental.

La formación de velo de flor es un fenómeno de agregación celular motivado por la síntesis de proteínas superficiales hidrofóbicas

La cepa B16 muestra los máximos niveles de tolerancia a alta concentración de etanol, alta temperatura y tracción mecánica cuando se encuentra en fase de formación de velo

Se ha purificado a partir de velo de flor una superóxido dismutasa extracelular con capacidad para inducir la agregación de la cepa B16 en condiciones fisiológicas en las que no forma velo

Bibliografía

- Aguilera, A. y Benítez, T.** (1985). Role of mitochondria in ethanol tolerance of *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Microbiol* **142**, 389-92.
- Ashraf, M. y Miller, J. J.** (1977). Induction of multispored asci in two-spored strains of *Saccharomyces cerevisiae* by amitrole. *Can J Microbiol* **23**, 690-4.
- Ashraf, M. y Miller, J. J.** (1978). Sporulation in single-spore isolates from amitrole-induced multispored asci of *Saccharomyces cerevisiae*. *Can J Microbiol* **24**, 1614-5.
- Bandas, E. L. y Zakharov, I. A.** (1980). Induction of rho- mutations in yeast *Saccharomyces cerevisiae* by ethanol. *Mutat. Res.* **71**, 193-9.
- Barnett, J. A., Payne, R. W. y Yarrow, D.** (1990). *Yeast: characteristics and identification, 2nd ed.* Cambridge University Press.
- Barre, P.** (1992). Les moyens d'intervention su l'expression des caractères des souches de levures. *Biologia Oggi VI* **1**, 117-126.
- Benítez, T., del Castillo, L., Aguilera, A., Conde, J. y Cerdá-Olmedo, E.** (1983). Selection of wine yeast for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. *Appl Environ Microbiol* **45**, 1429-1436.
- Benov, L. T. y Fridovich, I.** (1994). *Escherichia coli* expresses a copper- and zinc-containing superoxide dismutase. *J Biol Chem* **269**, 25310-4.
- Bilinski, C. A. y Miller, J. J.** (1980). Induction of normal ascosporeogenesis in two-spored *Saccharomyces cerevisiae* by glucose, acetate, and zinc. *J Bacteriol* **143**, 343-8.
- Bilinski, C. A., Marmioli, N. y Miller, J. J.** (1987). Cell division age dependency of meiosis in an apomictic variant of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **3**, 1-4.
- Björling, K.** (1944). *Kungl. Fvstografiska Sällskapepts i Lund* **14**, 147.
- Bolivar, F. y Backman, K.** (1979). Plasmids of *Escherichia coli* as cloning vectors. *Methods Enzymol* **68**, 245-67.
- Bony, M., Thines-Sempoux, D., Barre, P. y Blondin, B.** (1997). Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J Bacteriol* **179**, 4929-36.
- Bossier, P., Goethals, P. y Rodrigues-Pousada, C.** (1997). Constitutive flocculation in *Saccharomyces cerevisiae* through overexpression of the *GTS1* gene, coding for a 'Glo'-type Zn-finger-containing protein. *Yeast* **13**, 717-25.

- Botsein, D. y Fink, G. R.** (1988). Yeast: an experimental organism for modernbiology. *Science* **240**, 1439-1443.
- Boulton, B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. y Kunkel, R. E.** (1996). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation in Boulton, B., Singleton, V.L., Bisson, L.F. Kunkel, R.E. (Ed), *Principles and Practices of Winemaking*, Chapman and Hall, pp. 139-172.
- Bowler, C., Van Kaer, L., Van Camp, W., Van Montagu, M., Inze, D. y Dhaese, P.** (1990). Characterization of the *Bacillus stearothermophilus* manganese superoxide dismutase gene and its ability to complement copper/zinc superoxide dismutase deficiency in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **172**, 1539-46.
- Bradford, M. M.** (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**, 248-54.
- Bravo, F.** (1984). Consumo de glicerina por levaduras de flor en vinos finos. *Alimentaria* **156**, 19-24.
- Brown, S. W., Sugden, D. A. y Oliver, S. G.** (1984). *Chem Technol Biotechnol* **34**, 116-120.
- Cabezudo, M. D., Llaguno, C. y Garrido, J. M.** (1967). Aspectos de la crianza de vinos finos por levaduras de flor. *Rev. Cienc. Aplic.* **119**, 501-512.
- Canal-Llauberes, R. M.** (1993). Enzymes in winemaking in Fleet, G. H. (Ed), *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic, pp. 477-506.
- Chu, S., DeRisi, J., Eisen, M., Mulholland, J., Botstein, D., Brown, P. O. y Herskowitz, I.** (1998). The transcriptional program of sporulation in budding yeast [published erratum appears in *Science* 1998 Nov 20;282(5393):1421]. *Science* **282**, 699-705.
- Chung, C. T., Niemela, S. L. y Miller, R. H.** (1989). One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**, 2172-5.
- Chvapil, M.** (1973). New aspects in the biological role of zinc: a stabilizer of macromolecules and biological membranes. *Life Sci* **13**, 1041-9.
- Codón, A. C., Gasent-Ramírez, J. M. y Benítez, T.** (1995). Factors which affect the

- frequency of sporulation and tetrad formation in *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeasts [published erratum appears in Appl. Environ. Microbiol. 1995 Apr;61(4):1677]. *Appl Environ Microbiol* **61**, 630-8.
- Cole, V. C. y Noble, A. C.** (1995). Flavor chemistry and assessment in Lea, A. G. H. and Piggott, J. R. (Eds), *Fermented beverage production*, Blackie Academic and Professional, pp. 361-385.
- Conde, J. y Fink, G. R.** (1976). A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **73**, 3651-5.
- Dahmann, C. y Futcher, B.** (1995). Specialization of B-type cyclins for mitosis or meiosis in *S. cerevisiae*. *Genetics* **140**, 957-63.
- de Vries, O. M. H., Fekkes, M. P., Wösten, H. A. B. y Wessels, J. G. H.** (1993). Insoluble hydrophobincomplexes in the walls of *Schizophillum comune* and other filamentous fungi. *Arch Microbiol* **159**, 330-335.
- Degré, R.** (1993). Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria in Fleet, G. H. (Ed), *Wine Microbiology and Biotechnology*, Harwood Academic, pp. 421-447.
- Dengis, P. B., Nelissen, L. R. y Rouxhet, P. G.** (1995). Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top- and bottom-fermenting strains. *Appl Environ Microbiol* **61**, 718-28.
- Edman, P.** (1956). *Acta Chem. Scand.* **10**, 761-768.
- Erickson, J. R. y Johnston, M.** (1993). Direct cloning of yeast genes from an ordered set of lambda clones in *Saccharomyces cerevisiae* by recombination in vivo. *Genetics* **134**, 151-7.
- Esposito, R. E. y Klapholz, S.** (1981) in Strathern, J. N., Jones, F. W. and Broach, J. R. (Eds), *Molecular biology of the yeast Saccharomyces. Life cycle and Inheritance*, Cold Spring Harbor Laboratory, pp. 211-287.
- Falco, S. C., Li, Y., Broach, J. R. y Botstein, D.** (1982). Genetic properties of chromosomally integrated 2 μ plasmid DNA in yeast. *Cell* **29**, 573-84.
- Falco, S. C., Rose, M. y Botstein, D.** (1983). Homologous recombination between episomal plasmids and chromosomes in yeast. *Genetics* **105**, 843-856.
- Feinberg, A. P. y Vogelstein, B.** (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction

- endonuclease fragments to high specific activity". *Anal Biochem* **87**, 206-10
Addendum *Anal Biochem* **137**, 266-7
- Fornachon, J. C. M.** (1953). Estudios on the Sherry flor. *Australian Wine Board*.
- Fujii, T.** (1954). Presence of zinc in nucleoli and its possible role in mitosis. *Nature* **174**, 1108-1109.
- Galiazzo, F. y Labbe-Bois, R.** (1993). Regulation of Cu,Zn- and Mn-superoxide dismutase transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **315**, 197-200.
- Gómez, E., Laencina, J. y Martínez, A.** (1994). Vinification effects on changes in volatile compounds of wine. *J. Food Sci.* **59**, 406-409.
- González-Candelas, L., Cortell, A. y Ramón, D.** (1995). Construction of a recombinant wine yeast strains expressing a fungal pectate lyase gene. *FEMS Microbiol. Lett.* **126**, 263-270.
- Gralla, E. B. y Valentine, J. S.** (1991). Null mutants of *Saccharomyces cerevisiae* Cu,Zn superoxide dismutase: characterization and spontaneous mutation rates. *J Bacteriol* **173**, 5918-20.
- Gralla, E. B., Thiele, D. J., Silar, P. y Valentine, J. S.** (1991). ACE1, a copper-dependent transcription factor, activates expression of the yeast copper, zinc superoxide dismutase gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**, 8558-62.
- Gralla, E. B. y Kosman, D. J.** (1992). Molecular genetics of superoxide dismutases in yeasts and related fungi. *Adv Genet* **30**, 251-319.
- Grether, M. E. y Herskowitz, I.** (1999). Genetic and biochemical characterization of the yeast spo12 protein. *Mol Biol Cell* **10**, 3689-703.
- Grewal, N. S. y Miller, J. J.** (1972). Formation of asci with two diploid spores by diploid cells of *Saccharomyces*. *Can J Microbiol* **18**, 1897-905.
- Guérin, B.** (1991). Mitochondria in Rose, A. H. and Harrison, J. S. (Eds), *Yeast organelles*, Academic Press, pp. 541-600.
- Hammond, J. R. M.** (1996). Yeast genetics in Priest, F. G. and Campbell, I. (Eds), *Brewing Microbiology*, Chapman and Hall, pp. 45-82.
- Hanahan, D.** (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J Mol Biol* **166**, 557-80.
- Hansen, E.** (1888). Undrrsgelser fra Goerindustriens Praxis. *C.R. Lab. Calsberg* **2**, 257-

322.

- Henninger, W. y Emeis, C. C.** (1974). The apomictic life-cycle of the multispored strains of the yeast *Lipomyces*. *Arch Microbiol* **101**, 365-77.
- Henschke, P. A.** (1997). Wine Yeast in Zimmermann, F. K. and Entian, K. D. (Eds), *Yeast sugar metabolism*, Technomic Publishing.
- Hjalmarsson, K., Marklund, S. L., Engstrom, A. y Edlund, T.** (1987). Isolation and sequence of complementary DNA encoding human extracellular superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci USA* **84**, 6340-4.
- Hopper, A. K., Magee, P. T., Welch, S. K., Friedman, M. y Hall, B. D.** (1974). Macromolecule synthesis and breakdown in relation to sporulation and meiosis in yeast. *J Bacteriol* **119**, 619-28.
- Humpries, K. M. y Sweda, L. I.** (1998). Selective inactivation of alpha-ketoglutarate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* **37**, 15835-15841.
- Ibeas, J. I. y Jiménez, J.** (1997). Mitochondrial DNA loss caused by ethanol in *Saccharomyces* flor yeasts. *Appl Environ Microbiol* **63**, 7-12.
- Ilse, D. y Edman, P.** (1963). *Aust. J. Chem.* **16**, 411-416.
- Inoue, H., Nojima, H. y Okayama, H.** (1990). High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Gene* **96**, 23-8.
- Iñigo-Leal, B. y Arrollo-Varela, V.** (1964). Microbiología de los velos desarrollados sobre vinos de la zona de Montilla y Los Moriles. *Rev. Cienc. Apli.* **18**, 23-29.
- Ito, H., Fukuda, Y., Murata, K. y Kimura, A.** (1983). Transformation of intact cells treated with alkali cations. *J Bacteriol* **153**, 163-168.
- Jiménez, J. y Benítez, T.** (1987). Genetic analysis of highly ethanol-tolerant wine yeasts. *Curr Genet* **12**, 421-428.
- Jiménez, J. y Benítez, T.** (1988). Yeast cell viability under conditions of high temperature and ethanol concentrations depends on the mitochondrial genome. *Curr Genet* **13**, 461-9.
- Johansen, J. T., Overballe-Petersen, C., Martin, B., Hasemann, V. y Svendsen, I.** (1979). The complete amino acid sequence of copper, zinc superoxide dismutase from *Saccharomyces cerevisiae*. *Carlsberg Res. Commun.* **44**, 201-217.

- Kagi, J. H. y Schaffer, A.** (1988). Biochemistry of metallothionein. *Biochemistry* **27**, 8509-15.
- Kagi, J. H.** (1991). Overview of metallothionein. *Methods Enzymol* **205**, 613-26.
- Karlsson, K., Lindahl, U. y Marklund, S. L.** (1988). Binding of human extracellular superoxide dismutase C to sulphated glycosaminoglycans. *Biochem J* **256**, 29-33.
- Karlsson, K. y Marklund, S. L.** (1989). Binding of human extracellular-superoxide dismutase C to cultured cell lines and to blood cells. *Lab Invest* **60**, 659-66.
- Klapholz, S. y Esposito, R. E.** (1980). Isolation of *SPO12-1* and *SPO13-1* from a natural variant of yeast that undergoes a single meiotic division. *Genetics* **96**, 567-88.
- Klapholz, S. y Esposito, R. E.** (1980). Recombination and chromosome segregation during the single division meiosis in *SPO12-1* and *SPO13-1* diploids. *Genetics* **96**, 589-611.
- Kobayashi, O., Hayashi, N., Kuroki, R. y Sone, H.** (1998). Region of FLO1 proteins responsible for sugar recognition. *J Bacteriol* **180**, 6503-10.
- Kvist, U.** (1980). Importance of spermatozoal zinc as temporary inhibitor of sperm nuclear chromatin decondensation ability in man. *Acta Physiol Scand* **109**, 79-84.
- Laemmli, U. K.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-5.
- Lookene, A., Stenlund, P. y Tibell, L. A.** (2000). Characterization of heparin binding of human extracellular superoxide dismutase. *Biochemistry* **39**, 230-6.
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. y Randall, R. J.** (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* **193**, 265-275.
- Lydall, D., Nikolsky, Y., Bishop, D. K. y Weinert, T.** (1996). A meiotic recombination checkpoint controlled by mitotic checkpoint genes. *Nature* **383**, 840-3.
- Lydall, D. y Weinert, T.** (1997). G2/M checkpoint genes of *Saccharomyces cerevisiae*: further evidence for roles in DNA replication and/or repair. *Mol Gen Genet* **256**, 638-51.
- Mainwaring, H. R. y Wilson, I. M.** (1968). Transactions of the British Mycological society. *Transactions of the British Mycological society*, 663.
- Malavasic, M. J. y Elder, R. T.** (1990). Complementary transcripts from two genes necessary for normal meiosis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **10**,

2809-19.

- Malone, R. E. y Esposito, R. E.** (1981). Recombinationless meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **1**, 891-901.
- Marcilla, J., Alas, G. y Feduchi, E.** (1936). Contribución al estudio de las levaduras que forman velo sobre ciertos vinos de elevado grado alcohólico. *Anales Centro Inv. Vinícolas de Madrid* **1**.
- Marklund, S. L.** (1982). Human copper-containing superoxide dismutase of high molecular weight. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 7634-8.
- Markwell, M. A., Haas, S. M., Bieber, L. L. y Tolbert, N. E.** (1978). A modification of the Lowry procedure to simplify protein determination in membrane and lipoprotein samples. *Anal Biochem* **87**, 206-10.
- Marmiroli, N. y Bilinski, C. A.** (1985). Partial restoration of meiosis in an apomictic strain of *Saccharomyces cerevisiae*: a model system for investigation of nucleomitocondrial interactions during sporulation. *Yeast* **1**, 39-47.
- Martínez, P., Codón, A. C., Pérez, L. y Benítez, T.** (1995). Physiological and molecular characterization of flor yeasts: polymorphism of flor yeast populations. *Yeast* **11**, 1399-411.
- Martínez, P., Pérez-Rodríguez, L. y Benítez, T.** (1997). Evolution of flor yeast population during the biological aging of fino sherry wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **48**, 160-168.
- Martínez, P., Pérez-Rodríguez, L. y Benítez, T.** (1997). Velum formation by flor yeasts isolated from sherry wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **48**, 55-62.
- Martínez, P., Pérez-Rodríguez, L. y Benítez, T.** (1997). Factors which affect velum formation by flor yeasts isolated from Sherry wine. *Systematic and Applied Microbiology* **20**, 154-157.
- Martínez de la Osa, E., Caro, I., Bonat, M., Pérez, L. y Domecq, B.** (1987). Dry extract in Sherry and its evolution in the aging process. *Amer J Enol Vitic* **38**, 293-297.
- Martínez de la Osa, E., Pérez, L. y Caro, I.** (1987). Variations of the major volatiles though aging of Sherry. *Am. J. Enol. Vitic.* **38**, 297-305.
- Martínez-Force, E. y Benítez, T.** (1992). Selection of amino-acid overproducer yeast mutants. *Curr. Genet.* **21**, 191-196.

- Martínez-Force, E. y Benítez, T.** (1995). Effects of varying media, temperature, and growth rates on the intracellular concentrations of yeast amino acids. *Biotechnol Prog* **11**, 386-92.
- McCarroll, R. M. y Esposito, R. E.** (1994). *SPO13* negatively regulates the progression of mitotic and meiotic nuclear division in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **138**, 47-60.
- Miller, J. J.** (1989). Sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*, *The Yeast*, pp. 489-541.
- Molero, G., Yuste, R. M., Montesi, A., Vazquez, A., Nombela, C. y Sanchez, M.** (1993). A cdc-like autolytic *Saccharomyces cerevisiae* mutant altered in budding site selection is complemented by *SPO12*, a sporulation gene. *J Bacteriol* **175**, 6562-70.
- Munkres, K. D.** (1990). Purification of exocellular superoxide dismutases. *Methods Enzymol* **186**, 249-60.
- Nakaseko, Y., Niwa, O. y Yanagida, M.** (1984). A meiotic mutant of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* that produces mature asci containing two diploid spores. *J Bacteriol* **157**, 334-6.
- Natvig, D. O., Imlay, K., Touati, D. y Hallewell, R. A.** (1987). Human copper-zinc superoxide dismutase complements superoxide dismutase-deficient *Escherichia coli* mutants. *J Biol Chem* **262**, 14697-701.
- Natvig, D. O., Sylvester, K., Dvoracher Jr., W. H. y Baldwin, J. L.** (1996). Superoxide dismutases and catalases in Brambl and Marzluf (Eds), *The Mycota III*, Springer-Verlag, pp. 191-209.
- Oda, Y. y Ouchi, K.** (1989). Genetic analysis of haploids from industrial strains of baker's yeast. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**, 1742-1747.
- Oury, T. D., Crapo, J. D., Valnickova, Z. y Enghild, J. J.** (1996). Human extracellular superoxide dismutase is a tetramer composed of two disulphide-linked dimers: a simplified, high-yield purification of extracellular superoxide dismutase. *Biochem J* **317**, 51-7.
- Pérez, L.** (1979). Formación y evolución de los alcoholes superiores y otros componentes en vinos de Jerez, Univ. de Sevilla.
- Pérez, L.** (1982). Consideraciones técnicas en la elaboración del Jerez. *II Jornadas Universitarias sobre el Jerez. Univ. Cádiz*, pp. 167-197.



- Pérez, L.** (1984). Consideraciones técnicas en la elaboración del Jerez. *II Jornadas Universitarias sobre el Jerez. Univ. Cádiz*, pp. 333-367.
- Pérez, L.** (1991). La crianza del vino de Jerez. *Vitinicultura* **9**, 19-22.
- Pérez-González, J. A., González, R., Querol, A., Sendra, J. y Ramón, D.** (1993). Construction of a recombinant wine yeast strain expressing beta-(1,4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 2801-2806.
- Piskur, J.** (1994). Inheritance of the yeast mitochondrial genome. *Plasmid* **31**, 229-41.
- Pretorius, I. S. y van der Westhuien, T. J.** (1991). The impact of yeast genetics and recombinant DNA technology on the wine industry-a review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.* **12**, 3-31.
- Pretorius, I. S.** (2000). Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking. *Yeast* **16**, 675-729.
- Riles, L., Dutchik, J. E., Baktha, A., McCauley, B. K., Thayer, E. C., Leckie, M. P., Braden, V. V., Depke, J. E. y Olson, M. V.** (1993). Physical maps of the six smallest chromosomes of *Saccharomyces cerevisiae* at a resolution of 2.6 kilobase pairs. *Genetics* **134**, 81-150.
- Ristow, H., Seyfarth, A. y Lochmann, E. R.** (1995). Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied by pulsed field gel electrophoresis. *Mutat. Res.* **326**, 165-70.
- Robinson, J.** (1994). *The Oxford Companion to Wine*. Oxford University Press.
- Rose, M. D. y Fink, G. R.** (1987). KAR1, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell* **48**, 1047-60.
- Saavedra, I. J.** (1959). La levadura de flor en la crianza de vinos, Univ. de Madrid.
- Saavedra, I. J. y Garrido, J. M.** (1962). La levadura de flor en la crianza del vino. Evolución de la acidez por la acción del velo en medios sintéticos. *A.T.A.* **2**.
- Saavedra, I. J. y Garrido, J. M.** (1963). La levadura de flor en la crianza del vino. El etanol en el metabolismo en fase de velo. *Rev. Cienc. Apli.* **95**.
- Santa María, J. y Vidal, D.** (1973). Genetic control of "flor" formation by *Saccharomyces*. *J Bacteriol* **113**, 1078-80.
- Schägger, H. and von Jagow, G.** (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to

- 100 kDa. *Anal Biochem* **166**, 368-79.
- Schiestl, R. H. y Gietz, R. D.** (1989). High efficiency transformation of intact yeast cells using single stranded nucleic acids as a carrier. *Curr Genet* **16**, 339-46.
- Schild, D. y Byers, B.** (1980). Diploid spore formation and other meiotic effects of two cell-division-cycle mutations of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **96**, 859-76.
- Seki, T., Choi, E. H. y Ruy, D.** (1985). Construction of killer wine yeast strain. *Appl Environ. Microbiol.* **49**, 1211-1215.
- Sherman, F., Fink, G. R. y Hicks, J. B.** (1986). *Methods in Yeast Genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sieiro, C., Reboredo, N. M. y Villa, T. G.** (1995). Flocculation of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Ind Microbiol* **14**, 461-6.
- Sieiro, C., Reboredo, N. M., Blanco, P. y Villa, T. G.** (1997). Cloning of a new FLO gene from the flocculating *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b strain. *FEMS Microbiol Lett* **146**, 109-15.
- Sies, H. y Menck, C. F.** (1992). Singlet oxygen induced DNA damage. *Mutat Res* **275**, 367-75.
- Sies, H.** (1993). Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem* **215**, 213-9.
- Smit, G., Straver, M. H., Lugtenberg, B. J. y Kijne, J. W.** (1992). Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Appl Environ Microbiol* **58**, 3709-14.
- Steinman, H. M.** (1980). The amino acid sequence of copper-zinc superoxide dismutase from bakers' yeast. *J Biol Chem* **255**, 6758-65.
- Straver, M. H., v.d. Aar, P. C., Smit, G. y Kijne, J. W.** (1993). Determinants of flocculence of brewer's yeast during fermentation in wort. *Yeast* **9**, 527-32.
- Straver, M. H., Kijne, J. W. y Smit, G.** (1993). Cause and control of flocculation in yeast. *Trends Biotechnol* **11**, 228-32.
- Suárez-Lepe y Iñigo-Leal** (1990). La crianza biológica del vino, *Microbiología Enológica. Fundamentos de vinificación.*, Mundi Prensa.
- Tibell, L., Aasa, R. y Marklund, S. L.** (1993). Spectral and physical properties of human extracellular superoxide dismutase: a comparison with CuZn superoxide dismutase. *Arch Biochem Biophys* **304**, 429-33.

- Toyn, J. H. y Johnston, L. H.** (1993). Spo12 is a limiting factor that interacts with the cell cycle protein kinases Dbf2 and Dbf20, which are involved in mitotic chromatid disjunction. *Genetics* **135**, 963-71.
- Tubb, R. S. y Hammond, J. R. M.** (1987). *Yeast Genetics, Brewing biotechnology*, Elsevier Applied Science Publishers, pp. 47-82.
- Valentín, E., Herrero, E., Pastor, F. I. J. y Sentandreu, R.** (1984). Solubilization and analysis of mannoprotein molecules from the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Gen Microbiol* **130**, 1419-1428.
- van Rensburg, P., van Zyl, W. H. y Pretorius, I. S.** (1996). Co-expression of a *Phanerochaete chrysosporium* cellobiohydrolase gene and a *Butyrivibrio fibrisolvens* endo-beta-1,4-glucanase gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr Genet* **30**, 246-50.
- van Rensburg, P., van Zyl, W. H. y Pretorius, I. S.** (1997). Over-expression of the *Saccharomyces cerevisiae* exo-beta-1,3-glucanase gene together with the *Bacillus subtilis* endo-beta-1,3-1,4-glucanase gene and the *Butyrivibrio fibrisolvens* endo-beta-1,4-glucanase gene in yeast. *J Biotechnol* **55**, 43-53.
- van Rensburg, P., Van Zyl, W. H. y Pretorius, I. S.** (1998). Engineering yeast for efficient cellulose degradation. *Yeast* **14**, 67-76.
- van Solingen, P. y van der Platt, J. B.** (1977). Fusion of yeast spheroplasts. *J. Bacteriol.* **130**, 946-947.
- van Uden, N.** (1984). Temperature profiles of yeasts. *Adv Microb Physiol* **25**, 195-251.
- Villanueva, A., Ramón, D., Vallés, S., Lluch, M. A. y MacCabe, A. P.** (2000). Heterologous expression in *Aspergillus nidulans* of a *Trichoderma longibrachiatum* endoglucanase of enological relevance. *J. Agric. Food. Chem.* **48**, 951-957.
- Volschenk, H., Viljoen, M., Grobler, J., Petzold, B., Bauer, F. F., Subden, R., Young, R. A., Lonvaud, A., Denayrolles, M. and van Vuuren, H.J.J.** (1997). Engineering pathways for malate degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature Biotech.* **15**, 253-257.
- Wagstaff, J. E., Klapholz, S. y Esposito, R. E.** (1982). Meiosis in haploid yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**, 2986-90.
- Walker, G. M.** (1998). *Yeast Physiology and Biotechnology*. Wiley.
- Weinert, T. A., Kiser, G. L. y Hartwell, L. H.** (1994). Mitotic checkpoint genes in

- budding yeast and the dependence of mitosis on DNA replication and repair. *Genes Dev* **8**, 652-65.
- Wessels, J. G., de Vries, O. M., Asgeirsdottir, S. A. y Springer, J.** (1991). The thrn mutation of *Schizophyllum commune*, which suppresses formation of aerial hyphae, affects expression of the Sc3 hydrophobin gene. *J Gen Microbiol* **137**, 2439-45.
- Wessels, J. G.** (1997). Hydrophobins: proteins that change the nature of the fungal surface. *Adv Microb Physiol* **38**, 1-45.
- Wosten, H. A., Richter, M. y Willey, J. M.** (1999). Structural proteins involved in emergence of microbial aerial hyphae. *Fungal Genet Biol* **27**, 153-60.
- Wosten, H. A., van Wetter, M. A., Lugones, L. G., van der Mei, H. C., Busscher, H. J. y Wessels, J. G.** (1999). How a fungus escapes the water to grow into the air. *Curr Biol* **9**, 85-8.
- Yokomori, Y., Akiyama, H. y Shimizu, K.** (1989). Breeding of wine yeast through protoplast fusion. *Yeast* **5**, 145-150.
- Zamaroczy, M., Faugeron-Fonty, G. y Bernardi, G.** (1983). Excision sequences in the mitochondrial genome of yeast. *Gene* **21**, 193-202.

Apéndice

Tabla A-1 Densidad del mosto y viabilidad celular a lo largo del proceso de fermentación con la cepa PDC

Tiempo (días)	Biomasa(cél/ml)			Viabilidad (%)	Densidad (g/ml)
	Viables	No viables	Totales		
0	3,7E+06	6,5E+05	4,3E+06	85%	1,08
1	3,5E+07	4,3E+05	3,5E+07	99%	1,07
2	6,1E+07	1,5E+06	6,2E+07	98%	1,06
6	5,3E+07	4,4E+06	5,7E+07	92%	1,02
8	7,2E+07	5,9E+06	7,8E+07	92%	1,01
9	7,4E+07	6,3E+06	8,0E+07	92%	1,00
12	5,2E+07	7,3E+06	5,9E+07	88%	0,99
13	7,0E+07	8,8E+06	7,9E+07	89%	0,99
15	5,7E+07	8,8E+06	6,6E+07	87%	0,99
16	5,6E+07	7,7E+06	6,4E+07	88%	0,99

Tabla A-2 Densidad del mosto y viabilidad celular a lo largo del proceso de fermentación con la cepa IFI256

Tiempo (días)	Biomasa(cél/ml)			Viabilidad (%)	Densidad (g/ml)
	Viables	No viables	Totales		
0	2,8E+06	5,4E+05	3,3E+06	84%	1,08
1	2,0E+07	6,0E+05	2,1E+07	97%	1,08
2	5,6E+07	1,1E+06	5,7E+07	98%	1,06
6	5,4E+07	2,4E+06	5,7E+07	96%	1,03
8	8,3E+07	1,5E+06	8,5E+07	98%	1,02
9	7,3E+07	2,0E+06	7,5E+07	97%	1,01
12	6,6E+07	1,6E+06	6,7E+07	98%	1,01
13	7,6E+07	1,7E+06	7,7E+07	98%	1,00
15	6,7E+07	1,9E+06	6,8E+07	97%	1,00
16	7,4E+07	1,3E+06	7,5E+07	98%	1,00
19	7,1E+07	2,5E+06	7,3E+07	97%	0,99

Tabla A-3 Densidad del mosto y viabilidad celular a lo largo del proceso de fermentación
con la cepa IFI256-1978

Tiempo (días)	Biomasa(cél/ml)			Viabilidad (%)	Densidad (g/ml)
	Viables	No viables	Totales		
0	4,5E+06	3,3E+05	4,8E+06	93%	1,08
1	2,6E+07	4,1E+05	2,6E+07	98%	1,08
2	5,7E+07	1,1E+06	5,8E+07	98%	1,06
6	6,6E+07	2,2E+06	6,8E+07	97%	1,03
8	6,1E+07	1,3E+06	6,2E+07	98%	1,02
9	6,5E+07	1,1E+06	6,6E+07	98%	1,02
12	6,3E+07	6,5E+05	6,3E+07	99%	1,01
13	6,9E+07	1,1E+06	7,0E+07	98%	1,01
15	6,4E+07	9,5E+05	6,5E+07	99%	1,00
16	7,2E+07	9,5E+05	7,3E+07	99%	1,00
19	7,2E+07	1,1E+06	7,3E+07	98%	1,00
20	7,3E+07	7,0E+05	7,4E+07	99%	0,99
22	7,6E+07	7,5E+05	7,6E+07	99%	0,99

Tabla A-4 Características de los vinos producidos con las cepas PDC, IFI256 e IFI256-1978

Cepa	PDC			IFI256			IFI256-1978		
	1	2	M ⁽¹⁾	1	2	M ⁽¹⁾	1	2	M ⁽¹⁾
Ensayo									
Densidad (g/ml)	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99	0,99
pH	3,10	3,10	3,10	3,10	3,11	3,11	3,13	3,08	3,11
Etanol (% v/v)	12,2	12,1	12,14	11,8	11,7	11,75	11,5	11,5	11,53
Ac. Total (g TH ₂ /l)	5,16	5,16	5,16	6,36	6,24	6,30	6,88	6,95	6,92
Ac. Volátil (g AcH/l)	0,18	0,20	0,19	0,13	0,09	0,11	0,39	0,25	0,32
Absorbancia a 420nm	0,12	0,14	0,13	0,11	0,12	0,12	0,11	0,10	0,11
Absorbancia a 340nm	2,57	2,55	2,56	2,54	2,54	2,54	2,51	2,55	2,53
Absorbancia a 280nm	2,61	2,62	2,62	2,57	2,56	2,56	2,64	2,57	2,60
Acetaldehído (mg/l)	60,2	59,7	59,95	34,4	38,8	36,62	48,0	45,7	46,80
Acetato de etilo (mg/l)	19,6	21,5	20,53	28,0	31,8	29,93	30,9	32,3	31,60
Diacetal(mg/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Metanol (mg/l)	42,7	41,0	41,83	41,9	43,3	42,61	43,9	41,7	42,79
n-Propanol (mg/l)	14,5	14,8	14,67	18,6	18,1	18,39	40,4	39,2	39,81
iso-Butanol (mg/l)	17,6	20,2	18,89	29,1	27,8	28,44	43,4	48,6	46,00
n-Butanol (mg/l)	-	-	-	-	-	-	5,2	3,2	4,19
2-metilbutanol (mg/l)	31,4	31,1	31,24	47,0	46,2	46,58	109,3	127,3	118,30
3-metilbutanol (mg/l)	152,2	148,9	150,53	197,5	192,0	194,71	240,8	274,3	257,55
Acetoína (mg/l)	-	-	-	-	-	-	-	-	-

⁽¹⁾ Media de los dos ensayos anteriores

Tabla A-5 Porcentajes de esporulación en IF1256

				Medio de preesporulación						
				YNB						
				YPD		2% glucosa		6% glucosa		
				-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	
Medio de esporulación	1% AcK	+0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄	74,4 ± 0,6	80,6 ± 1,1	53,0 ± 1,5	64,2 ± 2,6	68,6 ± 0,9	67,3 ± 4,1
				+ZnSO ₄	81,7 ± 0,8	79,0 ± 1,0	55,8 ± 1,6	64,7 ± 3,6	71,3 ± 2,0	72,2 ± 1,7
	3,5% AcK	+0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄	85,2 ± 6,6	83,8 ± 0,8	61,1 ± 2,5	64,3 ± 2,3	76,1 ± 3,7	65,9 ± 6,8
				+ZnSO ₄	80,6 ± 1,5	81,9 ± 1,9	59,0 ± 1,1	65,3 ± 2,7	81,4 ± 3,9	69,9 ± 7,6
		-YEP	-ZnSO ₄				58,3 ± 4,9		59,9 ± 2,8	
			+ZnSO ₄				60,7 ± 4,4		58,6 ± 1,0	
		-0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄			69,3 ± 2,6		66,7 ± 2,9	
				+ZnSO ₄			67,3 ± 3,7		63,9 ± 3,8	
	-YEP	-ZnSO ₄			66,4 ± 3,9		63,0 ± 2,9			
		+ZnSO ₄			66,9 ± 2,8		64,3 ± 2,8			

Tabla A-6 Porcentajes de diadas tras la esporulación de IFI256

		Medio de preesporulación								
		YPD			YNB					
				2% glucosa		6% glucosa				
		-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	-ZnSO ₄	+ZnSO ₄			
Medio de esporulación	1% AcK	+0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄	74,4 ± 0,6	80,6 ± 1,1	53,0 ± 1,5	63,8 ± 2,7	67,9 ± 1,0	66,6 ± 3,7
				+ZnSO ₄	81,7 ± 0,8	79,0 ± 1,0	55,5 ± 1,6	63,8 ± 3,0	70,3 ± 1,8	71,0 ± 1,1
	3,5% AcK	+0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄	85,2 ± 6,6	83,8 ± 0,8	60,1 ± 2,1	61,8 ± 2,3	75,8 ± 3,7	63,1 ± 7,3
				+ZnSO ₄	80,6 ± 1,5	81,9 ± 1,9	58,4 ± 1,5	63,8 ± 2,4	80,3 ± 3,4	67,3 ± 7,9
		-YEP	-ZnSO ₄				56,9 ± 4,6		56,2 ± 4,0	
			+ZnSO ₄				59,1 ± 4,0		56,2 ± 0,7	
		-0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄			66,7 ± 3,5		62,5 ± 2,2	
				+ZnSO ₄			63,9 ± 2,9		60,1 ± 3,1	
	-YEP	-ZnSO ₄				63,0 ± 3,1		56,9 ± 1,2		
		+ZnSO ₄				61,4 ± 2,2		55,4 ± 1,6		

Tabla A-7 Porcentajes de tétradas tras la esporulación de IFI256

				Medio de preesporulación						
				YPD		YNB				
						2% glucosa		6% glucosa		
				-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	
Medio de esporulación	1% AcK	+0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,4 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,5
			+YEP	+ZnSO ₄	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,2 ± 0,1	0,8 ± 0,6	1,0 ± 0,2	1,2 ± 0,6
		+0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	1,0 ± 0,4	2,5 ± 0,4	0,4 ± 0,1	2,8 ± 0,6
			+YEP	+ZnSO ₄	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,6 ± 0,4	1,5 ± 0,3	1,1 ± 0,5	2,6 ± 0,9
	3,5% AcK	-0,5% glucosa	-YEP	-ZnSO ₄			1,3 ± 0,4		3,8 ± 1,4	
				+ZnSO ₄			1,6 ± 0,4		2,5 ± 0,7	
		-0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄			2,6 ± 1,0		4,2 ± 0,7	
				+ZnSO ₄			3,3 ± 0,8		3,8 ± 0,7	
	-0,5% glucosa	-YEP	-ZnSO ₄			3,4 ± 0,8		6,1 ± 2,0		
			+ZnSO ₄			5,6 ± 1,8		8,9 ± 1,2		

Tabla A-8 Porcentajes de células vegetativas tras la esporulación de IFI256

		Medio de preesporulación								
		YPD				YNB				
				2% glucosa		6% glucosa				
		-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	-ZnSO ₄	+ZnSO ₄	
Medio de esporulación	1% AcK	+0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄	25,7 ± 0,6	19,4 ± 1,1	47,0 ± 1,5	35,8 ± 2,6	31,4 ± 0,9	32,7 ± 4,1
				+ZnSO ₄	18,3 ± 0,8	21,0 ± 1,0	44,2 ± 1,6	35,3 ± 3,6	28,7 ± 2,0	27,8 ± 1,7
	3,5% AcK	+0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄	14,8 ± 6,6	16,2 ± 0,8	38,9 ± 2,5	35,7 ± 2,3	23,9 ± 3,7	34,1 ± 6,8
				+ZnSO ₄	19,4 ± 1,5	18,1 ± 1,9	41,0 ± 1,1	34,7 ± 2,7	18,6 ± 3,9	30,1 ± 7,6
		-YEP	-ZnSO ₄				41,7 ± 4,9		40,1 ± 2,8	
			+ZnSO ₄				39,3 ± 4,4		41,4 ± 1,0	
		-0,5% glucosa	+YEP	-ZnSO ₄			30,7 ± 2,6		33,3 ± 2,9	
				+ZnSO ₄			32,7 ± 3,7		36,1 ± 3,8	
	-YEP	-ZnSO ₄				33,6 ± 3,9		37,0 ± 2,9		
		+ZnSO ₄				33,1 ± 2,8		35,7 ± 2,8		

Tabla A-9 Esporulación de los conjugantes IFIMMY

Híbrido	Esporulación (%)	N° esporas/asca			
		1	2	3	4
IFIMMY1	67,8 ± 8,1	5,0 ± 6,6	38,2 ± 8,3	19,7 ± 10,1	37,1 ± 13,5
IFIMMY2	72,9 ± 11,1	2,7 ± 0,5	35,7 ± 8,2	23,2 ± 6,3	38,4 ± 7,0

Tabla A-10 Cultivo de levaduras en medios con etanol o acetaldehído

Medio	Grandes	Petites	Total	% Grandes	% Petites	Total
YPD	2215	45	2260	98,0	2,0	100
YPDE2	2155	75	2230	96,6	3,4	100
YPDE4	1530	220	1750	87,4	12,6	100
YPDE6	1580	300	1880	84,0	16,0	100
YPDAc0.02	1215	45	1260	96,4	3,6	100
YPDAc0.04	1365	85	1450	94,1	5,9	100
YPDAc0.06	1315	170	1485	88,6	11,4	100
YPDAc0.08	1210	620	1830	66,1	33,9	100
YPDAc0.1	1480	1020	2500	59,2	40,8	100

Tabla A-11 Tasas de crecimiento de los conjugantes de esporas BGT en medios con etanol

Medio de cultivo	Cepa			
	B16	BGT249	BGT269	BGT409
YPD	0,28	0,40	0,40	0,38
YPDE3	0,26	0,30	0,31	0,30
YPDE6	0,21	0,21	0,25	0,23
YPDE9	0,07	0,08	0,07	0,07
YPDE12	0,01	0,02	0,03	0,01
YPDE15	0,01	0,02	0,01	0,00

Tabla A-12 Hidrofobicidad superficial en la cepa B16

Fase de Crecimiento	DO	DO residual				M ⁽¹⁾	Hidrofobicidad (%)
	inicial	1	2	3	4		
Fase exponencial	0,53	0,25	0,32	0,37	0,36	0,32	38,72
Fase estacionaria	0,47	0,21	0,16	0,22	0,23	0,21	56,33
Fase de velo	0,52	0,12	0,12	0,09	0,27	0,15	70,80
Fase de velo/ProtK	0,53	0,51	0,41	0,42	0,45	0,45	15,05

⁽¹⁾ Media de las 4 determinaciones de DO residual

Agradecimientos

A la Doctora Tahía Benítez Fernández, por todo el apoyo que me ha brindado desde el primer día que pisé su laboratorio y por las enormes dosis de trabajo y entusiasmo que ha puesto en este proyecto de Tesis. A Tahía, por haberme mostrado tantas veces como se ha de conducir una gran persona.

Al resto de profesores del Departamento, por enseñarme mucha genética. En especial a Isabel López, a que siempre me hizo sentir uno de sus niños.

A todos mis compañeros de laboratorio, a los del pasado y a los que aún siguen allí, por hacerme pasar muy buenos ratos y por la gran ayuda que siempre he recibido: a Antonio, Jose Mari, Manolo, Carmen, Jesús y Ana. A Paula, que abrió el camino de esta tesis.

Al resto de compañeros de Departamento, por hacer que "Genética" haya sido un sitio de trabajo agradable durante tantos años.

A Pepe Córdoba, Luis Romanco y Ana Moreno, por su especialísima aportación de cada día.

Al Doctor Luis Pérez y sus colaboradores en el departamento de Ingeniería Química de la Universidad de Cádiz, por la inestimable ayuda prestada en los experimentos de vinificación y análisis químico.

A la Doctora Lucía Ramírez, del Departamento de Genética y Mejora Vegetal de la Universidad Pública de Navarra, por acogerme tan calurosamente en su laboratorio y a la Doctora María Peñas por toda la ayuda que me prestó durante la purificación de proteínas hidrofóbicas.

A los Amigos con los que he contado dentro y fuera del departamento, por aguantar mis peores momentos con la mejor de sus sonrisas.

Por último, a mi familia. Ellos han sido mi más grande apoyo en todo lo que he hecho. Éste es también el fruto de su trabajo y su sacrificio.

A todos, mi mayor simpatía y profundo agradecimiento.

Francisco Castrejon Marquez
Mujer al agua de Shalvanyes en su papel
celebrado en la elaboracion de vinos de Jerez

Shalvanyes en su papel
los monumentos
27 Sevilla 2000

24

~~Francisco Castrejon Marquez~~

~~Sevilla 2000~~

~~[Signature]~~

~~[Signature]~~

~~[Signature]~~

UNIVERSIDAD DE SEVILLA



600672159

