

R. 4504



**CARACTERIZACION GENETICA DE CEPAS DE LEVADURAS PARA LA PRODUCCION  
INDUSTRIAL DE ETANOL**

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

JUAN JIMENEZ MARTINEZ

Sevilla, setiembre de 1986

El director

Dra. Tahía Benítez  
Profesor Titular del  
Departamento de Genética

El ponente

Prof. Dr. E. Cerdá Olmedo  
Catedrático de Genética  
Director del Departamento

T.D. 131

UNIVERSIDAD DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
SECRETARIA

2-9-86

ENTRADA N.º 505

TD.131

A mis padres

## RESUMEN Y CONCLUSIONES

Con el fin de obtener cepas de levaduras más tolerantes a etanol que las existentes en la naturaleza, en este trabajo se ha realizado el análisis genético de la tolerancia a etanol de cepas vínicas seleccionadas por su tolerancia a este compuesto.

Las principales conclusiones son las siguientes:

1. La inhibición del crecimiento por etanol es distinta en las distintas cepas.
2. La producción de etanol puede optimizarse modificando las condiciones de fermentación (adición de sustrato a concentraciones no inhibitorias, suplementos nutricionales, reciclado de células).
3. Las características más deseables para la producción de etanol (tolerancia del crecimiento a etanol, a sustrato, alta actividad invertasa, floculencia, etc.) están repartidas entre distintas cepas.
4. Las cepas estudiadas son homotáticas, excepto las de flor que son heterotáticas, generando esporas haploides o próximas a la haploidía.
5. La formación de velo parece depender de al menos dos genes nucleares y de la presencia de mitocondrias funcionales.
6. En condiciones no extrema de temperatura y etanol, la tolerancia del crecimiento a etanol viene determinada fundamentalmente por genes nucleares. La diferencia en tolerancia del crecimiento a etanol encontrada entre las cepas estudiadas se debe a varios genes, distintos en las distintas cepas y a distintas concentraciones de etanol.
7. En condiciones extremas, la supervivencia es la que determina la tolerancia del crecimiento a etanol, y está codificada por genes mitocondriales.

8. En condiciones no extremas, se puede mejorar la tolerancia por complementación entre cepas no isogénicas; en condiciones extremas, la selección debe realizarse en base a la estabilidad respiratoria del genomio mitocondrial.

9. La inhibición del crecimiento por etanol está relacionada con la capacidad de interacción del etanol con la membrana celular, y la supervivencia por su interacción con la membrana mitocondrial.

10. La capacidad de las membranas celulares de adaptarse a etanol es una propiedad que depende de la naturaleza de cada cepa. El proceso requiere síntesis de proteínas y una fuente de energía.

11. La selección por cultivo continuo de híbridos entre cepas vínicas y cepas genéticas ha permitido el aislamiento de cepas capaces de crecer y fermentar en 15% de etanol y de producir cantidades similares a partir de glucosa.

12. Durante la realización de esta Tesis, se han desarrollado los siguientes métodos de trabajos con resultados sumamente satisfactorios:

a) Métodos bioquímicos. Ensayo de actividad hidrolítica sobre disacáridos que liberan glucosa, mediante el registro continuo de la liberación de este azúcar.

b) Métodos microbiológicos. **Cultivo continuo controlando la turbidez por** pH y por pulsos de dilución, que permiten variar las condiciones de cultivo.

Estimación de la tolerancia del crecimiento a etanol de cepas de levaduras mediante medidas de las **curvas de acidificación**

Estimación de la capacidad de supervivencia en condiciones extremas mediante la resistencia a la formación de mutantes [rho-] inducida por etanol (**frecuencia de mutantes "petite"**)

c) Métodos genéticos. Selección de híbridos y heteroplasmones vínico-genéticos a partir de cepas vínicas homotéticas y cepas de laboratorio heterotéticas.

SIMBOLOS

$K, k, C$	=	constantes empíricas
$p$	=	concentración de producto
$t$	=	tiempo
$\mu$	=	tasa de crecimiento
$\mu_0$	=	tasa de crecimiento en medio sin etanol
$\mu_{\text{máx}}$	=	tasa de crecimiento máxima
$\mu_c$	=	tasa específica de crecimiento
$\mu_d$	=	tasa específica de muerte
$x$	=	número de células
$x_0$	=	número de células inicial
$x_t$	=	número de células a tiempo $t$
$\nu$	=	tasa de fermentación
$Y$	=	rendimiento
$Y_{p/x}$	=	rendimiento producto/biomasa
$\tau$	=	tiempo de generación
$V$	=	volumen de la vasija de cultivo en un quimiostato
$F$	=	flujo de medio en un cultivo continuo
$D$	=	tasa de dilución de un cultivo continuo
$A$	=	tasa de acidificación
$r_0$	=	concentración inicial de etanol en la vasija de cultivo de un quimiostato
$r_1 \dots r_n$	=	concentración de etanol en la vasija de cultivo de un quimiostato, después de $1 \dots n$ pulsos de dilución de medio con $R\%$ de etanol
$R$	=	concentración de etanol de la vasija de alimentación de un quimiostato
$K_i$	=	constante de inhibición
$T_{\text{máx}}$	=	temperatura máxima de crecimiento
$\underline{k}$	=	constante de aumento del flujo pasivo de protones
$C_0$	=	constante de difusión en ausencia de etanol
$C_x$	=	constante de difusión a la concentración $x$ de etanol

$pH_f$	=	pH de equilibrio
$pH_c$	=	pH crítico
$\lambda$	=	tasa de inducción de mutantes "petite"
$[rho-]_0$	=	frecuencia inicial de mutantes $[rho-]$
$[rho-]_t$	=	frecuencia de mutantes $[rho-]$ a tiempo $t$

## INDICE GENERAL

### INTRODUCCION GENERAL

El etanol como alternativa energética . . . . .	1
Tolerancia a etanol de organismos productores . . . . .	2
Mecanismo de inhibición por etanol . . . . .	3
Mejora genética de levaduras productoras de etanol . . . . .	5
Tolerancia del crecimiento a etanol . . . . .	5
Objetivos del trabajo y estrategia experimental . . . . .	6

### CAPITULO I

#### CARACTERIZACION FISIOLÓGICA DE LEVADURAS VINICAS

Introducción . . . . .	8
Materiales y Métodos	
-Organismos . . . . .	9
--Medios de cultivo . . . . .	9
-Condiciones de cultivo:	
Crecimiento . . . . .	10
Fermentación . . . . .	10
Fermentación con adición parcial de sustrato . . . . .	11
-Fermentación con reciclado de células . . . . .	11
-Procedimientos analíticos . . . . .	11
Determinación de la actividad invertasa . . . . .	12
Ensayo rápido de la actividad invertasa . . . . .	12
Resultados	
-Inhibición del crecimiento por etanol . . . . .	12
-Inhibición del crecimiento por glucosa . . . . .	13
-Efecto de adiciones sucesivas de glucosa en la fermentación . . . . .	14
-Crecimiento y fermentación en medio industrial . . . . .	15
-Fermentación de melazas con reciclado de células . . . . .	16



Discusión . . . . .	17
<u>CAPITULO 2</u>	
CARACTERIZACION GENETICA DE LEVADURAS VINICAS	
Introducción . . . . .	21
Materiales y Métodos	
-Organismos . . . . .	23
-Esporulación y disección de ascas . . . . .	23
-Conjugación . . . . .	24
-Auxanografía . . . . .	25
-Otros caracteres . . . . .	25
Resultados	
-Viabilidad de los productos meióticos . . . . .	25
-Cruzamientos . . . . .	29
Discusión . . . . .	33
<u>CAPITULO 3</u>	
GENETICA DE LA TOLERANCIA DEL CRECIMIENTO A ETANOL	
Introducción . . . . .	36
Materiales y Métodos	
-Organismos . . . . .	37
-Determinación de la tolerancia . . . . .	37
-Estrategias para el análisis genético de la tolerancia . . . . .	37
Resultados	
-Segregación de la tolerancia en la cepa homotática ACA21 . . . . .	37
-Segregación de la tolerancia en la cepa heterotática FJF414 . . . . .	40
Discusión . . . . .	45
<u>CAPITULO 4</u>	
HERENCIA EXTRANUCLEAR DE LA TOLERANCIA AL ETANOL	
Introducción . . . . .	47
Materiales y Métodos	
-Organismos . . . . .	50

-Obtención de mutantes "petite" . . . . .	50
-Transferencia de mitocondrias de la cepa vínica ACA21 a la cepa de laboratorio ABQ21 . . . . .	50
-Recuperación de mitocondrias de ABQ21 en la cepa ABQ21-H1 . . . . .	52
-Crecimiento en etanol . . . . .	52
-Viabilidad en etanol . . . . .	52
-Temperatura máxima de crecimiento . . . . .	53
<b>Resultados</b>	
-Influencia del genomio mitocondrial en el crecimiento en etanol . . . . .	53
-Tolerancia a etanol y frecuencia de formación de mutantes "petite" inducidos por etanol . . . . .	54
-Influencia del genomio mitocondrial en la viabilidad celular en etanol a alta temperatura . . . . .	55
-Influencia de la naturaleza del genomio mitocondrial sobre la temperatura máxima de crecimiento, $T_{m\acute{a}x}$ , en presencia y ausencia de etanol . . . . .	57
-Inducción de mutantes "petite" por otros solventes	59
-Inducción por etanol de mutantes "petite" en diversas cepas vínicas . . . . .	60
-Termotolerancia de las cepas vínicas . . . . .	63
Discusión . . . . .	65

## CAPITULO 5

### PAPEL DE LAS MEMBRANAS EN LA TOLERANCIA AL ETANOL

Introducción . . . . .	68
<b>Materiales y Métodos</b>	
-Organismos . . . . .	70
-Medios y condiciones de cultivo . . . . .	71
-Determinación de las curvas de acidificación y del pH de equilibrio . . . . .	71
-Determinación de la capacidad de adaptación a etanol	71
<b>Resultados y Discusión</b>	
-Determinación de la constante de aumento por etanol del flujo pasivo de protones . . . . .	72

-Relación entre la constante de aumento, $k$ , y la constante de inhibición del crecimiento, $K_i$ . . . .	74
-Adaptación a etanol de las membranas celulares . . . .	75
 <u>CAPITULO 6</u>	
<u>SELECCION EN CULTIVO CONTINUO DE HIBRIDOS DE LEVADURAS TOLERANTES A ETANOL</u>	
Introducción . . . . .	78
Materiales y Métodos	
-Organismos . . . . .	79
-Medios y condiciones de cultivo . . . . .	79
-Adaptación al quimiostato del sistema de control turbidostático por pH . . . . .	80
-Procedimientos analíticos . . . . .	81
Resultados y Discusión	
-Valores extremos de pH obtenidos en cultivo discontinuo . . . . .	81
-Equilibrio del cultivo continuo controlado por el pHc . . . . .	82
-Experimentos de competencia y selección en cultivo continuo . . . . .	84
-Cultivos sometidos a concentraciones crecientes de etanol . . . . .	86
-Competencia y selección en cultivos mixtos sometidos a concentraciones crecientes de etanol . . . . .	88
-Producción de etanol por las cepas seleccionadas . . . . .	88
 <u>DISCUSION GENERAL</u> . . . . .	 90
 <u>APENDICES</u>	
APENDICE I: Cepas . . . . .	94
APENDICE II: Medios de Cultivo . . . . .	98
APENDICE III: Productos Químicos . . . . .	100
 <u>BIBLIOGRAFIA</u> . . . . .	 101

## INTRODUCCION GENERAL

### **El etanol como alternativa energética**

En apenas un siglo casi se ha consumido el petróleo acumulado en la tierra durante millones de años. El reconocimiento de que estas reservas petrolíferas no son infinitas ha potenciado el desarrollo de nuevas fuentes de energía renovable. En este sentido, el etanol es un buen candidato energético y su obtención por fermentación, una fuente de energía renovable de creciente interés.

El uso del etanol como combustible no es un concepto nuevo. A principios de siglo por ejemplo, se llegaron a diseñar vehículos capaces de utilizar gasolina, etanol, o cualquier mezcla de ambos ("model T" de Ford). Sin embargo, ha sido el encarecimiento creciente de los crudos de petróleo a partir de 1977 lo que ha activado la producción de etanol con fines energéticos, llegándose a multiplicar por 10 el volumen de producción en los "países desarrollados" durante los últimos 7 años (52). En la actualidad el etanol añadido a la gasolina en un 10% v/v (mezcla conocida como gasohol) llega a suplir grandes cantidades de combustible (en E.E.U.U. por ejemplo, más del 8% del petróleo), obteniéndose además una gasolina de mayor octanaje libre de plomo. El gasohol ha sido considerado por algunos como el primer paso hacia la independencia energética (44). Aún así, hoy en día obtener etanol por fermentación es mas caro que obtener gasolina, por lo que la sustitución de la industria "petroquímica" por la "alcoholquímica" es en este momento un proyecto utópico.

El abaratamiento del coste de producción de etanol juega un papel decisivo. En términos generales, la tecnología de la fermentación ha introducido grandes innovaciones al diseño clásico de producción, marcadas principalmente por el empleo de cultivos continuos (29). Sin embargo, la obtención de etanol por fermentación es aún un proceso de bajo rendimiento, debido sobre todo a factores

de difícil solución técnica, como la inhibición ejercida por el mismo etanol sobre el microorganismo que lo produce (54). Para evitar esta inhibición, han sido múltiples las soluciones técnicas empleadas, encaminadas a retirar el etanol a la vez que se produce (fermentación con extracción al vacío, o en presencia de solventes preferentes de etanol, etc.), pero esto acarrea problemas adicionales que hacen impráctico su uso (40). En este sentido, el problema puede tener una mejor solución abordado desde el punto de vista biológico: la obtención de organismos productores más tolerantes a este efecto tóxico ofrece una alternativa biológica al problema de la inhibición.

### **Tolerancia a etanol de organismos productores**

Saccharomyces cerevisiae y otras levaduras son los organismos más tolerantes a etanol de entre los eucariotas, ya que son capaces de crecer a concentraciones de entre 8-12% v/v etanol y de producir más de un 12% v/v (9). Por ejemplo, las levaduras de flor caracterizadas por su alto metabolismo oxidativo y su capacidad de formar velo en el mosto fermentante, llegan a producir 18% v/v etanol en los vinos finos de Jerez (70). Incluso en ciertas fermentaciones, como en la elaboración del sake (vino de arroz), algunas cepas de levaduras producen hasta un 20% v/v de etanol (32).

Las bacterias son mucho más sensibles a etanol ya que concentraciones superiores al 15% matan instantáneamente a la mayoría de las especies bacterianas. No obstante, existen excepciones, como el Lactobacillus heterohiochii y Lactobacillus homohiochii, que son los organismos más tolerantes a etanol que se conoce, ya que crecen hasta en un 20% v/v de etanol (38) (llegan a estropear el sake), aunque no lo producen. Zymomonas mobilis es otra excepción. Esta bacteria llega a crecer hasta en un 8% etanol y llega a producir tanto etanol como las levaduras, a una tasa superior a la de cualquiera de ellas. Además son más termotolerantes y osmotolerantes, lo que hace que se la considere en los últimos años como un buen candidato industrial. Sin embargo, Zymomonas mobilis sufre una fuerte inhibición por encima del 9% de etanol (57) lo que obliga al

uso de técnicas de reciclado de biomasa para obtener valores aceptables de producción (6). En la práctica, la mayor tolerancia de Saccharomyces y su fácil manipulación (sobre todo, en el aspecto genético), hacen que este organismo tradicional mantenga la hegemonía de la producción industrial.

### Mecanismo de inhibición por etanol

El efecto inhibitorio del etanol es un problema que ha llamado la atención de muchos investigadores en los últimos 50 años por su interés industrial, y también por su interés biomédico. No en vano, el etanol es la droga de mayor aceptación social en la historia del hombre (quizás, la descripción bíblica de la embriaguez de Noé, Génesis 9, 20-21, haga referencia a la borrachera más antigua recogida en los escritos de la humanidad). Sin embargo, aunque su efecto analgésico se relaciona con su interacción en las membranas (72), prácticamente se desconoce el mecanismo por el que el etanol afecta al sistema nervioso central, o en general, a los sistemas biológicos. El etanol es una molécula pequeña (ver descripción en la Tabla I.1), que ejerce una inhibición no competitiva en multitud de funciones (84). En el caso concreto de las levaduras el efecto del etanol es tan generalizado que resulta imposible determinar fisiológicamente cual es el paso enzimático cuya inhibición actúa de paso limitante del crecimiento y la fermentación, localizándose a veces en algún paso "clave" de la glicolisis (53), otras en el transporte de glucosa (47), etc.

**Tabla I.1.** Descripción de algunas constantes físico-químicas del etanol.

Fórmula	Peso Molecular	Coficiente de reparto	Densidad	Temperatura de ebullición	Temperatura de congelación
$\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$	46.07	0.14	0.816 g/ml	78.5°C	-114.1°C

El mecanismo por el que el etanol ejerce este efecto inhibitorio aún queda oscuro. Se ha observado una relación entre la temperatur

ra y el etanol, ya que la toxicidad del etanol aumenta cuando aumenta la temperatura (85) y aquellas levaduras que son más tolerantes a etanol también lo son a la temperatura (5, 9, 36). La presencia simultánea de etanol y otros compuestos como glucosa, ácidos derivados de la fermentación, etc. pueden también aumentar esta toxicidad. De ahí que con frecuencia se encuentre un efecto inhibitorio menor cuando el etanol se añade inicialmente al medio de cultivo que cuando ese mismo etanol es producido por fermentación. Otros alcoholes (metanol, propanol y butanol) ejercen un efecto inhibitorio similar, pero la toxicidad es tanto más acusada cuanto mayor es la longitud de la cadena carbonada, lo que confiere una mayor hidrofobicidad a la molécula. De ahí que la inhibición del etanol se haya asociado con su capacidad de interaccionar con las zonas hidrofóbicas de los componentes celulares, especialmente con los lípidos de la membrana. De hecho, son muchos los trabajos que describen una mejora en la tolerancia y la producción mediante la adición a cultivos de levaduras de determinados esteroides y ácidos grasos insaturados (20, 32). Así mismo se han logrado alteraciones en la tolerancia mediante manipulación de la composición lipídica de la levadura (8). Concordantemente, los cambios que tienen lugar en la composición de lípidos de bacterias y levaduras cuando estos organismos se cultivan en presencia de etanol, se han interpretado como una respuesta fisiológica de adaptación a estas condiciones (38). Así pues, es creencia generalizada que el etanol ejerce su efecto tóxico debido a sus propiedades físico-químicas, por interacción directa con las membranas, alterando su fluidez y en consecuencia, todas las funciones que directa o indirectamente dependan de ellas. Sin embargo, como se discutirá más adelante, además del componente lipídico existen componentes protéicos implicados directamente en la sensibilidad al etanol (3, 23). La acumulación interna de etanol también se ha sugerido que es un factor determinante de la tolerancia (8) al afectar, entre otras funciones, a la ruta glicolítica que transcurre intracelularmente. Sin embargo, la tasa de difusión del etanol a través de las membranas biológicas hacen que la concentración de etanol dentro y fuera de la célula se homogenice instantáneamente (30, 50), por lo que este enfoque del problema resulta probablemente inapropiado.

### Mejora genética de levaduras productoras de etanol

Aunque es mucha la información acumulada sobre el efecto inhibitorio del etanol, desde el punto de vista genético los conocimientos son muy escasos. Se sabe desde hace mucho tiempo que en Sacch. cerevisiae la tolerancia a etanol es una propiedad heredable característica de cada cepa (40), en la que están implicados un gran número de genes (19,40). Recientemente, se ha visto que cualquier producto génico de Sacch. cerevisiae es susceptible de ser inhibido por etanol, dado que cualquier gen, nuclear o extranuclear, puede mutar a formas alélicas que reducen la tolerancia a etanol (3). Sin embargo, queda por determinar cuáles habría que modificar para aumentar la tolerancia. Estos serían aquéllos que en su forma alélica silvestre limitan el crecimiento en presencia de etanol. Esta modificación debe ser compleja (cualitativa o cuantitativamente) puesto que los intentos de obtener cepas más tolerantes por mutagénesis y selección han sido, en general, infructuosos (13). La búsqueda en la naturaleza ha permitido, sin embargo, aislar cepas altamente tolerantes a etanol, capaces de crecer a concentraciones del 15% de este alcohol (5,9,36). Algunas de ellas constituyen el material básico de esta Tesis. De hecho, en este trabajo se aborda el estudio de las bases genéticas que determinan la mayor tolerancia de estas cepas y consecuentemente con los resultados, se han empleado las técnicas de manipulación genética apropiadas para obtener cepas aún más tolerantes.

### Tolerancia del crecimiento a etanol

En éste y otros trabajos, el análisis genético de la tolerancia se realiza en base a la "tolerancia del crecimiento", medido como la tasa de crecimiento ( $\mu$ ) o tiempo de generación\* ( $\mathcal{T}$ ) de cultivos en presencia y ausencia de etanol. Las razones para ello son varias: 1) Desde el punto de vista aplicado, la velocidad de producción de etanol ( $dp/dt$ ) se ve doblemente afectada por la tasa de crecimiento ( $\mu$ ), de acuerdo con la siguiente expresión:  $dp/dt = V x_t$ , donde  $t$  = tiempo de fermentación,  $p$  = concentración del producto,  $V$  = tasa de fermentación y  $x_t$  = número de células fermentando a tiempo  $t$ . Así, con una mayor tasa de crecimiento se consigue aumentar

$$\mu = \ln 2 / \mathcal{T}$$



tanto la tasa de fermentación como el número de células de la fermentación. Esto se debe a que, por una parte,  $V = Y_p/x \mu + C$ , y tanto el rendimiento producto biomasa,  $Y_p/x$ , como  $C$  se pueden considerar constantes (1), por lo que el aumento de la tasa de fermentación  $V$ , depende sólo del aumento de la tasa de crecimiento,  $\mu$ . Por otra parte, el número de células fermentantes también aumenta como se deduce de la ecuación  $x_t = x_0 e^{\mu t}$  (66), donde  $x_0$  = número de células del inóculo, y  $x_t$  = número de células que están fermentando después de un tiempo  $t$ . De ahí, que una mayor tolerancia al etanol del crecimiento pueda acelerar la velocidad de producción y aumentar la cantidad de etanol producido.

2) Desde el punto de vista básico, un proceso mal conocido genéticamente como la toxicidad del etanol, de efecto generalizado sobre las diversas funciones celulares, requiere a su vez un análisis genético que abarque (al menos en primera aproximación) el mayor número de funciones posibles, y el crecimiento es la resultante de la mayoría de ellas.

#### **OBJETIVOS DE ESTE TRABAJO**

El objetivo fundamental de esta Tesis es el de la obtención de cepas de levaduras altamente tolerantes a etanol. Puesto que la estrategia experimental para obtener cepas altamente tolerantes a etanol depende de la base genética de la tolerancia, el análisis de dicha base genética ha sido también objetivo prioritario del trabajo.

#### **ESTRATEGIA EXPERIMENTAL**

El presente trabajo ha sido dividido básicamente en seis capítulos:

- Capítulo 1: Caracterización fisiológica de levaduras vínicas.
- Capítulo 2: Caracterización genética de levaduras vínicas.
- Capítulo 3: Genética de la tolerancia del crecimiento a etanol.
- Capítulo 4: Herencia extranuclear de la tolerancia al etanol.
- Capítulo 5: Papel de la membrana en la tolerancia al etanol.
- Capítulo 6: Selección en cultivo continuo de híbridos de levaduras tolerantes a etanol.

El análisis de los resultados se realiza preferentemente de manera comparativa entre cepas del mismo experimento, puesto que pequeños cambios en la concentración de etanol y de la temperatura (factores de difícil control en el tiempo), afectan fuertemente a los resultados.

Cada uno de los capítulos de esta Tesis tiene una entidad propia, por lo que en cada uno de ellos se desarrolla una introducción específica, se describen los materiales y métodos y se discuten los resultados, de forma independiente a los demás. Finalmente, se realiza una discusión general para integrar los resultados y conclusiones del conjunto del trabajo. Las cepas, composición de los medios de cultivo y productos químicos empleados se describen en los apéndices correspondientes.

## CAPITULO 1

### **CARACTERIZACION FISIOLÓGICA DE LEVADURAS VINICAS**

#### I n t r o d u c c i ó n

La producción de etanol está limitada por el efecto inhibitorio que ejerce el propio etanol sobre la cepa que lo produce(38,54) y por el aumento en la presión osmótica debida a la alta concentración de sustrato requerida (63). Adicionalmente, existe un efecto sinérgico entre el etanol y el azúcar (56) y entre el etanol y otros derivados metabólicos (69) que aumentan la inhibición durante la fermentación. Mientras que la inhibición por azúcar puede evitarse con la adición del sustrato en pequeñas cantidades (33), el efecto inhibitorio del etanol en las levaduras es difícilmente evitable. Desde el punto de vista técnico, se han empleado varios métodos para intentar paliarlo, principalmente métodos encaminados a retirar el etanol a medida que se produce, lo que en general ha resultado infructuoso (55), o a la manipulación del "ambiente", reduciendo la temperatura (44) o añadiendo determinados compuestos lipídicos (32) que reducen el efecto inhibitorio. La búsqueda en la naturaleza (9,36) o la obtención en el laboratorio de levaduras más tolerantes a etanol ( 73 ), constituyen unas aproximaciones alternativas.

Además de los efectos inhibitorios mencionados, existen otros factores que, sobre todo en la fermentación industrial de melazas, pueden limitar la producción de etanol, como la actividad invertasa (64) o la escasez de compuestos nitrogenados (31). La fermentación depende de la cantidad de células del cultivo, por lo que, con frecuencia se reciclan, especialmente cuando la inhibición impide el aumento por crecimiento, aprovechando la capacidad de floculación en algunas cepas ( 80 ), o bien inmovilizándolas en un soporte sólido ( 41 ), para potenciar la producción.

De los factores esbozados anteriormente, la inhibición por etanol es el proceso que juega un papel más importante en la producción por fermentación biológica (4,51).En este primer capítulo se

describe una caracterización inicial de un grupo de levaduras vínicas previamente seleccionadas por su gran tolerancia a etanol y su capacidad de esporular. Esta caracterización va encaminada principalmente a establecer una clara clasificación fenotípica según el carácter "tolerancia a etanol" de las mismas, que permita un abordaje genético de esta propiedad. Adicionalmente, se pretende que estas cepas constituyan un grupo genético de partida para la obtención de levaduras productoras de etanol de interés aplicado. Así esta caracterización inicial se hace extensiva a otros aspectos biológicos importantes en la producción mencionados anteriormente, como la tolerancia a altas concentraciones de carbohidratos, o la capacidad de fermentar eficientemente melazas de remolacha, como medio barato de uso cotidiano en la industria de la producción de etanol.

## M a t e r i a l e s   y   M é t o d o s

### Organismos

Las levaduras vínicas ACA4, ACA21, ACA167, ACA174, IFI82, IFI256 y las de flor FJF206 y FJF414 son cepas que presentan una gran tolerancia a etanol (g), de ahí que se hayan seleccionado para un estudio detallado en este capítulo. ACA346 se seleccionó por su capacidad de flocular y las cepas DS8 y RBY-D5A, como controles de laboratorio e industrial respectivamente (ver apéndice I para descripción de cepas).

### Medios de cultivo

Como medio de laboratorio se utilizó el medio nutritivo YPD (ver apéndice II). Concentraciones de glucosa distintas del 2%, o la adición de etanol a este medio, se indican como YPD (% p/v glucosa) e YPDE (X%), siendo X la concentración de etanol (v/v) en el mismo.

Como medio industrial se utilizaron melazas de remolacha, obtenidas de Unión Alcohólica Española, S.A., Granada. Estas melazas (72% p/v sacarosa) se diluyeron con agua destilada hasta obtener

un 3.6% p/v de sacarosa para medir crecimiento, o hasta un 12% un 15% o un 20% p/v para medir fermentación. Dado que las melazas de remolacha son muy pobres en compuestos nitrogenados y que muchas levaduras requieren factores de crecimiento para crecer en este sustrato (36) en ocasiones se suplementaron las melazas con 0.5 g/l de fosfato diamónico, 0.5 g/l de biotina o 6.7 g/l de "Difco yeast Nitrogen Base with Ammonium Sulphate" (YNB), indicándose en cada caso el suplemento empleado. Este medio se acidificó hasta pH 4.5 y se utilizó sin esterilización previa, para imitar en todo lo posible las condiciones utilizadas habitualmente en la industria.

#### Condiciones de cultivo

**Crecimiento:** Tubos de 10 ml de capacidad que contenían 3.5 ml del medio de cultivo de que se tratase, se inocularon con 0.02 ml de un cultivo estacionario crecido en YPD y se incubaron a 30°C sin agitación. Periódicamente se midió la turbidez en un Spectronic 20 (Bausch & Lomb, Bélgica) a 660 nm de longitud de onda en cultivos con medios de laboratorio, y a 685 nm en cultivos con melazas. El crecimiento, expresado como tasa máxima de crecimiento ( $\mu$ ), se determinó a partir del tiempo medio de duplicación (tiempo de generación,  $\gamma$ ) durante el aumento exponencial de turbidez, de acuerdo con la expresión  $\mu = \ln 2 / \gamma$ .

**Fermentación:** Frascos de 100 ml de capacidad con 28.5 ml del medio de cultivo de que se tratase se inocularon con 1.5 ml de un cultivo estacionario en YPD y se incubaron a 30°C con agitación (160 rpm). Estos frascos se prepararon con una trampilla de agua para permitir la salida del CO<sub>2</sub> producido. Periódicamente, se tomaron 0.5 ml de muestra para determinar la concentración de azúcar y la de etanol (ver "Procedimientos analíticos"), así como para estimar el número de células, midiendo la turbidez a 660 nm en un Spectronic 2000 (Bausch & Lomb, Bélgica). La velocidad de fermentación se determinó midiendo el consumo medio de azúcar por unidad de tiempo

durante la fermentación, y la cantidad máxima de etanol producido, como la concentración del mismo existente, una vez agotado el azúcar del medio.

**Fermentación con adición parcial de sustrato:** La fermentación se realizó en medio YPD (8% p/v glucosa) como se ha descrito anteriormente. Cuando se agotaba la glucosa del medio (concentración inferior a 0.1%), se añadía glucosa hasta obtener un 8.5%. repitiéndose una segunda vez este proceso, con lo cual, se realizó una fermentación global de un 25% de glucosa. Como control y en paralelo, se realizó una fermentación con YPD y 25% de glucosa inicial.

**Fermentación con reciclado de células:** Melazas con un 12% de sacarosa y suplementadas con fosfato diamónico, se inocularon y fermentaron como se ha descrito anteriormente. Una vez agotada la sacarosa del medio, se recogieron las células del cultivo por centrifugación a 5000 g durante 10 minutos, se secaron con papel de filtro, se pesaron (peso húmedo) y se resuspendieron en 30 ml de nuevo medio en las mismas condiciones, repitiéndose el proceso hasta realizar tres fermentaciones. Finalmente, se llevó a cabo una cuarta fermentación resuspendiendo las células en melazas con un 20% de sacarosa. Con la cepa ACA346, capaz de flocular, las células se recogieron por simple decantación del medio, sin centrifugación.

#### Procedimientos analíticos

La concentración de **glucosa** se determinó inyectando 25  $\mu$ l de medio con una microjeringa en un analizador de glucosa YSI modelo 27 (Yellow Spring Instruments, Yellow Springs, OH E.E.U.U.).

La concentración de **sacarosa** se determinó midiendo la glucosa liberada tras mezclar 25  $\mu$ l de la muestra con 25  $\mu$ l de una solución de 10 mg/ml de invertasa (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO E.E.U.U.)

La concentración de **etanol** se determinó enzimáticamente, siguiendo el método descrito por Kaplan y Giotti (43).

La cantidad total de **proteínas** se determinó mediante el método descrito por Lowry et al. (49).

**Determinación de la actividad invertasa:** Se cultivaron células en 3 ml de YPD (5% p/v glucosa) para determinar la actividad basal y en 3 ml de YPM (maltosa como fuente de carbono, ver apéndice II), para determinar la actividad inducida. Cuando los cultivos alcanzaron una absorbancia a 660 nm de 0.5, las células se recogieron por centrifugación a 5000 g durante 5 min, se lavaron dos veces con tampón fosfato 1M pH 7.0 (27) y se resuspendieron en 3 ml del mismo tampón. Para la determinación del contenido en proteínas se tomó 1 ml de esta suspensión y las células de los restantes 2 ml se toluenizaron, añadiendo 0.1 ml de una mezcla 1:1 tolueno-etanol, y se incubaron con fuerte agitación durante 5 min a 30°C. Las células toluenizadas se recogieron por centrifugación, se resuspendieron en 2 ml del mismo tampón suplementado con 1% sacarosa y se determinó la liberación de glucosa cada 2 min.

**Ensayo rápido de la actividad invertasa:** Células de un cultivo estacionario en YPD se resuspendieron en 0.2 ml de agua con 50% sacarosa. 25 µl de esta suspensión se inyectaron en un analizador de glucosa YSI modelo 27 y se midió y registró la liberación de glucosa durante 20 segundos.

## Resultados

### Inhibición del crecimiento por etanol

El aumento en la concentración de etanol en el medio de cultivo ejerce un efecto inhibitorio en el crecimiento de las levaduras, distinto de unas cepas a otras (84). En las cepas caracterizadas en este trabajo, se observaron básicamente tres tipos de comportamiento en relación con esta inhibición, representados en la Fig. 1.1a. En las cepas IFI82, IFI256 y DS8 (control de laboratorio), la inhibición del crecimiento con las concentraciones crecientes de etanol fué de tipo lineal, mientras que las cepas ACA4, ACA21, ACA174 y RBY-D5A (control industrial) mostraron una inhibición exponencial. En las cepas de flor FJF206 y FJF414, apenas hubo inhibición hasta un 6% (v/v). Por encima de esta concen-

tración, la inhibición fué más acusada. Las cepas de flor fueron, con diferencia, las menos inhibidas respecto al crecimiento sin etanol (Tabla 1.1). Incluso en valores absolutos, la tasa de crecimiento por encima del 9-10% (v/v) etanol fué ligeramente superior en estas cepas, incluyendo el control industrial.

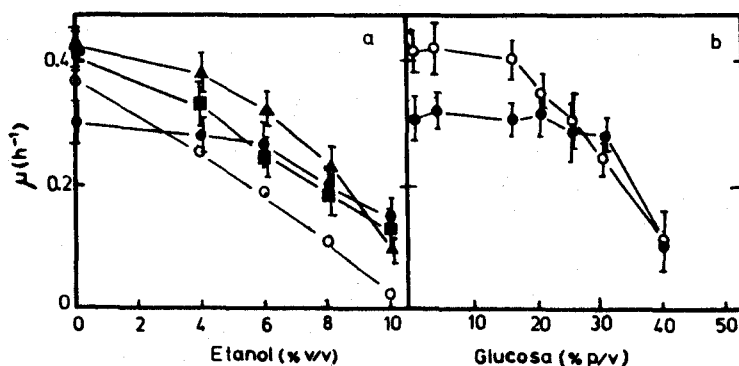


Figura 1.1. a) Inhibición del crecimiento ( $\mu$ ) por concentraciones crecientes de etanol, en las levaduras de flor FJF206 y FJF414 (●), en las cepas vnicas ACA4, ACA21 y ACA174 (▲), en las cepas vnicas IFI82 e IFI256 (■) y en el control de laboratorio DS8 (○). El control industrial RBY-D5A se inhibió como las cepas ACA. b) Inhibición del crecimiento por concentraciones crecientes de glucosa en las cepas de flor (●) y en las demás (○), inclusive las cepas control. Los resultados representan la media y la desviación típica de 3-4 experimentos realizados con cada una de las cepas.

### Inhibición del crecimiento por glucosa

La inhibición ejercida en el crecimiento por concentraciones crecientes de glucosa fué diferente de la ejercida por el etanol (Fig. 1.1b). En todas las cepas, excepto las de flor, la tasa de crecimiento se mantuvo constante hasta un 10% (p/v) de glucosa, por encima del cual se observó una reducción progresiva, llegando a disminuir hasta un 25-40% (según la cepa) en medio con un 25% (p/v) de glucosa (Tabla 1.1). En las levaduras de flor la inhibición no obedeció a este patrón. Las cepas de flor crecieron más lentamente en condiciones óptimas (Tabla 1.1), pero mantuvieron la misma tasa de crecimiento hasta un 25% (p/v) de glucosa. Por encima de esta concentración, la tasa de crecimiento se redujo, obteniéndose valores absolutos similares a los de las demás cepas.



**Tabla 1.1.** Parámetros generales (media de 3-4 experimentos) determinados en las levaduras vínicas caracterizadas. Crecimiento en YPD, YPD (25% p/v glucosa) (YPD25) y en YPDE (10%) (YPDE). Velocidad de fermentación expresada como consumo de azúcar en melazas (12% sacarosa, con fosfato diamónico y pH 4.5) y en YPD (30% p/v glucosa) (YPD30). Actividad basal, inducida y cociente inducida/basal. %i = % de inhibición respecto a YPD.

Cepa	Tasa de crecimiento ( $\mu$ ) ( $h^{-1}$ )					Velocidad de fermentación (g/l/h)		Actividad invertasa (ng gluc./s/ $\mu$ g prot.)		
	YPD	YPD25	%i	YPDE	%i	Melazas	YPD30	Basal	Inducida	I/B
ACA4	0.47	0.31	34%	0.09	81%	4.6	4.0	0.13	2.7	20
ACA21	0.44	0.30	32%	0.11	75%	0.0	4.3	ND	ND	ND
ACA174	0.40	0.30	25%	0.13	70%	4.8	4.2	0.37	6.1	16
IFI82	0.40	0.26	35%	0.12	70%	0.0	3.7	0.12	0.17	1
IFI256	0.43	0.26	40%	0.11	75%	7.1	4.3	0.27	4.6	16
FJF206	0.31	0.26	15%	0.12	61%	3.2	ND	0.34	1.7	5
FJF414	0.29	0.30	0%	0.14	52%	4.3	2.7	0.16	1.6	10
RBY-D5A	0.41	0.27	34%	0.08	81%	5.1	4.5	1.37	13.8	10
DS8	0.39	0.29	26%	0.06	85%	ND	ND	0.23	1.2	5

ND = no determinado

#### Efecto de adiciones sucesivas de glucosa en la fermentación

El efecto que tiene sobre la fermentación la utilización de concentraciones inicialmente altas de glucosa (25% p/v) se comparó con el que tiene lugar cuando se utiliza 8% p/v de glucosa inicial y se llevan a cabo adiciones sucesivas de 8% de glucosa. En estos experimentos se emplearon las cepas ACA4 y FJF414, de comportamientos extremos respecto a la inhibición por sustrato (Tabla 1.1). La cepa ACA4, cuya tasa de crecimiento se inhibió por concentraciones de glucosa superiores al 10%, mostró una mejora significativa en la velocidad de crecimiento y de producción de etanol, cuando un 25% de glucosa se fermentó en lotes (8% inicial y dos adiciones posteriores hasta alcanzar un 25% de glucosa final fermentada), con respecto a la fermentación en un 25% de glucosa inicial (Fig. 1.2a), siendo prácticamente el mismo el valor final de etanol alcanzado. Sin embargo en FJF414, cuya tasa de crecimiento permaneció constante hasta un 25% de glucosa (Tabla 1.1), no se observó ninguna mejora en la tasa de fermentación ni en la cantidad final de etanol producido (Fig. 1.2b).

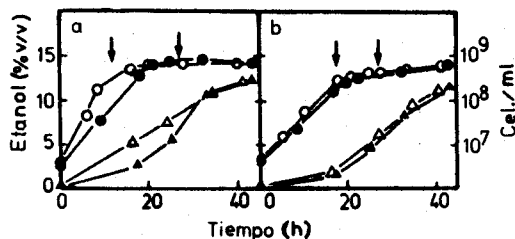


Figura 1.2. Producción de etanol ( $\Delta$ ,  $\blacktriangle$ ) y crecimiento (células/ml) ( $\circ$ ,  $\bullet$ ) en las cepas ACA4 (a) y FJF414 (b) en la fermentación de un 25% de glucosa inicial ( $\blacktriangle$ ,  $\bullet$ ), comparado con la fermentación de la misma cantidad en partes (8% inicial y dos adiciones hasta un 25% de glucosa final (indicadas por la flecha) ( $\Delta$ ,  $\circ$ ). Los resultados indicados son valores medios de tres experimentos.

### Crecimiento y fermentación en medio industrial

Cuando estas cepas se emplearon para fermentar melazas de remolacha (12% sacarosa, suplementadas con fosfato amónico y pH 4.5), los resultados fueron en parte distintos a los obtenidos en medio de laboratorio (Tabla 1.1). Algunas de las mejores cepas fermentando YPD (30% p/v glucosa), también lo fueron en la fermentación de melazas (IFI256, RBY-D5A). Sin embargo, cepas como IFI82 y ACA21 que en YPD (30% p/v glucosa) consumieron 3.7 y 4.3 g/l/h respectivamente, fueron incapaces de fermentar medio industrial (Tabla 1.1). Esta capacidad se vió que era debida a la carencia de actividad invertasa, como mostró un ensayo rápido de la misma (Fig. 1.3).

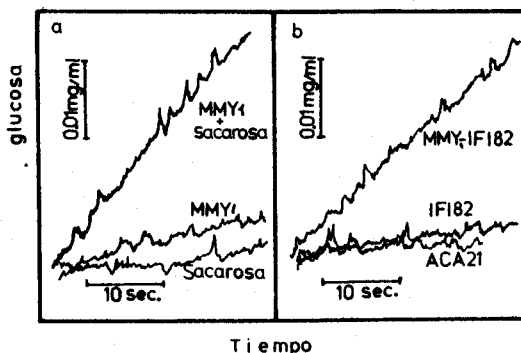


Figura 1.3. a) Liberación de glucosa registrada durante algunos segundos en una mezcla de células de la cepa MMY1 y sacarosa, como método rápido de determinación de la actividad invertasa. b) Aplicación del método para determinar la actividad de ACA21, IFI82 y un híbrido IFI82/MMY1.

Esta actividad también se determinó en la mayoría de las cepas por métodos cuantitativos convencionales (Tabla 1.1). Como en el caso anterior, IFI82 mostró una actividad invertasa despreciable (en ACA21 no se determinó). En las restantes cepas, la actividad específica en condiciones basales osciló en torno a 0.25 ng glucosa/s/ $\mu$ g de proteína, excepto RBY-D5A en la que fué casi 5 veces mayor, y el incremento en condiciones de desrepresión fué entre 5-20 veces la actividad basal.

En melazas no suplementadas, tanto el crecimiento (melazas 3.6% sacarosa) como la fermentación (melazas 12% sacarosa) transcurrieron muy lentamente (Fig. 1.4). La adición de una fuente de amonio (suplemento sistemático en la fermentación de melazas), de biotina, o de éstos y otros componentes del medio mínimo YNB, permitió un aumento proporcional en ambos parámetros (Fig. 1.4).

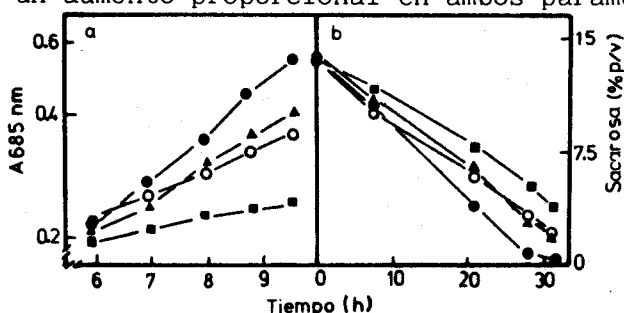


Figura 1.4. a) Crecimiento en melazas 3.6% sacarosa (incremento de absorbancia a 685 nm). b) Fermentación de melazas 12% sacarosa (consumo de sacarosa) de la levadura ACA167, en medio sin suplementar (■), suplementado con biotina (○), fosfato diamónico (▲) o YNB (●). El efecto obtenido con el suplemento simultáneo de amonio y biotina (no representado en la figura) fué similar al de YNB.

#### Fermentación de melazas con reciclado de células

La velocidad de consumo de azúcar fué baja en melazas 12% sacarosa (Tabla 1.1), y prácticamente nula en melazas 15% sacarosa. La fermentación pudo acelerarse cuando las células de una fermentación se recogieron y reutilizaron para fermentar medio fresco, durante cuatro fermentaciones consecutivas, las tres primeras con melazas 12% sacarosa y una cuarta con 20% sacarosa. La Tabla 1.2 muestra los resultados obtenidos con la cepa ACA346 (capaz de flocular en este medio) e IFI256 (la mejor fermentadora de

melazas). El crecimiento celular en melazas 12% sacarosa fué aproximadamente constante, de 0.5 g de peso seco/fermentación para ACA346 y 0.6 para IFI256, lo que permitió que reciclados sucesivos aumentaran la velocidad de fermentación, produciendo la misma concentración final de etanol. Las condiciones adversas de unas melazas más concentradas (20% sacarosa) impidieron el crecimiento en una cuarta fermentación. Incluso, es posible que en este medio se ejerciera un efecto tóxico que incrementara la muerte celular. Aún así, se obtuvo una velocidad de fermentación comparable a la obtenida inicialmente en melazas 12% sacarosa (Tabla 1.2), fermentando todo el azúcar a etanol.

**Tabla 1.2.** Velocidad de fermentación (g sacarosa consumidos/l/h), concentración máxima de etanol producida (% v/v) y cantidad de células obtenidas (g peso húmedo) en fermentaciones de melazas de remolacha con las concentraciones de sacarosa (% p/v) indicadas, reciclando las células de una fermentación para la siguiente. Las cepas utilizadas fueron ACA346 e IFI256.

Fermentaciones	Velocidad de fermentación (g/l/h)		Etanol producido (% v/v)		Biomasa producida (g)	
	ACA346	IFI256	ACA346	IFI256	ACA346	IFI256
1ª (12% sacarosa)	4.6	7.0	6.1	6.2	0.32	0.60
2ª (12% sacarosa)	10.7	10.2	6.2	6.4	0.85	1.23
3ª (12% sacarosa)	11.8	17.8	6.0	6.3	1.40	1.84
4ª (20% sacarosa)	7.9	8.6	10.7	12.5	1.40	1.56

## Discusión

La inhibición que ejerce el etanol sobre el crecimiento ha sido objeto de muchos trabajos, describiéndose para distintas levaduras curvas que se ajustan a una inhibición exponencial

(2, 4), lineal (35), parabólica (51) o hiperbólica (61), entre otras menos frecuentes (ver van Uden, (83) y (84)). Las cepas de esta Tesis

también sufrieron distintos tipos de inhibición, siendo lineal en algunas, exponencial en otras y aparentemente lineal tras un "plateau" (hasta 6% v/v etanol) en las levaduras de flor. Al igual que ya observaran otros autores (19,40) el tipo de inhibición por etanol resultó ser una característica de cada cepa y no de cada especie, ya que especies distintas fueron igualmente inhibidas (por ejemplo, RBY-D5A, Sacch. cerevisiae, y ACA4, T. delbrückii), mientras que algunas de la misma especie se inhibieron de manera diferente (por ejemplo, DS8 y ACA174, ambas Sacch. cerevisiae) (Tabla 1.1, Fig. 1.1).

El efecto inhibitorio de las altas concentraciones de azúcar sigue un modelo de inhibición diferente al del etanol, y muy similar entre distintas levaduras (56). La mayoría de las cepas caracterizadas en este apartado sufrieron una inhibición del crecimiento a concentraciones de glucosa superiores al 10% (Fig. 1.1), llegando a reducirse hasta un 25-40% en medio con 25% glucosa (Tabla 1.1). La reducción de este efecto inhibitorio por la adición de azúcar en cantidades no inhibitorias (8-8.5%), permitió un aumento en la velocidad inicial de producción de etanol, sin afectar al etanol máximo producido (Fig. 1.2). Otros autores ( 33 ) también han obtenido un aumento en la cantidad de etanol final al añadir el sustrato poco a poco durante la fermentación. Las levaduras de flor presentaron una inhibición por glucosa distinta a las cepas anteriores, ya que su tasa de crecimiento se mantuvo casi inalterable hasta un 25% de glucosa. De hecho, en estas cepas la adición parcial de glucosa no se tradujo en una mejora de la velocidad de fermentación. Así pues, aunque la inhibición por sustrato podría evitarse con la adición parcial del azúcar. el consecuente incremento en la velocidad inicial de producción depende del tipo de inhibición del crecimiento que sufra cada cepa.

La fermentación de medios industriales acarrea frecuentemente problemas adicionales a estos efectos inhibitorios. Las melazas de remolacha son pobres en nitrógeno y con frecuencia, la eficiente fermentación de estos medios por levaduras requieren la adición de factores de crecimiento (36). El escaso crecimiento encontrado con estas cepas cuando se emplearon melazas sin suplemento se estimuló con la adición de amonio, biotina o YNB, encontrándose

un efecto similar en la velocidad de fermentación (Fig. 1.4). La adición de invertasa también se ha descrito como favorable en la fermentación de melazas por Sacch. cerevisiae (64) indicando que la hidrólisis de sacarosa podría ser un paso limitante en la fermentación. En las cepas caracterizadas, se encontraron diferencias de más de 10 veces en la actividad invertasa de una a otra cepa, sin que esto se reflejara en grandes diferencias en la velocidad de fermentación de melazas (Tabla 1.1), por lo que, con la excepción de IFI82 y ACA21 que no poseen invertasa, esta capacidad hidrolítica no parece ser limitante en estas cepas. La sacarosa es un compuesto muy abundante en los medios industriales, por lo que el ensayo desarrollado podría ser utilizado como un método práctico para la medida de la actividad invertasa (Fig. 1.3).

En ocasiones, el crecimiento y la fermentación apenas tienen lugar cuando se utilizan melazas con más de un 15% de sacarosa (36). En las melazas aquí empleadas (12% sacarosa, suplementadas con fosfato amónico) se obtuvo una velocidad de fermentación comparable a la obtenida en medio YPD (30% p/v glucosa) (Tabla 1.1) pero, reciclando las células de una a otra fermentación, se incrementó progresivamente la velocidad de producción (Tabla 1.2). Utilizando las células recicladas durante tres fermentaciones sucesivas para fermentar finalmente melazas 20% sacarosa, todo el sustrato se transformó en etanol a una velocidad comparable a una fermentación con 12% sacarosa inicial, sin que hubiera crecimiento. La floculación (como le ocurre a ACA346) tiene una importancia tecnológica ampliamente conocida (8) en este proceso de reciclado.

En conjunto, la velocidad de fermentación, uno de los objetivos básicos de la producción de etanol, depende en gran medida de la tasa de crecimiento de manera que una reducción de la inhibición del crecimiento durante la fermentación (Fig. 1.2) o su estimulación mediante suplementos en el medio (Fig. 1.4), se reflejan en un aumento de la velocidad de fermentación. En medios donde el crecimiento es escaso o nulo, la fermentación depende básicamente de la cantidad de células que median el proceso (66). De ahí que un recicla-

do de células (Tabla 1.2), se tradujera en un aumento de la velocidad de producción. Las cepas aquí caracterizadas mostraron diversas propiedades de interés industrial dispersas entre ellas, pero en conjunto, todas presentaron una mayor tolerancia del crecimiento en medio con etanol que otras de laboratorio. Estas levaduras con una tolerancia bien caracterizada, constituyen el material básico de esta Tesis, y en ellas se ha llevado a cabo un análisis comparativo de esta propiedad.

## CAPITULO 2

## CARACTERIZACION GENETICA DE LEVADURAS VINICAS

Introducción

En la levadura de uso común en el laboratorio, Sacch. cerevisiae, las células diploides esporulan en condiciones inducibles experimentalmente, originando por meiosis 4 esporas haploides, dos de sexo a y dos de sexo  $\alpha$  (segregación mendeliana de los dos alelos a y  $\alpha$  del gen MAT). Cuando se mezclan células de distinto sexo, éstas conjugan dando lugar a diploides (Fig. 2.1). La estabilidad de ambas fases de ploidía, y la posibilidad de inducir la conjugación y esporulación, ofrecen grandes ventajas desde el punto de vista genético ya que permiten obtener fácilmente mutaciones y estudiar la dominancia o recesividad de un carácter determinando su expresión en diploides. También permite deducir el número de genes implicados en un carácter y su localización relativa en el genomio, mediante análisis de tetradas.

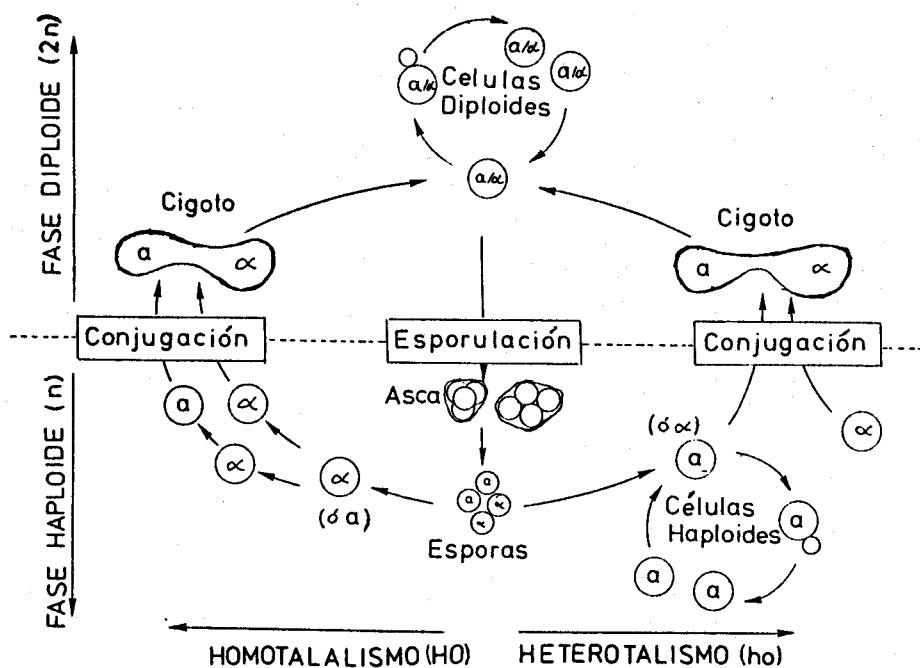


Figura 2.1. Ciclo de vida de *Sacch. cerevisiae*. a y  $\alpha$  son los alelos mendelianos del gen MAT; HO y ho los del gen HO; n y 2n representan una dotación haploide y diploide respectivamente. Para *Sacch. cerevisiae*, n = 17.



Este ciclo de vida, con alternancia de fases haploide y diploide estables, se denomina heterotálico (Fig. 2.1) y viene determinado por el alelo recesivo ho del gen HO, independiente del gen MAT. Su alelo dominante HO, confiere a las células la propiedad de cambiar de sexo tras la primera división mitótica. La posibilidad de que una célula conjugue con sus descendientes mitóticos (34,86), equivale a que cada espora pueda duplicar isogénicamente su material genético, manteniendo heterocigosis sólo para el locus sexual (a/x). Este ciclo, denominado homotálico, (Fig. 2.1) se caracteriza por la reducción de la fase haploide a una o pocas generaciones, lo que dificulta por tanto la manipulación genética por técnicas convencionales de conjugación cruzada.

Las levaduras industriales son frecuentemente homotáticas y además pcliploides o aneuploides (79). En consecuencia, no conjugan ni esporulan y si lo hacen, originan muchas esporas inviables. Todas estas características complican la posibilidad de análisis genético por conjugación y análisis de tetradas. En ocasiones la búsqueda de esporas heterotáticas espontáneas (26) o inducidas mediante mutagénesis (22,62) ha permitido este tipo de análisis, pero normalmente se recurre al "trasplante genético" a otras cepas del carácter en estudio, mediante transformación (79) u otras técnicas genéticas (60) o se llevan a cabo hibridaciones parasexuales (78).

Así pues, la posibilidad de llevar a cabo un ciclo heterotálico haplo/diploide regular es una característica deseable en cualquier programa de análisis y mejora genética en cepas industriales, ya que cualquier alteración de estas propiedades requiere estrategias de análisis complejas.

En este capítulo se exploran estas propiedades en las levaduras vínicas caracterizadas anteriormente. Dado que, como se indicó en la Introducción General, el objetivo prioritario de esta Tesis es el de la obtención de cepas altamente tolerantes a etanol, los análisis genéticos realizados han sido sólo el paso preliminar necesario para definir la estrategia experimental que se iba a seguir a fin de obtener estas cepas tolerantes. Por estas razones,

características tan interesantes como la formación de velo, la floculación o incluso la posible existencia de alelos letales y las aneuploidías han sido estudiadas de modo superficial. Análisis detallados se han llevado a cabo sólo con el carácter "tolerancia a etanol" que se describe en el capítulo 3.

## M a t e r i a l e s   y   M é t o d o s

### Organismos

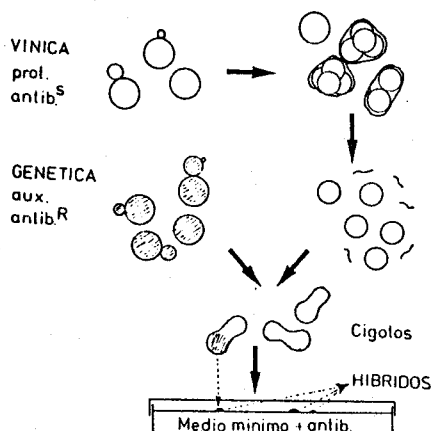
El análisis genético se llevó a cabo con las cepas vínicas ACA4, ACA21, ACA174, IFI82, IFI256, las cepas de flor FJF206 y FJF414 y como control se utilizó el diploide genético DS8. En experimentos de conjugación se utilizaron las cepas D517-4B y D273-11A, y la cepa MMY1 (descripción de las mismas en el apéndice I).

### Esporulación y disección de ascas

Para inducir esporulación, colonias aisladas que habían estado creciendo sobre YPD sólido durante 2 días a 30°C, se transfirieron a medio sólido de esporulación (apéndice II), se incubaron a 22°C y se incubaron durante 6-8 días. Posteriormente las células se resuspendieron en 0.3 ml de agua estéril. Una muestra se colocó en una cámara de conteo Burke para estimar al microscopio la proporción de células que esporularon (nº de ascas/total). Al resto, se añadió 0.03 ml de helicasa (Suc d'Helix pomatia, IBF, Clichy, Francia) para digerir la pared de las ascas y se incubó hasta que al microscopio se observaba que la mayoría de las ascas pasaban de formar un tetraedro a disponerse en un plano. El tiempo de digestión varió de 10 min a mas de 1 hora, dependiendo de la cepa. La disección de las ascas y la separación de sus esporas se realizó con una microaguja de cristal y un micromanipulador (Lawrence Instruments, OH E.E.U.U.), en YPD sólido. Una vez micromanipuladas, las esporas se incubaron durante 3-4 días a 30°C. La proporción de colonias crecidas respecto al total de esporas aisladas determinó la viabilidad de los productos meióticos (% germinación).

## Conjugación

Para determinar la capacidad de conjugarse de cada cepa, se prepararon dos mezclas de la misma con células de la cepa D517-4B (MATa ade2 lys9) o de la cepa D273-11A (MAT $\alpha$  adel his1) respectivamente en YPD sólido y se incubaron a 30°C durante 4-5 h. La formación de cigotos con una, otra o ninguna de las cepas de sexo conocido determinaba el que la cepa fuera clasificada como heterotálica de uno o el otro sexo u homotálica, respectivamente. En las cepas heterotálicas los híbridos se obtuvieron aislando cigotos de la mezcla de conjugación por micromanipulación. En las cepas homotálicas los híbridos se obtuvieron de la siguiente forma: se indujo la esporulación como se ha descrito con anterioridad y las ascas resultantes se incubaron con helicasa durante 30 min, agitando periódicamente hasta obtener una suspensión abundante de esporas libres. Las esporas se lavaron con agua estéril y finalmente se recogieron por centrifugación y se mezclaron en una proporción 1:3 con la cepa MMY1 (MAT $\alpha$  ura3- $\Delta$ 52 cyh<sup>R</sup>) o con D517-4CD, un mutante espontáneo resistente a cicloheximida (Chy<sup>R</sup>) de la cepa D517-4B. La mezcla de conjugación se sembró en YPD sólido y se incubó a 30°C durante 6 h, transcurridas las cuales las células se resuspendieron en 0.5 ml de agua y se extendieron (diluyendo 10 veces) en cajas que contenían medio mínimo YNBD con 10 mg/l de cicloheximida. Como control se sembraron en tres cajas de este mismo medio, 0.1 ml de la suspensión de esporas, de células de la cepa MMY1 o de la cepa D517-4BC respectivamente. Las colonias aparecidas a los 5 días de incubación a 30°C, se aislaron para su posterior comprobación y análisis (Fig. 2.2).



**Figura 2.2.** Método de selección de híbridos vínico-genéticos con cepas vínicas homotálicas prototrofas, y una cepa genética con auxotrofías y una resistencia (dominante) a un antibiótico.

### Auxonografía

La presencia de esporas auxótrofas entre las derivadas de las cepas vínicas se determinó replicando las colonias aparecidas tras incubación de 4-5 días a 30°C en YPD, a cajas con medios mínimo e YPD. Aquellas que no crecieron en medio mínimo YNBD, se replicaron a medio mínimo suplementado con 500 mg/l de casaminoácidos, lo que limitaba el estudio a sólo auxotrofías para aminoácidos. La determinación concreta del aminoácido requerido se realizó mediante el test de Holliday (75), probando el crecimiento en cajas con medio mínimo suplementado (50 mg/l de cada aminoácido) con distintas combinaciones de aminoácidos tomados de 4 en 4.

### Otros caracteres

La formación de velo, característica exclusiva de las levaduras de flor, se determinó en YPD líquido, incubando 15-20 días a 25°C sin agitación. La agregación celular (microfloculación) y las formas anómalas de las células se determinaron mediante observación al microscopio.

Los mutantes "petite" se determinaron mediante réplica a cajas YPG que contenían una fuente de carbono no fermentable.

## Resultados

### Viabilidad de los productos meióticos

La Tabla 2.1 recoge los resultados de las pruebas de esporulación de las cepas vínicas. Todas las cepas tenían un nivel aceptable de esporulación, dando mayoritariamente 4 esporas/asca, excepto IFI256, que sólo presentaba ascas con dos esporas. Comparando con el control DS8, la cepa ACA174 y sobre todo, las cepas de flor, ofrecieron una especial dificultad en la micromanipulación, siendo necesario en ocasiones un largo período de digestión enzimática del asca (hasta 60 min en FJF206) para hacer posible el aislamiento de esporas.

**Tabla 2.1** Eficiencia de la esporulación, viabilidad y comportamiento sexual de las esporas derivadas de las cepas vínicas

Cepa	Esporulación (%)	Nº de esporas/asca	Tiempo de digestión del asca (min)	Esporas viables (%)	Comportamiento de las esporas
ACA4	85%	2, 3, <u>4</u> <sup>(1)</sup>	15	100% (17) <sup>(2)</sup>	Todas esporulan
ACA21	100%	<u>2</u> , 3, <u>4</u>	15	61% (15)	"
ACA174	23%	<u>2</u> , <u>4</u>	25	12% (13)	"
IF182	90%	<u>2</u> , <u>3</u> , <u>4</u>	10	77% (11)	"
IF1256	100%	<u>2</u>	15	87% (16)	"
FJF206	78%	2, 3, <u>4</u>	60	50% (10)	Todas conjugan
FJF414	82%	2, 3, <u>4</u>	45	15% (10)	"
DS8	92%	<u>4</u>	15	100% (10)	"

(1) En subrayado, el caso más frecuente.

(2) Entre paréntesis, el número de tetradas micromanipuladas.

La viabilidad de las esporas en estas mismas cepas fué muy escasa. Aunque el prolongado tratamiento con helicasa pudo disminuir la viabilidad, no es descartable una causa genética de este efecto. De hecho, en FJF206, la supervivencia sistemática de sólo dos de las cuatro esporas (Fig. 2.3) podría deberse bien a la existencia de un alelo letal recesivo, o bien a una aneuploidía del tipo  $2n-1$  (monosomía). En este último caso, la meiosis generaría dos esporas viables ( $n$ ) y dos inviables ( $n-1$ ). En FJF414 germinaron una o dos esporas por tetrada, lo que podría deberse a la presencia en la cepa original de dos alelos letales o bien a determinadas alteraciones numéricas.

En IF182 aparecieron con la misma frecuencia tetradas con sólo dos o con las cuatro esporas viables (Fig. 2.4), lo que podría reflejar la existencia de una trisomía ( $2n+1$ ). La segregación meiótica de un mono- y un divalente generaría 4 esporas viables ( $2n : 2n+1$ ), mientras que la segregación de trivalentes daría lugar a dos esporas viables ( $n+2$ ) y dos inviables ( $n-1$ ).

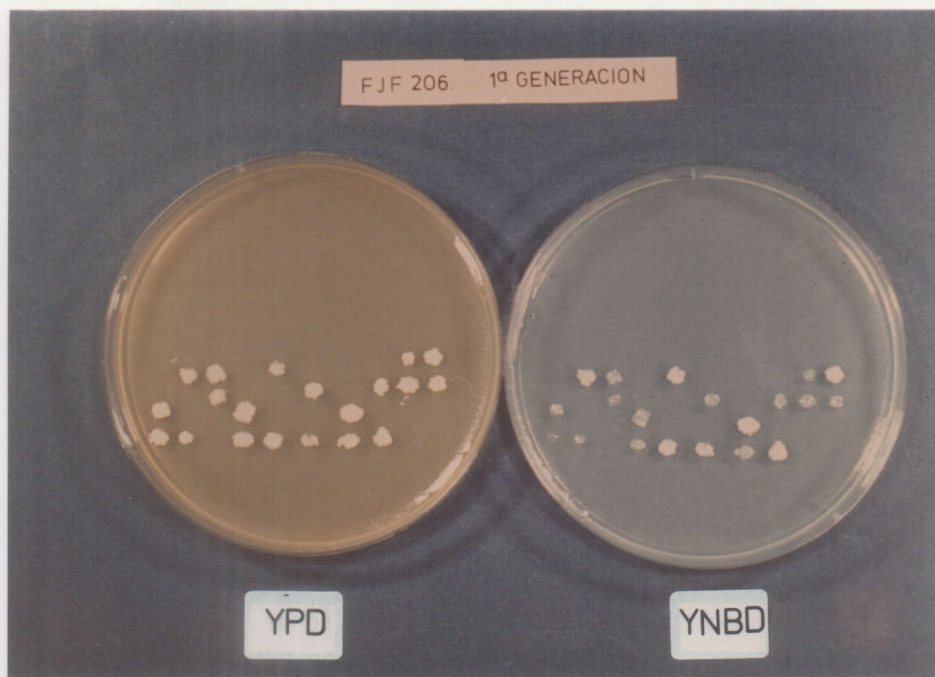


Figura 2.3. Segregación de viabilidad y auxotrofia (crecimiento en medio rico YPD /no crecimiento en medio mínimo YNBD) de la primera generación (10 tetradas completas) de la cepa de flor FJF206. Cada columna corresponde a las cuatro esporas de un asca.

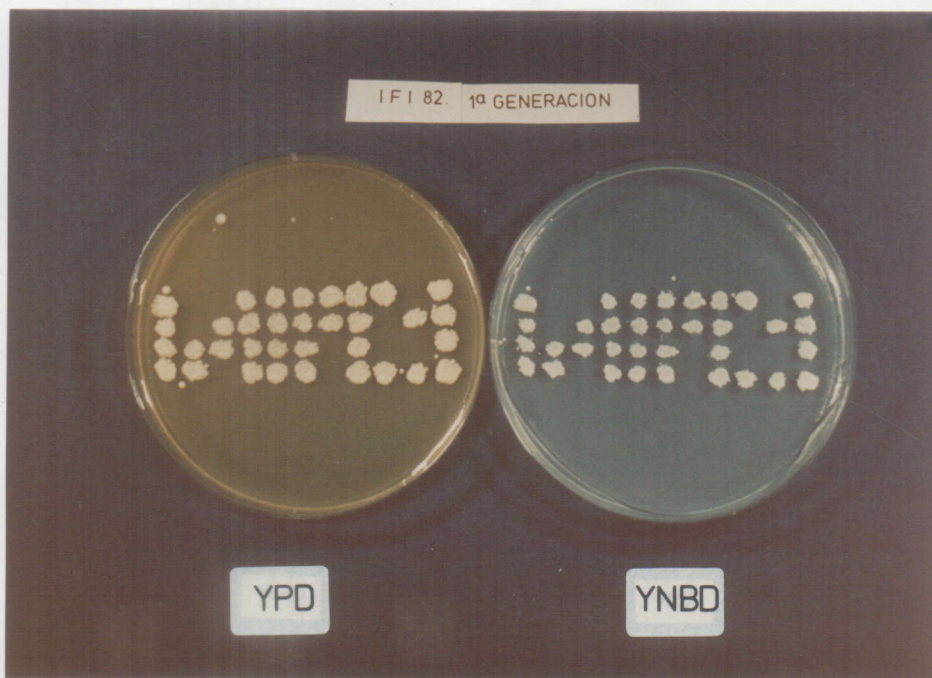


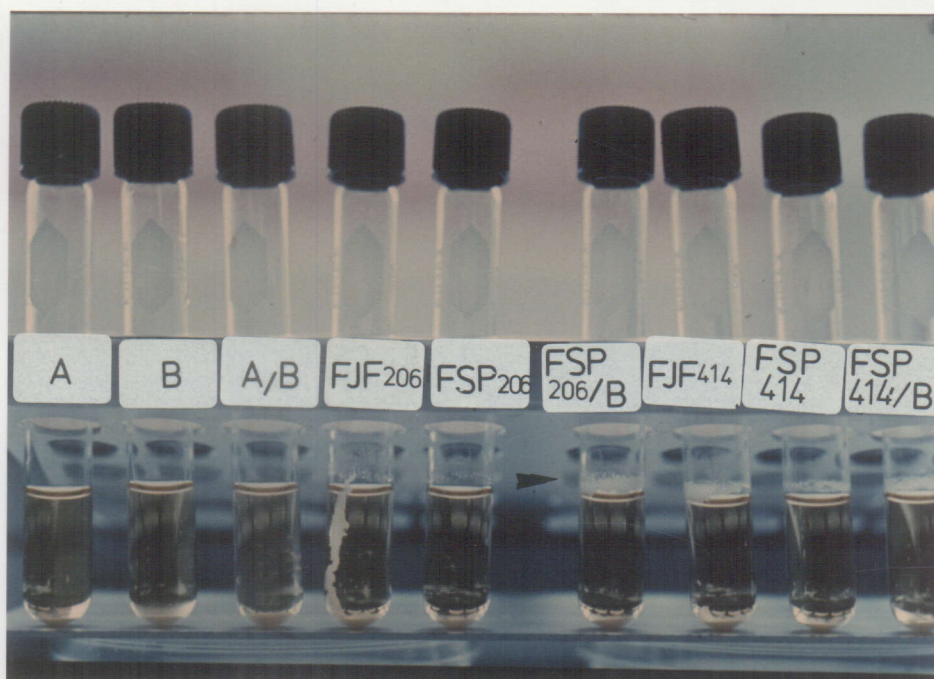
Figura 2.4. Segregación de viabilidad y auxotrofia (crecimiento en YPD no crecimiento en YNBD) de la primera generación (11 tetradas completas) de la cepa ví-nica IFI82. Cada columna corresponde a las cuatro esporas de un asca.

Además de la segregación en la viabilidad, 5 de 7 esporas de la cepa de flor FJF414, y 13 de 20 en las de FJF206, no crecieron en medio mínimo (Fig. 2.3). Mediante una auxanografía se determinó que tanto las esporas auxótrofas de FJF206 como las de FJF414, requieren sólo metionina para crecer. Para FJF206, la distribución de esta auxotrofia entre las esporas viables de cada tetrad, sugiere que ésta depende de un solo gen y que éste es independiente del que confiere letalidad. Todas las demás cepas originaron productos meióticos protótrofos (Fig. 2.4 para IFI82).

Otros caracteres como la formación de velo en las cepas de flor (Fig. 2.5 y 2.6), la "microfloculación" de las células, o la incapacidad de hidrolizar sacarosa ( $\text{Suc}^-$ ) de IFI82 y ACA21, no presentaban segregación alguna, siendo las esporas idénticas a la cepa parental. Esto es indicativo de que, o bien las cepas son homocigóticas para este carácter, o bien de que se trata de un carácter complejo gobernado por muchos genes.



**Figura 2.5.** Velo formado por levaduras de flor (denominado "flor" del vino), durante la maduración de un vino de Jerez, con un contenido alcohólico superior al 15% v/v (Bodegas de Domecq S.A. de Jerez de la Frontera).



**Figura 2.6.** Formación de velo en laboratorio (a la altura de la flecha) de: (A), cepa D273-11A; (B), cepa D517-4B; (A/B), diploide formado por cruzamiento de D273-11A y D517-4B; (FJF206), cepa vínica de flor; (FSP206), espora de FJF206; (FSP206/B), diploide formado por cruzamiento de D517-4B y FSP206; (FJF414), cepa vínica de flor; FSP414, espora de FJF414; (FSP414/B), diploide formado por cruzamiento de D517-4B y FSP414.

### Cruzamientos

Características como la auxotrofia Met<sup>-</sup> de algunas esporas de flor, o la incapacidad de hidrolizar sacarosa (Suc<sup>-</sup>) de las cepas ACA21 e IFI82, resultaron muy útiles como marcadores selectivos para la manipulación genética. Sin embargo, la característica más importante para poder desarrollar estudios genéticos posteriores fué la capacidad de conjugar mostrada por las esporas de las cepas de flor (Tabla 2.1). Todas ellas conjugaron con Sacch. cerevisiae de sexo a (D517-4B) o α (D273-11A), en una proporción que, a pesar de la baja viabilidad de las esporas, puede estimarse de 2:2. El aislamiento por micromanipulación de cigotos entre una espora Met<sup>-</sup> de FJF414 (FSP414/6) y la cepa D517-4B originó un 100% de colonias genéticamente estables, es decir, que no segregaban en mitosis sucesivas, a pesar de ser híbridos entre esporas de T. pretoriensis y Sacch. cerevisiae. Los híbridos resultantes eran protótrofos y, como se muestra en la Fig. 2.6, formaron velo,



demostrando la dominancia de este carácter. Estos diploides esporularon dando mayoría de ascas de 4 esporas que, tras una digestión de 10 min con helicasa, pudieron micromanipularse con facilidad, generando un 100% de esporas viables. En el caso de los marcadores ade2 (Fig. 2.7), sexo, lys9 y met-, se obtuvo una segregación 2:2 para cada uno de ellos, característica de genes únicos con dos alelos. La formación de velo y la microfloculación, dieron una segregación explicable en el caso más sencillo como característica de dos genes con dos alelos para cada marcador (Tabla 2.2). En ambos casos, estos caracteres vendrían determinados por la presencia simultánea del alelo dominante de cada gen.



Figura 2.7 . Segregación del híbrido FDH1, proveniente del cruzamiento de la espóra FSP414/6 de FJF414 y la cepa D517-4B. Las colonias rojas indican la presencia del alelo recesivo ade2 del parental genético D517-4B.

**Tabla 2.2.** Segregación de los caracteres capacidad de formar flóculos y capacidad de formar velo (+ = presencia del carácter), en 10 tetradas completas del híbrido entre FSP414/6 y D517-4B.

Carácter	Segregación		
	Ditipo Parental	Tetratipo	Ditipo recombinante
	$2^+ : 2^-$	$1^+ : 3^-$	$0^+ : 4^-$
Flóculo	6	4	0
Velo	1	8	1

Los genes que determinan la formación de velo son independientes. Este carácter no se desarrolló en mutantes "petite" deficientes en respiración. Para la microfloculación, los genes muestran ligamiento y proximidad al centrómero. Sin embargo, aunque la explicación más sencilla es que tanto el carácter "velo" como el carácter "floculación" están controlados por al menos dos genes, no puede descartarse la existencia de situaciones más complejas en la que estén implicados un número superior de genes.

Adicionalmente se observó que una o dos colonias de cada tetrada en esta segregación presentaron células con morfología atípica. (Fig. 2.8), quizás consecuencia del menor parentesco entre la espora FSP414/6 de FJF414 y D517-4B, ya que los productos meióticos del cruzamiento entre esporas de FJF414 y FJF206, o del cruzamiento D517-4B y D273-11A no presentaban ninguna morfología anormal. La segregación de todos estos caracteres en el híbrido se ajustan a lo esperado para la meiosis de un diploide completo, indicando que las esporas derivadas de las cepas de flor eran probablemente haploides.

En el resto de las cepas, las esporas no conjugaron y volvieron a esporular, como corresponde al carácter homotálico. Dado que los intentos de aislar híbridos cepa vínica/cepa de laboratorio por micromanipulación resultaron infructuosos, el aislamiento se realizó por selección según se indica en Materiales y Métodos y en la Fig. 2.2.

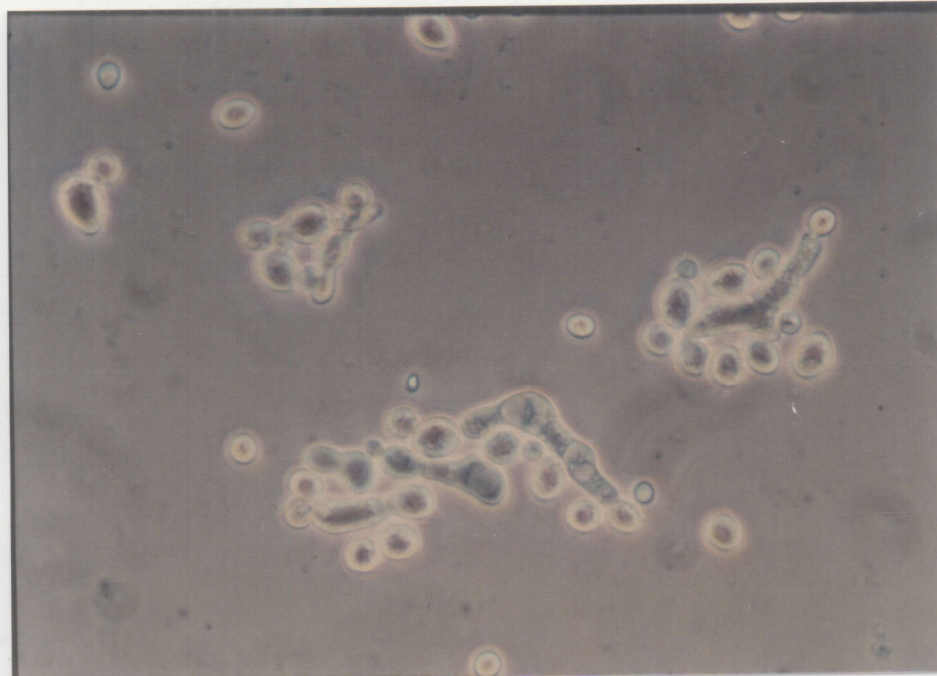


Figura 2.8. Morfología celular atípica que presentan las células de algunas de las colonias en la segregación del híbrido vínico-genético FDH1.

Como se muestra en la Tabla 2.3, sólo aparecieron colonias en cajas de medio selectivo sembradas con mezclas de conjugación, con una frecuencia que osciló entre  $10^{-6}$  y  $10^{-4}$  por cada espora vínica (parental limitante), sin que aparecieran mutantes espontáneos  $Cyh^R$  de las esporas vínicas o revertientes protótrofos de las cepas genéticas.

Tabla 2.3. Número de colonias obtenidas al sembrar en medio selectivo una mezcla de conjugación formada por  $10^6$  esporas de levaduras vínicas y  $3-4 \times 10^6$  células de la cepa MMY1 (sexo  $\alpha$ ) ó D517-4BC (sexo  $\underline{a}$ ). La siembra control se realizó con  $10^7$  células de MMY1 ó D517-4B.

Nº de colonias	Mezcla de conjugación:						
	Esporas de IFI256		Esporas de IFI82		Esporas de ACA4		Control
	+MMY1	+D517-4BC	+MMY1	+D517-4BC	+MMY1	+D517-4BC	
	2	0	110	12	89	4	0

Las colonias seleccionadas del cruzamiento entre esporas de IFI82 y MMY1, hidrolizaban sacarosa (Fig. 1.3) y segregaban 2:2 para los caracteres Suc y Ura. El análisis meiótico de algunas colonias, seleccionadas del cruzamiento entre esporas de ACA4 y D517-4BC, también demostró el carácter híbrido de estas células. En una de estas colonias, de 7 ascas micromanipuladas (supervivencia del 82%) se analizaron 3 tetradas completas, en las que dos esporas originaron colonias que no conjugaron y sí esporularon (homotáticas) y las otras dos sí conjugaron (heterotáticas), siendo una del sexo a y otra del  $\alpha$ . También se obtuvo una clara segregación 1:1 de los marcadores ade2 y lys9, lo que confirmó el carácter híbrido y la proximidad a la diploidía de estas cepas.

### D i s c u s i ó n

Como se refleja en la Tabla 2.1, todas las cepas producen esporas viables en mayor o menor grado, pero sólo las cepas de flor producen esporas heterotáticas susceptibles de hibridación sexual por métodos convencionales (79). Estas cepas de flor son altamente "consanguíneas" puesto que mostraron características fisiológicas muy parecidas (capítulo 1), e incluso segregaron la misma auxotrofia. En base a esto, es plausible que la segregación encontrada en la viabilidad de sus esporas tenga una causa común. En FJF206, la inviabilidad podría deberse indistintamente a un alelo letal recesivo o a una monosomía ( $2n-1$ ) (Fig. 2.3). Sin embargo, la presencia de una mayoría de tetradas con sólo una espора viable se explicaría más difícilmente por monosomía (como ocurrió con FJF414), lo que sugiere que en ambas cepas, la presencia en heterocigosis de uno o dos alelos letales recesivos en FJF206 y FJF414 respectivamente, sean la causa de esta segregación. No obstante, no se puede descartar la existencia de situaciones más complejas, tales como aneuploidía para más de un cromosoma, que podría dar el mismo resultado.

Independientemente de la determinación taxonómica de estas levaduras de flor, la compatibilidad de su genomio con el de Sacch. cerevisiae queda demostrada por la estabilidad de los híbridos

y la alta viabilidad de las esporas derivadas de los mismos. Esto, unido a la haploidía que parecen tener las esporas, hace que estas cepas sean candidatos ideales para el análisis genético de cualquier carácter que las diferencie de las levaduras comunes del laboratorio. De entre ellos, sobresalen por su interés en la maduración de algunos vinos de alto contenido alcohólico, la tolerancia a etanol y la formación de velo. Este último carácter depende de la presencia simultánea de dos alelos dominantes (Tabla 2.2 y Fig. 2.5) y al menos en las esporas de FJF414, no se expresa en mutantes "petite". También la "microfloculación" que presentan estas cepas parece depender de la presencia simultánea de dos alelos, aunque la expresión de este carácter depende no sólo de genes nucleares sino también de las condiciones ambientales y de factores citoplásmicos (80).

Las demás cepas vínicas dieron lugar a esporas homotálicas que con un método selectivo apropiado (Fig. 2.2) pueden cruzarse con una cepa de laboratorio, obteniéndose híbridos estables. La baja frecuencia de conjugación quizás esté relacionada con la ya descrita especificidad de las feromonas que intervienen en el proceso, especialmente la a, puesta de manifiesto en el efecto en diferentes especies (25) o a deficiencias sesgadas en el cambio de sexo de las cepas homotálicas (42). El híbrido formado segregaba monogénicamente para el homotalismo/heterotalismo, lo que sugiere que la conjugación con la cepa heterotálica ocurrió por competencia en la conjugación, y no por la aparición de esporas vínicas heterotálicas por mutación espontánea (60). Otros caracteres segregaron también de forma monogénica, lo que sugiere que estas esporas vínicas están próximas a la haploidía, por lo que también son propicias para un análisis genético. Sin embargo y a diferencia de las de flor, la viabilidad obtenida sugiere la existencia de aneuploidías. En el caso en que una cepa homotálica generara esporas distintas entre sí (segregara), un método de cruzamiento al azar como el desarrollado para estas cepas (Fig. 2.2) no sería útil para un análisis genético convencional, puesto que se desconocería el fenotipo de la espora que entra en conjugación. En ese caso,

la duplicación isogénica del material nuclear, su capacidad de esporular nuevamente y el estudio del carácter en sucesivas generaciones ofrecen una alternativa al método aquí expuesto.

### CAPITULO 3

#### **GENETICA DE LA TOLERANCIA DEL CRECIMIENTO A ETANOL**

##### I n t r o d u c c i ó n

Se desconoce la naturaleza y el número de genes que hacen que unas cepas sean más tolerantes que otras a la presencia de etanol en el medio. En Sacch. cerevisiae es posible obtener mutantes sensibles a etanol (3). La alta frecuencia de aparición de estos mutantes y su variedad ponen de manifiesto que la sensibilidad se puede conseguir alterando prácticamente cualquier proteína, incluso aunque no esté específicamente implicada en la tolerancia. Sin embargo, la obtención de mutantes capaces de crecer en concentraciones superiores de etanol sólo ha sido posible en un sistema continuo de selección (13), siendo muy pobre el incremento en la tolerancia de los mutantes así aislados (13). La comparación genética por cruzamientos de cepas con distinta tolerancia, revela que son muchos los genes implicados en este carácter, y de ahí quizás la dificultad que presenta su análisis genético (19,40). Otros métodos como la hibridación (40,73) o la selección de cepas naturales (9,40) han proporcionado cepas que, por término medio, han resultado más tolerantes, sin que exista en estos casos una clara interpretación genética.

En la mayoría de estos estudios genéticos, se entiende la tolerancia de una cepa como la máxima concentración de etanol que permite su crecimiento. La cinética de inhibición (reducción del crecimiento por concentraciones crecientes de etanol) también varía ampliamente de unas cepas a otras (84) pero este aspecto de la tolerancia sólo se ha abordado desde un punto de vista fisiológico (84).

En este capítulo se analizan las bases genéticas de la mayor tolerancia a etanol de algunas levaduras vínicas, y se realiza una aproximación genética a la cinética de inhibición.

## Materiales y Métodos

### Organismos

Se utilizaron las siguientes cepas vínicas altamente tolerantes a etanol: FJF414, heterotálica y con genomio aproximadamente diploide (capítulo 2) y ACA21, cepa homotálica (capítulo 2). Las cepas FSP414/1 a FSP414/7, provienen de la cepa vínica FJF414, y fueron obtenidas por inducción de la esporulación y micromanipulación de tetradas. La cepa FDH1 se obtuvo por hibridación de la cepa genética D517-4B y FSP414/6. Como cepas de laboratorio, se emplearon D517-4B (MAT $\alpha$  ade2 lys9) y D273-11A (MATa adel his4).

### Determinación de la tolerancia

En las esporas protótrofas provenientes de la meiosis de la cepa ACA21 la tolerancia del crecimiento se determinó midiendo el tiempo medio de duplicación ( $\bar{T}$ ) durante el crecimiento exponencial en medio mínimo YNBDE (10%), según se describe en el capítulo 1. En las esporas auxótrofas provenientes de la meiosis de la cepa FJF414, la tolerancia se determinó de la misma forma, pero utilizando medio YPD con la concentración (v/v) indicada de etanol (YPDE (X%)).

### Estrategias para el análisis genético de la tolerancia

En ACA21 (homotálica), el análisis se realizó determinando la tolerancia de las esporas en dos generaciones sucesivas, sin cruzamientos. En FJF414 (heterotálica), se estudió la segregación del carácter mediante las técnicas de esporulación e hibridación descritas en el capítulo 2.

## Resultados

### Segregación de la tolerancia en la cepa homotálica ACA21

En la Fig. 3.1 se recogen los tiempos de generación obtenidos para el crecimiento en YNBDE (10%) en dos generaciones sucesivas de ACA21. Esta cepa altamente tolerante (tiempo de generación en YNBDE (10%) de  $7.3 \text{ h} \pm 1.3$  en 7 experimentos), produjo por



meiosis esporas con igual o peor crecimiento en etanol, lo que indica que existe en ella variabilidad genética para la tolerancia

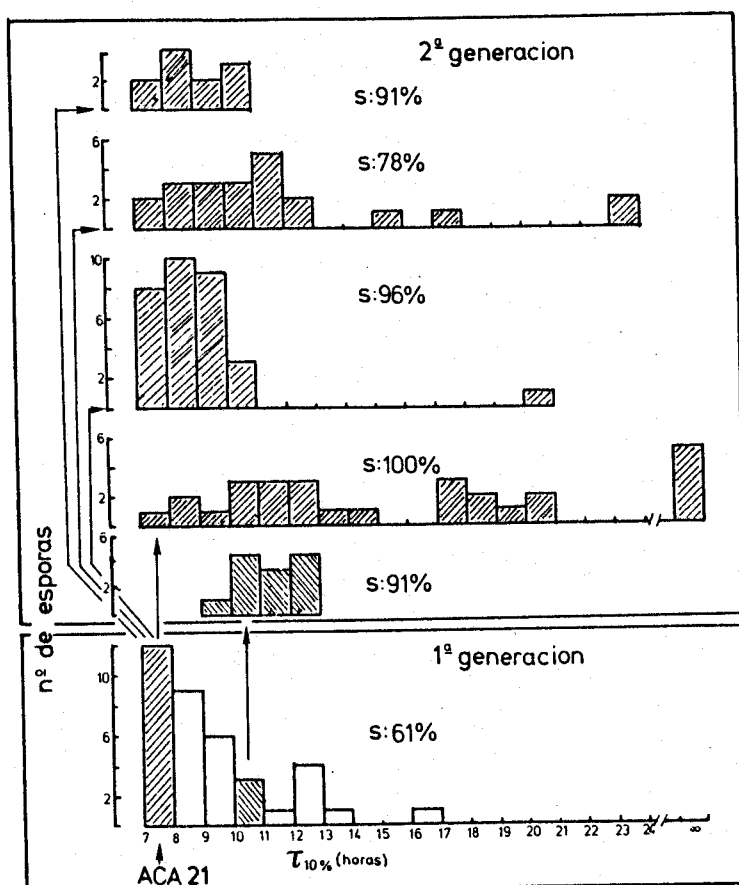


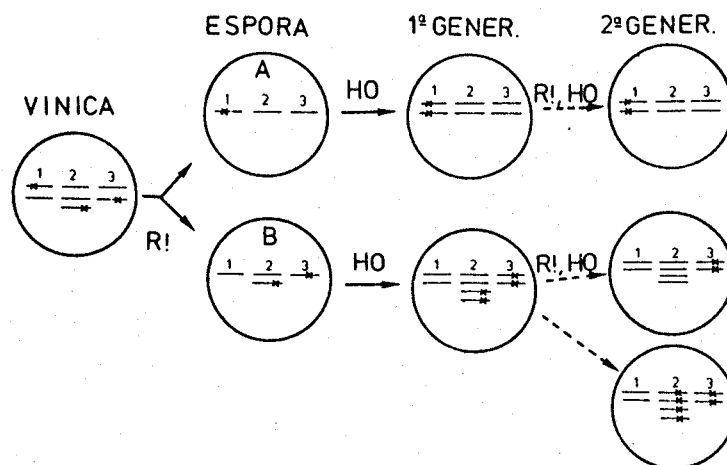
Figura 3.1. Tolerancia al etanol de las esporas de ACA21 en la 1ª generación y en la 2ª generación (productos meióticos de las esporas de la 1ª generación), agrupadas por similitud de tiempos de generación en YNBDE (10%) ( $\tau_{10\%}$ ). La flecha señala el grupo de esporas utilizadas para los distintos análisis en la 2ª generación. Se indica en cada caso la supervivencia obtenida ( $s$ ), así como el porcentaje de esporas viables/total de esporas aisladas.

El posterior estudio de la 1ª generación se hizo fundamentalmente con las esporas que presentaron una mayor tolerancia a etanol, ya que al ser ésta la característica más deseable, su modo de herencia era lo que más interesaba conocer. Debido al carácter homotático de la cepa, las esporas de esta primera generación serían ahora diploides y homocigóticas para todos sus genes nucleares. Sin embargo, como muestra la Fig. 3.1, cualquiera de estas esporas

vuelve a generar productos meióticos (esporas de la 2ª generación) iguales o peores que el parental.

Como se indicó anteriormente, el análisis se hizo con las esporas que presentaron una mayor tolerancia a etanol, por lo tanto es posible que al segregarse éstas no obtuvieran descendientes mejores porque tanto el parental como estas esporas ya han reunido la mejor combinación de genes posible para una alta tolerancia a etanol, de manera que dicha combinación no se puede mejorar por sólo meiosis. De hecho, cuando se analizaron descendientes de la 1ª generación de esporas que no eran los más tolerantes (Fig. 3.1:  $\gamma$  10-11 h), se obtuvo un pequeño porcentaje de esporas en la 2ª generación mejores que sus parentales, aunque la mayor parte fueron aún peores.

Como se esquematiza en la Fig. 3.2, la existencia de segregación nuclear en una cepa homotética durante dos generaciones, sólo es posible en el caso en que esta cepa vínica fuera aneuploide. Las aneuploidías inducen además alteraciones meióticas que reducen la viabilidad de las esporas (65), por lo que la baja viabilidad de las esporas de la 1ª generación podrían también ser consecuencia de la presencia de algunos cromosomas extras ( $2n+x$ ). Tras esta 1ª generación, los cromosomas de más se duplican (Fig. 3.2) por homotalismo, y ya pueden formar divalentes en la siguiente meiosis, con lo cual, las aneuploidías se estabilizan y los productos meióticos son más viables (65) en sucesivas generaciones. De hecho, la letalidad de las esporas en la 2ª generación (Fig. 3.1) es notablemente menor. Sin embargo, la variabilidad genética de la tolerancia llega incluso a aumentar, lo que sugiere que la segregación de la tolerancia estaría asociada a diferencias alélicas localizadas en estos cromosomas adicionales, y no a las aneuploidías por sí solas. De todas formas no es descartable una situación más compleja como por ejemplo, aneuploidía para varios cromosomas.



**Figura 3.2.** Esquema simplificado de una segregación nuclear esperada en una cepa homotálica, en dos generaciones consecutivas. Los números 1, 2 y 3 identifican tres cromosomas distintos (líneas) del núcleo de una cepa diploide, con una aneuploidía en el 2, en los que existen alelos de sensibilidad para el crecimiento en etanol (marcado con una x). La meiosis se representa como R! y la duplicación isogénica por homotalismo, como HO. En el caso en que esta cepa no fuera aneuploide (ver cromosomas 1 y 3), podría obtenerse segregación en la primera generación, pero ninguna espora generaría descendientes meióticos diferentes a ella. Sólo en caso de aneuploidía (ver cromosoma 2 en la espora B) la espora volvería a segregarse en la 2ª generación.

### Segregación de la tolerancia en la cepa heterotálica FJF414

El análisis de la tolerancia del crecimiento a etanol en la cepa de flor FJF414 se llevó a cabo en YPDE (12%) ya que se comprobó con anterioridad que a esta concentración de etanol todavía se detectaba un crecimiento razonable.

La cepa FJF414 también segregó para la tolerancia del crecimiento a etanol (Fig. 3.3), originando por meiosis esporas menos tolerantes que el parental FJF414 ( $\bar{T} = 18.8$  h) y esporas como FSP414/6 y FSP414/2 que mantuvieron una tolerancia parecida ( $\bar{T} = 22.0$  y  $22.5$  h respectivamente) a FJF414, muy superior a la tolerancia de las cepas de laboratorio D273-11A y D517-4B, que en estas condiciones fueron incapaces de crecer.

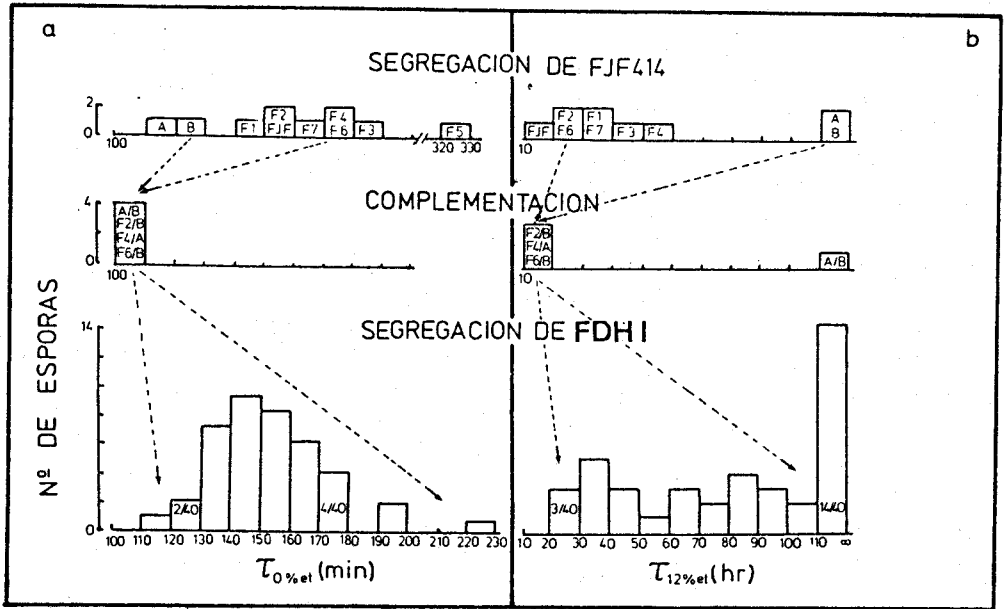


Figura 3.3. Tolerancia al etanol de las cepas de laboratorio D273-11A (A) y D517-4B (B), las esporas FSP414/1 a FSP414/7 (F1 a F7), derivadas de la cepa FJF414 (FJF) (Segregación de FJF414), de los híbridos entre estas esporas y las cepas de laboratorio ("complementación"), y de los productos meióticos del híbrido entre FSP414/6 y D517-4B ("segregación de FDH1"), agrupadas por similitud de tiempos de generación en YPD (a) y en YPDE (12%) (b).

El hecho de que también en YPD los productos meióticos de FJF414 crezcan peor que el parental podría indicar que están segregando alelos mórbidos no implicados en la tolerancia al etanol y que son los que son complementados por los de las cepas de laboratorio.

Los híbridos entre cualquiera de estas esporas descendientes de FJF414 con un cepa de laboratorio crecieron en YPDE (12%) algo mejor que su parental vínico FJF414 (Fig. 3.3, "complementación"). Esto indica nuevamente que en FJF414 hay genes con alelos recesivos en heterocigosis que confieren a las esporas menor tolerancia y/o mayor morbilidad que al parental FJF414.

El que estos híbridos fueran incluso algo más tolerantes que FJF414 ( $\bar{T}$  en algunos híbridos = 14-16 h frente a 18 h de FJF414) sugiere que los genes que determinan el nivel de tolerancia a etanol son distintos en las distintas cepas.

FSP414/6 es una de las esporas de FJF414 más tolerantes a etanol. El análisis de 40 esporas derivadas del híbrido FDH1, formado por conjugación entre FSP414/6 y D517-4B (Fig. 3.3), reveló que la diferencia genética, responsable de la distinta tolerancia entre ambas en YPDE (12%) parece venir determinada por un sistema poligénico. Otros autores han descrito un resultado similar obtenido con otras cepas (19, 21, 40). El número de genes implicados parece ser pequeño, posiblemente tres o cuatro, puesto que 3 de las 40 esporas mostraron una tolerancia similar a la del parental más tolerante, FSP414/6. (La frecuencia esperada de productos meióticos tan tolerantes como el parental más tolerante es de  $(1/2)^n$ , que es la probabilidad de que  $n$  alelos independientes de más tolerancia a etanol, segreguen juntos). Ningún producto meiótico alcanzó la tolerancia de FJF414 o la de los híbridos, lo que indica que alcanzar la tolerancia de esas cepas requiere un número superior de alelos que confieren tolerancia.

#### Cinética de inhibición del crecimiento por etanol

En ausencia de etanol, FJF414 tiene un crecimiento más lento que las demás cepas (Fig. 1.1). Este carácter también segrega entre sus esporas (Fig. 3.3). El hecho de que el crecimiento de estas esporas sea, en comparación con el de D517-4B más lento en medio sin etanol, pero más rápido en altas concentraciones de etanol, ofrece un buen sistema para abordar genéticamente la cinética de inhibición del crecimiento por etanol.

Como se muestra en la Fig. 3.3, los híbridos de estas esporas con D517-4B o D273-11A e incluso el diploide D517-4B/D273-11A crecieron en YPD más rápidamente que el parental más rápido, lo que parece indicar que en todas ellas existen alelos recesivos que afectan a la velocidad de crecimiento y que su efecto puede ser complementado en un híbrido. La segregación del tiempo de generación observada entre las esporas del híbrido FDH1 (FSP414/6/D517-4B) indica que la velocidad del crecimiento en YPD de estas cepas está determinada por más de un gen.

El mismo efecto se observa para el crecimiento en YPDE (12%). Ambos caracteres resultan ser independientes (Fig. 3.4), lo que indica que las funciones que limitan el crecimiento son distintas en ambas condiciones.

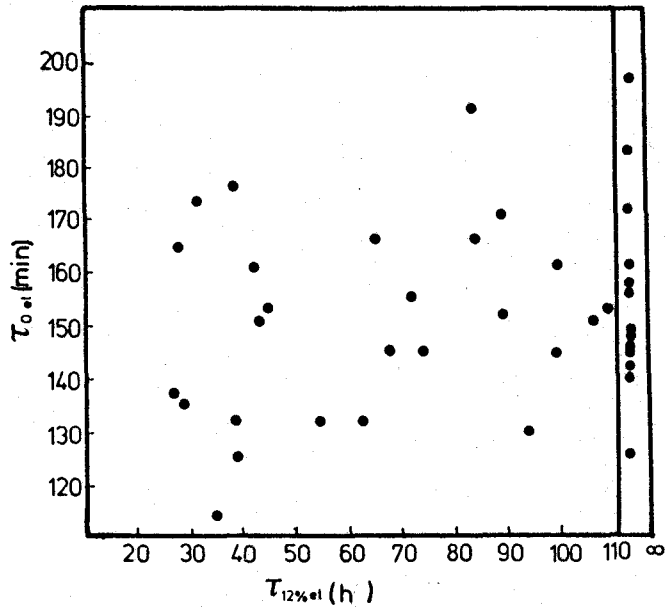


Figura 3.4. Relación entre los tiempos de generación en YPD sin etanol ( $\tau_{0\% \text{ et}}$ ) y en YPDE (12%) ( $\tau_{12\% \text{ et}}$ ), de 40 esporas del híbrido FSP414/6/D517-4B.

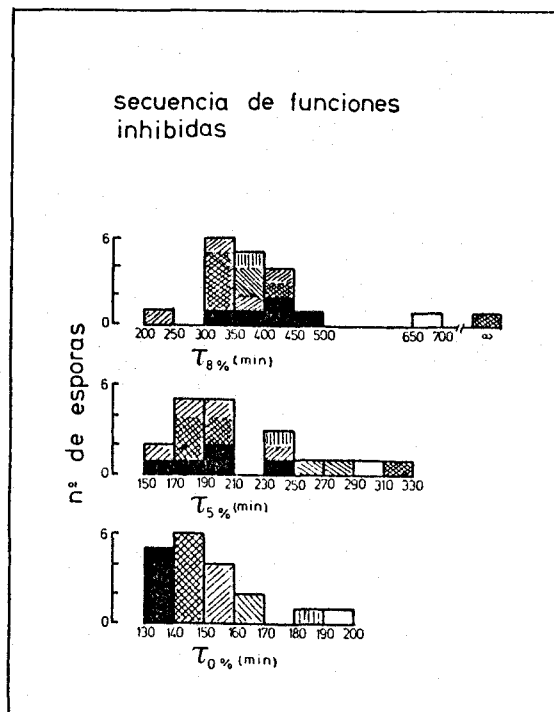


Figura 3.5. Tolerancia al etanol del crecimiento de 20 esporas (5 tetradas) del híbrido FDH1 en YPD ( $\tau_{0\%}$ ), YPDE (5%) ( $\tau_{5\%}$ ) y en YPDE (8%) ( $\tau_{8\%}$ ). Los distintos grupos de la distribución en YPD se marcan de distinta forma para seguir la secuencia de la inhibición en etanol.

Se analizó detenidamente el crecimiento de 20 de las esporas (5 tetradas) del híbrido FDH1 en medios con 0, 5, 8 y 12% de etanol y se observó que también en 5 y 8% de etanol son varios los genes que determinan las diferencias de crecimiento (Fig. 3.5). Sin embargo, los genes que determinan estas diferencias en 5% de etanol son distintos a los que lo hacen en 8% de etanol, y a la vez, distintos de los que determinan el crecimiento sin etanol, o con 12% de etanol (Fig. 3.4 y 3.6). En consecuencia, las funciones que limitan el crecimiento son distintas en ausencia y presencia de etanol, así como en diferentes concentraciones del mismo.

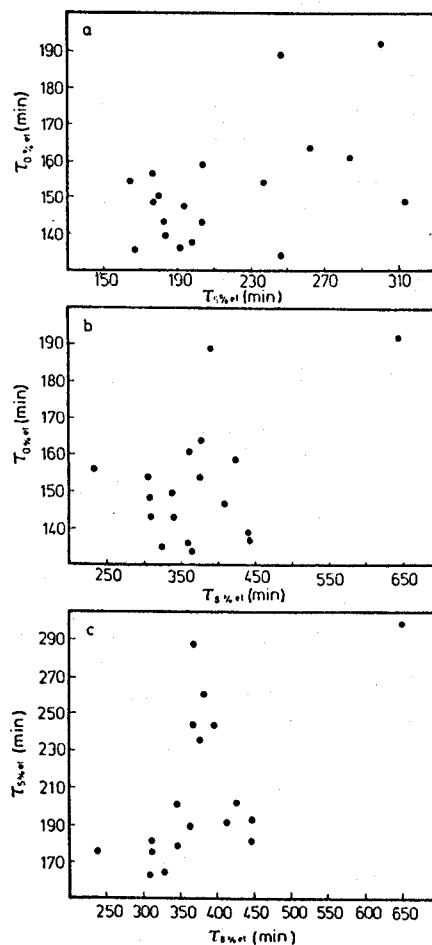


Figura 3.6. Relación entre los tiempos de generación en YPD (0%) e YPDE (5%) (T<sub>5%</sub>) (a), entre YPD e YPDE (8%) (T<sub>8%</sub>) (b) y entre YPDE (5%) e YPDE (8%) (c), de los productos meióticos de 20 esporas (5 tetradas) del híbrido FDH1.

## D i s c u s i ó n

Las cepas vínicas analizadas son altamente polimórficas para el carácter tolerancia a etanol (Fig. 3.1 y 3.3). Esta variabilidad genética da lugar a una segregación para este carácter en la primera generación de ACA21, que hace ineficaz el uso de técnicas de cruzamiento y análisis genético, previamente descritas para cepas homotáticas (capítulo 2), ya que al ser un método aleatorio de hibridación, no se conoce la tolerancia de la espora que hibrida.

El análisis del carácter en sucesivas generaciones de cepas homotáticas (Fig. 3.2) ha determinado que la presencia simultánea de aneuploidías y alelos recesivos, capaces de generar una menor tolerancia, dan lugar a una segregación como la encontrada en la segunda generación de ACA21 (Fig. 3.1).

En la cepa FJF414, la viabilidad fué menor, pero en este caso la presencia de alelos letales recesivos (capítulo 2) parece más probable que la existencia de alteraciones numéricas. Las esporas de FJF414 fueron más sensibles a etanol que el parental, aunque algunas como FSP414/6 mantuvieron un alto nivel de tolerancia, suficiente para permitir un análisis comparativo con las cepas de laboratorio. Los híbridos fueron sistemáticamente más tolerantes que los parentales (Fig. 3.3), e incluso que FJF414, lo que indica que posiblemente sean distintas las funciones que limitan el crecimiento en etanol en cepas no consanguíneas. De ahí que en la práctica, la hibridación haya resultado un método eficaz en la obtención de cepas más tolerantes que los parentales (40, 73).

La segregación (tolerancia de los productos meióticos) del híbrido FDH1, indicó que la diferencia de tolerancia entre los parentales podría deberse a un número pequeño de genes, quizás 3 ó 4. Con un sistema apropiado de mutagénesis y selección continua (13) se podría conseguir que una cepa de laboratorio alcanzara un nivel de tolerancia como el de FSP414/6. Sin embargo, los genes implicados en determinar un nivel de tolerancia similar al de FJF414 o al de los híbridos son muchos más, lo que haría inviable la obtención de cepas con tolerancia mucho mayor por mutagénesis y selección. El que estos



genes que delimitan el nivel de tolerancia sean muchos, pero distintos en cepas no consanguíneas, hacen que la hibridación sea posiblemente el método más eficaz para mejorar la tolerancia a etanol de una cepa.

La distinta cinética de inhibición mostrada por FSP414/6 y D517-4B, reveló que los genes que limitan el crecimiento son distintos en distintas concentraciones de etanol (Fig. 3.4 y 3.6), lo que indica que la cinética de inhibición es el resultado de la inhibición de distintas funciones a distintas concentraciones de etanol, y no consecuencia de la inhibición de las mismas funciones que limitan el crecimiento en ausencia de etanol.

## CAPITULO 4

### HERENCIA EXTRANUCLEAR DE LA TOLERANCIA AL ETANOL

#### I n t r o d u c c i ó n

Existen evidencias de que en levaduras la causa principal de la mortalidad producida por el etanol o por altas temperaturas podría ser la inhibición de funciones localizadas en la membrana interna de la mitocondria (para revisión ver (85)). La capacidad del etanol de interaccionar con las membranas es un hecho bien conocido (38). Las membranas mitocondriales, especialmente la membrana interna, poseen pocos esterolés (12), lo que supone una desventaja respecto de otras membranas frente a la acción del etanol (39) y podría hacer de las mismas un punto crítico para la tolerancia.

Las funciones mitocondriales están mayoritariamente determinadas por genes nucleares. Sólo un pequeño porcentaje lo están por el genomio mitocondrial (11,24). Sin embargo, existen numerosas pruebas a favor de la implicación del genomio mitocondrial en la tolerancia del crecimiento y la supervivencia en medio con etanol (2,7). De hecho, el etanol actúa como un mutágeno específico del ADN mitocondrial, dando lugar a mutantes [rho-], es decir, mutantes que poseen mitocondrias no funcionales y por lo tanto de fenotipo "petite" (7) debido a deleciones del genomio mitocondrial (7). La frecuencia de aparición de estos mutantes está directamente relacionada con la letalidad (15), lo que sugiere que la muerte celular por etanol tiene de alguna forma su origen en las mitocondrias.

El efecto inhibitorio del etanol se sabe que es mayor en mutantes [rho-] que en el silvestre [rho+] (2,7). Está descrita en la literatura (2) que la presencia de mitocondrias funcionales y de metabolismo oxidativo es esencial para mantener niveles bajos de inhibición por etanol de parámetros tales como tasas de crecimiento, de fermentación o de respiración.

El crecimiento celular se ajusta a una curva exponencial, de forma que el número de células existentes tras un tiempo  $t$ ,  $x_t$  aumenta respecto al inicial,  $x_0$ , de acuerdo con la ecuación  $\ln x_t = \ln x_0 + \mu t$  (66). Esta expresión se aplica para determinar empíricamente el valor de  $\mu$ , pero esta tasa empírica puede descomponerse en dos parámetros fisiológicos distintos, la tasa específica de crecimiento,  $\mu_c$ , y la tasa específica de muerte,  $\mu_d$ , de forma que  $\mu = \mu_c - \mu_d$  (66). En condiciones óptimas de crecimiento,  $\mu_d \ll \mu_c$  y  $\mu = \mu_c$ . Sin embargo, en condiciones extremas de alta temperatura y altas concentraciones de etanol,  $\mu_c \ll \mu_d$  y  $\mu = -\mu_d$ , y por lo tanto, las células viables decrecen de acuerdo con la expresión  $\ln x_t = \ln x_0 - \mu_d t$  (85). Este incremento de la muerte celular es en parte la causa de que en presencia de etanol, disminuya la tasa de crecimiento. El hecho de que el aumento de la tasa de muerte vaya en paralelo con un aumento de la frecuencia de mutantes "petite" (15) y el hecho de que la inhibición por etanol de mutantes "petite" sea mayor que en cepas con mitocondrias funcionales (2,7) apuntan de nuevo a las mitocondrias como origen de la muerte producida por etanol (85).

Existen funciones mitocondriales que podrían ser objeto preferencial de la acción inhibitoria del etanol, por ejemplo, algunas de las subunidades de la ATPasa mitocondrial. Es bien conocida además la capacidad del etanol de actuar sobre otras ATPasas celulares, mediante alteración de sus lípidos circundantes (28). La cadena respiratoria también posee algunas proteínas o subunidades de proteínas codificadas por el ADN mitocondrial, y ya se indicó que la capacidad respiratoria es muy importante en la tolerancia al etanol (2) y puede modificarse por transferencia del genomio mitocondrial de otra célula (2, 57).

Las mutaciones  $[\rho^-]$  están fisiológicamente asociadas a la letalidad por etanol (15) como se indicó anteriormente. Por otra parte, la frecuencia espontánea de mutantes  $[\rho^-]$  depende específicamente de determinadas secuencias del ADN mitocondrial (17,87) y de la funcionalidad de determinadas proteínas mitocondriales (57), algunas de las

cuáles están codificadas en este ADN. En consecuencia, aunque el genomio mitocondrial codifica pocas proteínas, la existencia de secuencias específicas en dicho genomio podría ser un elemento importante en la tolerancia de una célula a etanol.

En este capítulo se estudia la influencia de la información genética extranuclear en la tolerancia a etanol, y se determina el efecto que tiene la transferencia de información genética extranuclear de cepas altamente tolerantes, a cepas de laboratorio más sensibles a etanol. Para ello, se han utilizado mutaciones descritas en Sacch. cerevisiae que hacen que durante el ciclo sexual de esta levadura, las células fundan sus citoplasmas, pero los núcleos no lleguen a fundirse (18). Cuando se realizan cruces en el que uno de los conjugantes lleva una de estas mutaciones denominada kar (18) el resultado es un cigoto dicariótico que gema y da lugar tras sucesivas mitosis a algunas células que llevan los dos núcleos (heterocarionte) y a una mayoría de células que llevan uno u otro de los núcleos y el citoplasma mezclado de ambos parentales (heteroplasmonte) (18). La utilización de cepas que llevan la mutación kar y el aislamiento de heteroplasmontes ha sido enormemente útil en éste y otros trabajos (2, 60) para estudiar separadamente la herencia nuclear y citoplásmica de un carácter (2).

## Materiales y Métodos

### Organismos

Las cepas utilizadas en este capítulo, descritas en el apéndice I, fueron las siguientes: cepas vínicas ACA4, ACA21, ACA174, IFI82, IFI256, y las cepas de flor FJF206 y FJF414, junto con FSP414/6, procedente de la meiosis de FJF414, y FDH1, híbrido de FSP414/6 y la cepa de laboratorio D517-4B (capítulos 2 y 3). Como controles genéticos, se utilizaron las cepas ABQ21 y K5-5A, portadoras de mutaciones kar, y la cepa ES6. Finalmente, como control industrial se utilizó la cepa RBY-D5A.

### Obtención de mutantes "petite"

Los mutantes "petite" se indujeron con bromuro de etidio (7). Se colocó una gota de una solución de 10 µg/ml de bromuro de etidio en agua sobre una caja con YPD, sembrada con un césped de células. Al cabo de 4 días se observaba un halo o círculo de inhibición del crecimiento en el lugar en el que se había colocado la gota. La incubación se realizaba a 30°C y en oscuridad. Se tomó biomasa de la zona de crecimiento más próxima al halo, y se extendió sobre una caja con YPD para aislar colonias. De entre ellas, se seleccionaron las que no crecieron en medio YPG (fenotipo "petite"). Estos mutantes "petite" fueron caracterizados como mutantes mitocondriales [rho-] por experimentos de formación de heteroplasmontes, que se describirán posteriormente, y por su incapacidad de revertir al fenotipo silvestre [rho+].

### Transferencia de mitocondrias de la cepa vínica ACA21 a la cepa de laboratorio ABQ21.

En la Fig. 4.1 se esquematiza el procedimiento empleado basado en el uso de la mutación kar1 de ABQ21 que, como se indicó en la Introducción, permite por conjugación la mezcla de citoplasmas celulares sin fusión de núcleos (18). Esporas de ACA21 (ver "Esporulación y Digestión de Ascas" en el capítulo 2) se mezclaron en una caja con YPD y células de un mutante [rho-] (inducido con bromuro de etidio) de ABQ21 (MAT $\alpha$  kar1-2 can<sup>r</sup> nys<sup>r</sup> his4 $\Delta$ -15 ade2-1) en proporciones 1:3. La mezcla se incubó a 30°C durante 6 h para permitir la

conjugación y se sembró en medio YPDG y suplementado con adenina, histidina, canavanina y nistatina. El medio se tamponó con un 10% de tampón citrato-fosfato 1 M pH 6.5 (27). Las cajas se incubaron a 30°C durante 4-5 días. Las colonias que crecieron en este medio selectivo fueron aquellas que tenían el núcleo de ABQ21, pero el genomio mitocondrial de ACA21. Se seleccionó una de ellas, a la que se le denominó en adelante como ABQ21-H1.

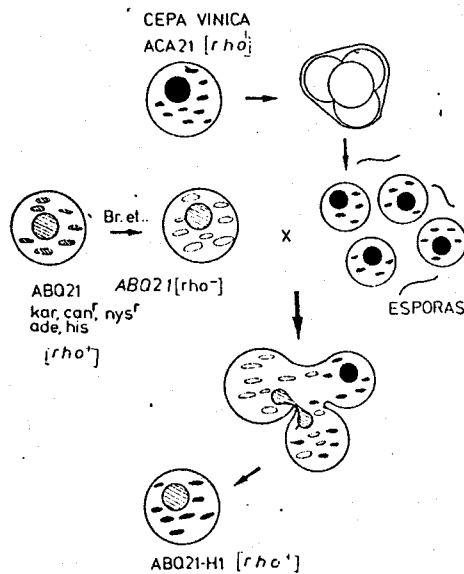


Figura 4.1. Construcción de la cepa ABQ21-H1 que contiene el núcleo de ABQ21 y las mitocondrias de ACA21

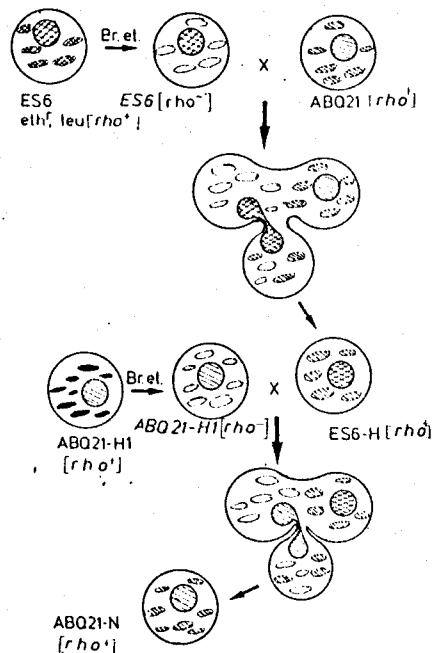


Figura 4.2. Construcción de la cepa ABQ21-N, similar nuclear y extranuclearmente a la ABQ21, mediante transferencia de mitocondrias desde ABQ21 a ABQ21-H1. Como intermediaria se utilizó la cepa ES6 [rho<sup>-</sup>]. (El proceso se repitió 3 veces).

Este método se empleó también para transferir mitocondrias de las demás cepas vínicas a la cepa K5-5A (MAT $\alpha$  karl-1 his4 $\Delta$ -15 ade2-1 can1), usando el mismo medio selectivo sin nistatina.

#### Recuperación de mitocondrias de ABQ21 en la cepa ABQ21-H1

El procedimiento se representa en la Fig. 4.2. Se basó también en la mutación karl de ABQ21 y ABQ21-H1, y se utilizó como intermedio un mutante "petite" de la cepa ES6 (MATa eth<sup>R</sup> leu2-1). En primer lugar se construyó la cepa ES6-H que contiene el núcleo de ES6 y las mitocondrias de ABQ21. Para ello se utilizó el método descrito en el apartado anterior con la diferencia de que el medio selectivo se suplementaba con etionina y leucina. A continuación se transfirieron las mitocondrias de ES6-H a un mutante [rho-] (inducido con bromuro de etidio) de ABQ21-H1. La selección se realizó en el mismo medio ya descrito para la selección de ABQ21-H1 y la cepa así obtenida se denominó ABQ21-N.

#### Crecimiento en etanol

El tiempo de generación se determinó según se describió en el capítulo 1 en cultivos con medio YPD o YPDE con la concentración de etanol indicada en cada caso.

De cada cultivo, se aislaron colonias en cajas de YPD y se determinó por réplica en YPG la proporción de ellas (%) que eran mutantes [rho-] ("petites").

#### Viabilidad en etanol

Matraces con 200 ml de medio YPDE con la concentración de etanol indicada en cada caso, se colocaron con agitación magnética en un baño con agua, regulado a 38°C, temperatura máxima de crecimiento de la cepa ABQ21 (ver más adelante). Una vez alcanzada la temperatura de 38°C, los matraces se inocularon con  $5 \times 10^5$  células de un cultivo exponencial ( $\sim 10^7$  cel/ml) en YPD. El número medio de células

viables, medido como unidades formadoras de colonias, a lo largo del tiempo se determinó sembrando a intervalos cortos de tiempo cajas que contenían YPD a razón de 0.1 ml de cultivo/caja y de 3 cajas por cada cultivo. Tras 4-5 días de incubación a 25°C se contaba el número de colonias crecidas. La proporción de colonias incapaces de crecer en YPG determinó el porcentaje de mutantes "petite".

#### Temperatura máxima de crecimiento

Matraces con 150 ml de medio YPD ó YPDE con la concentración de etanol indicada en cada caso, se inocularon con 3 ml de un cultivo en YPD en fase estacionaria temprana ( $2 \times 10^8$  cel/ml). Las suspensiones así obtenidas se distribuyeron en tubos de cultivo con forma de L a razón de 10 ml/tubo. Los tubos se taparon con tapón de goma y se incubaron con agitación en un incubador con gradiente de temperatura (modelo TN-3, Toyo Kagaku Sangio, Tokio, Japón), ajustado para generar un gradiente continuo entre 18 y 46°C, con un incremento máximo de 0.75°C de uno a otro tubo. A los 7 días de incubación se determinó en los cultivos el incremento en absorbancia a 660 nm en un Spectronic 20 (Bausch & Lomb, Bélgica) y se colocó una gota de cada uno en medio YPD, estimándose así la temperatura máxima (T<sub>máx.</sub>) a la que había crecimiento, y la máxima a la que aún quedaban células vivas (la supervivencia de una célula definida como la capacidad de ésta de formar una colonia).

### R e s u l t a d o s

#### Influencia del genomio mitocondrial en la tolerancia del crecimiento a etanol.

Según se deduce de la Fig. 4.3, la cepa vínica ACA21 crece mejor que ABQ21 a cualquier concentración de etanol. La transferencia de información genética mitocondrial de ACA21 a ABQ21 mejora notablemente la tolerancia de esta cepa. Esta mejora es más acentuada cuanto más alta es la concentración de etanol utilizada pero en ningún caso se alcanzan los valores de la cepa ACA21. Los resultados indican que la tolerancia al etanol depende principalmente de genes nucleares pero también depende de genes extranucleares.



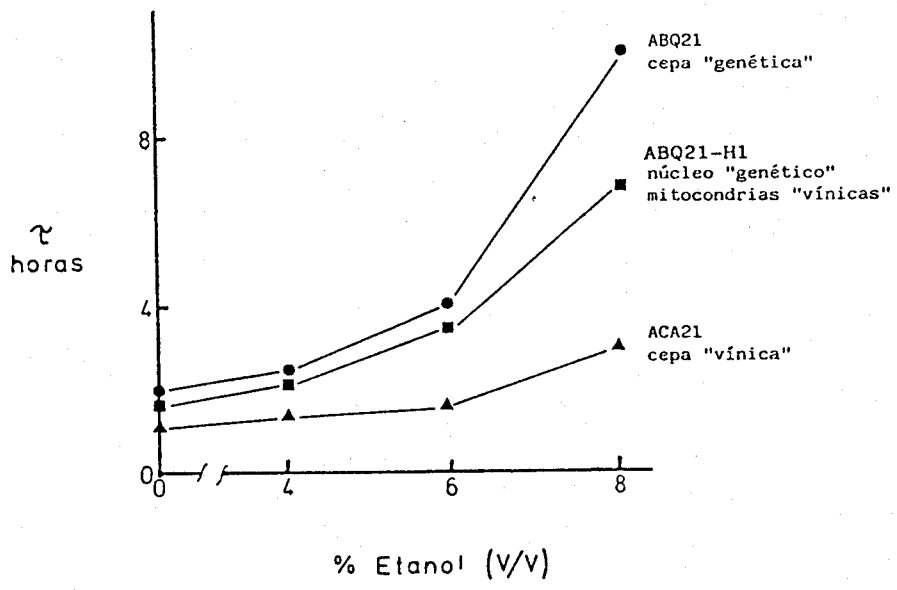


Figura 4.3. Tiempo de generación ( $\tau$ ) en medio YPDE con la concentración indicada de etanol en las cepas ABQ21 (●), ACA21 (▲) y el heteroplasmonte ABQ21-H1 (■), a 30°C.

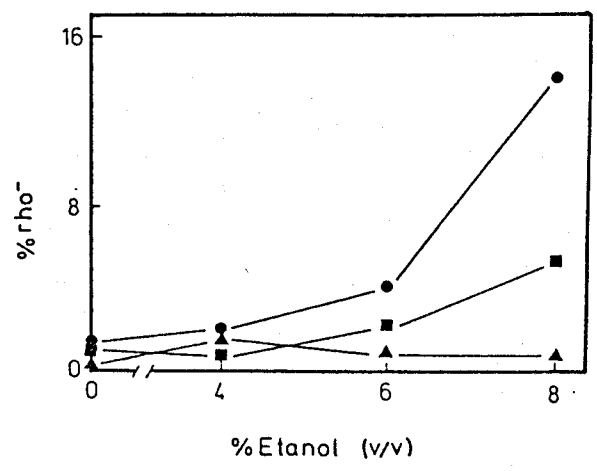


Figura 4.4. Frecuencia de mutantes "petite" inducidos por etanol durante el crecimiento en medio YPDE con las concentraciones indicadas de etanol en las cepas ABQ21 (●), ACA21 (▲) y el heteroplasmonte ABQ21-H1 (■), a 30°C.

Tolerancia a etanol y frecuencia de formación de mutantes "petite" inducidos por etanol

El etanol es un potente inductor de mutaciones [rho-] en el ADN mitocondrial de levaduras. Sin embargo, ACA21, cepa vínica muy tolerante a etanol, resultó tener una resistencia superior a este efecto mutagénico que ABQ21, cepa genética más sensible a etanol (Fig. 4.4). Esta propiedad también se /\_transfería,

al menos parcialmente, al transferir a ABQ21 la información genética extranuclear de ACA21 (Fig. 4.4), por lo que ambas características, resistencia del crecimiento a etanol y al efecto mutagénico, deben estar asociadas al ADN mitocondrial.

#### Influencia del genomio mitocondrial en la viabilidad celular en etanol y altas temperaturas

En condiciones extremas, de 38°C y en medio con 4 a 8% de etanol, la viabilidad celular de un cultivo de ABQ21 decrece exponencialmente (Fig. 4.5A) con un aumento equivalente en la proporción de mutantes "petite" (Fig. 4.5B), lo que permite, a partir de la expresión  $\ln x_t = \ln x_o - \mu_d t$  (40) (ver Introducción de este capítulo), obtener una estimación de la tasa de muerte,  $\mu_d$ , así como de la tasa de mutación,  $\lambda$  [ $\ln (\% \text{ rho-})_t = \ln (\% \text{ rho-})_o + \lambda t$ ] para cada concentración de etanol. Tanto  $\mu_d$  como  $\lambda$  aumentaron exponencialmente con la concentración de etanol en ACA21 y ABQ21 (Fig. 4.7)

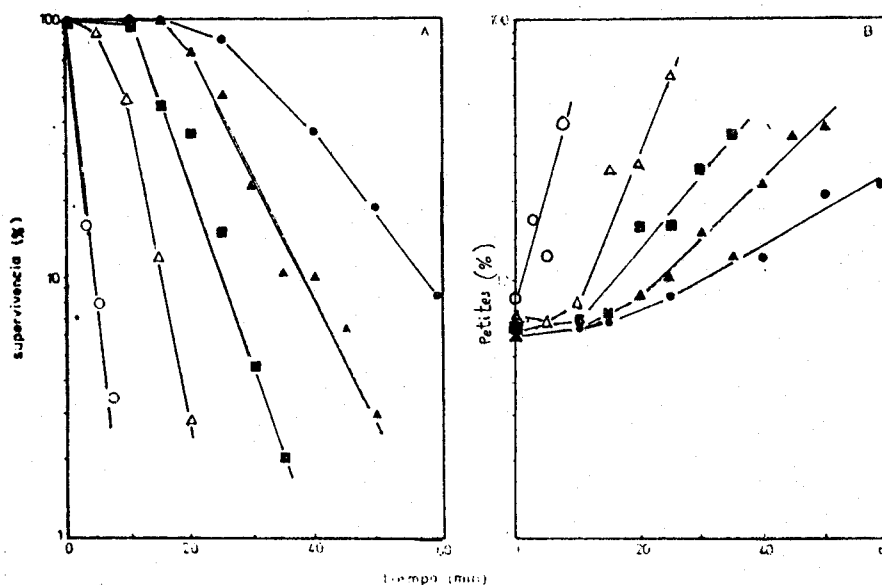


Figura 4.5. Supervivencia (A) y frecuencia de mutantes "petite" (B) en medio YPDE con 4 (●), 5 (▲), 6 (■), 7 (△) y 8% de etanol (p/v) a 38°C, en la cepa ABQ21.

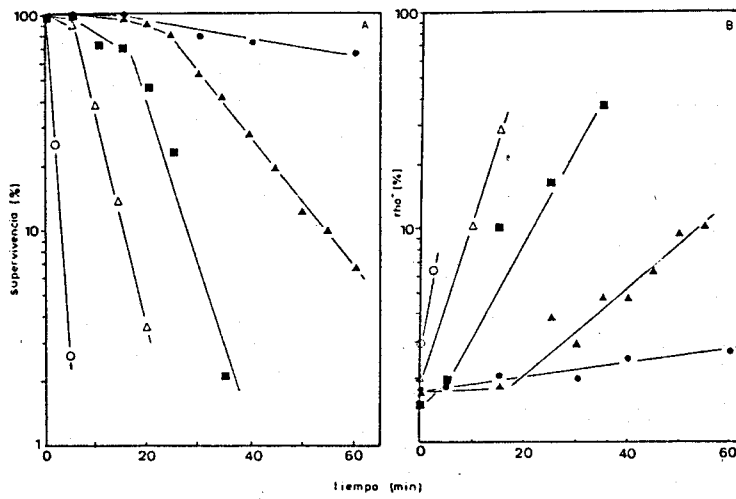


Figura 4.6. Supervivencia (A) y frecuencia de formación de mutantes "petite" (B) en medio YPDE con 4 (●), 5 (▲), 6 (■), 7 (△) y 8% (○) (p/v) etanol a 38°C en la cepa ABQ21-H1.

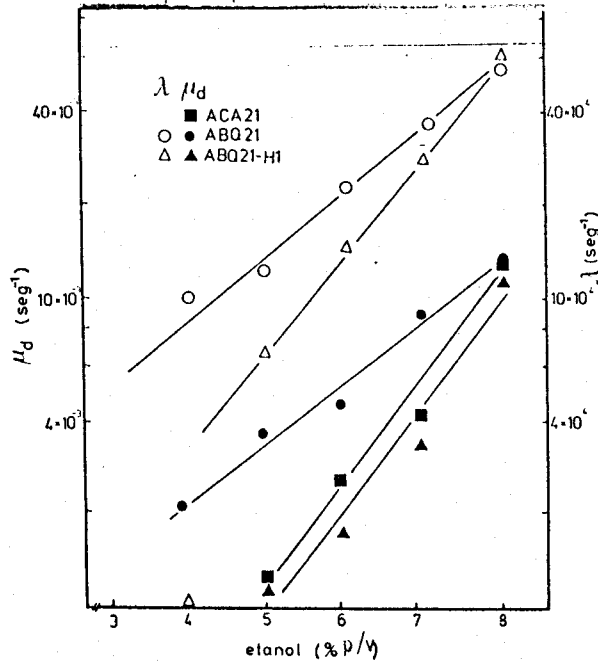


Figura 4.7. Tasa de muerte,  $\mu_d$  (símbolos llenos) y tasa de formación ( $\lambda$ ) de mutantes "petite" (símbolos abiertos) en medio YPDE con la concentración indicada de etanol, a 38°C en las cepas ABQ21 (●, ○), ABQ21-H1 (▲, △) y la cepa vínica ACA 21 (■). Valor medio de tres experimentos independientes.

Experimentos similares realizados con la cepa ABQ21-H1 y cuyos resultados globales se reflejan en la Fig. 4.6, mostraron que su comportamiento respecto de estos dos parámetros era idéntico al de ACA21 y, por lo tanto, distinto al de ABQ21 (Fig. 4.7). De estos resultados se deduce que la supervivencia y la resistencia al efecto mutagénico del etanol son parámetros asociados y dependientes del ADN mitocondrial. La diferencia observada entre las distintas cepas desaparece en concentraciones próximas a 2 M de etanol (12% v/v), posiblemente porque en estas condiciones, ACA21 también posee mitocondrias no funcionales.

De los resultados también se deduce que los dos componentes fisiológicos de la tasa empírica de crecimiento,  $\mu$ , la tasa específica de crecimiento,  $\mu_c$ , y la tasa específica de muerte,  $\mu_d$ , tienen distinta base genética ya que los valores de  $\mu_d$  vienen determinados exclusivamente por genes extranucleares (Fig. 4.7) mientras que los de  $\mu_c$ , están determinados fundamentalmente por genes nucleares (Fig. 4.3).

#### Influencia de la naturaleza del genomio mitocondrial sobre la temperatura máxima de crecimiento, $T_{m\acute{a}x}$ , en presencia y ausencia de etanol

En situaciones experimentales donde existe muerte celular, el valor de  $\mu_d$  repercute en el crecimiento ( $\mu = \mu_c - \mu_d$ ), de manera que posiblemente esta sea la causa principal de las diferencias en tasa de crecimiento,  $\mu$ , entre ABQ21 y ABQ21-H1 (Fig. 4.3). Cuando se extreman las condiciones,  $\mu_d$  aumenta y cuando  $\mu_c - \mu_d$  se hace menor que 0, no se obtiene crecimiento. La temperatura máxima de crecimiento,  $T_{m\acute{a}x}$ , en ausencia y presencia de etanol, parece estar determinada por esta situación (85). Para comprobar esta hipótesis se hicieron una serie de experimentos midiendo  $T_{m\acute{a}x}$  de crecimiento en YPD e YPDE con la concentración de etanol indicada en cada caso, según se describió en Materiales y Métodos. La Tabla 4.1 muestra que, en ausencia de etanol, en ABQ21 no se observó crecimiento por encima de 38°C aunque hubo células viables hasta 42°C.

Tabla 4.1. Temperatura máxima de crecimiento y de supervivencia ( $^{\circ}\text{C}$ ) en YPD e YPDE con la concentración de etanol\* indicada en cada caso en las cepas ABQ21, ACA21 y el heteroplasmonte ABQ21-H1.

Cepa	Medio							
	YPD		YPDE (5%)		YPDE (7.5%)		YPDE (10%)	
	T <sub>máx</sub> Crecim.	T <sub>máx</sub> Superv.	T <sub>máx</sub> Crecim.	T <sub>máx</sub> Superv.	T <sub>máx</sub> Crecim.	T <sub>máx</sub> Superv.	T <sub>máx</sub> Crecim.	T <sub>máx</sub> Superv.
ABQ21	38.0	42.0	34.0	36.5	30.0	31.0	25.0	27.5
ACA21	40.5	≥46.0	ND	ND	ND	ND	28.7	ND
ABQ21-H1	40.5	≥46.0	35.0	37.5	30.7	32.0	25.5	27.7

ND = no determinado

Valores medios de dos experimentos independientes

\*  
% p/v

La transferencia de mitocondrias de ACA21 a esta cepa elevó la temperatura a la que se observaban células viables a más de  $46^{\circ}\text{C}$  con un aumento paralelo en la temperatura máxima de crecimiento, T<sub>máx</sub>, hasta alcanzar valores idénticos a los de ACA21.

Así pues, en ABQ21 la T<sub>máx</sub> en ausencia de etanol viene determinada por un equilibrio entre  $\mu_d$  y  $\mu_c$ , donde  $\mu_d = \mu_c$ , ambos distintos de 0. En presencia de etanol, el efecto fué en cierto modo similar al descrito para los cultivos en ausencia de etanol, aunque según aumentaba la concentración de etanol, las diferencias de temperatura máxima, T<sub>máx</sub> para crecimiento y supervivencia entre las cepas ABQ21 y el heteroplasmonte ABQ21-H1 fueron haciéndose cada vez menor (Tabla 4.1). En YPDE (10%) como caso extremo, la T<sub>máx</sub> aumentó simultáneamente para el crecimiento y la supervivencia en ABQ21-H1, aunque quedó muy lejos de alcanzar los valores de ACA21. Este resultado indicaría que, junto con el genomio mitocondrial, el etanol podría afectar también funciones nucleares que contribuyan a aumentar la tasa de muerte,  $\mu_d$ , en estas condiciones no extremas de temperatura (68).

### Inducción de mutantes "petite" por otros solventes

Como se ha mencionado anteriormente, el mecanismo de acción del etanol sobre los sistemas biológicos está íntimamente asociado a su capacidad de interaccionar con las membranas (38,72). Consecuentemente, otros agentes capaces de interaccionar con membranas, tales como el ter-butanol, isopropanol, etc deberían tener un efecto similar al del etanol. Con el fin de estudiar si esta deducción es cierta, se llevaron a cabo una serie de experimentos sembrando células crecidas hasta fase estacionaria en YPD a 30°C, en cajas que contenían YPD suplementadas con distintos solventes (ter-butanol, isopropanol, etanol y SDS) a las concentraciones finales (% v/v) limitantes para el crecimiento que previamente se habían determinado, y que aparecen indicadas en la Tabla 4.2. Para cada solvente, se calculó la frecuencia de aparición de mutantes "petite" (ver Materiales y Métodos) así como la supervivencia en estas condiciones.

Tabla 4.2 . Porcentaje de mutantes "petite" inducidos por distintos solventes orgánicos a concentraciones extremas para el crecimiento.

Cepa	Frecuencia de "petites" (%)				
	Espontánea	3% Ter-butanol	3% Isopropanol	10% etanol	0.1% SDS
ABQ21	2.4 ± 0.9	4.9 ± 0.8	3.1 ± 0.6	21.7 ± 3.5	N.C.
ABQ21-H1	1.0 ± 0.4	2.4 ± 1.0	0.6 ± 0.3	10.8 ± 2.9	N.C.
ABQ21-N	2.7 ± 0.9	4.1 ± 1.2	2.8 ± 1.0	17.3 ± 3.8	N.C.
K5-5A	5.5 ± 0.4	18.7 ± 9.0	6.3 ± 1.2	21.1 ± 3.4	86.0 ± 7.5
IFI256	0.3 ± 0.2	3.4 ± 2.3	1.6 ± 1.8	3.2 ± 1.5	N.C.

NC = no crecimiento

Los valores representan la media y desviación típica de 4 experimentos independientes, en el que se contaron entre 500-1000 colonias para cada estimación.

Los resultados obtenidos (Tabla 4.2) indicaron que otros compuestos de carácter apolar, como los ya descritos ter-butanol, isopropanol o SDS (dodecil sulfato sódico) y en concentraciones extremas para el crecimiento, también inducen en distintas cepas

un aumento de la proporción de mutantes "petite", aunque, con la excepción del SDS y de la cepa K5-5A, el efecto fué mucho menor que el obtenido con etanol. El hecho de que otros solventes de membrana también induzcan mutantes "petite", aunque en menor grado que el etanol, podría interpretarse como que el efecto mutagénico de estos compuestos sobre el ADN mitocondrial es la consecuencia del efecto que ejercen sobre la membrana mitocondrial.

La proporción de mutantes "petite" obtenida fué menor en ABQ21 con información genética mitocondrial de ACA21 (ABQ21-H1) y revertió prácticamente al nivel normal cuando esta cepa recuperó su propia información genética extranuclear (ABQ21-N), por lo que el aumento de la resistencia de la cepa a la inducción de mutantes "petite" por otros solventes también parece depender, como ocurría con el etanol, del genomio extranuclear. No obstante y como se indicó anteriormente, los resultados obtenidos con otros solventes fueron mucho menos contundentes que los que se obtuvieron con etanol.

#### Inducción por etanol de mutantes "petite" en diversas cepas vínicas

Con el fin de comprobar si la baja frecuencia de formación de "petites" en ausencia y presencia de etanol observada en ACA21, cepa altamente tolerante a etanol, era una propiedad exclusiva de esta cepa o por el contrario era consecuencia directa de una alta tolerancia a etanol, experimentos similares a los descritos para la cepa ACA21 se hicieron con otras cepas vínicas, utilizando como control la cepa de laboratorio K5-5A. Paralelamente, se hicieron experimentos de transferencia de mitocondrias desde estas cepas vínicas a la cepa de laboratorio K5-5A, a fin de comprobar si, como ocurría con ABQ21, la transferencia de mitocondrias de una cepa tolerante (cepas vínicas) a una sensible (K5-5A) se traducía en una disminución de la frecuencia de formación de "petites" en ausencia y presencia de etanol.

Tabla 4.3. Porcentaje de mutantes "petite" espontáneos aparecidos en medio YPD, e inducidos por etanol en medio YPDE (10%), en diferentes cepas y en heteroplasmontes con núcleo de la cepa K5-5A y mitocondrias transferidas de cepas vónicas.

Núcleo de la cepa:	Mitocondrias de la cepa:	Medio	
		YPD	YPDE (10%)
K5-5A	K5-5A	5.6	23.8
K5-5A	IF182	3.0	7.5
IF182	IF182	0.6	0.4
K5-5A	ACA4	2.3	15.5
ACA4	ACA4	0.1	0.4
K5-5A	FJF206	10.3	12.6
FJF206	FJF206	2.3	1.4
K5-5A	FJF414	10.0	6.0
FJF414	FJF414	1.0	1.2
K5-5A	IFI256	4.4	ND
IFI256	IFI256	0.5	2.9
K5-5A	ACA174	3.6	10.8
ACA174	ACA174	0.4	0.3
K5-5A*	K5-5A*	5.3	20.9

ND = no determinado

\* De la cepa se obtuvo un mutante "petite" y posteriormente se le transfirieron mitocondrias de una cepa K5-5A "grande", por un procedimiento similar al descrito en la Fig. 4.2.

Como muestra la Tabla 4.3, todas las cepas vónicas presentan tasas de aparición de mutantes "petite", tanto espontáneas como inducidas por etanol, menor que las de la cepa de laboratorio K5-5A. En estas cepas se obtuvieron diferencias de menos de un 3% entre la frecuencia inducida por el etanol y la espontánea, mientras que esta diferencia fué superior a un 15% en cepas de laboratorio (K5-5A y ABQ21) (Tablas 4.2 y 4.3).



Se realizaron experimentos de transferencia de mitocondrias similares a los descritos para las cepas ACA21 y ABQ21, pero utilizando como donadoras de mitocondrias a las cepas vnicas y como receptora a un mutante espontáneo "petite" de K5-5A. En este caso, además de los heteroplasmones, en el medio selectivo aparecieron mutantes espontáneos  $\text{Can}^R$  procedentes de las esporas vnicas, con una frecuencia que variaba entre  $2.8 \times 10^{-6}$  para ACA4 y  $6.3 \times 10^{-6}$  para ACA174. (Tabla 4.4). No obstante, fué fácil distinguir entre los heteroplasmones y los mutantes espontáneos  $\text{Can}^R$  porque los primeros eran Ade-His- mientras que los segundos eran protótrofos.

Como se muestra en la Tabla 4.3, los heteroplasmones así formados se comportan respecto de la inducción de "petites" de un modo similar a ABQ21-H1, (Tabla 4.2), por lo que esta propiedad parece general en este grupo de cepas.

Tabla 4.4. Frecuencia de colonias aparecidas en medio selectivo (medio mínimo YNB + glicerol + ade + his + canavanina) tras conjugar esporas procedentes de cepas vnicas con la cepa K5-5A "petite".

	Esporas procedentes de la cepa:					
	IFI82	IFI256	ACA4	ACA174	FJF206	FJF414
Heteroplasmones (núcleo K5-5A, mitocondrias vnicas) / $10^6$ esporas	1262	26	80	86	2	3
Esporas $\text{Can}^R$ espontáneas/ $10^6$	3.7	4.0	2.8	6.3	0	0

### Termotolerancia de las cepas vínicas

Los experimentos llevados a cabo para la determinación de la  $T_{m\acute{a}x}$ , realizados con las cepas ACA21, ABQ21 y el heteroplasmon-te ABQ21-H1 (Tabla 4.1) se hicieron extrapolables a las restantes cepas vínicas, a fin de comprobar si también en estas cepas es el equilibrio entre  $\mu_c$  y  $\mu_d$  el que determina la  $T_{m\acute{a}x}$  de crecimiento. Para ello, se hicieron determinaciones de  $T_{m\acute{a}x}$  para crecimiento y supervivencia, como se describió en Materiales y Métodos, en las cepas que aparecen relacionadas en la Tabla 4.5. En dicha Tabla se recoge la  $T_{m\acute{a}x}$  donde se observó crecimiento y donde aún se obtuvieron células viables, tras 7 días de incubación en YPD y en YPDE (10%).

**Tabla 4.5.** Temperatura máxima de crecimiento y de supervivencia ( $^{\circ}C$ ) en YPD e YPDE (10%), en las levaduras vínicas relacionadas en la Tabla y en los controles RBY-D5A y K5-5A.

Cepa	Medio YPD		Medio YPDE (10%)	
	$T_{m\acute{a}x}$ Crecim.	$T_{m\acute{a}x}$ Superv.	$T_{m\acute{a}x}$ Crecim.	$T_{m\acute{a}x}$ Superv.
IFI256	40.5	ND	27.7	ND
ACA4	41.5	$\geq 46.0$	30.0	30.0
ACA21	40.5	$\geq 46.0$	28.7	ND
ACA174	41.0	$\geq 46.0$	28.7	30.5
FJF206	37.0	$\geq 46.0$	29.5	30.5
FJF414	36.0	$\geq 46.0$	31.0	32.0
RBY-D5A	39.0	ND	27.0	ND
K5-5A	39.0	42.5	26.0	ND

ND = no determinado

En medio con etanol, (YPDE (10%)), los valores de  $T_{m\acute{a}x}$  fueron superiores para el crecimiento y la supervivencia que en los controles de laboratorio. La  $T_{m\acute{a}x}$  de supervivencia fué en todos los casos muy poco superior a la de crecimiento, lo que sugiere que también en estas cepas, es el equilibrio entre  $\mu_c$  y  $\mu_d$  el que determinó el valor de  $T_{m\acute{a}x}$  para el crecimiento.

En ausencia de etanol, los resultados, con la excepción de las cepas de flor FJF206 y FJF414, fueron similares a los obtenidos en YPDE (10%), aunque las diferencias entre la  $T_{m\acute{a}x}$  del crecimiento y la supervivencia fueron más acentuadas (Tabla 4.5). En las cepas de flor, aunque la viabilidad se mantuvo incluso a 46°C, la temperatura máxima para el crecimiento fué de 36-37°C, inferior incluso a la de las cepas de laboratorio.

Un híbrido entre la cepa FSP414/6 (espora de FJF414) y D517-4B (cepa genética), FDH1 (capítulo 2), que tiene una tolerancia a etanol incluso superior a la de FJF414, tuvo valores de  $T_{m\acute{a}x}$  similares a las demás cepas vínicas (Tabla 4.6), lo que sugiere que en las cepas de flor, la  $T_{m\acute{a}x}$  para el crecimiento vendría determinada por alelos nucleares recesivos de termosensibilidad, que reducen  $\mu_c = 0$  en  $T_{m\acute{a}x}$ , y no, como en las demás cepas, por el equilibrio  $\mu_c - \mu_d$ .

Tabla 4.6. Temperatura máxima de crecimiento (°C) en YPD e YPDE (10%) de la espora de FJF414, FSP414/6, la cepa de laboratorio D517-4B y el híbrido entre ambas, FDH1.

Cepa	$T_{m\acute{a}x}$ . de crecimiento	
	Medio YPD	Medio YPDE (10%)
FSP414/6	36.0	30.5
D517-4B	39.0	26.2
FDH1	41.5	32.5

Dado que este híbrido FDH1 es mejor en cuanto a tolerancia a etanol que cualquiera de sus parentales (capítulo 3) y dado que en dicho híbrido parecen complementar los posibles alelos de termosensibilidad, de los resultados finales obtenidos se pueden sacar dos conclusiones de interés. Bajo un punto de vista aplicado, FDH1 es una cepa tolerante a etanol y termotolerante, candidato idóneo como cepa productora de etanol en condiciones industriales. Por otra parte, el hecho de que la mejora en tolerancia a etanol

conlleve a una mejora de la termotolerancia, contribuye a confirmar la hipótesis de que, probablemente, las proteínas que limitan el crecimiento en presencia de altas concentraciones de etanol son al menos en parte, las mismas que las que lo hacen en altas temperaturas.

### D i s c u s i ó n

A diferencia del resto de los eucariotas Saccharomyces y otras levaduras afines pueden prescindir del genomio mitocondrial (24). Sin embargo, en altas concentraciones de etanol, los mutantes [rho-] que carecen de parte o toda esta información genética, crecen más lentamente (2) y se mueren más en presencia de etanol y altas temperaturas (7) que las cepas silvestres [rho+] de las que derivan. Esto podría significar que el mantenimiento de la capacidad respiratoria es esencial para la supervivencia en altas concentraciones de etanol y altas temperaturas. Consecuentemente, cepas que presentan menores tasas, tanto espontáneas como inducidas por etanol, de mutaciones [rho-] deben tener una mayor viabilidad y una mayor tasa de crecimiento. Este es el caso encontrado en las cepas vónicas, caracterizadas en principio como altamente tolerantes a etanol para el crecimiento (Tabla 1.1).

Las mutaciones espontáneas [rho-] se originan por deleciones en el ADN mitocondrial (17, 87) y su frecuencia depende de la presencia en el mismo de determinadas secuencias (17,58) por lo que este carácter debe ser transferible via ADN mitocondrial y su aparición podría estar asociada a los mecanismos de replicación (59) y recombinación del ADN mitocondrial (17). El efecto de muchos mutágenos capaces de inducir mutaciones [rho-] está asociado a su capacidad de interaccionar directamente con el ADN mitocondrial, específica (77) o inespecíficamente (16). Sin embargo, el etanol no interacciona físicamente con el ADN. Su efecto mutagénico, parece deberse a su capacidad de interferir en funciones asociadas a membrana (38). De hecho, otros solventes de membrana más específicos producen efectos en cierto modo similares a los del etanol, aunque en menor grado (Tabla 4.2), lo que sugiere que la replicación del ADN mitocondrial podría transcurrir asociada a membranas (no existen evidencias de otros autores en este sentido) y que el

punto de anclaje podría ser el sitio donde la perturbación producida por etanol reduce la eficiencia de la replicación y consecuentemente, incrementa la proporción de mutantes [rho-] (38). En bacterias, posibles parientes genéticos de este orgánulo (78b), sí existen evidencias de que la replicación cromosómica está asociada a la membrana (16b) y en ocasiones se recurre a tratamiento con detergentes como el SDS para provocar la pérdida de plásmidos, con eficiencias similares a las obtenidas con SDS en la inducción de pérdida de información genética en el ADN mitocondrial (aparición de "petites") de la cepa K5-5A (Tabla 4.2).

La tolerancia del crecimiento a altas concentraciones de etanol, la muerte celular y la inducción de mutantes "petite" por etanol parecen tener la misma base genética, residente en parte en el genomio nuclear y en parte en el mitocondrial. La mayor resistencia al efecto inductor de mutaciones "petite" es una característica general en todas las levaduras vínicas estudiadas altamente tolerantes a etanol (Tabla 4.3) y a temperatura (Tabla 4.5). La transferencia de mitocondrias de una cepa altamente tolerante a etanol a una cepa de laboratorio proporciona a ésta última una mayor viabilidad en condiciones extremas de temperatura y etanol y reduce proporcionalmente la aparición de mutantes "petite" hasta niveles muy similares a los de la cepa tolerante (Fig. 4.7). Este incremento de resistencia al efecto mutagénico del etanol, heredable al menos en parte, como se ha indicado, por transferencia del ADN mitocondrial, tiene lugar en todas las cepas analizadas (Tabla 4.3), confirmando el que la integridad funcional del ADN mitocondrial, esencial para mantener la capacidad respiratoria, podría ser esencial para la supervivencia en altas concentraciones de etanol y altas temperaturas.

Este efecto se refleja también en el crecimiento en condiciones en las que la tasa de muerte juega un papel importante, reduciéndose el tiempo de generación en altas concentraciones de etanol (Fig. 4.3) y aumentando la temperatura máxima de crecimiento en presencia y ausencia de etanol (Tabla 4.1).

El que la base genética de la supervivencia en medio con etanol y en altas temperaturas sea extranuclear, lleva de inmediato a la selección del genomio mitocondrial como método de mejora en la producción industrial de etanol en condiciones técnicas extremas, como son la inmovilización celular y el reciclado de biomasa (44), donde el crecimiento puede ser nulo y la supervivencia es el único factor determinante de la fermentación (5) (Tabla 1.3). En este sentido, un método válido para valorar este carácter podría ser la resistencia al efecto mutagénico del etanol en el ADN mitocondrial (baja frecuencia de "petites"), dada la correlación entre supervivencia en etanol y baja frecuencia de formación de estos mutantes "petites", ambos dependientes del ADN mitocondrial.

La asociación entre una mayor resistencia al etanol y a altas temperaturas viene determinada por el hecho de que tanto la muerte en etanol como en altas temperaturas tiene la misma causa, ambas dependientes de la estabilidad del ADN mitocondrial (Fig. 4.7). Dicha asociación se pierde cuando el crecimiento está limitado por funciones nucleares: en las cepas de flor la existencia de alelos nucleares de termosensibilidad para el crecimiento, determinantes de una menor temperatura máxima de crecimiento (Tabla 4.6) sin modificar la viabilidad (Tabla 4.5), no impide que estas cepas sean las más tolerantes a etanol. Recíprocamente, sólo algunos de los alelos nucleares que confieren sensibilidad a etanol afectan simultáneamente a la sensibilidad a temperatura (3).

## CAPITULO 5

### **PAPEL DE LAS MEMBRANAS EN LA TOLERANCIA AL ETANOL**

#### I n t r o d u c c i ó n

Las cepas de Saccharomyces cuando crecen en etanol sintetizan lípidos enriquecidos en residuos grasos insaturados del tipo C18:1 para compensar la disminución de residuos de palmítico(2,82). Por otra parte, se sabe que cuando se suplementan los cultivos de levaduras con ácidos grasos insaturados, se incrementa su tolerancia a etanol (20, 32).

Por estas razones se considera a la membrana celular como el componente más importante con el que reacciona el etanol, y a los residuos de ácidos grasos insaturados de la misma como los elementos esenciales en el mantenimiento de una alta tolerancia a etanol (23, 81).

Existe una vasta información sobre el mecanismo de adaptación a etanol de las levaduras que incluye, como dato fundamental, cambios en los componentes de la membrana celular (38). El hecho de que, los microorganismos que son altamente tolerantes a etanol, presenten cambios muy específicos en los componentes estructurales de las membranas, apoya esta tesis.

Sin embargo, los intentos de obtener cepas más tolerantes a etanol mediante transferencias sucesivas a medios con concentraciones crecientes de etanol han resultado infructuosos y, hasta ahora, no se ha descrito el que se consigan cepas más tolerantes (39). Por el contrario, se ha observado que algunas cepas cambian la composición lipídica de sus membranas durante estos experimentos de transferencia que sin embargo, se vuelven incluso más sensibles a etanol que al principio del experimento(1).Una posible explicación sería que los cambios que se detectan en la composición de los lípidos se deban a alteraciones producidas por el etanol en enzimas implicadas en la ruta de biosíntesis de lípidos y no reflejen cambios adaptativos (14,37).Otra posibilidad alternativa es que, efectivamente,

los cambios observados son adaptativos, pero que la adaptación específica de las membranas no se refleja en otros parámetros como crecimiento, fermentación etc. La razón sería que el parámetro "crecimiento" o "fermentación" es en realidad la resultante de un gran número de funciones celulares y que cualquiera de ellas, no necesariamente la actividad de las membranas, puede ser la más inhibida por etanol. Por lo tanto ésta sería el factor limitante del crecimiento. Esta posibilidad no ha podido ser probada hasta ahora debido a que no se ha descrito ningún método que permita ver específicamente adaptación a etanol de las membranas celulares. Este método permitiría determinar si un cambio de la fisiología de la membrana causado por etanol conduce a una alteración equivalente del crecimiento. De hecho, el etanol interfiere mediante su efecto en la membrana en funciones como el transporte de glucosa (45, 47), viabilidad (46), etc. que pueden ser funciones que limiten el crecimiento.

El flujo pasivo de protones a través de la membrana es un parámetro que puede medirse fácilmente mediante curvas de acidificación inducida por glucosa (76) y permite una buena estimación de la interferencia del etanol con la membrana plasmática (48). Cuando se suspenden en una solución de glucosa, células de levaduras cultivadas en YPD, se produce una salida de protones que hace que el pH de la solución baje siguiendo una curva de acidificación característica (76). Cuando la entrada y salida de protones se equilibra, se alcanza un valor final de pH, pH<sub>f</sub> (48) que ya se mantiene constante, mientras haya glucosa.

El etanol aumenta la constante de difusión del flujo pasivo de protones, siguiendo la ecuación  $C_x = C_o e^{kx}$  (38), donde  $C_x$  y  $C_o$  son los valores de las constantes de difusión a las concentraciones de etanol 0 y x respectivamente y  $k$  es la constante de aumento por etanol del flujo pasivo de protones a través de la membrana. En consecuencia, el valor de pH<sub>f</sub> aumenta cuando se añade etanol a la suspensión de células con glucosa, de tal forma que puede establecerse una relación de tipo lineal entre las concentraciones de etanol añadidas y los valores de pH<sub>f</sub> alcanzados (28):  $pH_f = C + k \times \log e$  (48) y estimar así fácilmente el valor de  $k$ .



En este capítulo se han utilizado las curvas de acidificación para determinar si la interferencia del etanol en la membrana está relacionada con el efecto que causa en el crecimiento, así como si el crecimiento en medio con etanol, conlleva a una modificación de la membrana por adaptación que cambie la respuesta de la misma a la acción de este alcohol.

## Materiales y Métodos

### Organismos

Las determinaciones de la constante de aumento del flujo pasivo de protones,  $k$ , y de la constante de inhibición del crecimiento,  $K_i$ , se llevaron a cabo en once cepas de levaduras, relacionadas en la Tabla 5.1 y descritas en el Apéndice I. Los experimentos de adaptación al etanol se hicieron con las cepas FSP414/6, como prototipo de cepa tolerante a etanol y D517-4B, como cepa sensible.

**Tabla 5.1.** Relación de cepas utilizadas, y parámetros determinantes de la toxicidad en etanol:  $K_i$  (molar) y tasa máxima de crecimiento ( $\mu$ ) ( $h^{-1}$ ) en medio sin etanol, constante de aumento del flujo pasivo de protones ( $k$ ) (molar $^{-1}$ ) y pHf alcanzado en medio sin etanol. Los experimentos fueron realizados a 25°C.

Cepa	Crecimiento		Acidificación	
	$\mu_{\text{máx}}$ ( $h^{-1}$ )	$K_i$ (molar)	pHf	$k$ (molar $^{-1}$ )
(1) IFI256	0.43	1.24	3.50	0.55
(2) IF182	0.40	1.13	3.37	0.80
(3) ACA4	0.47	1.22	3.50	0.83
(4) ACA174	0.40	1.37	3.64	0.26
(5) RBY-D5A	0.41	1.26	3.41	0.59
(6) K5-5A	0.38	0.96	3.55	1.01
(7) FJF414	0.29	1.50	3.56	0.15
(8) X30-3C	0.36	0.96	3.57	0.70
(9) FSP414/6	0.25	1.37	3.45	0.45
(10) FXH1	0.42	1:16	3:30	1.50
(11) D517-4B	0.40	1.10	3.30	0.59

Los resultados que se expresan en la Tabla son los valores medios de 5 experimentos.

### Medios y condiciones de cultivo

Las cepas se cultivaron en matraces de 500 ml que contenían 250 ml de medio YPD ó YPDE con diferentes concentraciones de etanol, con agitación magnética y a 25°C. La tasa de crecimiento de cada cepa se determinó en medio YPDE con concentraciones de etanol que variaron de 0 a 10%, midiendo periódicamente la absorbancia a 660 nm como se ha descrito en capítulos anteriores. A partir de estos valores se calculó la  $K_i$ , que se define como la concentración de etanol que reduce la tasa de crecimiento a la mitad.

### Determinación de las curvas de acidificación y del pH de equilibrio

Cultivos en matraces de 500 ml que contenían 250 ml de medio YPD en fase estacionaria temprana ( $2 \times 10^8$  cel/ml) se centrifugaron y lavaron dos veces con agua destilada y finalmente se resuspendieron en 10 ml de agua destilada; 0.5 ml de esta suspensión se introdujo en un vial de 20 ml de capacidad y se añadió 0.5 ml de una solución acuosa de glucosa al 20% y agua destilada con 0, 2, 4, 6, 8 ó 10% (v/v) de etanol, hasta un volumen final de 4.5 ml. Las curvas de acidificación se determinaron introduciendo en el vial el electrodo de un pHmetro Crison (Crison Instruments, S.A., Madrid) conectado a un registrador LKB 6500. El pH de las soluciones se estabilizaba regularmente tras unos 75 min de incubación, por lo que en experimentos posteriores y para determinar el pH final de equilibrio (pH<sub>f</sub>), los viales se cerraron e incubaron a 25°C con agitación durante unos 75 min, transcurridos los cuales se midió el pH.

### Determinación de la capacidad de adaptación a etanol

Para determinar la capacidad de adaptación a etanol de las cepas, éstas fueron cultivadas en matraces de 500 ml con 250 ml de YPD ó YPDE (8%), con agitación y a 30°C hasta que alcanzaron la fase estacionaria temprana ( $2 \times 10^8$  cel/ml). Para determinar la tolerancia a etanol de las membranas celulares, se hicieron curvas de acidificación como las descritas anteriormente, incubando viales con células de cada cepa, glucosa y distintas concentraciones

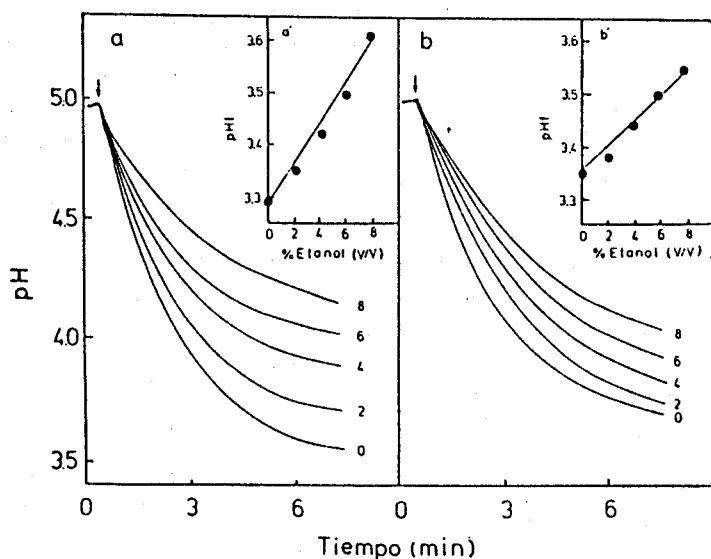
de etanol a 30°C con agitación y midiendo el pH durante los primeros 10 min del experimento y tras 75 min a 2 horas de incubación. Las determinaciones de peso seco se realizaron secando 0.1 ml de la suspensión celular sobre papel de aluminio a 105°C durante 12 h y pesándola posteriormente.

A fin de comprobar si los cambios que tienen lugar en la membrana celular durante el crecimiento en etanol son reversibles, se realizó el siguiente experimento: se cultivaron células en 1 litro de YPDE (8%) hasta fase estacionaria ( $5 \times 10^8$  cel/ml). El cultivo se dividió entonces en 4 subcultivos de 250 ml. De uno de ellos, utilizado como control, se recogieron las células por centrifugación y se procedió a determinar curvas de acidificación en distintas concentraciones de etanol como se describió anteriormente. Los otros tres cultivos se centrifugaron y las células se lavaron y resuspendieron en 100 ml de 1) agua destilada; 2) medio YB (medio mínimo sin fuente de carbono ni de nitrógeno) con 0.5% de glucosa; 3) medio YB suplementado con 0.5% de glucosa, y con 20 mg de cicloheximida. Los tres cultivos se incubaron durante 4 h a 30°C y posteriormente las células se centrifugaron, se lavaron y finalmente se resuspendieron en 2 ml de agua destilada para medir curvas de acidificación del modo descrito anteriormente.

## Resultados y Discusión

### Determinación de la constante de aumento por etanol del flujo pasivo de protones

Se determinaron las curvas de acidificación de las cepas relacionadas en la Tabla 5.1. La Fig. 5.1 muestra, a modo de ejemplo, las de las cepas D517-4B y FSP414/6. De estas gráficas se deduce que el valor del pH de equilibrio (pH<sub>f</sub>) aumenta con la concentración de etanol, tanto en la cepa FSP414/6 como en D517-4B, y que este aumento es mucho más patente en la cepa de laboratorio sensible a etanol, D517-4B, que en FSP414/6. Este efecto es aún más evidente si se representa, frente a la concentración de etanol, el pH final de equilibrio alcanzado para cada concentración (pH<sub>f</sub>) (Fig. 5.1 a' y b').



**Figura 5.1.** Efectos del etanol sobre las curvas de acidificación de las cepas D517-4B (a) y FSP414/6 (b), obtenidas al añadir glucosa (concentración final del 2%) a suspensiones celulares. La flecha indica el momento de adición de la glucosa. El número indicado junto a cada curva se refiere a la concentración de etanol (% v/v) a la que se hizo el experimento. En las Fig. a' y b' se representan los valores finales de pH (pHf) alcanzados tras 2 h de incubación a las concentraciones de etanol indicadas.

Como puede observarse, tanto para la cepa FSP414/6 como para D517-4B, existe una relación de tipo lineal entre las concentraciones de etanol añadidas y los valores de pHf alcanzados (84) aunque la pendiente que determina esta relación lineal es más pronunciada en la cepa D517-4B, sensible a etanol, que en FSP414/6, más tolerante a este compuesto (capítulo 3).

Cuando se representaron los valores de concentración de etanol frente al pHf alcanzado para cada concentración, correspondientes a cada una de las cepas que aparecen citadas en la Tabla 5.1, se observó que la relación entre el pH final y la concentración de etanol era lineal en todos los casos, con un coeficiente de correlación que varió normalmente entre 0.951 y 0.999, excepto en el caso de la cepa 7 (FSP414, *Torulospira pretoriensis*) en la que fué algo menor (0.862).

La constante de aumento por etanol del flujo pasivo de protones  $k$ , puede calcularse a partir de la pendiente determinada por la

relación lineal existente entre concentración de etanol y pHf (27). Para cada una de las cepas descritas en la Tabla 5.1, se determinó el valor de la pendiente ( $\underline{k}$ ) de la recta de regresión. Esta estimación de  $\underline{k}$  se realizó utilizando la expresión  $\underline{k} = \Delta \text{pHf} / \Delta x \times \log e$  (27), donde  $\Delta \text{pHf}$  es la diferencia en pHf causada por una diferencia  $\Delta x$  en la concentración molar de etanol del ensayo.

#### Relación entre la constante de aumento, $\underline{k}$ , y la constante de inhibición del crecimiento, $K_i$

Al calcular los valores de  $\underline{k}$  para las distintas cepas, se observó que existía correlación entre dicho parámetro y su tolerancia a etanol. Más concretamente, una correlación de tipo lineal entre la inhibición del crecimiento por etanol, definida por su  $K_i$ , y el efecto del etanol en los valores de pHf, de forma que cuanto menos tolerante es la cepa, más pronunciada es la pendiente que relaciona concentración de etanol y pHf.

Cuando se determinaron las curvas de acidificación de todas las cepas descritas en la Tabla 5.1, y se representaron los valores de la constante de aumento,  $\underline{k}$ , obtenidos frente a los valores de la constante de inhibición del crecimiento,  $K_i$ , se observó que se podía establecer una relación de tipo lineal entre ambas constantes, con un coeficiente de correlación de 0.8 (Fig. 5.2). Esta relación sugiere que la perturbación por etanol de la membrana plasmática es importante en la inhibición del crecimiento, y que ambas pueden variar considerablemente de unas cepas a otras.

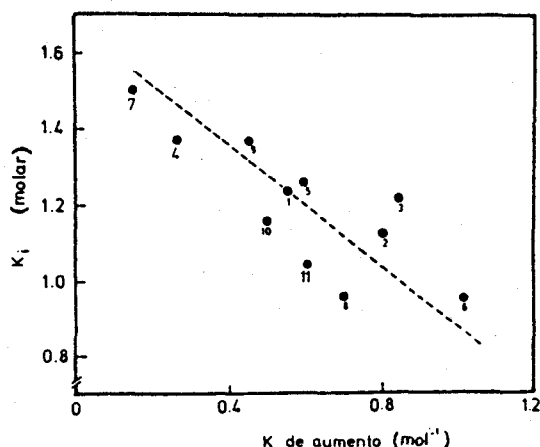
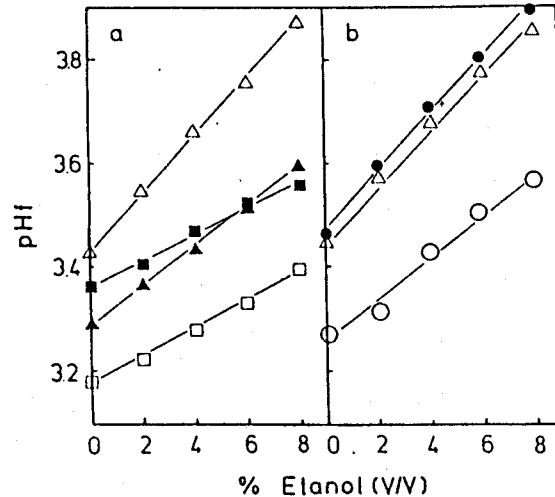


Figura 5.2. Relación entre los valores de  $K_i$  (concentración molar de etanol que reduce la tasa de crecimiento a la mitad) y  $\underline{k}$  (constante de aumento por etanol del flujo pasivo de protones a través de la membrana) (molar<sup>-1</sup>). Los números se corresponden con los de las cepas descritas en la Tabla 5.1.



**Figura 5.3.** Relación entre la concentración de etanol y el pH final (pHf) obtenido en las curvas de acidificación de (a) la cepa D517-4B crecida en YPD (▲) o en YPDE (8%) (△) y la cepa FSP414/6 crecida en YPD (■) o en YPDE (8%) (□). (b) la cepa D517-4B crecida en YPDE (8%) e incubada durante 4 h en agua destilada (△), en medio YB sin fuente de nitrógeno y 0.5% de glucosa (○) y en este último medio suplementado con una concentración final de 200 µg/ml de cicloheximida (●). Los resultados representan la media de 2-5 experimentos.

#### Adaptación a etanol de las membranas celulares

Cuando se midieron las curvas de acidificación en las cepas FSP414/6 y D517-4B, previamente cultivadas en YPDE (8%), se observó que se comportaban de forma distinta. Los valores de pHf de la cepa D517-4B (Fig. 5.3a) fueron mucho más altos que los de la misma cepa cultivada en YPD, y en consecuencia con una pendiente mucho más pronunciada, indicando que esta cepa era incapaz de adaptarse a etanol, presentando incluso más sensibilidad a este compuesto. Este aumento de sensibilidad fué reversible ya que, en células cultivadas en YPDE (8%) e incubadas posteriormente durante 4 h en medio YB (con una fuente energía, glucosa, a fin de permitir un metabolismo mínimo, pero sin fuente de nitrógeno para evitar variaciones debidas a crecimiento y división celular), los valores de pHf obtenidos fueron los mismos que los que presentaba la cepa cuando se cultivaba en YPD, indicando que la cepa es capaz de recuperar la tolerancia que tenía cuando era cultivada en YPD (Fig. 5.3a). Este proceso de reversión no ocurre si la incubación

durante 4 h se hace en agua destilada o en medio sintético con glucosa pero con cicloheximida, siendo entonces los valores de pHf obtenidos, los mismos que los que se observan cuando se mide directamente acidificación en células crecidas en YPDE (8%) (Fig. 5.3a).

La cepa FSP414/6 se comportó de un modo diferente. La pendiente de la relación lineal obtenida entre concentración de etanol y pHf fué la misma para células cultivadas en YPD que para cultivos mantenidos en YPDE (8%) (Fig. 5.3b). Sin embargo, los valores absolutos de pHf obtenidos fueron mucho más bajos en células cultivadas en YPDE (8%). Este resultado parece indicar que durante el crecimiento en YPDE (8%) en las membranas de la cepa FSP414/6 se ha producido un verdadero proceso adaptativo, que se refleja en una disminución de los valores de pHf, frente a los valores obtenidos en células crecidas en YPD, a cualquier concentración de etanol.

Los resultados obtenidos indican que tanto FSP414/6 como D517-4B alteran sus membranas cuando crecen en presencia de etanol (Fig. 5.3). Sin embargo, mientras que las membranas de la cepa D517-4B se vuelven más sensibles a etanol, las de la cepa FSP414/6 mejoran su tolerancia, lo que podría interpretarse como que la capacidad de la membrana celular de adaptarse a etanol depende de la cepa, como ocurre con la tolerancia a etanol del crecimiento (85).

El aumento de sensibilidad a etanol observado en la cepa D517-4B puede revertirse, aunque el proceso requiere una fuente de energía y posiblemente, síntesis de proteínas (Fig. 5.3). Otros autores<sup>(10,23)</sup> han sugerido que en E. coli y Z. mobilis una disminución del cociente lípidos/proteínas es esencial para la tolerancia al etanol. También se ha descrito que Saccharomyces cultivado en medio con etanol, la relación lípidos/proteínas disminuye, conforme aumenta la concentración de etanol (1). Por otro lado, se sabe que el aumento de pHf debido al etanol tiene como base un aumento de la difusión pasiva de protones a través de

la membrana (27). Puesto que las proteínas constituyen una barrera para el movimiento de iones a través de la membrana(38) los cambios que se observan en la tolerancia a etanol de la membrana celular, tras incubar las células en medio con etanol, podrían reflejar cambios en la composición proteica de la membrana celular. De hecho, la cepa D517-4B necesita síntesis de proteínas para recuperar la tolerancia al etanol que posee cuando se cultiva en medio sin etanol (Fig. 5.3a). No es descartable sin embargo que sean proteínas enzimáticas, implicadas en la biosíntesis de los lípidos de la membrana (37), las que se alteren al incubar con etanol (37) y por lo tanto, la modificación que sufra la membrana sea consecuencia fundamentalmente de alteración de lípidos, más que de proteínas estructurales de membrana.

Estos resultados, junto con datos analíticos de otros autores (1,10,23) sugieren que los componentes proteicos de la membrana celular posiblemente jueguen un papel esencial en la tolerancia a etanol que presentan las cepas de levaduras.



## CAPITULO 6

### **SELECCION EN CULTIVO CONTINUO DE HIBRIDOS DE LEVADURAS TOLERANTES A ETANOL**

#### I n t r o d u c c i ó n

La tolerancia a etanol en levaduras está controlada por un gran número de genes (capítulos 3 y 4). Estos genes pueden ser distintos de unas cepas a otras (capítulo 3), por lo que la hibridación entre cepas no isogénicas puede generar nuevas cepas que por complementación sean más tolerantes a etanol que los parentales. De hecho, la complementación por hibridación ha sido la técnica que, de modo habitual, se ha utilizado para la obtención de cepas altamente tolerantes a etanol (40,73). Por otra parte, los genes nucleares que limitan la tolerancia a etanol de una cepa son distintos a distintas concentraciones de etanol (capítulo 3). Adicionalmente, en condiciones extremas de altas temperaturas y altas concentraciones de etanol, se ha observado que el papel que ejerce el genomio extranuclear en la tolerancia a etanol es esencial (capítulo 4).

La complejidad del sistema aconseja que para obtener cepas muy tolerantes a partir de cepas naturales tolerantes, se recurra a la hibridación entre cepas no consanguíneas para generar variabilidad genética, y se utilice un sistema de selección en medio con cantidades crecientes de etanol y bajo control turbidostático, a fin de evitar la pérdida de híbridos interesantes si se someten a una fuerte presión selectiva puntual.

En este capítulo, híbridos entre cepas vínicas y cepas genéticas se sometieron a un control turbidostático en cultivo continuo, basado en la capacidad de las levaduras de acidificar los medios

en los que crecen. La tasa de acidificación es un parámetro paralelo al de la tasa de crecimiento. Este sistema de control, realizado de forma discontinua, ha permitido desarrollar un método extremadamente preciso para controlar la turbidez del cultivo, permitiendo además pulso a pulso, incrementar la concentración de etanol del cultivo durante el proceso de selección.

## M a t e r i a l e s   y   M é t o d o s

### Organismos

La puesta en marcha del método de selección se llevó a cabo con las cepas FJF414 y D517-4B, debido a las grandes diferencias que ofrecían en su cinética de crecimiento con y sin etanol; los híbridos empleados fueron los obtenidos en el capítulo 2 entre cepas vnicas y cepas genéticas (híbridos del cruzamiento de las cepas genéticas D273-11A, D517-4B y MMY1 con las esporas de las cepas vnicas IFI256, IFI82, ACA4, FJF414 y FJF206).

### Medios y condiciones de cultivo

En los experimentos de cultivo discontinuo, las cepas se inocularon en matraces de 50 ml con 25 ml de medio YPD y se incubaron a 30°C con agitación hasta fase estacionaria ( $5 \times 10^8$  cel/ml). El crecimiento se determinó midiendo la absorbancia a 660 nm en un espectrofotómetro Spectronic 2000 (Bausch & Lomb, Bélgica).

La capacidad fermentativa se determinó en matraces de la misma capacidad que los descritos, en medio YPD suplementado con 30 ó 45% de glucosa. Periódicamente se tomaron muestras para determinar la absorbancia a 660 nm así como la glucosa consumida y el etanol producido, según métodos descritos en "Procedimientos analíticos".

En los experimentos de cultivo continuo se empleó medio YPD ó YPDE con las concentraciones de etanol indicadas en cada caso. El aislamiento de colonias tras la recogida de muestras del cultivo continuo, se realizó en medio YPD sólido.

### Adaptación al quimiostato del sistema de control turbidostático por pH

Para estos experimentos se empleó un fermentador New Brunswick Bioflo modelo C30 (New Brunswick Scientific Co. Inc., Edison, NJ, E.E.U.U.) provisto de una vasija para 1.5 l de medio. El fermentador se equipó con un electrodo de pH en la vasija, conectado a un controlador automático de pH modelo pH40. La bomba del fermentador se reguló para generar una tasa de dilución ( $D$ ) de  $0.5 \text{ h}^{-1}$  (mayor que la tasa máxima de crecimiento,  $\mu_{\text{máx}}$ , de las levaduras empleadas) y se conectó al controlador de pH, de manera que cuando el crecimiento y en consecuencia la acidificación generaban un pH por debajo de un valor crítico,  $\text{pH}_c$ , el controlador de pH conectaba la bomba y diluía el cultivo con medio fresco; cuando el pH del cultivo alcanzaba valores por encima del valor crítico,  $\text{pH}_c$ , como consecuencia de la dilución, la bomba se desconectaba. Este sistema de control se esquematiza en la Fig. 6.1. La vasija con 1.5 l de medio YPD se inoculó con 15 ml de cultivo de cada cepa, en fase estacionaria, y se reguló la incubación a  $30^\circ\text{C}$  y agitación magnética (300 rpm) con baja aireación (0.5 unidades en la escala del fermentador).

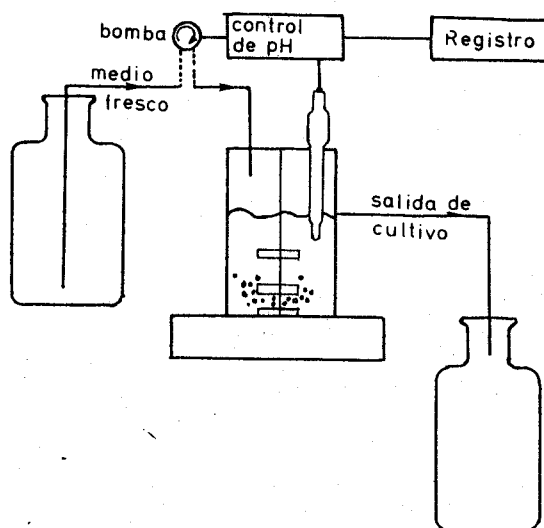


Figura 6.1. Esquema del turbidostato, con control automático de la opacidad del cultivo mediante un pHmetro.

### Procedimientos analíticos

La glucosa consumida se midió en un analizador de glucosa YSI27 descrito anteriormente. El etanol se determinó siguiendo el método descrito por Kaplan y Giotti (43). El pH se determinó continuamente en un registrador LKB 6500, acoplado al controlador de pH del fermentador. Las medidas más precisas de pH se realizaron en un pHmetro Crison (Crison Instruments, S.A., España).

### Resultados y Discusión

#### Valores extremos de pH obtenidos en cultivo discontinuo

La regulación de la tasa de dilución,  $D$ , de un cultivo continuo mediante control de pH, implica que el valor crítico de pH,  $pH_c$ , debe estar siempre comprendido entre los que posee un medio recién inoculado y los valores obtenidos cuando, en cultivo discontinuo, todo el azúcar del medio ha sido fermentado por las levaduras (fase estacionaria), puesto que el control consiste en evitar que, bien por crecimiento o por dilución, se puedan alcanzar algunos de los valores de pH extremos.

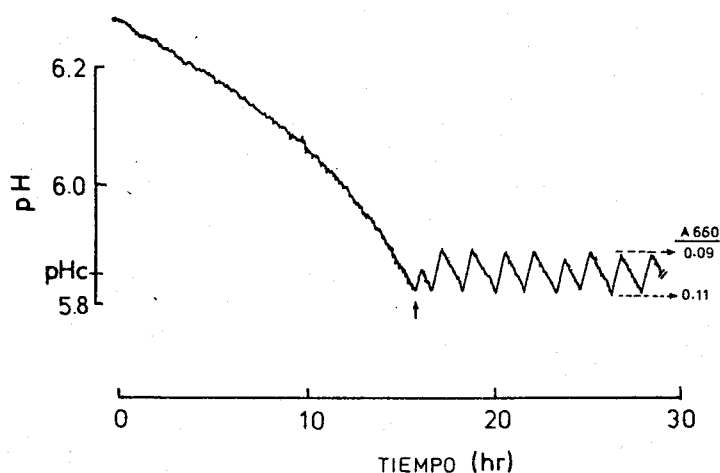
Consecuentemente se procedió en primer lugar a determinar cuáles eran estos valores de pH, inoculando células de la cepa FJF414, previamente cultivadas en YPD hasta fase estacionaria, en matraces de 50 ml con 25 ml de YPD, e incubando los matraces con agitación a 30°C, nuevamente hasta fase estacionaria. Las medidas de pH se hicieron al comienzo y al final del experimento, y paralelamente se hicieron determinaciones del contenido en glucosa de los cultivos y de la turbidez de los mismos (absorbancia a 660 nm).

Los valores mínimos (fase estacionaria) y máximos (inicio del cultivo) de pH obtenidos se recogen en la Tabla 6.1, junto con los datos de turbidez del cultivo (absorbancia a 660 nm) en cada caso. De acuerdo con estos valores, incluso en presencia de etanol el pH inicial se mantuvo por encima de 6.0, y por debajo

de 5.0 el de los cultivos en fase estacionaria (pH final). En consecuencia y para experimentos posteriores, el control turbidostático se realizó regulando el pHc entre estos dos valores.

**Tabla 6.1.** Valores de pH y de absorbancia a 660 nm de un cultivo discontinuo de la cepa FJF414, obtenidos al principio (2.2% glucosa) y al final (0% glucosa) del experimento.

Medio	pH		A <sub>660</sub>	
	Inicial	Final	Inicial	Final
YPD	6.02	4.97	0.03	>1.0
YPDE (5%)	6.19	4.90	0.03	>1.0
YPDE (10%)	6.31	4.65	0.04	>1.0



**Figura 6.2.** Registro de pH de un cultivo de la cepa FJF414 creciendo en YPDE (10%), sometido a control turbidostático por pH. Tras la inoculación, el pH del medio decrece continuamente conforme crecen las células. Una vez que se alcanza un pH determinado (pHc), señalado con una flecha en la figura, el cultivo se somete a pulsos de dilución cada vez que, como consecuencia del crecimiento, el pH baja por debajo del pHc.

#### Equilibrio del cultivo continuo controlado por el pHc

Para determinar la eficacia potencial del método de control por pH, se empleó la cepa FJF414 y se utilizó como medio de cultivo YPD e YPDE. Para ello se inoculó la vasija del fermentador, que

contenía 1.5 l de YPD, con 15 ml de un cultivo en fase estacionaria de la cepa FJF414, previamente crecida en YPD, y se reguló la incubación a 30°C y con el sistema de control por pH como se indicó en Materiales y Métodos. Una vez alcanzadas las condiciones de equilibrio

las células se mantuvieron en el cultivo durante tres días. Experimentos similares se llevaron a cabo utilizando YPDE suplementado con 5 o con 10% etanol (YPDE (5%) ó YPDE (10%)). En estos casos, el tiempo necesario para alcanzar el equilibrio fué superior (Fig. 6.2); una vez alcanzado éste, la incubación se prolongó durante 7 días, dado que en estas condiciones la tasa de acidificación, y en consecuencia la de dilución, es mucho menor.

Durante el experimento se produjo una acidificación continua del cultivo del fermentador, como consecuencia del crecimiento y la fermentación de la cepa (Fig. 6.2). De acuerdo con el sistema de control que se había conectado (Fig. 6.1), la bomba de adición de medio se conectaba cuando el pH descendía por debajo del pH<sub>c</sub> (indicado por una flecha en la Fig. 6.2) y se desconectaba cuando el pH superaba el pH<sub>c</sub>. Esto permitía alcanzar un equilibrio de crecimiento continuo.

Durante esta fase de equilibrio la concentración de glucosa se mantuvo prácticamente constante, entre 1.7-2.0% (Tabla 6.2) y con valores muy similares a los iniciales (2.2-2.1%), lo que indicaba que las células siempre estaban creciendo a su tasa máxima.

Puesto que en este estado de equilibrio, una variación dada de pH implica una variación proporcional en la turbidez del cultivo (Fig. 6.2 y Tabla 6.2), la tasa de acidificación,  $\underline{A}$ , obtenida después de cada pulso de dilución (disminución de pH/tiempo cuando  $D = 0$ ) fué proporcional a la tasa máxima de crecimiento,  $\mu_{\text{máx}}$  (incremento de turbidez/tiempo cuando  $D = 0$ ), de donde se deduce que  $\underline{A} = K \times \mu_{\text{máx}}$ .

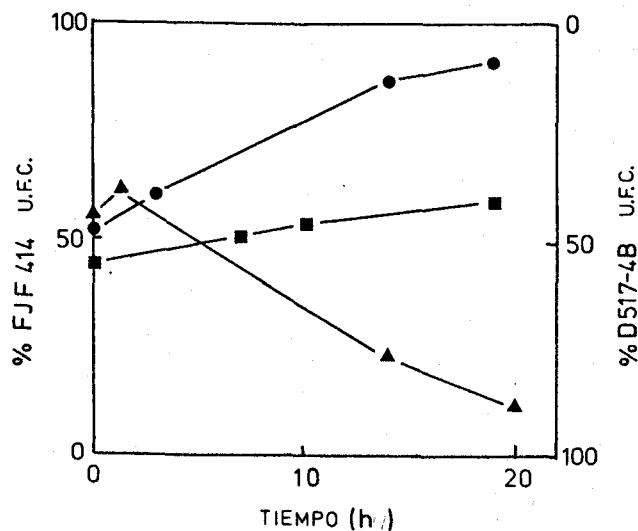
Tabla 6.2 Valores máximos y mínimos de pH, turbidez ( $A_{660}$  nm) y concentración de glucosa, obtenidos bajo condiciones constantes de cultivo continuo sometido a control turbidostático por pH, en la cepa FJF414

Medio	pH		$A_{660}$		Glucosa	
	Inicial	Final	Inicial	Final	Inicial	Final
YPD	5.67	5.66	0.15	0.12	1.9	1.7
YPDE (5%)	5.62	5.59	0.18	0.16	1.9	1.8
YPDE (10%)	5.88	5.84	0.11	0.09	2.0	2.0

### Experimentos de competencia y selección en cultivo continuo

Para llevar a cabo este experimento de competencia se utilizaron la cepa vínica FJF414 y la genética D517-4B. La cepa de flor FJF414 es una de las menos inhibidas por concentraciones crecientes de etanol, pero en ausencia de este compuesto, su tasa de crecimiento es enormemente baja comparada con otras cepas (capítulo 1). La cepa de laboratorio D517-4B sin embargo, es fuertemente inhibida por etanol, pero su tasa de crecimiento en medios sin etanol es muy superior a la de la cepa FJF414 (capítulo 3). Por este motivo se utilizaron estas cepas para realizar un experimento de competencia en cultivo continuo, en ausencia (YPD) y presencia de etanol (YPDE (5%) e YPDE (10%)), respectivamente, a fin de llevar a cabo posteriormente, similares experimentos de competencia y selección de organismos altamente tolerantes a etanol. Ambas cepas se cultivaron en YPD hasta fase estacionaria en matraces de 50 ml con 25 ml de medio y a 30°C y posteriormente de estos cultivos se inocularon 15 ml de cada cepa en la vasija del fermentador que contenía YPD, YPDE (5%) ó YPDE (10%). Una vez alcanzado el equilibrio, se procedió a mantener las células del cultivo durante 7 días, cogiendo muestras periódicamente, sembrando cajas de YPD y contando el número de colonias aparecidas a los 3 días de incubación a 30°C. La mutación ade2 de la cepa D517-4B confiere a las colonias un color rojo que las hace fácilmente distinguibles de las restantes colonias que no presentan auxotrofia para adenina y que son de color blanco (FJF414).

A concentraciones inferiores a 5% de etanol (YPDE (5%)) la tasa máxima de la cepa D517-4B es mayor que la de la cepa FJF414. Sin embargo a concentraciones superiores, estos valores se invierten, siendo la tasa máxima de FJF414 superior a la de D517-4B (Fig. 3.3). Como muestra la Fig. 6.3, y como era de esperar, la competencia favoreció a la cepa FJF414 cuando el sistema operaba con YPDE (10%) y a la cepa D517-4B cuando el medio empleado fué YPD. Cuando se empleó YPDE (5%) las diferencias fueron menores ya que, como se observó con anterioridad, (Fig. 1.1 y 3.3) en estas condiciones tanto la tasa de crecimiento de FJF414 como la de D517-4B mostraban valores muy similares. Este experimento de competencia mostró que a pesar de los numerosos factores que pueden afectar al desarrollo de cultivos mixtos (74), el sistema permite seleccionar la cepa que posea la máxima tasa de crecimiento en cada una de las condiciones utilizadas.



**Figura 6.3** Variación en la proporción (%) de unidades formadoras de colonias (U.F.C.) en cultivo continuo de las cepas FJF414 y D517-4B, sujeto a control turbidostático por pH en YPD (▲), YPDE (5%) (■) o YPDE (10%) (●).



### Cultivos mantenidos en concentraciones crecientes de etanol

La selección de cepas altamente tolerantes a etanol a concentraciones fijas de este compuesto no conduce necesariamente a la selección de la cepa más apropiada para la producción de etanol ya que a distintas concentraciones de etanol son distintas las funciones que limitan la tasa de crecimiento (capítulo 3). Un sistema de selección en cultivo continuo permite sin embargo obtener aquellas cepas que crecen mejor a cualquier concentración de etanol. Para modificar la concentración de etanol, una vez alcanzado el equilibrio en el fermentador en medio sin etanol (YPD), o con una concentración de etanol determinada,  $r_0$ , (YPDE ( $r_0$  %)), se utiliza medio fresco YPDE suplementado con una concentración de etanol mucho mayor,  $R$  (YPDE ( $R$ %)). De esta forma, cuando se inicia el siguiente pulso de dilución de este medio durante un tiempo  $t$ , a una tasa de dilución  $D$ , se produce un aumento de la concentración de etanol en el medio de cultivo hasta un valor  $r_1$ , que puede calcularse a partir de la expresión  $r_1 = R (1 - e^{-Dt}) + r_0 (e^{-Dt})$  (desarrollado a partir de "Distribution of residence times in a chemostat, Pirt (65) ). En general, tras  $n$  pulsos de dilución, la concentración de etanol alcanzada es de  $r_n = R (1 - e^{-Dtn}) + r_0 (e^{-Dtn})$ .

Un cultivo en YPDE (10%) ( $r_0 = 10\%$ ) de la cepa FJF414, inicialmente equilibrado bajo control por pH, se sometió a esta serie alternante de pulsos con medio fresco YPDE enriquecido en etanol hasta un 18% ( $R = 18\%$ ). El primer pulso de medio fresco incrementó la concentración de etanol del cultivo y este efecto se vió inmediatamente reflejado en la tasa de crecimiento del cultivo y en la tasa de acidificación

(Fig. 6.4). Dichas tasas de crecimiento y acidificación fueron disminuyendo paulatinamente a lo largo de los sucesivos pulsos, cada uno de los cuales incrementaba la concentración de etanol del medio de cultivo (Fig. 6.4).

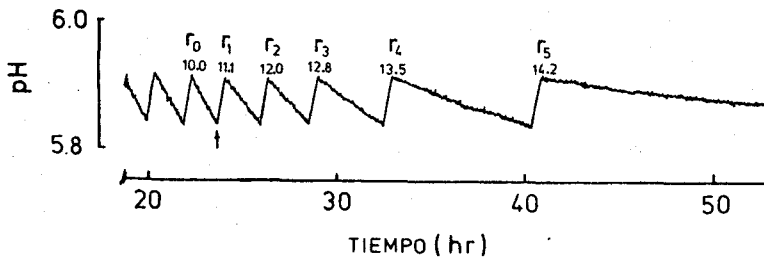


Figura 6.4. Registro de pH de un cultivo de la cepa FJF414 creciendo en YPDE (10%), sometido a control turbidostático por pH. Una vez que se alcanza un pH determinado ( $pH_c$ ), señalado con una flecha en la figura, el cultivo se somete a pulsos de dilución con medio fresco YPDE (18%). De este modo, la concentración de etanol del cultivo aumenta con cada pulso de dilución, mientras que la tasa de acidificación,  $A$ , disminuye. Los valores  $r_n$  indicados en la figura se refieren a la concentración final de etanol del cultivo, después de  $n$  pulsos de dilución.

El experimento se mantuvo durante cinco pulsos consecutivos al cabo de los cuales el crecimiento y la tasa de acidificación se hicieron cerc. De acuerdo con la ecuación anterior, tras cinco pulsos de dilución ( $n = 5$ ) de 0.3 h/pulso ( $t = 0.3$ ) a una tasa de dilución  $D = 0.5 \text{ h}^{-1}$ , la concentración de etanol debía ser  $r_5 = 14.2\%$ . Esta fué la máxima concentración de etanol que tolera el crecimiento. La medida experimental de etanol por los métodos descritos (43) dió una concentración en el cultivo de 12.5%. La diferencia encontrada entre el valor teórico calculado y el valor obtenido por determinación experimental podría deberse a efectos de evaporación que ha podido tener lugar a lo largo del experimento.

El sistema descrito permite por tanto la selección en cultivo mixto de aquella cepa que posee la mayor tasa de crecimiento a cualquier concentración de etanol. Mediante el sistema de la adición de medio enriquecido en etanol, la cepa o cepas seleccionadas al final del experimento poseen un amplio espectro de tolerancia a etanol que va desde la concentración inicial,  $r_0$ , a la final  $r_n$ , con unos valores de máxima tolerancia a todas y cada una de las concentraciones de etanol ensayadas.

### Competencia y selección en cultivos mixtos mantenidos en concentraciones crecientes de etanol

Los híbridos obtenidos tras el cruce de cepas no isogénicas son frecuentemente mejores que cualquiera de los parentales con respecto a la tolerancia a etanol. De acuerdo con estos resultados, 25 híbridos procedentes de cruces de cepas genéticas con esporas de cepas vínicas, descritos anteriormente, fueron inoculados en idénticas proporciones en el fermentador controlado por pH, con medio YPDE (2%). Tras el inóculo se inició el experimento de competencia utilizando en el tanque de alimentación, medio fresco YPDE (20%). Tras ocho días de incubación, la tasa de crecimiento de las cepas se hizo prácticamente cero y el cultivo había alcanzado una concentración de etanol real superior a 15%. De esta fase final del experimento se aislaron unas 1000 colonias en medio YPD sólido y se procedió a la caracterización de 10 de ellas, siguiendo métodos descritos en el capítulo 2.

Las diez colonias analizadas mostraron capacidad de formar velo. El análisis de los productos meióticos de estas cepas tras esporularlas dió una segregación 2:2 de los marcadores adenina y lisina, indicando que las cepas que se habían aislado, altamente tolerantes a etanol, procedían de híbridos de esporas de las cepas de flor FJF414 ó FJF206 y la cepa genética D517-4B.

### Producción de etanol por las cepas seleccionadas

Una de las colonias aisladas, tras el proceso de selección en cultivo continuo con pulsos y concentraciones crecientes de etanol en el medio, denominada FDHS, se utilizó para comprobar la capacidad de fermentar medio YPD suplementado con 30 y 45% de glucosa. Los resultados obtenidos se compararon con experimentos similares realizados con las cepas IFI256 y ACA4. La Fig. 6.5 expresa los resultados obtenidos con cada una de las tres cepas en YPD con 30 y 45% de glucosa. Con 30% de glucosa inicial, sólo la cepa FDHS fué capaz de utilizar todo el azúcar, produciendo

prácticamente la misma cantidad de etanol al final de la fermentación que la concentración máxima de etanol que permitió crecimiento en los experimentos de selección en cultivo continuo, por encima de 15%. Sólo esta cepa fué capaz de crecer, aunque pobremente, tras 20 horas de incubación en YPD con 30% de glucosa. En YPD con 45% de glucosa, también FDHS fué la única cepa que continuó creciendo tras 20 horas de incubación, siendo la concentración final de etanol obtenida similar a la producida a partir de YPD (30% p/v glucosa), aunque, la tasa de producción fué ligeramente menor. Esto pudo deberse al efecto sinérgico producido por altas concentraciones de sustrato y etanol sobre la cepa fermentante cuyos efectos inhibitorios son bien conocidos (56).

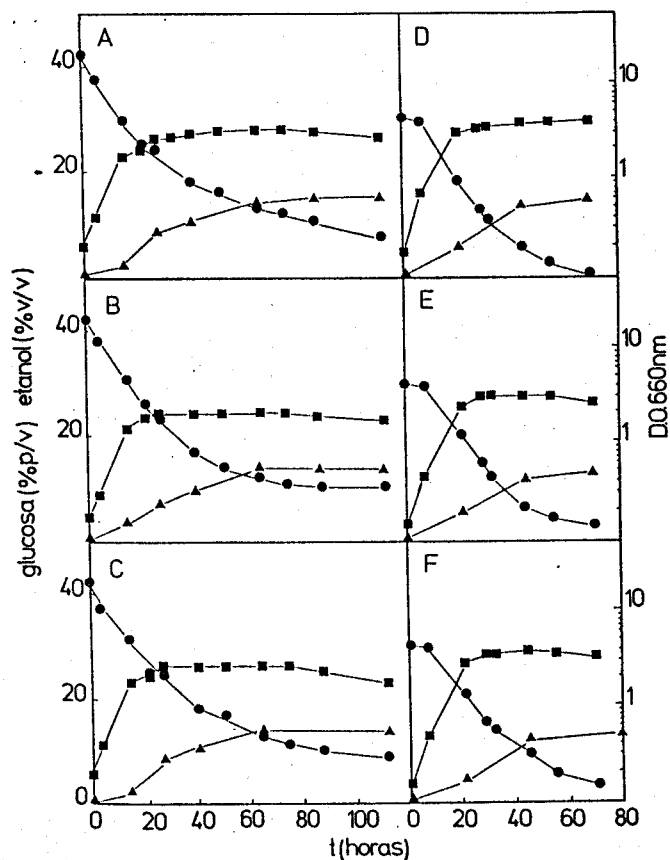


Figura 6.5. Crecimiento (■), consumo de glucosa (●), y producción de etanol (▲) de la cepa vínica ACA4 (C, F), la cepa vínica IFI256 (B, E), y el híbrido FDHS (A, D), cultivados en YPD (30% p/v glucosa) (D, E, F) e YPD (45% p/v glucosa) (A, B, C).

## DISCUSION GENERAL

Las levaduras vínicas son cepas que han estado sometidas a un proceso continuo de selección durante cientos de años (71), y en el que la alta concentración de etanol alcanzada durante la vinificación ha ejercido una presión selectiva importante. Posiblemente por ello, estas cepas fueron por término medio más resistentes a los efectos que sobre el crecimiento (capítulo 3), la supervivencia y la mutagenicidad (capítulo 4) ejerce el etanol.

La resistencia al efecto mutagénico del etanol (baja frecuencia de mutantes "petite") de las cepas vínicas posiblemente sea un factor determinante de su comportamiento en etanol. Este carácter, heredable extranuclearmente, genera una estabilidad respiratoria en condiciones extremas de etanol y temperatura, que posiblemente sea la responsable de la mayor supervivencia que presentan dichas cepas vínicas en estas condiciones, característica esta última que es también heredable extranuclearmente. (capítulo 4).

La capacidad respiratoria es esencial para sobrevivir en condiciones de vinificación con un alto contenido alcohólico. De hecho, el poder acceder a la superficie del medio de fermentación en la fase final de la producción de vinos, con concentraciones de etanol superiores a 15%, es imprescindible para mantener crecimiento y fermentación en el cultivo (70). Las levaduras de flor, responsables de esta última fase del proceso de vinificación en los vinos de Jerez (70), consiguen acceder a la superficie del líquido de fermentación gracias a su capacidad para formar velo (71). La consecuencia de la permanencia de las levaduras en la superficie del líquido de fermentación es un aumento de la respiración y el metabolismo oxidativo y un incremento de la tolerancia de las cepas a etanol (2,7).

Sorprendentemente, los mutantes "petite" ( [rho-] ) de las cepas de flor, son incapaces de formar velo (capítulos 3 y 4). De este resultado se deduce que la resistencia al efecto mutagénico del etanol que presentan las cepas vínicas (baja frecuencia de mutantes "petite") confiere a éstas no sólo una mayor capacidad respiratoria en presencia de etanol, puesto que siguen manteniendo mitocondrias funcionales, sino además la propiedad adicional de formar velo y por lo tanto poder permanecer en la superficie del medio fermentante con las ventajas que ello supone de una mayor oxigenación, una mayor tasa de metabolismo respiratorio y una supervivencia también más alta.

La capacidad respiratoria por lo tanto, es esencial para la supervivencia en condiciones extremas de etanol y temperatura. De hecho, la incapacidad respiratoria de Zymomonas mobilis ha sido considerada como el factor determinante de la fuerte inhibición que ejercen concentraciones superiores a 8% de etanol sobre esta bacteria (38).

La importancia que tiene la supervivencia en la fermentación realizada con células inmovilizadas o recicladas, en condiciones industriales con altas concentraciones de etanol, donde el crecimiento es cero, y el hecho de que la supervivencia en altas concentraciones de etanol tenga su base en el genoma mitocondrial, hace que en la mejora genética de cepas para la producción de etanol haya que considerar la selección de genomas mitocondriales apropiados como factor fundamental para que la mejora surta efecto.

Los genes nucleares determinan la capacidad de crecer y de fermentar en condiciones menos extremas de etanol y temperatura (capítulo 3). Sin embargo, los genes que limitan el crecimiento son muchos y distintos en distintas cepas y a distintas concentraciones de etanol (capítulo 3). El alto número de genes implicados en la tolerancia, dificulta en principio el poder localizar fisiológicamente una función concreta que sea la responsable

de la inhibición del crecimiento. No obstante, la relación existente entre la tolerancia del crecimiento a etanol y la capacidad del etanol de alterar la membrana celular (capítulo 5) sugiere que al menos algunas de estas funciones están localizadas en la membrana plasmática. Aunque la composición lipídica es importante en la determinación de la tolerancia de las membranas a etanol, no es descartable que el componente proteico tenga también un papel importante en la determinación de dicha tolerancia (capítulo 5).

El número de genes que determinan funciones cuya inhibición da como resultado sensibilidad a etanol es enormemente alto. De hecho, este número es probablemente mayor que el número de genes capaces de determinar auxotrofías en las células. Este razonamiento se basa en el hecho de que, si las cepas vínicas analizadas han acumulado mutaciones aleatorias, la probabilidad de que estas mutaciones afecten a genes implicados en la tolerancia al etanol es mucho mayor que la probabilidad de afectar a genes implicados en deficiencias nutricionales. En todos los casos estudiados, las cepas que se analizaron presentaron segregación para la tolerancia al etanol. Sin embargo, sólo las cepas de flor presentaron heterocigosis para un gen de auxotrofia.

Aunque cualquier gen podría en principio mutar a una forma alélica más sensible a etanol(3) los resultados obtenidos sugieren que al menos algunas de las funciones de estos genes están localizadas en la membrana plasmática y codificadas por genes nucleares. Estos genes nucleares son los que, esencialmente, determinan la tolerancia del crecimiento a etanol en concentraciones bajas de este compuesto. Otras funciones, algunas de ellas localizadas en la membrana mitocondrial, están codificadas por genes mitocondriales, están probablemente relacionadas con la estabilidad del ADN mitocondrial y son las responsables de la supervivencia de las células en condiciones extremas de etanol y temperatura.

Los experimentos de complementación realizados con cepas vínicas y cepas genéticas y el análisis de las meiosis de estas cepas permiten sugerir que la diferencia en tolerancia a etanol entre esporas vínicas y cepas de laboratorio está determinada por un número relativamente pequeño de genes, aunque el número de genes debe aumentar notablemente para llegar a niveles de tolerancia como los obtenidos en un híbrido. Estos genes determinantes de la tolerancia son distintos en las distintas cepas. De aquí que la hibridación entre cepas no consanguíneas diera como resultado una mejora notable de la tolerancia a etanol al complementar las funciones de los distintos genes implicados en la tolerancia. La hibridación de cepas no consanguíneas debe ser el mejor método práctico para generar nuevas cepas más tolerantes a etanol que los respectivos parentales. La selección en condiciones apropiadas de cultivo continuo, con un amplio espectro de concentraciones de etanol durante el proceso de selección, ha permitido la obtención de híbridos capaces de crecer a concentraciones de etanol superiores a 15%, 1-2% de etanol por encima de la concentración que tolera el crecimiento de cualquiera de las cepas vínicas. Estos híbridos llegan a producir por fermentación de glucosa la misma concentración final de etanol que tolera el crecimiento en los experimentos de selección.

Aunque existen otros organismos capaces de crecer a concentraciones superiores de etanol (38), las levaduras como Saccharomyces cerevisiae y especies afines posiblemente tengan un límite biológico en cuanto a la concentración de etanol que pueden tolerar que no debe estar muy lejos de las concentraciones que toleran los híbridos seleccionados. Cualquier mejora adicional probablemente requiere numerosos ciclos de mutación-hibridación-selección. Esto, unido al efecto generalizado que ejerce el etanol sobre las levaduras, sugiere que la obtención de cepas mucho más tolerantes a etanol que las ya seleccionadas es un hecho altamente improbable.



APENDICES

APENDICE IC E P A S

Las cepas utilizadas en este trabajo aparecen descritas en la Tabla I. La nomenclatura empleada para la designación de genotipos se basa en las recomendaciones elaboradas en la "IV International Conference on Yeast Genetics", recogidas en el Yeast Genetics Supplement (Microbial Genetics Bulletin nº 31, 1969). Los genes se designan con tres letras que hacen referencia a la actividad fisiológica que determinan, seguidas de un número. Los alelos se designan con otro número separado del anterior por un guión. Los alelos cuyo fenotipo sea dominante se escriben con mayúsculas; los recesivos con minúsculas. En este trabajo se utilizan las designaciones genéticas siguientes:

ADE HIS URA LYS LEU MET: son genes implicados en las rutas biosintéticas de los aminoácidos y bases a los que corresponde cada abreviatura. Las mutaciones en estos genes producen auxotrofia para ese aminoácido o base.

MAL GAL SUC: son genes implicados en la fermentación de maltosa, galactosa y sacarosa, respectivamente.

MAT<sub>x</sub> y MAT<sub>a</sub>: son alelos del gen MAT y determinan el sexo

CUP: es un gen que determina resistencia al cobre

KAR: son genes relacionados con la cariogamia. Las mutaciones en estos genes impiden la fusión nuclear tras la conjugación

NYS CYH CAN ETH: son genes relacionados con la resistencia a nistatina cicloheximida, canavanina y etionina respectivamente.

[RHO-]: son mutaciones en el ADN mitocondrial que hacen a las células que las llevan defectuosas en la respiración.

Los signos adicionales que aparecen como superíndices en los fenotipos son: + para los fenotipos silvestres; - para los fenotipos mutantes; R resistencia a un inhibidor; S sensibilidad a un inhibidor.

Todas las cepas descritas en esta Tabla son [rho+] excepto donde se especifica, que son [rho-].

HO y ho son alelos del gen HO, determinante del homotalismo.

Tabla I. Relación de cepas utilizadas en este trabajo

Denominación	Especie <sup>(1)</sup>	Genotipo	Origen
ACA4	<u>Torulaspóra delbrueckii</u>	<u>MAT<math>\alpha</math>/MATa</u> <u>HO/HO</u>	ACA
ACA21	<u>Saccharomyces sp.</u>	<u>MAT<math>\alpha</math>/MATa</u> <u>HO/HO</u> <u>suc/suc</u>	ACA
ACA167	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	ND	ACA
ACA174	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math>/MATa</u> <u>HO/HO</u>	ACA
ACA346	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	ND	ACA
IFI82	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math>/MATa</u> <u>HO/HO</u> <u>suc/suc</u>	VA
IFI256	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math>/MATa</u> <u>HO/HO</u>	VA
FJF206	<u>Torulaspóra delbrueckii</u>	<u>MAT<math>\alpha</math>/MATa</u> <u>ho/ho</u> <u>MET/met</u>	JC
FJF414	<u>Torulaspóra pretoriensis</u>	<u>MAT<math>\alpha</math>/MATa</u> <u>ho/ho</u> <u>MET/met</u>	JC
FSP414	<u>Torulaspóra pretoriensis</u>	ND	Este trabajo (Esporas de FJF414)
FSP414/1	" "	ND	Este trabajo (Espora de FJF414)
FSP414/2	" "	ND	"
FSP414/3	" "	ND	"
FSP414/4	" "	ND	"
FSP414/5	" "	ND	"
FSP414/6	" "	<u>MAT<math>\alpha</math></u>	"
FSP414/7	" "	ND	"
FSP206/1	<u>Torulaspóra delbrueckii</u>	ND	Este trabajo (Espora de FJF206)
D517-4B	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MATa</u> <u>ade2</u> <u>lys9</u>	JC
D517-4BC	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MATa</u> <u>ade2</u> <u>lys9</u> <u>cyh<sup>R</sup></u>	Este trabajo (Mutante Cyh <sup>R</sup> de D517-4B)
D273-11A	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math></u> <u>ade1</u> <u>his1</u>	JC
X30-3C	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math></u> <u>ade2-1</u> <u>his4-<math>\Delta</math>15</u>	ILC
FDH1	Híbrido <u>Sacch. cerevisiae/</u> <u>T. pretoriensis</u>	ND	Este trabajo (Diploide entre FSP414/6 y D517-4B)
FXH1	Híbrido <u>Sacch. cerevisiae/</u> <u>T. pretoriensis</u>	ND	Este trabajo (Diploide entre FSP414/6 y X30-3C)

Tabla 1. (Continuación)

Denominación	Especie <sup>(1)</sup>	Genotipo	Origen
FDHS	Híbrido <u>Sacch. cerevisiae/</u> <u>T. delbrueckii</u> ó <u>T. pretoriensis</u>	ND	Este trabajo (Diploide entre D517-48 y una espo- ra de FJF206 ó FJF414)
MMY1	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math> ura3-<math>\Delta</math>52 cyh<sup>R</sup></u>	RB
ABQ21	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math> his4-<math>\Delta</math>15 ade2-1</u> <u>can<sup>R</sup> nys<sup>R</sup> kar1-2</u>	JP
ABQ21 [rho-]	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math> his4-<math>\Delta</math>15 ade2-1</u> <u>can<sup>R</sup> nys<sup>R</sup> kar1-2 [rho-]</u>	Este trabajo (Mutante [rho-] de ABQ21)
ABQ21-H1	Heteroplasmonte <u>Sacch. cerevisiae/</u> <u>Sacch. sp.</u>	<u>MAT<math>\alpha</math> his4-<math>\Delta</math>15 ade2-1</u> <u>can<sup>R</sup> nys<sup>R</sup> kar1-2</u>	Este trabajo (Heteropl. núcleo ABQ21 [rho-] / citopl. ACA21)
ABQ21-N	Heteroplasmonte <u>Sacch. cerevisiae/</u> <u>Sacch. cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math> his4-<math>\Delta</math>15 ade2-1</u> <u>can<sup>R</sup> nys<sup>R</sup> kar1-2</u>	Este trabajo (Heteropl. núcleo ABQ21 [rho-] / citopl. ABQ21)
ES6	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math> leu2-1 eth<sup>R</sup></u>	JP
ES6 [rho-]	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math> leu2-1 eth<sup>R</sup> [rho-]</u>	Este trabajo (Mutante [rho-] de ES6)
ES6-H	Heteropl. <u>Sacch. cerevisiae/</u> <u>Sacch. cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math> leu2-1 eth<sup>R</sup></u>	Este trabajo (Heteropl. núcleo ES6 [rho-] / citopl. ABQ21)
K5-5A	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math> his4-<math>\Delta</math>15 ade2-1</u> <u>can1 kar1-1</u>	JC
DS8	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math> mal/mal gal2/gal2</u> <u>SUC2/SUC2 CUP1/CUP1</u>	AAL
RBV-D5A	<u>Saccharomyces cerevisiae</u>	<u>MAT<math>\alpha</math>/MAT<math>\alpha</math></u>	RB

(1)

"The Yeast, A Taxonomic Study". N.I.W.Kreger-van Rij (Ed.), 3ª edición, 1984.

ACA = Alberto Casas Asín, Departamento de Microbiología, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

VA = Victor Arroyo, Instituto de Fermentaciones Industriales, Madrid.

JC = Jaime Conde, La Cruz del Campo, S.A., Sevilla.

ILC = Isabel López Calderón, Departamento de Genética, Facultad de Biología, Universidad de Sevilla.

AAL = Andrés Aguilera López, Departamento de Genética, Facultad de Biología,  
Universidad de Sevilla.

RB = Richard Bailey, Solar Energy Research Institute, Golden, CO E.E.U.U.

JP = Julio Polaina, Departamento de Genética, Facultad de Biología,  
Universidad de Sevilla.

APENDICE IIMEDIOS DE CULTIVO

El cultivo y mantenimiento de las cepas se realizó en los medios siguientes:

Medios líquidos:

**Medio nutritivo (YPD):** Extracto de levadura (Difco), 1%; peptona, 2% y glucosa, 2% (Sherman et al. 1979). La glucosa se esterilizó por separado.

**Medio nutritivo con etanol (YPDE):** Extracto de levadura (Difco), 2%; peptona, 4% y glucosa, 4%. Este medio se diluyó al 50% con una solución de etanol en agua en la cual la concentración de etanol era el doble de la concentración final en el medio.

**Medio nutritivo con maltosa (YPM):** Extracto de levadura (Difco), 1%; peptona, 2% y maltosa, 1.5%.

**Medio nutritivo con glucosa y glicerol (YPDG):** Extracto de levadura (Difco), 1%; peptona, 2%; glucosa, 0.1% y glicerol, 3%.

**Medio de respiración (YPG):** Extracto de levadura (Difco) 1%; peptona, 2% y glicerol, 3%.

**Medio mínimo (YNBD):** "Yeast Nitrogen Base" sin aminoácidos (Difco), 0.67%; glucosa, 2%. La glucosa se esterilizó por separado.

**Medio mínimo con etanol (YNBDE):** "Yeast Nitrogen Base" sin aminoácidos (Difco), 1.34%; glucosa, 4%. El medio se diluyó al 50% con una solución de etanol en agua en la cual la concentración de etanol era el doble de la concentración final en el medio.

**Medio mínimo con fuente de carbono limitante (YNB):** "Yeast Nitrogen Base" sin aminoácidos (Difco), 0.67%.

**Medio mínimo con fuentes de carbono y de nitrógeno limitantes (YB):** "Yeast Nitrogen Base" sin aminoácidos ni sulfato amónico (Difco), 0.17%; sulfato de amonio, 0.1%.

Medios sólidos:

**Medio nutritivo (YPD):** Igual que el descrito en el apartado anterior, suplementado con 2% de agar.

**Medio mínimo (YNBD):** Igual al descrito en el apartado anterior más 2% de agar. En los casos necesarios se suplementó con aminoácidos y bases a las concentraciones indicadas por Sherman et al. (1979), con nistatina a concentraciones de 2 µg/ml, canavanina a una concentración de 60 µg/ml, etionina a 1 mM y cicloheximida a 50 µg/ml.

**Medio nutritivo con etanol (YPDE):** Al medio nutritivo YPD enfriado al máximo antes de la gelificación (unos 45°C) se añadió el etanol en la cantidad indicada en cada caso. Las cajas se conservaron a 4°C en atmósfera de etanol.

**Medio mínimo con etanol (YBDE):** Como el descrito anteriormente para el medio nutritivo, pero utilizando el medio YNBD ya descrito.

**Medio de respiración (YPG):** Extracto de levadura (Difco), 1%; peptona, 2%; agar, 2%; glicerol, 2%.

**Medio de esporulación (SPO):** Extracto de levadura, 0.1%; acetato potásico, 1%; glucosa, 0.05%, agar 2%.

APENDICE IIIPRODUCTOS QUÍMICOS

Los productos químicos utilizados en este trabajo y su procedencia fueron los siguientes:

biotina, cicloheximida, aminoácidos (metionina, histidina etc.), canavanina, nistatina, etionina, bromuro de etidio, invertasa, casaminoácidos y deshidrogenasa del alcohol, Sigma Chemical Company, St. Louis, Missouri, E.E.U.U.

helicasa (Suc d'Helix pomatia), L' Industrie Biologique Française, Clichy, Francia.

etanol, tolueno, ter-butanol, SDS (dodecil sulfato sódico), e isopropanol, E. Merck AG, Darmstadt, Alemania.

sacarosa, glucosa, maltosa, fosfato diamónico, Panreac, S.A. Barcelona.

Yeast Nitrogen Base y Yeast Extract, Difco Laboratories, Detroit, Michigan, E.E.U.U.



## BIBLIOGRAFIA

1. Aguilera, A. (1983). Fisiología y genética de la tolerancia a etanol en Saccharomyces cerevisiae. Tesis doctoral, Universidad de Sevilla.
2. Aguilera, A., Benítez, T. (1985). Role of mitochondria in ethanol tolerance of Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 142: 389-392.
3. Aguilera, A., Benítez, T. (1986). Ethanol-sensitive mutants of Saccharomyces cerevisiae. Arch. Microbiol. 143: 337-344.
4. Aiba, S., Shoda, M., Nagatani, M. (1968). Kinetics of product inhibition in alcohol fermentation. Biotechnol. Bioeng. 10: 845-864.
5. Anderson, P.J., MacNeil, K., Watson, K. (1986). High-efficiency carbohydrate fermentation to ethanol at temperatures above 40°C by Kluyveromyces marxianus isolated from sugar mills. Appl. Environm. Microbiol. 51: 1314-1320.
6. Bajpai, P.K., Margaritis, A. (1986). Effect of temperature and pH on immobilized Zymomonas mobilis for continuous production of ethanol. Biotechnol. Bioeng. 28: 824-828.
7. Bandas, E.L., Zakharov, I.A. (1980). Induction of rho- mutations in yeast Saccharomyces cerevisiae by ethanol. Mut. Res. 71: 193-199.
8. Beaven, M.J., Charpentier, C., Rose, A. (1982). Production and tolerance of ethanol in relation to phospholipid fatty-acyl composition in Saccharomyces cerevisiae NCYC 431. J. Gen. Microbiol. 128: 1447-1455.
9. Benítez, T., del Castillo, L., Aguilera, A., Conde, J., Cerdá-Olmedo, E. (1983). Selection of wine yeasts for growth and fermentation in the presence of ethanol and sucrose. Appl. Environm. Microbiol. 45: 1429-1436.
10. Benschoter, A.S., Ingram, L.O. (1986). Thermal tolerance of Zymomonas mobilis: temperature-induced changes in membrane composition. Appl. Environm. Microbiol. 51: 1278-1284.
11. Borst, P., Grivell, L.A. (1978). The mitochondrial genome of yeast. Cell 15: 705-723.
12. Bottema, C.K., Parks, L.K. (1980). Sterol analysis of the inner and outer mitochondrial membranes in yeast. Lipids 15: 987-993.
13. Brown, S.W., Oliver, S.G. (1983). Isolation of ethanol tolerant mutants of yeast by continuous selection. Eur. J. Appl. Microbiol. 16: 119-122.
14. Buttke, T.M., Ingram, L.O. (1978). Mechanism of ethanol-induced changes in lipid composition of E. coli: inhibition of saturated fatty acid synthesis in vivo. Biochem. 17: 637-644.
15. Cabeça-Silva, C., Madeira-Lopes, A., van Uden, N. (1982). Temperature relations of ethanol-enhanced petite mutation in Saccharomyces cerevisiae: mitochondria as targets of thermal death. FEMS Microbiol. Lett. 15: 149-151.
16. Calderón, I.L., Cerdá-Olmedo, E. (1983). Induction by N-methyl-N'-nitrosoguanidine of nuclear and cytoplasmic mutations in Saccharomyces cerevisiae. Mut. Res. 108: 133-146.
16. Cánovas, J.L., Tresguerres, E.F., Yousif, A.M.E., López-Sáez, J.F., Navarrete, M. (1984). DNA segregation in E. coli cells with 5-bromodeoxyuridine-substituted nucleotids. J. Bacteriol. 158: 128-133.

17. Clark-Walker, G.D., Evang, R.T. (1985). Elevated levels of petite formation in strains of Saccharomyces cerevisiae restored to respiratory competence. II Organization of mitochondrial genome in strains having high and moderate frequencies of petite mutant formation. Genetics 111: 403-432.
18. Conde, J., Fink, G. (1976). A mutant of Saccharomyces cerevisiae defective for nuclear fusion. Proc. Nat. Acad. Sci. USA 73: 3651-3655.
19. Day, A., Anderson, E., Martin, P.A. (1975). Ethanol tolerance of brewing yeasts. Eur. Brew Conv. Proc. Congr. Elsevier Scientific Publishing Co., Amsterdam, pp. 377-391.
20. Dekker, D.F.H. (1986). Lipid-enhanced ethanol production from xylose by Pachysolen tannophilus. Biotechnol. Bioeng. 28: 605-608.
21. del Castillo, L. (1985). Genetic aspects of ethanol tolerance and production by Saccharomyces cerevisiae. Curr. Microbiol. 12: 122-129.
22. del Castillo, L. (1984). Obtention of heterothallic mutants from homothallic wine yeasts: application to hybridization for industrial purposes. Curr. Microbiol. 11: 261-264.
23. Dombek, K.M., Ingram, L.O. (1984). Effects of ethanol on the Escherichia coli plasma membrane. J. Bacteriol. 157: 233-239.
24. Dujon, B. (1983). Mitochondrial genes, mutants and maps: a review. En: Mitochondria 1983. Sheweyen, R.J., Wolf, K., Kavdewitz, F. eds. W. de Guyter and Co., Berlin, pp. 1-24.
25. Fujimura, M., Yanagishima, H. (1983). Mating-type-specific cell arrest and shmoo formation by  $\alpha$ -pheromone of Saccharomyces cerevisiae in Hansenula wingei. Arch. Microbiol. 136: 79-80.
26. Gjermansen, C., Sigsgaard, P. (1981). Construction of a hybrid brewing strain of Saccharomyces carlsbergensis by mating of meiotic segregants. Carlsberg Res. Comm. 46: 1-11.
27. Gomori, G. (1955). Preparation of buffers for use in enzyme studies. Methods Enzymol. 1: 138-146.
28. Grisham, C.M., Barnett, R.E. (1973). The effects of long-chain alcohols on membrane lipids and the  $(Na^+ + K^+)$  ATPase. Biochim. Biophys. Acta 311: 417-422.
29. Guidobon, G.E. (1984). Continuous fermentation systems for alcohol production. Enzyme Microbiol. Technol. 6: 194-200.
30. Guijarro, J.M., Lagunas, R. (1984). Saccharomyces cerevisiae does not accumulate ethanol against a concentration gradient. J. Bacteriol. 160: 874-878.
31. Harding, P.I., Obi, E.I., Slaughter, J.C. (1984). The potential action of NH as stimulator of ethanol production by Saccharomyces cerevisiae. FEMS Microbiol. Lett. 21: 185-187.
32. Hayashida, S., Feng, D.D., Hongo, M. (1975). Physiological properties of yeast cells grown in the proteolipid-supplemented media. Agr. Biol. Chem. 39: 1025-1031.
33. Hayashida, S., Ohta, K. (1981). Formation of high concentration of alcohol by various yeasts. J. Inst. Brew. 87: 42-44.
34. Hicks, J.B., Herskowitz, I. (1976). Interconversion of yeast mating types. I Direct observations of the action of the homothallism (HO) gene. Genetics 83: 245-258.

35. Holzberg, J., Finn, R.K., Steinkraus, K.H. (1967). A kinetic study of the alcoholic fermentation of grape juice. *Biotechnol. Bioeng.* 9: 413-427.
36. Idris, E.T.A., Berry, D.R. (1980). Selection of thermotolerant yeast strains for biomass production from sudanese molasses. *Biotechnol. Lett.* 2: 61-66.
37. Ingram, L.O. (1977). Preferential inhibition of phosphatidyl ethanolamine synthesis in *E. coli* by alcohols. *Can. J. Microbiol.* 23: 779-789.
38. Ingram, L.O., Buttke, I.M. (1984). Effects of alcohols on microorganisms. *Advances Microb. Physiol.* 25: 253-300.
39. Ismail, A.A., Ali, A.M.M. (1971). Selection of high ethanol-yielding *Saccharomyces*. I. Ethanol tolerance and the effect of training in *Saccharomyces cerevisiae* Hansen. *Folia Microbiol.* 16: 346-349.
40. Ismail, A.A., Ali, A.M.M. (1971). Selection of high ethanol-yielding *Saccharomyces*. II. Genetics of ethanol tolerance. *Folia Microbiol.* 16: 350-354.
41. Jain, U.K., Toran-Díaz, I., Barratti, J. (1985). Preparation and characterization of immobilized growing cells of *Zymomonas mobilis* for ethanol production. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 273-279.
42. Jensen, R.E., Herskowitz, I. (1984). Directionality and regulation of cassette substitution in yeast. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 49: 97-104.
43. Kaplan, N.O., Giotti, M.M. (1957). Enzymatic determination of ethanol. *Methods Enzymol.* 3: 253-255.
44. Keim, C.R. (1983). Technology and economics of fermentation alcohol- an update. *Enzyme Microbiol. Technol.* 5: 103-114.
45. Leao, C., van Uden, N. (1983). Effects of ethanol and other alkanols on the ammonium transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2085-2088.
46. Leao, C., van Uden, N. (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the kinetics and the activation parameters of thermal death on *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 1581-1590.
47. Leao, C., van Uden, N. (1982). Effects of ethanol and other alkanols on the glucose transport system of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Bioeng.* 24: 2601-2604.
48. Leao, C., van Uden, N. (1984). Effects of ethanol and other alkanols on passive proton influx in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta.* 774: 43-48.
49. Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randal, R.J. (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Bio. Chem.* 193: 265-275.
50. Loureiro, V., Ferreira, H.G. (1983). On the intracellular accumulation of ethanol in yeast. *Biotechnol. Bioeng.* 25: 2263-2269.
51. Luong, J.H.T. (1985). Kinetics of ethanol inhibition in alcohol fermentation. *Biotechnol. Bioeng.* 27: 280-285.
52. Lyons, T.P. (1983). Ethanol production in developed countries. *Proc. Biochem.* 4: 18-25.
53. Llorente, P., Sols, A. (1969). Ethanol inactivation of glycolytic enzymes in yeasts with different alcohol resistance. 6th FEBS Meeting, Madrid.

54. Margaritis, A., Bajpai, P. (1982). Continuous ethanol production from Jerusalem artichoke tubers. I Use of free cells of Kluyveromyces marxianus. Biotechnol. Bioeng. 24: 1473-1482.
55. Matsumara, M., Märkl, H. (1986). Elimination of ethanol inhibition by perstraction. Biotechnol. Bioeng. 28: 534-541.
56. Moulin, G., Boze, P., Galzy, P. (1981). A comparative study of the inhibitory effect of ethanol and substrate on the fermentation rate of the parent and a respiratory-deficient mutant. Biotechnol. Lett. 3: 351-356.
57. Myers, A.L., Pape, L.K., Izasoloff, A. (1985). Mitochondrial protein synthesis is required for maintenance of intact mitochondrial genome in Saccharomyces cerevisiae. EMBO J. 4: 2087-2092.
58. Nagley, P., Linnane, A.W. (1978). Expression of mitochondrial DNA in Saccharomyces cerevisiae: the construction of sets of isonuclear haploid strains containing different specified mitochondrial genomes. Biochim. Biophys. Res. Comm. 85: 585-592.
59. Newlon, L.S., Ludescher, R.D., Walter, S.K. (1979). Production of Saccharomyces cerevisiae defective in DNA synthesis. Mol. Gen. Genet. 169: 189-194.
60. Nilsson-Tillgren, T., Gjermansen, C., Kielland-Brandt, M.C., Petersen, I.G.L., Holmberg, S. (1981). Genetic differences between Saccharomyces carlsbergensis and Saccharomyces cerevisiae. analysis of chromosome III by singer chromosome transfer. Carlsberg Res. Comm. 46: 65-76.
61. Novack, M., Strehaiano, P., Moreno, M. (1981). Alcoholic fermentation: on the inhibitory effect of ethanol. Biotechnol. Bioeng. 23: 201-211.
62. Oshima, T., Takano, I. (1980). Mutants showing heterothallism from homothallic strains of Saccharomyces cerevisiae. Genetics 94: 841-847.
63. Panchal, C.I., Stewart, G.G. (1980). The effect of osmotic pressure on the production and excretion of ethanol and glycerol by a brewing yeast strain. J. Inst. Brew. 86: 207-210.
64. Park, Y.K., Sato, H.P. (1982). Fungal invertase as an aid for fermentation of cane molasses into ethanol. Appl. Environm. Microbiol. 44: 988-989.
65. Parry, E.M., Cox, B.S. (1970). The tolerance of aneuploidy in yeast. Genet. Res. Cambridge 16: 333-340.
66. Pirt, S.T. (1975). Principles of microbe and cell cultivation. Blackwells Scientific Publications, Oxford.
67. Roels, J.A., Jöbses, I.M.L. (1986). The inhibition of the maximum specific growth and fermentation rate of Zymomonas mobilis by ethanol. Biotechnol. Bioeng. 28: 554-563.
68. Sá-Correia, I., van Uden, N. (1986). Ethanol-induced death of Saccharomyces cerevisiae at low and intermediate growth temperatures. Biotechnol. Bioeng. 28: 301-303.
69. Sá-Correia, I. (1986). Synergistic effects of ethanol, octanoic and decanoic acids on the kinetics and the activation parameters of thermal death in Saccharomyces bayanus. Biotechnol. Bioeng. 28: 761-763.

70. . Sancho, E.D., Hernández, E., Rodríguez-Najarro, A. (1986). Presumed sexual isolation in yeast populations during production of sherrylike wine. *Appl. Environm. Microbiol.* 51: 395-397.
71. Santa María, J., Vidal, D. (1973). Genetic control of "flor" formation by Saccharomyces. *J. Bacteriol.* 113: 1078-1080.
72. Seeman, P. (1972). The membrane action of anesthetics and tranquilizers. *Pharmacol. Rew.* 24: 583-655.
73. Seki, T., Myoga, S., Limtong, S., Vedono, S., Kumnuanda, J., Taguchi, M. (1983). Genetic construction of yeast strains for high ethanol production. *Biotechnol. Lett.* 5: 351-356.
74. Sherman, F., Lawrence, C.W. (1974). Saccharomyces. *En: Handbook of genetics*. R.C. King, ed. Vol. 1. Plenum Press, Nueva York, pp. 359-393.
75. Sherman, F., Fink, G.R., Lawrence, C.W. (1979). *Methods in yeast genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, Nueva York.
76. Singler, K., Knotková, A., Kotyk, A. (1981). Factors governing substrate-induced generations and extrusion of protons in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Biochim. Biophys. Acta.* 643: 572-582.
77. Slonowski, P.P., Perrodin, G., Groft, J.H. (1968). Ethidium bromide induced mutation of yeast mitochondria: complete transformation cells into respiratory deficient non chromosomal "petite". *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 30: 232-239.
78. Spencer, J.F.T., Bizeau, C., Reynolds, N., Spencer, D.M. (1985). The use of mitochondrial mutants in hybridization of industrial yeast strains. *Curr. Genet.* 9: 649-652.
- 78<sub>b</sub>. Stern, D.B., Lousdale, D.M. (1982). Mitochondrial and chloroplast genomes of maize have a 12-kilobase DNA sequence in common. *Nature* 299: 698-702.
79. Stewart, G.G. (1981). The genetic manipulation of industrial yeast strains. *Can. J. Microbiol.* 27: 973-990.
80. Suzzi, G., Romano, P., Zambonelli, C. (1984). Flocculation of wine yeasts: frequency, differences and stability of the character. *Can. J. Microbiol.* 30: 36-39.
81. Thomas, D.S., Hossack, J.A., Rose, A.H. (1978). Plasma-membrane lipid composition and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae. *Arch. Microbiol.* 117: 239-245.
82. Thomas, D.S., Rose, A.H. (1979). Inhibitory effect of ethanol on growth and solute accumulation by Saccharomyces cerevisiae as affected by plasma-membrane lipid composition. *Arch. Microbiol.* 122: 49-55.
83. van Uden, N. (1971). Kinetics and energetics of yeast growth. *En: The Yeasts*. A.H. Rose, J.J. Harrison, eds. Vol 2. Academic Press, Londres, pp. 75-118.
84. van Uden, N. (1985). Ethanol toxicity and ethanol tolerance in yeasts. *Ann. Rep. Ferment. Proc.* 8: 11-58.
85. van Uden, N. (1984). Temperature profiles of yeasts. *Adv. Microbiol. Physiol.* 25: 195-248.

86. Weffenbach, B., Rogers, D.T., Haber, J.E., Zoller, M., Russell, R.W., Smith, M. (1983). Deletion and single base pair changes in the yeast mating type locus that prevent homothallic mating type conversion. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 80: 3401-3405.
87. Zamaroczy, M., Faugeron-Fonty, G., Bernardi, G. (1983). Excision sequences in the mitochondrial genome of yeast. *Gene* 21: 193-202.

## AGRADECIMIENTOS

A todos los miembros del Departamento de Genética de la Universidad de Sevilla, mi más sincero agradecimiento.

A Andrés Aguilera e Isabel López-Calderón, cuyas sugerencias y discusiones han resultado de especial relevancia en el desarrollo y redacción de esta Tesis.

A Curro Rivero, Javier Avalos, Eduardo Rodríguez, Paco Rodríguez Luis Miguel Salgado, Asunción Contreras, Asunción F. Estefane, Eduardo Santero, Paco Luque, Josep Casadesus, Maria Tortolero y Juan Ramón Medina, a Cayo, Bea, Corro y Enca, cuya mera presencia ha supuesto de una u otra forma una nota cordial en el transcurso de este trabajo.

A E. Cerdá-Olmedo, Jaime Conde y N. van Uden, cuya opinión ha marcado las directrices de este trabajo en diversas fases del mismo.

A personas ajenas a este trabajo, como Jose M<sup>a</sup> Barrientos o Isabel M<sup>a</sup> Alonso, que han aireado frecuentemente mis inclemencias anímicas.

La dirección de esta Tesis ha generado de forma continua, una fuerte motivación al desarrollo de la misma, con una amistad y entusiasmo difícilmente superables. A Tahía Benítez Fernández.

Reunido el Tribunal integrado por los señores [illegible]  
el día de la fecha, para juzgar la Tesis

D. Juan Quintanilla Martínez  
Título: "Caracterización genética de cepas de le-  
vaduras para la producción industrial de Etanol"

Se le otorga la calificación de Apto "cum laude"

Sevilla, 9 de Octubre

1986

Vocal.

El Vocal.

El Vocal.

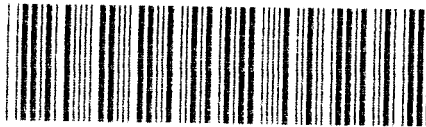
El Presidente.

El Secretario.

El Decano.

J. Verdá Olmedo

Pedro Gaudin Guaco



500293272

FBI E TO-101

293 272