

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE
CEPAS VÍNICAS DE SACCHAROMYCES SP. INFLUENCIA
EN SU COMPORTAMIENTO DURANTE LA VINIFICACIÓN

AURORA ZUZUARREGUI MIRÓ

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2005

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 6 de Maig de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Enrique Herrero Perpiñán
- D^a. Ana Isabel Briones Pérez
- D^a. Concha Gil García
- D. Nabil Khayyat Khury
- D. José Enrique Pérez - Ortín

Va ser dirigida per:

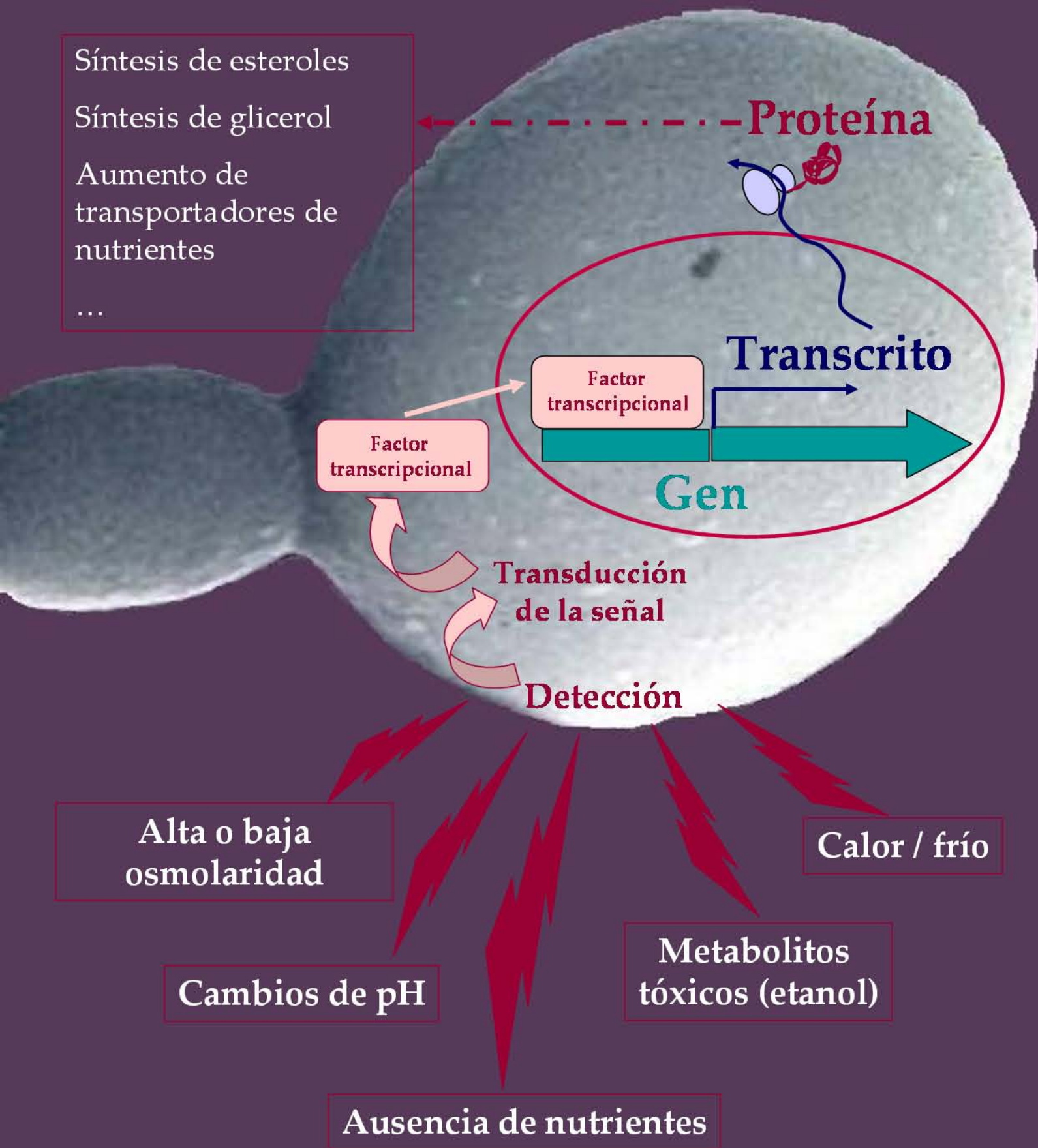
D. Marcel·lí del Olmo Muñoz

©Copyright: Servei de Publicacions
Aurora Zuzuarregui Miró

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6278-0

Edita: Universitat de València
Servei de Publicacions
C/ Artes Gráficas, 13 bajo
46010 València
Spain
Telèfon: 963864115



Tesis Doctoral

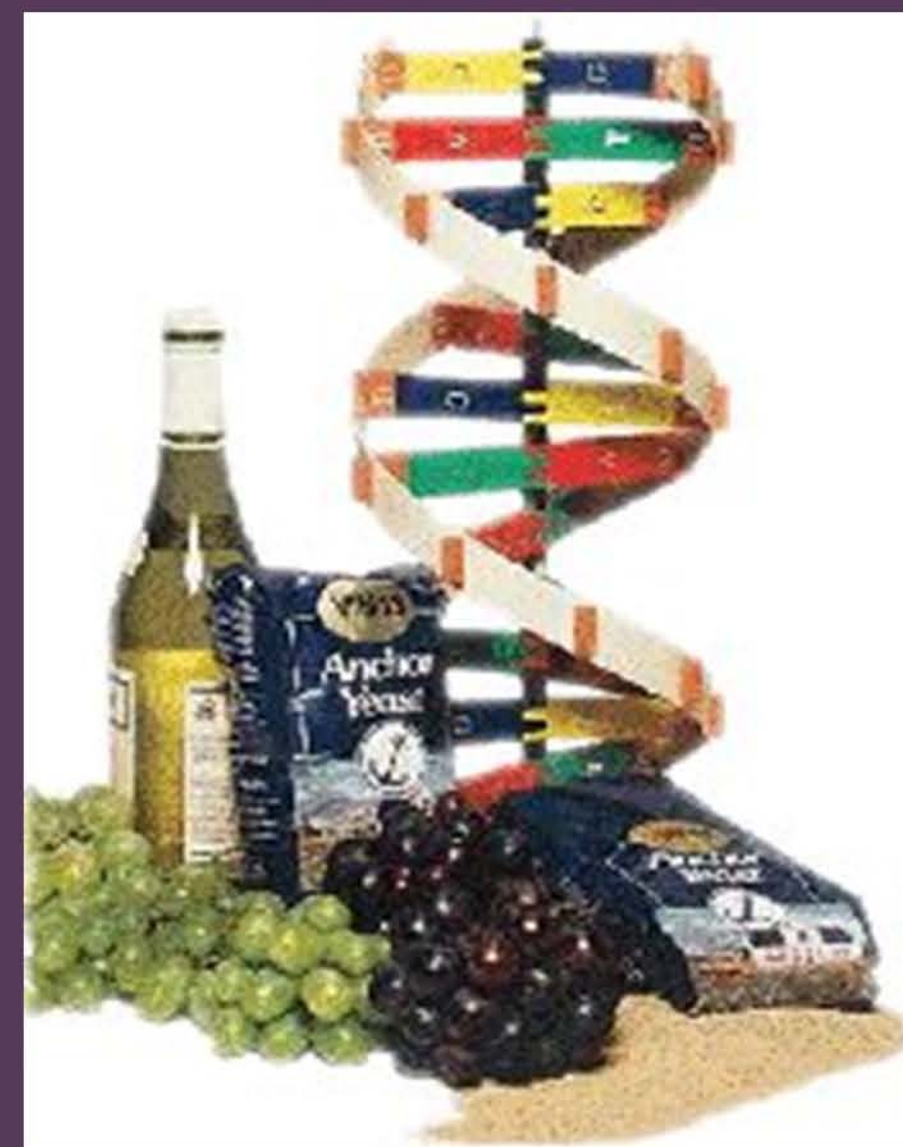
Aurora Zuzuarregui Miró

2005

CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS VÍNICAS DE

Saccharomyces sp.

INFLUENCIA EN SU COMPORTAMIENTO DURANTE LA VINIFICACIÓN.



CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS VÍNICAS DE *Saccharomyces sp.*

INFLUENCIA EN SU COMPORTAMIENTO DURANTE LA
VINIFICACIÓN



Trabajo realizado por Aurora Zuzuarregui Miró en el Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos, CSIC, y en el Departament de Bioquímica i Biologia Molecular, Universitat de València, para optar al grado de Doctora por la Universitat de València.

Valencia, Febrero de 2005.

MARCEL·LÍ DEL OLMO MUÑOZ, Doctor en Ciencias Biológicas y Profesor Titular del Departament de Bioquímica i Biologia Molecular de la Universitat de València,

CERTIFICA que la presente tesis doctoral titulada “Caracterización fisiológica y molecular de cepas vínicas de *Saccharomyces sp.* Influencia en su comportamiento durante la vinificación” ha sido realizada bajo su dirección por la licenciada en Ciencias Biológicas y en Bioquímica Aurora Zuzuarregui Miró.

A mis padres



QUINTO

MAFALDA INÉDITA

*Cada loco con su tema,
contra gustos no hay disputas:
artefactos, bestias, hombres y mujeres,
cada uno es como es,
cada quién es cada cual
y baja las escaleras como quiere.*

*Pero, puestos a escoger, soy partidario
de las voces de la calle
más que del diccionario,
me privan más los barrios
que el centro de la ciudad
y los artesanos más que la factoría,
la razón que la fuerza,
el instinto que la urbanidad
y un siux más que el Séptimo de Caballería.*

**Cada loco con su tema
Joan Manuel Serrat**

AGRADECIMIENTOS

Sobre todo a Marce por su gran dedicación, por preocuparse de que el trabajo salga adelante y sacarle el máximo provecho, por su disposición en todo momento a echar una mano y, además, por haber permitido iniciarme en la investigación en biología molecular, mi gran sueño desde primero de carrera.

Con especial cariño también a Emilia, por despertar ese sueño con sus estupendas clases de Bioquímica y por haber contribuido en la oportunidad que me brindaron de empezar a trabajar en su grupo de investigación y comenzar esta tesis. También por los buenos ratos pasados y por haber querido compartir las prácticas de Métodos II.

A los compañeros del laboratorio, Puri, Agustín, Roberto, Geno, Elena, Fernando, Begoña, Mariola, Paco, Anita, Gonzalo, Bea y las recién llegadas Elena, Helena y Lorena, por hacer agradables las muchas horas que pasamos en el laboratorio.

A Amparo Querol, a Eladio Barrio y a toda la gente que trabaja con ellos, por sus lecciones y colaboración en todo lo referente a taxonomía e identificación de levaduras vínicas y en muchos otros aspectos relacionados con la enología. En especial también a María José, por su gran ayuda en la caracterización de las cepas utilizadas en este trabajo mediante el análisis de restricción del DNA mitocondrial. Gracias también a Roseta, por los momentos compartidos últimamente.

A Concha, muchísimas gracias por haberme permitido realizar una estancia en tu laboratorio. A Marisa, a Lola y a Montse por la caracterización de las proteínas identificadas en este trabajo mediante MALDI-TOF/TOF. A Luci, Rosa, María I. y Aida, por su gran ayuda con las bidimensionales. A ellas y a toda la gente del departamento de Microbiología II en general, muchas gracias por la cálida acogida y por haber hecho que guarde un recuerdo inolvidable de Madrid. En especial a Txema por haberme acogido unas semanas en su casa, por las sesiones de cine, por los paseos por Madrid, por los viajes y por aguantar algunos malos ratos "pretésicos".

A Maite Rábena por ayudarnos con el análisis estadístico del capítulo 1.

A Antonio Palacios y a Anne Julien Ortiz por permitir la colaboración con la empresa de producción de levaduras Lallemand Inc., participante en el desarrollo del primer punto del capítulo 2 de la presente tesis.

A Cassandra Neal, Andy Morty y Jeffrey Dellrow, del Genomics Resource Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle, por realizar la hibridación y el análisis de imagen de los microchips de DNA.

A la gente de chips del departamento por su ayuda con los macroarrays y a Pepe en especial por el análisis de microchips con el ArrayStat.

Muchísimas gracias a toda la gente del departamento en general, en especial a los que habéis compartido los ratos de las comidas, a las compañeras de gimnasio, a las que también estáis acabando la tesis y compartís momentos de agobio, a la gente de plantas por su alegría, a los del laboratorio de chips, además de por su colaboración, por compartir viajes a congresos y a la gente de secretaría en general pero en especial a María por estar tan pendiente de los becarios. También un agradecimiento especial a Paula por abrirme las puertas del futuro.

Dar las gracias también a la gente del IATA, fundamentalmente a la gente del tercer piso por haber compartido el día a día de la mayor parte de esta tesis.

Por último agradecer a mis padres y amigos el confiar y el creer en mí, en aguantar momentos difíciles pasados durante la tesis y en hacer que sea feliz. Gracias a Maria Jesús, Marta, Pachi, Loreto, Mari Carmen, Blanca, Ana E., Marcos, Ana R., Lo, Carminas y parejas por los estupendos momentos compartidos durante la carrera y por no permitir que los diferentes caminos seguidos nos distancien, espero que mi próxima lejanía no consiga enfriar nuestra amistad. Agradecer también esto mismo a mis amigas del instituto, en especial a Leti y a Susa, y a mi prima Celia, gracias por estar ahí cuando se os necesita.

Este trabajo ha sido posible gracias a una beca de Introducción a la Investigación en Líneas de Interés para el Sector Industrial del CSIC y a una beca de Formación de Personal Investigador de la Generalitat Valenciana.

PRÓLOGO

Los arqueólogos identifican producción de vino cuando un yacimiento posee un elevado número de pepitas de uva. Los yacimientos más antiguos de este tipo tienen 7000 años y se localizan en las laderas del Cáucaso, en el estado de Georgia. Al Mediterráneo, tierra prometida del vino (Francia, Italia y España concentran el 54% de la producción mundial actual), llega a principios del S.II antes de Cristo donde el Egipto de los faraones y la civilización cretense desarrollan un gran conocimiento sobre su elaboración y conservación. A lo largo de su historia se han ido generando diferentes técnicas en su elaboración lo que ha permitido que hoy en día se disponga de una gran variedad de vinos como tintos, blancos, rosados, finos, espumosos, encabezados...

Hipócrates, considerado padre de la medicina, ya recomendaba como remedio diferentes clases de vino y filósofos griegos como Sócrates también citaban los beneficios del vino tomado en cantidades moderadas. Estas ideas se investigan en la actualidad y existen datos publicados en revistas científicas como *The Lancet* que indican que un consumo continuado en dosis moderadas previene enfermedades cardiovasculares, Alzheimer y, probablemente, reduce el riesgo de padecer determinados tipos de cáncer.

Actualmente en España el valor medio de uva utilizada para vinificación asciende a 1200 millones de euros lo que proporciona una idea de la importancia de este mercado en este país.

Todos estos datos nos ilustran acerca del elevado impacto socio-económico que envuelve a la industria vitivinícola especialmente en las regiones mediterráneas, lo que justifica el desarrollo de trabajos, como la presente tesis, encaminados a comprender el proceso biológico de la vinificación para intentar ofrecer a la sociedad vinos de mayor calidad o de menor coste económico.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN GENERAL

<u>1. La producción del vino. Fermentaciones espontáneas versus inoculadas.</u>	14
<u>2. Criterios de selección de levaduras vínicas.</u>	15
<u>3. Etapas relacionadas con la producción de vino y condiciones de estrés asociadas a las mismas.</u>	16
<u>4. Mecanismos de respuesta a estrés en <i>Saccharomyces sp.</i></u>	18
<u>5. Expresión génica durante la vinificación.</u>	19
<u>6. Características genéticas de las levaduras vínicas. Problemática de su manipulación.</u>	26
<u>7. Objetivos.</u>	28

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES BIOLÓGICOS.

<u>1. Plásmidos.</u>	30
<u>2. Oligonucleótidos.</u>	30
<u>3. Matrices.</u>	
3.1. Macromatrices.	32
3.2. Micromatrices.	33
<u>4. Cepas.</u>	
4.1. Cepas de <i>Escherichia coli</i> .	33
4.2. Cepas de levadura de laboratorio.	34
4.3. Cepas vínicas de levadura.	34

MÉTODOS.

<u>1. Medios y condiciones de cultivo.</u>	
1.1. Bacterias.	36
1.2. Levaduras.	

1.2.1. Medios generales y condiciones de incubación.	36
1.2.2. Mostos y condiciones de incubación.	37
1.2.3. Experimentos de sensibilidad a estrés.	40
<u>2. Métodos de manipulación de microorganismos.</u>	
2.1. Transformación de <i>E. coli</i> .	41
2.2. Transformación de levadura.	41
2.3. Construcción de cepas vínicas auxótrofas para uracilo.	42
<u>3. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos.</u>	
3.1. Aislamiento de DNA y RNA.	
3.1.1. DNA plasmídico de <i>E. coli</i> .	44
3.1.2. DNA genómico de levadura.	44
3.1.3. DNA de levadura para cariotipos.	45
3.1.4. Aislamiento de RNA.	45
3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT).	
3.2.1. PCR.	46
3.2.2. RT.	47
3.2.3. RT-PCR semicuantitativa.	47
3.2.4. RT-PCR cuantitativa.	47
3.3. Otras técnicas de DNA recombinante. Digestiones y ligaciones.	48
3.4. Separación de ácidos nucleicos por electroforesis.	
3.4.1. Electroforesis de fragmentos de DNA en geles de agarosa.	48
3.4.2. Separación de cromosomas por electroforesis en campo pulsante.	49
3.4.3. Electroforesis de RNA en geles de agarosa.	49
3.5. Marcaje radiactivo de DNA y RNA.	
3.5.1. Marcaje de fragmentos de DNA.	49
3.5.2. Marcaje radiactivo de RNA poliadenilado.	50
3.6. Hibridación de ácidos nucleicos y autorradiografía.	
3.5.1. Hibridación de macromatrices.	50
3.5.2. Autorradiografía.	51

<u>4. Métodos de manipulación y análisis de proteínas.</u>	
4.1. Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas.	51
4.2. Geles bidimensionales analíticos.	51
4.3. Geles bidimensionales preparativos.	53
4.4. Análisis de imagen de los geles analíticos.	54
4.5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF/TOF (<u>M</u> atriz <u>A</u> ssisted <u>L</u> aser <u>D</u> esorption <u>I</u> onization - <u>T</u> ime <u>O</u> f <u>F</u> light).	54
<u>5. Determinación de metabolitos.</u>	
5.1. Azúcares reductores.	55
5.2. Etanol.	56
5.3. Valoración de nitrógeno asimilable.	56
5.4. Determinación de ergosterol.	57
<u>6. Tratamiento estadístico, normalización y análisis bioinformático de los datos.</u>	
6.1. Análisis discriminante.	57
6.2. Normalización de los datos obtenidos por macromatrices.	58
6.3. ArrayStat para el análisis estadístico de micromatrices de DNA.	59
6.4. Melanie 3.0 para el análisis de geles bidimensionales.	59
CAPÍTULO 1. Caracterización fisiológica de cepas de <i>Saccharomyces sp.</i>:	
Estudio de la relación entre comportamiento fermentativo y resistencia a estrés	60
RESULTADOS	
<u>1. Selección de cepas.</u>	60
<u>2. Análisis del comportamiento fermentativo.</u>	62
<u>3. Análisis de sensibilidad a estrés oxidativo.</u>	64
<u>4. Resistencia a estrés osmótico.</u>	66
<u>5. Resistencia a estrés por etanol.</u>	67
<u>6. Tratamiento estadístico de los datos.</u>	68
DISCUSIÓN	71

CAPÍTULO 2. Expresión de genes de respuesta a estrés durante la vinificación 74

RESULTADOS

1. Estudio de la respuesta a estrés al inicio de la vinificación. Efecto del pH y la temperatura.

1.1. Cepas empleadas y comportamiento durante la vinificación. 75

1.2. Expresión de genes de estrés al inicio de la vinificación. 77

1.3. Efecto del pH sobre la expresión génica. 79

1.4. Efecto de la temperatura sobre la expresión génica. 81

2. Estudio de la respuesta a estrés durante la vinificación en cepas con diferente comportamiento fermentativo.

2.1. Cepas de levadura seleccionadas y comportamiento fermentativo. 84

2.2. Selección de tiempos y genes para el análisis de la expresión génica. 87

2.3. Expresión de genes que codifican proteínas de choque térmico. 89

2.4. Expresión de genes que responden a estrés osmótico. 92

2.5. Expresión de genes que responden a estrés oxidativo. 93

2.6. Expresión de genes que responden a ayuno de nutrientes y entrada en fase estacionaria. 95

2.7. Otros genes inducidos por estrés implicados en procesos celulares. 98

2.8. Caracterización genotípica de las cepas. 100

DISCUSIÓN 103

CAPÍTULO 3. Expresión global en cepas con diferente comportamiento fermentativo durante la entrada en fase de crecimiento estacionaria 111

RESULTADOS

1. Selección de cepas y punto de la vinificación para el estudio de expresión global. 111

2. Expresión génica diferencial mediante chips de DNA.

2.1. Análisis global de los resultados. 112

2.2. Metabolismo de carbohidratos. 114

2.3. Genes relacionados con transporte y metabolismo de compuestos nitrogenados.	121
2.4. Metabolismo y transporte de esteroides.	124
2.5. Genes relacionados con presencia/ausencia de oxígeno.	126
2.6. Genes relacionados con el transporte de iones y la homeostasis celular.	128
2.7. Genes relacionados con la respuesta a estímulos.	129
2.8. Genes relacionados con metabolismo y cambios en el DNA.	134
2.9. Meiosis, mitosis y organización y biogénesis de la pared celular.	135
2.9. Otros.	136
<u>3. Expresión proteica diferencial mediante electroforesis bidimensional.</u>	
3.1. Relación de proteínas que mostraron expresión diferencial.	138
3.2. Proteínas relacionadas con respuesta a estrés.	140
3.3. Proteínas relacionadas con el metabolismo del azufre en levadura.	143
3.4. Proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos.	145
3.5. Otras proteínas identificadas.	145
DISCUSIÓN	147
CAPÍTULO 4. Aplicaciones biotecnológicas.	154
RESULTADOS	
<u>1. Experimentos de microvinificación y sensibilidad a estrés en mostos naturales de las variedades Bobal y Sauvignon Blanc.</u>	156
<u>2. Estudios previos sobre la relevancia de los genes <i>YHR087W</i> y <i>HSP26</i> en la respuesta a estrés y la vinificación.</u>	161
<u>3. Selección de cepas y estrategia de manipulación.</u>	165
<u>4. Experimentos de microvinificación con las cepas transformantes.</u>	168
DISCUSIÓN	172
CONCLUSIONES	175
BIBLIOGRAFÍA	177

INTRODUCCIÓN GENERAL

1. La producción del vino. Fermentaciones espontáneas versus inoculadas.

La transformación del mosto de uva en vino es un proceso microbiológico complejo que implica la participación de diferentes microorganismos como levaduras, bacterias y hongos filamentosos (Fleet, G.H. y col., 1993b). La fermentación alcohólica es una de las principales fases que tienen lugar en este proceso y consiste en la transformación de la glucosa y fructosa presentes en el mosto en etanol y CO₂ mayoritariamente, junto con la aparición de otros subproductos muy importantes para la calidad del vino, como son los ésteres y los alcoholes superiores. Esta conversión es llevada a cabo generalmente por cepas de la levadura *Saccharomyces cerevisiae* aunque en fermentaciones espontáneas pueden crecer durante las primeras fases levaduras de otros géneros como *Kloeckera*, *Hanseniaspora*, *Debaryomyces*, *Hansenula*, *Candida* y *Pichia* (Fleet, G.H. y col., 1993b), procedentes de la uva o de los tanques de fermentación. Incluso en estos procesos naturales las especies de *Saccharomyces* acaban sustituyendo al resto en el caldo de cultivo y son las que completan la fermentación.

Frente a estas fermentaciones espontáneas el uso de inóculos de cepas preseleccionadas es hoy en día un procedimiento frecuente en bodega dado que la cepa utilizada como iniciadora tiende a imponerse sobre las indígenas presentes en la uva y en los tanques de fermentación (Querol, A. y col., 1992a). Aunque durante las primeras fases las cepas naturales pueden tener importantes efectos en el aroma (Querol, A. y col., 1992a), la cepa inoculada es responsable de la fermentación y constituye la mayor parte de la población de levaduras al final del proceso (Boulton, R.B. y col., 1996). Esta estrategia de inoculación de cultivos iniciadores proporciona ventajas tales como un acortamiento de la fase de latencia, una reducción significativa de la influencia de cepas salvajes de

levadura, una fermentación rápida y completa del mosto y la posibilidad de reproducir las características y la calidad del vino (Bauer, F.F. y col., 2000; Fleet, G.H. y col., 1993b).

2. Criterios de selección de levaduras vínicas.

Dada la relevancia de la utilización de cultivos iniciadores en la actualidad, es necesario el establecimiento de criterios de selección de cepas que garanticen una optimización del proceso y una buena calidad del producto final. En este sentido Degré (1993) propuso como características deseables en una cepa vínica el conducir fermentaciones vigorosas con cortas fases de latencia y sin dejar azúcares residuales (o dejando cantidades muy pequeñas), tener características fermentativas reproducibles, ser tolerante a presiones elevadas, etanol y temperaturas no óptimas, producir glicerol y β -glucosidasa en cantidades adecuadas para conseguir un buen aroma, y flocular o ser fácilmente separables del medio (importante sobre todo en la fermentación secundaria de algunos vinos espumosos). También se han descrito otros criterios entre los que podemos destacar la capacidad de conducir fermentaciones a baja temperatura (tendencia actual para una mayor conservación de aromas) o la capacidad de resistir cantidades moderadas de SO₂ (utilizado habitualmente en bodega como estabilizante microbiológico) (Pretorius, I.S., 2000).

Como vemos, varios de los criterios propuestos tienen relación con la capacidad de resistencia a estrés. Esta resistencia y su relación con el comportamiento de las cepas vínicas durante la fermentación fueron estudiados por Ivorra y colaboradores (1999). En este trabajo se consiguió demostrar que existía una correlación entre el comportamiento fermentativo de 3 cepas vínicas y su resistencia a diferentes condiciones adversas para la levadura, de manera que la cepa incapaz de completar la fermentación era más sensible a todas las condiciones de estrés estudiadas. Otros autores también han visto que existe una correlación entre la composición en ácidos grasos y la tolerancia a estrés de diferentes cepas y subespecies de *S. cerevisiae* y su origen de aislamiento (fábricas de bebidas no alcohólicas, fábricas de zumos de frutas, destilerías y bodegas) (Guerzoni, M.E. y col., 1993). Para establecer esta correlación estos autores utilizaron el análisis discriminante ya que se trata de una herramienta estadística que permite asignar individuos a grupos

INTRODUCCIÓN

previamente establecidos en base a observaciones multivariantes. El modelo trata de establecer una serie de funciones lineales discriminantes cuyo valor es el que determina que cada individuo sea clasificado en uno u otro grupo. Cuanto mayor sea la distancia en el valor para la función entre los diferentes grupos, estos quedan más diferenciados en el espacio discriminante, mayor es la correlación que existe entre los grupos y las variables que se utilizaron para diferenciarlos y más segura es la asignación de nuevos individuos a dichos grupos. Este tipo de análisis tiene su origen en los trabajos de Fisher (1936), donde trataba de discriminar 3 especies del género *Iris* utilizando como variables longitud y anchura de sépalos y pétalos. También ha sido aplicado a la identificación de bacterias patógenas obtenidas de aislados clínicos (Bourne, R. y col., 2001) y a problemas relacionados con la tecnología de alimentos como la caracterización de diferentes muestras de té (Valera, P. y col., 1996) y de vinagre de vino (García-Padilla, M.C. y col., 1997; Guerrero, M.I. y col., 1997) en base a su composición química. Como vemos este método permite determinar si una o varias variables de selección son suficientes para caracterizar muestras biológicas obtenidas de diferentes fuentes o que muestran alguna característica diferencial con lo que puede ser una herramienta muy útil para aplicar a cepas con diferente comportamiento fermentativo y estudiar qué criterios correlacionan bien con este patrón en vinificación.

3. Etapas relacionadas con la producción de vino y condiciones de estrés asociadas a las mismas.

Como ya hemos comentado lo más habitual en la actualidad en bodega es la utilización de levaduras iniciadoras (Bauer, F.F. y col., 2000), con lo que hay que considerar como parte del proceso de elaboración de vino la producción industrial de dichas levaduras. Estas levaduras son crecidas en unas condiciones óptimas para la obtención de una gran cantidad de biomasa y seguidamente son sometidas a un proceso de desecación y deshidratación para ser comercializadas en forma de levadura seca activa. En la bodega esta levadura es habitualmente rehidratada durante media hora en una solución de agua con glucosa al 5-10% (p/v) y después se adiciona directamente al tanque de fermentación. Cuando la levadura consume todos los azúcares del mosto o deja

INTRODUCCIÓN

cantidades residuales inferiores a 5 g/L se considera que la vinificación ha finalizado y se procede, en algunos tipos de vino como el de Jerez, a un envejecimiento biológico. En estos casos se adiciona etanol al vino ya elaborado y se introduce en barricas donde levaduras diferentes a las responsables de la fermentación alcohólica (levaduras de flor) (Esteve-Zarzoso, B. y col., 2001) forman un velo en la superficie (Martínez, P. y col., 1998).

Durante todas estas etapas las levaduras se ven sometidas a diferentes condiciones de estrés entre los que destacaremos el estrés oxidativo, el osmótico y el causado por el etanol y por la limitación de nutrientes. El estrés oxidativo tiene una gran relevancia durante la producción industrial de levadura seca activa (Bauer, F.F. y col., 2000) ya que las levaduras son crecidas sobre melazas con alimentación progresiva o en “fed-batch” y con aporte de oxígeno para optimizar la producción de biomasa, por lo que se ven expuestas a un ambiente oxidante causado por su propio metabolismo respiratorio. En cuanto al estrés osmótico existen varios momentos en los que las cepas deben tolerar aumentos en la osmolaridad del medio (Attfield, P.V., 1997; Bauer, F.F. y col., 2000). Así, el crecimiento de las levaduras para su producción industrial se realiza en melazas que pueden tener concentraciones de sacarosa de aproximadamente un 50% (p/v). Aunque dichas melazas suelen ser diluidas alrededor de 10 veces, la concentración de azúcar es suficiente para generar cierto grado de estrés osmótico sobre la célula. Sin embargo, el punto crítico en cuanto a este tipo de estrés lo encontramos al inocular las levaduras en el mosto, donde se alcanzan concentraciones de azúcares entre el 15 y el 25% (p/v). Otro aspecto importante es el estrés por etanol que se produce en condiciones naturales por el propio avance de la fermentación (Bauer, F.F. y col., 2000) y es muy importante en la elaboración de algunos vinos como el de Jerez en la fase de envejecimiento biológico, donde se parten de concentraciones de este agente de aproximadamente un 15% (v/v) (Larue, F. y col., 1989). Debemos tener en cuenta que el etanol es altamente tóxico para el metabolismo y crecimiento de las levaduras, ya que afecta, por ejemplo, a las membranas biológicas (Ingram, L.O. y col., 1984). Por último debemos mencionar el estrés por agotamiento de nutrientes que se produce en las fases finales de producción de levaduras y fermentación y que es constante generalmente durante todo el envejecimiento biológico (Bauer, F.F. y col., 2000).

4. Mecanismos de respuesta a estrés en *Saccharomyces sp.*

La supervivencia de una célula puede depender de su capacidad para adaptarse rápidamente a modificaciones en el entorno. En el caso de organismos unicelulares esta habilidad es especialmente importante ya que se encuentran frecuentemente sometidos a situaciones cambiantes. Cualquier factor ambiental que comprometa la supervivencia de una célula o, al menos, su óptimo desarrollo, se considera una situación de estrés (Hohmann, S. y col., 2003). Para una correcta producción de vino las levaduras tienen que ser capaces de detectar y responder a estas condiciones de estrés sin pérdidas importantes de viabilidad (Bauer, F.F. y col., 2000) ya que debido a éstas y otras causas (composición del mosto, temperatura...), durante algunas fermentaciones se producen condiciones subóptimas que para determinadas cepas de levadura pueden conducir a paradas prematuras de la fermentación (Larue, F. y col., 1989; Muñoz, E. y col., 1990). Esta situación deja una cantidad de azúcares sin fermentar alta y generalmente indeseable en el producto final. Este tipo de problemas puede solucionarse gracias a la práctica de inoculación de cepas seleccionadas convenientemente.

Los mecanismos de respuesta a estrés en levadura engloban sistemas de detección y rutas de transducción de señal que activan factores de transcripción. Estas cascadas acaban produciendo cambios significativos en los niveles de mRNA de numerosos genes (Causton, H.C. y col., 2001; Estruch, F., 2000; Gasch, A.P. y col., 2000; Hohmann, S. y col., 2003). En las células de levadura se ha visto que parte de esta respuesta es común a diferentes condiciones ambientales por lo que ha sido llamada respuesta a estrés ambiental (Environmental Stress Response, ESR, (Gasch, A.P. y col., 2000)). De hecho, los estudios con micromatrices indican que la expresión de unos 900 genes se encuentra alterada en *S. cerevisiae* en respuesta a una gran variedad de cambios ambientales. Algunos de los genes inducidos en estas condiciones son dianas de los factores de transcripción Msn2p y Msn4p (Martínez-Pastor, M.T. y col., 1996), que son reprimidos por la proteína quinasa A (PKA) (Boy-Marcotte, E. y col., 1998; Marchler, G. y col., 1993) en condiciones de disponibilidad de nutrientes y proliferación celular. Bajo condiciones específicas de estrés otros factores de transcripción se encuentran implicados en la regulación de los cambios de expresión génica que se producen. Así, el factor de choque

INTRODUCCIÓN

térmico (Hsf1p, Heat Shock Factor, (Amorós, M. y col., 2001)), gobierna la respuesta a choque térmico induciendo la expresión, entre otras proteínas, de diferentes carabinas moleculares. Por otro lado, el factor de respuesta a elevada osmolaridad (Hog1p, High Osmolarity Glycerol, (Gustin, M.C. y col., 1998)) induce la transcripción, entre otros, de los genes implicados en la síntesis de glicerol; este osmolito es sintetizado por las levaduras para contrarrestar aumentos en la osmolaridad del medio. Finalmente, el factor Yap1p, se activa en situaciones de estrés oxidativo y controla, junto con Skn7p, la expresión de proteínas que mantienen el equilibrio redox de la célula (Krems, B. y col., 1996; Kuge, S. y col., 1994). En cualquiera de estos casos los cambios que se produzcan a nivel proteico (abundancia, modificación postraduccional y/o localización subcelular) serán los que permitan a la célula de levadura adaptarse a la nueva situación y continuar su crecimiento.

Frente a cualquiera de estas situaciones se produce otra respuesta en la levadura, encaminada a prevenir posibles daños en fases del ciclo celular en los que la célula es especialmente vulnerable: la fase S (síntesis de DNA) y la fase M (mitosis). Esta respuesta es una parada del ciclo, generalmente en G1, aunque en condiciones de estrés osmótico se ha visto que puede ser en la transición G2-M (Hohmann, S. y col., 2003). Durante estas paradas, la célula regula los genes y/o proteínas que le permiten adaptarse a la condición de estrés para poder, a continuación, avanzar en el ciclo y seguir creciendo. Por este motivo es muy importante que las cepas vínicas sean capaces de adaptarse rápidamente a los cambios ambientales de manera que puedan seguir llevando a cabo el proceso de fermentación.

5. Expresión génica durante la vinificación.

Existen diversos estudios en la bibliografía que intentan hacer una caracterización de levaduras vínicas a nivel molecular durante vinificaciones llevadas a cabo en condiciones más o menos similares a las que tienen lugar durante la fermentación en bodega. Algunos de estos estudios están centrados en fases concretas del proceso y otros intentan abarcar toda la fermentación; en algunos se analizaron determinados grupos de genes y en otros se determinó la expresión global mediante matrices de DNA o mediante electroforesis

INTRODUCCIÓN

bidimensional. En todos estos experimentos hay una característica común y es que se utilizó una única cepa vínica capaz de completar la fermentación en las condiciones estudiadas. De estos estudios se pueden sacar algunas conclusiones generales aunque si intentamos analizar con detalle genes concretos vemos diferencias debidas a las condiciones particulares utilizadas por cada autor.

Durante la primera fase de la vinificación, al inocular las células en mosto sintético con 200 g/L de glucosa, se ha visto una inducción importante del gen *GPD1* (Pérez-Torrado, R. y col., 2002), que codifica la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, implicada en la síntesis de glicerol. En estas primeras fases del proceso también existen cambios en la expresión de algunos genes de respuesta general a estrés como los que codifican Hsps (Heat Shock Proteins), como *HSP12* o *HSP104*. En estos casos el cambio en el perfil de expresión depende de factores como el estado de las células al ser inoculadas en el mosto (cultivos de una noche, levadura seca activa,...) o el pH (Pérez-Torrado, R. y col., 2002).

En cuanto al resto de fases de la vinificación, debemos destacar el momento en el que las células entran en fase estacionaria y dejan de dividirse. En condiciones de laboratorio el inicio de esta fase está estrictamente vinculado al momento en que se acaba la glucosa del cultivo (Werner-Washburne, M. y col., 1996). El metabolismo de la glucosa (sustrato fermentable preferido por las levaduras) se encuentra finamente regulado de manera que, por ejemplo, se evite un funcionamiento significativo con coincidencia en el tiempo de glicólisis y gluconeogénesis, lo que nos llevaría a un ciclo fútil. En condiciones de disponibilidad de glucosa la ruta de la proteína quinasa A (PKA, revisado en Hohmann y col. (2003)) se encuentra activa (Figura I.1) gracias a un aumento en la producción de cAMP (mediado por Cyr1p), que se une a las subunidades reguladoras Bcy, lo que determina la disociación del complejo y la activación de las subunidades catalíticas (Tpk). Las subunidades Tpk activas median la represión de 3 grandes grupos de genes gracias a la inactivación de la quinasa Snf1p (Figura I.2): los genes gluconeogénicos, los genes de respiración y los genes implicados en la utilización de sustratos alternativos. Cuando se agota la glucosa del cultivo se produce una inactivación de Tpk por disminución de los niveles de cAMP y reasociación con las subunidades reguladoras lo que conduce, entre otros aspectos, a la desrepresión de estos grupos de

genes, al cese de la división celular, a la activación de la ruta general de respuesta a estrés (mediada por Msn2p y Msn4p) y de la ruta de respuesta a fase estacionaria (mediada por Gis1p), a una movilización de las reservas de carbohidratos (glucógeno y trehalosa) y a una estimulación de crecimiento filamentoso (revisados en Verstrepen y col. (2004) y en Hohmann y col. (2003)).

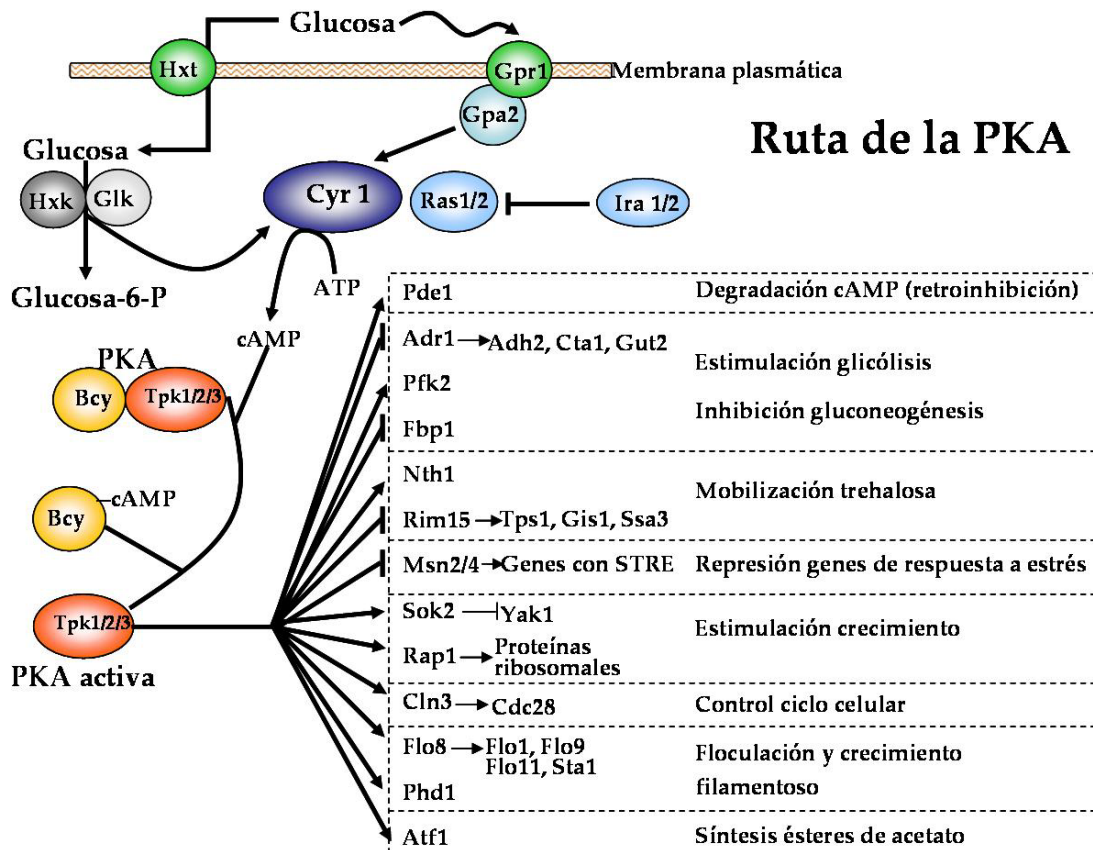


Figura I.1. Esquema de la ruta Ras/cAMP/PKA (adaptada de Verstrepen (2004)). La actividad máxima de Cyr1 se consigue gracias a una señal doble: la fosforilación intracelular de glucosa a glucosa-6-P y la detección de glucosa extracelular mediada por Gpr1. Además hay una influencia de Ras1 y Ras2 sobre la actividad basal de Cyr1 aunque la conexión concreta todavía se desconoce.

Este tipo de respuesta también se ha visto en condiciones de limitación de fuentes nitrogenadas (revisado en Hohmann y col. (2003)). Cuando las levaduras crecen en amonio como fuente de nitrógeno, genes implicados en la utilización de fuentes de nitrógeno alternativas están sometidos al mecanismo conocido como represión por

catabolito de nitrógeno (Nitrogen Catabolite Repression, NCR, (Wiame, J.M. y col., 1985)). En esta regulación se sabe que participan 4 factores de transcripción (Gln3p, Gat1p, Dal80p, Deh1p) que reconocen secuencias de tipo GATA. En condiciones de limitación de fuentes de nitrógeno se activa la transcripción tanto de genes implicados en su transporte como de otros relacionados con el metabolismo de glutamina, glutamato, prolina, urea, arginina, alantoína y γ -amino butirato. Entre estos genes podemos citar, por ejemplo, las permeasas de aminoácidos *GAP1* y *AGP1*, los genes *DAL* (metabolismo de alantoína) o *GDH1* y 2 (actividad glutamato deshidrogenasa).

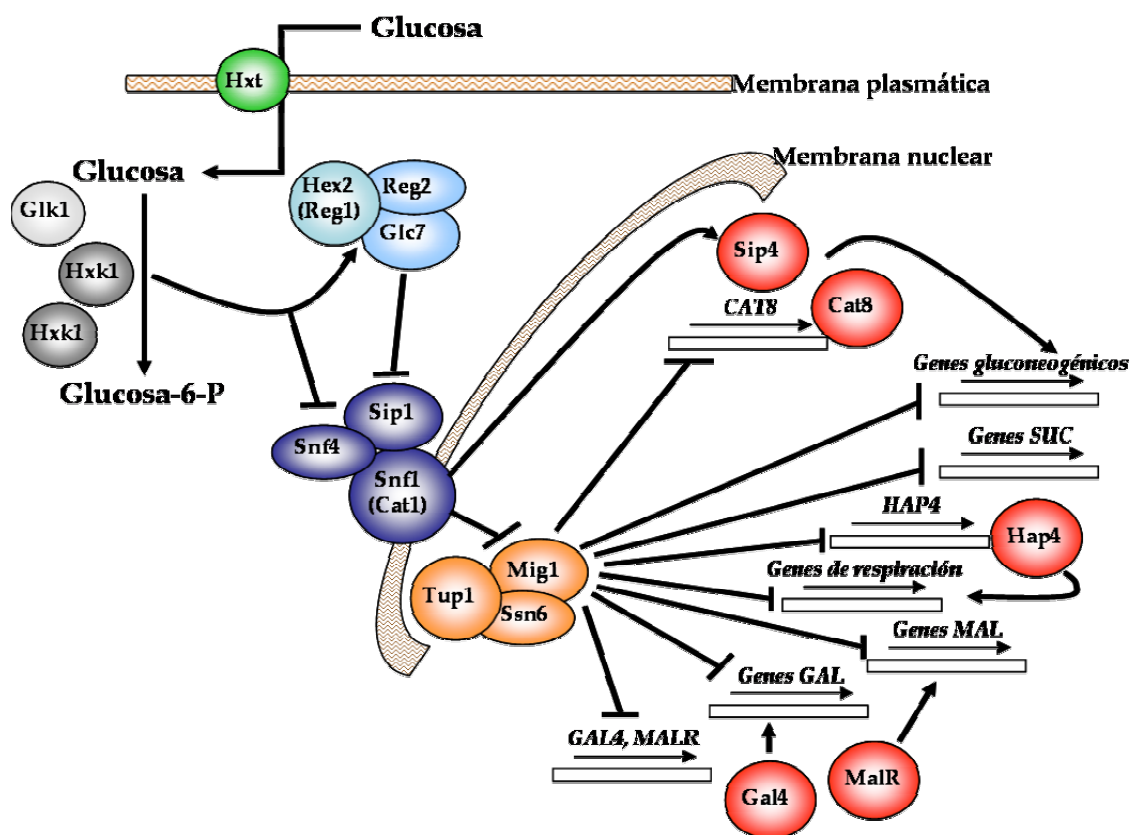


Figura I.2. Esquema simplificado de mediadores y dianas implicados en la represión por catabolito de carbono (adaptada de Hohmann. y Mager (2003)).

Es interesante resaltar también que las rutas de represión por catabolito de carbono y de nitrógeno se encuentran interconectadas en diferentes puntos lo que conduce a patrones de regulación específicos en función tanto de la cantidad como de la calidad de los nutrientes presentes en el medio (revisado en Hohmann y Mager (2003)). En esta

INTRODUCCIÓN

integración se sabe que la ruta TOR juega un papel esencial. Esta ruta actúa en respuesta a disponibilidad de nutrientes regulando negativamente Msn2p y Msn4p y activando (al igual que la ruta de la PKA) el crecimiento celular (Cardenas, M.E. y col., 1999; Schmelzle, T. y col., 2000). Otra proteína implicada en estos procesos es Sch9p, quinasa relacionada también con el control del crecimiento y la respuesta a estrés (Crauwels, M. y col., 1997). Existen muchos trabajos que intentan establecer las conexiones entre estas rutas y proteínas y delimitar a qué nivel se sitúa cada una. Según un modelo aparecido últimamente la ruta de la PKA, la ruta TOR y la proteína Sch9p ejercerían parte de sus efectos a través de la regulación del factor Rim15 (Roosen, J. y col., 2005) (Figura I.3). En función de la localización de este factor y de la regulación de dianas específicas de PKA, TOR y Sch9p parece que se regulan todas las respuestas generales y específicas en respuesta a ayuno de nutrientes (Figura I.3).

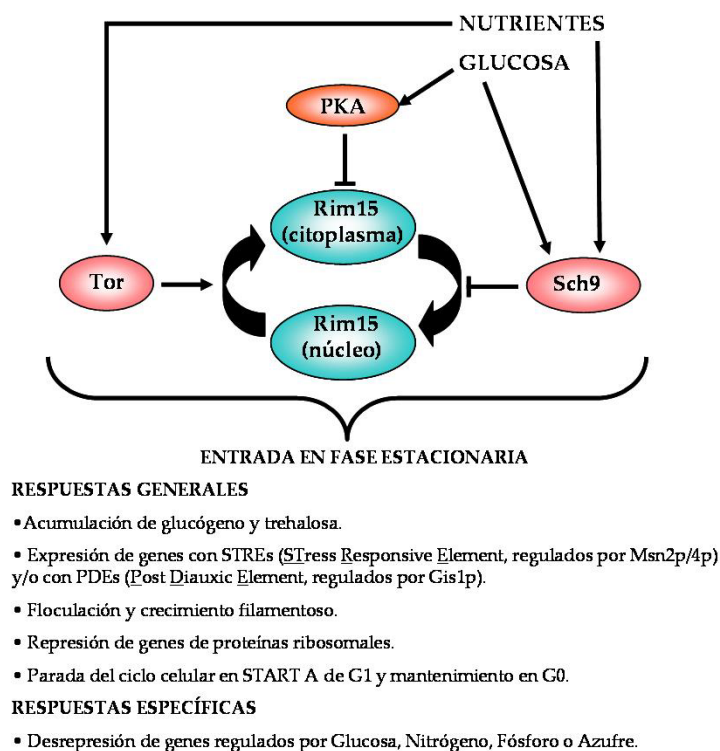


Figura I.3. Principales reguladores y respuestas de las levaduras al ayuno de nutrientes. El modelo de regulación está basado en lo propuesto por Roosen y colaboradores (2005) y las respuestas se basan en lo descrito por muchos autores (revisado en Hohmann y Mager (2003)).

INTRODUCCIÓN

En condiciones de vinificación la entrada en fase estacionaria también supone grandes cambios tanto a nivel transcriptómico como a nivel proteómico (Rossignol, T. y col., 2003). En general lo que se puede deducir a partir de los datos obtenidos es una disminución de procesos biosintéticos (biosíntesis de aminoácidos y transcripción de genes relacionados con síntesis de RNA y proteínas) y una activación de genes de respuesta a estrés, algunos directamente relacionados con el ayuno de nutrientes y la entrada en fase estacionaria (como *YGP1* (Riou, C. y col., 1997) o *SPI1* (Puig, S. y col., 2000b)). Debemos destacar, por ejemplo, la inducción de genes HSPs como *HSP26*, demostrada en diferentes condiciones de vinificación tanto por matrices de DNA (Rossignol, T. y col., 2003) como por análisis Northern (Puig, S. y col., 2000b; Riou, C. y col., 1997) y que se ve reflejada también en un aumento a nivel de cantidad de proteína (Trabalzini, L. y col., 2003). También se ha detectado una inducción de genes que codifican proteínas implicadas en homeostasis de protones (como *HSP30*, *PTK2* y *KHA1* (Rossignol, T. y col., 2003)) y de genes relacionados con la biogénesis de la pared celular (como *FKS1* y *GSC2* (Rossignol, T. y col., 2003)). La inducción de estos genes puede estar relacionada con el estrés por etanol (Alexandre, H. y col., 2001), que debe haber alcanzado niveles suficientes para desencadenar una respuesta en este punto de la vinificación (Rossignol, T. y col., 2003). Además, se observan cambios importantes en el perfil de expresión de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos. Mediante análisis Northern se ha demostrado, por ejemplo, una inducción de genes relacionados con el metabolismo del glucógeno y de la trehalosa, como *GSY2* (Pérez-Torrado, R. y col., 2002) y una disminución en los niveles de expresión de algunos genes relacionados con glicólisis como *PGK1*, *FBA1*, *TDH1/2/3* o *ADH1/2* (Puig, S. y col., 2000a). En este último caso la represión se produce en estadios cercanos (anteriores o posteriores) al cese de división celular, pero el momento exacto depende de cada gen concreto. También referente al metabolismo de carbohidratos, el análisis transcriptómico global (Rossignol, T. y col., 2003) ha permitido observar un aumento de la transcripción de isoformas relacionadas con respuesta a estrés como *HXK1*, *GLK1*, *PGM2*, *GPM2* y *ALD2*, *ALD3* y *ALD4*, mientras que *ALD6* (isoforma mayoritaria en la formación de acetato) se encuentra reprimida tanto a nivel de transcripción como a nivel de abundancia de proteína (Trabalzini, L. y col.,

INTRODUCCIÓN

2003). Además de la disminución de la transcripción de algunos genes implicados en glicólisis, se ha visto un aumento de la de genes relacionados con gluconeogénesis y respiración (Rossignol, T. y col., 2003). Esta respuesta es similar a la que se produce durante la entrada en fase estacionaria en condiciones de laboratorio (DeRisi, J.L. y col., 1997). Los efectos que hemos descrito anteriormente de Snf1p y Tpk en respuesta a una limitación de glucosa (disminución de glicólisis, aumento gluconeogénesis y respiración, activación de respuesta a estrés) parecen coincidir, al menos en parte, con la respuesta de las levaduras en el momento en que dejan de dividirse durante una vinificación. Sin embargo, la concentración de azúcares que queda en el mosto en este momento puede alcanzar los 100-150 g/L, por lo que el cese de la división celular en este caso parece relacionado más bien con un agotamiento de las fuentes nitrogenadas (Fleet, G.H. y col., 1993b) y/o con una alteración de la membrana plasmática (debida a la acumulación de etanol y su efecto sobre los sistemas de transporte, tanto de los compuestos nitrogenados (Alexandre, H. y col., 1994) como de la captación de glucosa (Jackson, R.S., 1994)). De momento no existe explicación al cambio en el perfil de expresión de genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos en momentos donde la glucosa se encuentra en exceso ni se conoce la relevancia que puede tener este cambio sobre el metabolismo de las levaduras. Lo que está claro es que sí debe haber un efecto, ya que estudios sobre cinética fermentativa con diferentes mostos, levaduras y condiciones demuestran que en cualquier caso se pueden diferenciar 3 etapas en cuanto a la tasa de producción de CO₂ durante una fermentación: una primera etapa que coincide con la fase de latencia y donde no hay producción significativa, una segunda donde se alcanzan las tasas máximas y que coincide con el crecimiento exponencial y una última donde la velocidad de fermentación disminuye progresivamente y que comienza en el momento en que se alcanza la máxima biomasa (Bely, M. y col., 1990).

Otro grupo de genes que muestra diferencias de expresión durante la entrada en fase estacionaria en la vinificación está constituido por varios genes reprimidos por catabolito de nitrógeno, aunque en este caso, dada la diferencia en la composición de los mostos utilizados, la respuesta de la levadura varía según las condiciones utilizadas. En el trabajo de Rossignol y colaboradores (2003) la entrada en fase estacionaria coincide con un

INTRODUCCIÓN

agotamiento de las fuentes de nitrógeno asimilable (amonio y todos los aminoácidos menos la prolina, que requiere oxígeno para su degradación). Estos autores observan un aumento de muchos de los genes reprimidos por catabolito de nitrógeno, lo que concuerda con la limitación de este nutriente en sus condiciones de vinificación. Sin embargo, en el trabajo de Backhus y colaboradores (2001), lo que se observa es una represión de muchos de estos genes en sus condiciones de exceso de arginina y tan solo se observa activación de *CAR1*, *CAR2*, *DAL4* y *DAL5* en condiciones de limitación de este mismo aminoácido.

Otra familia funcional que muestran cambios durante la vinificación incluye genes relacionados con el metabolismo del ergosterol (Backhus, L.E. y col., 2001; Rossignol, T. y col., 2003). El ergosterol es el principal esteroles de la membrana plasmática de *S. cerevisiae* y se sabe que la eficiencia fermentativa y la resistencia a etanol están normalmente relacionados con un aumento en la relación ergosterol/fosfolípidos y con una disminución del índice de saturación de los ácidos grasos en células de levadura (Chi, Z. y col., 1999; Sajbidor, J. y col., 1995). En el caso de que la proporción de ergosterol sea baja se potencian los efectos tóxicos del etanol dificultándose, entre otros, la captación de glucosa (Jackson, R.S., 1994). Sin embargo, la síntesis de esteroides y de ácidos grasos de cadena larga se encuentra inhibida en ausencia de oxígeno. Se ha visto que la adición puntual de oxígeno durante la fase estacionaria de una vinificación aumenta la viabilidad celular y la tasa de fermentación y disminuye el tiempo requerido para completar la fermentación (Rosenfeld, E. y col., 2003). En cuanto a la expresión génica durante la vinificación se ha visto que hay una disminución de los niveles de mensajero de genes implicados en la síntesis de ergosterol (debido a las condiciones anaerobias) y un aumento de los genes relacionados con su transporte (Rossignol, T. y col., 2003).

6. Características genéticas de las levaduras vínicas. Problemática de su manipulación.

Las cepas de *S. cerevisiae* que se utilizan habitualmente en el laboratorio descienden de aislados naturales pero ambos tipos poseen múltiples diferencias a nivel genético. Así, una de las características de las cepas de laboratorio es que son haploides o diploides y presentan longitudes cromosómicas definidas. En las cepas vínicas no son habituales estas

INTRODUCCIÓN

características de manera que la mayoría son diploides, poliploides o incluso aneuploides (Bakalinsky, A.T. y col., 1990; Codon, A.C. y col., 1995) y suelen presentar un elevado grado de polimorfismo en la longitud de sus cromosomas (Bidenne, C. y col., 1992; Rachidi, N. y col., 1999), lo que permite la diferenciación de cepas a nivel de cariotipos (Guillamon, J.M. y col., 1996) y provoca una gran variabilidad en la capacidad de esporulación y en la viabilidad de las esporas (Codon, A.C. y col., 1995). Además, la mayoría de las cepas industriales son homotáticas de manera que tras la esporulación algunas células cambian de sexo debido a una inestabilidad del locus *MAT* y pueden conjugar con otras de tipo contrario de la misma población motivo por el cual no se puede mantener una línea haploide. En las cepas de laboratorio el locus *HO* se encuentra mutado con lo que son heterotáticas y las células mantienen el tipo sexual y permanecen en estado haploide hasta que encuentran una célula de tipo sexual contrario. Por otro lado, las cepas vínicas presentan un elevado grado de heterocigosis (Barre, P. y col., 1993; Codon, A.C. y col., 1995) (que incluye el locus *HO*) y una gran capacidad para reorganizar sus cromosomas durante el ciclo mitótico mediante translocaciones mediadas por elementos Ty (Longo, E. y col., 1993; Rachidi, N. y col., 1999), entrecruzamiento mitótico (Aguilera, A. y col., 2000) y conversión génica (Puig, S. y col., 2000c).

Otro aspecto a considerar desde el punto de vista genético es que en las cepas de laboratorio se han provocado auxotrofías, de manera que se pueden transformar con plásmidos que restauren la prototrofia para alguno de los requerimientos nutricionales. Sin embargo, las cepas industriales son protótrofas, lo que dificulta su manipulación genética. Por este motivo, para llevar a cabo estas transformaciones hay que emplear marcadores de resistencia a antibióticos que permitan la selección de transformantes positivos. Estos marcadores deben ser eliminados posteriormente dado que su mantenimiento está totalmente prohibido a nivel industrial. Esta prohibición se deriva de que uno de los criterios que deben reunir los organismos manipulados genéticamente para ser reconocidos como GRAS (Generally Recognized As Safe) es la ausencia de cualquier DNA exógeno.

A pesar de toda esta problemática se han diseñado estrategias de manipulación genética aplicables a levaduras industriales en general y vínicas en particular. Dentro del

INTRODUCCIÓN

campo de la enología existen múltiples dianas potencialmente mejorables en las levaduras vínicas (revisadas por Pretorius (2000)). Considerando todas ellas en conjunto podemos diferenciar dos aspectos: la mejora de la eficiencia fermentativa y la disminución del riesgo de paradas de fermentación (que conducen a un beneficio a nivel industrial) y la mejora de características saludables, nutricionales y organolépticas (encaminadas a atraer a un mayor número de consumidores). En cuanto a eficiencia fermentativa se ha logrado, por ejemplo, la posibilidad de fermentar mostos pobres en nitrógeno fácilmente asimilable mediante la interrupción del gen *URE2* (Salmon, J.M. y col., 1998a), uno de los factores que gobiernan la represión por catabolito de nitrógeno. En cuanto a mejora de las características organolépticas se han obtenido cepas que producen vinos con mayor potencial aromático mediante la sobreexpresión del gen *ATF1* (alcohol acetil transferasa) (Lilly, 2000; Uber, G., Ramón, D., Matallana, E., datos no publicados). Finalmente, en cuanto a la producción de bebidas más saludables, se han conseguido cepas que producen bajos niveles de urea, un precursor del carcinógeno etilcarbamato (Kitamoto, K. y col., 1991; Ough, C.S. y col., 1998).

Aunque el uso de organismos manipulados a nivel genético en la industria alimentaria todavía no tiene un gran desarrollo por impedimentos a nivel legal, este tipo de aproximaciones proporciona también un mayor entendimiento de cuáles son los factores que conducen a la mejora del proceso. De esta manera se podrían diseñar métodos de vinificación optimizados a nivel de parámetros como temperatura, nutrientes,... y/o establecer métodos moleculares de selección de cepas con características fermentativas adecuadas a un determinado proceso industrial.

7. Objetivos.

Teniendo en cuenta todos estos antecedentes, se planteó el desarrollo de este proyecto de tesis doctoral con los siguientes objetivos principales:

1. Estudio de la correlación entre comportamiento fermentativo y la sensibilidad a condiciones de estrés semejantes a las que se producen durante su uso industrial.

INTRODUCCIÓN

2. Estudio de la respuesta a estrés de las levaduras vínicas en condiciones de vinificación.
3. Estudio global de los niveles de expresión de genes y proteínas en cepas con diferente patrón fermentativo.
4. Posibles aplicaciones biotecnológicas a partir de los resultados obtenidos tras el desarrollo de los tres primeros puntos.

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIALES BIOLÓGICOS.

1. Plásmidos.

Tabla M1. Plásmidos.

Plásmido	Descripción	Procedencia
pUG6	Plásmido que contiene el gen marcador de resistencia a geneticina flanqueado por secuencias LoxP	(Guldener, U. y col., 1996)
YEp351-cre-cyh	Plásmido con marcador <i>CYH^R</i> que contiene el gen de la recombinasa Cre bajo el control del promotor <i>GAL1</i>	(Delneri, D. y col., 2000)
YEp352	Vector episomal lanzadera con marcador <i>URA3</i> .	(Hill, J.E. y col., 1986)
YEp352-HSP26	Plásmido derivado de YEp352 conteniendo el gen <i>HSP26</i> .	Este trabajo
YEp352-YHR87w	Plásmido derivado de YEp352 conteniendo el gen <i>YHR087w</i> .	Este trabajo

2. Oligonucleótidos.

Tabla M2. Oligonucleótidos.

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Utilización
p(dT) ₁₅ (Roche)		Obtención de cDNA para hibridación de macromatrices
OligodT	TTTTTTTTTTTTTTT(AGC)(AGCT)	Obtención de cDNA para RT-PCR cuantitativa
ACT1-1	GGATCTTCTACTACATCAGC	RT-PCR de <i>ACT1</i>
ACT1-2	CACATACCAGAACCGTTATC	"

MATERIALES Y MÉTODOS

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Utilización
GPD1-1	GTTGCTAATCCAGACTTG	RT-PCR de <i>GPD1</i>
GPD1-2	AGATAGCTCTGACGTGTG	"
TRX2-1	CAAGTTAGTCGTTGTTGAC	RT-PCR de <i>TRX2</i>
TRX2-2	TTGAGCAACATCTGAGAC	"
HSP104-1	GCGGTCTTACCGATACCTGG	RT-PCR de <i>HSP104</i>
HSP104-2	GACTGAGCAGGCTCGTCAAGG	"
SSA3-1	AGAGCCTAATCGTTCTATC	RT-PCR de <i>SSA3</i>
SSA3-2	GTTTCAATTCTAGGGAC	"
YHR087 _w -1	GGTAAGCTATCTGAAGTTGTC	RT-PCR de <i>YHR087_w</i>
YHR087 _w -2	ACTTCTTCGATCTTCTTG	"
HSP26-A	GACAACATCCAACAACG	RT-PCR de <i>HSP26</i>
HSP26-B	CCTCAATCTTCTTGAC	"
MUP1-1	CGAAAACGCTCCAAGA	RT-PCR de <i>MUP1</i>
MUP1-2	CCTCACCAAAGACAGA	"
ERG10-1	TATCGACTGCCAGAAC	RT-PCR de <i>ERG10</i>
ERG10-2	CATTACAAATGGCGGC	"
AUS1-1	TTCCTTGCTCACCTGCAA	RT-PCR de <i>AUS1</i>
AUS1-2	CCCATTAAGGCGGTCAA	"
ADR1-1	TCCCGTTGTTGACTTG	RT-PCR de <i>ADR1</i>
ADR1-2	ACTTGACTGAGGATGC	"
FBA1-1	TAAAGAGAAAGACCGGTGTCAT	RT-PCR de <i>FBA1</i>
FBA1-2	GGGAGGAGAATAATGGTTCA	"
SNQ2-1	ACTGTGTACCCAACGT	RT-PCR de <i>SNQ2</i>
SNQ2-2	CATTGATCGCCTCTGA	"
MET2-1	CCTCACCAAAGACAGA	PCR-RFLP de <i>MET2</i>
MET2-2	CGAAAACGCTCCAAGA	"
IURA5	ATGTCGAAAGCTACATATAAGGAACGTGC TGCTACTCATC CGTACGCTGCAGGTGCAC	Interrupción del gen <i>URA3</i> en cepas vínicas
IURA3	TACAGTTTTTTAGTTTTGCTGGCCGCATCTT CTCAAAT ATAGGCCACTAGTGGATCTG	"

MATERIALES Y MÉTODOS

Oligo	Secuencia (5' a 3')	Utilización
IURA5B	CTAGTCCTGTTGCTGCCAAGCTATTTAATA TCATGCACGA CGTACGCTGCAGGTCGAC	Interrupción del gen <i>URA3</i> en cepas vínicas
IURA3B	ATGCTTCCCAGCCTGCTTTTCTGTAACGTTT ACCCTCTAC ATAGGCCACTAGTGGATCT	"
URA3A1	GAGTATTGAGAAGGGCAACG	Comprobación de integración e interrupción del locus <i>URA3</i>
URA3A4	TGCCCTACACGTTTCGCTATG	"
tHSP26-1	TCCCCCGGGACCTACCATAGGACACAC	Amplificación de <i>HSP26</i> incluyendo promotor y terminador y sitios <i>SmaI/BamHI</i> para clonación en YEp352
tHSP26-2	CGCGGATCCACCGTTTGATATAACCGAGC	"
tYHR087w-1	TCCCCCGGGACGGTGATATAACAGCGC	Amplificación de <i>YHR087w</i> incluyendo promotor y terminador y sitios <i>SmaI/BamHI</i> para clonación en YEp352
tyhr087w-2	CGCGGATCCCTCTATCGTCTGTGTTACG	"

3. Matrices.

3.1. Macromatrices.

Se utilizaron macromatrices con sondas, por duplicado, de 32 genes de respuesta a estrés. Las sondas intentan abarcar, en lo posible, la pauta abierta de lectura completa. Las matrices incluyen también controles negativos (8 puntos con DNA genómico total de *E. coli*) y positivos (16 puntos con genómico total de *Saccharomyces cerevisiae*). Se incluye también el gen *ACT1* por duplicado. Se utilizó un mismo chip para todas las muestras procedentes de un mismo cultivo para cada cepa. Las matrices fueron elaboradas por el servicio de Chips de la Universitat de València. En la Figura M.1. se muestra la hibridación de una de las matrices y las posiciones de cada gen o cada control en la misma.

3.2. Micromatrices.

Las matrices fueron elaboradas en el centro Research Genetics (Huntsville, AL) a partir de la amplificación mediante oligos específicos de 6281 pautas abiertas de lectura. El marcaje e hibridación de las muestras fueron realizados por el servicio de Genómica del Fred Hutchinson Cancer Research Center (Seattle, E.E.U.U.) en las mismas condiciones que las descritas previamente (Fazzio, T.G. y col., 2001). Se utilizaron muestras de RNA de 3 cultivos independientes de cada cepa y se hibridaron los siguientes pares Cy3-Cy5: 16A-27A, 16C-27B, 27B-16B, 27B-16C y 27C-16A.

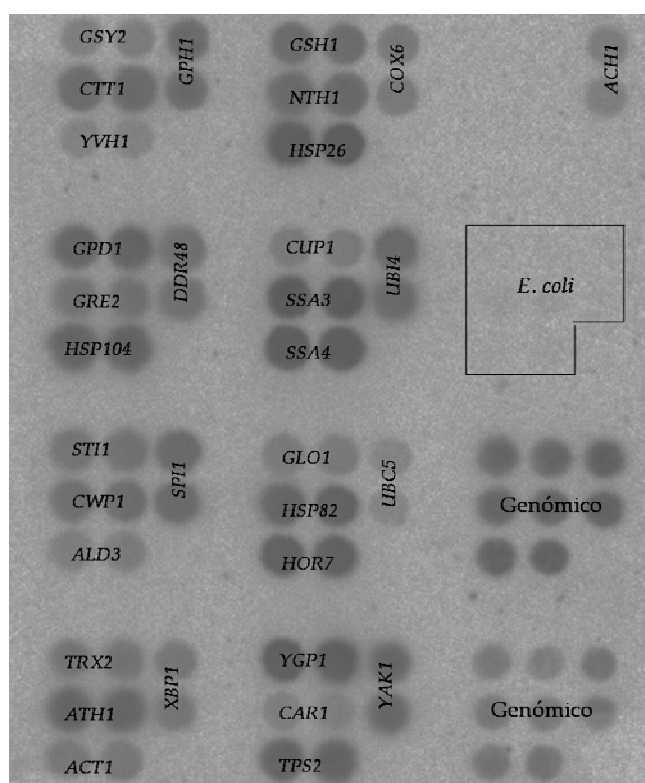


Figura M.1. Hibridación de una de las macromatrices mostrando las posiciones de los genes y los controles.

4. Cepas.

4.1. Cepas de *Escherichia coli*.

Se ha utilizado la cepa DH5α transformada con los plásmidos indicados en la Tabla M1, excepto YEp351-cre-cyh que está introducido en la cepa XL-1 Blue.

4.2. Cepas de levadura de laboratorio.

Tabla M3. Cepas de levadura de laboratorio.

Cepa	Descripción	Procedencia
W303-1A	MATa, <i>SUC2</i> , <i>ade2</i> , <i>can1</i> , <i>his3</i> , <i>leu2</i> , <i>trp1</i> , <i>ura3</i>	(Thomas, B.J. y col., 1989)
BY4742	MATalpha, <i>his3Δ1</i> , <i>leu2Δ0</i> , <i>lys2Δ0</i> , <i>ura3Δ0</i>	Euroscarf
YHR087w	BY4742; YHR087w::kanMX4	“

4.3. Cepas vínicas de levadura.

Tabla M4. Cepas vínicas comerciales.

Cepa	Nombre comercial	Procedencia	Identificación comercial
ICV 9	*Fermivin VB1	DSM (1)	<i>S. cerevisiae</i>
ICV 16	Fermicru primeur	DSM (1)	<i>S. cerevisiae</i>
ICV 18	*Fermicru VR5	DSM (1)	<i>S. cerevisiae</i>
ICV 22	Lalvin T73	Lallemand Inc. (2) (Querol, A. y col., 1992b)	<i>S. cerevisiae bayanus</i>
ICV 27	UCLM S377	Springer Oenologie (3)	<i>S. cerevisiae bayanus</i>
ICV 48	*Lalvin DV10	Lallemand Inc. (2)	<i>S. cerevisiae bayanus</i>
1	BRG	Lallemand Inc. (2)	<i>S. cerevisiae</i>
2	DV10	“	<i>S. bayanus</i>
3	QA23	“	<i>S. cerevisiae bayanus</i>
4	EC1118	“	<i>S. bayanus</i>
5	BC	“	“
6	D47	“	<i>S. cerevisiae</i>
7	71B	“	«
8	M2	“	“
9	SC	“	“
10	KIM	“	“
11	CM	“	<i>S. cerevisiae</i>
12	CHP	“	<i>S. bayanus</i>
13	R2	“	<i>S. cerevisiae bayanus</i>
14	PM	“	<i>S. bayanus</i>
15	CAW	“	<i>S. cerevisiae</i>
16	RC212	“	“

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa	Nombre comercial	Procedencia	Identificación comercial
17	CEG	Lallemand Inc. (2)	<i>S. cerevisiae</i>
18	CY3079	“	“
19	D254	“	“
20	BDX	“	“
21	L2056	“	“
22	CSM	“	“
23	CGC62	“	“
24	BM45	“	“

(1) Delft, The Netherlands. (2) Maisons-Alfort, Francia (3) Montreal, Québec Canadá

* Las cepas utilizadas proceden de una colección de levaduras industriales cedida por el Dr. E. Bartra y elaborada, hace aproximadamente 10 años, a partir de lotes de de las levaduras secas indicadas. No podemos asegurar que estas cepas se comercialicen actualmente o que no se hayan producido cambios de cepa aunque se utilicen estos nombres comerciales.

Tabla M5. Cepas vínicas no comerciales procedentes del Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI).

Cepa	Origen	Alcohol (°Brix)/sustrato	Identificación
IFI 87	Montilla	15.7° sobre uva P.Ximenez	<i>S. ellipsoideus</i>
IFI 89	Córdoba	19° sobre pulpa de membrillo	<i>S. ellipsoideus</i>
IFI 240	Valladolid	8.3° sobre mosto	<i>S. ellipsoideus</i>
IFI 278	Albariño	9.7° sobre mosto de uva	<i>S ellipsoideus</i>
IFI 279	Valladolid	8° sobre mosto de uva	<i>S. ellipsoideus</i>
IFI 367	Mentrida	8.7° sobre mosto de uva	<i>S. uvarum</i>
IFI 391	Serrada	7° sobre mosto de uva	<i>S. uvarum</i>
IFI 704	Requena.	13°	<i>S. bayanus</i>

Tabla M6. Cepas vínicas modificadas genéticamente.

Cepa	Descripción	Procedencia
T ₇₃₋₄	<i>ura3/ura3</i>	(Puig, S. y col., 1998)
BQS272	T ₇₃₋₄ transformada con YEp352	Carrasco, P., Tesis Doctoral
BQS2004	T ₇₃₋₄ transformada con YEp352-HSP26	Este trabajo

MATERIALES Y MÉTODOS

Cepa	Descripción	Procedencia
BQS2006	T ₇₃₋₄ transformada con YEp352-YHR087w	Este trabajo
BQS2017	ICV 16 <i>ura3</i> ⁻	“
BQS2018	BQS2017 transformada con YEp352	“
BQS2020	BQS2017 transformada con YEp352-HSP26	“
BQS2022	BQS2017 transformada con YEp352-YHR087w	“
BQS2033	ICV 27 <i>ura3</i> ⁻	“
BQS2034	BQS2033 transformada con YEp352	“
BQS2036	BQS2033 transformada con YEp352-HSP26	“
BQS2038	BQS2033 transformada con YEp352-YHR087w	“

MÉTODOS.

1. Medios y condiciones de cultivo.

1.1. Bacterias.

Los cultivos de *E. coli* se realizaron en medio LBA (extracto de levadura 0.5% (p/v), bactotriptona 1% (p/v), NaCl 1% (p/v), ampicilina 50 mg/mL) a 37°C con agitación (200 rpm). Para los cultivos en placa el medio fue suplementado con agar 2%.

1.2. Levaduras.

1.2.1. Medios generales y condiciones de incubación.

Para los cultivos de células de levadura sin auxotrofías se utilizó medio YPD (extracto de levadura al 1% (p/v), bactopectona al 2% (p/v) y glucosa al 2% (p/v)), agitación a 200 rpm e incubación a 30°C. Para el crecimiento en soporte sólido se utilizó el mismo medio YPD con agar al 2% (p/v) y las placas se incubaron durante 24-72 h a 30°C.

Las cepas auxótrofas transformadas con plásmidos (marcador *URA3* en todos los casos) fueron cultivadas en medio selectivo. Para las cepas derivadas de W303-1A se

MATERIALES Y MÉTODOS

utilizó medio mínimo SD (base nitrogenada para levadura sin aminoácidos y sin sulfato amónico 0.17% (p/v), $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 0.5% (p/v), glucosa 2% (p/v)) suplementado con leucina (100 mg/L), triptófano (20 mg/L), histidina (20 mg/L) y adenina (100 mg/L). Para la cepa T₇₃₋₄ (*ura3*) transformada con plásmidos se empleó medio mínimo SD sin suplementos. Para la elaboración de los medios sólidos se agregó agar al 2% (p/v).

La selección de transformantes resistentes a antibiótico se llevó a cabo en medio sólido YPD suplementado con geneticina a 100 mg/L o con cicloheximida a 1 mg/L. Los transformantes estables fueron discriminados entre los transformantes abortivos formadores de microcolonias mediante resiembra en medio selectivo.

Para la inducción del promotor del gen *GAL1* en las cepas transformadas con el plásmido YEp352-cre-cyh se inocularon las colonias resistentes a geneticina y a cicloheximida en YPD conteniendo ambos antibióticos a 100 y 1 mg/L respectivamente. Se dejaron crecer los cultivos durante 1 día, se lavaron las células 3 veces con agua destilada estéril y se resuspendieron en medio YPGal (YP conteniendo galactosa 2% (p/v) en lugar de glucosa). Tras una incubación de 2-4 horas se plaqueó en SD-cicloheximida una dilución adecuada para la obtención de unas 100 colonias por placa. En el paso en que se eliminó la última copia del gen *URA3* las placas fueron de YPD en lugar de SD y también contenían el antibiótico. A los 2-3 días de incubación a 30°C se realizó una réplica de las colonias a placas de YPD-geneticina para comprobar la pérdida del marcador.

1.2.2. Mostos y condiciones de inoculación.

En este trabajo se han utilizado mostos sintéticos de composición químicamente definida y mostos naturales.

Para detectar diferencias en los patrones de fermentación de diferentes cepas vínicas se realizaron experimentos de microvinificación en condiciones subóptimas empleando mosto sintético deficiente en nitrógeno (glucosa al 20% (p/v), KH_2PO_4 al 0.5% (p/v), $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ al 0.04% (p/v) y extracto de levadura al 0.1% (p/v), pH 3.8) y botellas de 250 mL con sistema para permitir el intercambio gaseoso. La fermentación se llevó a cabo en cámaras de temperatura controlada a 22°C y en condiciones de agitación suave (125 rpm). Como control se hicieron algunos experimentos en condiciones no limitantes de nitrógeno

MATERIALES Y MÉTODOS

añadiendo al mosto $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ al 0.2% (p/v). Se inocularon en los mostos $5 \cdot 10^6$ células/mL procedentes de un cultivo en YPD crecido durante una noche.

Para analizar la expresión génica y proteica durante la vinificación se empleó otro mosto sintético de composición químicamente definida (MS300) (Riou, C. y col., 1997), con algunas modificaciones, la principal de las cuales es el empleo de una mezcla equimolecular de glucosa y fructosa a una concentración final del 20% (p/v). El mosto contenía además 0.03% (p/v) de nitrógeno atómico asimilable (120 mg/L en forma de NH_4Cl y 180 mg/L en forma de aminoácidos (Tyr 18 mg/L, Trp 179 mg/L, Ile 33 mg/L, Asp 44 mg/L, Glu 120 mg/L, Arg 374 mg/L, Leu 48 mg/L, Thr 76 mg/L, Gly 18 mg/L, Gln 502 mg/L, Ala 145 mg/L, Val 44 mg/L, Met 31 mg/L, Phe 38 mg/L, Ser 78 mg/L, His 32 mg/L, Lys 17 mg/L, Cys 13 mg/L, Pro 619 mg/L)), vitaminas (mioinositol 20 mg/L, pantotenato de calcio 1.5 mg/L, tiamina 0.25 mg/L, ácido nicotínico 2 mg/L, piridoxina 0.25 mg/L, biotina 0.003 mg/L), ácidos (málico 0.6% (p/v) y cítrico 0.6% (p/v)), sales minerales (KH_2PO_4 750 mg/L, K_2SO_4 500 mg/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 250 mg/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 155 mg/L, NaCl 200 mg/L, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4 mg/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 1 mg/L, KI 1 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0,4 mg/L, H_3BO_3 1 mg/L, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 1 mg/L) y factores anaerobios (ergosterol 15 mg/L, ácido oleico 5 mg/L, Tween 80 0.5 mL/L). El pH final en condiciones estándar fue 3,2 y se ajustó con NaOH. Estos experimentos se llevaron a cabo también en botellas de 250 mL y la temperatura en condiciones estándar fue de 22°C pero sin agitación, para simular mejor las condiciones anaerobias que se producen durante la vinificación en bodega. En los experimentos de expresión génica a los 30 minutos desde la inoculación en mostos con diferente pH (3.0, 3.3, 3.6) o temperatura (15, 22, 28°C) se inocularon $5 \cdot 10^6$ células/mL procedentes de un cultivo en YPD crecido durante una noche. En el resto de experimentos se utilizó el mismo número de células pero procedentes de un cultivo en fase de crecimiento exponencial con una composición del medio igual a la del mosto MS300 pero conteniendo tan sólo un 2% (p/v) de glucosa como fuente de carbono.

Para los experimentos realizados con levadura seca activa y con levaduras manipuladas genéticamente se utilizaron mostos naturales de las variedades Bobal y Sauvignon blanc de la cosecha de 2004 de Requena (Bodegas Torre Oria y C. Carrascal). El

MATERIALES Y MÉTODOS

mosto Bobal fue suplementado con 10 mL de sulfoferment por hectolitro de mosto (equivalente a 6 g/HL de SO₂) y con 1 g de cóctel enzimático Lallyzyme (Lallemand Inc.) por 100 Kg de uva. El mosto Sauvignon fue suplementado con 10 g/HL de metabisulfito potásico (KHSO₃, que equivale a 5.3 g/HL de SO₂) y con 0.5 g/HL del preparado enzimático Lafase 60 (Laffort). En ambos casos los mostos fueron parcialmente clarificados por sedimentación en depósitos de 150 HL durante 1-2 días a 10°C, tomándose para los experimentos mosto situado aproximadamente a 1.5-2 metros del fondo del depósito donde sedimentan las lías. El mosto tomado en estas condiciones fue congelado inmediatamente hasta su utilización. Tras su descongelación y previamente al inóculo de las levaduras se realizó una siembra directa de 10 µL en placas con YPD y no se observó crecimiento de ninguna colonia motivo por el cual no se estudió la imposición de la cepa inoculada durante la vinificación.

Los experimentos preliminares en mosto natural se realizaron a partir de precultivos líquidos en YPD procedentes de colonias aisladas y crecidos durante tres noches. Para los experimentos con levaduras manipuladas genéticamente se procedió de la misma manera pero utilizando medio SC sin uracilo para evitar la pérdida de plásmido. Con esta estrategia se pretende conseguir cultivos en fase estacionaria muy avanzada de manera que el estado metabólico de las células sea lo más parecido posible al que se encuentra en la levadura seca. De los cultivos crecidos de esta manera se recogieron las células y se resuspendieron en glucosa al 5% (p/v) a una concentración aproximada de 1·10⁷ células/µL. Después de una incubación durante 20 minutos a 30°C se inoculó en proporción 1:50 al mosto natural.

En los experimentos en los que se inoculó levadura seca activa, la hidratación previa de ésta se llevó a cabo de acuerdo con las sugerencias de las empresas suministradoras. Así, antes de ser inoculada, fue incubada a una concentración del 10% (p/v) en un medio con glucosa al 5% (p/v) durante 20 minutos a 37°C. Posteriormente se inoculó en una proporción 1:50 al mosto natural lo que supone una concentración de viables de aproximadamente 2·10⁵ células/µL.

Para todos los experimentos con mosto natural el cultivo de cada cepa se separó en alícuotas de 1.5 mL contenidas en tubos de 2 mL de forma cónica. Para todas las

MATERIALES Y MÉTODOS

determinaciones a lo largo de la vinificación se recogió toda la muestra contenida de manera que en este caso no hay aireación ni agitación del cultivo en ningún momento de la vinificación. Para los experimentos preliminares en los que se estudió el comportamiento a partir de precultivos crecidos en YPD la temperatura de incubación fue de 22°C. Para los experimentos con levadura seca activa y levaduras modificadas genéticamente se ensayaron temperaturas de incubación de 16, 22 y 30°C, abarcando así el rango de temperaturas utilizado en la elaboración de vinos tanto tintos como blancos.

1.2.3. Experimentos de sensibilidad a estrés.

Para el estudio de la sensibilidad a los distintos tipos de estrés se siguieron protocolos basados en aquellos utilizados previamente en el nuestro y en otros laboratorios (Ivorra, C. y col., 1999; Piper, P.W. y col., 1994).

Para la mayoría de experimentos se diluyeron cultivos en YPD crecidos durante una noche hasta una absorbancia a 600 nm de 0.1 y se dejaron crecer hasta 0.3-0.4 (fase exponencial temprana), momento en el cual se aplicó el estrés correspondiente.

Para el estudio de estrés osmótico se recogieron mediante centrifugación (3000 rpm, 2 minutos) las células contenidas en una alícuota del cultivo en YPD mantenido en fase de crecimiento exponencial y se resuspendieron en el mismo volumen de medio YPD suplementado con KCl 1 ó 0.7 M. La incubación continuó a 30°C durante 60 y 120 minutos respectivamente. Para el estudio de estrés por etanol se añadió directamente este compuesto al cultivo de células en crecimiento exponencial hasta una concentración del 8 o del 10% (v/v) e incubando a 30°C durante 90 y 60 minutos respectivamente.

La viabilidad de las células tras estos tratamientos se determinó sembrando en placas de YPD por triplicado la dilución adecuada de los cultivos, de manera que tras la incubación a 30°C se obtuviesen entre 100 y 300 colonias. Para expresar el resultado como porcentaje de viabilidad se tomó como referencia el cultivo en el momento anterior a la aplicación del estrés. En aquellos casos en los que se obtuvo un mayor número de unidades formadoras de colonias tras la aplicación del estrés se consideró un 100% de viabilidad y por eso se muestran los valores correspondientes sin desviación. Los datos mostrados son el resultado de al menos tres experimentos independientes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para el estudio de la sensibilidad a estrés oxidativo se sembraron en placas de YPD por triplicado 10^7 células procedentes de cultivos en YPD y se colocó en el centro de la placa un disco de papel de filtro de 5 mm de diámetro y 0.6 mm de grosor impregnado con 10 μ L de H_2O_2 9.79 M. Tras 24-48 horas de incubación a 30°C se formó un césped de células y en el centro de la placa un halo de inhibición del crecimiento cuyo diámetro constituye una medida de la sensibilidad de cada cepa a dicho estrés (Stephen, D.W. y col., 1995). El experimento se realizó utilizando tanto células en fase de crecimiento exponencial como células en fase de crecimiento estacionaria (cultivos de una noche) cultivadas en YPD. Se llevaron a cabo al menos tres experimentos independientes para cada cepa y condición.

2. Métodos de manipulación de microorganismos.

2.1. Transformación de *E. coli*.

Las transformaciones de *E. coli* se realizaron según el protocolo descrito previamente (Hanahan, D., 1983). Se partió de células competentes obtenidas mediante el método del RbCl (Sambrook, J. y col., 2001) descongeladas en hielo. Se añadió entre 1 y 20 ng de DNA en un volumen no superior al 5% (v/v) del volumen de competentes, se mezcló suavemente y se incubó durante 30 minutos en hielo. Seguidamente se dio un choque térmico a 42°C durante 90 segundos y se dejó de nuevo en hielo 5 minutos. Las células fueron después recuperadas añadiendo 4 volúmenes de LB e incubando durante 1 hora a 37°C. Finalmente se plaquearon en medio selectivo LBA.

2.2. Transformación de levadura.

Las distintas cepas de *S. cerevisiae* fueron transformadas siguiendo el protocolo basado en la incubación con acetato de litio (Gietz, R.D. y col., 1995). A partir de cultivos de una noche en YPD las células se diluyeron en este mismo medio de cultivo hasta una absorbancia a 600 nm de 0.2-0.3. Después de 2.5-3 generaciones se recogieron 10^8 células por transformación y se lavaron una vez con agua destilada estéril y otra vez con LiAc 0.1 M. Seguidamente se resuspendieron en 50 μ L de LiAc 0.1 M y se incubaron durante 15

MATERIALES Y MÉTODOS

minutos a 30°C. Después se añadieron 25 µL de DNA de esperma de salmón disuelto en TE (Tris HCl 10 mM, EDTA 1 mM pH 8.0) a 2 mg/mL y previamente desnaturizado y 5-10 µL con 100-200 ng (plásmido YEp352) o 1-5 µg (módulos de integración) de DNA transformante. A la mezcla se añadió 300 µL de una solución de polietilenglicol (peso molecular medio 3350, 50% (p/v)): LiAc (1 M): H₂O en proporciones 24:3:1. El tubo se agitó de forma vigorosa, se incubó a 30°C 30 minutos y seguidamente se realizó un choque térmico a 42°C durante 20 minutos.

En el caso de las transformaciones con plásmidos que complementan auxotrofías de la cepa, tras el choque térmico la mezcla de transformación se plaqueó en medio mínimo selectivo. En el caso de las transformaciones en las que la selección se basa en la resistencia a antibióticos (véase a continuación), las células fueron recuperadas en medio YPD líquido durante 2-5 horas en agitación a 30°C. Después de la recuperación se realizó la siembra en placas con antibiótico a las concentraciones indicadas en el apartado 1.2.1.

2.3. Construcción de cepas vínicas auxótrofas para uracilo.

Las transformaciones integrativas para la eliminación de secuencias en el genoma se llevaron a cabo con el sistema descrito por (Guldener, U. y col., 1996). El DNA transformante se sintetizó mediante una reacción de PCR en la que se utilizó como molde el plásmido pUG6. Este plásmido contiene el gen *kan^r* de *E. coli*, que confiere resistencia a geneticina, flanqueado por secuencias LoxP. Según se muestra en la Figura M.2, los cebadores utilizados inicialmente (IURA3 e IURA5) poseen en la zona 3' una secuencia de 18-20 bases homólogas al plásmido pUG6 (indicada en cursiva en la tabla M2 de oligonucleótidos) y, en la zona 5', secuencias de 38-40 bases homólogas a los extremos de la secuencia que se desea eliminar, en nuestro caso los extremos de la región codificante del gen *URA3*. Después de la transformación (apartado 2.2) con el DNA lineal obtenido de esta manera se produce, por recombinación homóloga, la integración en el locus deseado y la sustitución de la secuencia salvaje por la del gen marcador. El siguiente paso fue la transformación de la cepa con el plásmido YEp351-cre-cyh. Éste posee como marcador el gen *CYIII^R* de *Candida maltosa*, que confiere resistencia a cicloheximida y, además, posee la secuencia codificante para la recombinasa Cre del fago P1 bajo el control del promotor del

MATERIALES Y MÉTODOS

gen *GAL1*. Seguidamente se procedió a la inducción de la expresión de la recombinasa (apartado 1.2.1 de esta sección) para eliminar el marcador de resistencia a geneticina por recombinación de las secuencias *LoxP*. Tras sucesivas rondas de integración y eliminación hasta interrumpir todas las copias de *URA3* presentes en el genoma de las cepas se realizó un crecimiento de la cepa *ura⁻, cyh⁺* durante 2 días en medio YPD no selectivo con el fin de conseguir colonias que hubiesen perdido el plásmido YEp352-cre-cyh.

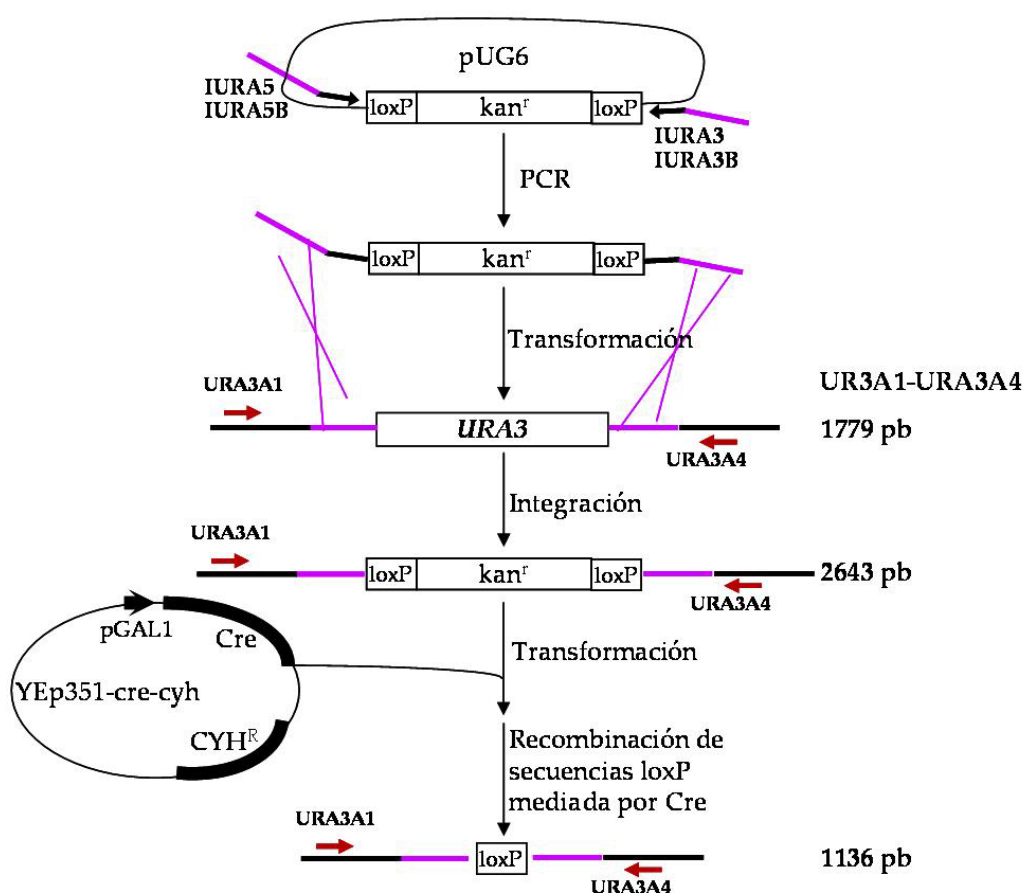


Figura M.2. Esquema del proceso de interrupción génica mediante sustitución por módulo de resistencia a geneticina y eliminación del marcador por recombinación de secuencias *LoxP* mediada por recombinasa Cre. (Basada en Guldener (1996)).

Como se muestra en la Figura M.2 todos estos pasos pueden ser seguidos mediante PCR por amplificación a partir de los oligos *URA3A1* y *URA3A4* ya que el tamaño de las bandas obtenidas es de 1779 pb si el gen está intacto, 2643 pb si posee el marcador *kan^r* integrado y de 1136 pb después de la recombinación de las secuencias *LoxP*. Dado que en

cada ronda de interrupción el módulo de integración puede recombinar en locus ya interrumpidos se tuvo que diseñar otra pareja de oligos (IURA3B e IURA5B) con una secuencia interna respecto a la primera para poder eliminar todas las copias del gen *URA3* presentes en el genoma de estas levaduras.

3. Métodos de manipulación y análisis de ácidos nucleicos.

3.1. Aislamiento de DNA y RNA.

3.1.1. DNA plasmídico de E. coli.

Para las preparaciones de DNA plasmídico a pequeña escala se utilizó el sistema comercial "Perfect prep plasmid mini" (Eppendorff) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.1.2. DNA genómico de levadura.

La obtención de DNA genómico de levadura para marcaje e hibridación en las macromatrices se llevó a cabo a partir de cultivos de 40 mL de YPD crecidos durante una noche según el protocolo "Yeast DNA miniprep" (Kaiser, C. y col., 1994). Para la obtención de los patrones de restricción del DNA mitocondrial (Querol, A. y col., 1993) y seguimiento de las interrupciones de las diferentes copias del gen *URA3* se utilizó un protocolo similar adaptado a volúmenes de cultivo inicial de 2 mL. Se recogieron las células contenidas en estos 2 mL por centrifugación a 13000 rpm 30 segundos y se resuspendieron en 500 µL de medio sorbitol 0.9 M, EDTA 0.1 M pH 8.0, conteniendo Zimoliasa 20T a una concentración de 0.4 mg/mL. Se incubó a 37°C durante 1 hora para obtener los protoplastos, que se recogieron centrifugando a 8000 rpm 2 minutos y se resuspendieron en 500 µL de tampón Tris-HCl 50 mM, EDTA 20 mM. Seguidamente se añadieron 50 µL de una disolución de SDS al 10% (p/v) y se incubó a 65°C 30 minutos para romper membranas. Tras la incubación se añadieron 200 µL de KAc 5 M, se mantuvo la mezcla en hielo durante 30 minutos y se eliminaron los restos celulares por centrifugación a 13000 rpm 10 minutos a 4°C. Con el objetivo de obtener una suspensión

MATERIALES Y MÉTODOS

de DNA más limpia se fenolizó el sobrenadante de la centrifugación anterior con un volumen de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (25:24:1), se separaron las fases centrifugando a 10000 rpm 5 minutos a 4°C, se recogió la fase acuosa y se precipitó el DNA contenido en la misma con 1 volumen de isopropanol. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente se recogió el DNA por centrifugación a 13000 rpm 10 minutos, se hizo un lavado con etanol al 70% (v/v) y se secó el pellet en una Speed Vac (Savant). Por último el DNA se resuspendió en agua milliQ con RNasa 0.5 mg/mL, se incubó a 37°C 30 minutos y se guardó a -20°C hasta su utilización.

3.1.3. DNA de levadura para cariotipos.

Se utilizó un protocolo descrito anteriormente (Carle, G.F. y col., 1985) con algunas modificaciones. Se recogieron por centrifugación (3000 rpm, 2 minutos) las células de un cultivo crecido durante una noche a partir de una colonia en 10 mL de YPD. Se lavaron las células una vez en EDTA 50 mM, pH 8 y se resuspendieron en una proporción de 0.1 g de células/mL en tampón CPES (tampón CPE (ácido cítrico 40 mM, fosfato sódico 120 mM pH 6 y EDTA 20 mM pH 8) con D-sorbitol 1.2 M y DTT 5 mM) con 1 mg/mL de Zimoliasa 20T. Inmediatamente se añadió un volumen de tampón CPE con agarosa de bajo punto de fusión de grado cromosómico (FMC) al 2% (p/v) mantenida a 55°C. Esta mezcla se vertió en jeringas de insulina, se dejó solidificar y se realizaron discos a partir del bloque de agarosa de diámetro igual al de la jeringa y de aproximadamente 1 mm de grosor. Los discos se pasaron a un tubo, se cubrieron con tampón CPE y se incubaron durante 4 horas a 30°C. Seguidamente se eliminó el tampón y se incubaron durante al menos 12 horas a 50°C en tampón TESP (TES (Tris-HCl 10 mM pH 8, EDTA 0.45 M y SDS 1%) con 1 mg/mL de proteinasa K). Finalmente los bloques se conservaron en EDTA 500 mM a 4°C. Antes de realizar la electroforesis los bloques se lavaron con tampón TE (Tris-HCl 10 mM, EDTA 1 mM, pH 8) durante 30 minutos 3 veces a 50°C y 2 veces más a temperatura ambiente.

3.1.4. Aislamiento de RNA.

Para la extracción de RNA total de levadura se siguió el protocolo descrito previamente (Sherman, F. y col., 1994) con algunas modificaciones. Se recogieron las

MATERIALES Y MÉTODOS

células mediante centrifugación, se lavaron una vez con agua destilada estéril y se congelaron inmediatamente en nitrógeno líquido, almacenándose a -80°C hasta su procesamiento posterior. Las células se descongelaron entonces en hielo y se resuspendieron en 0.5 mL de tampón LETS (LiCl 0.1 M, EDTA 0.01 M, Tris 0.01 M, SDS 0.2% (p/v), pH 7.4). Se añadió 0.5 mL de fenol ajustado a pH 4.3 (Amresco) y 0.5 mL de perlas de vidrio (425-600 micras de diámetro). Las células se rompieron por agitación en un aparato Fast-Prep FP120 (Savant Instruments Inc. Farmingdale, NY) durante dos períodos de 30 segundos (velocidad 5.5), entre los cuales las células se mantuvieron 1 minuto en hielo. Posteriormente, se centrifugaron las muestras durante 5 minutos a 13000 rpm en una centrífuga refrigerada a 4°C . El sobrenadante se extrajo con una mezcla de fenol: cloroformo: alcohol isoamílico (125:24:1). El RNA se precipitó con un volumen de LiCl 5 M a -80°C durante al menos 3 horas, se recogió por centrifugación, se lavó con 200 μl de etanol 70% (v/v) y se resuspendió en H_2O milliQ. Se volvió a precipitar el RNA con acetato sódico a una concentración final 0.3 M y dos volúmenes de etanol. Después de al menos 2 horas a -80°C se recogió el precipitado por centrifugación, se lavó con etanol 70% y se resuspendió en agua milliQ.

Para el estudio de la expresión génica por RT-PCR cuantitativa se utilizó el sistema de extracción de RNA "Total quick RNA cells and tissues kit" de la casa Talent (Trieste, Italia) añadiendo, respecto a las instrucciones de los fabricantes, un paso previo de rotura de células en Fast Prep (4 pulsos de 30 segundos a velocidad 5.5) utilizando el tampón de lisis suministrado por el kit.

La concentración de RNA se valoró midiendo la absorbancia a 260 nm.

Todo el material utilizado para la obtención de RNA fue autoclavado a 2 atmósferas y 121°C durante 1 hora para inactivar las RNasas.

3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y transcripción reversa (RT).

3.2.1. PCR.

Las reacciones se realizaron en un volumen final de 15-25 μl (PCR analítica) o 100 μl (PCR preparativa) con 100 ng de DNA molde genómico o 10 ng de DNA plasmídico, 0.5

MATERIALES Y MÉTODOS

μ M de cada cebador, 0.2 mM de cada dNTP, $MgCl_2$ 3 mM, tampón proporcionado por la casa comercial y una unidad de DNA polimerasa *Biotaq* (Bioline), aislada de *Thermus aquaticus* YT-1. Las condiciones de reacción fueron: 1 ciclo de 3 minutos a 94°C, 20-40 ciclos compuestos de 1 minuto a 94°C, 1 minuto a la temperatura óptima de hibridación para cada par de oligonucleótidos y un tiempo variable (1 minuto por Kb) a 72°C y, finalmente, 1 ciclo de 10 minutos a 72°C.

3.2.2. RT.

Se incubaron 5 (RT-PCR) o 30 (macromatrices) μ g de RNA con 1 unidad de DNasa I (Gibco, Life Technologies) en un volumen de 8.8 μ L a 37°C durante 30 minutos. A continuación se agregaron 0.8 μ L de oligodT (500 ng/ μ L), 16 unidades de inhibidor de ribonucleasas Rnasin (Promega) y 0.8 μ L de una mezcla de dNTPs a una concentración de 10 mM cada uno, y se incubó la mezcla a 72°C durante 10 minutos, tras lo cual se transfirió el tubo a hielo. Se añadieron entonces 3.2 μ L de tampón 5x para SuperScript II (Invitrogen) y 1.6 μ L de DTT 0.1 M. Esta mezcla se incubó durante 2 minutos a 42°C, y tras la adición de 80 unidades de transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen), durante 1 hora adicional a 42°C. Finalmente se inactivó el enzima incubando a 72°C 10 minutos.

3.2.3. RT-PCR semicuantitativa.

Para la amplificación del producto de la transcripción reversa (cDNA) se realizó una dilución 1/20 del cDNA obtenido como se describe en el apartado anterior y se utilizaron 5 μ L como molde de la PCR. El volumen de reacción para estos estudios fue de 20 μ L y se utilizaron 20 ciclos de amplificación para *ACT1*, *YHR087w*, *HSP26*, *PDR10*, *FBA1* y *AUS1*, 35 ciclos para *SNQ2*, 40 ciclos para *MUP1* y 45 ciclos para *ADR1*.

3.2.4. RT-PCR cuantitativa.

Los experimentos de expresión génica al inicio de la vinificación en cepas vnicas comerciales se llevaron a cabo mediante RT-PCR cuantitativa en un aparato GeneAmp 5700 (Perkin Elmer), utilizando el reactivo SYBR Green (Perkin Elmer). El diseño de oligonucleótidos, la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación se llevaron a

cabo siguiendo las instrucciones del fabricante. Se hizo triplicado de PCR para todas las muestras. El procesamiento de los datos se llevó a cabo de la manera siguiente: Se realizó un patrón con varias de las muestras de cDNA. Se hicieron 4 diluciones seriadas del patrón de manera que en cada PCR se ponía, junto con las muestras, un triplicado de cada dilución con el objetivo de realizar una recta a partir de los Ct resultantes. Al interpolar las muestras en la recta se obtiene el nivel relativo de cada cDNA en estudio, que fue normalizado frente al nivel de gen *ACT1* de cada muestra obtenido en las mismas condiciones.

3.3. Otras técnicas de DNA recombinante. Digestiones y ligaciones.

Las digestiones de DNA genómico o plasmídico con endonucleasas de restricción se realizaron siguiendo las recomendaciones del fabricante (Roche).

Las reacciones de ligación se realizaron siguiendo los protocolos previamente descritos (Sambrook, J. y col., 2001). Se utilizaron proporciones 1:5 de vector: inserto, la mezcla de reacción recomendada por la casa comercial de la DNA ligasa del fago T4 (Roche), y 12 horas aproximadamente de incubación a 16°C.

3.4. Separación de ácidos nucleicos por electroforesis.

3.4.1. Electroforesis de fragmentos de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa de concentración variable (0.8%-2% (p/v)) según los tamaños a separar. Los geles se prepararon en tampón TBE 0.5x (Tris 44.5 mM, ácido bórico 44.5 mM, EDTA 1.25 mM), que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Para la separación de bandas obtenidas tras las digestiones con *Hinfl* (patrón de restricción del DNA mitocondrial) tanto los geles al 1% (p/v) de agarosa como la electroforesis se realizó en tampón TAE 1x (Tris 40 mM, ácido acético glacial 4 M, EDTA 1 mM, pH 8). Las muestras se mezclaron con tampón de carga 6X (azul de bromofenol 0.25% (p/v), xilen cianol 0.25% (p/v), glicerol 30% (v/v)) hasta una concentración final 1X y la electroforesis se realizó a voltaje constante (6-10 V/cm) durante un tiempo variable en función de la resolución requerida.

3.4.2. Separación de cromosomas por electroforesis en campo pulsante.

Se preparó un gel de agarosa de grado cromosómico (FMC) al 1% (p/v) en tampón TBE 0.5x. Los discos de DNA se introdujeron en los pocillos del gel y se sellaron con agarosa al 1% (p/v) en tampón TBE 0.5x. La separación de las muestras se realizó en este mismo tampón mediante un equipo CHEF-DRII de Bio-Rad migrando a 6 V/cm durante 22h a 14°C. Durante las primeras 13 horas el campo eléctrico pulsó cada 60 segundos y durante las últimas 9 horas cada 90 segundos. Una vez finalizada la electroforesis el gel fue teñido con bromuro de etidio (1 mg/L) durante 5 minutos y a continuación se destiñó en agua destilada durante varias horas.

3.4.3. Electroforesis de RNA en geles de agarosa.

La integridad del RNA obtenido tras las extracciones y la concentración determinada por absorbancia a 260 nm, se comprobaron mediante la visualización de 2-3 µg de RNA total en un gel TAE 1x al 1% de agarosa. Estas electroforesis se llevaron a cabo durante 10-15 minutos generalmente a 10 V/cm.

3.5. Marcaje radiactivo de DNA y RNA.

3.5.1. Marcaje de fragmentos de DNA.

Para el marcaje de DNA genómico total previo a la hibridación de las macromatrices se utilizó la técnica de cebado aleatorio empleando el sistema High Prime (Roche) y utilizando como nucleótido marcado [α -³³P]-dCTP (Amersham). La reacción se incubó durante 15-20 minutos a 37°C, y posteriormente se detuvo por adición de EDTA a una concentración final 50 mM, de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para confirmar la incorporación de los nucleótidos radioactivos al DNA genómico y eliminar el exceso de nucleótidos libres se pasó la muestra por columnas MS300 (Amersham) siguiendo las indicaciones descritas por la casa comercial. Seguidamente se determinaron las desintegraciones por minuto (dpm) y se utilizaron 5·10⁶ dpm por mL de solución de hibridación.

3.5.2. Marcaje radiactivo de RNA poliadenilado.

El marcaje radiactivo de RNA poliadenilado para la hibridación de las macromatrices se realizó siguiendo el mismo protocolo que se detalló en el apartado 3.2.2. de esta sección pero la mezcla de dNTPs contenía una concentración final 16 mM de cada uno de los nucleótidos dATP, dTTP, dGTP y 100 μ M de dCTP y, en el momento de añadir la transcriptasa reversa, se añadió también 1 μ L de [α -³³P]-dCTP (Amersham). Después de la inactivación del enzima la muestra se pasó por columnas MS300 (Amersham) y se determinaron las dpm. Para la hibridación se utilizaron $3 \cdot 10^6$ dpm por mL de solución de hibridación.

3.6. Hibridación de ácidos nucleicos y autorradiografía.

3.6.1. Hibridación de macromatrices.

Las membranas se preincubaron a 42°C durante al menos dos horas en solución de prehibridación (SSPE 5x (NaCl 0.9 M, fosfato sódico 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7.7), Denhardt 5x (BSA 0.1% (p/v), Ficoll 0.1% (p/v), PVP 0.1% (p/v)) y DNA de esperma de arenque (100 μ g/mL)). Esta solución fue sustituida por solución de hibridación (SSPE 5x, Denhardt 1x, formamida desionizada 50% (v/v), sulfato de dextrano 10% (p/v) y DNA de esperma de arenque desnaturalizado (100 μ g/mL) a la que fue añadido el cDNA o el DNA genómico marcado y previamente desnaturalizado. La hibridación tuvo lugar a 42°C durante 16-24 horas, tras lo que se procedió a la eliminación de radiactividad que no hibrida específicamente lavando los filtros 1 vez durante 20 minutos a 65°C en SSPE 2x y dos veces durante 30 minutos y a la misma temperatura en SSPE 0.2x. Finalmente los filtros se secaron al aire.

Para eliminar la sonda de los filtros, con la finalidad de reutilizarlos, se realizaron dos lavados con SDS 0,1% (p/v) hirviendo. La eliminación de la sonda se comprobó realizando una exposición de 48 horas.

3.6.2. Autorradiografía.

La cuantificación de la intensidad en cada punto se llevó a cabo con un sistema de autorradiografía Phosphorimager FLA3000 (Fujifilm). El análisis de la imagen se llevó a cabo con el programa Image Gauge (Fujifilm).

4. Métodos de manipulación y análisis de proteínas.

4.1. Obtención de extractos proteicos y cuantificación de proteínas.

Se recogieron por centrifugación las células contenidas en 20 mL de los cultivos en el punto de 6 días de vinificación. Los extractos se obtuvieron por rotura de las células con perlas de vidrio en tampón de lisis (Tris-HCl 50 mM pH 7.5, EDTA 1 mM, NaCl 50 mM, DTT 1 mM) conteniendo una mezcla de inhibidores de proteasas ("Complete Mini EDTA-free", Roche) mediante Fast Prep realizando 2 pulsos de 20 segundos a velocidad 5. El lisado se centrifugó a 13000 rpm durante 20 minutos a 4°C obteniéndose un sobrenadante que constituye el extracto proteico. Una parte de dichos extractos fue lavada en Amicon Ultra (Millipore) siguiendo las instrucciones del fabricante con el fin de eliminar sales que podrían interferir en la primera dimensión de los geles preparativos.

La cuantificación de los extractos se realizó por el método de Bradford (Bradford, M.M., 1976) utilizando el reactivo comercializado por Bio-Rad y siguiendo las instrucciones proporcionadas por esta empresa. Para hacer la recta patrón se utilizó una solución de seroalbúmina bovina cuantificada por absorbancia a 280 nm ($\epsilon^{1\%}$ seroalbúmina bovina a 280 nm = 6.6). Para comprobar la correcta cuantificación de las proteínas y la calidad e integridad del extracto se cargaron 10 μ g de cada muestra en geles monodimensionales al 12% (p/v) de poliacrilamida utilizando el sistema Mini-Protean y llevando a cabo una tinción con reactivo de plata (Bio-Rad).

4.2. Geles bidimensionales analíticos.

Se realizaron 3 geles analíticos para cada extracto proteico y se utilizó triplicado de cada cultivo con lo que finalmente se analizaron 9 geles por cada cepa.

MATERIALES Y MÉTODOS

La electroforesis bidimensional se realizó según el método descrito por O'Farrell (O'Farrell, P.H., 1975), con algunas modificaciones. El isoelectroenfoco se llevó a cabo en un gradiente de pH inmovilizado (IPG) (Bjellqvist, B. y col., 1993) con un rango de pH 3-10 no lineal (Immobiline DryStrip, 18cm; Amersham Biosciences) con el sistema IPGphor (Amersham Biosciences). Los geles fueron rehidratados durante 10 horas a 15°C en presencia de 70 µg de proteína de cada extracto solubilizada en tampón de muestra (urea 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2% (p/v), ditioeritrol 10 mM, Pharmalyte pH 3-10 (Amersham Biosciences) 2% (p/v) y trazas de azul de bromofenol). Para el isoelectroenfoco se utilizó el siguiente programa: 1 hora a 500 V, 1 hora hasta 2000 V en gradiente y 6 horas 15 minutos a 8000V. Seguidamente se procedió a la reducción de las proteínas contenidas en las tiras con ditioeritrol 2% (p/v) 10 minutos y posterior alquilación de los grupos reducidos con iodoacetamida 2.5% (p/v) 5 minutos, ambos en tampón de equilibrado (urea 6 M, Tris-HCl 50 mM pH 6.5, glicerol 30% (p/v) y SDS 2% (p/v)).

La segunda dimensión se llevó a cabo con el sistema Protean II (Bio-Rad) en geles de poliacrilamida al 10% (p/v) de 1.5 mm de grosor, sin gel concentrador y preparados con ligeras modificaciones respecto a los de la primera dimensión. Como entrecruzador se empleó piperacina diacrilamida (PDA) ya que con ella se consigue mejor resolución y menos bloqueo N-terminal de proteínas (Hochstrasser, D.F. y col., 1988b). Además se añadió tiosulfato sódico a una concentración final de 5 mM para disminuir fondo, eliminar la tinción negativa y optimizar la reproducibilidad en la tinción de plata (Hochstrasser, D.F. y col., 1988c; Hochstrasser, D.F. y col., 1988a). Antes de añadir el SDS y los catalizadores los geles fueron desgasificados en baño de ultrasonido durante 30 minutos. La preparación de los geles se llevó a cabo un día antes de su uso para conseguir una polimerización lo más completa posible. Las tiras equilibradas se cargaron en la parte superior de los mismos y se selló el sistema con agarosa al 0.5% (p/v) en tampón Laemmli (Tris 0.25 M, Glicina 2 M y SDS 1% (p/v) (Laemmli, U.K., 1970)). Las electroforesis se llevaron a cabo en tampón Laemmli a 15 mA por gel si se realizaban durante la noche o a 40 mA por gel si se realizaban durante el día.

Seguidamente se procedió a la fijación de las proteínas en el gel y a la tinción mediante el método de plata amoniacal. El procedimiento empleado fue el descrito por

MATERIALES Y MÉTODOS

Bjellqvist (1993) con ligeras modificaciones. En primer lugar los geles fueron lavados en agua MilliQ para eliminar restos de tampón de electroforesis y después se procedió a su fijación en etanol: ácido acético: agua (40:10:50) durante 1 hora y en etanol: ácido acético: agua (5:5:90) 2 horas o toda la noche. Los geles se lavaron después 3 veces en ácido acético 7.5% (v/v) durante 30 minutos y se incubaron en una solución de glutaraldehído 2.5% (v/v) otros 30 minutos. El paso siguiente fue un lavado extensivo en agua MilliQ para proceder a la tinción en solución de plata amoniacal (amoníaco concentrado 1.33% (v/v), NaOH 2 N y nitrato de plata 0.8% (p/v)) durante 30 minutos. Transcurrido este tiempo se volvió a lavar en agua MilliQ varias veces y se reveló con una solución de ácido cítrico al 0.01% (p/v) y formaldehído al 0.1% (v/v) hasta que las manchas adquirieron la intensidad deseada momento en el cual se paró la reacción en solución Tris 5% (p/v) y ácido acético 2% (v/v).

4.3. Geles bidimensionales preparativos.

Para la primera dimensión se utilizó el mismo sistema que para los geles analíticos pero la cantidad de proteína fue de 0.5-1 mg. En este caso se hizo una rehidratación activa de las tiras a 30V durante 6 horas y a 60V 6 horas más. El programa de isoelectroenfoque fue: 2 horas a 500V, 2 horas a 2000V, 2 horas en gradiente hasta 5000V y 14 horas a 8000V. El equilibrado de las tiras y la segunda dimensión se realizó en las mismas condiciones que para los geles analíticos.

La fijación y tinción se hizo realizando algunas modificaciones sobre el protocolo descrito por Mann (Shevchenko, A. y col., 1996), compatible con espectrometría de masas. Tras la electroforesis, los geles fueron fijados en una solución de metanol 50% (v/v) y ácido acético 5% (v/v) durante 30 minutos. Después se lavaron con metanol 50% (v/v) durante 15 minutos y con agua MilliQ durante otros 15 minutos. A continuación se incubaron en una solución de tiosulfato sódico 0.01% (p/v) durante 1 minuto. Después de lavarlos dos veces con agua MilliQ, los geles fueron incubados a 4°C en una solución de nitrato de plata 0.1% (p/v) durante 20 minutos. A continuación se lavaron brevemente con agua y se procedió al revelado con una solución de carbonato sódico 2% (p/v) en

formaldehído 0.04% (v/v). La fijación de la tinción se realizó en ácido acético 5% (v/v) y los geles fueron conservados en ácido acético 1% (v/v) a 4°C hasta su análisis.

4.4. Análisis de imagen de los geles analíticos

Las imágenes bidimensionales fueron capturadas escaneando los geles analíticos teñidos con plata en un densitómetro GS-690 (Bio-Rad) y digitalizadas con el programa Multi-Analyst (Bio-Rad). Las imágenes obtenidas fueron procesadas utilizando el programa Melanie 3.0 (Bio-Rad).

4.5. Identificación de proteínas por espectrometría de masas tipo MALDI-TOF/TOF (Matriz Assisted Laser Desorption Ionization - Time Of Flight).

El análisis de las proteínas por espectrometría de masas fue llevado por el personal de la Unidad de Proteómica de la Universidad Complutense – Parque científico de Madrid (www.ucm.es/proteomica).

Las manchas se recortaron utilizando puntas de pipeta recortadas. La reducción, alquilación y digestión con tripsina de las proteínas se llevó a cabo según el protocolo descrito por Sechi (1998) con algunas modificaciones. En primer lugar las muestras se lavaron dos veces con agua MilliQ durante 10 minutos y posteriormente se deshidrataron 3 veces con 20 µl de acetonitrilo. Seguidamente se procedió al secado al vacío de las muestras en una Speed-Vac (Savant). A continuación se añadió 20 µl de una solución 10 mM de DTT en bicarbonato amónico 25 mM y se incubaron las muestras a 56°C durante 30 minutos para reducir los puentes disulfuro de las proteínas. Después de lavar los fragmentos de gel con acetonitrilo se añadieron 20 µl de iodoacetamida 55 mM en bicarbonato amónico 25 mM y se incubaron durante 15 minutos en la oscuridad, para alquilar los grupos previamente reducidos. Después se realizaron dos lavados con acetonitrilo y bicarbonato amónico de forma secuencial durante 20 minutos. Entonces, se retiró el sobrenadante y se secaron las muestras en "Speed-Vac". La digestión proteolítica se realizó en solución de tripsina 12.5 ng/µl en bicarbonato amónico 25 mM durante toda la noche (o al menos 6 horas) a 37°C.

MATERIALES Y MÉTODOS

La extracción de los péptidos se realizó cubriendo el gel con una solución de acetonitrilo 50% (v/v) y ácido trifluoroacético 0.5% (v/v) y sonicando durante 10 minutos. Esta operación se repitió tres veces y se recogieron los sobrenadantes de cada extracción juntos. Posteriormente se realizaron otras tres extracciones con acetonitrilo de 10 minutos cada una y también se juntaron con los sobrenadantes anteriores. Finalmente se secaron a vacío en la "Speed-Vac" y se resuspendieron en 5 µl de una solución de acetonitrilo 50% (v/v) y TFA 0.1% (v/v).

Para la identificación de los péptidos por espectrometría de masas, se dispuso 1 µl del sobrenadante obtenido por digestión en cada pocillo de una placa de acero inoxidable recubierta de teflón y se dejó secar formando una película. Después se añadió en cada pocillo 0.4 µl de la matriz constituida por ácido α -ciano-4-hidroxicinámico 3 mg/mL en acetonitrilo al 50% (v/v) acidificado con TFA al 0.1% (v/v). Las muestras así cargadas se analizaron mediante espectrometría de masas de tipo MALDI-TOF/TOF en un espectrómetro de masas MALDI-TOF/TOF 4700 Proteomics Analyzer (Applied Biosystems, Framingham, MA). La adquisición de los espectros se realizó en modo reflector. La huella peptídica resultante de las masas de los péptidos experimentales se comparó mediante los programas Mascot (www.matrixscience.com) y ProFound (prowl.rockefeller.edu).

En los casos en los que la huella peptídica no conducía a una identificación clara de la proteína fue necesario el análisis parcial de la secuencia proteica mediante fragmentación de péptidos. Para ello se seleccionaron los precursores adecuados procedentes de la huella peptídica y la fragmentación se llevó a cabo utilizando la CID (Collision-Induced Dissociation). La secuenciación *DeNovo* del espectro de fragmentación de los péptidos se realizó con el programa DeNovo (Applied Biosystems) y la búsqueda de homologías se hizo mediante Blast.

5. Determinación de metabolitos.

5.1. Azúcares reductores.

El método empleado se basa en un ensayo colorimétrico (Robyt, J.F. y col., 1972).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se realizaron diluciones de las soluciones problema de azúcares en un volumen final de 250 μL y se añadieron 250 μL de reactivo DNS (ácido dinitro-3,5-salicílico 1% (p/v), NaOH 1.6% (p/v), tartrato doble sódico-potásico 30% (p/v)). Se prepararon también varios tubos conteniendo concentraciones conocidas de glucosa (entre 0 y 2 g/L) para construir una recta patrón. Todas las muestras se hirvieron durante 5 minutos y, tras enfriarse en hielo, se midió la absorbancia a 540 nm de una dilución 1/6 en agua destilada. La concentración de azúcares reductores se calculó interpolando en la recta patrón de glucosa a partir del valor de absorbancia de cada muestra.

5.2. Etanol.

La determinación del etanol producido durante la vinificación se llevó a cabo también mediante ensayo colorimétrico según lo descrito previamente (Cornell, N.W. y col., 1983). Este método se basa en la cuantificación de la producción de NADH gracias a la reacción de la alcohol deshidrogenasa (ADH) en presencia de NAD^+ con el etanol que se pretende valorar. Se añadieron 100 μL de una dilución apropiada en agua destilada de la muestra a 500 μL de un tampón Tris-Glicina de pH 9.7 (Glicina 0.2 M, Tris 0.3 M). Seguidamente se adicionaron 20 μL de una disolución de NAD^+ 50 mM y por último 10 μL de ADH 4 mg/mL. Tras una incubación de 15 minutos a temperatura ambiente se leyó la absorbancia a 340 nm lo que supone una medida del NADH producido ($\epsilon^{\text{M}} \text{NADH a } 340 \text{ nm} = 6220$). A partir de la estequiometría de la reacción (en este caso 1:1), es posible calcular el etanol producido.

5.3. Valoración de nitrógeno asimilable.

Se utilizó el método del formol (Levy, M., 1933), que es válido para medir nitrógeno amínico y amónico, dado que el grupo amino o el amonio se bloquea con formaldehído. Como la prolina no posee el grupo amino libre no puede ser valorada por este método y, como no es un compuesto asimilable por la levadura, podemos decir que el método cuantifica la cantidad de nitrógeno asimilable. Para esta determinación se tomaron 10-50 mL del sobrenadante de muestras de vinificación y se llevaron a pH 8 con NaOH. Seguidamente se añadió 2 mL de formaldehído 35% ajustado también a pH 8, se

MATERIALES Y MÉTODOS

agitó y, tras esperar 5 minutos, se determinó el volumen de NaOH 50 mM que era necesario para recuperar el pH 8. Multiplicando los mL de NaOH utilizados en la valoración por 50 (concentración de NaOH utilizada) y dividiendo por el volumen de muestra (generalmente 10 mL) se obtiene la concentración mM de nitrógeno fácilmente asimilable de la muestra original.

5.4. Determinación de ergosterol.

Para la determinación de ergosterol presente en las células se realizó una extracción de esteroides basada en ensayos descritos previamente (Quail, M.A. y col., 1993) y una cuantificación específica del ergosterol contenido gracias a su espectro típico de absorción, que da 3 picos característicos entre 240 y 300 nm, con una absorbancia máxima a 281.5 nm (Quail, M.A. y col., 1993). Se recogieron entre 20 y 150 unidades de DO₆₀₀ por centrifugación y se resuspendieron en 2.5 mL de metanol con pirogallol al 0.2% (p/v). A las células resuspendidas en metanol se añadió 1 mL de una disolución de KOH al 60% (p/v) y se procedió a una incubación de 2 horas a 90°C. Después de dejar que los tubos se enfriaran se extrajeron los esteroides con 3 mL de heptano. La separación de fases se hizo por centrifugación a 500 rpm 5 minutos. Se siguió el espectro de absorción entre 220 y 300 nm de la muestra sin diluir y se utilizó el valor de la absorbancia a 282 nm para el cálculo de la cantidad de ergosterol por unidad de DO₆₀₀ ($\epsilon^{1\%}$ ergosterol a 282 nm = 290). Para garantizar que no quedaban esteroides sin extraer se repitió el proceso con otros 4 mL de heptano pero no se observó absorbancia a 282 nm en ninguno de los casos.

6. Tratamiento estadístico, normalización y análisis bioinformático de los datos.

6.1. Análisis discriminante.

Para comprobar la correlación entre comportamiento fermentativo y capacidad de resistencia a estrés se recurrió al análisis discriminante lineal (Fisher, R.A., 1936; Gupta, S.D., 1973; Lachenbruch, P.A., 1975; Lachenbruch, P.A. y col., 1979), realizando los cálculos mediante el programa estadístico SPSS (SPSS Inc. Chicago, Illinois) y utilizándose el método de inclusión por pasos. En líneas generales este método se basa en la

elaboración de funciones a partir de variables cuantitativas (en nuestro caso viabilidad o diámetro de halo frente a condiciones de estrés), de manera que el valor numérico de esta función para cada cepa permita clasificarla dentro de un grupo (en nuestro caso definido por el tipo de comportamiento fermentativo). El método de inclusión por pasos permite que sólo se utilicen para elaborar las funciones aquellas variables que posean una capacidad de discriminación entre grupos elevada, evitando así problemas de falsos positivos cuando se intentan clasificar cepas no incluidas en el análisis. Para determinar la robustez del método se empleó la validación cruzada que consiste en eliminar una cepa del análisis, recalcular las funciones sin tenerla en cuenta, y ver si es clasificada o no correctamente dentro de su grupo. Este proceso se repite para todas las cepas y al final se obtiene el porcentaje de cepas que globalmente han sido correcta o incorrectamente clasificadas mediante validación cruzada. Si el porcentaje de cepas bien clasificadas se aleja del esperado considerando una distribución por azar supondrá que existe una correlación entre el carácter de los grupos y las variables analizadas.

6.2. Normalización de los datos obtenidos por macromatrices.

A los valores de intensidad obtenidos para cada punto mediante el Image Gauge se les restó la media de la intensidad de señal obtenida en los 8 puntos que contienen los controles negativos (genoma de *E. coli*). El valor resultante se dividió por la media de la señal obtenida en los puntos que contenían DNA genómico total de *S. cerevisiae* de manera que se normaliza la intensidad de señal en cada hibridación. Las muestras procedentes de un mismo cultivo a lo largo de la vinificación se hibridaron siempre en el mismo chip y después de analizar todas las muestras se realizó una hibridación con DNA genómico total de la cepa correspondiente. El valor normalizado de cada punto en cada muestra de la vinificación fue dividido por el valor normalizado de la hibridación con genómico. Finalmente se realizó la media entre los dos puntos que hay para cada gen en un mismo filtro. Los resultados de media y desviación estándar mostrados se obtuvieron al analizar 4 cultivos diferentes para cada cepa.

6.3. ArrayStat para el análisis estadístico de micromatrices de DNA.

La señal obtenida para cada fluoróforo en cada hibridación fue normalizada por Lowess (Cleveland, W.S., 1979). Los resultados de los 5 chips fueron validados estadísticamente con el programa ArrayStat (Imagin Research Inc., Ontario, Canadá) en el Servicio de Chips de la Universitat de València mediante un test t-student con un nivel de significatividad de 0.05. El mínimo número de replicados exigidos para el análisis fue de 4 y se utilizó la condición de que las muestras eran dependientes.

6.4. Melanie 3.0 para el análisis de geles bidimensionales.

El programa Melanie 3.0 (Biorad) permite la detección, cuantificación del volumen, superposición de manchas, análisis estadístico y edición de masas moleculares y puntos isoelectrónicos de cada una de las manchas del gel. Seguidamente se puede obtener un gel sintético a partir de diferentes geles de una misma cepa con lo que se eliminan las diferencias en cuanto a intensidad de tinción, pequeñas variaciones en cuanto a cantidad de muestra o defectos en el enfoque de alguno de los geles, entre otros aspectos. Finalmente se puede comparar el gel sintético obtenido para cada una de las cepas, detectando así proteínas que sólo aparecen en una u otra cepa y proteínas que muestran una expresión diferencial en cada una de ellas. Otro tipo de análisis que permite el programa y que también se utilizó se basa en agrupar los geles procedentes de cada cepa en dos clases diferentes y obtener el cociente para cada mancha en estas dos clases (las dos cepas) validado estadísticamente mediante el análisis t-student. Para obtener el listado de manchas que presentan niveles diferentes en ambas cepas sólo se tuvieron en cuenta aquellas que aparecían mediante los dos tipos de análisis. El valor de sobreexpresión que se muestra es el mínimo obtenido en al menos 8 geles.

CAPÍTULO 1

Caracterización fisiológica de cepas de *Saccharomyces sp.*: Estudio de la relación entre comportamiento fermentativo y resistencia a estrés.

El objetivo principal de este capítulo es estudiar la correlación entre resistencia a estrés y comportamiento fermentativo en una batería amplia de cepas que permita comprobar si es posible generalizar lo encontrado previamente en 3 cepas vínicas comerciales (Ivorra, C. y col., 1999). Además de demostrar que la tolerancia a determinados tipos de estrés es importante para llevar a cabo la vinificación, también se pretende encontrar nuevos criterios de selección de cepas aplicables en bodega. Parece que la tendencia actual es utilizar como inóculo levaduras autóctonas de cada región, que garanticen así el mantenimiento de los caracteres típicos de vinos elaborados en diferentes zonas (Lafon-Lafourcade, S., 1983; Snow, R., 1983), de manera que se preserve la pluralidad sensorial de esta bebida. Por este motivo hay un creciente interés por parte de la industria por establecer sistemas de diagnóstico sencillos para que las bodegas puedan realizar la selección entre la microbiota natural presente en sus uvas o en su maquinaria de transporte, tratamiento y tanques de vinificación.

RESULTADOS

1. Selección de cepas.

Con el objetivo de encontrar diferentes patrones de fermentación se seleccionaron para realizar nuestro análisis tanto cepas comerciales como cepas no comerciales aisladas

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

de diferentes orígenes y proporcionadas por el Instituto de Fermentaciones Industriales (IFI). Estas cepas son las que se detallan en la Tabla C1.1 y en ella se incluyen también datos sobre su origen, la graduación alcohólica que producen sobre mosto de uva y la identificación específica proporcionada por las casas comerciales o por el IFI. Como se puede observar en la mayoría de casos se trata de cepas de *S. cerevisiae*, ya que esta especie es la que participa en mayor grado en la fase de fermentación alcohólica, aunque, como veremos en el capítulo 2, se ha profundizado en la identificación de algunas de estas cepas obteniéndose resultados diferentes en algunos casos.

Tabla C1.1. Análisis de la capacidad de diferentes cepas vínicas de levadura para llevar a cabo fermentaciones en mosto sintético sin sulfato amónico.

CEPA	ESPECIE	ORIGEN	COMPORTAMIENTO
ICV 9	<i>S. cerevisiae</i>	Comercial	Completa vinificación en 24 días
IFI 704	<i>S. bayanus</i>	Requena (13°)	Completa vinificación en 25 días
ICV 18	<i>S. cerevisiae</i>	Comercial	Completa vinificación en 29 días
ICV 22	<i>S. cerevisiae bayanus</i>	Comercial	Completa vinificación en 29 días
ICV 48	<i>S. cerevisiae bayanus</i>	Comercial	Completa vinificación en 29 días
IFI 87	<i>S. cerevisiae</i>	Montilla (15.7°)	Completa vinificación en 29 días
ICV 16	<i>S. cerevisiae</i>	Comercial	Completa vinificación en 34 días
ICV 27	<i>S. cerevisiae bayanus</i>	Comercial	No completa vinificación (25-50 g/L)
IFI 278	<i>S. ellipsoideus</i>	Albariño (9.7°)	No completa vinificación (10-70 g/L)
IFI 279	<i>S. ellipsoideus</i>	Valladolid	No completa vinificación (15-20 g/L)
IFI 240	<i>S. cerevisiae</i>	Valladolid (8.3°)	No completa vinificación (75-100 g/L)
IFI 89	<i>S. cerevisiae</i>	Córdoba (19°) ¹	No completa vinificación (140-170 g/L)
IFI 367	<i>S. cerevisiae</i>	Mentrida (8.7°)	No completa vinificación (135-150 g/L)
IFI 391	<i>S. cerevisiae</i>	Serrada (7°)	No completa vinificación (140-155 g/L)

¹Producción alcohólica sobre pulpa de membrillo.

La selección de cepas procedentes del IFI se realizó en base al dato de graduación alcohólica producida por estas cepas en diferentes sustratos. Como cabía esperar un buen comportamiento fermentativo en las cepas comercializadas para uso en vinificación, con

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

la finalidad de poder disponer de diferentes tipos de cepas, se seleccionaron las cepas IFI que producían una baja graduación alcohólica, esperando que estas cepas tuviesen problemas para completar el proceso de fermentación. Dado que también se iba a estudiar la resistencia a estrés mostrada por estas cepas se seleccionaron entre las IFI aquellas cepas que producían un nivel de alcohol por encima de lo normal pensando que en estos casos podría haber una mayor resistencia, por lo menos, al estrés producido por adición de etanol.

2. Análisis del comportamiento fermentativo.

Se utilizaron en principio condiciones restrictivas de microvinificación para resaltar con mayor claridad las diferencias entre cepas. Con este fin se utilizó un mosto sintético cuya única fuente de nitrógeno procede del extracto de levadura y supone aproximadamente 74 mg/L de nitrógeno atómico total de acuerdo con la información del fabricante. Esta cantidad constituye la cuarta parte del nitrógeno asimilable presente, por ejemplo, en mostos sintéticos químicamente definidos (Henschke, P.A. y col., 1993; Riou, C. y col., 1997) muy similares en composición a los mostos naturales o en otros mostos, también sintéticos, utilizados en otras ocasiones en nuestro laboratorio (Pérez-Torrado, R. y col., 2002). Además esta cantidad es inferior a los 140 mg/L propuesto por algunos autores como necesario para asegurar que la fermentación sea completada (Trioli, G. y col., 1992).

En la Tabla C1.1 se muestran los resultados obtenidos para todas las cepas consideradas en cuanto a tiempo requerido para completar la vinificación o cantidad de azúcar residual presente. Como vemos (Figura C1.1), el estudio del consumo de glucosa a lo largo del tiempo permitió la identificación de tres patrones de fermentación. En primer lugar podemos hacer una clasificación entre cepas capaces e incapaces de completar la fermentación. Dicha capacidad se define, como se comentó en la introducción general, como la propiedad de dejar una cantidad de azúcares residuales inferior a 5 g/L tras 40 días desde la inoculación y en la Figura C1.1 este patrón es el representado por la cepa ICV 16. Dentro de la categoría de cepas incapaces de completar la fermentación se pudieron establecer dos subgrupos. Así, se observó que algunas de estas cepas apenas

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

consumían azúcares (como la IFI 367 de la Figura C1.1), mientras que otras (como la cepa ICV 27 de la Figura C1.1) sí fermentaban al menos la mitad de la glucosa presente pero llegaba un momento en que dejaban de consumirla.

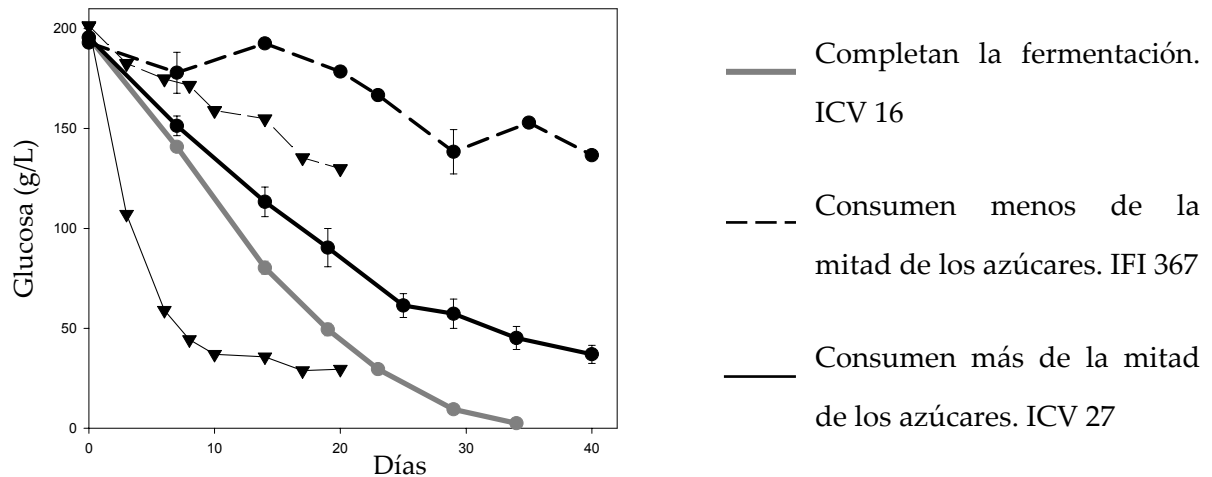


Figura C1.1. Consumo de glucosa durante una fermentación en mosto sintético sin $(NH_4)_2SO_4$ (●) o con 300 mg/L de nitrógeno atómico (▼). Los experimentos se llevaron a cabo como se describe en Materiales y Métodos. Se muestra una cepa representativa de cada patrón de vinificación.

Tal y como era de esperar las cepas comerciales pertenecen en su gran mayoría a patrones capaces de consumir todos los azúcares del mosto aunque existe una cepa, la ICV 27, que deja una cantidad de azúcar residual de 25-50 g/L en estas condiciones. Entre las cepas no comerciales procedentes de diferentes orígenes se puede encontrar cualquier patrón de fermentación.

Se realizaron también algunos experimentos de vinificaciones en mosto sintético con sulfato amónico para ver si en estas condiciones se mantenían o no los diferentes patrones. Estos análisis permitieron determinar que las cepas IFI 89, 367 y 391 tampoco eran capaces de consumir azúcares en esta condición y que las cepas que completaban la fermentación también lo hacían en estas condiciones y en un tiempo menor. Además, las cepas que no completaban la fermentación pero consumían más de la mitad de los azúcares en mosto sintético sin sulfato amónico, aunque al principio tenían un consumo más activo de la glucosa, llegaba un momento en que también se paraban y seguían dejando cierta cantidad de azúcar residual. En la Figura C1.1 se muestran como ejemplos los patrones encontrados en las cepas ICV 27 e IFI 367. Como veremos en el capítulo 2, en

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

experimentos de microvinificación con algunas de las cepas en mosto sintético completo muy similar al mosto natural (Riou, C. y col., 1997) se confirma la clasificación entre cepas capaces e incapaces de completar la fermentación. Además, como se indicará en el capítulo 4, microvinificaciones en mosto natural de la variedad Sauvignon también permiten encontrar las diferencias mostradas por las cepas ICV 16 e ICV 27.

3. Análisis de sensibilidad a estrés oxidativo.

En la Tabla C1.2 se muestran los resultados globales de todos los experimentos de estrés y la pertenencia de cada cepa a cada grupo en función de su comportamiento durante la microvinificación en las condiciones de limitación de nitrógeno. Estos resultados también se muestran en forma de Figura (Figura C1.2) ya que, aún siendo redundantes, resultan mucho menos tediosos de observar.

Para estudiar la sensibilidad de las diferentes cepas a estrés oxidativo se optó por un protocolo muy sencillo descrito por Stephen (1995) y que se detalla en la sección de Materiales y Métodos.

Como se observa (Figura C1.2, Tabla C1.2), lo primero a destacar es que no existen grandes diferencias entre las dos condiciones estudiadas, cultivos en fase estacionaria y cultivos en fase exponencial. En cuanto a la correlación entre los 3 patrones fermentativos considerados y la tolerancia a este tipo de estrés sí se obtienen resultados interesantes. En cuanto al grupo 1 (cepas capaces de completar la fermentación), a excepción de la cepa IFI 87, todas las demás presentan halos de inhibición inferiores a 3.1 cm. El problema con IFI 87 fue que aún mostrando en varios experimentos valores similares a los encontrados dentro de su grupo hubo otros en los que el halo de inhibición fue mayor, lo que queda patente en la elevada desviación estándar. Entre las cepas del grupo 2 encontramos valores mayoritariamente entre 3.15 y 3.2, siendo un poco mayores en el caso de la cepa IFI 240. Dentro de este tipo de estrés los valores más destacables son los encontrados para las cepas IFI 367 e IFI 391, claramente muy superiores al resto. Entre las cepas de este grupo encontramos un segundo caso en el que no existe correlación entre comportamiento fermentativo y resistencia a estrés y es la cepa IFI 89, que presenta valores más similares a los encontrados para las cepas del grupo 2.

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Tabla C1.2. Matriz de datos para el análisis estadístico. Incluye identificación de cepas, clasificación según comportamiento fermentativo y resistencia a las condiciones de estrés consideradas en el trabajo. Todos los datos son el resultado de al menos tres experimentos independientes.

Cepa	Comp. Ferment. ¹	Oxidativo (estacionario) ²		Oxidativo (exponencial) ²		KCl 0,7 M ³		KCl 1 M ⁴		Etanol 8% (v/v) ⁵		Etanol 10% (v/v) ⁶	
		Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD	Media	SD
ICV 9	1	2,98	0,07	3,03	0,08	97,59	6,38	20,30	2,48	92,63	12,50	21,41	3,08
ICV 16	1	3,01	0,08	2,88	0,18	100,00	n.d.	40,43	4,37	84,89	7,55	47,22	8,92
ICV 18	1	3,00	0,14	2,96	0,03	100,00	n.d.	33,92	4,67	65,41	6,37	28,98	6,53
ICV 22	1	3,01	0,09	3,01	0,08	85,50	4,04	23,42	4,50	69,56	3,30	37,87	1,9
ICV 48	1	3,07	0,09	3,05	0,13	100,00	n.d.	39,86	2,97	83,42	11,70	53,31	4,64
IFI 87	1	3,21	0,15	3,29	0,14	91,32	8,56	27,63	8,49	77,96	7,51	52,56	14,4
IFI 704	1	3,07	0,08	2,97	0,05	100,00	n.d.	23,86	6,63	81,70	8,50	40,24	2,45
ICV 27	2	3,19	0,08	3,10	0,04	78,85	1,38	12,71	3,46	53,45	6,86	18,17	6,77
IFI 240	2	3,33	0,28	3,26	0,05	94,40	14,26	10,58	4,71	76,48	2,78	12,72	8,91
IFI 278	2	3,16	0,04	3,21	0,06	100,00	n.d.	23,93	3,65	54,31	16,82	31,05	8,83
IFI279	2	3,15	0,18	3,17	0,05	100,00	n.d.	22,62	3,71	72,65	2,37	30,31	9,56
IFI 89	3	3,15	0,12	3,18	0,06	85,21	6,82	10,17	0,97	20,78	12,72	6,78	0,79
IFI 367	3	3,89	0,07	3,36	0,08	10,52	4,36	4,08	0,25	51,78	7,45	19,35	4,07
IFI 391	3	4,13	0,23	3,55	0,09	46,66	7,83	10,52	1,49	60,99	8,75	20,23	4,75

¹Clasificación de las cepas en grupos en base a su comportamiento fermentativo. 1: cepas capaces de completar la fermentación. 2: cepas incapaces de completar el proceso pero que dejan menos del 50% (p/v) de azúcares presentes inicialmente en el mosto. 3: cepas que consumen cantidades muy bajas de azúcar.

²Dímetro (cm) del halo de inhibición de crecimiento por H₂O₂, según las condiciones descritas en Materiales y Métodos.

³Porcentaje de células viables tras 2 horas de incubación en YPD suplementado con KCl 0.7 M.

⁴Porcentaje de células viables tras 1 hora de incubación en YPD suplementado con KCl 1 M.

⁵Porcentaje de células viables tras 90 minutos desde la adición de etanol hasta una concentración final del 8% (v/v) al cultivo celular.

⁶Porcentaje de células viables tras 1 hora desde la adición de etanol hasta una concentración final del 10% (v/v) al cultivo celular.

n.d.: no determinado (no se observa pérdida de viabilidad).

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

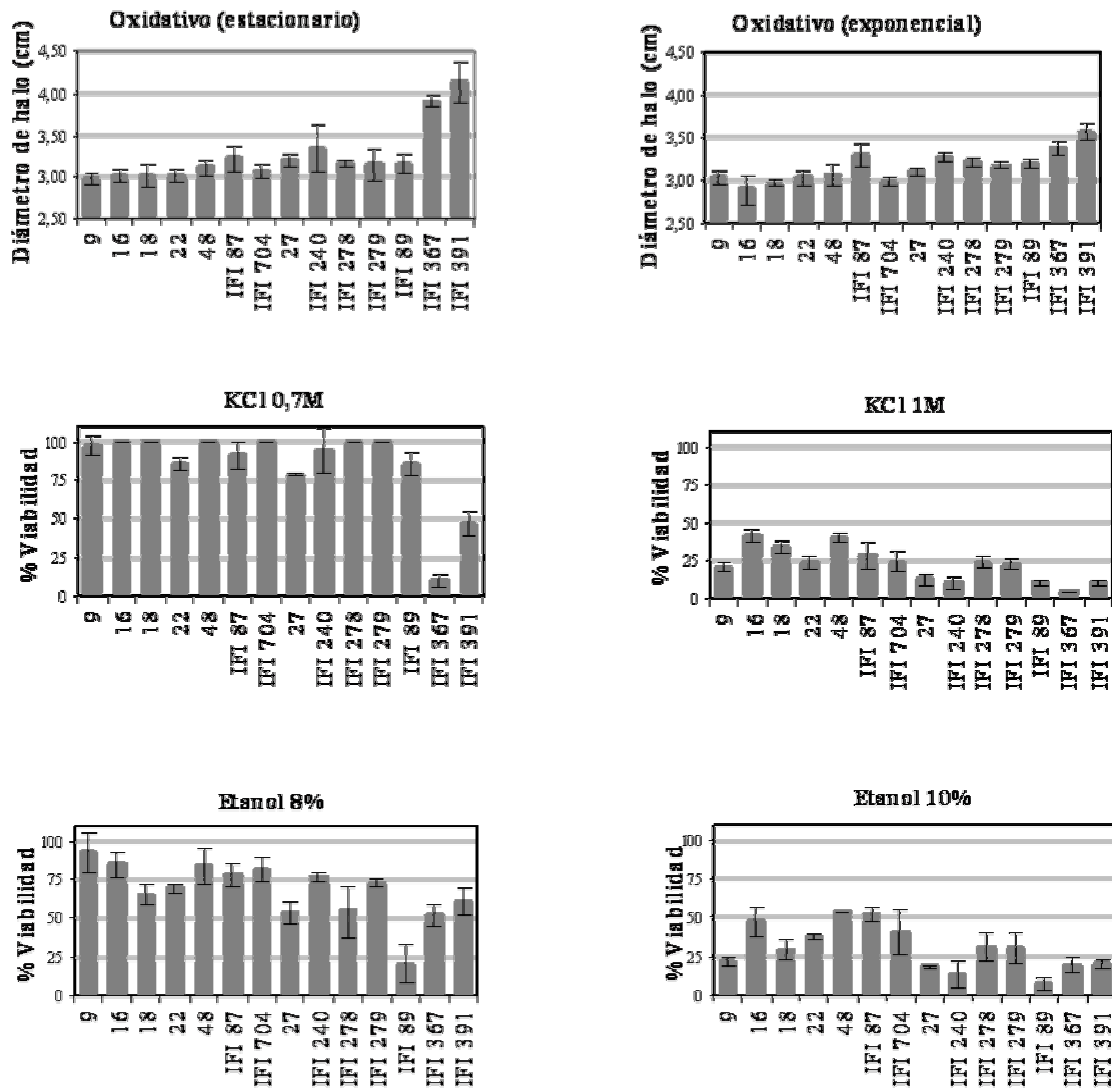


Figura C1.2. Histogramas mostrando la sensibilidad de las diferentes cepas a las condiciones de estrés consideradas en este trabajo. La resistencia a estrés oxidativo se determina aquí como el diámetro del halo de inhibición de crecimiento sobre un césped de células alrededor de un disco impregnado en H₂O₂. La resistencia al resto de condiciones de estrés se determinó como la pérdida de viabilidad tras un cierto tiempo desde la aplicación del estrés (véase Tabla C1.2. y Materiales y Métodos).

4. Resistencia a estrés osmótico.

Para estudiar las diferencias entre cepas respecto a tolerancia a este tipo de estrés se utilizó como agente osmóticamente activo una sal, el cloruro potásico, a concentraciones 0.7 y 1 M. La forma habitual de comparar y cuantificar el grado de estrés osmótico que producen diferentes osmolitos es mediante la actividad de agua en las correspondientes

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

disoluciones. Si asumimos una concentración media en los mostos del 20% (p/v) de azúcar podemos considerar la condición de KCl 0.7 M similar en cuanto a estrés osmótico a la situación al principio de la vinificación, dados los valores de actividad de agua en ambos medios (0.977 y 0.98 respectivamente, (Chen, C.S., 1989)). En esta condición no hay, o apenas, pérdida de viabilidad para la mayoría de las cepas (Tabla C1.2, Figura C1.2). Los datos más llamativos son de nuevo los encontrados para IFI 367 e IFI 391 que vuelven a mostrar una gran sensibilidad a estrés, que podría guardar una relación con su comportamiento fermentativo. En este caso la cepa IFI 87 sí muestra un comportamiento similar al resto de cepas de su grupo y la cepa IFI 89 sigue sin quedar claramente correlacionada con su comportamiento en fermentación.

Debido a las escasas diferencias encontradas se decidió probar una condición más fuerte, KCl 1 M, que se corresponde con una actividad de agua de 0.967 (Chen, C.S., 1989), inferior a la encontrada en los mostos. En este caso observamos importantes pérdidas de viabilidad respecto a la condición más suave pero tampoco se obtiene una correlación completa con el comportamiento en fermentación. Sí queda claro que las cepas del grupo 3 son muy sensibles y que la ICV 27 y la IFI 240, pertenecientes al grupo 2, también lo son, pero entre el resto de cepas no se observan claras diferencias.

5. Resistencia a estrés por etanol.

Por último se estudió el comportamiento de las cepas frente a una situación de estrés por etanol.

Aquí también se consideraron dos condiciones, una más suave (etanol 8% (v/v), 90 minutos), donde en general no existen grandes pérdidas de viabilidad, y otra más severa (etanol 10% (v/v), 1 hora), para lo cual la mayoría de las cepas presentan niveles de supervivencia por debajo del 50%. Como se observa (Figura C1.2, Tabla C1.2), estos resultados nos ayudan a diferenciar muy bien la cepa IFI 89 que era la única del tercer grupo que presentaba niveles de tolerancia para el resto de condiciones de estrés similares a los encontrados para las cepas del grupo 2. En este caso presenta para las dos condiciones los porcentajes de viabilidad más bajos. Este resultado es muy curioso ya que esta cepa se seleccionó por producir 19°, aunque hay que recordar que el sustrato era

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

pulpa de membrillo y las condiciones de crecimiento pueden ser totalmente diferentes. En este tipo de estrés las cepas IFI 367 e IFI 391 no se diferencian de algunos datos encontrados para el grupo 2, pero sigue viéndose una clara diferencia con las cepas capaces de completar la fermentación.

6. Tratamiento estadístico de los datos.

El análisis discriminante es una herramienta estadística que trata de clasificar o asignar nuevos individuos a grupos previamente establecidos en base a observaciones multivariantes. En nuestro caso nos servirá además para determinar si nuestras cepas pueden ser clasificadas en base a los datos de estrés, lo que indicaría que existe una correlación entre la resistencia a las condiciones de estrés consideradas en este trabajo y el comportamiento fermentativo.

Para realizar el análisis discriminante en primer lugar hay que proporcionar al programa estadístico (SPSS en este trabajo) una matriz de datos (Tabla C1.2) donde hay que especificar para cada cepa el grupo (comportamiento fermentativo) al que pertenece y el valor de cada una de las variables en estudio (resistencia a cada condición de estrés). Así, el SPSS elabora un número de funciones igual al número de grupos menos 1, de forma que cada individuo queda identificado por su valor para cada función.

Una cuestión a tener en cuenta en este tipo de análisis es el número de variables a utilizar. Se ha observado que cuando se incluyen muchas variables las funciones discriminantes lineales tienen un gran poder de clasificación de los individuos incluidos en el análisis pero que cuando se intentan clasificar nuevos individuos se producen más errores que cuando el número de variables inicial es menor (McKay, R.J. y col., 1982). Por ello se optó por utilizar el método de inclusión por pasos, donde las variables son introducidas una a una en base a su poder discriminante.

Así, se obtuvieron 2 funciones a partir de las variables oxidativo (cultivo estacionario) y etanol 8% (v/v), ya que son las que proporcionaron valores más alejados entre cepas de cada uno de los tres grupos. Los coeficientes de estas funciones y los estadísticos que valoran su poder discriminante se muestran en la Tabla C1.3. La Lambda de Wilks y la Chi-cuadrado se utilizan para contrastar la hipótesis nula de que ninguna

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

función es capaz de discriminar los tres grupos. La forma de rechazar esta hipótesis es a través del p-valor (Sig., Tabla C1.3), de forma que si adquiere valores por debajo de 0.05 aceptaremos la hipótesis alternativa, que en este caso es que al menos una discrimina. Como se puede observar por los p-valores obtenidos en este caso la única función significativamente discriminante es la 1 y esto puede visualizarse también en la Figura C1.3. En este gráfico los ejes corresponden al valor de cada una de las dos funciones y las cepas se representan mediante puntos dentro del espacio discriminante. También se incluyen los centroides que se calculan como la media de todos los individuos de un grupo para cada función y se podrían considerar el individuo tipo de cada patrón de fermentación. Como se puede observar el único eje capaz de diferenciar cepas es el delimitado por la función 1. Además, como se comentará también más adelante, la cepa IFI 279 no se puede clasificar mediante estas funciones dentro del grupo 2 ya que queda dentro del espacio discriminante delimitado por las cepas del grupo 1. Otro resultado que queda patente mediante este tipo de gráfico es lo distantes que se encuentran las cepas del grupo 3, hecho que concuerda muy bien con sus graves defectos en vinificación.

Tabla C1.3. Coeficientes de las funciones discriminantes y estadísticos definidos por el programa SPSS.

Función	Coeficientes de las funciones			Estadísticos de las funciones			
	Etanol 8%	Oxidativo (estacionario)	Constante	Lambda Wilks	Chi-cuadrado	gl (grados de libertad)	Sig. ¹
1	-0,1	5,7	-11,6	0,088	25,6	4	0,000
2	0,043	2,3	-10,3	0,98	0,25	1	0,61

¹Significatividad

Por último, en la Tabla C1.4 se muestra en qué grupo es clasificada cada cepa en base a las funciones discriminantes y con qué probabilidad. Como vemos el 100% de las cepas son clasificadas correctamente aunque en el caso de las cepas ICV 18 e IFI 279 la probabilidad es muy baja. Esto se debe a que, para los datos de estrés por etanol al 8% (v/v) (ver Tabla C1.2), la cepa ICV 18 tiene el valor más bajo dentro de su grupo y la cepa

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

IFI 279 el más alto. Hay que recordar que para la clasificación final de las cepas sólo se ha considerado este estrés y el oxidativo sobre cultivos en fase de crecimiento estacionario.

Una vez obtenidos los resultados el programa permite un contraste del modelo frente a sí mismo mediante lo que se conoce como validación cruzada, en la que cada individuo es ignorado momentáneamente para volver a reclasificar al resto. De esta forma se determina si los individuos son asignados a uno o a otro grupo exclusivamente por azar o si existe una tendencia de los datos. El resultado de esta operación se detalla en las dos últimas columnas de la Tabla C1.4. Como vemos, en este caso, el 21% de las cepas no resultan bien clasificadas, lo que significa que las cepas sí se distribuyen en los grupos en base a su resistencia a estrés, ya que en caso de tener una distribución aleatoria esperaríamos un 66% de error.

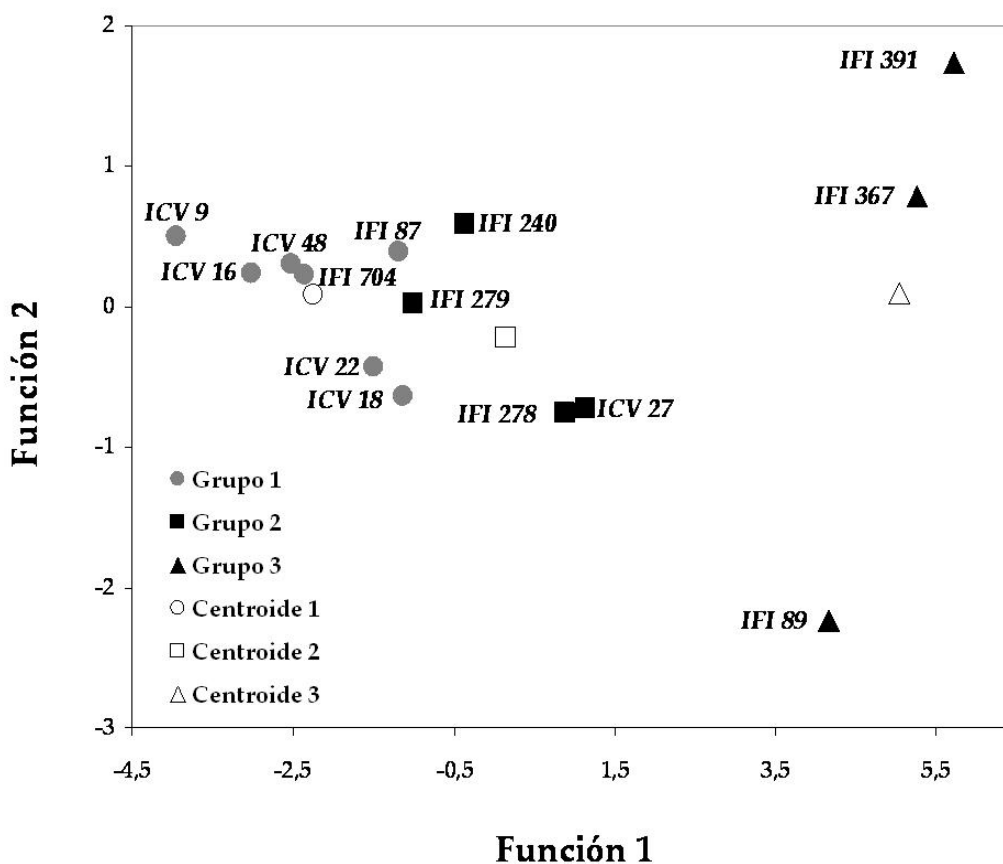


Figura C1.3. Gráfico de puntos de grupos combinados de las cepas de levadura consideradas en el trabajo considerando las dos funciones elaboradas por el SPSS.

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

Tabla C1.4. Aplicación de las funciones discriminantes a la clasificación de las cepas.

Cepa	Grupo real	Original		Validación cruzada	
		Grupo pronosticado	Probabilidad	Grupo pronosticado	Probabilidad
ICV 9	1	1	0,999	1	1,000
ICV 16	1	1	0,992	1	0,990
ICV 18	1	1	0,501	2 (*)	0,613
ICV 22	1	1	0,726	1	0,683
ICV 48	1	1	0,975	1	0,965
IFI 87	1	1	0,624	1	0,562
IFI 704	1	1	0,961	1	0,949
ICV 27	2	2	0,995	2	0,993
IFI 240	2	2	0,813	2	0,718
IFI 278	2	2	0,992	2	0,988
IFI 279	2	2	0,504	1 (*)	0,647
IFI 89	3	3	0,999	2 (*)	1,000
IFI 367	3	3	1,000	3	1,000
IFI 391	3	3	1,000	3	1,000

(*) Cepa mal clasificada.

DISCUSIÓN

El uso de inóculos de levaduras preseleccionadas para la elaboración del vino ha llevado al establecimiento de criterios de selección de cepas (Degré, R., 1993), entre los que se mencionan la resistencia a diferentes tipos de estrés. Además, en los últimos años, se ha destacado la importancia de disponer de información sobre la resistencia a estrés y la viabilidad de las levaduras durante su uso industrial (Attfield, P.V., 1997; Bauer, F.F. y col., 2000). Sin embargo, a excepción de un trabajo preliminar en nuestro laboratorio (Ivorra, C. y col., 1999), no se había intentado correlacionar la resistencia a estrés con el comportamiento fermentativo en cepas vínicas.

Por esta razón, en este trabajo se analizó el comportamiento fermentativo en mostos sintéticos pobres en nitrógeno de 14 cepas de levadura, 6 comerciales y 8 aisladas de diferentes orígenes, lo que permitió la identificación de tres patrones de fermentación: cepas capaces de completar la fermentación (grupo 1, Tabla C1.2), cepas que consumen más de la mitad de azúcares presentes en el mosto inicial pero que dejan más de 5 g/L tras 40 días desde la inoculación (grupo 2, Tabla C1.2) y cepas que no son capaces de consumir apenas azúcares (grupo 3, Tabla C1.2). Como se verá en los siguientes capítulos

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

experimentos con algunas de estas cepas en mostos sintéticos no limitantes en nitrógeno y muy similares en composición a los mostos naturales, así como en mosto natural, mostraron que las cepas incapaces de completar la fermentación también presentaban paradas del proceso en estas condiciones, aunque el consumo de azúcares siempre era superior al 50% (p/v).

Para el estudio de la sensibilidad de estas 14 cepas a diferentes estreses relevantes durante todo el proceso de producción del vino se emplearon técnicas sencillas con el fin de que puedan tener aplicación industrial tanto a nivel de empresas de producción de levaduras como a nivel de bodega para selección de cepas autóctonas. Se optó pues por el estudio de los estreses oxidativo, osmótico y por etanol, empleando en todos los casos dos condiciones, una más suave y otra más severa. Los datos encontrados mostraron que en general las cepas capaces de completar la fermentación eran más resistentes a estrés que las cepas que no la completaban, aunque la falta de una correlación absoluta en todos los casos nos llevó a la búsqueda de un modelo estadístico que determinase tanto la relación concreta como la probabilidad de acierto utilizándola.

Para ello se buscó un método de clasificación que permitiese evaluar la potencialidad de ese sistema de agrupación a la aplicación sobre nuevos individuos. La clasificación es un problema multivariante que trata de agrupar objetos, sujetos o entidades de cualquier tipo. Cuando está basada en un conjunto de variables o características se pueden utilizar técnicas estadísticas que realizan el proceso sistemático y proporcionan el grado de predicción y robustez de la clasificación, entre otros. Existen dos técnicas (Duda, R.O. y col., 1973) para tratar este tipo de problemas y el punto de partida en ambas es muy diferente. Cuando los grupos son desconocidos *a priori* y lo que se pretende es encontrar niveles de homogeneidad o similitud entre el conjunto de datos se emplea el análisis clúster. Sin embargo, cuando partimos de entidades previamente clasificadas y deseamos conocer si nuevas observaciones concuerdan con dicha clasificación, se emplea el análisis discriminante.

Finalmente se optó pues por el uso del análisis discriminante dado que partíamos del conocimiento del comportamiento fermentativo de las diferentes cepas y queríamos comprobar si se podía sustituir la determinación del patrón de fermentación por otras

C1. CARACTERIZACIÓN FISIOLÓGICA

medidas mucho más sencillas como son la resistencia a algunas condiciones de estrés en condiciones de laboratorio. Además, tal y como se resalta en la introducción, ha sido un método utilizado en el análisis de muestras biológicas y de alimentos. Nuestros datos han indicado una relación lineal entre el comportamiento fermentativo y dos condiciones de estrés, el oxidativo sobre células en fase estacionaria y el etanol al 8% (v/v). Es curioso que, a pesar de nuestras expectativas iniciales, la resistencia a estrés osmótico no constituye una variable discriminante en el análisis a pesar de su importancia, como ya se ha comentado, durante el uso industrial de las levaduras. No obstante, es interesante comentar, como veremos en el capítulo 2, que experimentos llevados a cabo en nuestro laboratorio sobre respuesta molecular a este tipo de estrés en diferentes cepas de levadura muestran una inducción importante de genes de respuesta a estrés osmótico en todos los casos (Pérez-Torrado, R. y col., 2002).

El contraste del modelo mediante validación cruzada resulta en un 79% de cepas correctamente clasificadas lo que dista mucho de la aleatoriedad y confirma la validez del modelo para su aplicación a nuevos individuos. De acuerdo con estos resultados es posible establecer estas dos determinaciones sencillas como paso previo en la selección de cepas vínicas, lo que no evita el estudio posterior de las características organolépticas del producto final ya que en la industria alimentaria es tan importante la optimización del proceso como la garantía de calidad del producto.

Este tipo de análisis puede ser aplicado también a otros procesos como la elaboración del pan y la cerveza eligiendo en cada caso las variables (condiciones de estrés) que determinen una buena correlación con el comportamiento en la fermentación de las harinas de trigo y los cereales, respectivamente.

CAPÍTULO 2

Expresión de genes de respuesta a estrés durante la vinificación.

Como ya comentamos en la introducción, todos los estudios sobre la expresión génica durante la vinificación han utilizado una única cepa bien adaptada al proceso. Como hemos demostrado en el capítulo 1 nosotros disponemos de una batería amplia de cepas vínicas en las que hemos demostrado que existe una correlación entre la resistencia a algunas condiciones de estrés y su comportamiento durante la vinificación. Por este motivo lo que nos planteamos ahora es hacer un análisis comparativo de la expresión de genes de estrés en estas cepas, con el objetivo de encontrar la clave molecular que explique, al menos en parte, las diferencias en los patrones de vinificación ya descritos. El estudio de cepas diferentes e incluso de especies diferentes nos podría hacer dudar de la validez de la comparación, es decir, de si las posibles diferencias que encontremos se deben a características genéticas propias de especie o de cepa o si realmente existe una correlación entre comportamiento fermentativo y expresión génica. En este sentido existe un trabajo que parece demostrar que las diferencias en expresión génica en diferentes aislados naturales tienen una relación causal con la variación fenotípica que mostraban los mismos (Fay, J. y col., 2004).

Por otra parte y dada la importancia de que las levaduras superen las condiciones de estrés del inicio de la vinificación para poder imponerse sobre el resto de las especies presentes en el mosto, se planteó también un análisis más detallado de la respuesta a estrés en este punto inicial del proceso. Esta fase ha sido la menos estudiada ya que de los trabajos comentados en la introducción sólo el llevado a cabo en nuestro laboratorio (Pérez-Torrado, R. y col., 2002) se centra en el estudio de las primeras horas de la vinificación. Estos autores detectaron que parece haber una influencia del pH del mosto

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

en los niveles de expresión de algunos de los genes estudiados; dado que existe la posibilidad de corregir la acidez de los mostos en bodega mediante la adición de tartárico (Rankine, B., 2000), pensamos que podía ser de interés industrial el estudio de esta variable. Además, algunas evidencias sugieren que pequeñas variaciones en el pH del mosto pueden tener influencia en el comportamiento durante la vinificación de determinadas cepas vínicas comerciales (Anne Ortiz Julien, comunicación personal). También se pensó que podría ser interesante un análisis de la influencia de la temperatura sobre esta fase temprana ya que existe la tendencia cada vez mayor de vinificar a bajas temperaturas para mejorar el perfil aromático del producto final. Se sabe que la temperatura de fermentación tiene una influencia sobre el crecimiento y la viabilidad de las levaduras, y sobre la dinámica de las poblaciones presentes en el mosto (Torija, M.J. y col., 2001). Además es un parámetro controlable en bodega y poco estudiado a nivel de expresión génica. Por este motivo se ha considerado en este trabajo el estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la expresión de algunos genes de respuesta a estrés en un amplio catálogo de cepas vínicas comerciales durante el inicio de la vinificación.

RESULTADOS

1. Estudio de la respuesta a estrés al inicio de la vinificación. Efecto del pH y la temperatura.

1.1. Cepas empleadas y comportamiento durante la vinificación.

Esta parte del trabajo se realizó en colaboración con la empresa Lallemand Inc. (Québec, Canada), productora de levaduras vínicas, por lo que las 24 cepas utilizadas son todas procedentes de esta casa comercial. El listado de todas ellas se encuentra en el apartado de cepas vínicas comerciales de la sección de Materiales y Métodos (Tabla M4) y son aquellas que aparecen identificadas sólo con un número. Para simplificar tablas y figuras la identificación de las cepas será, a lo largo de este capítulo, con este código numérico.

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

En primer lugar se hizo un estudio del comportamiento fermentativo de estas levaduras en vinificaciones llevadas a cabo a 22°C en mosto sintético MS300 de pH 3.3 (Materiales y Métodos) conteniendo 200 g/L de glucosa, sin ninguna limitación de nutrientes, y de composición muy similar al mosto natural. Al tratarse de cepas vínicas comerciales y mosto completo no observamos grandes diferencias en los patrones de fermentación de las 24 cepas (Figura C2.1). Debido a la complejidad de la gráfica (por el gran número de datos) los valores se muestran sin desviación, pero corresponden a la media de 3 cultivos independientes para cada cepa. Lo primero a destacar es que los experimentos están hechos en dos tandas de vinificación diferentes en el tiempo con lo que existen pequeñas diferencias (por ejemplo en la cantidad inicial de azúcar presente en los mostos). Con línea continua y color negro se muestra la primera tanda (en la que el mosto contenía 175 g/L de azúcar) y en línea discontinua y en color rojo la segunda tanda (en la que la concentración de azúcares era de 200 g/L). Esto, junto con otras variaciones que pueda haber en la concentración de otros nutrientes o pequeñas diferencias, por ejemplo, en la temperatura de la cámara de incubación, hace que veamos que en general la segunda tanda fue un poco más lenta con lo que las cepas acabaron la vinificación en un tiempo ligeramente superior.

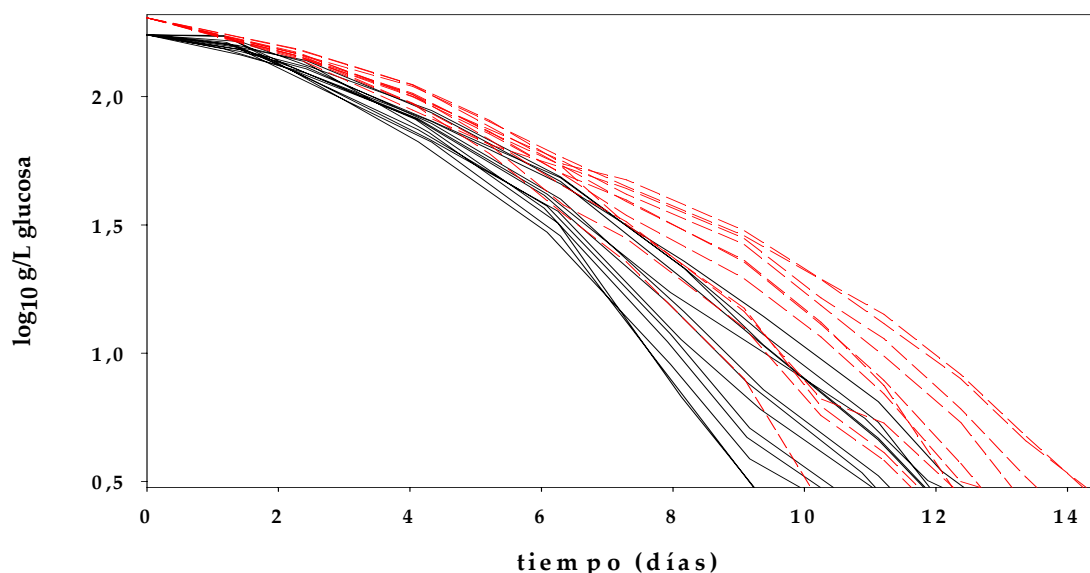


Figura C2.1. Evolución del consumo de azúcares en mosto sintético MS300 en las 24 cepas vínicas comerciales.

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

Ante la falta de diferencias significativas entre el comportamiento de estas cepas, se puede concluir que todas ellas completan la fermentación, aunque existen diferencias en el tiempo requerido por cada una (Tabla C2.1).

Tabla C2.1. Días tras la inoculación requeridos para completar la fermentación.

Tiempo	9 días	10 días	11 días	12 días	13 días	14 días
Tanda 1 ¹	5, 7	10, 11, 12	6, 8, 13	1, 2, 3, 4, 9		
Tanda 2 ²		14		15, 18, 19, 21, 23, 24	17, 20	16, 22

¹Mosto con 175 g/L de azúcar inicial.

²Mosto con 200 g/L de azúcar inicial.

1.2. Expresión de genes de estrés al inicio de la vinificación.

Para realizar este estudio se decidió utilizar dos genes de respuesta específica a una condición de estrés, el gen *GPD1* (de respuesta a estrés osmótico) y el gen *TRX2* (de respuesta a estrés oxidativo), y dos genes de respuesta a choque térmico pero que también participan en la respuesta general a diferentes tipos de estrés, como son *HSP104* y *SSA3*. En condiciones estándar (pH 3.3, 22°C) se analizaron los niveles de mensajero de los 4 genes. Para el estudio del efecto del pH (pH 3.0, 22°C y pH 3.6, 22°C), se analizó la expresión de *GPD1* y *TRX2* y para el estudio de la temperatura (15°C, pH 3.3 y 28°C, pH 3.3) los de *HSP104* y *SSA3*. El tiempo seleccionado para la toma de muestra fue 30 minutos tras la inoculación de las levaduras en el mosto ya que, en trabajos previos con la cepa vínica comercial T73 (Pérez-Torrado, R. y col., 2002), se ha visto que el aumento de los niveles de expresión, por ejemplo para *GPD1*, comienza ya a detectarse a los 10 minutos desde la inoculación en el mosto.

En estos estudios la detección de los niveles de mensajero se realizó mediante RT-PCR cuantitativa. Los datos mostrados (Figuras C2.2 y C2.4, Tabla C2.2) representan valores relativos de cDNA normalizados frente al nivel de cDNA del gen *ACT1*, de manera que valores inferiores a 1 nos indican unos niveles de mensajero del gen considerado inferiores a los encontrados para el gen de la actina. Lo contrario se concluye si los niveles son superiores a 1. En estas figuras se distribuyen las cepas en categorías que

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

corresponden a los niveles de expresión de los genes considerados y se muestran, tanto con barras como con perfiles, el número de cepas contenido dentro de cada categoría. Los números dentro de cada barra corresponden a las cepas que pertenecen a cada categoría para cada condición. Los valores mostrados son la media de 3 cultivos independientes y en la mayoría de los casos mostraron porcentajes de error por debajo del 10-15% (datos no mostrados).

En condiciones estándar (pH 3.3, 22°C) se observan niveles muy altos, siempre superiores a *ACT1*, para el gen *GPD1* (Figura C2.2). Este resultado coincide con los trabajos previos (Pérez-Torrado, R. y col., 2002) y se explica por la elevada concentración de azúcares del mosto donde las levaduras son inoculadas. Entre cepas vemos grandes diferencias, encontrando valores que oscilan entre 5 y 160 veces superiores a los de *ACT1*. Para el gen *TRX2* vemos valores inferiores a los encontrados para *ACT1*, con la única excepción de las cepas 3 y 24, que mostraron valores cercanos a 1.3. Este resultado es el esperable ya que las células pasan de estar creciendo en un matraz con más de 3/5 de volumen de espacio de cabeza y con agitación de 200 rpm a botellas completamente llenas y sin agitación, donde el contacto con oxígeno es mucho menor. Para los genes *HSP104* y *SSA3* (Figura C2.4) se obtienen resultados similares a los de *TRX2*, es decir, niveles inferiores a *ACT1*, que llegan a ser incluso más de 10 veces menores para *SSA3*, con la salvedad de las cepas 1, 19 y 23. Estos resultados también son similares a los de trabajos previos (Pérez-Torrado, R. y col., 2002) donde se observaban niveles bajos de *HSP104* durante las primeras horas de vinificación.

De acuerdo con estos resultados y, a pesar de las diferencias en los valores encontrados en las diferentes cepas, sí se observa en todas ellas una respuesta clara al estrés osmótico, lo que queda patente por los elevados niveles de *GPD1* que muestran todas ellas. Los bajos niveles encontrados en el resto de genes pueden estar indicando que la respuesta al estrés que tiene lugar al inicio de la vinificación no está controlada por la ruta de respuesta general a estrés ni por la ruta de respuesta a estrés oxidativo.

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

1.3. Efecto del pH sobre la expresión génica.

Se decidió utilizar para este estudio mostos de pH 3.0, 3.3 y 3.6 porque son valores dentro de lo que se puede encontrar habitualmente en los mostos naturales. Para ver el efecto de esta variable se mantuvo en todos los casos la temperatura utilizada en condiciones estándar (22°C).

Los resultados se detallan en las Figuras C2.2 y C2.3 y en la Tabla C2.2. Analizando los experimentos realizados a pH 3.0 llama mucho la atención la acusada disminución respecto a condiciones estándar de los niveles de mensajero de los dos genes considerados, especialmente de *GPD1*. Para este gen y esta condición la mayoría de las cepas presentan niveles entre 1.5 y 11.2 veces superiores a los de *ACT1* y, además, hay una cepa, la 11, que presenta valores por debajo de 1. Analizando los resultados para *TRX2* se obtienen conclusiones similares, es decir, una disminución de los niveles de mensajero, que en este caso no superan la mitad de los obtenidos para el gen de la actina.

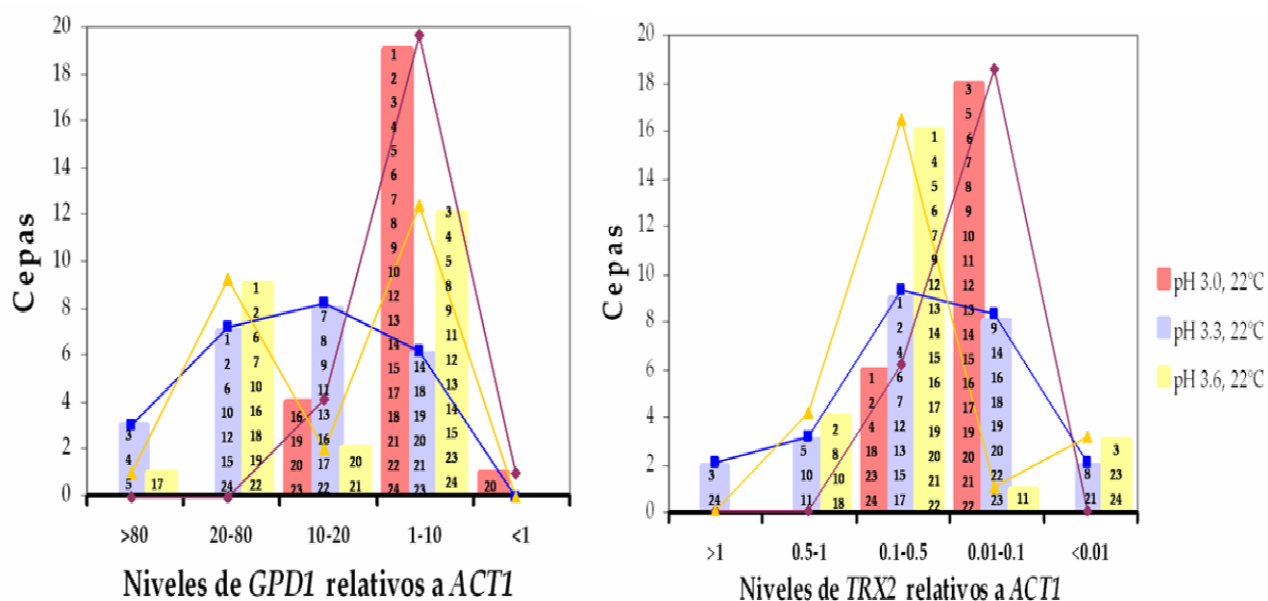


Figura C2.2. Efecto del pH en los niveles de mensajeros relativos a *ACT1* de los genes *GPD1* (izquierda) y *TRX2* (derecha). Las cepas (números contenidos en las barras) se encuentran agrupadas en categorías en función de los rangos de nivel de mensajero que se muestran en el eje X. Con líneas y puntos se muestran los perfiles del número de cepas englobado en cada rango de nivel de expresión para cada condición de pH.

Los resultados a pH 3.6 no muestran un patrón tan claro para *GPD1* como los encontrados en las otras dos condiciones de pH. En este caso volvemos a encontrar

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

valores muy altos que van desde 2.3 hasta 80 veces superiores los encontrados para *ACT1*, una situación muy similar a la que vimos en condiciones estándar. Lo que llama la atención es que en este caso existen bastantes cepas que presentan valores bajos de inducción, perteneciendo la mayoría de las mismas a la categoría de valores comprendidos entre 1 y 10 veces el nivel de *ACT1*. Para *TRX2* sí se observa que la mayoría de cepas presentan valores más altos de mensajero respecto a las otras dos condiciones.

Como hemos visto, para el conjunto de cepas la tendencia general es un nivel mínimo de expresión para los dos genes a pH 3.0 y un máximo, a pH 3.3 para *GPD1*, y a pH 3.6 para *TRX2*. Para ver si esto también se cumplía analizando los perfiles de expresión de cada cepa se hizo un análisis clúster (www.bioinfo.cnio.es). Estos resultados se muestran en la Figura C2.3 donde vemos a la izquierda las cepas, a continuación el perfil promedio mostrado por estas cepas y por último el nivel máximo de expresión del promedio.

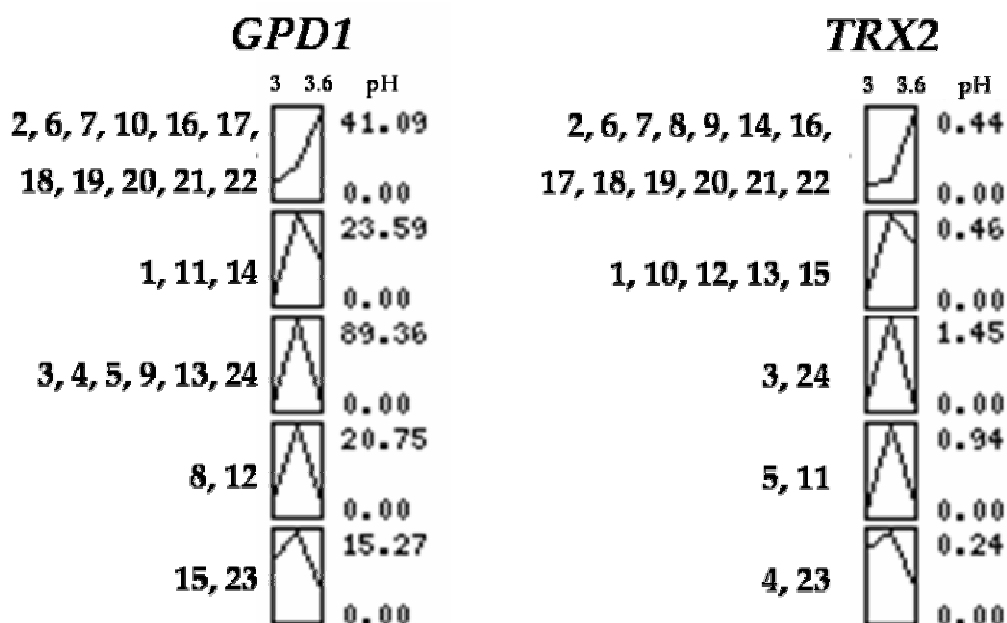


Figura C2.3. Efecto del pH en el perfil de expresión de los genes *GPD1* (izquierda) y *TRX2* (derecha) en cada una de las cepas.

Como se observa en esta Figura existen 2 perfiles claros para los dos genes. Aproximadamente la mitad de las cepas muestran un aumento de la expresión de *GPD1* y *TRX2* a medida que aumenta el pH del mosto. La otra mitad de las cepas tiene como

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

característica el presentar un máximo de expresión a pH 3.3 aunque hay mayores diferencias entre los niveles encontrados a 3 y 3.6 unidades de pH, de manera que este segundo grupo puede ser subdividido en varios clusters. Las diferentes cepas muestran un perfil general muy similar para los dos genes (con la única excepción de las 8, 9, 10 y 14) lo que probablemente nos está indicando que ambos genes están regulados por mecanismos similares en respuesta a los cambios del pH del medio.

Evaluando el conjunto de los resultados parece claro que cada cepa muestra niveles de expresión relativos al gen de la actina muy diferentes para los dos genes y además no existe una correlación con el patrón de fermentación, hecho esperable dada la pequeña diferencia que mostraban las cepas en este sentido. Lo que sí parece claro analizando tanto la frecuencia de cepas en cada rango de nivel de expresión (Figura C2.2), como los perfiles mayoritarios mostrados por las diferentes cepas (Figura C2.3), es que existe una influencia del pH sobre los niveles de genes de respuesta a estrés, al menos *GPD1* y *TRX2*. Esta influencia consiste en unos niveles mínimos de ambos mensajeros a pH 3.0. También apoya esta conclusión el cálculo de la mediana considerando los niveles de expresión de todas las cepas para cada pH (Tabla C2.2). Para las condiciones de pH 3.3 y 3.6 vemos que, en el caso de *GPD1*, hay mayores diferencias entre las cepas. En 11 de las 24 cepas vemos, como para *TRX2*, mayores niveles a pH 3.6, pero en el resto se observan niveles superiores a pH 3.3 que a pH 3.6 lo que hace que en el global de datos obtengamos una mediana ligeramente superior a pH 3.3 que a pH 3.6 (Tabla C2.2). En el caso de *TRX2*, aunque la mediana es algo superior a pH 3.6, la mayor diferencia también se encuentra en el menor nivel encontrado a pH 3.0 respecto a las otras dos condiciones.

1.4. Efecto de la temperatura sobre la expresión génica.

Para el estudio del efecto de la temperatura sobre la expresión génica al inicio de la vinificación se analizaron los niveles de mensajero de dos genes de respuesta a estrés térmico, los genes *HSP104* y *SSA3* (Figuras C2.4 y C2.5 y Tabla C2.2). Estos genes también responden a otras condiciones desfavorables para la levadura y, además, se ha visto inducción de *HSP104* y *SSA4* (perteneciente, al igual que *SSA3*, a la familia de genes *HSP70*) a temperaturas cercanas a las de congelación (Kandror, O. y col., 2004).

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

En este caso los niveles de mensajero obtenidos para los dos genes fueron muy bajos en las 3 condiciones estudiadas por lo que existe una mayor dispersión de los resultados de las 3 réplicas de cada cepa. Como se refleja en la Figura C2.4, en condiciones estándar (22°C), la mayoría de cepas presentan niveles que van de 10 a 100 veces inferiores a los obtenidos para el gen de la actina en el caso de *SSA3* y entre 2 y 100 veces para *HSP104*.

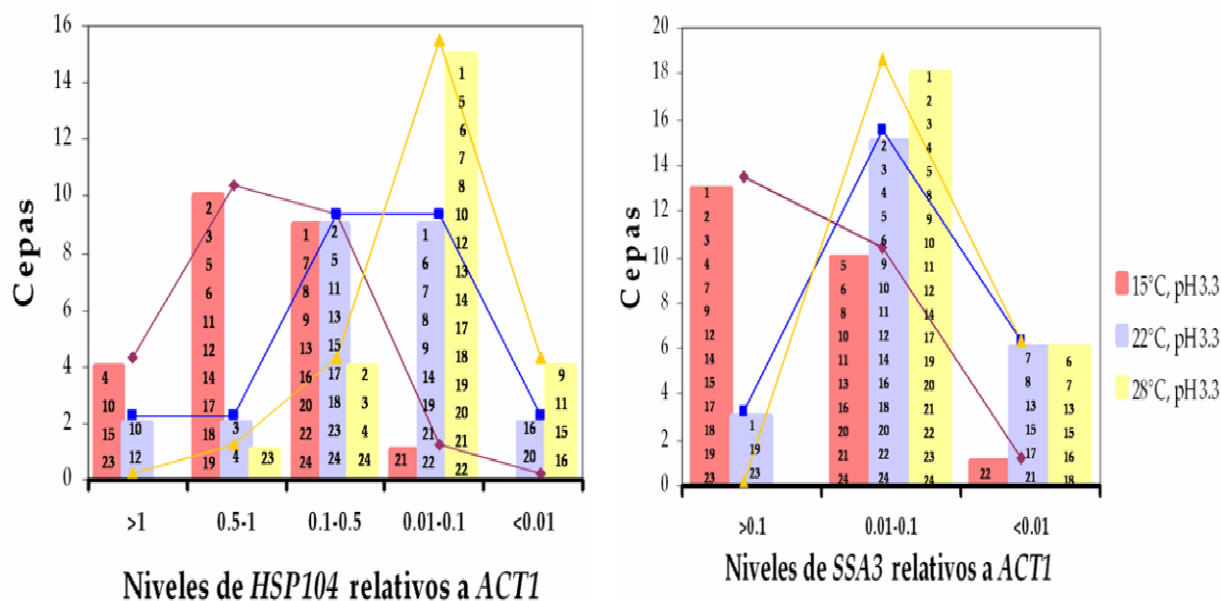


Figura C2.4. Efecto de la temperatura en los niveles de mensajeros relativos a *ACT1* de los genes *HSP104* (izquierda) y *SSA3* (derecha). Las cepas (números contenidos en las barras) se encuentran agrupadas en categorías en función de los rangos de nivel de mensajero que se muestran en el eje X. Con líneas y puntos se muestran los perfiles del número de cepas englobado en cada rango de nivel de expresión para cada condición de temperatura.

Analizando el efecto de la temperatura no parece haber grandes cambios en la expresión a 28°C de *SSA3* pero sí en la de *HSP104*. Para este último gen se observa que la mayoría de las cepas poseen valores relativos de expresión muy bajos, perteneciendo casi todas ellas a la categoría de niveles entre 10 y 100 veces menores a los de *ACT1*. Estudiando lo que ocurre a 15°C sí se observan cambios en los dos genes; para la mayoría de las cepas encontramos niveles máximos de expresión tanto de *HSP104* como de *SSA3*. Además, para *HSP104*, sólo existe una cepa, la 21, que presenta niveles inferiores a 10

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

veces los del gen de la actina y hay cuatro cepas, la 4, la 10, la 15, y la 23 que muestran valores superiores a los de *ACT1*.

Analizando los perfiles mostrados por las cepas (Figura C2.5) vemos que en este caso hay una homogeneidad aún mayor en los resultados ya que prácticamente todas las cepas muestran niveles mínimos a 28°C y máximos a 15°C. Este resultado parece indicar que estos dos genes, caracterizados por su inducción frente a temperaturas elevadas, podrían también responder a temperaturas por debajo de la óptima. Esta conclusión se deriva del hecho de que a la temperatura óptima de crecimiento de las levaduras (28-30°C) todas las cepas presentan niveles mínimos para los dos genes, excepto las cepas 21 y 23 (en el caso de *HSP104*) y 16 y 22 (en el caso de *SSA3*), aunque en este último caso los niveles son muy bajos y lo que realmente se observa es que no hay variación significativa en todo el rango de temperaturas. Estas conclusiones se ven reforzadas analizando el dato de las medianas (Tabla C2.2), donde también vemos que los niveles de mensajero son mínimos a 28°C y máximos a 15°C.

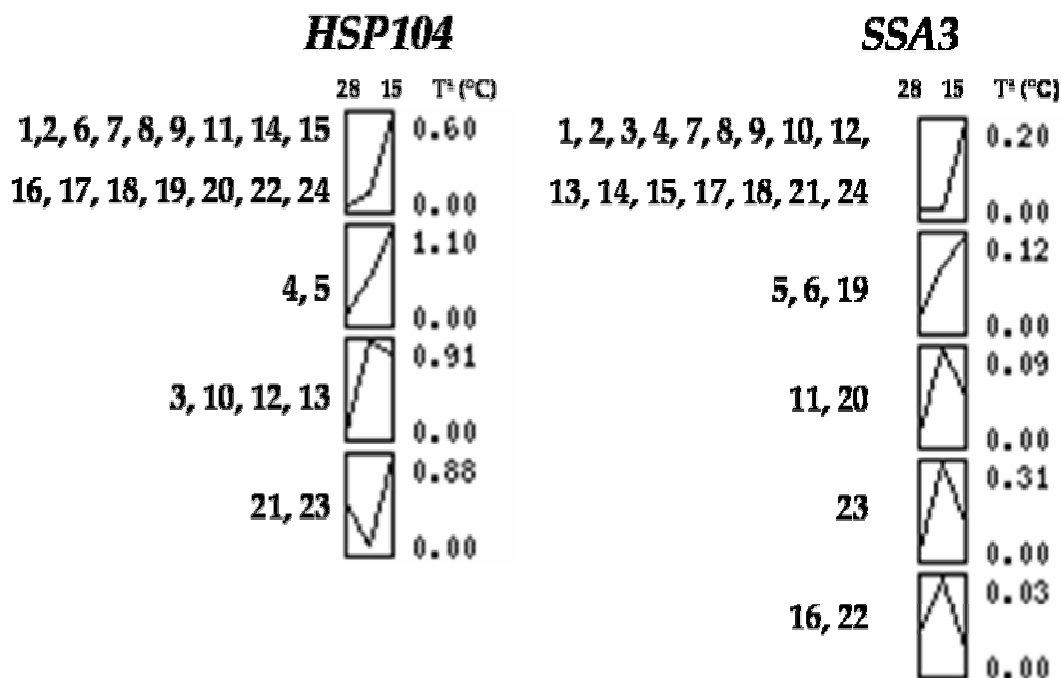


Figura C2.5. Efecto de la temperatura en el perfil de expresión de los genes *HSP104* (izquierda) y *SSA3* (derecha) en cada una de las cepas.

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

Tabla C2.2. Mediana de los niveles de mensajero relativos a *ACT1* de las 24 cepas para cada gen y condición.

pH (T 22°C)	<i>GPD1</i>	<i>TRX2</i>	T (°C) (pH 3.3)	<i>HSP104</i>	<i>SSA3</i>
3	3.7	0.061	28	0.023	0.014
3.3	16	0.19	22	0.12	0.022
3.6	12	0.25	15	0.59	0.11

2. Estudio de la respuesta a estrés durante la vinificación en cepas con diferente comportamiento fermentativo.

2.1. Cepas de levadura seleccionadas y comportamiento fermentativo.

Se llevaron a cabo microvinificaciones en mosto sintético MS300 como el descrito previamente por otros autores (Riou, C. y col., 1997), y como el utilizado en el apartado 1 de este capítulo, pero conteniendo como fuente de carbono una mezcla equimolecular de glucosa y fructosa. Para estos experimentos se seleccionaron 6 cepas (Tabla C2.3) a partir de los resultados del capítulo 1 de manera que hubiese 2 cepas de cada grupo según su comportamiento fermentativo y que además fuesen clasificadas dentro de su grupo con una elevada probabilidad tanto en la fase de clasificación como en la de validación cruzada (Tabla C1.4). Para estos experimentos las células inoculadas fueron obtenidas por crecimiento exponencial en MS300 pero conteniendo tan solo un 2% (p/v) de glucosa como fuente de carbono. Con esta estrategia de inoculación se pretendía, por una parte eliminar el efecto del cambio de pH sobre la expresión génica, y por otra inocular células en un estado de crecimiento óptimo para que los únicos efectos al inocularlas en el mosto fueran el cambio de dilución, la ausencia de agitación y la elevada concentración de azúcares.

Los resultados obtenidos respecto al comportamiento fermentativo de las cepas se muestran en la Figura C2.6.

De acuerdo con estos resultados podemos clasificar las cepas en dos grupos aunque el segundo es bastante heterogéneo. El primer grupo lo formarían las cepas ICV 16 e ICV 48, capaces de completar la fermentación de los azúcares presentes en el mosto, y el

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

segundo grupo las cepas ICV 27, IFI 278, IFI 367 e IFI 391, que son cepas que dejan una cierta cantidad de azúcar residual.

Tabla C2.3. Cepas seleccionadas a partir del capítulo 1 e identificación de las mismas.

Cepa	Identificación (comercial o IFI)	Identificación (este trabajo)	Grupo según comportamiento fermentativo (detallado en capítulo 1)
ICV 48	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Grupo 1 (Completa)
ICV 16	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. cerevisiae</i>	“
ICV 27	<i>S. cerevisiae bayanus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	Grupo 2 (Parada final)
IFI 278	<i>S. ellipsoideus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	“
IFI 367	<i>S. uvarum</i>	<i>S. bayanus</i>	Grupo 3 (Parada inicial)
IFI 391	<i>S. uvarum</i>	<i>S. bayanus</i>	“

Las cepas ICV 16 e ICV 48 alcanzan los mayores valores de DO₆₀₀ entre los 10 y los 15 días respectivamente aunque la viabilidad permanece constante desde los 5 ó 6 días. El consumo de nitrógeno se encuentra muy acelerado durante los primeros 5 días pero transcurrido este tiempo disminuye significativamente y no llega a agotarse el nitrógeno asimilable durante la vinificación.

En cuanto al segundo grupo la cepa ICV 27 muestra un patrón similar al grupo 1 en cuanto a crecimiento y consumo de nitrógeno aunque deja entre 15 y 30 g/L de azúcar residual.

El caso de la cepa IFI 278 es muy peculiar ya que alcanza los valores más altos tanto de DO₆₀₀ como de viabilidad y a tiempos menores que el resto de las cepas. En concordancia con estos datos de crecimiento, encontramos muy acelerados en esta cepa el consumo tanto de nitrógeno como de azúcar en los primeros tiempos (hasta los 2 días en el caso del nitrógeno y hasta los 10 días en el caso de los azúcares). Ambos consumos son prácticamente nulos a partir de 15 días, cuando no hay apenas células viables en el medio de cultivo.

La cepa IFI 367 muestra los mayores problemas de fermentación ya que deja una importante cantidad de azúcar residual (alrededor de 50 g/L). Estos resultados están en

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

consonancia con el crecimiento extremadamente bajo (tanto en cuanto a DO_{600} como a viabilidad) encontrado para esta cepa.

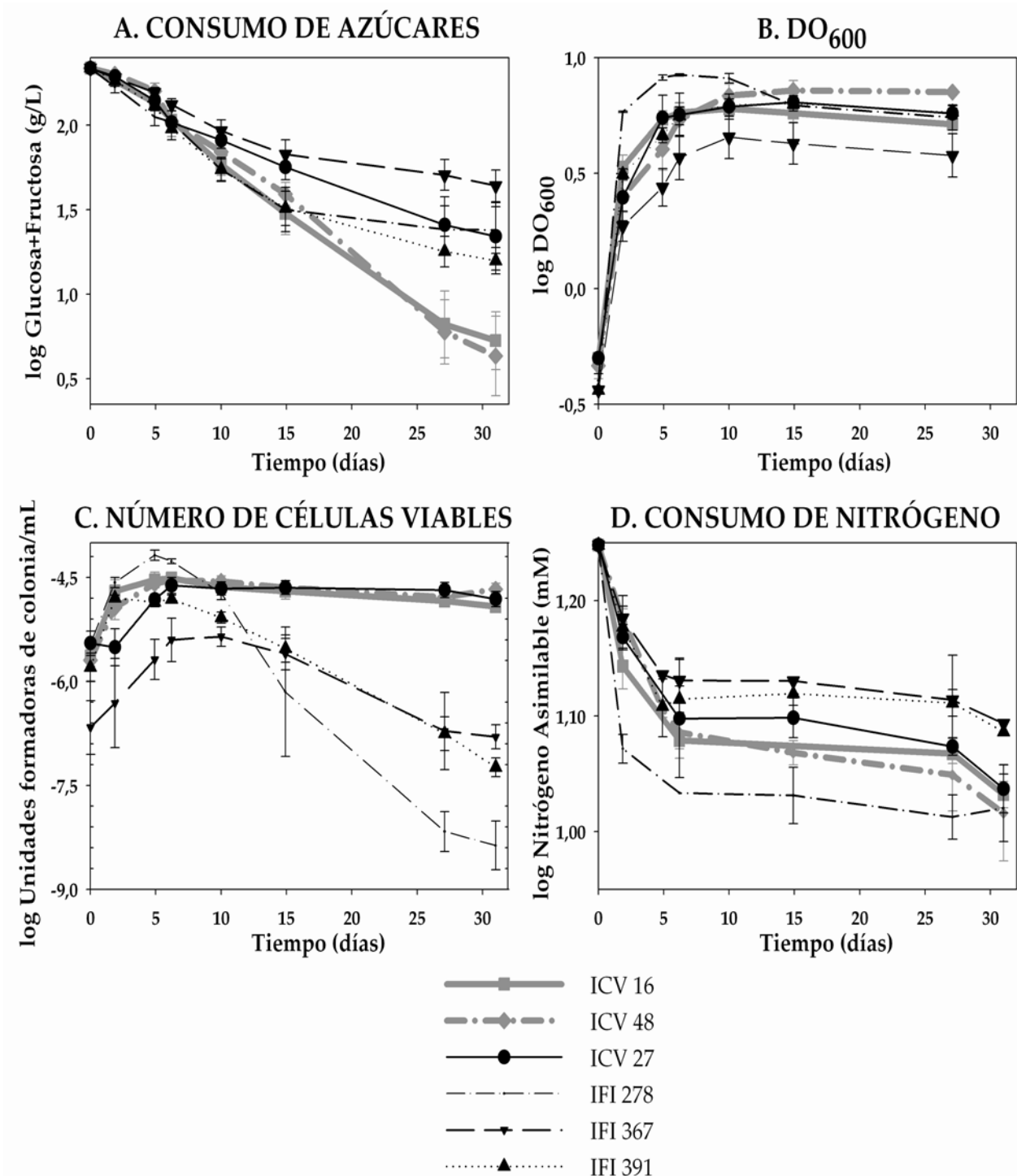


Figura C2.6. Consumo de azúcares (panel A), DO_{600} (panel B), viabilidad (panel C) y consumo de nitrógeno (panel D) en 6 cepas vínicas en mosto sintético completo MS300.

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

Por último la cepa IFI 391 también muestra un patrón particular. Esta cepa no completa la vinificación y deja una cantidad de azúcar residual similar a las cepas ICV 27 e IFI 278. Su consumo de nitrógeno es cercano al mostrado por la cepa IFI 367 y presenta una baja viabilidad, aunque mayor que la de cepa IFI 367.

Comparando estos resultados con los obtenidos en el capítulo 1 (Tabla C1.1) vemos que se mantiene la diferencia entre cepas que completan y cepas que no completan la fermentación, pero dentro de este último grupo no existe ninguna cepa que muestre una vinificación parada desde el principio.

2.2. Selección de tiempos y genes para el análisis de la expresión génica.

Se tomaron muestras a lo largo de estas vinificaciones para determinar la expresión de genes relacionados con estrés y observar si existían variaciones entre cepas con diferente patrón en fermentación. Los tiempos (horas o días desde inoculación) seleccionados fueron: 1 hora (0.04 días, las células tienen que hacer frente al estrés hiperosmótico), 6 horas (0.25 días, las células empiezan a entrar en fase exponencial), 2 días (células en fase exponencial, 16-19% (p/v) - dependiendo de la cepa - de azúcar), 6 días (la mayoría de cepas entran en fase estacionaria, 8.5-13% (p/v) de azúcar) y 10 días (casi todas las cepas han pasado por el máximo de DO_{600} , en algunas comienza el descenso en viabilidad, al menos la mitad de los azúcares han sido consumidos y debe haberse producido un 6-8% (v/v) de etanol). Así se cubre la primera mitad de la vinificación que es donde tanto el consumo como el crecimiento se encuentran más acelerados y donde encontramos mayores diferencias entre los comportamientos mostrados por las 6 cepas.

Dado que, como se demostró en el capítulo 1, existe una relación entre la resistencia a estrés y la habilidad para completar la fermentación se decidió estudiar la expresión de genes que se inducen en respuesta a condiciones desfavorables. Los genes fueron seleccionados porque, o bien se conoce su participación en la respuesta a estrés (revisados, por ejemplo, en (Estruch, F., 2000; Hohmann, S. y col., 2003)), o porque se ha visto su inducción en respuesta a diversas condiciones de estrés en estudios de expresión global (Alexandre, H. y col., 2001; Causton, H.C. y col., 2001; Gasch, A.P. y col., 2000).

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

La lista de genes se muestra en la Tabla C2.4. Como se observa se incluyen genes relacionados con la respuesta a diferentes condiciones de estrés y genes relacionados principalmente con la respuesta a formas particulares de estrés como osmótico, oxidativo y ayuno de nutrientes. Además se han incluido genes implicados en degradación proteica, metabolismo de glucógeno y trehalosa y otros procesos, ya que en todos los casos se ha visto que muestran variaciones en el patrón de expresión en respuesta a una o varias condiciones de estrés (Alexandre, H. y col., 2001; Causton, H.C. y col., 2001; Gasch, A.P. y col., 2000). La única excepción en este sentido es el gen que codifica *ACT1* cuya expresión es bastante constitutiva durante la vinificación (Riou, C. y col., 1997) y se utiliza como control. Para abordar el estudio de todos estos genes se encargó la elaboración de una matriz con sondas para todos ellos al Servicio de Chips de DNA de la Universitat de València (<http://scsie.uv.es/scsie-docs/matricesdna/matricesdna.html>), según lo descrito en la sección de Materiales y Métodos.

Tabla C2.4. Genes incluidos en el filtro.

Genes codificantes de HSPs	Genes de respuesta a osmótico	Genes de respuesta a oxidativo	Genes de respuesta a ayuno de nutrientes	Genes de metabolismo de glucógeno	Genes de metabolismo de trehalosa	Genes de degradación proteica	Otros
<i>HSP82</i>	<i>GPD1</i>	<i>GRE2</i>	<i>SPI1</i>	<i>GSY2</i>	<i>NTH1</i>	<i>UBI 4</i>	<i>ACH1</i>
<i>HSP26</i>	<i>GLO1</i>	<i>DDR48</i>	<i>YVH1</i>	<i>GPH1</i>	<i>ATH1</i>	<i>UBC5</i>	<i>CWP1</i>
<i>HSP104</i>	<i>HOR7</i>	<i>CUP1</i>	<i>COX6</i>		<i>TPS2</i>		<i>ALD3</i>
<i>SSA3</i>		<i>TRX2</i>	<i>XBP1</i>				<i>YAK1</i>
<i>SSA4</i>		<i>GSH1</i>	<i>YGP1</i>				<i>CTT1</i>
<i>STI1</i>			<i>CAR1</i>				<i>ACT1</i>

Para la discusión de los resultados se han seleccionado algunos genes representativos de cada grupo. Para el resto se observan valores relativos de mRNA muy bajos o desviación estándar muy elevada, por lo que no se consideraron. Los genes seleccionados se muestran en la Tabla C2.5 que incluye información sobre inducción en diferentes condiciones de estrés y las principales referencias bibliográficas sobre la misma.

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

Tabla C2.5. Relación de genes utilizados para la discusión de resultados. En la primera columna se indica el tipo de estrés o el proceso con el que fueron inicialmente relacionados.

		Choque térmico	Etanol	Oxidativo	Osmótico	Ayuno de nutrientes	Fase estacionaria	Referencias
Genes que codifican Hsps	<i>HSP26</i>	x •	•	x •	•	•	•	1, 2, 3, 4
	<i>HSP82</i>	x •	•	x •				1, 3, 4, 5
	<i>SSA3</i>	x •	•		•	•	•	1, 3, 4, 6, 7
	<i>SSA4</i>	x •	•	•	•	•	•	1, 3, 4, 6
	<i>STI1</i>	x •			•	•	•	4, 3, 8
Respuesta a estrés osmótico	<i>GPD1</i>	•	•	•	x •		•	1, 4, 3, 9
	<i>GLO1</i>	•	•	•	x •	•	•	1, 4, 3, 10
	<i>HOR7</i>	•	•	•	x •		•	1, 3, 11
Respuesta a estrés oxidativo	<i>GRE2</i>	•	•	x •	•	•	•	1, 4, 3, 12
	<i>CUP1</i>			x		•	•	3, 13
	<i>TRX2</i>	•		x •			•	3, 14
Respuesta a ayuno de nutrientes	<i>SPI1</i>	•	•	•	•	x •	•	1, 4, 3, 15
	<i>COX6</i>	•				x	•	3, 16
	<i>YGP1</i>	•	•	•	•	x •	•	1, 4, 3, 17
	<i>CAR1</i>	•				x		3, 18
Metabolismo de glucógeno y trehalosa	<i>GSY2</i>	• x	•	• x	• x	• x	•	1, 4, 3, 19, 20, 21
	<i>ATH1</i>	•	•	•	•	•	•	1, 4, 3, 19
Otros	<i>ACT1</i>							

• Condiciones de estrés en las que se ha visto inducción del gen en trabajos de expresión global.

x Condiciones de estrés en las que se ha visto inducción del gen en trabajos de expresión no global.

1. (Alexandre, H. y col., 2001), 2. (Amorós, M. y col., 2001), 3. (Gasch, A.P. y col., 2000), 4. (Causton, H.C. y col., 2001), 5. (Borkovich, K.A. y col., 1989), 6. (Werner-Washburne, M. y col., 1989), 7. (Boorstein, W.R. y col., 1990), 8. (Nicolet, C.M. y col., 1989), 9. (Albertyn, J. y col., 1994), 10. (Inoue, Y. y col., 1998), 11. (Hirayama, T. y col., 1995), 12. (Garay-Arroyo, A. y col., 1999), 13. (Liu, X.D. y col., 1996), 14. (Kuge, S. y col., 1994), 15. (Puig, S. y col., 2000b), 16. (Wright, R.M. y col., 1989), 17. (Destruelle, M. y col., 1994), 18. (Dubois, E. y col., 1997), 19. (François, J. y col., 2001), 20. (Ni, H.T. y col., 1995), 21. (Parrou, J.L. y col., 1997)

2.3. Expresión de genes que codifican proteínas de choque térmico.

En la Figura C2.7 se muestran los resultados obtenidos para los genes seleccionados en este análisis: *HSP26*, *HSP82*, *SSA3*, *SSA4*, y *STI1*.

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

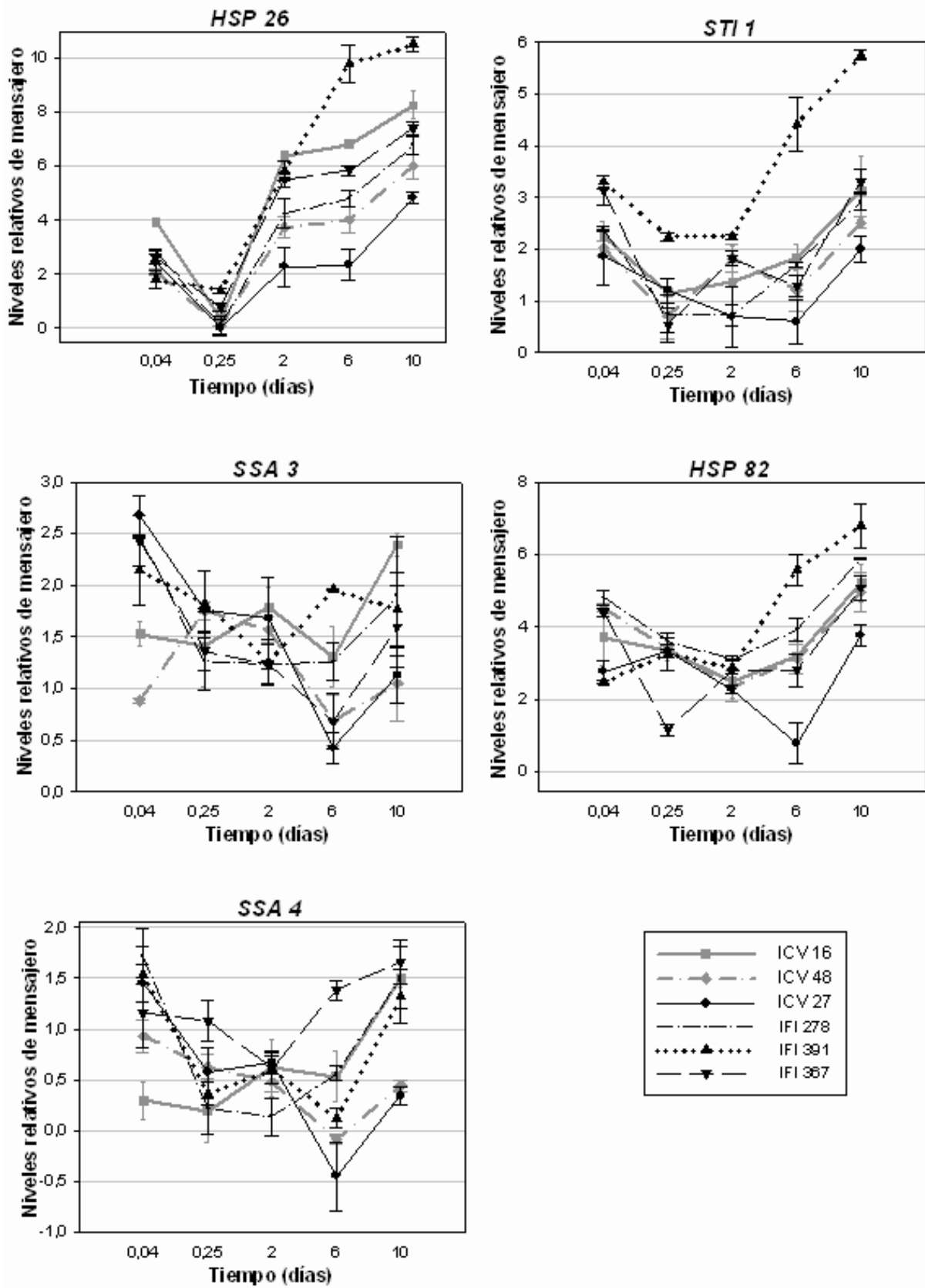


Figura C2.7. Expresión durante la primera mitad de la vinificación de algunos genes que codifican Hsps. Los datos muestran niveles de mRNA relativos a DNA genómico.

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

El gen *HSP26* codifica una proteína citoplasmática implicada en plegamiento de proteínas (Morimoto, R.I. y col., 1994). Su expresión está regulada en condiciones de estrés por los factores de transcripción Msn2/4p, Hsf1p, y Gis1p, mostrando peculiaridades en función de la condición particular que activa la respuesta (Amorós, M. y col., 2001). En todas las cepas consideradas en este trabajo los menores niveles de mRNA se encuentran a 6 horas tras la inoculación y se detecta un importante aumento ya a los 2 días. En muchos casos este incremento continúa a tiempos posteriores y los máximos niveles se detectan a los 10 días, cuando el cultivo se encuentra en fase estacionaria y se ha producido una mayor cantidad de etanol. En cuanto a diferencias entre cepas, se observa que los niveles más altos los presenta la cepa IFI 391 sobre todo a 6 y 10 días. Esta cepa también destaca porque, aunque muestra los niveles más elevados a 6 horas, tiene el nivel más bajo a 1h. Además, así como el resto de cepas muestran un primer aumento en los niveles a los 2 días y otro entre los 6 y los 10 días, el segundo aumento en la cepa IFI 391 tiene lugar entre los 2 y los 6 días, momento en el cual las células todavía están creciendo y consumiendo tanto azúcares como nitrógeno.

El gen *HSP82* codifica la carabina molecular Hsp90p, una ATPasa localizada en la membrana plasmática. Con respecto a este gen encontramos niveles de mRNA parecidos a 1 y 6 horas excepto en el caso de la cepa IFI 367, para la que se observa un acusado descenso. Al igual que para el gen *HSP26* los mayores niveles se detectan a 10 días y la cepa IFI 391 muestra los valores más altos excepto a 1 hora.

Los genes *HSP70* en levadura constituyen una familia multigénica en la cual al menos cinco de sus nueve miembros son inducibles por choque térmico. Además los niveles de mensajero en algunos de ellos también varían en otras condiciones (Werner-Washburne, M. y col., 1989). Nosotros estudiamos aquí dos de los genes de la familia, *SSA3* y *SSA4*, cuyos productos son proteínas citoplasmáticas implicadas en plegamiento y respuesta a estrés. Ambos genes muestran perfiles de expresión bastante similares en las cepas consideradas. Como se observa principalmente en *SSA3* existen claras diferencias entre los dos grupos de cepas. Las cepas que completan la fermentación muestran valores más bajos a 1 hora y los niveles de mRNA se mantienen relativamente constantes exceptuando el aumento a los 10 días observado para la cepa ICV 16. En las cepas del otro

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

grupo se observan niveles altos a 1 hora y sólo la cepa IFI 391 tiene niveles más o menos mantenidos para *SSA3* aunque no para *SSA4*.

El gen *STI1* codifica una Hsp citoplasmática implicada en plegamiento e inducida de forma bastante específica por choque térmico, de forma dependiente de Hsf1p (Nicolet, C.M. y col., 1989). Los niveles más bajos se encuentran a 6 horas, 2 y 6 días para todas las cepas excepto la IFI 391, que presenta el aumento de expresión ya a los 6 días en lugar de a los 10 días como ocurre en el resto de las cepas. En este caso vuelven a destacar niveles altos en todos los puntos para la cepa IFI 391 y a 1h para la cepa IFI 367.

2.4. Expresión de genes que responden a estrés osmótico.

En este estudio se han seleccionado como genes de respuesta a estrés osmótico *GPD1* y *GLO1* (relacionados con el metabolismo del glicerol) y *HOR7* (de función molecular desconocida). Los resultados obtenidos para estos tres genes se detallan en la Figura C2.8.

En estos experimentos, los niveles máximos de *GPD1* los encontramos en la mayoría de las cepas a 1 hora tras el choque osmótico, lo que está de acuerdo con datos previos obtenidos en nuestro laboratorio (Pérez-Torrado, R. y col., 2002). Para las cepas ICV 16, ICV 48, ICV 27 e IFI 278 los niveles decrecen significativamente a 6 horas, lo que indica que la producción de glicerol ha sido capaz de contrarrestar el estrés osmótico. Sin embargo, este no es el caso para la cepa IFI 367, que no muestra apenas variación durante los primeros días, y la IFI 391, para la que los niveles son incluso mayores a 6 horas que a 1 hora y, además, no cambian significativamente en los tiempos incluidos en este estudio. La incapacidad de responder de forma adecuada al estrés osmótico del inicio de la vinificación junto con la limitación de nitrógeno probablemente explica los graves problemas de fermentación mostrados por estas cepas que se detallaron en el capítulo 1.

Resultados similares se obtienen para los otros dos genes inducidos por estrés osmótico: *HOR7* y *GLO1*, aunque en estos casos no existen grandes diferencias entre las cepas. *HOR7* codifica una proteína de función desconocida localizada en la fracción membranosa y *GLO1* codifica la lactoil glutation ligasa. Para estos dos genes las diferencias entre 1 y 6 horas y el incremento en los niveles de mRNA a 10 días son más

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

pronunciados para todas las cepas. En el caso de *HOR7* de nuevo la cepa IFI 367 muestra los niveles más altos a 1 hora. Para el resto de cepas los niveles más elevados se encuentran a 2, 6 y 10 días.

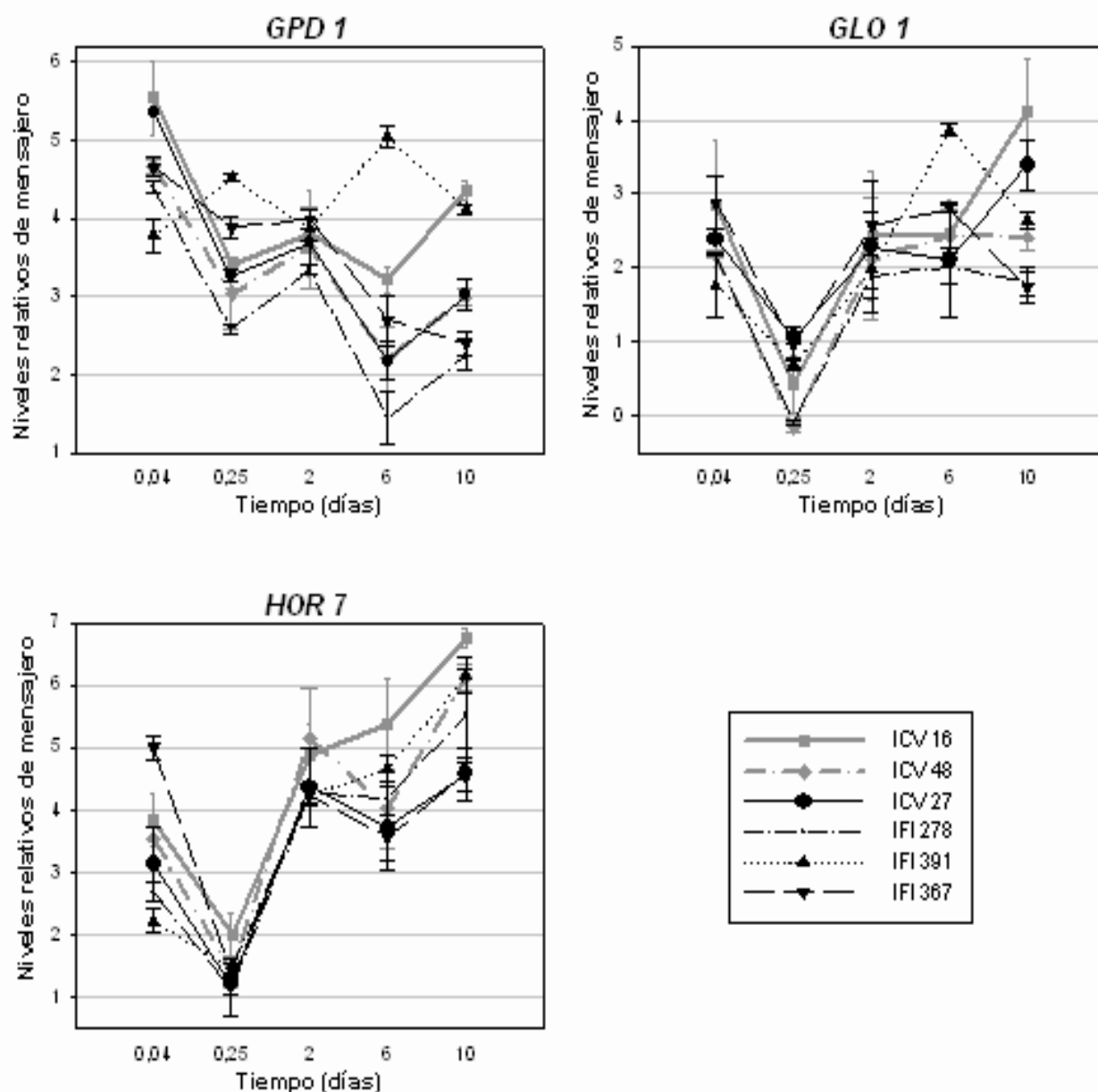


Figura C2.8. Expresión durante la primera mitad de la vinificación de algunos genes que responden a estrés osmótico. Los datos muestran niveles de mRNA relativos a DNA genómico.

2.5. Expresión de genes que responden a estrés oxidativo.

El estrés oxidativo no debe ser muy relevante durante la fermentación vínica, especialmente durante la primera mitad del proceso, ya que en esta fase las células llevan

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

a cabo un metabolismo fermentativo. Sin embargo, la respuesta a este tipo de estrés es importante durante la producción industrial de levaduras (Pérez-Torrado, R., Tesis Doctoral) y puede serlo también durante el envejecimiento biológico. Dentro de los genes inducidos por este tipo de estrés nosotros hemos seleccionado para nuestro estudio *TRX2*, *GRE2* y *CUP1* (Figura C2.9).

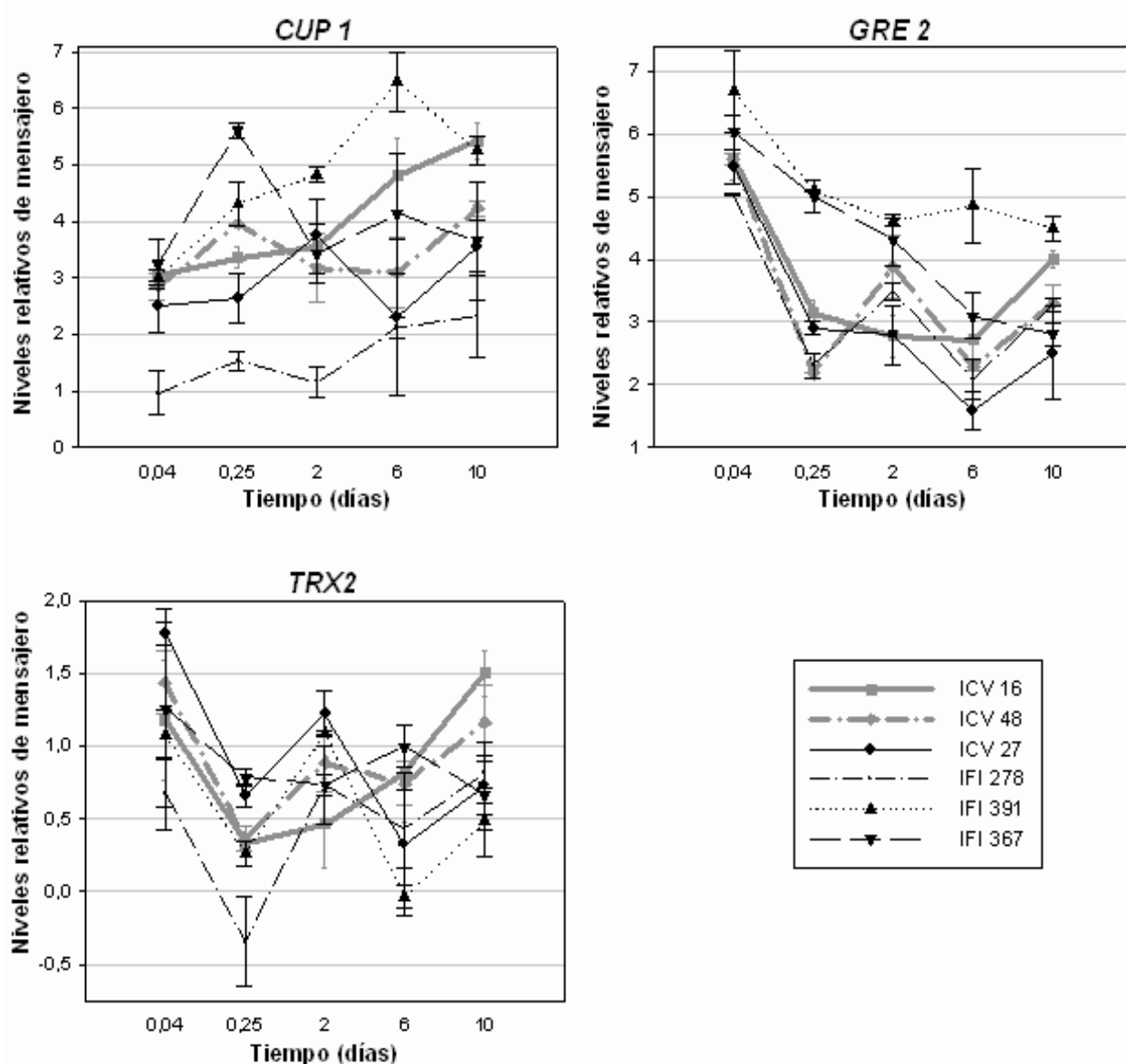


Figura C2.9. Expresión durante la primera mitad de la vinificación de algunos genes que responden a estrés oxidativo. Los datos muestran niveles de mRNA relativos a DNA genómico.

TRX2 codifica la proteína tiorredoxina y es probablemente el gen más representativo inducido por estrés oxidativo. Los niveles de mRNA relativos a genómico obtenidos en

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

nuestro estudio son bastante bajos en todos los tiempos considerados en este trabajo y probablemente el único resultado interesante sean los extremadamente bajos niveles mostrados por la cepa IFI 278, particularmente a 6 horas. Para el resto de cepas los niveles se mantienen bastante constantes durante todo el periodo estudiado.

GRE2 codifica una proteína similar a la dihidroflavonol-4-reductasa de plantas, aunque su función y localización son desconocidas. El patrón de expresión de este gen a lo largo de la vinificación no dista mucho del encontrado para los genes de respuesta a estrés osmótico, observándose niveles de mRNA relativos a genómico bastante altos especialmente a 1 hora. Posteriormente los niveles se mantienen bajos hasta los 6 días, momento a partir del cual se observa un incremento. Este comportamiento es seguido por todas las cepas con excepción de IFI 367 e IFI 391 en las que el descenso a 6 horas es menor y los niveles se mantienen durante todos los tiempos considerados, especialmente en el caso de la cepa IFI 391, resultado bastante similar al encontrado para *GPD1*.

El gen *CUP1* codifica una metalotioneína que presenta, en general, niveles más bajos a 1 y 6 horas y más altos a 6 y 10 días. Como aspectos peculiares de cepa cabe destacar que en IFI 367 los valores más elevados se dan a 6 horas, y para IFI 391 el máximo aparece a los 6 días aunque los niveles son bastante similares a los 2 y 10 días. El otro dato interesante son los bajos niveles encontrados en todos los tiempos en la cepa IFI 278.

2.6. Expresión de genes que responden a ayuno de nutrientes y entrada en fase estacionaria.

Bastantes genes de levadura se inducen por ayuno de azúcar o nutrientes y por entrada en fase estacionaria (Gasch, A.P. y col., 2000). La entrada de las células en esta fase durante la vinificación no está del todo clara. De hecho, en las vinificaciones llevadas a cabo para este trabajo, esta entrada se produce cuando hay todavía azúcar y nitrógeno disponible por lo que probablemente es la producción de etanol y su efecto sobre la asimilación de compuestos de nitrógeno (Alexandre y col., 1994) y de glucosa (Jackson, 1994) lo que esté produciendo el cese de división celular. En este trabajo hemos considerado los genes *SPI1*, *COX6*, *YGP1* y *CAR1* como indicativos de la respuesta a esta condición de estrés (Figura C2.10).

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

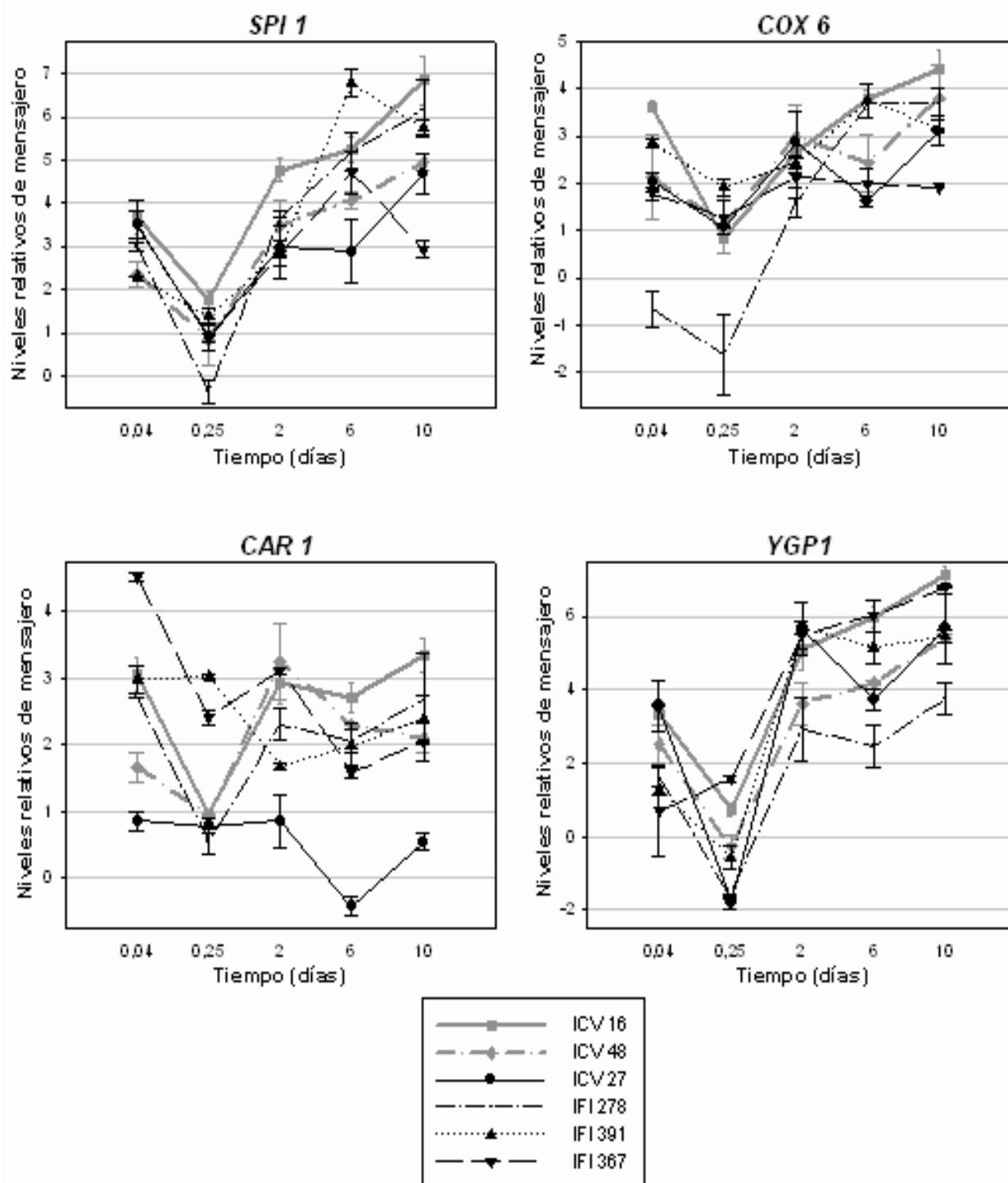


Figura C2.10. Expresión durante la primera mitad de la vinificación de algunos genes inducidos por ayuno de nutrientes y fase estacionaria. Los datos muestran niveles de mRNA relativos a DNA genómico.

SPI1 codifica una proteína de pared de función desconocida. En mutantes con diferentes defectos en la construcción de pared se ha visto inducción del gen y además se han encontrado en su promotor motivos de unión de factores de transcripción como

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

Msn2/4p, Hsf1p y Rlm1p (Lagorce, A. y col., 2003). El patrón de expresión para este gen durante la vinificación es bastante similar en todas las cepas consideradas: niveles mínimos de mRNA a 6 horas y máximos a 6 días. Las cepas ICV 16 e IFI 391 muestran los niveles más altos en casi todos los tiempos considerados. La cepa IFI 278 presenta niveles muy bajos a 6 horas. Para todas las cepas (excepto IFI 367 e IFI 391) los niveles de mRNA son menores a 10 que a 6 días.

COX6 es un gen nuclear que codifica una subunidad de la citocromo oxidasa mitocondrial. Para este gen se observan los niveles más altos a 10 días, aunque en las cepas IFI 278 e IFI 391 no hay muchas diferencias con el nivel encontrado a 6 días. En la cepa IFI 367 no se encuentran cambios significativos a lo largo de todo el periodo considerado. El nivel más bajo lo presentan todas las cepas a 6 horas y la cepa IFI 278 muestra los niveles más bajos al menos hasta los 2 días.

Para el gen *YGP1* se observaron en general valores mínimos a 6 horas y máximos a 6 y 10 días y la cepa IFI 367 volvió a mostrar un patrón único ya que es la cepa que posee el nivel mínimo a 1 hora.

CAR1 codifica el enzima arginasa cuya actividad está regulada por represión catabólica de nitrógeno y por mecanismos post-transcripcionales (Messenguy, F. y col., 1983). Aunque bajo condiciones limitantes de nitrógeno la actividad arginasa se encuentra inducida (Whitney, P.A. y col., 1973), la expresión del gen no parece verse afectada por condiciones de estrés (Gasch, A.P. y col., 2000). Sin embargo, recientes estudios en nuestro laboratorio han indicado cambios en los niveles de mRNA durante la vinificación no relacionados estrictamente con deficiencias de nitrógeno (Carrasco, P. y col., 2003). Para la mayoría de cepas los niveles de mRNA de *CAR1* son bastante constantes durante los tiempos estudiados excepto a 6 horas, para este tiempo los niveles fueron menores en las cepas ICV 16, ICV 48, ICV 27 e IFI 278. Este resultado concuerda con el obtenido para vinificaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio con la cepa comercial T73 (Carrasco, P. y col., 2003). En la cepa IFI 391 encontramos niveles de mRNA similares a 1 y 6 horas y en la cepa IFI 367 un descenso entre estos dos tiempos. Además, en el caso de estas dos cepas es importante resaltar los elevados niveles encontrados respecto a los que presentan

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

las demás. Debemos señalar por último los bajos niveles de la cepa ICV 27 particularmente a 6 días.

2.7. Otros genes inducidos por estrés implicados en procesos celulares.

Existen muchos genes implicados en la respuesta a estrés que participan en procesos relacionados con mecanismos de protección frente a estrés (acetato, acetaldehído, metabolismo del glucógeno y trehalosa, degradación proteica, mecanismos de transducción de señal...). Entre todos ellos nosotros hemos seleccionado *GSY2* y *ATH1* para un estudio más profundo (Figura C2.11).

El almacenamiento de glucosa en forma de glucógeno es crítico para la supervivencia celular en situaciones de ayuno. Además se sabe que el glucógeno juega un papel importante en la respuesta a una amplia variedad de condiciones de estrés medioambientales (François, J. y col., 2001). Los genes que codifican enzimas que promueven su almacenamiento o movilización se encuentran coinducidos en la ESR (Gasch, A.P. y col., 2000). El gen *GSY2* codifica la forma predominante de la glucógeno sintasa y en conjunto muestra un incremento en sus niveles a medida que la fermentación progresa. Los niveles más altos los presenta la cepa ICV 16 durante las primeras horas y la cepa IFI 391 a los 6 días. Para este gen vuelven a destacar los bajos valores presentados por la cepa IFI 278 especialmente a 1 hora, 2 y 6 días.

Es bien conocido por otro lado que la trehalosa participa en la respuesta a estrés particularmente en condiciones de elevada osmolaridad, choque térmico y estrés oxidativo (François, J. y col., 2001) de forma que se ha visto inducción de genes que afectan a su síntesis y degradación en respuesta a múltiples condiciones de estrés como parte de la ESR (Gasch, A.P. y col., 2000). *ATH1* codifica la trehalasa ácida, proteína localizada en la vacuola implicada en la movilización de este disacárido (Destruelle, M. y col., 1995). Para este gen las diferencias entre cepas son importantes pero los datos más significativos son los elevados niveles mostrados por las cepas IFI 367 e IFI 391 y, especialmente en la cepa IFI 391, la constancia en los niveles a lo largo del periodo estudiado. También es importante resaltar los valores mínimos de la cepa IFI 278 durante los dos primeros días.

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

Por último cabe mencionar los resultados obtenidos para el gen codificante de actina, utilizado como control en estos experimentos. De acuerdo con los resultados de Riou y colaboradores (1997), no se aprecian cambios significativos durante el periodo de vinificación estudiado para la mayoría de las cepas; en todo caso una ligera disminución a los 6 ó 10 días. Nuevamente las cepas IFI 367 e IFI 391 muestran un patrón peculiar mostrando un pico a 6 horas que no aparece en el resto de cepas.

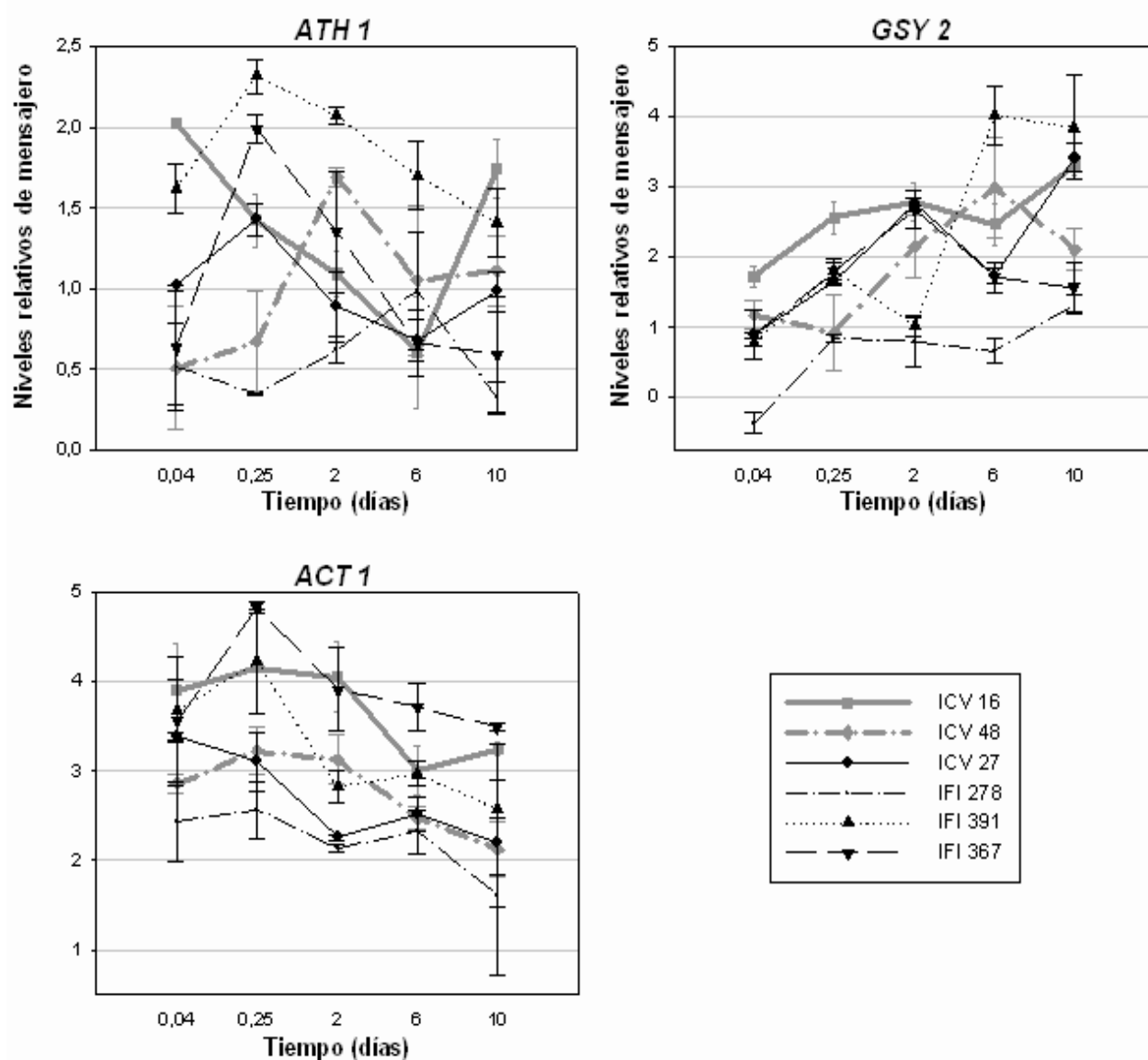


Figura C2.11. Expresión durante la primera mitad de la vinificación de los genes *ATH1* y *GSY2*. Los datos muestran niveles de mRNA relativos a DNA genómico.

2.8. Caracterización genotípica de las cepas.

Al analizar las hibridaciones de las matrices de DNA observamos que en el caso de las cepas IFI 367 e IFI 391 obteníamos una intensidad de señal en general mucho más baja que para el resto de cepas. Esto, junto con el patrón tan peculiar tanto en expresión génica como en crecimiento y consumo de nutrientes en las diferentes condiciones de vinificación, nos hizo plantearnos un estudio a nivel genómico. En la información de las cepas proporcionada por las casas comerciales o por el IFI se clasificaban dentro de las especies que se detallan en la Tabla C2.3. Se sabe que algunas casas comerciales cometen fraudes en el sentido de comercializar cepas iguales con diferente nombre, cambiar cepas con el tiempo pero comercializarlas con el mismo nombre y sin aviso de ningún tipo en los nuevos envases o proporcionar datos erróneos como la caracterización de la cepa (Fernández-Espinar, M.T. y col., 2001). Además, las cepas procedentes del IFI estaban clasificadas dentro de las especies *S. ellipsoideus* y *S. uvarum* que son especies no reconocidas actualmente (Fernández-Espinar, M.T. y col., 2003). Por todo esto se decidió realizar algunos análisis encaminados hacia la caracterización de estas 6 cepas.

En primer lugar se hizo un análisis de los cariotipos de las cepas que consiste en utilizar una técnica electroforética (electroforesis en campo pulsante) para separar los cromosomas enteros de levadura. A pesar del escepticismo de ciertos autores existen numerosos estudios que muestran que el patrón de migración de los cromosomas permite diferenciar las especies de levadura *S. bayanus* y *S. cerevisiae* (Masneuf, I. y col., 1996; Nguyen, H.V. y col., 1997; Rainieri, S. y col., 1999), que son las especies a las que típicamente pertenecen las cepas vínicas. El resultado de este análisis se muestra en la Figura C2.12. Como se puede observar hay 6 cepas que muestran un patrón electroforético muy similar y 2 que muestran un patrón diferente. Las cepas BY4742 y T73 (cepa de laboratorio y cepa vínica comercial, respectivamente) se pusieron como control ya que se sabe que son dos cepas de la especie *S. cerevisiae*.

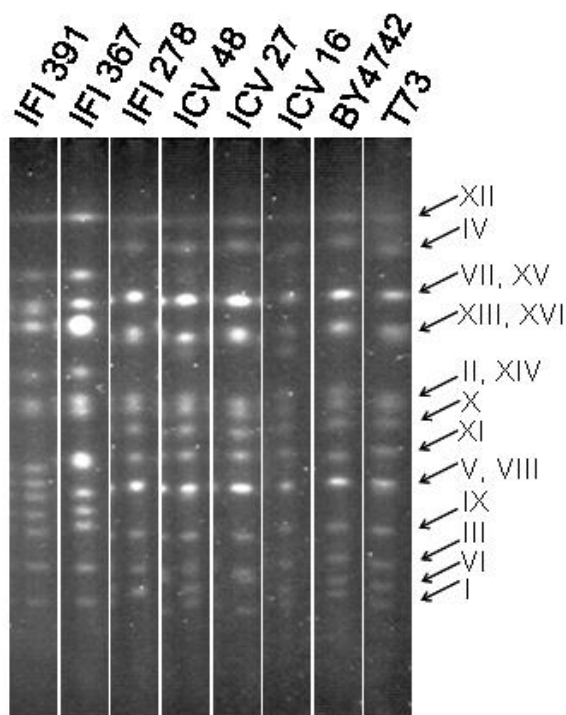


Figura C2.12. Cariotipos de las levaduras utilizadas para el análisis de la expresión de genes de respuesta a estrés durante la vinificación. En la parte superior de la Figura se muestra el nombre de las cepas. Las cepas BY4742 y la T73 se han puesto como control ya que pertenecen a la especie *S. cerevisiae*. La migración de cada uno de los cromosomas de T73 (Puig, S. y col., 2000c) se indica a la derecha de la Figura.

Para confirmar que las 4 cepas con patrón similar pertenecían también a la especie *S. cerevisiae* y determinar si las otras dos cepas pertenecían a *S. bayanus* se utilizó la técnica PCR-RFLP sobre el gen *MET2* ya que se ha visto que el enzima *Pst*I posee secuencias de corte en el gen de la especie *S. bayanus* y no el gen de *S. cerevisiae* y lo contrario ocurre cuando el enzima utilizado es *Eco*RI (Masneuf, I. y col., 1996). A partir del patrón de bandas obtenido mediante este análisis (Figura C2.13) parece que las cepas ICV 16, ICV 27, ICV 48 e IFI 278 pertenecen a la especie *S. cerevisiae* y que las cepas IFI 367 e IFI 391 pertenecen a una especie diferente, presumiblemente a *S. bayanus*. Sin embargo, según lo descrito por los Drs. Barrio y Querol (González y col., enviado), la restricción sobre el fragmento amplificado de *MET2* no permite la diferenciación de otras especies del complejo *sensu stricto*, como *S. kudriatzevii* y *S. paradoxus*, que muestran el mismo patrón de bandas que *S. bayanus*. El análisis PCR-RFLP sobre otros genes descrito por estos

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

autores permitió confirmar que IFI 367 e IFI 391 son *S. bayanus* lo que podría explicar en parte las diferencias en el comportamiento fermentativo en las condiciones analizadas.

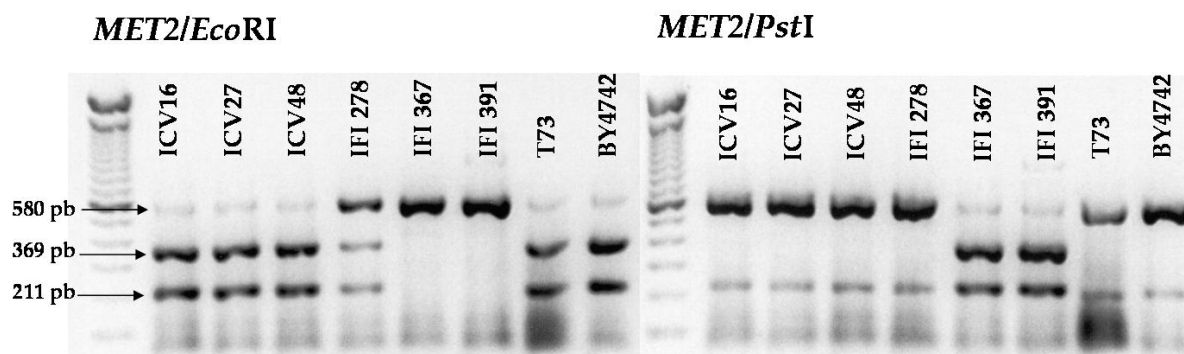


Figura C2.13. Análisis RFLP de un fragmento del gen *MET2* obtenido por amplificación mediante PCR.

En segundo lugar se realizó un análisis de restricción del DNA mitocondrial para confirmar, sobre todo por los fraudes cometidos por las casas comerciales, que se trataba de cepas diferentes. Para ello se empleó el método descrito por Querol y colaboradores (1993) que se basa en una extracción de DNA genómico total y posterior digestión con un enzima de restricción (*HinfI*) que posee una frecuencia de corte muy alta en el DNA nuclear y una frecuencia de corte más baja en el DNA mitocondrial lo que permite obtener un patrón de bandas distinguible para cada cepa. Como se observa en la Figura C2.14 en todos los casos se trata de cepas diferentes.

En el caso de las cepas ICV 16, ICV 22 (Capítulo 1) e ICV 27 se ha comparado el patrón de restricción del DNA mitocondrial con las cepas comercializadas actualmente como Fermicru primeur (DSM), Lalvin T73 (Lallemand Inc.) y UCLM S377 (Springer Oenologie) respectivamente, encontrando patrones idénticos en cada caso. Para las cepas ICV 9 (Capítulo 1), ICV 18 (Capítulo 1) e ICV 48 no se ha considerado la utilización de levadura seca activa por lo que no hemos realizado la comprobación pertinente y sólo podemos garantizar que hace aproximadamente 10 años estas cepas se comercializaban con el nombre y por la casa comercial que se indica en la sección de Materiales y Métodos.

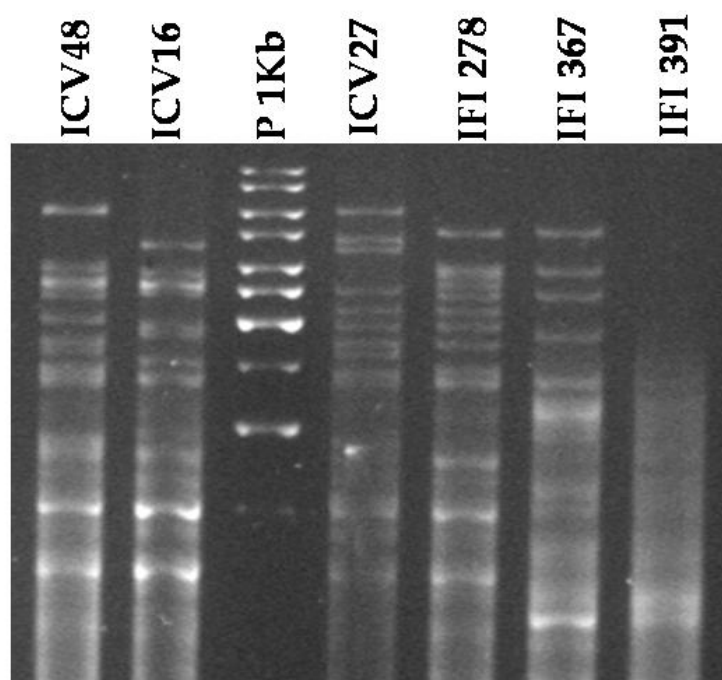


Figura C2.14. Patrones de restricción del DNA mitocondrial con el enzima *HinfI* de las cepas utilizadas en el trabajo de expresión de genes de estrés durante la vinificación.

DISCUSIÓN

En los últimos años se han llevado a cabo diversos estudios sobre expresión génica durante la vinificación que tienen en cuenta grupos particulares de genes durante periodos concretos del proceso o durante toda la fermentación (Ivorra, C. y col., 1999; Pérez-Torrado, R. y col., 2002; Puig, S. y col., 2000a; Puig, S. y col., 2000b; Rachidi, N. y col., 1999; Riou, C. y col., 1997). También se han llevado a cabo experimentos de expresión global bajo condiciones particulares de crecimiento (Backhus, L.E. y col., 2001; Marks, V.D. y col., 2003). En todos estos estudios una sola cepa vínica ha sido utilizada para la realización de los experimentos. Además, de todos ellos, sólo en el de Pérez-Torrado y colaboradores (2002) se hace un análisis detallado de la respuesta de las levaduras vínicas al estrés que tiene lugar en el inicio de la vinificación, donde las células son inoculadas en un mosto que tiene una elevada concentración de azúcares, un pH bajo y, en algunas ocasiones, una temperatura inferior a la óptima de crecimiento de *Saccharomyces sp.*

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

En este escenario nosotros nos planteamos un estudio de la expresión génica en diferentes cepas vínicas así como un análisis más detallado de la respuesta de las levaduras al ser inoculadas en el mosto y de factores que pueden afectar esta respuesta. Para todos estos estudios se utilizó mosto sintético pero de composición muy similar a un mosto natural sin limitaciones de nutrientes y empleado por muchos autores (Jiranek, V. y col., 1995; Riou, C. y col., 1997; Salmon, J.M. y col., 1998b). El uso de estos mostos facilita en muchos casos la elaboración de conclusiones ya que los mostos naturales son muy variables en composición dependiendo, por ejemplo, del grado de maduración de la uva, las condiciones climatológicas en que se desarrolla,... lo que afecta en muchos casos al contenido en fuentes nitrogenadas (Henschke, P.A. y col., 1993). De hecho la limitación de nitrógeno es la causa más común de las paradas de fermentación (Bisson, L.F., 1999) y afecta al crecimiento celular, a la velocidad de fermentación y a la tolerancia a etanol. Por todo esto hicimos el estudio en un medio de composición definida, sin ninguna limitación de nutrientes y con un rango de pH y temperatura de incubación dentro de los márgenes del uso industrial.

Así pues se analizó, en primer lugar, la expresión de genes de respuesta a estrés al inicio de la vinificación obteniendo como conclusiones más relevantes elevados niveles de mensajero del gen *GPD1* y bajos de *TRX2*, *HSP104* y *SSA3*. Este resultado es el esperable dado que las levaduras responden a los aumentos de osmolaridad del medio acumulando glicerol, el osmolito que permite a la célula recuperar la turgencia que se había perdido por la salida del agua al exterior celular. El hecho de que los otros genes se encuentren en bajo nivel podría indicar que en estas condiciones lo que se observa es una respuesta bastante específica a estrés hiperosmótico y no una respuesta general a estrés como la encontrada por otros autores en condiciones de estrés hiperosmótico generadas por otros osmolitos (Causton, H.C. y col., 2001; Gasch, A.P. y col., 2000). La explicación a este resultado podría ser una diferencia en el estado de las células al ser inoculadas en el mosto o en los medios de elevada osmolaridad estudiados por los otros autores. En los estudios de respuesta a estrés las células proceden de cultivos en fase de crecimiento exponencial, es decir, en condiciones óptimas para la supervivencia celular. En el mosto se inoculan células, en nuestro caso, obtenidas a partir de un cultivo crecido durante 1 día

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

con lo que las células han entrado en fase estacionaria y, presumiblemente, tienen activada la ruta general de respuesta a estrés. Al inocular estas células en el mosto se recuperan las condiciones óptimas de crecimiento en cuanto a nutrientes y esta puede ser la razón de la respuesta específica a estrés osmótico. Otro dato que apoya esta idea son los resultados obtenidos en el segundo apartado de este capítulo donde se estudia la expresión de genes de respuesta a estrés 1 hora tras la inoculación. En este caso sí se utilizaron células que no habían entrado en fase estacionaria precisamente para profundizar en el efecto que esto produce sobre la expresión génica. En estas condiciones lo que hemos visto en algunas cepas son niveles relativamente altos de algunos genes de respuesta general a estrés y, entre ellos, *TRX2* y *SSA3*. También debemos considerar que durante la vinificación el estrés osmótico es causado precisamente por los elevados niveles de glucosa, que ejerce efectos de represión sobre diversos procesos, tal y como se revisó en la introducción general.

En cuanto al estudio del efecto del pH y la temperatura sobre la expresión de estos genes debemos destacar que, en general, sí se encuentran diferencias en el perfil de expresión mostrado por las cepas. En el caso del pH se observa unos niveles mínimos a pH 3.0 y mayores diferencias a pH 3.3 y 3.6 de manera que algunas cepas tienen el máximo de expresión en estas condiciones a pH 3.3 y otras a pH 3.6 (ninguna a pH 3.0). A pesar de estas diferencias lo que sí se encuentra son perfiles similares para los dos genes considerados (*GPD1* y *TRX2*) en cada cepa, lo que significa que probablemente sus mecanismos de regulación en respuesta al pH son similares. En cuanto a la temperatura existen menos diferencias entre las cepas, de manera que la mayoría muestra un aumento de los niveles de expresión de *HSP104* y *SSA3* a medida que disminuye la temperatura. En la bibliografía existen pocos datos acerca de la respuesta transcripcional de la levadura frente a estrés por frío aunque se ha visto que los niveles de algunos genes de respuesta a choque térmico como *HSP26* o *SSA3* (Homma, T. y col., 2003) y *HSP104* o *SSA4* (Kandror, O. y col., 2004) se encuentran incrementados cuando se disminuye la temperatura hasta valores cercanos a los de congelación. Además, según un seguimiento de la expresión global durante 8 horas de crecimiento a 10°C, aunque la transcripción de algunas *HSPs* se encuentra reprimida durante todo el periodo, los genes que codifican Hsp12p y Hsp26p se

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

encuentran inducidos a partir de las 4 horas tras el choque por frío (Sahara, T. y col., 2002). Todo esto parece sugerir que las células también podrían activar algunos genes de choque térmico para protegerse en condiciones de temperatura por debajo de la óptima además, por supuesto, de otros muchos como *NRS1* (Kondo, K. y col., 1992) y *TIP1* (Kondo, K. y col., 1991) que no han sido considerados en este trabajo.

En cuanto a posibles relaciones entre el comportamiento fermentativo y la expresión de genes de respuesta a estrés al inicio de la vinificación no podemos sacar fácilmente conclusiones a partir de las condiciones utilizadas en este trabajo ya que, al tratarse de cepas vínicas comerciales, mosto completo y temperatura cercana a la óptima de crecimiento, no observamos grandes diferencias en el patrón de vinificación. Sin embargo, la información proporcionada por la empresa de comercialización de las cepas utilizadas en este trabajo (Lallemand Inc.) en relación con sus peculiaridades fermentativas puede darnos algunas claves. Tal vez el dato más significativo en este sentido sea que la cepa 3, que muestra los niveles más altos de *GPD1* y *TRX2* en condiciones estándar y de *HSP104* y *SSA3* a 15°C, está muy bien adaptada a las fermentaciones llevadas a cabo a baja temperatura (Anne Ortiz Julien, datos no publicados). La diferencia entre los niveles de mensajero encontrado en las diferentes cepas podría pues estar indicando, en algunos casos, diferencias en la adaptación a determinadas condiciones de vinificación. En cualquier caso, también se han observado variaciones de expresión génica en cepas vínicas en condiciones de laboratorio (Carrasco, P. y col., 2001). Estas diferencias pueden ser debidas a la plasticidad genotípica de las cepas vínicas que les permite una mayor capacidad de adaptación (Querol, A. y col., 2003). Además, es posible que los niveles necesarios para contrarrestar el estrés tengan un umbral de suficiencia a partir del cual la célula es capaz de protegerse, que los máximos de expresión se alcancen en tiempos diferentes o que existan adicionalmente mecanismos de regulación a nivel de actividad de proteína.

Para poder profundizar en el estudio de cómo diferencias en la expresión génica entre cepas pueden correlacionarse con diferencias en el patrón de fermentación se seleccionaron un grupo de cepas a partir de los resultados del primer capítulo. En primer lugar se analizó el comportamiento en condiciones estándar de vinificación y se vieron

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

diferencias en parámetros como el número de viables y la capacidad de completar la fermentación de los azúcares por lo que se utilizaron estas mismas condiciones para el estudio de expresión de 32 genes de respuesta a estrés durante la primera mitad de la vinificación. Una consideración global de todos los datos obtenidos en este análisis es la existencia de bajos niveles de mRNA a las 6 horas desde la inoculación y unos niveles máximos a tiempos de 6 días o posteriores. A las 6 horas desde la inoculación las células han debido contrarrestar ya el estrés hiperosmótico mediante la producción de glicerol, ya se han duplicado (al menos una vez) y todavía no se ha acumulado etanol en el medio de cultivo con lo que en este punto observamos las condiciones óptimas de crecimiento y de ahí la baja expresión de genes de estrés. A partir de aquí irá disminuyendo la concentración de nutrientes (aunque en nuestras condiciones no hay agotamiento de azúcares ni de nitrógeno) y se irá produciendo etanol, cuyo efecto principal es una alteración de los sistemas de transporte a nivel de membrana (Alexandre, H. y col., 1994; Jackson, R.S., 1994). Esto se refleja en un aumento gradual de algunos de los genes estudiados, que además suelen presentar niveles máximos hacia los 6 días (cuando la mayoría de las cepas entran en fase estacionaria de crecimiento en nuestras condiciones de vinificación), o hacia los 10 días (cuando todas las cepas se encuentran en fase estacionaria avanzada y en muchas comienza a haber una pérdida de viabilidad). Este resultado de aumento de la expresión de genes de estrés en el momento de la entrada en fase estacionaria durante la vinificación es similar a lo encontrado por otros autores (Puig, S. y col., 2000b; Riou, C. y col., 1997). Además, el perfil obtenido para *HSP26* y *SPI1* en el trabajo de Rossignol y colaboradores (2003) (condiciones muy similares a las utilizadas en nuestro trabajo), es prácticamente idéntico: Niveles máximos de expresión para *HSP26* en el momento en que las células empiezan a disminuir su tasa de división celular (momento previo a la fase estacionaria), y niveles máximos para *SPI1* una vez que ya no se observan cambios en la biomasa del cultivo (fase estacionaria). Al igual que *SPI1*, *COX6* también muestra el perfil de expresión que se encuentra para estos dos genes tras el agotamiento de la glucosa o del nitrógeno en condiciones de laboratorio. Como se ha comentado, en nuestras condiciones de vinificación no hay agotamiento de nutrientes pero la producción

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

de etanol en este punto puede haber sido suficiente para inhibir su transporte hacia el interior celular.

Al margen de estas consideraciones generales también hemos encontrado ciertas diferencias entre las cepas. Las cepas ICV 16, ICV 48 e ICV 27 (cepas vínicas comerciales todas ellas) muestran perfiles de expresión bastante similares, aunque la última presenta niveles estacionarios significativamente más bajos de mensajeros de *HSP26* y *HSP82* al final de la vinificación y de *CAR1* en todos los puntos estudiados. Estas tres cepas muestran curvas de crecimiento y consumo de nutrientes muy similares con la única excepción del consumo de azúcares a partir de los 6 días, que en el caso de la cepa ICV 27 empieza a ralentizarse y cesa cuando todavía quedan 15-30 g/L.

La cepa IFI 278 presenta un comportamiento muy peculiar. El crecimiento está muy acelerado durante los primeros 5 días y esto se refleja también en el rápido consumo de azúcares y nitrógeno durante este periodo. Después de este tiempo comienza la pérdida de viabilidad del cultivo y hay un cese casi completo de consumo de azúcares y nitrógeno. En esta cepa también hemos visto niveles bajos para algunos genes; destacan en este aspecto *TRX2* y *COX6* durante los primeros días y *CUP1* y *GSY2* durante todo el periodo considerado. Aunque en estas condiciones la cepa IFI 278 tiene un comportamiento único, en las condiciones del capítulo 1 el patrón de crecimiento y consumo era más parecido al resto de cepas de su grupo, entre las que se encontraba ICV 27. Como vemos, estas dos cepas se caracterizan por presentar niveles mínimos de expresión de algunos de los genes estudiados con lo que probablemente sea esta carencia la que condicione, al menos en cierto grado, su comportamiento durante la vinificación.

Las cepas IFI 367 e IFI 391 también tienen un comportamiento peculiar muy probablemente debido a que pertenecen a la especie *S. bayanus*. Esta especie es un taxón muy heterogéneo que se subdivide en dos variedades, el grupo 'bayanus' (que incluye la especie tipo CBS 380) y el grupo 'uvarum' en el que se engloban las especies anteriormente clasificadas como *S. uvarum* y donde se incluyen la mayoría de cepas vínicas (Rainieri, S. y col., 1999). Se ha visto que las cepas vínicas de *S. bayanus* var. *uvarum* podrían tener ventajas en fermentaciones a bajas temperaturas (Naumov, I. y col., 2000). Probablemente esta adaptación a condiciones concretas de vinificación es lo que les

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

impide progresar adecuadamente en condiciones estándar y probablemente también sea la causa de las diferencias en expresión génica. En estas cepas lo que más destaca son niveles de expresión elevados de algunos genes y en algunos casos estos niveles se encuentran más o menos mantenidos, de manera que no parece haber una respuesta típica a estrés a lo largo del proceso. Podemos destacar, por ejemplo, que para *GPD1* los niveles son altos y mantenidos en la cepa IFI 391 y tienen un nivel similar al de las otras cepas aunque mantenido durante los dos primeros días en la cepa IFI 367. Para otro gen de respuesta a estrés osmótico (aunque se haya descrito principalmente en la respuesta a estrés oxidativo), *GRE2*, observamos niveles altos en las dos cepas y con poca diferencia entre 1 y 6 horas. Probablemente estos niveles altos y mantenidos están indicando una continua respuesta a estrés que, como comentamos en la introducción, podría condicionar su capacidad de crecimiento y, como veíamos en la Figura C2.6, una de las características de estas cepas es la baja viabilidad que muestran durante toda la fermentación. También llaman la atención en IFI 391 los altos niveles que muestra en todos los puntos el gen *STI1* y el bajo nivel de *HSP26* a 1 hora y elevado a 6 y 10 días. Los altos niveles de *STI1* durante toda la vinificación podrían explicar también los defectos en crecimiento aunque en este caso sí se observa cómo varían los niveles a lo largo de la vinificación mostrando un perfil bastante similar al resto de las cepas. Una posible explicación al resultado de estos dos genes de respuesta a choque térmico podría ser, como también se ha comentado al principio de esta discusión, una mejor adaptación a condiciones de baja temperatura.

Considerando en conjunto todos los resultados podemos destacar que las cepas vínicas deben ser capaces de responder a las diferentes situaciones estresantes que tienen lugar durante la vinificación y que esta respuesta puede ser algo diferente en función de la adaptación a las condiciones concretas que existen en las regiones de donde fueron aisladas. Las diferencias que hemos visto en la respuesta de algunos genes en función del comportamiento fermentativo de las cepas confirman que la resistencia a estrés ha sido importante en la adaptación al proceso de vinificación y que un aspecto fundamental es la consecución de un equilibrio entre una adecuada capacidad de respuesta sin perjuicio de un correcto crecimiento. Sin embargo, no podemos descartar la influencia de otros aspectos en un desarrollo correcto de la fermentación. Con el objetivo de encontrar estos

C2. GENES DE RESPUESTA A ESTRÉS

otros posibles factores se planteó un análisis global tanto a nivel de transcritos como de proteínas, cuyos resultados se detallan en el siguiente capítulo.

CAPÍTULO 3

Expresión global en cepas con diferente comportamiento fermentativo durante la entrada en fase de crecimiento estacionaria.

A partir de los resultados de los capítulos anteriores se han seleccionado dos cepas y un momento de la vinificación para hacer un análisis de la expresión global tanto génica como proteica con el objetivo de obtener una información más amplia del estado de las células. Mediante esta visión general se intentarán establecer los mecanismos moleculares que pueden influir en que una de estas cepas no sea capaz de completar la fermentación.

RESULTADOS

1. Selección de cepas y punto de la vinificación para el estudio de expresión global.

A partir de los resultados del capítulo 2 se decidieron seleccionar las cepas ICV 16 e ICV 27 ya que ambas son cepas comerciales y presentan un comportamiento muy similar excepto en lo que se refiere al consumo de azúcares. Éste muestra una fuerte ralentización a partir de los seis días en la cepa ICV 27, produciéndose una parada de fermentación cuando aún quedan entre 15 y 30 g/L de azúcar residual (Figura C2.6).

Las condiciones de vinificación empleadas fueron las mismas que en el capítulo 2 para intentar simular lo mejor posible las condiciones de la bodega pero pudiendo controlar los parámetros que afectan a la expresión génica y proteica.

El momento de la vinificación seleccionado para el análisis es aquél en el que las cepas entran en fase estacionaria (6 días en nuestras condiciones, Figura C2.6) ya que a partir de este momento se produce la disminución del consumo de azúcares en la cepa

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

ICV 27, hemos visto diferencias en la expresión de algunos genes de respuesta a estrés (Figuras C2.7 y C2.10), y además es un punto, como se detalló en la introducción, estudiado por otros autores lo que permite comparar resultados con experimentos realizados con otras cepas que completan la fermentación.

En la Tabla C3.1 se detallan algunos parámetros de las vinificaciones llevadas a cabo para este análisis en el punto donde se determinó la expresión global y en el punto final de vinificación.

Tabla C3.1. Parámetros de la vinificación.

	ICV 16, 6 días	ICV 27, 6 días	ICV 16, 30 días	ICV 27, 30 días
Azúcares (g/L)	89-94	89-92	2-3	12-15
Nitrógeno asimilable (mg/L)	168-175	158-188	162-168	153-158
Etanol (% v/v)	5.7-6.3	5.7-6	9.3-10.3	9.3-9.6
CFU·10 ⁻⁶ /mL	28-38	38-42	12-17	15-17.9

2. Expresión génica diferencial mediante matrices de DNA.

2.1. Análisis global de los resultados.

Se realizaron 3 vinificaciones (A, B, C) procedentes de diferentes colonias para cada cepa y se hibridaron 5 matrices a partir de las siguientes combinaciones Cy5-Cy3: 16A-27C, 16C-27B, 16B-27B, 27A-16A y 27B-16C. La intensidad obtenida en cada canal para cada par de matrices fue normalizada por Lowess (Cleveland, W.S., 1979) y los cocientes de los 5 experimentos se evaluaron mediante un t-test utilizando el programa estadístico ArrayStat, tomando un nivel de significatividad del 95% y un mínimo de 4 réplicas. El resultado del test se detalla en la Tabla C3.2 y, como vemos, hay un número algo mayor de genes con niveles de expresión superiores en la cepa ICV 27; este número aumenta además a medida que lo hace el nivel de sobreexpresión.

Tabla C3.2. Número y proporción de genes con expresión significativamente diferente en cada cepa.

Nº genes significativos	Mayor expresión en ICV 16	Mayor expresión en ICV 27	*%
Totales	1018	1055	33
Relación mayor que 2.5	85	113	3.1
Relación mayor que 5	6	17	0.4

*% de genes que muestra una expresión diferencial para cada categoría de nivel.

Para evaluar los resultados se hizo en primer lugar una agrupación de los genes expresados más de 2.5 veces en categorías funcionales utilizando la herramienta "Function Associate" (<http://llama.med.harvard.edu/cgi/func/funcassociate>) (Tabla C3.3). En esta tabla sólo se han incluido genes de los que se conoce el proceso biológico en el que participan. Además se indica el p-valor que cuantifica en este caso la sobrerrepresentación de los genes que aparecen en nuestro experimento (Nº genes) respecto al total de genes que se incluyen en esa categoría (Nº genes total categoría). Se debe señalar que al hacer este tipo de análisis aparece un elevado número de categorías pero, sobre todo para la cepa ICV 16, están todas interrelacionadas y unas incluyen los genes de otras. Por este motivo sólo se indica la categoría más general (metabolismo de alcoholes) y sí se ha querido destacar la presencia de varios genes dentro de esta categoría que pertenecen estrictamente a la ruta de la glicólisis. También se han obviado categorías que hacen referencia a la actividad catalítica o a la localización subcelular.

En una primera vista global de los resultados lo que se observa es que en la cepa ICV 16 aparecen, como ya hemos comentado, genes relacionados con metabolismo de alcoholes y en concreto con glicólisis mientras que en la cepa ICV 27 hay una mayor proporción de genes implicados en respuesta a estímulos y en transporte a través de membranas. A continuación se detallarán los resultados más relevantes indicando el nivel de sobreexpresión entre paréntesis e incluyendo en algunos casos genes con expresión diferencial menor a 2.5 veces. También se ha realizado una Tabla (Tabla C3.4, páginas 117-118) que engloba todas las categorías y genes a los que haremos referencia.

Tabla C3.3. Agrupación en categorías funcionales de los genes expresados más de 2.5 veces en cada cepa de acuerdo con la herramienta Function Associate.

Nº genes	Nº genes total categoría	P-valor	Categoría funcional
Categorías sobrerrepresentadas en ICV 16			
12	148	2.7e-10	Metabolismo de alcoholes
4	18	5.4e-06	Glicólisis
Categorías sobrerrepresentadas en ICV 27			
3	3	6.9e-07	Transporte de iones sodio
5	29	5.2e-06	Respuesta a drogas
4	16	1e-05	Actividad ATPasa acoplada al movimiento transmembrana de iones
10	208	1.7e-05	Respuesta a estímulos abióticos
5	42	3.4e-05	Transporte de aminas
3	9	5.6e-05	Floculación

2.2. Metabolismo de carbohidratos.

Como se comentó en la introducción general de esta tesis, uno de los cambios que se produce a nivel de expresión génica durante la entrada en fase estacionaria tiene relación con el metabolismo de carbohidratos. En la Figura C3.1 se muestra un esquema intentando englobar todos los aspectos de este metabolismo a los que vamos a hacer referencia.

En nuestro estudio lo que aparece globalmente es una gran proporción de genes implicados en el metabolismo de alcoholes y carbohidratos en la cepa ICV 16 y algunos genes relacionados con oxidación de compuestos orgánicos y gluconeogénesis en la cepa ICV 27. Analizando en detalle los genes concretos y las rutas en las que participan vemos que:

- **Transporte de carbohidratos.** Aparecen más expresados *HXT3* (7.1) y *HXT4* (2.4) en la cepa ICV 16 y *HXT5* (3.4) en la cepa ICV 27. La transcripción de *HXT3* es independiente de la concentración de glucosa mientras que *HXT4* se activa cuando los niveles de

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

glucosa son bajos. *HXT5* es un transportador de hexosas con moderada afinidad por glucosa, que puede funcionar en la acumulación de carbohidratos de reserva durante condiciones de estrés y se induce por una disminución en la tasa de crecimiento (Kruckeberg, A.L., 1996; Maier, A. y col., 2002; Wieczorke, R. y col., 1999). También aparecen como estadísticamente significativos aunque con valores sólo ligeramente superiores en la cepa ICV 16 los genes *HXT1* (1.8) y *HXT16* (1.3). La consideración de estos resultados debe hacerse con mucha cautela ya que, aunque las diferencias de expresión son claras y tienen una alta significatividad, existen numerosos genes *HXT* en levadura que presentan además un elevado grado de homología y pueden dar hibridaciones cruzadas.

- Fermentación, glicólisis y gluconeogénesis. Todos los genes que aparecen en nuestro estudio implicados en glicólisis se encuentran sobreexpresados en la cepa ICV 16 y concretamente son los que codifican las proteínas fructosa bisfosfatasa aldolasa (*FBA1* (2.8)), enolasa (*ENO1* y *ENO2* (3 y 3.1)), 6-fosfofructo 2-quinasa (*PFK27* (4.9), importante regulador de esta ruta), gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa (*TDH1*, *TDH2* y *TDH3* (entre 2.3 y 2.5)) y, con niveles entre 2 y 2.5 respecto a la cepa ICV 27, fosfoglicerato mutasa (*GPM1* (2.3)), fosfoglucosa isomerasa (*PGI1* (2.3)), y la subunidad β de la fosfofructoquinasa (*PFK2*(2.1)). También aparecen las alcohol deshidrogenasas *ADH1* (2.8), *ADH2* (2.5) y, con niveles entre 2 y 2.5, *ADH6*, que codifican proteínas que forman parte del metabolismo propiamente fermentativo. *ADH6* no se muestra en la Figura C3.1 porque parece que actúa sobre moléculas de un mayor número de carbonos, aunque es interesante resaltar que este gen se encuentra fuertemente reprimido durante la fase estacionaria y en condiciones de ayuno de nitrógeno (Gasch, A.P. y col., 2000). La mayoría de los genes glicolíticos que se han citado codifican enzimas que catalizan etapas reversibles de las rutas glicolítica – gluconeogénica; sin embargo, la mayor expresión en la cepa ICV 16 de genes que codifican enzimas típicamente fermentativos y de enzimas o reguladores de etapas irreversibles de la glicólisis, permiten deducir que en el punto de la vinificación considerado la cepa ICV 16 estaría “transcriptómicamente preparada” para una importante actividad glicolítica – fermentativa. En contraposición, en la cepa ICV 27, existe una mayor expresión de genes gluconeogénicos, de manera que

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

observamos en mayor nivel los dos reguladores principales, *CAT8* (2.8) y *SIP4* (3.3) y el gen *PCK1* (2.1). El gen *PCK1* codifica la fosfoenolpiruvato carboxiquinasa, que cataliza uno de los dos pasos irreversibles de la gluconeogénesis. El otro paso es el catalizado por la fructosa-1,6-bisfosfatasa cuyo gen, *FBP1*, también se encuentra en un nivel 1.4 veces significativamente mayor en la cepa ICV 27. También aparecen valores superiores de expresión en esta cepa del regulador de la transcripción *ADR1* (3.6), cuya actividad está controlada por la ruta de la PKA (Figura I.1) y está implicado en la estimulación de gluconeogénesis frente a glicólisis mediante la inducción de genes implicados directa o indirectamente en la misma, como *ADH2* (ICV 16 (2.5)), *CTA1* (ICV 27 (4.2)) y *GUT2* (ICV 27 (3.2)). Como vemos, los resultados obtenidos para *ADH2* no concuerdan con los niveles de expresión encontrados para los otros 3 genes pero, como se comentó en la introducción, en la regulación de los genes implicados en metabolismo participan diferentes rutas y diferentes reguladores con lo que la respuesta es en muchos casos variable en función de las condiciones particulares. También aparece con mayor expresión en ICV 27 el gen *GPM3* (2.2) que codifica una de las tres fosfoglicerato mutasas, aunque parece que la única que tiene una actividad fisiológica relevante es la codificada por *GPM1*, dado que mutantes en *GPM2* y en *GPM3* no tienen ningún efecto sobre glicólisis (Rodicio, R. y col., 1987).

- Oxidación de compuestos orgánicos y respiración. Dentro de esta categoría encontramos una mayoría de genes con mayor expresión en la cepa 27 y podemos hacer una subdivisión en diferentes categorías:

- ✓Ciclo de Krebs: Con una expresión 7.5 veces mayor en la cepa ICV 27 encontramos el gen *YJL045W* que es similar a la succinato deshidrogenasa *SDH1*. Aunque con poca diferencia pero también significativa encontramos en esta cepa mayor nivel de mRNA de los genes *FUM1* (1.3), *IDH2* (1.3), *KGD1* (1.5), *ACO1* (1.6) y *SDH2* (1.7). En este caso también aparecen algunos genes con mayor expresión en la cepa ICV 16: la citrato sintasa (*CIT1* (2.5)) y la succinil-CoA ligasa (*LSC2* (2.6)). Es conveniente resaltar aquí que durante la fermentación muchos enzimas del Ciclo de Krebs muestran cierta actividad ya que algunos de sus intermediarios son precursores de reacciones biosintéticas. Además, esta actividad es la responsable de la formación de

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

citrato, malato y succinato que son exportados al exterior celular (probablemente mediante transportadores de la familia ABC, que trataremos en detalle posteriormente) y tienen una influencia sobre las características organolépticas del vino. Se sabe que durante la fermentación el ciclo no actúa como tal sino que funcionan dos ramas, una oxidativa que va desde piruvato hasta, al menos, α -cetoglutarato, y otra reductora que funciona en sentido opuesto y conduce, al menos, hasta la producción de fumarato (Camarasa, C. y col., 2003). Lo que sí parece claro es una inhibición absoluta a nivel del complejo succinato deshidrogenasa (formado por las proteínas Sdh1p, Sdh2p y Sdh4p) que está directamente relacionado con respiración ya que aporta electrones a la cadena respiratoria mitocondrial a través de la ubiquinona. Estos datos podrían estar sugiriendo una mayor actividad respiratoria en la cepa ICV 27.

- ✓ Generación y transporte de acetyl-CoA: Aparecen tres genes con expresión superior en la cepa ICV 27: el gen *ACS1* (3.1), que codifica la acetato CoA ligasa (implicada en biosíntesis de acetyl-CoA), y los genes *CRC1* (3) y *AGP2* (2.1), que participan en el transporte de acetyl-CoA desde el peroxisoma a la mitocondria. Además, en relación con estos aspectos, aparecen también más expresados en esta cepa varios genes implicados en la organización y biogénesis del peroxisoma (Tabla C3.4), como *PXA1* (2.4), que codifica el transportador de ácidos grasos al peroxisoma y *POX1* (1.9), codificante del enzima que cataliza el primero de los tres pasos de la β -oxidación encaminados a la generación de acetyl-CoA. Además la β -oxidación genera H_2O_2 que es detoxificado gracias a la catalasa (*CTA1*, (2.5)). Es interesante destacar que *Agp2p* también puede funcionar como permeasa de aminoácidos en condiciones de bajos niveles de nutrientes, lo cual permitiría clasificar también este gen dentro del grupo de transportadores de aminoácidos (Schreve, J.L. y col., 2004).
- ✓ ATP sintasa mitocondrial. También con mayor expresión en la cepa ICV 27 encontramos las proteínas codificadas por los genes *NCA3* (2.6) y *NCA2* (2.1), que regulan la correcta expresión de las subunidades *Atp6p* y *Atp8p* del componente F0 de esta ATP sintasa (Pelissier, P. y col., 1995).

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

- ✓Oxidación de NADH. Con niveles superiores en ICV 27 encontramos los dos mecanismos principales para dirigir el exceso de NADH citosólico hacia la cadena respiratoria mitocondrial, los genes *NDE2* (3.7) y *GUT2* (3.2). El primero de estos genes codifica una de las dos NADH deshidrogenasas “externas” (*Nde1/2p*), denominadas así por la orientación del sitio catalítico hacia el espacio intermembrana. El segundo mecanismo de reoxidación de NADH en *S. cerevisiae* es la lanzadera glicerol-3-fosfato deshidrogenasa, que conduce 2 electrones a la cadena respiratoria a través de la glicerol-3-fosfato deshidrogenasa mitocondrial (*Gut2p*) (Luttik, M.A.H. y col., 1998; Pahlman, A.K. y col., 2001).
- ✓Otros. Aparecen con mayor expresión en la cepa ICV 27 los genes *ISF1* (2.6), *BCS1* (2.1), *HAP1* (2) y *HAP2* (1.9) todos ellos reprimidos por catabolito de glucosa. *BCS1* codifica una carabina molecular necesaria para el ensamblaje del complejo citocromo bc1. El gen *ISF1* es un supresor del defecto de crecimiento en mutantes *hap2,3,4*, implicado en funciones mitocondriales y regulado por *HAP1*. Finalmente, *HAP1* y *HAP2* están implicados en la regulación -dependiente de hemo y del estado redox celular- de genes relacionados con respiración.
- Síntesis de glucógeno y trehalosa. Aparece el gen *PGM2* con un nivel 2.1 veces superior en la cepa ICV 16. Este gen codifica la isoforma mayoritaria de la fosfoglucomutasa que cataliza la conversión de glucosa-6-P en glucosa-1-P siendo este el primer paso necesario para la síntesis de carbohidratos de reserva. Sin embargo, el enzima cataliza la reacción en los dos sentidos de forma que sólo cuando existe un exceso de glucosa una parte se deriva hacia la síntesis de glucógeno y trehalosa. El resto de genes implicados en el metabolismo de estos carbohidratos de reserva presentan niveles inferiores a 2 aunque todos ellos muestran diferencias estadísticamente significativas y es muy curioso que todos los genes implicados en el metabolismo del glucógeno (*GSY1* (1.8), *GSY2* (1.3), *GPH1* (1.7)) muestran un nivel algo superior en la cepa ICV 16 y casi todos los genes implicados en el metabolismo de la trehalosa (*TPS1* (1.9), *TPS2* (1.5), *NTH1* (1.4), *ATH1*(1.6)) tienen niveles superiores en la cepa ICV 27; la única excepción en este sentido es el gen *NTH2* que presenta una expresión 1.4 veces mayor en la cepa ICV 16.

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

- Ruta de los fosfatos de pentosa. Aparece más expresado en la cepa ICV 16 el gen *TKL1* (3.2) que codifica el enzima transaldolasa. La función principal de esta ruta es la generación de NADPH (necesario para la biosíntesis de ácidos grasos) y de ribosa-fosfato (necesaria para la síntesis de nucleótidos).
- Otros. Aparecen con niveles entre 2 y 2.5 en la cepa ICV 16 los genes *DOG2* y *GRE3*. *DOG2* codifica un enzima con actividad 2-desoxiglucosa 6-fosfato fosfatasa, inducido bajo diversas formas de estrés (Gasch, A.P. y col., 2000) pero de función fisiológica desconocida. *GRE3* codifica una aldehído reductasa que también se induce bajo diversas condiciones de estrés (Garay-Arroyo, A. y col., 1999; Gasch, A.P. y col., 2000).

Considerando en conjunto todos los genes relacionados con el metabolismo de carbohidratos y la obtención de energía nos encontramos ante un presumible metabolismo fermentativo más activo en la cepa ICV 16 y una mayor proporción de procesos relacionados con oxidación de compuestos orgánicos y respiración en ICV 27. Para determinar qué ocurre con la expresión de algunos de estos genes en otras fases de la vinificación y confirmar los resultados obtenidos mediante matrices de DNA se llevaron a cabo reacciones de RT-PCR semicuantitativa (Figura C3.2). Se eligieron los genes *FBA1* (glicólisis) y *ADR1* (regulación de gluconeogénesis y respiración) para abarcar los dos aspectos generales relacionados con el metabolismo de carbohidratos que hemos ido comentando. Como vemos, se confirma una mayor expresión de *FBA1* en ICV 16 y de *ADR1* en ICV 27 a los seis días de vinificación. En cuanto al perfil a lo largo del proceso vemos que en ambas cepas hay elevados niveles de *FBA1* a los dos días pero que estos niveles empiezan a disminuir en ICV 27 durante la entrada en fase estacionaria (seis días), mientras que en la cepa ICV 16 los niveles permanecen altos incluso a los 10 días desde la inoculación de las células en el mosto. Considerando los resultados para *ADR1* lo que observamos es un pequeño aumento de expresión en ICV 27 a los seis días respecto a la expresión a dos días y un segundo aumento en este caso mayor a los 10 días. En ICV 16 no parece haber cambios a seis días y sólo se observa un aumento leve transcurridos diez días de vinificación. Estos datos parecen indicar que en la cepa ICV 27 en el momento de la entrada en fase estacionaria se producen cambios a nivel de expresión de genes relacionados con metabolismo que probablemente se traducen en una disminución del

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

flujo glicolítico y de fermentación frente a un aumento de procesos como gluconeogénesis y respiración. En contraposición, en la cepa ICV 16, parece haber un mantenimiento del flujo glicolítico, al menos durante los primeros diez días, si consideramos los niveles del gen *FBA1*, aunque el aumento de expresión de *ADR1* a diez días probablemente indica que el cambio metabólico en esta cepa se daría a partir de este momento.

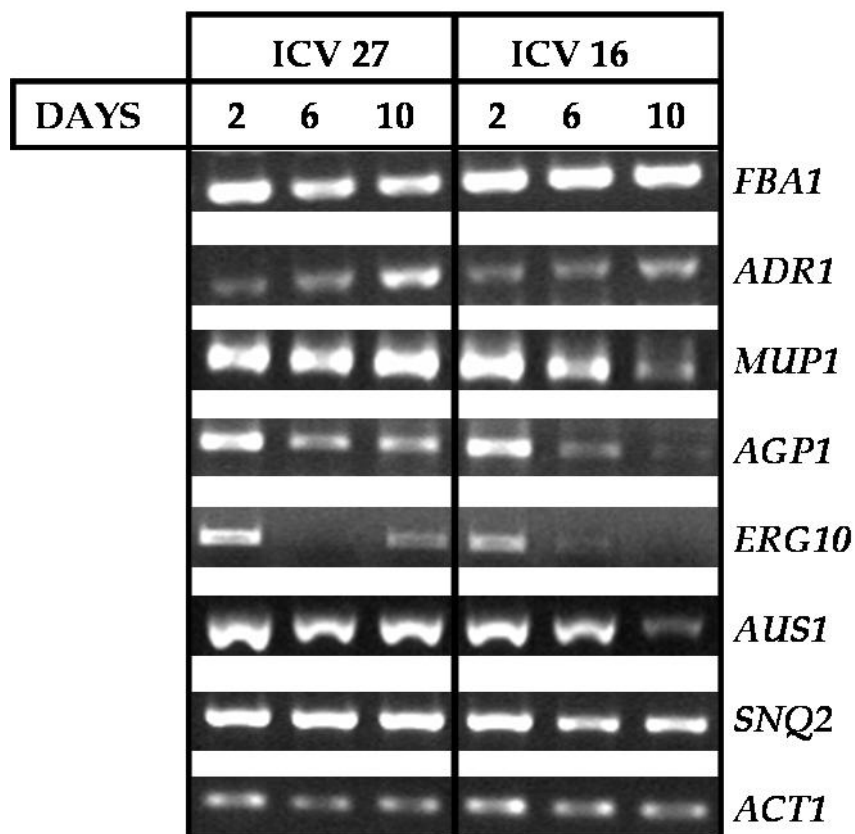


Figura C3.2. RT-PCR semicuantitativa de los genes *FBA1*, *ADR1*, *MUP1*, *ERG10*, *AUS1* y *ACT1* (control de carga) en las cepas ICV 16 e ICV 27 a los 2, 6 y 10 días de la vinificación.

2.3. Genes relacionados con transporte y metabolismo de compuestos nitrogenados.

En la cepa ICV 27 encontramos una familia estadísticamente significativa en la que aparecen genes relacionados con transporte de aminas, poliaminas y aminoácidos y además con valores muy altos de expresión relativa con respecto a ICV 16. En este grupo se incluyen:

- *AGP1* (9.8), una permeasa de aminoácidos de amplio espectro implicada en el transporte de asparragina, glutamina y la mayoría de aminoácidos sin carga.

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

- *MUP1* (4.1), permeasa de metionina de alta afinidad.
- *GNP1* (3.3), permeasa de glutamina de alta afinidad, aunque también transporta leucina, serina, treonina, cisteína, metionina, glutamina y asparragina.
- *SAM3* (3.6), permeasa de S-adenosil-metionina.
- *PTK1* (2.7), putativa proteína quinasa de serina y treonina que incrementa la captación de espermina.
- *DUR3* (2.3), transportador de urea de la membrana plasmática.
- *AVT6* (2) con actividad transportadora de aminoácidos.
- *AGP2* (2.1) que puede funcionar como permeasa de aminoácidos en condiciones de limitación de nutrientes (Schreve y col., 2004).

En la categoría de transporte de aminoácidos del Go Finder también aparecen como significativos y con mayor expresión en ICV 27, aunque con niveles bajos, los genes *UGA4* (1.4), *AVT3* (1.5), *MMP1* (1.6), *CAN1* (1.7), *GAP1* (1.9) y *BAP2* (1.9).

Dentro de esta categoría sólo encontramos dos genes con mayor expresión en ICV 16, el transportador de poliaminas *TPO2* (3.5) y el transportador de péptidos *PTR2* (3.1).

Además de los genes que codifican permeasas de aminoácidos también encontramos con mayor expresión en la cepa ICV 27 los genes *MEP1* (14.7, permeasa de amonio de relativamente alta afinidad por este compuesto), *GAT1* (3.3, regulador que controla la activación transcripcional de genes regulados por catabolito de nitrógeno), *GLT1* (3.1, que cataliza la síntesis de glutamato a partir de glutamina y α -cetoglutarato) y el gen *DUR1,2* (2.3, implicado en el metabolismo de la urea).

En relación con el metabolismo de aminoácidos en la cepa ICV 16 aparecen los genes *SFA1* (13), una formaldehído deshidrogenasa que participa en la degradación de triptófano y fenilalanina y que está relacionada con resistencia a estrés oxidativo, y *SAH1* (2), *HOM2* (1.9), *YMR226C* (2.3), *BAT1* (2) y *LEU2* (2) que están implicados en diversos aspectos de metabolismo de metionina, treonina, serina, homoserina, leucina, valina o isoleucina.

Muchos de estos genes están regulados por represión por catabolito de nitrógeno. A destacar, por ejemplo, la presencia en ICV 27 de uno de los activadores transcripcionales que participan en respuesta a una limitación de nitrógeno, el factor

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

GAT1. Acompañando a este gen en esta cepa también encontramos los genes *AGP1*, *BAP2*, *GAP1*, *GNP1*, *DUR1,2*, *DUR3* y *CAN1* todos ellos regulados por disponibilidad de fuentes nitrogenadas con participación en esta regulación de las quinasas TOR (revisado en Hohmann y Mager (2003)). En la cepa ICV 16 sólo aparece con mayor expresión un gen de los regulados por esta ruta, el codificante del transportador *PTR2*.

Es interesante comentar que experimentos llevados a cabo con estas cepas en mosto natural de las variedades Sauvignon blanc y Bobal han mostrado un comportamiento de las cepas similar al mosto sintético en el primer caso y diferente en el segundo; las vinificaciones en mosto Bobal no mostraban diferencias significativas entre las cepas ya que ICV 27 era capaz de consumir todos los azúcares presentes inicialmente (capítulo 4). Determinando la cantidad de nitrógeno asimilable contenido en estos mostos pudimos comprobar que el mosto Sauvignon blanc tenía una cantidad similar al mosto sintético MS300 pero que el mosto Bobal presentaba un contenido de fuentes nitrogenadas de casi el doble. Considerando los datos de expresión génica parece que la cepa ICV 27 esté respondiendo a una falta de nitrógeno aunque en nuestras condiciones de vinificación no existe limitación de este nutriente a lo largo de toda la vinificación. Sin embargo, la posibilidad de completar fermentaciones en mostos con un alto contenido en fuentes nitrogenadas podría sugerir que la capacidad de transporte en esta cepa esté mermada (tal vez por los efectos tóxicos del etanol, aunque no podemos descartar otras causas) de forma que sólo ante concentraciones muy elevadas es capaz de internalizar una cantidad de nitrógeno suficiente para no desencadenar una respuesta.

Dado que esta familia de genes presentaba diferencias muy significativas estadísticamente entre las dos cepas (transporte de aminos, Tabla C3.3) y que estas diferencias podrían guardar relación, como acabamos de comentar, con su comportamiento en diferentes condiciones de vinificación, decidimos comprobar la expresión de uno de sus genes por RT-PCR. Se optó por el estudio del gen *MUP1* porque presenta niveles altos de sobreexpresión en ICV 27 y porque los niveles de metionina intracelular pueden tener relación con resultados relativos a producción de aromas y/o detoxificación de compuestos que se discutirán más adelante. Como vemos (Figura C3.2), los niveles de mensajero de *MUP1* son mayores en ICV 27 y, además, se mantienen altos

durante el periodo estudiado. Sin embargo, en ICV 16, los niveles de partida (2 días de vinificación) son más bajos y además disminuyen a medida que progresa la fermentación. Estos resultados parecen confirmar la necesidad de un transporte activo de compuestos nitrogenados en la cepa ICV 27.

2.4. Metabolismo y transporte de esteroides.

Una buena parte de los genes que codifican enzimas implicados en la ruta de biosíntesis de ergosterol muestran niveles más elevados de expresión en la cepa ICV 16 (*ERG10* (2.5), *IDI1* (2.5), *ERG13* (2.3), *ERG26* (2.3), *ERG20* (2.3), *ERG9* (1.5) y *ERG4* (1.4), Figura C3.3).

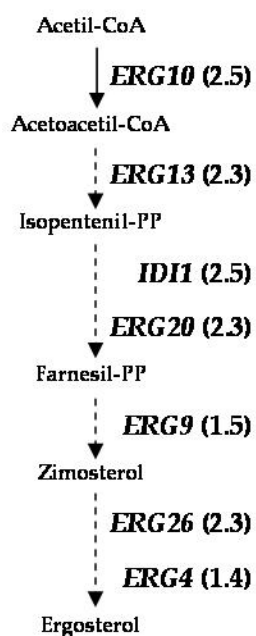


Figura C3.3. Esquema simplificado de la ruta de síntesis de ergosterol donde se indican los genes que aparecen en nuestro análisis y el nivel de sobreexpresión en la cepa ICV 16. Las flechas discontinuas indican varias etapas enzimáticas.

Como se comentó en la introducción una buena proporción de ergosterol está muy relacionada con la capacidad fermentativa, la resistencia a etanol y el transporte a través de membrana, con lo que puede ser un factor importante que explique las diferencias encontradas en nuestras dos cepas. Sin embargo, la síntesis está muy influenciada por la presencia de oxígeno de manera que, en vinificaciones con adiciones puntuales de

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

oxígeno y con disponibilidad de factores anaerobios, se ha visto que esta ruta consume aproximadamente el 30-40% del oxígeno (Rosenfeld, E. y col., 2003). Teniendo en cuenta que nuestros experimentos de vinificación se llevan a cabo en un medio sintético que contiene ergosterol y factores anaerobios y se toman muestras a lo largo del proceso, con la consiguiente aireación, los resultados obtenidos sugieren que la cepa ICV 16 podría disponer de una mayor capacidad de biosíntesis de esteroides, lo que conduciría a una mayor resistencia a condiciones de estrés, a un transporte a través de membrana menos afectado por el etanol y a una mayor actividad fermentativa.

También con mayor expresión en ICV 16 encontramos los genes *CYB5* (6.2), que codifica el citocromo b5 (una proteína de membrana del retículo endoplásmico que, junto con la NADH citocromo b5 reductasa, cataliza la reacción 14 de desmetilación de esteroides) y *ARE2* (2.2) que es uno de los dos genes de levadura que codifican proteínas con actividad esterasa de esteroides y también está regulado por oxígeno.

En contraposición, en la cepa ICV 27, aparecen varios genes relacionados con el transporte de esteroides: los genes *AUS1* (3.1), *DAN1* (2.4) y *PDR11* (2). Se ha visto que la inactivación de *AUS1* y *PDR11* provoca graves defectos de crecimiento en anaerobiosis observándose un fenotipo idéntico al causado por privación simultánea de oxígeno y esteroides en el medio de cultivo (Wilcox, L.J. y col., 2002).

Para profundizar en los resultados obtenidos en esta categoría se analizó, en primer lugar, el nivel de expresión de los genes *ERG10* (relacionado con biosíntesis de ergosterol) y *AUS1* (relacionado con transporte de ergosterol) por RT-PCR a 2, 6 y 10 días de vinificación. Como se observa en la Figura C3.2 la cepa ICV 27 tiene niveles más altos de mensajero de *ERG10* a 2 días pero éstos son inapreciables a 6 días mientras que en ICV 16 a este tiempo sí detectamos algo de expresión del gen. A los 10 días los niveles aumentan en la cepa ICV 27. En cuanto a *AUS1* observamos mayores niveles en ICV 27 a 2 días de vinificación, una disminución en la cantidad de mensajero en las dos cepas a 6 días y, a 10 días, un mantenimiento de los niveles en ICV 27 y una disminución bastante acusada en ICV 16.

En segundo lugar, dado que conservábamos muestras de células procedentes de 5 días de las mismas vinificaciones decidimos analizar el contenido en ergosterol en las

mismas. Así, obtuvimos 1.65 y 1.2 $\mu\text{g}/\text{unidad DO}_{600}$ en las muestras de dos cultivos procedentes de ICV 16 y 0.98 y 0.85 $\mu\text{g}/\text{unidad DO}_{600}$ en las muestras procedentes de ICV 27. Aunque las diferencias no son muy amplias todos estos resultados parecen indicar una capacidad de síntesis (a nivel transcriptómico) y una cantidad de ergosterol algo mayor en ICV 16 en momentos cercanos a la llegada a fase estacionaria lo que podría conferirle a esta cepa una resistencia algo mayor al etanol producido. Además, dado que los niveles de *ERG10* varían a lo largo de la vinificación sería conveniente analizar cómo varía el contenido en ergosterol durante todo el proceso en las dos cepas para intentar comprender mejor la posible relevancia de estos resultados.

2.5. Genes relacionados con presencia/ausencia de oxígeno.

Aparecen con expresión diferencial entre las dos cepas consideradas muchos genes relacionados con la disponibilidad de oxígeno por lo que es conveniente evaluar estos resultados. Hay que tener en cuenta que en estos experimentos hay una cierta aireación del cultivo en el momento de la toma de muestras. Aunque la vinificación en bodega se lleva a cabo en su mayor parte en condiciones anaerobias en algunas ocasiones puede haber una cierta inyección de oxígeno, por ejemplo durante los remontados realizados en la elaboración de vinos tintos o en las agitaciones llevadas a cabo cuando se observa un enlentecimiento del consumo de azúcares.

En nuestro estudio hemos encontrado con diferencias significativas algunos de los reguladores principales de la respuesta de las levaduras a los niveles de oxígeno: los genes *HAP1* y *HAP2* (con niveles 2 y 1.9 veces mayores respectivamente en ICV 27) y *ROX1* (con nivel 3.5 veces superior en ICV 16). Parece que estos genes están regulados por los niveles de hemo y se sabe que Hap1p, junto con el complejo Hap2/3/4/5p activa la transcripción de muchos genes llamados “aeróbicos” y de algunos “hipóxicos” y que *ROX1* actúa como represor de muchos genes “hipóxicos”, entre ellos el factor implicado en el inicio de la traducción *ANB1* (expresión 3.9 veces mayor en ICV 16) (Zitomer, S. y col., 1992; Deckert, J. y col., 1995; Kwast, K.E. y col., 1999). También aparece en nuestro análisis y con niveles 3.6 veces mayor en ICV 16 otro gen implicado en el inicio de la traducción que sólo se expresa en condiciones aerobias (*HYP2* (3.6)). Debemos destacar

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

también que la transcripción de *ROX1* está activada por *HAP1*. Aunque teniendo en cuenta los niveles de expresión de estos reguladores encontramos ciertos datos a priori contradictorios (fundamentalmente la mayor expresión de *ROX1* y *ANB1* en la misma cepa) hay que tener en cuenta que la regulación por oxígeno (al igual que ya se explicó para los nutrientes) es muy compleja y depende de diversos factores, y que la actividad de factores de transcripción muchas veces está más regulada a nivel de actividad de proteína que a nivel de transcripción.

Otro gen regulador que parece relacionado con estos aspectos es *GAT1* (3.3, ICV27) que, aunque está principalmente relacionado con la respuesta a limitación de nitrógeno (como vimos en el apartado 2.3), se ha visto que también podría regular *OLE1*, el gen codificante de la desaturasa de ácidos grasos $\Delta 9$ (Nakagawa, Y. y col., 2001). Según el modelo propuesto por estos autores, en condiciones anaerobias en ausencia de ácidos grasos insaturados, probablemente los factores Gln3p y Gat1p se unirían al elemento O2R del promotor de *OLE1* para regular un uso eficiente del oxígeno limitante. En esta inducción transcripcional estaría implicada la cadena respiratoria mitocondrial y la citocromo c oxidasa sería probablemente el sensor para el oxígeno (Kwast, K.E. y col., 1999). De acuerdo con esto encontramos en la cepa ICV 27 un nexo transcripcional entre limitación de nitrógeno, metabolismo de ácidos grasos y respiración.

Por otra parte, en la categoría Go Finder relacionada con metabolismo de especies reactivas del oxígeno (categoría de respuesta a estímulos, oxidativo, Tabla C3.4) aparecen varios genes sobreexpresados en la cepa ICV 27: *SRX1* (7.8) *CTA1* (4.2), *SNQ2* (4.1) y, con niveles inferiores a 2.5, *SOD1* (1.2), *CYR1* (1.3), *CCP1* (1.3), *SKN7* (1.5), *ALO1* (1.6), *RIM15* (1.7), *YFH1* (1.9), *GPX1* (1.9) y *YAP1* (2.1). Directamente relacionados con la respuesta a estrés oxidativo encontramos también en esta cepa el gen *OYE3* (2.7) que codifica una NADPH deshidrogenasa inducida por Yap1p en respuesta a estrés oxidativo y, con niveles más bajos, *GSH1* (2.3) implicado en la síntesis de glutatión, molécula clave en el mantenimiento del balance redox celular.

Dentro de la categoría de transporte de iones y homeostasis celular y también relacionados con la respuesta a estrés oxidativo encontramos 2 genes con mayor expresión en ICV 16: *AHP1* (2.8) y *TSA1* (2), que codifican tiorredoxina peroxidasa. Quizá tenga

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

relación con este resultado la mayor expresión en la misma cepa de *TKL1*, que forma parte de la ruta de los fosfatos de pentosas, importante para la regeneración de NADPH, utilizado por ejemplo por el sistema tiorredoxina. Debemos señalar que la función fisiológica de estas dos proteínas en condiciones de laboratorio parece relegada a fase de crecimiento exponencial mientras que Prx1p (que no muestra diferencias significativas entre cepas en nuestro estudio) parece ser la peroxidasa más inducida durante el cambio diáuxico y la fase estacionaria.

Es difícil interpretar todos estos resultados. En cualquier caso, como la toma de muestra se realizó en las mismas condiciones en las dos cepas podemos suponer que la cantidad de oxígeno disponible debe ser similar en ambas. Por este motivo, la detección en ICV 27 de mayores niveles de genes como *CTA1* y *SOD1*, directamente relacionados con la detoxificación de especies reactivas del oxígeno, sugiere que podría haber una mayor actividad respiratoria en esta cepa lo que también guardaría relación con la mayor expresión en ICV 27 de genes implicados en respiración (apartado 2.2).

2.6. Genes relacionados con el transporte de iones y la homeostasis celular.

Una categoría altamente representada en la cepa ICV 27 es la de transporte de iones sodio, donde aparecen en este análisis los genes *ENA2* (6.9), *ENA5* (6.3) y *ENA1* (6.2). Los tres codifican bombas ATPasas transportadoras de cationes hacia el exterior celular con lo que están relacionadas con la resistencia a iones Na^+ y Li^+ . En la interpretación de estos resultados debemos ser cautos ya que estos genes forman un clúster de 5 miembros con una identidad de secuencia del 98%, aunque también es cierto que todos parecen tener un nivel de transcripción bajo y constitutivo, excepto *ENA1*. Este gen se encuentra regulado por varias condiciones de estrés, entre otras por ayuno de nutrientes mediada por el regulador transcripcional Gat1p (Crespo y col., 2001) lo que refuerza el perfil transcripcional global de respuesta a limitación de nutrientes mostrado por esta cepa.

En la cepa ICV 16 encontramos varios genes relacionados con la homeostasis celular: *PMA1* (3.2), *VCX1* (2.9), *CUP9* (2.7) y los ya comentados *AHP1* y *TSA1*, implicados en el mantenimiento del equilibrio redox. Pma1p es una ATPasa transportadora de cationes, que bombea protones hacia el exterior de la célula (Carmelo, V. y col., 1996) y es la

principal reguladora del pH del citosol. Vcx1p es una proteína vacuolar que interviene en la homeostasis de calcio, a través de su papel en el intercambio H^+/Ca^{2+} (Cunningham, K.W. y col., 1996). Cup9p es una proteína de unión a DNA que regula la expresión de genes implicados en homeostasis de cobre y permite a las levaduras resistir elevadas concentraciones de este metal ya sea en presencia de fuentes de carbono fermentables o no fermentables (Knight, S.A. y col., 1994).

También en la cepa ICV 16 aparece en mayor nivel el gen *FTR1* (3.4), que forma parte del sistema de transporte de hierro de alta afinidad (Stearman, R. y col., 1996). Este gen también está regulado por el oxígeno disponible de manera que se observa una disminución de los niveles de mRNA bajo condiciones de hipoxia (Vasconcelles, M.J. y col., 2001).

2.7. Genes relacionados con la respuesta a estímulos.

Dentro de las categorías que ya hemos ido comentando hemos visto varios genes que muestran una expresión diferencial en respuesta a diferentes condiciones de estrés. Ahora nos centraremos en los genes catalogados dentro de las categorías de respuesta a estrés y de respuesta a estímulos por el Go Finder.

Sobre todo en la cepa ICV 27 aparecen más expresados muchos genes de estas categorías que se pueden subclasificar a su vez en:

- Respuesta a drogas.

- Encontramos los genes *PDR10* (8.5), *SNQ2* (4.1), *PDR5* (3), *PDR15* (2.7), *YOR1* (2.5), *SNG1* (2.5) y *PDR1* (2.1). Pdr1p y Pdr3p, son factores transcripcionales con dedos de Zn que regulan la resistencia múltiple a drogas a través del control sobre la transcripción de genes codificantes de proteínas ABC (Wilcox, L.J. y col., 2002), encargadas del bombeo de drogas hacia el exterior de la célula, como *PDR5*, *10* y *15*, *SNQ2* y *YOR1*. Además Pdr3p activa la transcripción tanto de *PDR1* como de *PDR3*. Aunque esta familia de genes se caracterizó porque confieren resistencia al tratamiento con muy diversas drogas, hay diferentes estudios que apuntan a que pueden tener además otras funciones fisiológicas como el transporte de ácidos débiles o de conjugados de glutatión con compuestos de azufre (Wolfger, H. y col., 2001). Se

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

ha visto, además, que el mutante *pdr1* muestra defectos de crecimiento en fuentes de carbono no fermentables y en algunas condiciones de estrés (Bauer, B.E. y col., 1999; Rank, G.H. y col., 1976) y muchos de ellos están regulados, entre otros, por *Msn2/4p* y/o por *Yap1p*.

- Con niveles entre 1.8 y 2.2 en ICV 16 encontramos los genes *PDR17* y *PDR16* pero estos son dos genes muy homólogos que afectan a la biosíntesis de lípidos (Van Den Hazel, H.B. y col., 1999) (categoría en cierta medida sobrerrepresentada en ICV 16) de manera que podrían conferir la resistencia a drogas a través de un efecto sobre la composición de lípidos de membrana. También aparece en esta cepa el gen *RDS1* (4.1) que está implicado en la respuesta a sustancias químicas.
- Respuesta a estrés.
 - Aquí encontramos con mayor expresión en ICV 27 los genes *RAD55* (2.5) y *RDH54* (2.9, que participan en mecanismos de reparación por recombinación homóloga), *SSA3* (3.3, que codifica una proteína de la familia Hsp70 que está implicada en la respuesta a diversos tipos de estrés), *SIP18* (3.8, que está relacionado con respuesta a desecación y a estrés osmótico) y *XBP1* (4.5, que es un regulador de la transcripción).
 - En la categoría específica de respuesta a estrés también aparecen varios genes con una expresión superior en ICV 16: *SSA4* (3.9) que forma parte también del complejo Hsp70, *UBC4* (2.8) que está relacionada con degradación de proteínas por ubiquitinación, *YHB1* (2.1), represor de ciclinas inducido en diversas condiciones de estrés, *RVS161* (2.3), regulador de procesos relacionados con citoesqueleto frente a condiciones de estrés, *MSN4* (2.4) que codifica uno de los factores transcripcionales implicados en la activación de la ruta general de respuesta a estrés y *HSP26* (2.3) que es otra proteína de respuesta a choque térmico que participa en la respuesta a muchas condiciones adversas para el crecimiento de las levaduras.
- Respuesta a temperatura. Junto con otros genes ya descritos, como *HSP26*, debemos considerar aquí por su mayor expresión en ICV 27 *SPL2* (3), que codifica una proteína relacionada con inhibición de actividades enzimáticas.

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

Tabla C3.4. Agrupación en categorías de los genes expresados diferencialmente en las cepas ICV 16 e ICV 27. Se indica entre paréntesis el nivel de expresión diferencial.

Categorías funcionales		ICV 16	ICV 27	
Metabolismo de carbohidratos	Transporte	<i>HXT3</i> (7.1), <i>HXT4</i> (2.4), <i>HXT1</i> (1.8), <i>HXT16</i> (1.3)	<i>HXT5</i> (3.4)	
	Fermentación, glicólisis y gluconeogénesis	<i>FBA1</i> (2.8), <i>ENO1</i> (3), <i>ENO2</i> (3), <i>PFK27</i> (4.9), <i>TDH1</i> (2.3), <i>TDH2</i> (2.4), <i>TDH3</i> (2.5), <i>GPM1</i> (2.3), <i>PGI1</i> (2.3), <i>PFK2</i> (2.1), <i>ADH1</i> (2.8), <i>ADH2</i> (2.5), <i>ADH6</i> (2)	<i>CAT8</i> (2.8), <i>SIP4</i> (3.3), <i>PCK1</i> (2.1), <i>GPM3</i> (2.2), <i>FBP1</i> (1.4), <i>ADR1</i> (3.6), <i>GUT2</i> (3.2)	
	Oxidación compuestos orgánicos y respiración	Ciclo de Krebs	<i>CIT1</i> (2.5), <i>LSC2</i> (2.6)	<i>YJL045W</i> (7.5), <i>FUM1</i> (1.3), <i>IDH2</i> (1.3), <i>KGD1</i> (1.5), <i>ACO1</i> (1.6), <i>SDH2</i> (1.7)
		Metab. de Acetil-CoA y β -oxidación		<i>ACS1</i> (3.1), <i>AGP2</i> (2.1), <i>POX1</i> (1.9), <i>PEX10</i> (2.6), <i>PEX29</i> (1.3), <i>PEX28</i> (1.3), <i>PEX2</i> (1.4), <i>PEX18</i> (1.5), <i>YOR084W</i> (1.5), <i>PEX22</i> (1.7), <i>PEX3</i> (1.7), <i>PEX10</i> (2.6), <i>ADR1</i> (3.6), <i>CTA1</i> (2.5), <i>CRC1</i> (3)
		ATPsintasa		<i>NCA3</i> (2.6), <i>NCA2</i> (2.1)
		Oxidación NADH		<i>NDE2</i> (3.7), <i>GUT2</i> (3.2)
		Otros		<i>ISF1</i> (2.6), <i>BCS1</i> (2.1), <i>HAP1</i> (2), <i>HAP2</i> (1.9)
	Glucógeno y trehalosa	<i>PGM2</i> (2.1), <i>GSY1</i> (1.8), <i>GSY2</i> (1.3), <i>GPH1</i> (1.7), <i>NTH2</i> (1.4)	<i>TPS1</i> (1.9), <i>TPS2</i> (1.5), <i>NTH1</i> (1.4), <i>ATH1</i> (1.6)	
	Fosfatos de pentosa	<i>TKL1</i> (3.2)		
	Otros	<i>GRE3</i> (2.1), <i>DOG2</i> (2.1)		
Nitrógeno	Transporte	<i>TPO2</i> (3.5), <i>PTR2</i> (3.1)	<i>MEP1</i> (14.7), <i>GAT1</i> (3.3), <i>AGP1</i> (9.8), <i>MUP1</i> (4.1), <i>GNP1</i> (3.3), <i>SAM3</i> (3.6), <i>PTK1</i> (2.7), <i>DUR3</i> (2.3), <i>AVT6(2)</i> , <i>AGP2</i> (2.1), <i>UGA4</i> (1.4), <i>AVT3</i> (1.5), <i>MMP1</i> (1.6), <i>CAN1</i> (1.7), <i>GAP1</i> (1.9), <i>BAP2</i> (1.9)	
	Metabolismo	<i>SFA1</i> (13), <i>SAH1</i> (2), <i>HOM2</i> (1.9), <i>YMR226C</i> (2.3), <i>BAT1</i> (2), <i>LEU2</i> (2)	<i>GAT1</i> (3.3), <i>GLT1</i> (3.1), <i>DUR1,2</i> (2.3)	
Esteroles	Transporte		<i>AUS1</i> (3.1), <i>DAN1</i> (2.4), <i>PDR11</i> (2)	
	Metabolismo	<i>CYB5</i> (6.2), <i>IDI1</i> (2.5), <i>ARE2</i> (2.2), <i>ERG10</i> (2.5), <i>ERG13</i> (2.3), <i>ERG20</i> (2.3), <i>ERG9</i> (1.5), <i>ERG4</i> (1.4), <i>ERG26</i> (2.3)		
Genes relacionados con presencia/ausencia de oxígeno		<i>ROX1</i> (3.5), <i>ANB1</i> (3.9), <i>HYP2</i> (3.6), <i>AHP1</i> (2.8), <i>TSA1</i> (2)	<i>HAP1</i> (2), <i>HAP2</i> (1.9), <i>SRX1</i> (7.8), <i>CTA1</i> (4.2), <i>SNQ2</i> (4.1), <i>SOD1</i> (1.2), <i>CYR1</i> (1.3), <i>CCP1</i> (1.3), <i>SKN7</i> (1.5), <i>ALO1</i> (1.6), <i>RIM15</i> (1.7), <i>YFH1</i> (1.9), <i>GPX1</i> (1.9), <i>YAP1</i> (2.1)	

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

Categorías funcionales		ICV 16	ICV 27
Transporte de iones y homeostasis celular		<i>FTR1</i> (3.4), <i>PMA1</i> (3.2), <i>VCX1</i> (2.9), <i>CUP9</i> (2.7), <i>AHP1</i> (2.8), <i>TSA1</i> (2)	<i>ENA2</i> (6.9), <i>ENA5</i> (6.3), <i>ENA1</i> (6.2)
Respuesta a estímulos	Drogas	<i>PDR16</i> (2.2), 17 (1.8), <i>*RDS1</i> (4.1)	<i>PDR10</i> (8.5), <i>SNQ2</i> (4.1), <i>PDR5</i> (3), <i>PDR15</i> (2.7), <i>YOR1</i> (2.5), <i>SNG1</i> (2.5), <i>PDR1</i> (2.1)
	Estrés	<i>SSA4</i> (3.9), <i>UBC4</i> (2.8), <i>YHB1</i> (2.1), <i>RVS161</i> (2.3), <i>MSN4</i> (2.4), <i>HSP26</i> (2.3)	<i>RAD55</i> (2.5), <i>RDH54</i> (2.9), <i>SSA3</i> (3.3), <i>SIP18</i> (3.8), <i>XBP1</i> (4.5)
	Temperatura		<i>SPL2</i> (3)
	Feromonas		<i>HBT1</i> (5.1), <i>CSN9</i> (3.2), <i>FUS3</i> (3.2)
	Señalización celular		<i>FUS3</i> (3.2), <i>TPK1</i> (2.7), <i>IRA2</i> (3.3)
	Oxidativo		<i>SRX1</i> (7.8), <i>CTA1</i> (4.2), <i>SNQ2</i> (4.1), <i>OYE3</i> (2.7), <i>GSH1</i> (2.3), <i>SOD1</i> (1.2), <i>CYR1</i> (1.3), <i>CCP1</i> (1.3), <i>SKN7</i> (1.5), <i>ALO1</i> (1.6), <i>RIM15</i> (1.7), <i>YFH1</i> (1.9), <i>GPX1</i> (1.9), <i>YAP1</i> (2.1)
Metabolismo y cambios en el DNA		<i>YCL074W</i> (4.8), <i>YER138C</i> (2.5), <i>YML039W</i> (2.4), <i>YFL002W-A</i> (2.4), <i>YMR050C</i> (2.2), <i>YRF1</i> (2.4-2.5)	
Meiosis, mitosis y organización y biogénesis de la pared celular		<i>PIR2</i> (2.5), <i>PIR3</i> (2.8), <i>GAS1</i> (2.7), <i>TIP1</i> (2.5), <i>MUC1</i> (6.1)	<i>ZIP2</i> (4.5), <i>RDH54</i> (2.9), <i>RAD55</i> (2.5), <i>HOP1</i> (1.9), <i>RCK2</i> (2.1), <i>SPO22</i> (2.2), <i>YBL009W</i> (2.2), <i>DST1</i> (2), <i>MCM16</i> (3.7), <i>SPC24</i> (2.9), <i>CTF19</i> (2.2), <i>CSM2</i> (2.6), <i>MPS2</i> (3.9), <i>ECM12</i> (4.1), <i>ECM5</i> (3.1), <i>ECM8</i> (2.4), <i>FMP45</i> (6.8), <i>SPS22</i> (3.3), <i>KTR7</i> (2.5), <i>SMK1</i> (2.2), <i>FLO9</i> (5.9), <i>FLO5</i> (5.1), <i>FLO1</i> (3.4), <i>NRG2</i> (2.5)
Otros	Proteolisis, autofagia y funciones vacuolares	<i>UBC4</i> (2.8), <i>YPS1</i> (3)	<i>MON1</i> (2.6), <i>ATG2</i> (1.4), <i>ATG11</i> (1.6), <i>ATG15</i> (2.7), <i>CVT17</i> (2.7)
	Biosíntesis ácidos nucleicos	<i>SRL1</i> (2.5), <i>URA10</i> (2.2), <i>NPT1</i> (2.3), <i>BNA6</i> (2.3), <i>AAH1</i> (2.4)	<i>URA2</i> (3.9)
	Procesamiento y modificación RNA	<i>REX3</i> (3.2)	<i>PTA1</i> (2.6), <i>TAD2</i> (2.8)
	Metabolismo y transporte de ácidos grasos	<i>ELO1</i> (2.5), <i>DPL1</i> (2.5), <i>YPC1</i> (2.1), <i>SAC1</i> (2.6), <i>SCS7</i> (2.3)	<i>PEX10</i> (2.6), <i>PEX29</i> (1.3), <i>PEX28</i> (1.3), <i>PEX2</i> (1.4), <i>PEX18</i> (1.5), <i>YOR084W</i> (1.5), <i>PEX22</i> (1.7), <i>PEX3</i> (1.7), <i>PEX10</i> (2.6), <i>POX1</i> (1.9), <i>ADR1</i> (3.6), <i>AGP2</i> (2.1), <i>CTA1</i> (2.5), <i>CRC1</i> (3), <i>PXA1</i> (2.4), <i>SFH5</i> (3.1)
	Modificación de proteínas		<i>SDS3</i> (3.4), <i>MNN5</i> (2.8), <i>KNS1</i> (2.5), <i>SMK1</i> (2.2), <i>RCK2</i> (2.1)
	Otros	<i>PRM7</i> (6), <i>SCM4</i> (3.2), <i>CLN3</i> (2.5)	<i>SLY41</i> (3.6)

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

- Respuesta a feromonas. *HBT1* (5.1), *CSN9* (3.2) y *FUS3* (3.2) aparecen también más expresados en ICV 27.
- Señalización celular. Ya hemos visto que en la cepa ICV 27 aparecen muchos genes reguladores de ciertos procesos y además también se encuentran en mayor nivel algunos transcritos correspondientes a proteínas que forman parte de cascadas de señalización intracelular como *FUS3* (3.2, MAP quinasa de la ruta de respuesta a feromonas), *TPK1* (2.7, subunidad catalítica de la PKA) o *IRA2* (3.3, regulador negativo de la actividad de proteínas Ras). Es muy difícil sacar conclusiones a partir de los niveles de expresión de estos genes ya que tienen sistemas de regulación muy complejos y, además, la regulación principal se lleva a cabo a nivel de proteína, por ejemplo por fosforilación en el primer caso o a través de complejos con subunidades reguladoras en el segundo.
- Respuesta a estrés oxidativo. En el apartado relacionado con la respuesta a presencia /ausencia de oxígeno ya se ha comentado que aparecen varios genes más expresados en ICV 27 relacionados con la respuesta a estrés oxidativo que participan en la detoxificación de especies reactivas del oxígeno. Además encontramos con niveles 2.1 y 1.5 veces superior a los de ICV 16 los principales reguladores de la respuesta a este tipo de estrés, los factores de transcripción Yap1p y Skn7p.

Considerando en conjunto los resultados de esta categoría parece que la cepa ICV 27 esté respondiendo a estímulos de muy diverso tipo. Dado que la composición del medio de partida es idéntico para las dos cepas lo que estos resultados podrían sugerir es un cambio metabólico en ICV 27 que obligue a la célula a poner en marcha mecanismos de detoxificación como la respuesta múltiple a drogas (que como ya comentamos también participa en procesos fisiológicos) o la eliminación de especies reactivas del oxígeno. Resultan muy llamativos los niveles de *SNQ2* (Figura C3.2) en estas cepas a 2, 6 y 10 días de vinificación. Estos resultados confirman la diferencia de niveles detectada en las micromatrices y muestran que la expresión máxima en ICV 27 ocurre a los 6 días, lo que parece indicar que el cambio metabólico podría darse en momentos cercanos a este punto.

Como vemos en la Figura los niveles de mensajero para este gen en la cepa ICV 16 a lo largo de la vinificación son prácticamente indetectables.

2.8. Genes relacionados con metabolismo y cambios en el DNA.

Nos encontramos principalmente con dos subgrupos de genes que presentan expresión diferencial entre las dos cepas:

- Transposición de elementos Ty. Aparecen sobreexpresados en la cepa ICV 16 los genes *YCL074W* (4.8), *YER138C* (2.5) y con niveles por debajo de 2.5 *YML039W* (2.4), *YFL002W-A* (2.4) y *YMR050C* (2.2). Estos genes codifican proteínas necesarias para la retrotransposición. Las levaduras vínicas, como se comentó en la introducción, son homotáticas y altamente heterocigóticas (Barre, P. y col., 1993; Codon, A.C. y col., 1995) y muestran un elevado grado de polimorfismo en la longitud de sus cromosomas (Bidenne, C. y col., 1992; Rachidi, N. y col., 1999). La capacidad de cambiar su genoma está incrementada por la existencia de ciclos mitóticos y meióticos. Además, las cepas vínicas tienen la capacidad de reorganizar sus cromosomas durante el ciclo mitótico (Longo, E. y col., 1993) y se han descrito translocaciones mediadas por elementos Ty (Rachidi, N. y col., 1999), entrecruzamiento mitótico (Aguilera, A. y col., 2000) y conversión génica (Puig, S. y col., 2000c) como mecanismos para provocar cambios adaptativos más rápidos. Estos datos podrían indicar una mayor plasticidad genotípica en ICV 16 pero, como veremos más adelante, en ICV 27 aparecen genes relacionados con meiosis que también podrían estar relacionados directa o indirectamente con cambios a nivel genómico y mecanismos adaptativos.
- Mantenimiento de telómeros telomerasa-independiente. Aparecen con niveles entre 2.4 y 2.5 en la cepa ICV 16 muchos de los genes *YRF1*. Estos genes codifican helicasas Y' necesarias para el mantenimiento de telómeros independiente de telomerasa (Yamada, M. y col., 1998). Se sabe que la presencia de estos elementos es muy variable entre cepas y, además, presentan todos ellos una elevada homología (Louis, E.J. y col., 1992) con lo que no se pueden sacar conclusiones a partir únicamente de estos datos.

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

La diferencia en los niveles de expresión de este grupo de genes parece simplemente confirmar la diferencia genotípica encontrada en cepas vínicas aisladas de diferentes orígenes.

2.9. Meiosis, mitosis y organización y biogénesis de la pared celular.

En la cepa ICV 27 aparece un grupo heterogéneo de genes que participan de una manera más o menos directa en división celular mediante meiosis o mitosis.

En relación directa con meiosis, y en algunos casos con mitosis, se observa mayor expresión en ICV 27 de:

- Genes relacionados con la formación del complejo sinaptonémico (*ZIP2* (4.5) y *HOP1* (1.9)).
- Recombinación (*RDH54* (2.9) y *RAD55* (2.5)).
- Segregación de cromosomas (*MCM16* (3.7), *SPC24* (2.9), *CTF19* (2.2) y *CSM2* (2.6))
- Otros aspectos: *MPS2* (3.9, que codifica una proteína constituyente del citoesqueleto que interviene en anafase), *RCK2* (2.1, proteína quinasa relacionada con inhibición de meiosis), *SPO22* (2.2, proteína específica de meiosis con similitud a la fosfolipasa A2), *YBL009W* (2.2) y *DST1* (2).

Tanto en la cepa ICV 16 como en la cepa ICV 27 aparecen algunos genes dentro de la categoría de organización y biogénesis de la pared celular, proceso fundamentalmente activo durante periodos de división celular. En ICV 16 hay mayor expresión de *PIR2* (2.5, codificante de la proteína de choque térmico Hsp150p), *PIR3* (2.8), *GAS1* (2.7) y *TIP1* (2.5) y en ICV27 encontramos los genes *ECM12* (4.1), *ECM5* (3.1) y *ECM8* (2.4), junto con *FMP45* (6.8), *SPS22* (3.3), *KTR7* (2.5) y *SMK1* (2.2, MAPK implicada en el ensamblaje de la pared de la espora). Con niveles inferiores a 2.5 encontramos, dentro de esta categoría, 2 genes más expresados en la cepa ICV 16 y 29 en la ICV 27.

Aparecen también genes en relación con cambios morfológicos que muestran una expresión diferencial. En la cepa ICV 27 hay una mayor expresión de los genes *FLO9* (5.9), *FLO5* (5.1) y *FLO1* (3.4). Otra de las respuestas fisiológicas de las levaduras a la limitación de nutrientes es mostrar un crecimiento pseudofilamentoso y se sabe que algunos genes *FLO* participan en este proceso. Relacionado también con crecimiento invasivo y con

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

mayor expresión en esta cepa aparece *NRG2* (2.5). Sin embargo, también está directamente relacionado con esta respuesta el gen *MUC1* (de expresión regulada por Flo8p) que aparece 6.1 veces más expresado en la cepa ICV 16. En la regulación del cambio morfológico se sabe que participa la ruta de la PKA (revisado en Hohmann y Mager (2003)) pero también hay otros factores implicados, por lo que la evaluación de este resultado es complicada. Además se ha visto que la susceptibilidad a este cambio es un carácter muy variable en las diferentes cepas (Kron, S.J., 1997; Liu, H. y col., 1996; Stanhill, A. y col., 1999).

Considerando en conjunto este grupo tan heterogéneo de genes la conclusión es similar a la obtenida en el punto 2.7; entre cepas vínicas hay una elevada plasticidad genotípica que lleva asociada diferentes mecanismos de proliferación celular, pseudofilamentación, capacidad de formar esporas...

2.9. Otros.

- Proteolisis, autofagia y funciones vacuolares: Aparecen algunos genes con mayor expresión en ICV 16 y otros en ICV 27 por lo que no podemos predecir si hay una diferencia entre las cepas en este tipo de procesos. Con niveles superiores a 2.5 encontramos, en ICV 16, *UBC4* (2.8) relacionada con degradación por ubiquitinación e *YPS1* (3) que es una proteasa vacuolar. En ICV 27 encontramos 4 genes dentro de la categoría de autofagia del Go Finder, *MON1* (2.6), *ATG2* (1.4), *ATG11* (1.6) y *ATG15* (2.7) y también encontramos *CVT17* (2.7), que codifica un enzima con actividad lipasa en la vacuola, necesario para la lisis de cuerpos de autofagia en dicho orgánulo.
- Biosíntesis de bases y ácidos nucleicos: En la cepa ICV 16, con niveles entre 2.2 y 2.5 superiores, encontramos un grupo de genes (*SRL1* (2.5), *URA10* (2.2), *NPT1* (2.3), *BNA6* (2.3) y *AAH1* (2.4)) relacionados con biosíntesis de bases, nucleósidos, nucleótidos y ácidos nucleicos. Sin embargo, en ICV 27 también encontramos un gen dentro de esta categoría, el gen *URA2* (3.9), que participa en la biosíntesis de pirimidinas, por lo que es difícil adivinar cuál de las dos cepas presenta un metabolismo más activo en este sentido.

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

- Procesamiento y modificación del RNA: Encontramos con mayor nivel de mensajero en ICV 27 *PTA1* (2.6), factor de especificidad de corte y poliadenilación y *TAD2* (2.8) que participa en modificación de tRNA. Relacionado con procesamiento de RNA en ICV 16 aparece sobreexpresado el gen *REX3* (3.2).
- Metabolismo y transporte de ácidos grasos. En ICV 27 parece haber, como se comentó en el apartado de generación y transporte de acetil-CoA, una mayor actividad de degradación de ácidos grasos ya que aparecen incrementados en esta cepa genes relacionados con organización y biogénesis del peroxisoma, genes implicados en el transporte de ácidos grasos al peroxisoma y en el transporte de acetil-CoA desde peroxisoma a mitocondria y genes que participan directamente en la β -oxidación. Además encontramos *ADR1* que codifica un activador transcripcional diana de la PKA que participa en la estimulación de la gluconeogénesis y de la degradación de ácidos grasos peroxisomal. En contraposición, en la cepa ICV 16, parece haber una mayor actividad de biosíntesis de ácidos orgánicos, proceso regulado positivamente por la PKA, ya que aparece el gen *ELO1* (2.5) que codifica la elongasa de ácidos grasos insaturados. Además aparecen en esta cepa genes relacionados con metabolismo de esfingolípidos (*DPL1* (2.5)), ceramidas (*YPC1* (2.1)), biosíntesis de fosfatidilinositol (*SAC1* (2.6)) e hidroxilación de ácidos grasos de cadena muy larga (*SCS7* (2.3)). En ICV 27 aparece el gen *SFH5* (3.1) que está relacionado con transporte de fosfatidilinositol.
- Modificación de proteínas. Aparece más expresado en ICV 27 el gen *SDS3* (3.4) que es un componente necesario para la estabilidad del complejo histona desacetilasa Rpd3-Sin3 (Lechner, T. y col., 2000). Se ha descrito que este complejo participa en la represión de genes que codifican proteínas ribosomales, rRNA y tRNA tras un tratamiento con rapamicina, un inhibidor de las quinasas TOR que mimetiza un estado de ayuno de nutrientes (Kurdistani, S.K. y col., 2002). Curiosamente aparecen 46 genes codificantes de proteínas ribosomales nucleares significativamente más expresados (aunque con poca diferencia de nivel) en ICV 16 y ninguno en ICV 27. También relacionados con modificación de proteínas encontramos el gen *MNN5* con participación en glicosilación (2.8) y los genes *KNS1* (2.5), *SMK1* y *RCK2* relacionados con fosforilación. El alcance de estos cambios de expresión no es fácil de determinar,

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

pero puede indicar modificaciones en regulación y metabolismo entre las cepas. Resulta significativo que estas modificaciones en los aminoácidos determinan alteraciones en la carga total de las proteínas y, como veremos más adelante, hemos detectado especies proteicas que presentan diferente punto isoeléctrico diferencialmente expresadas en las cepas.

- Finalmente, también nos encontramos con algunos genes con expresión superior a 3; en la cepa ICV 27 el gen *SLY41* (3.6), implicado en el transporte retículo endoplásmico-Golgi, y en la cepa ICV 16 un gen relacionado con conjugación (*PRM7* (6)) y dos con ciclo celular (*SCM4* (3.2) y *CLN3* (2.5)).

3. Expresión proteica diferencial mediante electroforesis bidimensional.

3.1. Relación de proteínas que mostraron expresión diferencial.

Dado que en definitiva son las proteínas las moléculas responsables de conducir la mayoría de procesos celulares, en este trabajo decidimos completar la información obtenida sobre expresión génica con el análisis de perfiles proteicos de estas cepas en el mismo punto de la vinificación.

En la Figura C3.4 se muestra uno de los geles analíticos obtenidos para cada cepa y se identifican con números las manchas que han resultado tener una expresión diferencial en al menos 8 de los geles realizados con cada una. Las manchas que no van acompañadas del nombre de una proteína y que se muestran en cursiva también mostraron una expresión diferencial pero no ha sido posible su identificación por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF. En la Tabla C3.5 se indican todas las manchas que muestran una expresión diferencial en ambas cepas junto con la masa molecular y el punto isoeléctrico experimental obtenido mediante el programa Melanie 3.0. En el caso de las proteínas identificadas se muestra la masa molecular y el punto isoeléctrico de la proteína madura (tras la escisión de la Met N-terminal en los casos en los que ésta se produce). Para Adk1 se muestran los valores tanto para la forma inmadura como la madura (tras la escisión de Met-Ser y la acetilación N-terminal) dado que mostrarían diferente movilidad en un gel bidimensional. En la Tabla también se indican el % de cobertura y el número de péptidos

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

coincidentes obtenidos en la huella peptídica. Las muestras que no pudieron ser identificadas a partir de estos datos fueron analizadas por espectrometría de masas MALDI-TOF/TOF y el espectro MS/MS para una de estas proteínas se muestra en la Figura C3.5. En la Tabla también se indican datos interesantes relativos a la proteína como posible localización subcelular, posibles modificaciones postraduccionales y función obtenidos a partir de la base de datos Proteome (www.incyte.com).

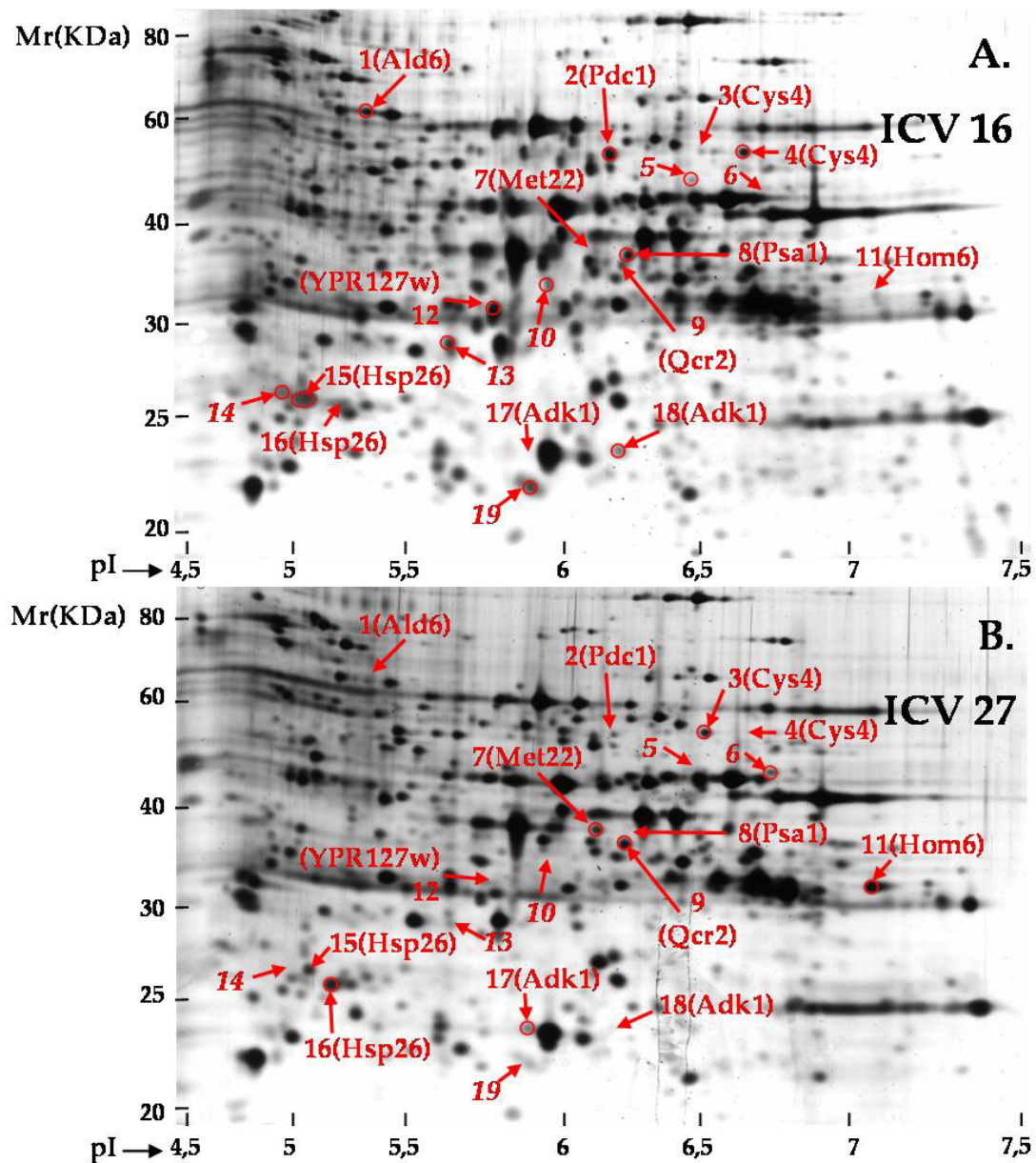


Figura C3.4. Geles bidimensionales analíticos de las cepas ICV 16 (A, arriba) e ICV 27 (B, abajo). Se indican rodeadas con un círculo las manchas que presentan un mayor nivel en cada cepa y en cursiva y sin nombre las manchas cuya identificación por MS MALDI-TOF/TOF no ha sido posible.

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

Se obtuvieron 19 manchas que mostraban una expresión diferencial en ambas cepas lo que supone aproximadamente un 4% del total de manchas presentes en los geles (aproximadamente 400). Como discutiremos más adelante algunas de estas manchas corresponden a diferentes formas proteicas de una misma proteína con lo que realmente el porcentaje de proteínas que muestra una expresión diferencial es algo menor y obtenemos una proporción similar a la de transcritos que muestran una expresión diferencial superior a 2.5 veces (Tabla C3.2, 3.1%).

Como se puede observar en la Tabla C3.5 la mayoría de las proteínas identificadas están relacionadas con respuesta a estrés, metabolismo de azufre y metabolismo de carbohidratos. A continuación analizaremos con detalle estas proteínas.

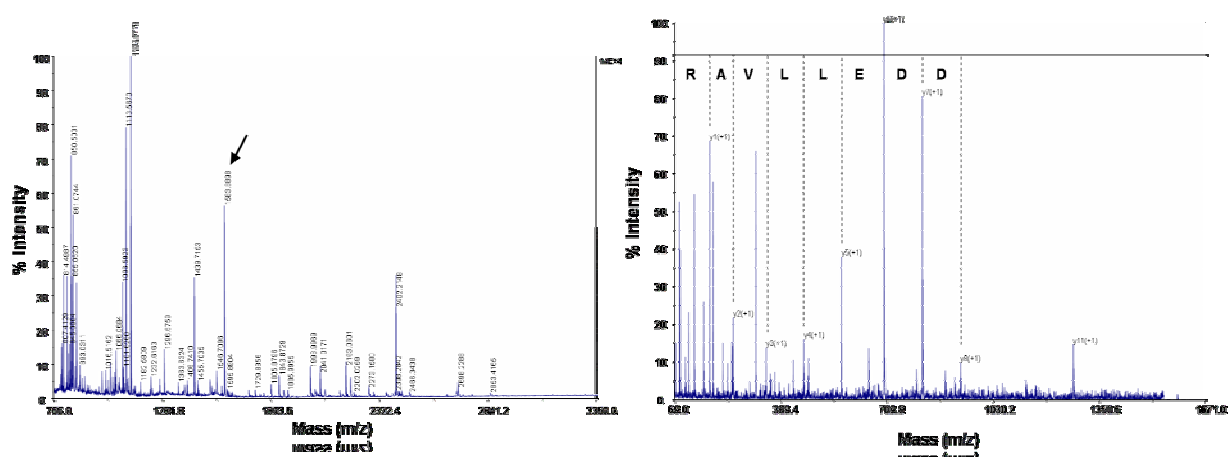


Figura C3.5. Caracterización por espectrometría de masas de una de las proteínas diferencialmente expresadas en las cepas. En la parte de la izquierda se muestra el resultado de la huella peptídica y en la de la derecha el espectro MS/MS del péptido de 1583.8898 Da. Este péptido posee la secuencia DDELLVAR, que forma parte de la proteína de *S. cerevisiae* Adk1p.

3.2. Proteínas relacionadas con respuesta a estrés.

La proteína Hsp26p es una carabina molecular de respuesta a estrés que puede ser importante por este motivo para el mantenimiento de la viabilidad durante la fermentación. Un análisis proteómico en una cepa vínica demostró además que existe un importante aumento en el nivel de esta proteína cuando se acaba la glucosa del cultivo y se produce la entrada en fase estacionaria (Trabalzini, L. y col., 2003). Asimismo, en

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

fermentaciones conducidas por cepas cerveceras, los niveles de ésta y otras proteínas se encuentran reprimidos durante la primera generación, presentando niveles más altos y mantenidos durante las siguientes (Kobi, D. y col., 2004).

En nuestros experimentos hemos encontrado dos especies proteicas para Hsp26p, la de menor punto isoeléctrico con mayor nivel en la cepa ICV 16 y la de mayor punto isoeléctrico con mayor nivel en la cepa ICV 27. Algunas modificaciones postraduccionales que pueden afectar a la actividad de las proteínas producen un cambio isoeléctrico en las mismas. Entre ellas la fosforilación reversible en residuos de serina, tirosina y treonina juega un papel crucial en la transducción de señales y representa un mecanismo de regulación de muchos procesos celulares. Hsp26p tiene 3 sitios potenciales de fosforilación según ha sido demostrado en un análisis proteómico de un extracto de proteínas totales de *S. cerevisiae* basado en enriquecimiento cromatográfico en fosfopéptidos y posterior identificación por espectrometría de masas (Ficarro, S.B. y col., 2002). Como la fosforilación disminuye el punto isoeléctrico de las proteínas nuestros resultados sugieren que en la cepa ICV 16 encontraríamos la forma con mayor grado de fosforilación sobreexpresada respecto a la cepa ICV 27. Es interesante recalcar también que considerando el conjunto de las dos especies la abundancia es mayor en la cepa ICV 16 lo que concordaría con el mayor nivel del mensajero que codifica esta proteína encontrado en esta cepa (tanto por análisis de macro como de micromatrices).

El gen YPR127w codifica una proteína no caracterizada con cierta homología (aproximadamente el 25% de residuos idénticos) con el producto de los genes YPL088W (putativa aril-alcohol deshidrogenasa) e YJR096W (similar a aldo-ceto reductasas). Se ha visto que este gen se induce por ayuno de nitrógeno y entrada en fase estacionaria (Gasch, A.P. y col., 2000). Además también presenta homología con una piridoxal reductasa de *Schizosaccharomyces pombe* lo que podría guardar alguna relación, como veremos en el siguiente apartado, con el metabolismo del azufre. Esta proteína presenta una mayor abundancia en la cepa ICV 16.

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

Tabla C3.5. Relación de manchas que muestran una expresión diferencial en las cepas ICV 16 e ICV 27 en la entrada en fase estacionaria.

¹ Id	² Proteína	³ Mr Ap / Calc	⁴ pI Ap / Calc	⁵ %cov	⁶ Nº pep. coinc.	Expresión	⁸ Loc. Subcel.	⁹ Mod. Post.	Función
1	Ald6	60 / 54	5.2 / 5.3	22	10	2x ICV 16	C, N, M, V	Ac	Aldehído deshidrogenasa citosólica.
2	Pdc1	54 / 61	6.2 / 6	⁷ MALDI-TOF-TOF	⁷ MALDI-TOF-TOF	3x ICV 16	C, N	Ac, C	Piruvato descarboxilasa.
3	Cys4	54 / 56	6.6 / 6.5	15	8	6x ICV 27	C, M		Cistationina-β-sintasa.
4	Cys4	54	6.7	23	13	ICV 16			
5	No id.	54	6.6			ICV 16			
6	No id.	47	6.8			ICV 27			
7	Met22	37 / 39	6.1 / 6	37	14	ICV 27	C, N	Ac	3'(2'),5'-bifosfato nucleotidasa.
8	Psa1	37 / 40	6.3 / 6.1	34	11	ICV 16	C	C	Manosa-1-fosfato guanililtransferasa.
9	Qcr2	36 / 39	6.2 / 6.2	26	10	3x ICV 27	M	C	Ubiquinol-citocromo c reductasa.
10	No id.	34	6.0			ICV 16			
11	Hom6	33 / 38	7.1 / 7.2	18	7	ICV 27	C, N, M	Ac	Homoserina deshidrogenasa.
12	YPR127w	32 / 38	5.8 / 5.8	44	19	ICV 16	C, N	Ac	Similar a piridoxal reductasa de <i>S. pombe</i> .
13	No id.	30	5.6			ICV 16			
14	No id.	25	5.0			ICV 16			
15	Hsp26	25 / 24	5.1 / 5.4	42	8	6x ICV 16	C, N	Ac, F(3)	Carabina molecular de respuesta a estrés.
16	Hsp26	25	5.2	42	7	2x ICV 27			
17	Adk1	23 / 24*	5.9 / 6*	55	14	ICV 16	C, M	Ac	Adenilato quinasa
18	Adk1	23 / 24**	6.2 / 6.2**	24		ICV 27			
19	No id.	21	5.9			2x ICV 16			

1.Id: Número de identificación en el gel.

2.Proteína identificada mediante huella peptídica por espectrometría de masas. No id.=Proteína no identificada.

3.Masa molecular aparente (Ap) obtenida mediante el Melanie 3.0 y calculada (calc) en base a secuencia

4.Punto isoeléctrico aparente (Ap) obtenido mediante el Melanie 3.0 y calculado (calc) en base a secuencia

5.% de cobertura obtenido en la huella peptídica

*/** Forma madura/Forma inmadura

6.Nº de péptidos coincidentes obtenidos en la huella peptídica

7.Identificación por secuenciación interna mediante MS MALDI-TOF/TOF

8.Localización subcelular. C=citoplasma, N=núcleo, V=vacuola, M=mitocondria

9.Modificaciones postraduccionales. Ac=Acetilación, C=Carbamilación,

F=Fosforilación (nº de residuos fosforilables)

3.3. Proteínas relacionadas con el metabolismo del azufre en levadura.

La biosíntesis de aminoácidos azufrados en levadura requiere la capacidad de transportar y acumular átomos de azufre del medio y después reducirlos antes de ser incorporados a diferentes metabolitos orgánicos, mayoritariamente cisteína, metionina y S-adenosilmetionina (Thomas, D. y col., 1997). Hemos encontrado al menos 3 proteínas relacionadas con esta parte del metabolismo (Figura C3.6) de las levaduras.

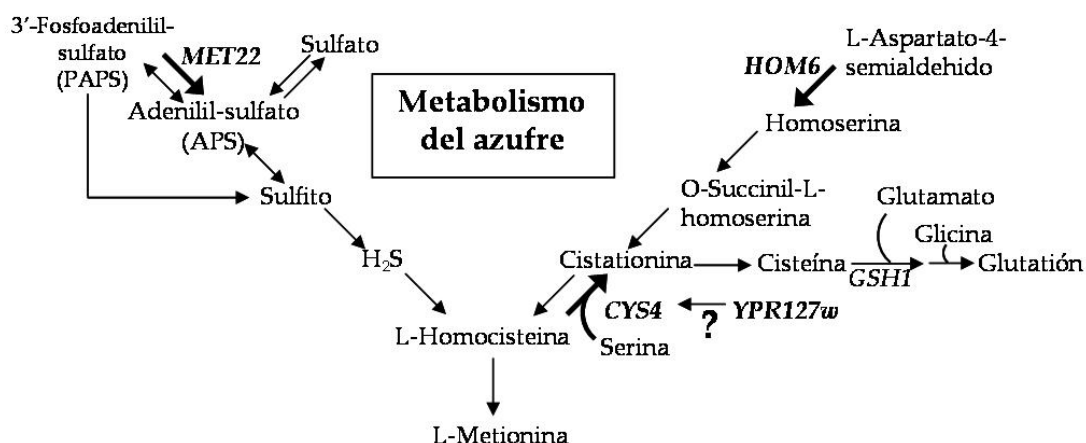


Figura C3.6. Fijación del azufre en levaduras. En negrita y con flechas engrosadas se muestran las proteínas que han resultado tener una expresión diferencial en las cepas ICV16 e ICV 27. También se muestra el gen *GSH1* porque presenta expresión diferencial a nivel transcripcional en nuestros datos de micromatrices.

La primera de estas proteínas es Cys4p, cistationina-β-sintasa, que cataliza un paso intermediario en la síntesis de cisteína, la conversión de serina y homocisteína en cistationina. La segunda es Met22p, implicada en el metabolismo de metionina, cuya actividad nucleótido fosfatasa permite el recambio de adenilil-sulfato necesario para la formación de sulfito a partir de sulfato. Finalmente, Hom6p codifica la homoserina deshidrogenasa, que participa en la biosíntesis de homoserina, precursora de homocisteína. Otra de las proteínas encontradas en este trabajo, la codificada por el gen YPR127w, podría tener alguna relación con la proteína Cys4p ya que esta proteína requiere como cofactor el fosfato de piridoxal y la primera presenta cierta homología con la piridoxal reductasa de *Schizosaccharomyces pombe*. Como vemos en la Figura C3.6 la actividad de estas proteínas parece conducir hacia la producción de cisteína y es

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

conveniente recordar que también hemos encontrado inducido a nivel transcripcional el gen *GSH1* que cataliza el primer paso de la biosíntesis de glutatión.

Para la proteína Cys4p hemos encontrado también dos especies proteicas diferenciables por el punto isoeléctrico. Una de ellas es más abundante en la cepa ICV 27 y la otra sólo es detectable en la cepa ICV 16 (Tabla C3.5 y Figura C3.7). Dado que esta proteína puede estar localizada tanto en la mitocondria como en el citosol, es posible que las dos especies detectadas tengan relación con la localización subcelular de la proteína en cada cepa. El transporte de proteínas a la mitocondria requiere de la presencia de un péptido señal enriquecido en arginina donde los aminoácidos negativamente cargados son raros. El péptido señal es cortado durante el importe a la mitocondria con lo que se produce una pequeña reducción de la masa molecular y una disminución del punto isoeléctrico hacia pHs más ácidos. Teniendo en cuenta esto cabría esperar que la totalidad de la proteína se encontrase en la mitocondria en la cepa ICV 27 y la mayor parte de la misma en el citosol en la cepa ICV 16.

Las proteínas Met22p y Hom6p detectadas en este análisis presentan mayor abundancia en ICV 27 y la proteína codificada por el gen YPR127w en ICV 16.

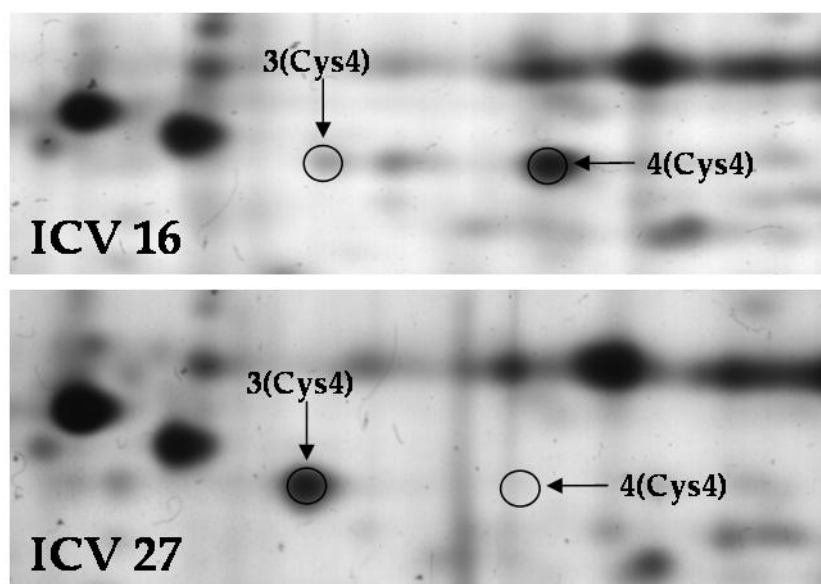


Figura C3.7. Ampliación de una parte de los geles analíticos mostrando las dos especies proteicas detectadas en este trabajo para la proteína Cys4p.

3.4. Proteínas relacionadas con el metabolismo de carbohidratos.

La proteína Ald6p es una aldehído deshidrogenasa citosólica que participa, junto con Ald4p (aldehído deshidrogenasa mitocondrial), en la oxidación del acetaldehído producido durante la fermentación alcohólica (Meaden, P.G. y col., 1997). Durante la vinificación los niveles de esta proteína se reducen unas 2.5 veces tras el agotamiento de glucosa y la entrada en fase estacionaria (Trabalzini, L. y col., 2003). El mayor nivel de proteína encontrado en la cepa ICV 16 podría explicarse por la fermentación más activa encontrada en esta cepa.

Otra proteína que muestra diferencia en los niveles de expresión es la piruvato descarboxilasa (Pdc1p) que está relacionada con la generación de Acetil-CoA en el citosol para la síntesis de lípidos y lisina. La especie proteica que aparece diferencialmente expresada es una forma minoritaria de la proteína, con una masa molecular reducida, probablemente producto de degradación vacuolar, con lo que sacar conclusiones relevantes respecto a este resultado parece difícil sin realizar estudios adicionales. Según el análisis de Trabalzini y colaboradores (2003) esta especie proteica se detecta cuando la glucosa ha sido completamente consumida.

El gen *QCR2* codifica la ubiquinol-citocromo c reductasa, componente del complejo citocromo bc1 de la cadena respiratoria mitocondrial. Esta proteína se encuentra al menos 3 veces más expresada en la cepa 27 lo que, junto con los resultados encontrados mediante matrices de DNA, podría estar indicando un metabolismo respiratorio más activo en esta cepa en el punto de la vinificación considerado.

3.5. Otras proteínas identificadas.

La proteína Adk1p o adenilato quinasa posee actividad GTP:AMP fosfotransferasa. Este enzima es el encargado del mantenimiento de los nucleótidos de adenina en equilibrio, reutilizando el AMP para la síntesis de ADP. Una pequeña fracción del enzima Adk1p (6-8%) se localiza en la mitocondria (Bandlow, W. y col., 1988) donde juega un importante papel en el metabolismo oxidativo (Schricker, R. y col., 1992), probablemente facilitando el intercambio ATP/ADP a través de la membrana mitocondrial interna

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

(Bandlow, W. y col., 1988). Se ha visto que mutantes *adk1* pierden aproximadamente un 90% de la actividad adenilato quinasa total y tienen importantes problemas de crecimiento (Konrad, M., 1988). De acuerdo con todo esto la diferencia de los niveles de proteínas en estas dos cepas podría estar relacionada con variaciones en el crecimiento o en el metabolismo respiratorio. En este trabajo se detectan dos especies proteicas, la de mayor punto isoeléctrico presente únicamente en la cepa ICV 16 y la de menor punto isoeléctrico en la ICV 27. Según los datos disponibles en la bibliografía sobre esta proteína la presencia de dos especies proteicas podría ser debida a diferente localización celular (mayor punto isoeléctrico citosol y menor punto isoeléctrico mitocondria) o a presencia/ausencia de acetilación N-terminal (menor punto isoeléctrico de la forma acetilada). El efecto de esta modificación sobre la función de las proteínas no se conoce con claridad pero gracias a estudios con mutantes en N-acetil transferasas se ha visto que puede tener consecuencias importantes en la actividad o estabilidad de algunas proteínas en condiciones particulares (Mullen, J.R. y col., 1989; Polevoda, B. y col., 1999; Tercero, J.C. y col., 1992; Tercero, J.C. y col., 1993). En lo que concierne a nuestro caso concreto estaríamos viendo la forma mitocondrial y/o N-acetilada en la cepa ICV 27 lo que nos lleva a relacionar nuevamente un posible metabolismo respiratorio más activo en esta cepa si realmente se trata de que posee una mayor proporción de la forma mitocondrial. Sin embargo, en el caso de esta proteína, no podemos descartar que las especies detectadas sean variaciones alélicas debidas a diferencias a nivel genómico, ya que cada mancha sólo se detecta en una de las cepas.

Finalmente, la proteína Psa1p (manosa-1-fosfato guanilil transferasa), implicada en glicosilación y biogénesis de la pared celular, sólo se detecta en la cepa ICV 16. La interpretación de este resultado resulta complicada dado que se trata de una proteína aislada que a priori no tiene relación con el resto de proteínas. Además el estudio transcripcional reveló proteínas relacionadas en las dos cepas con lo que resulta muy complicado extraer conclusiones. El hecho de que presente actividad en la síntesis de pared podría estar indicando una mayor capacidad de división celular en la cepa ICV 16 aunque se necesitarían más datos para reforzar esta afirmación.

DISCUSIÓN

En este capítulo hemos abordado el estudio global comparado tanto de expresión génica como de perfiles proteicos en dos cepas con ciertas diferencias en comportamiento fermentativo en un punto correspondiente a la entrada en fase estacionaria y al inicio de la divergencia entre las cepas.

En primer lugar resulta interesante comparar los resultados de expresión de genes de estrés en estas dos cepas mediante macromatrices (capítulo 2) con los obtenidos mediante micromatrices (Tabla C3.6).

Tabla C3.6. Comparación de los resultados ICV 16 / ICV 27 obtenidos por macro y micromatrices.

	Macromatrices	Micromatrices		Macromatrices	Micromatrices
<i>HSP26</i>	22	2,3	<i>CUP1</i>	5,7	NS
<i>HSP82</i>	5,3	NS	<i>TRX2</i>	1,4	1,3
<i>SSA3</i>	1,8	-3,3	<i>SPI1</i>	5,2	NS
<i>SSA4</i>	2	3,9	<i>COX6</i>	4,4	NS
<i>STI1</i>	2,4	NS	<i>YGP1</i>	11,3	NS
<i>GPD1</i>	2	NS	<i>CAR1</i>	8,8	1,5
<i>GLO1</i>	1,3	-1,4	<i>GSY2</i>	1,7	1,3
<i>HOR7</i>	3,1	NS	<i>ATH1</i>	-1,1	-1,6
<i>GRE2</i>	2,2	1,5	<i>ACT1</i>	1,4	1,8

NS= No significativo.

Como vemos encontramos incongruencias en los resultados obtenidos para *SSA3* y *GLO1*. *SSA3* y *SSA4* son dos genes muy homólogos por lo que es posible que la sonda utilizada en las macromatrices esté dando una hibridación cruzada en este caso. Sin embargo parece que no hay homólogos para *GLO1* en el genoma de *S. cerevisiae*. De todas formas para este gen las diferencias son pequeñas y en realidad hay una superposición entre el nivel obtenido para las dos cepas mediante el análisis con macromatrices si consideramos las barras de error (Figura C2.8). El resto de resultados muestran la misma tendencia mediante las dos técnicas aunque parece haber una mayor sensibilidad en la

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

diferencia de niveles que obtenemos mediante macromatrices (sobre todo para *HSP26* y *CAR1*).

En cuanto a la comparación de los resultados de expresión génica con los de expresión proteica debemos destacar que ambos proporcionan distintos niveles de información y lo interesante es que aportan datos complementarios. El hecho de que en una célula haya una mayor expresión de un gen en un momento dado suele conducir al aumento del nivel de proteína total codificada en dicho transcrito. Aunque esto suele ser así a grandes rasgos también hay que considerar otros niveles de regulación, como son la estabilidad del mRNA y su exportación desde el núcleo al citoplasma. Además de estos aspectos lo más importante a tener en cuenta en este tipo de comparaciones es que mediante el tipo de análisis realizado en este trabajo sólo se intentan identificar aquellas manchas que presentan diferente abundancia en el gel bidimensional lo que no excluye que existan diferentes formas electroforéticas de la proteína en las que no veamos diferencias. Este es el caso, por ejemplo, de la proteína Pdc1p que posee 3 formas características muy abundantes y una cuarta que es la que encontramos presente diferencialmente en este trabajo y que se trata muy probablemente de un fragmento de proteólisis poco abundante respecto al nivel de proteína Pdc1p total. Otro caso podría ser el de la proteína Hom6p. La mancha identificada aquí aparece en un nivel muy abundante en la cepa ICV 27 y hay una ausencia casi absoluta en la cepa ICV 16. Buscando esta proteína en otros trabajos donde también se realizó una electroforesis bidimensional podemos encontrar una forma de la proteína con un pI menor (Ohlmeier, S. y col., 2004) en geles bidimensionales realizados a partir de extractos mitocondriales, lo que indicaría que la proteína encontrada en nuestro estudio podría ser la forma no mitocondrial. Por este motivo no podemos asegurar que la cantidad de proteína total sea mucho mayor en la cepa ICV 27 respecto a la cepa ICV 16; sólo podemos indicar que existe una diferencia clara en una de las formas de la proteína lo que muy probablemente está indicando una abundancia diferente de formas más o menos activas o una localización subcelular adecuada para su función.

Teniendo en cuenta globalmente los resultados obtenidos tanto por genómica como por proteómica podemos sacar las siguientes conclusiones más relevantes:

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

En general parece haber una respuesta en la cepa ICV 27 similar a la que se produce cuando las células entran en fase estacionaria en condiciones de laboratorio. Así, predomina en esta cepa la expresión de genes implicados en gluconeogénesis, genes relacionados con degradación peroxisomal de ácidos grasos, genes del ciclo del Krebs relacionados con respiración, genes implicados en la regulación de la ATP sintasa y en mecanismos de donación de electrones a la cadena respiratoria y, en cuanto a expresión proteica, mayor nivel de la proteína Qcr2p. Frente a esta situación en la cepa ICV 16 se detectan niveles de expresión más elevados de prácticamente todos los genes implicados en glicólisis y fermentación alcohólica y una mayor abundancia de la proteína Ald6p. Como se comentó en la introducción todos estos procesos, especialmente los de glicólisis y gluconeogénesis, se encuentran finamente regulados para evitar ciclos fútiles y una utilización óptima de la glucosa, el sustrato preferido por las levaduras.

En condiciones de laboratorio la entrada en fase de crecimiento estacionaria también puede deberse a una limitación de nitrógeno fácilmente asimilable. En este caso la respuesta de las levaduras es una desrepresión de genes inhibidos por catabolito de nitrógeno, como los que codifican algunos transportadores de fuentes nitrogenadas y proteínas implicadas en el metabolismo de glutamina, glutamato, prolina, urea, arginina, alantoína y γ -amino butirato (revisado en Hohmann y Mager (2003)). Este tipo de respuesta también se observa en la cepa ICV 27 donde encontramos con niveles diferenciales muy elevados con respecto a ICV 16 genes que codifican permeasas y algunos genes de metabolismo inducidos por privación de nitrógeno. También se encuentra sobreexpresado uno de los genes reguladores, el que codifica el factor transcripcional Gat1p. En ICV 16 también hay niveles superiores de varios genes relacionados con metabolismo de fuentes nitrogenadas pero en este caso corresponden a algunos que se expresan bajo condiciones de disponibilidad de nitrógeno.

Una respuesta molecular semejante a la que se produce a la entrada en fase estacionaria en condiciones de laboratorio parece una explicación razonable a la ralentización del proceso fermentativo que se detecta en la cepa ICV 27 comparada con la ICV 16. Como se comentó en la introducción este freno de la capacidad fermentativa es un comportamiento habitual durante la fermentación, con lo que el problema debe ser que en

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

ICV 27 se da prematuramente o de una forma más acusada de lo normal. En la cepa ICV 16 la disminución del consumo de glucosa sucede aproximadamente a los 10 días que es el momento en que se ha alcanzado el máximo número de células viables. En ICV 27 ocurre en el punto que estamos estudiando, el de los 6 días, que es cuando cesa el crecimiento exponencial y el cultivo inicia la entrada en fase estacionaria. Analizando los datos de Rossignol (Rossignol, T. y col., 2003) vemos que el máximo de expresión de los genes relacionados con respiración, utilización de fuentes de nitrógeno alternativas (la mayoría de los genes *DAL* y algunos otros de los que se encuentran reprimidos por catabolito de nitrógeno) y síntesis de glucógeno y trehalosa se da en momentos equivalentes en cuanto a crecimiento celular a lo que pueden ser nuestros 10 días de vinificaciones conducidas por ICV 16. Estos datos parecen reforzar la hipótesis de una respuesta prematura en ICV 27. Sin embargo, los genes implicados en metabolismo de trehalosa y algunos otros reprimidos por catabolito de nitrógeno o ya han alcanzado el máximo al equivalente de 6 días o, los menos, ha empezado incluso una disminución en sus niveles, con lo que no podemos asegurar que una respuesta temprana en la expresión de estos genes sea la causa del defecto en fermentación mostrado por esta cepa. Aún así hay que tener en cuenta que en el trabajo de Rossignol y colaboradores (2003) hay un agotamiento de las fuentes nitrogenadas cosa que no ocurre en nuestro estudio y esto puede conducir a diferencias en la expresión de estos genes.

Otro resultado llamativo es el hecho de que encontremos en la cepa ICV 16 algunos genes que participan en la síntesis de ergosterol. Por el contrario, en ICV 27 encontramos una mayor expresión de genes relacionados con su transporte. La determinación de niveles de ergosterol respecto a la densidad óptica de los cultivos ha revelado pequeñas diferencias entre las cepas. Con estos datos no es posible sacar conclusiones determinantes aunque el indicio de que puedan existir diferencias en estos aspectos hace aconsejable un estudio más detallado en el que se debería tener en cuenta la influencia del oxígeno. Estos estudios son importantes porque, como se comentó en la introducción general, una correcta proporción de la relación ergosterol/fosfolípidos y la disminución del índice de saturación de ácidos grasos en membrana está relacionada con una buena capacidad fermentativa, con una mayor protección frente a los efectos tóxicos del etanol y con una

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

mayor resistencia a estrés (Chi, Z. y col., 1999; Sajbidor, J. y col., 1995). Teniendo en cuenta esto es posible que, a pesar de que tanto la glucosa como el nitrógeno se encuentren en elevada concentración en este punto de la vinificación, estén siendo transportados con muy baja eficacia al interior celular, sobre todo en la cepa ICV 27 porque está menos protegida a nivel de composición de membrana. Aunque en muchos casos está descrito que el sensor de los nutrientes que dispara la señal de limitación está en la superficie celular es posible que, o bien esté afectado él mismo por el etanol y no mande señales adecuadas al interior celular, o bien que existan mecanismos adicionales dentro de la célula que detecten la limitación a nivel intracelular.

Otro resultado destacable es el encontrado para el gen *HSP26*. En el estudio de expresión de genes de estrés del capítulo 2 ya encontramos datos interesantes en el análisis de este gen. En concreto vimos un aumento de expresión en todas las cepas a medida que avanzaba la fermentación y, comparando unas cepas con otras, se observaba que este aumento era muy elevado en una de las cepas con peores comportamientos fermentativos y significativamente más bajo respecto a la media en la cepa ICV 27. Este resultado ha sido confirmado con las micromatrices aunque mediante esta técnica hemos encontrado una diferencia de niveles menor. Además, también hemos visto diferencias a nivel de proteína: hemos detectado dos especies proteicas diferencialmente expresadas, presumiblemente una forma hiperfosforilada en ICV 16 y una forma hipofosforilada en ICV 27, habiendo una abundancia total mayor en ICV 16 considerando las dos especies. Estos resultados son consistentes con los obtenidos por otros autores durante la vinificación (Backhus, L.E. y col., 2001; Rossignol, T. y col., 2003; Trabalzini, L. y col., 2003) y también se han visto aumentos de expresión de esta proteína en fermentaciones de malta para la obtención de cerveza (Kobi, D. y col., 2004). Como ya vimos en el capítulo 1 la resistencia a estrés es importante para llevar a cabo una vinificación y, como demostramos en el capítulo 2, también existe una cierta correlación entre la expresión de algunos genes de respuesta a estrés y una correcta capacidad fermentativa en condiciones estándar. Por estos motivos este tipo de genes pueden ser posibles dianas de mejora genética de cepas vónicas.

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

Otro resultado interesante es la aparición en el análisis proteómico de, al menos, 3 proteínas relacionadas con la fijación del azufre y el metabolismo de aminoácidos azufrados. Esta rama del metabolismo de las levaduras es muy importante a nivel industrial esencialmente por tres motivos: porque tiene una influencia sobre la producción de aromas, porque es habitual la utilización de sulfito como antioxidante y estabilizante microbiológico y porque tiene una relación directa con la producción de glutatión, tripéptido esencial para la supervivencia que tiene un papel clave en la resistencia a estrés oxidativo y en la detoxificación de compuestos como el cadmio (Dormer, U.H. y col., 2000). En relación con la respuesta a cadmio se ha visto que el aumento de Gsh1p (el primer enzima implicado en la síntesis de glutatión) requiere la participación de genes reguladores del metabolismo de aminoácidos azufrados, de manera que hay un aumento en los niveles de varias proteínas relacionadas con este aspecto y, entre ellas, Cys4p y Hom6p (Fauchon, M. y col., 2002; Vido, K. y col., 2001). Además también se ha visto que existe una correlación entre las respuestas transcriptómicas y proteómicas en respuesta a este metal (Fauchon, M. y col., 2002). En nuestro caso no podemos hacer la comparación entre los análisis proteómico y transcriptómico porque, como ya hemos comentado, para Cys4p vemos dos especies proteicas, mayoritarias cada una en una cepa, y hemos visto que para Hom6p hay descritas formas con un punto isoelectrico menor a la encontrada en nuestro estudio (Ohlmeier, S. y col., 2004). Sí es interesante comentar que por el punto isoelectrico la forma de Cys4p que aparece con mayor expresión en ICV 27 parece la única forma que se muestra en el trabajo de respuesta a cadmio (Vido, K. y col., 2001). En cuanto a Hom6p en el trabajo de Fauchon (Fauchon, M. y col., 2002) sólo muestran el dato de inducción (sin indicar su localización en el gel) con lo que no podemos saber cuál es la forma que han identificado estos autores. Aunque nosotros no hemos detectado niveles diferenciales de Gsh1p, a nivel de transcripción sí hemos visto una sobreexpresión de 2.3 veces en ICV 27. Todo esto podría estar apuntando a 2 posibles respuestas en ICV 27. Por un lado una respuesta frente a estrés oxidativo que estaría reforzada además por la mayor expresión de genes relacionados con este aspecto. Una segunda posibilidad sería la detoxificación de compuestos, apoyada por el elevado nivel de proteínas ABC implicadas, entre otros

C3. EXPRESIÓN GLOBAL

aspectos, en la detoxificación de drogas, eliminación de metabolitos conjugados con glutatión,... Estas dos respuestas pueden estar interconectadas en levadura ya que se sabe, por ejemplo, que la transcripción de algunos de los genes clasificados dentro de la familia de la respuesta múltiple a drogas (por ejemplo *SNQ2* y *PDR15*) se encuentra regulada, además de por Pdr1p y Pdr3p, por los factores Yap1p (principal regulador de la respuesta a estrés oxidativo) o Msn2/4p (reguladores de la respuesta general a estrés) (revisado en Bauer y colaboradores (1999)). Asimismo, como se sugiere en el trabajo publicado por Aranda y colaboradores (Aranda, A. y col., 2004), en la detoxificación de productos del metabolismo como el acetaldehído podría haber una participación importante del azufre o de aminoácidos azufrados formando conjugados que serían eliminados de la célula a través de bombas de la membrana plasmática. Por último, y relacionado también con el metabolismo del azufre, hay que considerar que estas rutas tienen una gran relevancia en las características organolépticas del vino, tanto en aspectos beneficiosos como perjudiciales. Por una parte es indeseable una producción excesiva de SH₂ y por otra hay ciertos compuestos como la mercaptopentanona cuya producción es muy apreciada en la elaboración de tipos concretos de vino caracterizados por poseer el llamado aroma de boj (Fleet, G.H. y col., 1993a). Además, está demostrado que la producción de este tipo de aroma es dependiente de la cepa vínica con la que se lleva a cabo la fermentación (Howell, K.S. y col., 2004). Para conocer si las diferencias de expresión se traducen en una diferencia en el perfil aromático habría que determinar los niveles de compuestos de este tipo y, en caso de encontrar diferencias, los datos de expresión génica y proteica podrían tal vez incluirse como nuevo criterio de selección de cepas vínicas que potencian determinados aromas.

CAPÍTULO 4

Aplicaciones biotecnológicas.

En este capítulo se pretende estudiar el comportamiento fermentativo mostrado por las cepas ICV 16 e ICV 27 en condiciones lo más próximas posible a su utilización en bodega. Además se ensayarán diferentes condiciones para ver si hay una influencia sobre su comportamiento e intentar así profundizar en la posible relación existente entre la expresión de genes y proteínas y sus diferencias a nivel fisiológico. Se intentará comprobar además si los ensayos realizados con mosto sintético y a partir de precultivos líquidos guardan similitud con condiciones más próximas a las que se pueden encontrar en bodega, crecimiento sobre mosto natural e inoculación de levadura seca activa.

Por otra parte se ensayará una aproximación inicial para la mejora genética de estas cepas basada en generación de auxotrofia para uracilo mediante interrupción del gen *URA3* y posterior transformación con el plásmido episomal multicopia YEp352. La obtención de una cepa ICV 27 auxótrofa para uracilo resulta muy interesante ya que, como se ha ido viendo a lo largo de todo el trabajo, esta cepa comercial tiene problemas para completar la fermentación en la mayoría de condiciones estudiadas, con lo que es un modelo ideal para ensayar dianas de mejora genética de cepas vínicas en condiciones similares a las que se utilizan en bodega.

En cuanto a las dianas de manipulación genética los datos obtenidos en los capítulos anteriores sugieren algunos genes de interés. Para este trabajo se seleccionaron dos genes: *HSP26* (por los datos previos obtenidos en los capítulos 2 y 3) e *YHR087w* (interesante por otros motivos que se explicarán a continuación). Con esta estrategia se pretende analizar las posibilidades de mejora de la capacidad fermentativa y/o de la resistencia a estrés de

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

dos cepas vínicas comerciales, una que completa la fermentación (ICV 16) y otra que no lo hace (ICV 27).

HSP26 codifica una carabina molecular de respuesta a múltiples condiciones de estrés en condiciones de laboratorio. En vinificación, como ya hemos ido comentando a lo largo del trabajo, presenta un elevado grado de inducción a medida que se acerca la fase de crecimiento estacionaria y durante una buena parte de la vinificación, según ha sido demostrado tanto a nivel de transcripción como a nivel de abundancia de proteína (Backhus, L.E. y col., 2001; Puig, S. y col., 2000b; Rossignol, T. y col., 2003; Trabalzini, L. y col., 2003). Además, como vimos en el capítulo 2 (Figura C2.7) y en el capítulo 3 (Tabla C3.4), existen algunas diferencias entre los niveles de mensajero en cepas con diferente comportamiento fermentativo y estas diferencias se mantienen a nivel de cantidad de proteína (capítulo 3, Figura C3.4 y Tabla C3.5). Concretamente la cepa mejor adaptada a las condiciones de vinificación muestra la mayor expresión de esta proteína.

El gen *YHR087W* codifica una proteína de función desconocida. Se ha visto que la transcripción del gen se encuentra altamente incrementada en respuesta a estrés hiperosmótico provocado por elevadas concentraciones de glucosa (Erasmus, D.J. y col., 2003). La expresión del gen también se encuentra inducida por otras condiciones como aumento de temperatura, exposición a agentes oxidantes o entrada en fase estacionaria (Gasch, A.P. y col., 2000). Además, se ha visto que su transcripción responde a defectos de plegamiento de proteínas en el retículo endoplásmico, de forma dependiente de *IRE1* y *HAC1*, lo que sugiere que podría estar implicado en la llamada “respuesta a proteínas desplegadas” (UPR, Unfolded Protein Response) (Travers, K.J. y col., 2000). La UPR es uno de los dos mecanismos celulares que responden a la acumulación de proteínas desplegadas a nivel de retículo y presumiblemente ayudan a proteger a las células de este tipo de estrés evitando, entre otros aspectos, una acumulación de las mismas. Como detallaremos en los resultados de este capítulo, hay otros indicios que hacen también interesante el estudio de este gen.

RESULTADOS

1. Experimentos de microvinificación y sensibilidad a estrés en mostos naturales de las variedades Bobal y Sauvignon Blanc.

En los estudios llevados a cabo en capítulos anteriores se ha utilizado como medio de crecimiento para las levaduras mostos sintéticos que, por su contenido en nitrógeno total y en glucosa, son similares al mosto natural. Además, en el caso del mosto MS300 (capítulos 2 y 3), la composición intenta mimetizar más aún la composición de los mostos naturales cuidando cantidades y proporciones de aminoácidos, de amonio, de ácidos como málico y cítrico, vitaminas, sales,... y además, presencia de glucosa y fructosa como fuente de carbono. Por otro lado se han inoculado levaduras procedentes de cultivos líquidos. Como se comentó en la introducción general la estrategia mayoritaria en la actualidad es el uso de levadura seca activa rehidratada.

Por este motivo lo primero que nos planteamos fue comprobar si las diferencias de comportamiento fermentativo mostradas por las cepas ICV 16 e ICV 27 se mantenían en condiciones muy similares a las de vinificación en bodega para lo que se hicieron ensayos en mostos naturales de las variedades Bobal y Sauvignon Blanc (Figura C4.1). Para estos experimentos se utilizó la temperatura de incubación estándar que se ha empleado a lo largo de todo el trabajo, 22°C. Estos experimentos se realizaron por duplicado a partir de cultivos en fase estacionaria avanzada de dos colonias aisladas según lo descrito en materiales y métodos. Se tomaron células en este estado de crecimiento para intentar que hubiese cierta semejanza con la situación de estrés en la que se encuentran las levaduras secas activas. Analizando el consumo de azúcares (panel A) vemos que las diferencias se mantienen para el mosto de la variedad Sauvignon pero no para el de la variedad Bobal. Además, en el primer caso, las diferencias empiezan a ser aparentes en un punto equivalente al que vimos en los experimentos con mosto sintético, es decir, la ralentización del consumo de azúcares comienza en un momento inmediatamente anterior a la entrada en fase de crecimiento estacionaria. Además del seguimiento de los azúcares se realizó una medida del contenido en nitrógeno inicial de estos mostos observándose que el Sauvignon contenía aproximadamente 200 mg/L de nitrógeno

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

asimilable mientras que en el Bobal se superaban los 500 mg/L. Teniendo en cuenta estos resultados y la expresión de genes reprimidos por catabolito de nitrógeno en la cepa ICV 27 (capítulo 3), es posible que el exceso de nitrógeno presente en el mosto Bobal sea lo que permita que esta cepa presente un buen comportamiento fermentativo en estas condiciones. Para comprobar esta posibilidad se debería ensayar el consumo de azúcares mostrado por estas cepas en un mosto Sauvignon suplementado con nitrógeno hasta una concentración similar a la que presenta el mosto de la variedad Bobal.

Además del consumo de azúcares también se determinó la viabilidad y la resistencia a estrés oxidativo mostrado por estas cepas en estas condiciones (Figura C4.1, panel B). El estudio del estrés oxidativo se incluyó porque, como vimos también en el capítulo 3, una de las diferencias más significativas en cuanto a expresión diferencial en las dos cepas tenía relación con el metabolismo respiratorio y la respuesta a este tipo de estrés. Además, como vimos en el capítulo 1, la sensibilidad a estrés oxidativo constituye un factor determinante en la capacidad fermentativa de las cepas vínicas que puede ayudar a su selección. Como se observa en la Figura C4.1 panel B, la viabilidad es algo mayor en ICV 27 con lo que se confirma que los problemas que presenta esta cepa para completar la fermentación no parecen tener relación con problemas de proliferación (tampoco vimos diferencias en este sentido en los experimentos con mosto sintético). Además, resultan muy interesantes los datos obtenidos en cuanto a resistencia a estrés oxidativo. Como se detalló en la sección de Materiales y Métodos los ensayos de sensibilidad a este tipo de estrés se realizan sembrando en medio sólido un número de células suficiente para formar un césped en toda la superficie de la placa y colocando en el centro un disco de papel de filtro impregnado con H₂O₂. Tras la incubación de las placas se forma un halo de inhibición del crecimiento que es inversamente proporcional a la resistencia a estrés, grandes halos de inhibición indican baja resistencia a estrés oxidativo y viceversa. En la Figura C4.1 panel B se muestra la media de tres experimentos de estrés realizados para cada uno de los dos cultivos de cada cepa. Como vemos, en muchas de las muestras obtenidas a lo largo de la vinificación o no encontramos diferencias claras entre las cepas o hay mucha dispersión entre los dos cultivos de cada una. Sin embargo, hay un resultado muy interesante y repetido en los dos mostos: Cuando las células están

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

creciendo exponencialmente (día 1) muestran una resistencia similar a este tipo de estrés (las dos cepas presentan diámetros de inhibición de crecimiento cercanos a 3 cm), pero en el momento inmediatamente anterior a la entrada en fase de crecimiento estacionaria (día 2) la cepa ICV 16 muestra una mayor resistencia al estrés oxidativo (diámetros entre 2.5 y 2.7 cm), mientras que en ICV 27 no se observan cambios significativos respecto a otras fases de la vinificación (3-3.2 cm). Diferencias en este sentido también son apreciables a las 6 horas desde la inoculación, aunque en este caso los resultados son menos claros porque uno de los cultivos de la cepa ICV 16 en mosto Bobal no mostró diferencias con los de la cepa ICV 27. Analizando la viabilidad que muestran las cepas a las 6 horas desde la inoculación se observa que la ICV 27 en los dos mostos presenta valores cercanos al 90% respecto al tiempo 0 y la cepa ICV 16 al 65%. Una posible explicación a estos resultados está relacionada con la respuesta general a estrés que muestran las levaduras. Se sabe que cuando un cultivo es sometido a un estrés suave presenta una mayor resistencia a otras condiciones de estrés aplicadas posteriormente que un cultivo que se encuentre en unas condiciones óptimas de crecimiento (Martínez-Pastor, M.T. y col., 1996). Teniendo en cuenta esto parece que la cepa ICV 27 no esté mostrando una respuesta típica a estrés general ni en el inicio de la vinificación ni en momentos cercanos a la entrada en fase de crecimiento estacionaria con lo que muestra una sensibilidad a estrés mayor que la que se observa en la cepa ICV 16, claramente más resistente en estas dos fases respecto al resto de la vinificación. Además es muy curioso que en el mosto Bobal la cepa ICV 27 sí muestra una mayor resistencia cuando los cultivos ya han alcanzado la fase estacionaria (día 3) y es precisamente en este mosto donde esta cepa presenta el mejor comportamiento fermentativo. Sin embargo, en el mosto Sauvignon, aunque la sensibilidad a estrés es algo menor en este punto no llega a ser tan aparente como en el mosto Bobal y en ningún caso parecida a la mostrada por la cepa ICV 16 en el punto anterior. Aunque es conveniente repetir estos experimentos porque sólo se han realizado por duplicado y en un mismo momento estos indicios apoyan los resultados que se han ido discutiendo a lo largo de la tesis y que indican que una correcta respuesta a estrés está directamente relacionada con la capacidad de completar la vinificación.

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

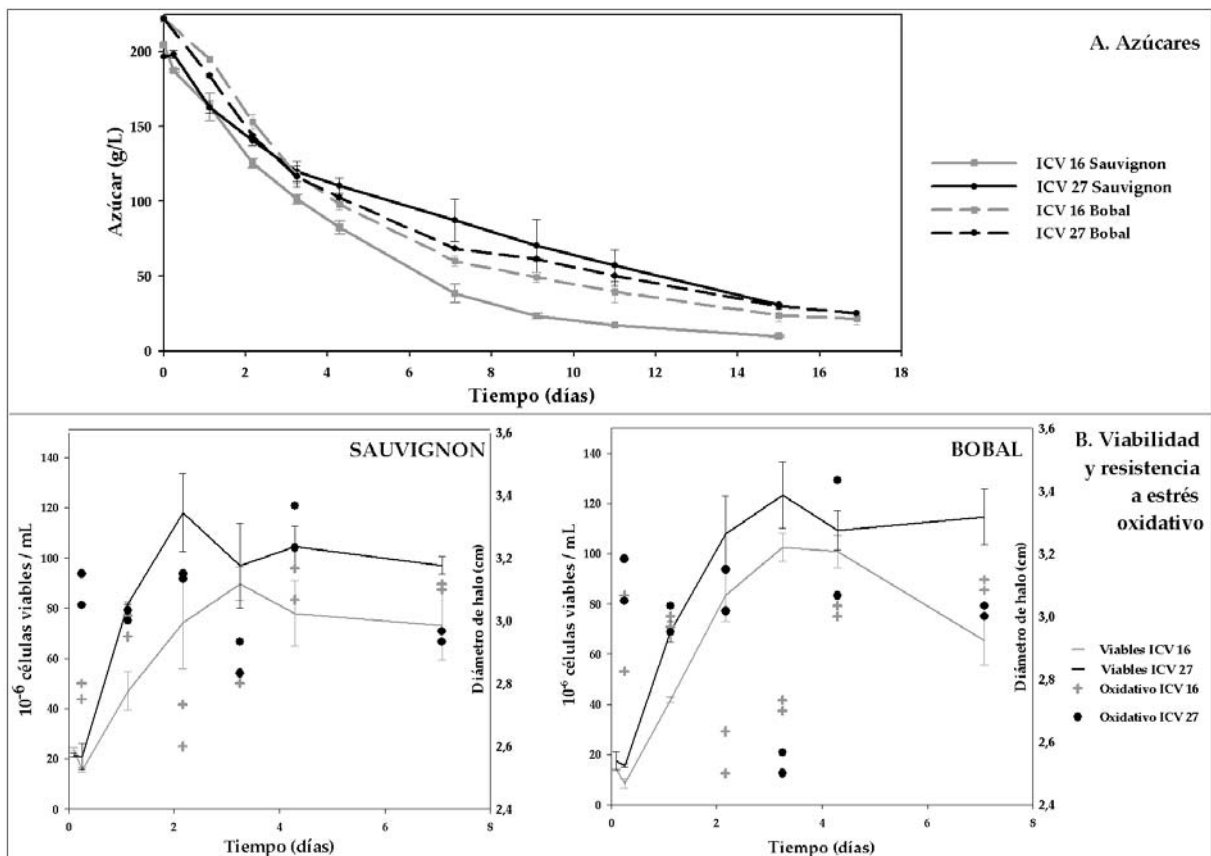


Figura C4.1. Consumo de azúcares (panel A), viabilidad y resistencia a estrés oxidativo (panel B) en microvinificaciones llevadas a cabo por las cepas ICV 16 e ICV 27 en mostos naturales de las variedades Bobal y Sauvignon Blanc. Las condiciones de inoculación y la determinación de la sensibilidad a estrés oxidativo se llevaron a cabo según lo detallado en el texto y en la sección de Materiales y Métodos.

A partir de estos resultados se pasó al estudio del comportamiento en vinificaciones sobre mosto Sauvignon (donde se conservan las diferencias entre las cepas) con levadura seca activa y en las condiciones de rehidratación detalladas por las casas comerciales tal y como se describe en la sección de Materiales y Métodos. Revisando las indicaciones proporcionadas por estas empresas respecto a las condiciones óptimas para la vinificación con estas levaduras vimos que ambas estaban recomendadas para la elaboración de tintos jóvenes lo que guarda relación con los resultados ya detallados donde veíamos que la cepa ICV 27 sí era capaz de completar la fermentación en mostos de este tipo. Dado que las vinificaciones para tinto se suelen realizar a temperaturas más elevadas para una mayor extracción de color y de compuestos como los taninos (Pretorius, I.S., 2000) se

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

decidió investigar también si existe un efecto de la temperatura sobre la capacidad fermentativa de las cepas en mosto de la variedad Sauvignon (Figura C4.2).

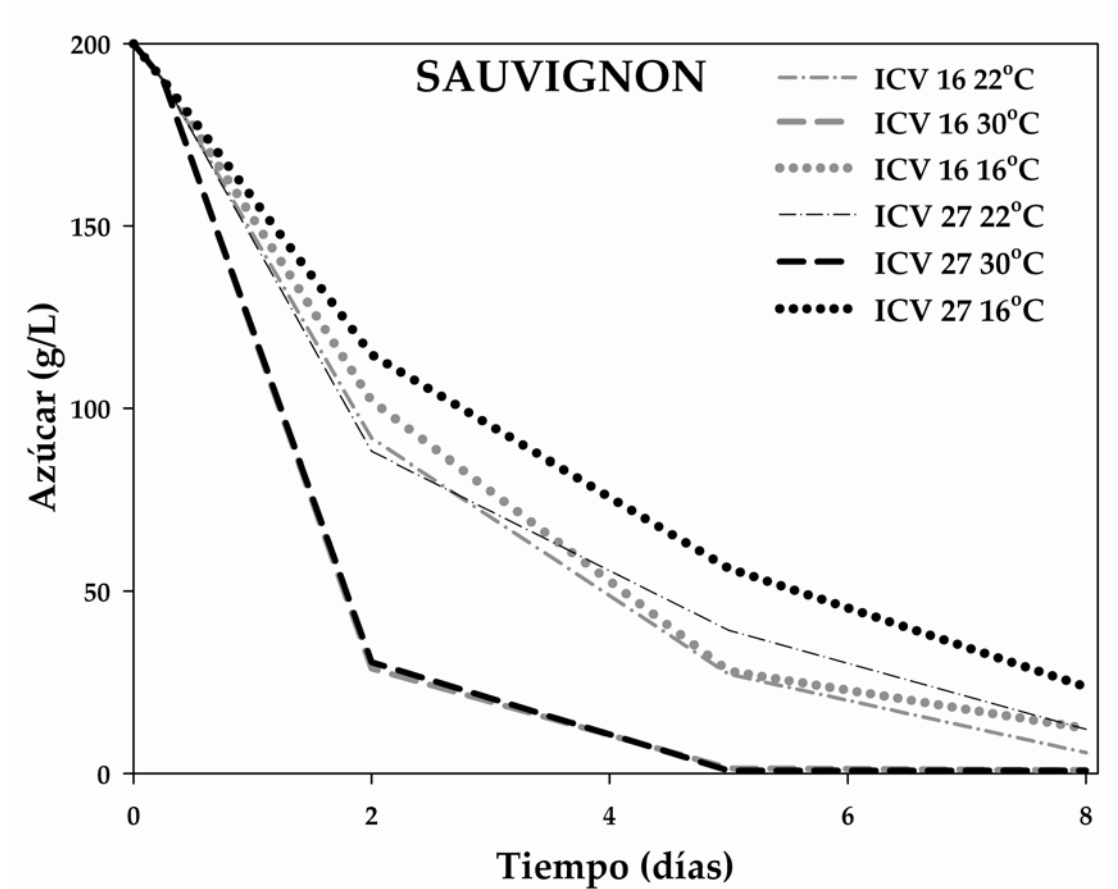


Figura C4.2. Microvinificaciones con levadura seca activa en mosto de la variedad Sauvignon. Influencia de la temperatura de incubación (16, 22 y 30°C).

En cuanto a las temperaturas seleccionadas para realizar estos análisis finalmente se optó por ensayar 16°C (temperatura habitual de vinificación de blancos), 22°C (temperatura estándar utilizada a lo largo de todo el trabajo) y 30°C (temperatura máxima permitida en la elaboración de tintos de Torre Oria (Martínez, S., comunicación personal).

Como vemos (Figura C4.2), a 16 y 22°C se mantiene la diferencia en el comportamiento mostrado por ICV 16 e ICV 27, aunque no a 30°C, donde las 2 cepas fueron capaces de completar la vinificación en un tiempo similar e inferior al requerido a las otras temperaturas. Además, parece que las diferencias en el consumo de azúcares se amplían a medida que disminuye la temperatura. Dado que la temperatura de incubación tiene efectos sobre la composición lipídica de la membrana (Arthur, H. y col., 1976) y,

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

presumiblemente entonces, sobre su permeabilidad, estos resultados podrían apoyar la hipótesis discutida en el capítulo 3 de que las dificultades mostradas por la cepa ICV 27 para completar la fermentación pueden ser debidas a los efectos del etanol sobre la permeabilidad de membrana.

Considerando en conjunto los resultados obtenidos en este apartado podemos concluir que las aproximaciones empleadas en los 3 primeros capítulos de esta tesis son adecuadas, ya que el comportamiento mostrado por las cepas no dista mucho del encontrado en algunas condiciones similares a las que se pueden producir en bodega. Además, las diferencias encontradas en cuanto al patrón fermentativo en función de la temperatura de incubación y la diferente sensibilidad a estrés en dos momentos muy importantes de la vinificación (tiempo inicial, donde tienen que superar el estrés osmótico, y entrada en fase estacionaria) son más indicios que apuntan hacia la resistencia a estrés para la mejora genética de cepas vínicas.

2. Estudios previos sobre la relevancia de los genes *YHR087W* y *HSP26* en la respuesta a estrés y la vinificación.

Dentro de las líneas de trabajo del laboratorio hay un interés por el estudio del estrés osmótico que se produce al inicio de la vinificación, por lo que se investigó la expresión génica global mediante micromatrices de DNA de un cultivo con glucosa al 2% (p/v) frente a un cultivo con glucosa al 20% (p/v). Para ello se creció la cepa de laboratorio W303-1A en YPD durante una noche, se recogieron las células y se inocularon a una concentración de $5 \cdot 10^6$ células/mL en un medio YP-glucosa 20% (p/v) o en otro YP-glucosa 2% (p/v). Tras una incubación de una hora se recogieron las células contenidas en ambos cultivos, se realizó la extracción del RNA y se mandaron las muestras al servicio de chips del Fred Hutchinson Cancer Research Center de Seattle para ser procesadas e hibridadas. Se realizó un marcaje Cy3-2% / Cy5-20% y el inverso, obteniendo una media de inducción del gen *YHR087W* en estas condiciones de 117 veces en el cultivo con un 20% (p/v) de glucosa respecto al del 2% (p/v) (Del Olmo, M., datos no publicados). Estos resultados son similares a los encontrados en otros estudios globales de expresión génica en presencia de

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

elevadas concentraciones de glucosa (26 veces en el trabajo de Erasmus y colaboradores (2003) y 5.5 veces en el trabajo de Kaeberlein y colaboradores (2002)).

Seguidamente se pidieron a Euroscarf las cepas mutante en *YHR087W* y parental (*BY4742*) y se realizó un seguimiento del crecimiento en un medio YPD con un 20% de glucosa (Figura C4.3). Estos experimentos se realizaron por triplicado. Como vemos, ambas cepas son incapaces de completar la fermentación, hecho observado para la mayoría de cepas de laboratorio. En cuanto al consumo de azúcares no parece haber una diferencia significativa entre las dos cepas, pero la mutante sí parece tener una viabilidad menor a los dos y tres días de la vinificación. También se determinó la viabilidad de estas dos cepas tras una hora de haberlas inoculado en el mosto mostrando un valor medio del 85% en la cepa silvestre y del 74% en la mutante.

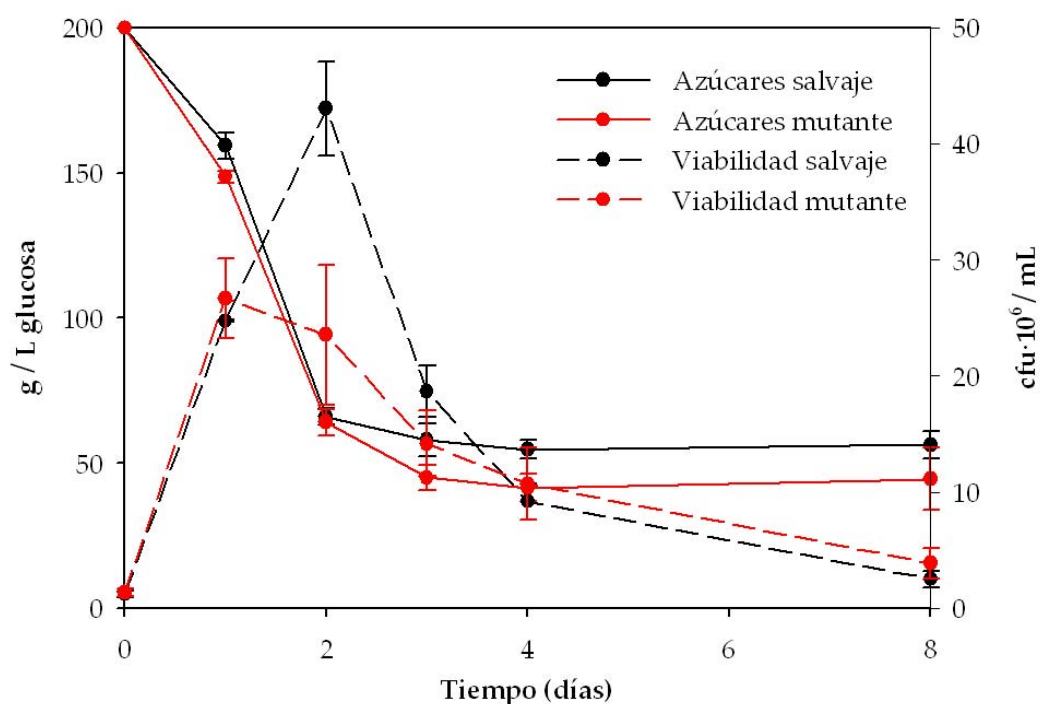


Figura C4.3. Evolución del consumo de azúcares y del número de células viables en el mutante para el gen *YHR087W* y en la cepa parental de la que deriva.

Considerando estos datos no parece haber un efecto muy acusado de la interrupción del gen en las condiciones estudiadas, por lo que pasamos a confirmar su expresión por RT-PCR cuantitativa tanto en W303-1A (empleada en el estudio global de la transcripción)

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

como en la cepa BY4742 y en las cepas vínicas utilizadas para el análisis de expresión de genes de estrés durante la vinificación del capítulo 2 (Tabla C4.1). Para el análisis en las cepas de laboratorio se emplearon las mismas condiciones que en las muestras analizadas mediante micromatrices y para las cepas vínicas se utilizaron condiciones de vinificación, concretamente se comparó la expresión a 1 hora desde la inoculación en el mosto MS300 con la expresión a las 6 horas puesto que a este tiempo ya vimos una disminución del nivel de expresión de genes de respuesta a estrés osmótico para la mayoría de las cepas (Figura C2.8).

Tabla C4.1. Expresión del gen *YHR087W* y viabilidad frente a diferentes condiciones de estrés osmótico.

Cepa	Inducción <i>YHR087W</i> ¹		Viabilidad KCl 0,7M ²		Viabilidad KCl 1M ³	
	Media	SD	Media	SD	Media	SD
ICV 16	236	16	100	n.d.	40	4
ICV 48	211	27	100	n.d.	40	3
ICV 27	16	31	79	2	13	3
IFI 278	273	7	100	n.d.	24	4
IFI 367	15	6	10	4	4	0,2
IFI 391	4	33	47	8	10	1
W303	140	17	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.
BY4742	11	14	n.d.	n.d.	n.d.	n.d.

¹Inducción del gen *YHR087W* una hora después de la inoculación en MS300 frente a 6 horas tras la inoculación (cepas ICV e IFI) o inducción tras una hora de incubación en YP-glucosa 20% (p/v) frente a YP-glucosa 2% (p/v) (cepas W303 y BY4742).

²Porcentaje de células viables tras 2 horas de incubación en YPD suplementado con KCl 0.7M.

³Porcentaje de células viables tras 1 hora de incubación en YPD suplementado con KCl 1M.

n.d. No determinado.

Como vemos, en prácticamente todas las cepas hay una inducción del gen a la hora de haber expuesto a las células al estrés osmótico. La única excepción - considerando la elevada desviación estándar - podría ser la cepa IFI 391, lo que guardaría relación con el nivel de expresión en esta cepa de otros genes de respuesta a estrés osmótico (Figura C2.8), donde recordemos que veíamos niveles iguales o superiores a 6 horas respecto a 1 hora. Considerando todas las cepas, parece haber dos grupos claramente diferenciables en

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

cuanto al grado de inducción, uno formado por ICV 27, IFI 367, BY4742 e IFI 391 (en los casos en que muestra aumento de expresión) en las que vemos unos niveles de sobreexpresión de unas 10-15 veces aproximadamente y otro formado por ICV 16, ICV 48, IFI 278 y W303 donde la inducción supera los dos órdenes de magnitud. Además, recordando la resistencia a estrés osmótico de las cepas IFI e ICV estudiada en el capítulo 1 (Tablas C1.1 y C4.1) vemos que existe una correlación entre el nivel de sobreexpresión del gen *YHR087W* y la viabilidad en las dos condiciones estudiadas: las cepas vínicas con los niveles más altos son más resistentes al estrés causado por el cloruro potásico.

Todos estos indicios parecen indicar una influencia del gen *YHR087w*, al menos, sobre la resistencia a estrés osmótico de diferentes cepas vínicas. Por este motivo pensamos que es un buen candidato para la manipulación genética de cepas con el objetivo de mejorar el proceso de vinificación.

Por otro lado, los resultados obtenidos para diferentes Hsps a lo largo de todo el trabajo, también hace interesante el estudio de este tipo de proteínas. Por una parte, hemos visto su posible implicación en la respuesta a estrés por frío, que, como ya hemos comentado en varias ocasiones, puede ser importante teniendo en cuenta las actuales tendencias del proceso de vinificación en bodega. Por otra parte hemos encontrado diferencias de expresión en cepas con diferente comportamiento fermentativo. En este sentido la Hsp más interesante a nuestro parecer es *HSP26* ya que muestra diferencias en los niveles tanto de transcripción como de abundancia de proteína. Además, el aumento de expresión durante la entrada en fase estacionaria en condiciones de vinificación, ha sido vista tanto a nivel génico como proteico por otros autores (Puig, S. y col., 2000b; Rossignol, T. y col., 2003; Trabalzini, L. y col., 2003). También es interesante mencionar que el aumento en la cantidad de proteína es significativa en otras condiciones de fermentación diferentes a la vínica, concretamente durante la producción de cerveza (Kobi, D. y col., 2004).

Finalmente es interesante comentar que experimentos previos realizados con la cepa vínica T₇₃ sobreexpresando estas proteínas han mostrado cierta mejora de la resistencia a estrés (Orozco, H., Jiménez, E., y Del Olmo, M., datos no publicados). Concretamente se ha visto un porcentaje de supervivencia algo mayor frente a un choque osmótico por un

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

25% (p/v) de glucosa en las cepas transformadas con los dos genes respecto a la cepa transformada con el plásmido vacío. Este incremento en la viabilidad de los cultivos también se ha visto tras la exposición a un 10% (v/v) de etanol aunque en este caso la mejora sólo es significativa en la cepa sobreexpresante de *HSP26*.

3. Selección de cepas y estrategia de manipulación.

En base a todo lo expuesto en el apartado 2 se planteó la sobreexpresión de *YHR087w* y *HSP26* en las dos cepas vínicas más estudiadas a lo largo de todo el trabajo, la cepa ICV 16 (cepa modelo de buen comportamiento fermentativo) y la cepa ICV 27 (cepa incapaz de completar la fermentación en la mayoría de condiciones estudiadas). Ambas son cepas vínicas comerciales por lo que, como se detalló en la introducción, no poseen ningún requerimiento nutricional que pueda ser utilizado para la selección de transformantes. Por este motivo el primer paso fue la eliminación de todas las copias del gen *URA3* según la estrategia que se detalló en el apartado 2.3 de la sección de Materiales y Métodos. En la figura C4.4 se muestra el seguimiento de la interrupción de copias mediante la amplificación de secuencias flanqueantes a *URA3*. Como vemos, en la primera carrera aparece una banda única que corresponde al gen *URA3* intacto y en la última una única banda también pero de menor tamaño que se corresponde con el gen interrumpido. En la Figura C4.5 se indica la capacidad de crecimiento de las cepas sucesivamente obtenidas en medio sólido con antibióticos. En la cepa ICV 16 se consiguieron transformantes con integración en locus diferentes tras dos rondas de transformación. En la tercera ronda no pudimos saber si la integración se produjo en algún locus ya interrumpido o en algún locus intacto ya que los transformantes resultantes todavía no presentaban auxotrofia para uracilo y obteníamos 3 bandas como resultado de la amplificación. Para solucionar este problema se diseñaron nuevos oligos (IURA3B, IURA5B, Tabla M2 de Materiales y Métodos) con una secuencia interna respecto a la utilizada en las primeras rondas de transformación de manera que sólo fuese posible la recombinación en locus intactos. Con esta nueva construcción se consiguieron transformantes auxótrofos para uracilo en la primera ronda de transformación. Para ICV 27 la tercera ronda de integración se hizo ya con la construcción B de manera que

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

garantizábamos la interrupción de 3 copias diferentes hasta ese momento. En la cuarta ronda (realizada también con la construcción B) se consiguió un transformante auxótrofo para uracilo con lo que podemos afirmar que en esta cepa hay 4 copias diferentes del gen *URA3*.

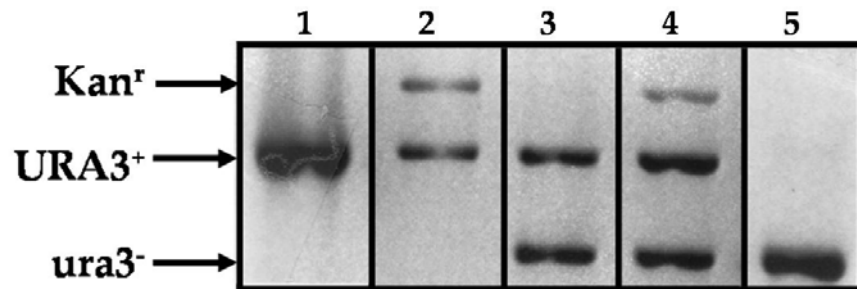


Figura C4.4. Seguimiento por PCR de la interrupción de copias del gen *URA3*. El esquema del proceso se detalló en el apartado de Materiales y Métodos. La banda de mayor tamaño (**Kan^r**) se corresponde con la recombinación en el locus *URA3* del módulo de integración que contiene la resistencia a geneticina. La banda intermedia (**URA3⁺**) corresponde al locus intacto y la banda más pequeña (**ura3⁻**) al locus interrumpido tras la rescambinación de las secuencias loxP. 1= cepa original, 2= integración del módulo de interrupción en la primera copia de *URA3*, 3= salto del módulo, 4= sucesivas rondas de integración, 5= interrupción de todas las copias de *URA3*.

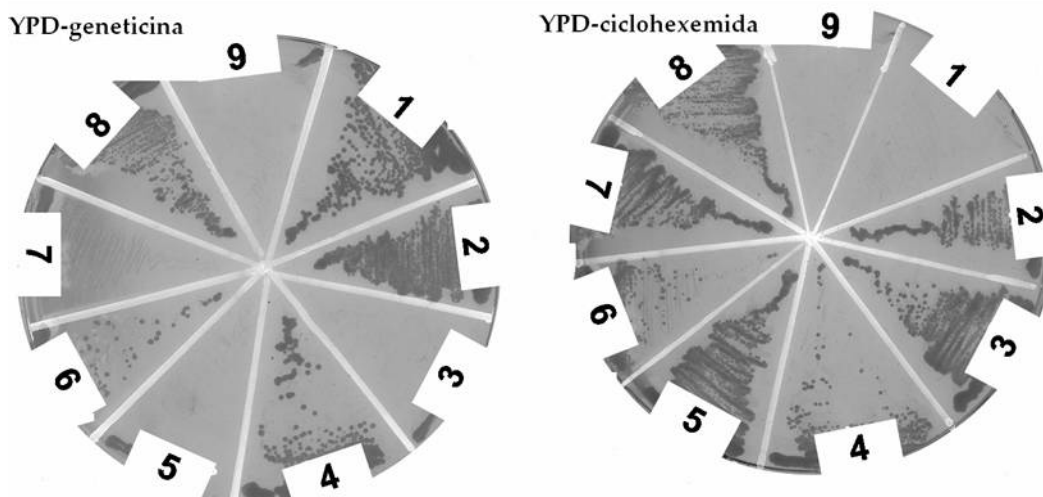


Figura C4.5. Seguimiento mediante crecimiento en medio selectivo con antibióticos de la interrupción de copias de *URA3*. El proceso comienza en 1 con la integración del módulo que contiene la resistencia a geneticina en la primera copia de *URA3*. El siguiente paso (2) es la transformación con el plásmido que contiene la recombinasa y que confiere resistencia a cicloheximida. Seguidamente hay varias rondas de salto del módulo (pérdida de resistencia a geneticina) y nueva integración hasta conseguir un transformante auxótrofo para uracilo que no muestra resistencia a ningún antibiótico (9).

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

Una vez construidas las cepas *ura^r* y eliminadas todas las secuencias *kan^r* mediante recombinación de secuencias *loxP* se procedió a la eliminación del plásmido YEp351-cre-cyh. Para ello se crecieron cultivos líquidos en medio no selectivo (YPD sin cicloheximida) y se seleccionaron colonias sensibles al antibiótico según lo detallado en Materiales y Métodos. Una vez obtenidos los transformantes *ura⁻*, *cyh⁻*, *kan^s* se procedió a la transformación con los plásmidos YEp352, YEp352-HSP26 y YEp352-YHR087w.

A pesar de que el proceso de interrupción se empezó en las dos cepas simultáneamente, en la cepa ICV 16 se consiguió avanzar mucho más rápido debido a algunos problemas de crecimiento de la cepa ICV 27 en los medios líquidos con antibiótico. Por ese motivo sólo se pudieron llevar a cabo experimentos adicionales en la cepa ICV 16. El primer paso fue comprobar que se había conseguido una sobreexpresión de los genes en las cepas transformantes. Dado que tanto *HSP26* como *YHR087w* se inducen en fase de crecimiento estacionaria se probó esta condición para el ensayo. Así, se crecieron precultivos en SC-ura de colonias aisladas y se recogió muestra para la determinación de los niveles de mensajero después de 1 día de incubación a 30°C. Como referencia se tomó parte del cultivo crecido durante 1 día, se refrescó en medio nuevo y se dejó crecer hasta 1.5-2 generaciones con lo que las células están creciendo exponencialmente y no deben mostrar respuesta a estrés. El resultado de la determinación de niveles de mensajero mediante RT-PCR se muestra en la Figura C4.6. Como se puede observar los niveles de ACT1, aunque la cantidad de RNA total fue comprobada mediante A₂₆₀ y comprobación en gel, fueron muy bajos en la condición de fase estacionaria. Aún así se observa claramente que la cepa transformada con YEp-HSP26 muestra niveles de expresión mucho más elevados que la cepa con el plásmido vacío, incluso en condiciones de crecimiento exponencial. En el caso de YEp-YHR087w también encontramos efecto de la sobreexpresión, si bien éste es menos marcado y se detecta mejor, curiosamente, en las condiciones control. Tal vez en otras condiciones de estrés (por ejemplo elevadas concentraciones de glucosa) se pueden obtener datos de inducción más significativos.

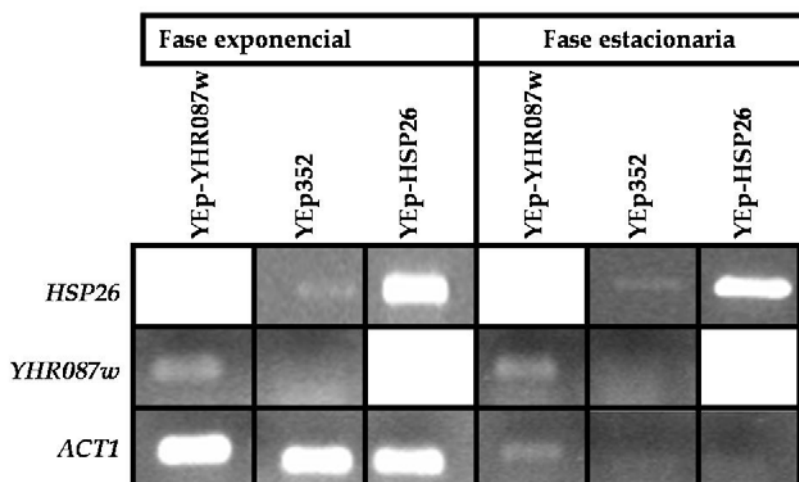


Figura C4.6. Análisis de la sobreexpresión en las cepas transformantes. En la parte de arriba se indican las cepas y las condiciones en las que se tomó la muestra de RNA y a la izquierda se indica el gen al que corresponde cada banda.

4. Experimentos de vinificación con las cepas transformantes.

Se llevaron a cabo microvinificaciones en mosto natural Sauvignon con las condiciones de inoculación que se utilizaron para el primer apartado de este capítulo y que se describen en la sección de Materiales y Métodos. Dado que los genes sobreexpresados responden a estrés y se ha visto una influencia de la temperatura en el comportamiento mostrado por las cepas (Figura C4.2) se realizó un seguimiento del consumo de azúcares en vinificaciones realizadas a 16, 22 y 30°C (Figura C4.7). Además, se estudió la viabilidad y la resistencia a estrés en la vinificación realizada a 22°C (Tabla C4.2).

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

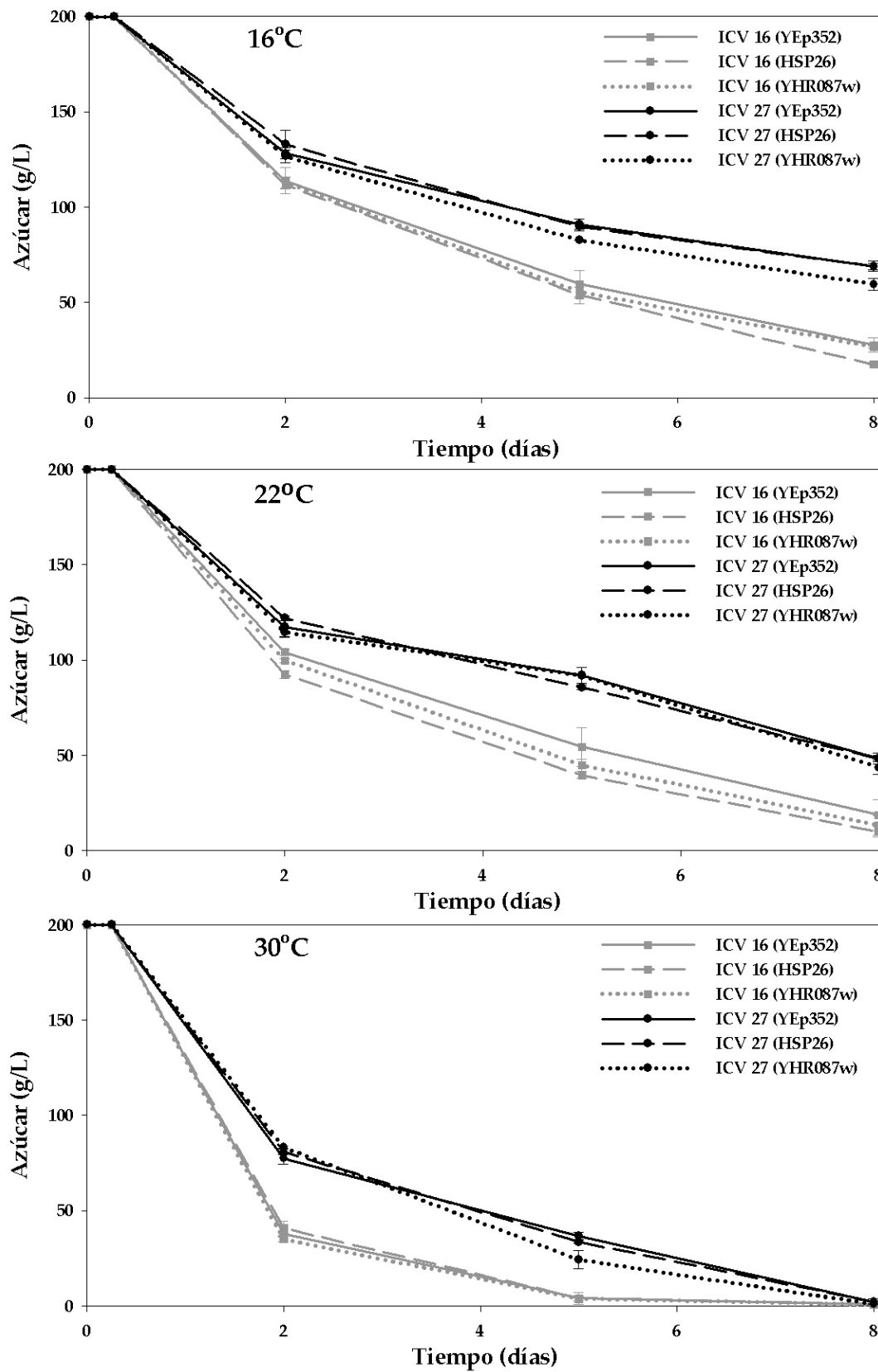


Figura C4.7. Consumo de azúcares mostrado por las cepas transformantes ICV 16 en vinificaciones realizadas a 16, 22 y 30°C como se describe en Materiales y Métodos.

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

En cuanto a los resultados del consumo de azúcares obtenidos con las cepas transformantes no parece haber un efecto claro de la sobreexpresión en estas condiciones aunque se observan ligeras diferencias en las vinificaciones realizadas a 22°C: las cepas sobreexpresantes en *HSP26* e *YHR087w* parecen tener un consumo algo más activo respecto a la cepa transformada con el plásmido vacío con lo que sería interesante repetir las vinificaciones para confirmar este resultado y, probablemente, ensayar otras condiciones (en principio subóptimas de vinificación) con el objetivo de analizar si estas diferencias pueden ser más importantes y la sobreexpresión puede representar una ventaja en las mismas.

Tomando en consideración los resultados de este capítulo relacionados con resistencia a estrés oxidativo y, dado que en estas cepas se están sobreexpresando genes de respuesta a estrés, nos pareció interesante analizar su viabilidad y su capacidad para resistir condiciones de estrés puntuales adicionales a aquéllas que se van presentando durante la vinificación. En consonancia con otros capítulos de este trabajo además del estudio del estrés oxidativo se decidió analizar también el estrés por adición brusca de etanol (recordemos que son las dos condiciones de estrés que nos ayudan a diferenciar cepas en función de su comportamiento en vinificación, Capítulo 1). En estos experimentos, todavía preliminares, hemos encontrado diferencias pequeñas entre las cepas (Tabla C2.4). Los resultados sugieren que la cepa transformada con *HSP26* muestra un porcentaje de viabilidad algo mayor durante el periodo estudiado. Por otro lado, la cepa transformada con *YHR087w* parece ser más resistente al estrés causado por adición de etanol.

En cuanto a los ensayos de sensibilidad a estrés oxidativo vemos las mismas diferencias que encontramos en el primer apartado de este capítulo: hay un incremento de la resistencia en momentos cercanos a la entrada en fase estacionaria pero sin diferencias significativas asociadas a las sobreexpresiones. Estos resultados, junto con los obtenidos con la cepa T_{73} transformada con los mismos plásmidos, hacen aconsejable la confirmación de resultados mediante nuevos experimentos, el ensayo de vinificaciones en las cepas ICV 27 transformantes y, probablemente, el análisis de condiciones algo más restrictivas para

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

las cepas derivadas de ICV 16 con el objetivo de deducir si pueden darse diferencias más significativas en condiciones subóptimas de interés en vinificación.

Tabla C4.2. Viabilidad y sensibilidad a estrés de las cepas transformantes durante una microvinificación a 22°C.

Cepa	¹ % vb 6h		¹ % vb 2D		² % plas 2D		³ H ₂ O ₂ 6h		³ H ₂ O ₂ 2D		⁴ % vb et 3h	
	Media	E	Media	E	Media	E	Media	E	Media	E	Media	E
YEp352	42	5	279	11	92	0	3,4	0	3,0	1	79	1
HSP26	55	3	384	8	89	1	3,5	2	3,1	0	79	30
YHR087w	45	4	273	10	72	3	3,5	2	3,0	1	91	5

E= Error estándar, % de desviación respecto a la media.

¹Porcentaje de células viables a 6 horas o a 2 días desde la inoculación.

²Porcentaje de células que conservan el plásmido a 2 días desde la inoculación.

³Diámetro del halo formado por H₂O₂ (descrito en Materiales y Métodos) en células procedentes de la vinificación tomadas a 6 horas o 2 días después de la inoculación.

⁴Porcentaje de viabilidad tras 3 horas desde la adición de etanol hasta una concentración final del 12% (v/v) a las vinificaciones después de 2 días desde la inoculación.

DISCUSIÓN

En este capítulo final el objetivo general era demostrar que las condiciones utilizadas a lo largo del trabajo, a pesar de ser aproximaciones que permitiesen el control riguroso de todos los parámetros de la vinificación, son válidas para la obtención de resultados aplicables posteriormente a nivel industrial.

En primer lugar se planteó un análisis del comportamiento en estas cepas en condiciones más similares a las de la bodega, concretamente el empleo de mostos naturales y la utilización de levadura seca activa. Como hemos visto la diferencia en los patrones de fermentación se mantiene en algunas de las condiciones estudiadas y, además, algunos de los resultados obtenidos, aunque hay que hacer ensayos adicionales, parecen guardar relación con las características genéticas y fisiológicas que se han encontrado en estas cepas en los 3 primeros capítulos. Concretamente el buen comportamiento fermentativo mostrado por ICV 27 en el mosto Bobal y en el mosto Sauvignon a 30°C pueden tener alguna conexión con la expresión de genes reprimidos

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

por catabolito de nitrógeno y con la hipótesis de problemas a nivel de permeabilidad de membrana plasmática discutidos en el capítulo 3. Otra posible explicación es que 30°C es la temperatura óptima de crecimiento de las levaduras, es una condición más favorable para su desarrollo, de manera que, como hemos demostrado en el capítulo 1, la menor resistencia a algunas condiciones de estrés de la cepa ICV 27 puede estar determinando que esta cepa sólo sea capaz de completar fermentaciones en condiciones en las que no hay estreses adicionales a los intrínsecos del proceso (por ejemplo limitación de nitrógeno y temperaturas subóptimas). En este mismo sentido debemos destacar también los resultados de experimentos de resistencia a estrés oxidativo de esta cepa mostrados en este capítulo. Aunque se deben hacer estudios adicionales en más puntos a lo largo de la vinificación es interesante el hecho de que no haya grandes diferencias en la sensibilidad mostrada por la cepa ICV 27 a lo largo de toda la vinificación pero sí en la cepa ICV 16. Como se indicó en el apartado de resultados una posible explicación a este resultado es que la cepa ICV 16 esté protegida frente a la aparición de condiciones desfavorables adicionales (en este caso el estrés oxidativo) porque esté mostrando previamente una respuesta al estrés producido por las características propias del proceso de vinificación, en concreto el estrés osmótico al inocular las células en el mosto y el estrés por acumulación de etanol y por entrada en fase de crecimiento estacionaria en un punto intermedio de la fermentación. Estos datos también apuntan hacia ciertos defectos en la respuesta general a estrés en la cepa ICV 27 y probablemente a su incapacidad de completar fermentaciones en determinadas condiciones.

En segundo lugar se planteó la obtención de una cepa ICV 27 auxótrofa para uracilo ya que pensamos que es el modelo ideal para el estudio de dianas de mejora genética en cepas vínicas. El hecho de que sea una cepa comercial que en condiciones concretas de vinificación, pero dentro de los márgenes habitualmente encontrados en bodega, presente ciertos problemas fermentativos permite que se puedan ensayar el efecto de las manipulaciones genéticas en condiciones normales de vinificación, sin que haya que recurrir a forzar situaciones extremas para poder encontrar diferencias. La selección de la estrategia basada en generación de la cepa auxótrofa y sobreexpresión de los genes de interés por transformación con el plásmido multicopia YEp352 se realizó porque se ha

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

visto que la cepa T₇₃ ura⁻/YEp352 presenta parámetros enológicos muy similares a la original (Puig, S. y col., 1998) lo que hace que estas cepas sean potencialmente adecuadas para su utilización en bodega.

En cuanto a las posibles dianas de mejora se optó por el estudio de los genes *HSP26* e *YHR087w* por todo lo discutido en el apartado 2 de este capítulo. Además, en nuestro grupo de investigación, hay un gran interés por el estudio de la respuesta a estrés en levaduras vínicas y de hecho ya se habían intentado estrategias de mejora del proceso de vinificación en este sentido. Concretamente se había ensayado el efecto de la sobreexpresión de *MSN2*, uno de los factores que gobierna la respuesta general a estrés en levaduras. Sin embargo, los resultados de estos experimentos fueron que las cepas presentaban graves defectos de crecimiento y mostraban una baja viabilidad en condiciones de vinificación (Carrasco, P., Tesis Doctoral). Como se comentó en la introducción en condiciones desfavorables para el crecimiento de la levadura hay una activación de la respuesta general a estrés y, además, una parada del crecimiento en determinadas fases del ciclo celular (Hohmann, S. y col., 2003). Dado que los factores de transcripción Msn2p/Msn4p controlan muchos de estos procesos (Martinez-Pastor, M.T. y col., 1996) su sobreexpresión en condiciones no estresantes puede estar impidiendo el correcto desarrollo de la levadura a lo largo del ciclo celular. Por este motivo se pensó que una estrategia más adecuada para no afectar significativamente el crecimiento era ensayar el efecto de la manipulación de alguna proteína que no fuese factor de transcripción, que fuese diana final de la ruta general de respuesta a estrés y que participase en la resistencia a diferentes condiciones adversas importantes para el correcto desarrollo durante la vinificación, como el estrés osmótico, el estrés por etanol y la entrada en fase de crecimiento estacionaria. Por todos estos motivos se seleccionó el gen *HSP26*. En el caso de *YHR087w* la selección se realizó porque, tal y como se ha detallado, también presenta aumento de expresión frente a estrés osmótico y en condiciones de entrada en fase de crecimiento estacionaria y porque es un gen de función desconocida con lo que puede ser interesante realizar análisis que puedan dar ideas sobre su posible función molecular.

Como se ha detallado en el apartado de resultados en las condiciones estudiadas no parece haber un resultado claro de la sobreexpresión. Aunque las condiciones ensayadas

C4. APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS

pueden ser adecuadas para estudios futuros con las cepas ICV 27 transformantes, la ausencia o leve efecto mostrado por las cepas derivadas de ICV 16 entra dentro de lo esperado ya que las condiciones ensayadas son similares a las que se pueden dar en bodega: al ser una cepa sin problemas de fermentación, no resulta extraño que no se produzca una mejora aparente del proceso. Para intentar observar un efecto en esta cepa sería más adecuado ensayar vinificaciones en condiciones desfavorables como por ejemplo temperaturas aún más bajas (por ejemplo 10°C), limitación de nitrógeno,... Además, en estos experimentos preliminares, no se ha comprobado si realmente hay sobreexpresión de los genes a lo largo de la vinificación con lo que, en la repetición de los ensayos, sería conveniente el análisis de los niveles de mensajero de estos genes respecto a los mostrados por la cepa transformada con el plásmido vacío.

Por último debemos comentar que la estrategia de manipulación desarrollada, una vez conseguidas las cepas auxótrofas para uracilo, resulta muy útil por su sencillez para ensayos preliminares de múltiples dianas ya que simplemente requiere de la clonación en YEp352 de los genes candidatos incluyendo su promotor, y la transformación de la levadura con la construcción. Sin embargo, esta estrategia puede conllevar problemas como la pérdida de plásmido. Otras estrategias que se están empezando a poner a punto en el laboratorio intentan solucionar este problema ya que están basadas en integración en el genoma. Concretamente lo que se ha ideado es un sistema de sustitución de promotores basado, al igual que en la generación de auxotrofías, en la integración por recombinación en los promotores diana de las secuencias candidatas junto con el gen de resistencia a geneticina flanqueado por secuencias loxP (Cardona, F., Aranda, A., y Del Olmo, M., en preparación).

CONCLUSIONES

Tomando en consideración los resultados detallados a lo largo de este trabajo podemos sacar las siguientes conclusiones finales:

1. En una batería de 14 cepas aisladas de diferentes orígenes hemos conseguido encontrar una correlación basada en criterios estadísticos entre el comportamiento fermentativo de las cepas y la resistencia a dos condiciones de estrés, el estrés oxidativo y el estrés por adición de etanol. Estos ensayos de capacidad de resistencia a estrés pueden ser utilizados como criterios iniciales de selección de cepas vínicas con buen poder de fermentación.
2. La expresión de genes de respuesta a estrés en diferentes cepas vínicas (la mayoría de ellas comerciales) muestra niveles absolutos en muchos casos dependientes de cepa. Sin embargo, el análisis de los perfiles en diferentes condiciones o a lo largo del tiempo permite sacar conclusiones sobre la respuesta de las cepas vínicas a condiciones similares a las que tienen lugar durante la vinificación en bodega. Así, ciertas variaciones en el pH del mosto o en la temperatura durante la vinificación tienen influencia en la expresión de ciertos genes de respuesta a estrés. En cuanto a la relación entre expresión génica y comportamiento durante la vinificación hemos visto que las cepas con mayores problemas de fermentación suelen mostrar escasa regulación en la respuesta a estrés y que las cepas con defectos leves en vinificación tienen comparativamente bajos niveles de expresión de determinados genes de estrés en algunos momentos.
3. A partir del análisis de la expresión global tanto génica como proteica en dos cepas con diferente comportamiento fermentativo hemos podido determinar algunos de los factores moleculares que podrían explicar las diferencias

CONCLUSIONES

fisiológicas que muestran estas dos cepas. Entre estos se podrían resaltar los aspectos relacionados con el metabolismo de carbohidratos, con la expresión de genes regulados por catabolito de nitrógeno y con la respuesta a estímulos de diversa naturaleza. Además, las diferencias de expresión de otros genes y proteínas para los que no hemos encontrado correlación con el comportamiento en vinificación, pero que podrían tener efectos sobre el uso industrial de estas levaduras (como los relacionados con el metabolismo del azufre), abren la puerta de futuras investigaciones.

4. Hemos encontrado una cepa, la ICV 27, que puede ser muy útil para el ensayo de manipulaciones genéticas encaminadas a incrementar el poder de fermentación en cepas vínicas. Se ha conseguido construir una cepa derivada auxótrofa para uracilo que permite su transformación con plásmidos multicopia como YEp352 para ensayar el efecto de la sobreexpresión de genes candidatos.
5. Hemos comprobado que las aproximaciones utilizadas a lo largo del trabajo -sobre todo la utilización de mostos sintéticos y la inoculación de levaduras procedentes de cultivos líquidos- son válidas a la hora de buscar aplicaciones biotecnológicas útiles para la mejora del proceso de vinificación en bodega. En este sentido, nuestros datos parecen indicar que la cepa ICV 27 debe poder llevar a cabo vinificaciones siempre y cuando las condiciones no sean muy desfavorables (por ejemplo mostos pobres en nitrógeno, temperaturas lejanas a la óptima...).
6. Por último destacar que los análisis realizados durante todo el trabajo han mostrado indicios de que *HSP26* puede ser un buen candidato para la mejora del comportamiento fermentativo y la resistencia a estrés en cepas vínicas. Aunque ensayos preliminares de su sobreexpresión no dan lugar a conclusiones relevantes, los indicios de mejora mostrados por cepas sin problemas fermentativos (ICV 16 y T73) hacen aconsejable el estudio de nuevas condiciones para estas cepas y el ensayo con las cepas derivadas de ICV 27.

BIBLIOGRAFÍA

Aguilera, A., S. Chavez, y F. Malagon. *Mitotic recombination in yeast: elements controlling its incidence.* *Yeast* **2000.** 16:731-754.

Albertyn, J., S. Hohmann, J. M. Thevelein, y B. A. Prior. *GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase is essential for growth under osmotic stress in *Saccharomyces cerevisiae*, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol pathway.* *Mol. Cell Biol.* **1994.** 14:4135-4144.

Alexandre, H., V. Ansanay-Galeote, S. Dequin, y B. Blondin. *Global gene expression during short-term ethanol stress in *Saccharomyces cerevisiae*.* *FEBS Lett.* **2001.** 498:98-103.

Alexandre, H., I. Rousseaux, y C. Charpentier. *Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*.* *Biotechnol. Appl. Biochem.* **1994.** 20:173-183.

Amorós, M. y F. Estruch. *Hsf1p and Msn2/4p cooperate in the expression of *Saccharomyces cerevisiae* genes HSP26 and HSP104 in a gene- and stress type-dependent manner.* *Mol. Microbiol.* **2001.** 39:1523-1532.

Aranda, A. y M. del Olmo. *Exposure of *Saccharomyces cerevisiae* to acetaldehyde induces sulfur amino acid metabolism and polyamine transporter genes, which depend on Met4p and Haa1p transcription factors, respectively.* *Appl. Environ. Microbiol.* **2004.** 70:1913-1922.

Arthur, H. y K. Watson. *Thermal adaptation in yeast: growth temperatures, membrane lipid, and cytochrome composition of psychrophilic, mesophilic, and thermophilic yeasts.* *J. Bact.* **1976.** 128:56-68.

BIBLIOGRAFÍA

Attfield, P. V. *Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast.* Nat. Biotech. **1997.** 15:1351-1357.

Backhus, L. E., J. DeRisi, P. O. Brown, y L. F. Bisson. *Functional genomic analysis of a commercial wine strain of *Saccharomyces cerevisiae* under differing nitrogen conditions.* FEMS Yeast Res. **2001.** 1:111-125.

Bakalinsky, A. T. y R. Snow. *The chromosomal constitution of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*.* Yeast **1990.** 6:367-382.

Bandlow, W., G. Strobel, C. Zoglowek, U. Oechsner, y V. Magdolen. *Yeast adenylate kinase is active simultaneously in mitochondria and cytoplasm and is required for non-fermentative growth.* Eur. J. Biochem. **1988.** 178:451-457.

Barre, P., F. Vézinhét, S. Dequin, y B. Blondin. *Genetic improvement of wine yeast,* p. 421-447. In G. H. Fleet (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology.* **1993.** Harwood Academic, Reading.

Bauer, B. E., H. Wolfger, y K. Kuchler. *Inventory and function of yeast ABC proteins: about sex, stress, pleiotropic drug and heavy metal resistance.* Biochim. Biophys. Acta **1999.** 1461:217-236.

Bauer, F. F. y I. S. Pretorius. *Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review.* S. Afr. J. Enol. Vitic. **2000.** 21:27-51.

Bely, M., J. M. Sablayrolles, y P. Barre. *Description of alcoholic fermentation kinetics: its variability and significance.* Am. J. Enol. Vitic. **1990.** 41:319-324.

Bidenne, C., B. Blondin, S. Dequin, y F. Vezinhét. *Analysis of the chromosomal DNA polymorphism of wine strains of *Saccharomyces cerevisiae*.* Curr. Genet. **1992.** 22:1-7.

Bisson, L. F. *Stuck and sluggish fermentations.* Am. J. Enol. Vitic. **1999.** 50:107-119.

BIBLIOGRAFÍA

Bjellqvist, B., C. Pasquali, F. Ravier, J. C. Sanchez, y D. Hochstrasser. *A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale.* Electrophoresis. **1993.** 14:1357-1365.

Boorstein, W. R. y E. A. Craig. *Regulation of a yeast HSP70 gene by a cAMP responsive transcriptional control element.* EMBO J. **1990.** 9:2543-2553.

Borkovich, K. A., F. W. Farrelly, D. B. Finkelstein, J. Taulien, y S. Lindquist. *Hsp82 is an essential protein that is required in higher concentrations for growth of cells at higher temperatures.* Mol. Cell Biol. **1989.** 9:3919-3930.

Boulton, R. B., V. L. Singleton, L. F. Bisson, y R. E. Kunkee. *Principles and practices of winemaking.* **1996.** The Chapman & Hall Enology Library, New York.

Bourne, R., U. Himmelreich, A. Sharma, C. Mountford, y T. Sorrell. *Identification of Enterococcus, Streptococcus, and Staphylococcus by multivariate analysis of proton magnetic resonance spectroscopic data from plate cultures.* J. Clin. Microbiol. **2001.** 39:2916-2923.

Boy-Marcotte, E., M. Perrot, F. Bussereau, H. Boucherie, y M. Jacquet. *Msn2p and Msn4p control a large number of genes induced at the diauxic transition which are repressed by cyclic AMP in Saccharomyces cerevisiae.* J. Bacteriol. **1998.** 180:1044-1052.

Bradford, M. M. *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem. **1976.** 72:248-254.

Camarasa, C., J. P. Grivet, y S. Dequin. *Investigation by ¹³C-NMR and tricarboxylic acid (TCA) deletion mutant analysis of pathways for succinate formation in Saccharomyces cerevisiae during anaerobic fermentation.* Microbiology. **2003.** 149:2669-2678.

Cardenas, M. E., N. S. Cutler, M. C. Lorenz, C. J. Di Como, y J. Heitman. *The TOR signaling cascade regulates gene expression in response to nutrients.* Genes Dev. **1999.** 13:3271-3279.

BIBLIOGRAFÍA

- Carle, G. F. y M. V. Olson.** *An electrophoretic karyotype for yeast.* PNAS. **1985.** 82:3756-3760.
- Carmelo, V., P. Bogaerts, y I. Sa-Correia.** *Activity of plasma membrane H⁺-ATPase and expression of PMA1 and PMA2 genes in Saccharomyces cerevisiae cells grown at optimal and low pH.* Arch. Microbiol. **1996.** 166:315-320.
- Carrasco, P., J. E. Pérez-Ortín, y M. del Olmo.** *Arginase activity is a useful marker of nitrogen limitation during alcoholic fermentations.* Syst. Appl. Microbiol. **2003.** 26:471-479.
- Carrasco, P., A. Querol, y M. del Olmo.** *Analysis of the stress resistance of commercial wine yeast strains.* Arch. Microbiol. **2001.** 175:450-457.
- Causton, H. C., B. Ren, S. S. Koh, C. T. Harbison, E. Kanin, E. G. Jennings, T. I. Lee, H. L. True, E. S. Lander, y R. A. Young.** *Remodeling of yeast genome expression in response to environmental changes.* Mol. Biol. Cell **2001.** 12:323-337.
- Chen, C. S.** *Water activity--concentration models for solutions of sugars, salts and acids.* J. Food Sci. **1989.** 54:1318-1321.
- Chi, Z. y N. Arneborg.** *Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in Saccharomyces cerevisiae.* J. Appl. Microbiol. **1999.** 86:1047-1052.
- Cleveland, W. S.** *Robust locally weighted regression and smoothing scatterplots.* J. Am. Stat. Assoc. **1979.** 74:829-836.
- Codon, A. C., J. M. Gasent-Ramirez, y T. Benitez.** *Factors which affect the frequency of sporulation and tetrad formation in Saccharomyces cerevisiae baker's yeasts.* Appl. Environ. Microbiol. **1995.** 61:630-638.
- Cornell, N. W. y R. L. Veech.** *Enzymatic measurement of ethanol or NAD in acid extracts of biological samples.* Anal. Biochem. **1983.** 132:418-423.

BIBLIOGRAFÍA

Crauwels, M., M. C. Donaton, M. B. Pernambuco, J. Winderickx, J. H. De Winde, y J. M. Thevelein. *The Sch9 protein kinase in the yeast Saccharomyces cerevisiae controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway.* Microbiology. **1997.** 143:2627-2637.

Crespo, J. L., K. Daicho, T. Ushimaru, and M. N. Hall. *The GATA transcription factors GLN3 and GAT1 link TOR to salt stress in Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem. **2001.** 276:34441-34444.

Cunningham, K. W. y G. R. Fink. *Calcineurin inhibits VCX1-dependent H⁺/Ca²⁺ exchange and induces Ca²⁺ ATPases in Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Cell Biol. **1996.** 16:2226-2237.

Deckert, J., R. Perini, B. Balasubramanian, and R. S. Zitomer. *Multiple elements and auto-repression regulate Rox1, a repressor of hypoxic genes in Saccharomyces cerevisiae.* Genetics. **1995.** 139:1149-1158

Degré, R. *Selection and commercial cultivation of wine yeast and bacteria,* p. 421-447. In Fleet G.H. (ed.), Wine Microbiology and Biotechnology. **1993.** Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Delneri, D., G. C. Tomlin, J. L. Wixon, A. Hutter, M. Sefton, E. J. Louis, y S. G. Oliver. *Exploring redundancy in the yeast genome: an improved strategy for use of the cre-loxP system.* Gene. **2000.** 252:127-135.

DeRisi, J. L., V. R. Iyer, y P. O. Brown. *Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale.* Science. **1997.** 278:680-686.

Destruelle, M., H. Holzer, y D. J. Klionsky. *Identification and characterization of a novel yeast gene: the YGP1 gene product is a highly glycosylated secreted protein that is synthesized in response to nutrient limitation.* Mol. Cell Biol. **1994.** 14:2740-2754.

BIBLIOGRAFÍA

Destruelle, M., H. Holzer, y D. J. Klionsky. *Isolation and characterization of a novel yeast gene, ATH1, that is required for vacuolar acid trehalase activity.* Yeast. **1995.** 11:1015-1025.

Dormer, U. H., J. Westwater, N. F. McLaren, N. A. Kent, J. Mellor, y D. J. Jamieson. *Cadmium-inducible expression of the yeast GSH1 gene requires a functional sulfur-amino acid regulatory network.* J. Biol. Chem. **2000.** 275:32611-32616.

Dubois, E. y F. Messenguy. *Integration of the multiple controls regulating the expression of the arginase gene CAR1 of Saccharomyces cerevisiae in response to different nitrogen signals: role of Gln3p, ArgRp-Mcm1p, and Ume6p.* Mol. Gen. Genet. **1997.** 253:568-580.

Duda, R. O. y P. E. Heart. *Pattern classification and scene analysis.* **1973.** Wiley, New York.

Erasmus, D. J., G. K. van der Merwe, y H. J. J. van Vuuren. *Genome-wide expression analyses: Metabolic adaptation of Saccharomyces cerevisiae to high sugar stress.* FEMS Yeast Res. **2003.** 3:375-399.

Esteve-Zarzoso, B., M. J. Peris-Toran, E. Garcia-Maiquez, F. Uruburu, y A. Querol. *Yeast population dynamics during the fermentation and biological aging of sherry wines.* Appl. Environ. Microbiol. **2001.** 67:2056-2061.

Estruch, F. *Stress-controlled transcription factors, stress-induced genes and stress tolerance in budding yeast.* FEMS Microbiol. Rev. **2000.** 24:469-486.

Fauchon, M., G. Lagniel, J. C. Aude, L. Lombardia, P. Soularue, C. Petat, G. Marguerie, A. Sentenac, M. Werner, y J. Labarre. *Sulfur sparing in the yeast proteome in response to sulfur demand.* Mol. Cell. **2002.** 9:713-723.

Fay, J., H. McCullough, P. Sniegowski, y M. Eisen. *Population genetic variation in gene expression is associated with phenotypic variation in Saccharomyces cerevisiae.* Genome Biol. **2004.** 5:R26.

BIBLIOGRAFÍA

Fazio, T. G., C. Kooperberg, J. P. Goldmark, C. Neal, R. Basom, J. Delrow, y T. Tsukiyama. *Widespread collaboration of Isw2 and Sin3-Rpd3 chromatin remodeling complexes in transcriptional repression.* Mol. Cell. Biol. **2001.** 21:6450-6460.

Fernández-Espinar, M.T., Barrio, E. y A. Querol. *Analysis of the genetic variability in the species of the Saccharomyces sensu stricto complex.* Yeast **2003.** 20:1213-1226.

Fernández-Espinar, M.T., López, V., Ramón, D., Bartra, E. y A. Querol. *Study of the authenticity of commercial wine yeast strains by molecular techniques.* Int. J. Food Microbiol. **2001.** 70:1-10.

Ficarro, S. B., M. L. McClelland, P. T. Stukenberg, D. J. Burke, M. M. Ross, J. Shabanowitz, D. F. Hunt, y F. M. White. *Phosphoproteome analysis by mass spectrometry and its application to Saccharomyces cerevisiae.* Nat. Biotechnol. **2002.** 20:301-305.

Fisher, R. A. *The use of multiple measurements in taxonomic problems.* Ann. Eugen. **1936.** 7:179-188.

Fleet, G. H. y G. M. Heard. *Yeast production of sulfur compounds,* p. 183-223. In G. H. Fleet (ed.), Wine Microbiology and Biotechnology. **1993a.** Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Fleet, G. H. y G. M. Heard. *Yeasts-growth during fermentation,* p. 42-43. In G. H. Fleet (ed.), Wine Microbiology and Biotechnology. **1993b.** Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

François, J. y J. L. Parrou. *Reserve carbohydrates metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* FEMS Microbiol. Rev. **2001.** 25:125-145.

Garay-Arroyo, A. y A. A. Covarrubias. *Three genes whose expression is induced by stress in Saccharomyces cerevisiae.* Yeast. **1999.** 15:879-892.

BIBLIOGRAFÍA

García-Padilla, M. C., G. A. González, F. J. Heredia, y A. M. Troncoso. *Differentiation of wine vinegars based on phenolic composition.* J. Agric. Food Chem. **1997.** 45:3492.

Gasch, A. P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein, y P. O. Brown. *Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes.* Mol. Biol. Cell. **2000.** 11:4241-4257.

Gietz, R. D., R. H. Schiestl, A. R. Willems, y R. A. Woods. *Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure.* Yeast. **1995.** 11:355-360.

Guerrero, M. I., C. Herce-Pagliai, A. M. Camean, A. M. Troncoso, y A. G. Gonzalez. *Multivariate characterization of wine vinegars from the south of Spain according to their metallic content.* Talanta. **1997.** 45:379-386.

Guerzoni, M. E., M. Sinigaglia, y F. Gardini. *Interaction between isolation source, cellular fatty acid composition and stress tolerance in Saccharomyces cerevisiae and its subspecies.* J. App. Bacteriol. **1993.** 75:588-594.

Guillamon, J. M., E. Barrio, y A. Querol. *Characterization of wine yeast strains of the Saccharomyces genus on the basis of molecular markers: Relationships between genetic distance and geographic or ecological origin.* Syst. Appl. Microbiol. **1996.** 19:122-132.

Guldener, U., S. Heck, T. Fielder, J. Beinhauer, y J. H. Hegemann. *A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast.* Nucleic Acids Res. **1996.** 24:2519-2524.

Gupta, S. D. *Theories and methods in classification: a review,* p. 77-137. In T. Caucoullou (ed.), Discriminant analysis and applications. **1973.** Academic Press, New York.

Gustin, M. C., J. Albertyn, M. Alexander, y K. Davenport. *MAP kinase pathways in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. **1998.** 62:1264-1300.

BIBLIOGRAFÍA

Hanahan, D. *Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids.* J. Mol. Biol. **1983.** 166:557-580.

Henschke, P. A. y V. Jiranek. *Yeasts—metabolism of nitrogen compounds*, p. 77-164. In G. H. Fleet (ed.), *Wine Microbiology and Biotechnology.* **1993.** Harwood Academic Publishers, Chur, Switzerland.

Hill, J. E., A. M. Myers, T. J. Koerner, y A. Tzagoloff. *Yeast/E. coli shuttle vectors with multiple unique restriction sites.* Yeast. **1986.** 2:163-167.

Hirayama, T., T. Maeda, H. Saito, y K. Shinozaki. *Cloning and characterization of seven cDNAs for hyperosmolarity-responsive (HOR) genes of Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Gen. Genet. **1995.** 249:127-138.

Hochstrasser, D. F., M. G. Harrington, A. C. Hochstrasser, M. J. Miller, y C. R. Merrill. *Methods for increasing the resolution of two-dimensional protein electrophoresis.* Anal. Biochem. **1988a.** 173:424-435.

Hochstrasser, D. F. y C. R. Merrill. *'Catalysts' for polyacrylamide gel polymerization and detection of proteins by silver staining.* Appl. Theor. Electrophor. **1988b.** 1:35-40.

Hochstrasser, D. F., A. Patchornik, y C. R. Merrill. *Development of polyacrylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining.* Anal. Biochem. **1988c.** 173:412-423.

Hohmann, S. y W. H. Mager. *Yeast stress responses.* **2003.** Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.

Homma, T., H. Iwahashi, y Y. Komatsu. *Yeast gene expression during growth at low temperature.* Cryobiology **2003.** 46:230-237.

BIBLIOGRAFÍA

Howell, K. S., J. H. Swiegers, G. M. Elsey, T. E. Siebert, E. J. Bartowsky, G. H. Fleet, I. S. Pretorius, y M. A. Barros Lopes. *Variation in 4-mercapto-4-methyl-pentan-2-one release by Saccharomyces cerevisiae commercial wine strains.* FEMS Microbiol. Lett. **2004.** 240:125-129.

Ingram, L. O. y T. M. Buttke. *Effects of alcohols on micro-organisms.* Adv. Microb. Physiol **1984.** 25:253-300.

Inoue, Y., Y. Tsujimoto, y A. Kimura. *Expression of the glyoxalase I gene of Saccharomyces cerevisiae is regulated by high osmolarity glycerol mitogen-activated protein kinase pathway in osmotic stress response.* J. Biol. Chem. **1998.** 273:2977-2983.

Ivorra, C., J. E. Pérez-Ortín, y M. del Olmo. *An inverse correlation between stress resistance and stuck fermentations in wine yeasts. A molecular study.* Biotechnol. Bioeng. **1999.** 64:698-708.

Jackson, R. S. *Wine Science. Principles and Applications.* **1994.** Academic Press, San Diego.

Jiranek, V., P. Langridge, y P. A. Henschke. *Regulation of hydrogen sulfide liberation in wine-producing Saccharomyces cerevisiae strains by assimilable nitrogen.* Appl. Environ. Microbiol. **1995.** 61:461-467.

Kaeberlein, M., A. A. Andalis, G. R. Fink, y L. Guarente. *High osmolarity extends life span in Saccharomyces cerevisiae by a mechanism related to calorie restriction.* Mol. Cell. Biol. **2002.** 22:8056-8066.

Kaiser, C., S. Michaelis, y A. Mitchell. *Techniques and Protocols.* In Methods in Yeast Genetics. **1994.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Kandror, O., N. Bretschneider, E. Kreydin, D. Cavalieri, y A. L. Goldberg. *Yeast adapt to near-freezing temperatures by STRE/Msn2,4-dependent induction of trehalose synthesis and certain molecular chaperones.* Mol. Cell. **2004.** 13:771-781.

BIBLIOGRAFÍA

Kitamoto, K., K. Oda, K. Gomi, y K. Takahashi. *Genetic engineering of a sake yeast producing no urea by successive disruption of arginase gene.* Appl. Environ. Microbiol. **1991.** 57:301-306.

Knight, S. A., K. T. Tamai, D. J. Kosman, y D. J. Thiele. *Identification and analysis of a Saccharomyces cerevisiae copper homeostasis gene encoding a homeodomain protein.* Mol. Cell Biol. **1994.** 14:7792-7804.

Kobi, D., S. Zugmeyer, S. Potier, y L. Jaquet-Gutfreund. *Two-dimensional protein map of an "ale"-brewing yeast strain: proteome dynamics during fermentation.* FEMS Yeast Res. **2004.** 5:213-230.

Kondo, K. y M. Inouye. *TIP 1, a cold shock-inducible gene of Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem. **1991.** 266:17537-17544.

Kondo, K., L. R. Kowalski, y M. Inouye. *Cold shock induction of yeast NSR1 protein and its role in pre-rRNA processing.* J. Biol. Chem. **1992.** 267:16259-16265.

Konrad, M. *Analysis and in vivo disruption of the gene coding for adenylate kinase (ADK1) in the yeast Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem. **1988.** 263:19468-19474.

Krems, B., C. Charizanis, y K. D. Entian. *The response regulator-like protein Pos9/Skn7 of Saccharomyces cerevisiae is involved in oxidative stress resistance.* Curr. Genetics. **1996.** 29:327-334.

Kron, S. J. *Filamentous growth in budding yeast.* Trends in Microbiol. **1997.** 5:450-454.

Kruckeberg, A. L. *The hexose transporter family of Saccharomyces cerevisiae.* Arch. Microbiol. **1996.** 166:283-292.

Kuge, S. y N. Jones. *YAP1 dependent activation of TRX2 is essential for the response of Saccharomyces cerevisiae to oxidative stress by hydroperoxides.* EMBO J. **1994.** 13:655-664.

BIBLIOGRAFÍA

Kurdistani, S. K., D. Robyr, S. Tavazoie, y M. Grunstein. *Genome-wide binding map of the histone deacetylase Rpd3 in yeast.* Nat. Gen. **2002.** 31:248-254.

Kwast, K. E., P. V. Burke, B. T. Staahl, y R. O. Poyton. *Oxygen sensing in yeast: Evidence for the involvement of the respiratory chain in regulating the transcription of a subset of hypoxic genes.* PNAS. **1999.** 96:5446-5451.

Lachenbruch, P. A. *Discriminant Analysis.* **1975.** Hafner Press, New York.

Lachenbruch, P. A. y M. Goldstein. *Discriminant Analysis.* Biometrics **1979.** 35:69-85.

Laemmli, U. K. *Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4.* Nature. **1970.** 227:680-685.

Lafon-Lafourcade, S. *Wine and brandy,* p. 81-163. In G. Reed (ed.), *Biotechnology.* **1983.** Verlag-Chemie, Heidelberg.

Lagorce, A., N. C. Hauser, D. Labourdette, C. Rodriguez, H. Martin-Yken, J. Arroyo, J. D. Hoheisel, y J. Francois. *Genome-wide analysis of the response to cell wall mutations in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*.* J. Biol. Chem. **2003.** 278:20345-20357.

Larue, F. y S. Lafon-Lafourcade. *Survival factors in wine fermentation,* p. 193-215. In N. Van Uden (ed.), *Alcohol Toxicity in Yeast and Bacteria.* **1989.**

Lechner, T., M. J. Carrozza, Y. Yu, P. A. Grant, A. Eberharter, D. Vannier, G. Brosch, D. J. Stillman, D. Shore, y J. L. Workman. *Sds3 (Suppressor of Defective Silencing 3) is an integral component of the yeast Sin3-Rpd3 histone deacetylase complex and is required for histone deacetylase activity.* J. Biol. Chem. **2000.** 275:40961-40966.

Levy, M. *Equilibria in the formol trititation.* J. Biol. Chem. **1933.** 99:767-779.

BIBLIOGRAFÍA

Lilly, M., M. G. Lambrechts, y I. S. Pretorius. *Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates.* Appl. Environ. Microbiol. **2000.** 66:744-753.

Liu, H., C. A. Styles, y G. R. Fink. *Saccharomyces cerevisiae S288C has a mutation in FLO8, a gene required for filamentous growth.* Genetics. **1996.** 144:967-978.

Liu, X. D. y D. J. Thiele. *Oxidative stress induced heat shock factor phosphorylation and HSF-dependent activation of yeast metallothionein gene transcription.* Genes Dev. **1996.** 10:592-603.

Longo, E. y F. Vezinhet. *Chromosomal rearrangements during vegetative growth of a wild strain of Saccharomyces cerevisiae.* Appl. Environ. Microbiol. **1993.** 59:322-326.

Louis, E. J. y J. E. Haber. *The structure and evolution of subtelomeric Y' repeats in Saccharomyces cerevisiae.* Genetics. **1992.** 131:559-574.

Luttik, M. A. H., K. M. Overkamp, P. Kotter, S. De Vries, J. P. Van Dijken, y J. T. Pronk. *The Saccharomyces cerevisiae NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH.* J. Biol. Chem. **1998.** 273:24529-24534.

Maier, A., B. Volker, E. Boles, y G. F. Fuhrmann. *Characterisation of glucose transport in Saccharomyces cerevisiae with plasma membrane vesicles (countertransport) and intact cells (initial uptake) with single Hxt1, Hxt2, Hxt3, Hxt4, Hxt6, Hxt7 or Gal2 transporters.* FEMS Yeast Res. **2002.** 2:539-550.

Marchler, G., C. Schuller, G. Adam, y H. Ruis. *A Saccharomyces cerevisiae UAS element controlled by protein kinase A activates transcription in response to a variety of stress conditions.* EMBO J. **1993.** 12:1997-2003.

BIBLIOGRAFÍA

Marks, V. D., G. K. van der Merwe, y H. J. J. van Vuuren. *Transcriptional profiling of wine yeast in fermenting grape juice: regulatory effect of diammonium phosphate.* FEMS Yeast Res. **2003.** 3:269-287.

Martínez, P., L. Pérez, y C. T. Benítez. *Metabolism of Saccharomyces cerevisiae flor yeasts during fermentation and biological aging of Fino Sherry: by-products and aroma compounds.* Am. J. Enol. Vit. **1998.** 49:240-250.

Martinez-Pastor, M. T., G. Marchler, C. Schuller, A. Marchler-Bauer, H. Ruis, y F. Estruch. *The Saccharomyces cerevisiae zinc finger proteins Msn2p and Msn4p are required for transcriptional induction through the stress response element (STRE).* EMBO J. **1996.** 15:2227-2235.

Masneuf, I., M. Aigle, y D. Dubourdieu. *Development of a polymerase chain reaction/restriction fragment length polymorphism method for Saccharomyces cerevisiae and Saccharomyces bayanus identification in enology.* FEMS Microbiol Lett. **1996.** 138:239-244.

McKay, R. J. y N. A. Campbell. *Variable selection techniques in discriminant analysis: I. Description.* Brit. J. Mat. Stat. Psychol. **1982.** 35:1-29.

Meaden, P. G., F. M. Dickinson, A. Mifsud, W. Tessier, J. Westwater, H. Bussey, y M. Midgley. *The ALD6 gene of saccharomyces cerevisiae encodes a cytosolic, Mg-activated acetaldehyde dehydrogenase.* Yeast. **1997.** 13:1319-1327.

Messenguy, F. y E. Dubois. *Participation of transcriptional and post-transcriptional regulatory mechanisms in the control of arginine metabolism in yeast.* Mol. Gen. Genet. **1983.** 189:148-156.

Morimoto, R. I., A. Tissières, y C. Georgopoulos. *The biology of heat shock proteins and molecular chaperones.* **1994.** Cold Spring Harbor, New York.

BIBLIOGRAFÍA

Mullen, J. R., P. S. Kayne, R. P. Moerschell, S. Tsunasawa, M. Gribskov, M. Colavito-Shepanski, M. Grunstein, F. Sherman, y R. Sternglanz. *Identification and characterization of genes and mutants for an N-terminal acetyltransferase from yeast.* EMBO J. **1989.** 8:2067-2075.

Muñoz, E. y W. M. Ingledeu. *Yeast hulls in wine fermentation - a review.* J. Wine Res. **1990.** 1:197-210.

Nakagawa, Y., S. Sugioka, Y. Kaneko, y S. Harashima. *O2R, a novel regulatory element mediating Rox1p-independent O2 and unsaturated fatty acid repression of OLE1 in Saccharomyces cerevisiae.* J. Bacteriol. **2001.** 183:745-751.

Naumov, I., I. Masneuf, S. Naumova, M. Aigle, y D. Dubourdieu. *Association of Saccharomyces bayanus var. uvarum with some French wines: genetic analysis of yeast populations.* Res. Microbiol. **2000.** 151:683-691.

Nguyen, H. V. y C. Gaillardin. *Two subgroups within the Saccharomyces bayanus species evidenced by PCR amplification and restriction polymorphism of the non-transcribed spacer 2 in the ribosomal DNA unit.* Syst. Appl. Microbiol. **1997.** 20:286-294.

Ni, H. T. y D. C. LaPorte. *Response of a yeast glycogen synthase gene to stress.* Mol. Microbiol. **1995.** 16:1197-1205.

Nicolet, C. M. y E. A. Craig. *Isolation and characterization of STI1, a stress-inducible gene from Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Cell Biol. **1989.** 9:3638-3646.

O'Farrell, P. H. *High resolution two dimensional electrophoresis of proteins.* J. Biol. Chem. **1975.** 250:4007-4021.

Ohlmeier, S., A. J. Kastaniotis, J. K. Hiltunen, y U. Bergmann. *The yeast mitochondrial proteome, a study of fermentative and respiratory growth.* J. Biol. Chem. **2004.** 279:3956-3979.

BIBLIOGRAFÍA

Ough, C. S. y G. Trioli. *Urea removal from wine by an acid urease.* Am. J. Enol. Vit. **1998.** 39:303-307.

Pahlman, A. K., K. Granath, R. Ansell, S. Hohmann, y L. Adler. *The yeast glycerol 3-phosphatases Gpp1p and Gpp2p are required for glycerol biosynthesis and differentially involved in the cellular responses to osmotic, anaerobic, and oxidative stress.* J. Biol. Chem. **2001.** 276:3555-3563.

Parrou, J. L., M. A. Teste, y J. Francois. *Effects of various types of stress on the metabolism of reserve carbohydrates in Saccharomyces cerevisiae: genetic evidence for a stress-induced recycling of glycogen and trehalose.* Microbiology. **1997.** 143:1891-1900.

Pelissier, P., N. Camougrand, G. Velours, y M. Guerin. *NCA3, a nuclear gene involved in the mitochondrial expression of subunits 6 and 8 of the Fo-F1 ATP synthase of S. cerevisiae.* Curr. Genet. **1995.** 27:409-416.

Pérez-Torrado, R., P. Carrasco, A. Aranda, J. Gimeno-Alcaniz, J. E. Pérez-Ortín, E. Matallana, y M. L. del Olmo. *Study of the first hours of microvinification by the use of osmotic stress-response genes as probes.* Syst. Appl. Microbiol. **2002.** 25:153-161.

Piper, P. W., K. Talreja, B. Panaretou, P. Moradas-Ferreira, K. Byrne, U. M. Praekelt, P. Meacock, M. Recnacq, y H. Boucherie. *Induction of major heat-shock proteins of Saccharomyces cerevisiae, including plasma membrane Hsp30, by ethanol levels above a critical threshold.* Microbiology. **1994.** 140:3031-3038.

Polevoda, B., J. Norbeck, H. Takakura, A. Blomberg, y F. Sherman. *Identification and specificities of N-terminal acetyltransferases from Saccharomyces cerevisiae.* EMBO J. **1999.** 18:6155-6168.

Pretorius, I. S. *Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of winemaking.* Yeast. **2000.** 16:675-729.

BIBLIOGRAFÍA

Puig, S. y J. E. Pérez-Ortín. *Expression levels and patterns of glycolytic yeast genes during wine fermentation.* Syst. Appl. Microbiol. **2000a**. 23:300-303.

Puig, S. y J. E. Pérez-Ortín. *Stress response and expression patterns in wine fermentations of yeast genes induced at the diauxic shift.* Yeast. **2000b**. 16:139-148.

Puig, S., A. Querol, E. Barrio, y J. E. Pérez-Ortín. *Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation.* Appl Environ. Microbiol. **2000c**. 66:2057-2061.

Puig, S., D. Ramon, y J. E. Pérez-Ortín. *Optimized method to obtain stable food-safe recombinant wine yeast strains.* J. Agric. Food Chem. **1998**. 46:1689-1693.

Quail, M. A. y L. K. Steven. *The extraction and analysis of sterols from yeasts*, p. 123-131. In I. Evans (ed.), *Methods in Molecular Biology*, Vol. 53: Yeast protocols. **1993**. Humana Press Inc., Totowa, NJ.

Querol, A., E. Barrio, T. Huerta, y D. Ramon. *Molecular monitoring of wine fermentations conducted by active dry yeast strains.* Appl. Environ. Microbiol. **1992a**. 58:2948-2953.

Querol, A., E. Barrio, T. Huerta, y D. Ramon. *Utilization of molecular techniques for the characterization of wine yeasts and the study of the wine-making process.* Microbiologia. **1993**. 9:76-82.

Querol, A., T. Huerta, E. Barrio, y D. Ramon. *Strain for use as dry yeast in fermentation of Alicante wine: selection and DNA patterns.* J. Food Sci. **1992b**. 57:183-185.

Querol, A., E. Barrio, y D. Ramon. *Population dynamics of natural *Saccharomyces* strains during wine fermentation.* Int. J. Food Microbiol. **1994**. 21:315-323.

Querol, A., M. T. Fernández-Espinar, M. I. del Olmo, y E. Barrio. *Adaptive evolution of wine yeast.* Int. J. Food Microbiol. **2003**. 86:3-10.

BIBLIOGRAFÍA

- Rachidi, N., P. Barre, y B. Blondin.** *Multiple Ty-mediated chromosomal translocations lead to karyotype changes in a wine strain of Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Gen. Genet. **1999.** 261:841-850.
- Rainieri, S., C. Zambonelli, J. E. Hallsworth, A. Pulvirenti, y P. Giudici.** *Saccharomyces uvarum, a distinct group within Saccharomyces sensu stricto.* FEMS Microbiol. Lett. **1999.** 177:177-185.
- Rank, G. H., J. H. Gerlach, y A. J. Robertson.** *Some physiological alteration associated with pleiotropic cross resistance and collateral sensitivity in Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Gen. Genetics. **1976.** 144:281-288.
- Rankine, B.** *Manual práctico de enología.* **2000.** Acribia S.A., Zaragoza, España.
- Riou, C., J. M. Nicaud, P. Barre, y C. Gaillardin.** *Stationary-phase gene expression in Saccharomyces cerevisiae during wine fermentation.* Yeast. **1997.** 13:903-915.
- Roby, J. F. y W. J. Whelan.** *Reducing value methods for maltodextrins. I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper.* Anal. Biochem. **1972.** 45:510-516.
- Rodicio, R. y J. Heinisch.** *Isolation of the yeast phosphoglyceromutase gene and construction of deletion mutants.* Mol. Gen. Genet. **1987.** 206:133-140.
- Roosen, J., K. Engelen, K. Marchal, J. Mathys, G. Griffioen, E. Cameroni, J. M. Thevelein, C. De Virgilio, B. De Moor, y J. Winderickx.** *PKA and Sch9 control a molecular switch important for the proper adaptation to nutrient availability.* Mol. Microbiol. **2005.** 55:862-880.
- Rosenfeld, E., B. Beauvoit, B. Blondin, y J. M. Salmon.** *Oxygen consumption by anaerobic Saccharomyces cerevisiae under enological conditions: effect on fermentation kinetics.* Appl. Environ. Microbiol. **2003.** 69:113-121.

BIBLIOGRAFÍA

Rossignol, T., L. Dulau, A. Julien, y B. Blondin. *Genome-wide monitoring of wine yeast gene expression during alcoholic fermentation.* *Yeast.* **2003.** 20:1369-1385.

Sahara, T., T. Goda, y S. Ohgiya. *Comprehensive expression analysis of time-dependent genetic responses in yeast cells to low temperature.* *J. Biol. Chem.* **2002.** 277:50015-50021.

Sajbidor, J., Z. Ciesarova, y D. Smogrovicova. *Influence of ethanol on the lipid content and fatty acid composition of *Saccharomyces cerevisiae*.* *Folia Microbiol.* **1995.** 40:508-510.

Salmon, J. M. y P. Barre. *Improvement of nitrogen assimilation and fermentation kinetics under enological conditions by derepression of alternative nitrogen-assimilatory pathways in an industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain.* *Appl. Environ. Microbiol.* **1998a.** 64:3831-3837.

Salmon, J. M., C. Fornairon, y P. Barre. *Determination of oxygen utilization pathways in an industrial strain of *Saccharomyces cerevisiae* during enological fermentation.* *J. Ferm. Bioeng.* **1998b.** 86:154-163.

Sambrook, J., D. W. Russell, y J. Sambrook. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* **2001.** Cold Spring Harbor.

Schmelzle, T. y M. N. Hall. *TOR, a central controller of cell growth.* *Cell.* **2000.** 103:253-262.

Schreve, J. L. y J. M. Garrett. *Yeast *Agp2p* and *Agp3p* function as amino acid permeases in poor nutrient conditions.* *Biochem. Biophys. Res. Com.* **2004.** 313:745-751.

Schricker, R., V. Magdolen, A. Kaniak, K. Wolf, y W. Bandlow. *The adenylate kinase family in yeast: identification of *URA6* as a multicopy suppressor of deficiency in major AMP kinase.* *Gene.* **1992.** 122:111-118.

Sechi, S. y B. T. Chait. *Modification of cysteine residues by alkylation. A tool in peptide mapping and protein identification.* *Anal. Chem.* **1998.** 70:5150-5158.

BIBLIOGRAFÍA

Sherman, F., G. R. Fink, y J. Hicks. *Techniques and Protocols: Yeast RNA Isolation.* In *Methods in Yeast Genetics.* **1994.** Cold Spring Harbor Laboratory Press, NY.

Shevchenko, A., M. Wilm, O. Vorm, y M. Mann. *Mass spectrometric sequencing of proteins silver-stained polyacrylamide gels.* *Anal. Chem.* **1996.** 68:850-858.

Snow, R. *Genetic improvement of wine yeast,* p. 439-459. In J. F. T. Spencer, D. M. Spencer, and A. R. W. Smith (eds.), *Yeast Genetics. Fundamental and Applied Aspects.* **1983.** Springer-Verlag, New York.

Stanhill, A., N. Schick, y D. Engelberg. *The yeast Ras/cyclic AMP pathway induces invasive growth by suppressing the cellular stress response.* *Mol. Cell. Biol.* **1999.** 19:7529-7538.

Stearman, R., D. S. Yuan, Y. Yamaguchi-Iwai, R. D. Klausner, y A. Dancis. *Permease-oxidase complex involved in high-affinity iron uptake in yeast.* *Science.* **1996.** 271:1552-1557.

Stephen, D. W., S. L. Rivers, y D. J. Jamieson. *The role of the YAP1 and YAP2 genes in the regulation of the adaptive oxidative stress responses of Saccharomyces cerevisiae.* *Mol. Microbiol.* **1995.** 16:415-423.

Tercero, J. C., J. D. Dinman, y R. B. Wickner. *Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal four amino acids of the major coat protein (gag) of the L-A double-stranded RNA virus.* *J. Bacteriol.* **1993.** 175:3192-3194.

Tercero, J. C., L. E. Riles, y R. B. Wickner. *Localized mutagenesis and evidence for post-transcriptional regulation of MAK3. A putative N-acetyltransferase required for double-stranded RNA virus propagation in Saccharomyces cerevisiae.* *J. Biol. Chem.* **1992.** 267:20270-20276.

Thomas, B. J. y R. Rothstein. *Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA.* *Cell.* **1989.** 56:619-630.

BIBLIOGRAFÍA

Thomas, D. y Y. Surdin-Kerjan. *Metabolism of sulfur amino acids in Saccharomyces cerevisiae.* Microbiol. Mol. Biol. Rev. **1997.** 61:503-532.

Torija, M. J., N. Rozes, M. Poblet, J. M. Guillamon, y A. Mas. *Yeast population dynamics in spontaneous fermentations: Comparison between two different wine-producing areas over a period of three years.* Ant. Van Lew. **2001.** 79:345-352.

Trabalzini, L., A. Paffetti, A. Scaloni, F. Talamo, E. Ferro, G. Coratza, L. Bovalini, P. Lusini, P. Martelli, y A. Santucci. *Proteomic response to physiological fermentation stresses in a wild-type wine strain of Saccharomyces cerevisiae.* Biochem. J. **2003.** 370:35-46.

Travers, K. J., C. K. Patil, L. Wodicka, D. J. Lockhart, J. S. Weissman, y P. Walter. *Functional and genomic analyses reveal an essential coordination between the unfolded protein response and ER-associated degradation.* Cell. **2000.** 101:249-258.

Trioli, G., L. Paroneto. *Relazioni tra componenti azotate dei mosti e qualità dei vini.* Vignevini. **1992.** 1:29-36.

Valera, P., F. Pablos, y A. Gustavo Gonzalez. *Classification of tea samples by their chemical composition using discriminant analysis.* Talanta. **1996.** 43:415-419.

Van Den Hazel, H. B., H. Pichler, M. A. d. V. Matta, E. Leitner, A. Goffeau, y G. Daum. *PDR16 and PDR17, two homologous genes of Saccharomyces cerevisiae, affect lipid biosynthesis and resistance to multiple drugs.* J. Biol. Chem. **1999.** 274:1934-1941.

Vasconcelles, M. J., Y. Jiang, K. McDaid, L. Gilooly, S. Wretzel, D. L. Porter, C. E. Martin, y M. A. Goldberg. *Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of Saccharomyces cerevisiae genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes.* J. Biol. Chem. **2001.** 276:14374-14384.

BIBLIOGRAFÍA

Verstrepen, K. J., D. Iserentant, P. Malcorps, G. Derdelinckx, P. Van Dijck, J. Winderickx, I. S. Pretorius, J. M. Thevelein, y F. R. Delvaux. *Glucose and sucrose: hazardous fast-food for industrial yeast?* Trends Biotechnol. **2004.** 22:531-537.

Vido, K., D. Spector, G. Lagniel, S. Lopez, M. B. Toledano, y J. Labarre. *A proteome analysis of the cadmium response in Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem. **2001.** 276:8469-8474.

Werner-Washburne, M., J. Becker, J. Kosic-Smithers, y E. A. Craig. *Yeast Hsp70 RNA levels vary in response to the physiological status of the cell.* J. Bacteriol. **1989.** 171:2680-8.

Werner-Washburne, M., E. L. Braun, M. E. Crawford, y V. M. Peck. *Stationary phase in Saccharomyces cerevisiae.* Mol. Microbiol. **1996.** 19:1159-1166.

Whitney, P. A. y B. Magasanik. *The induction of arginase in Saccharomyces cerevisiae.* J. Biol. Chem. **1973.** 248:6197-6202.

Wiame, J. M., M. Grenson, y H. N. Arst, Jr. *Nitrogen catabolite repression in yeasts and filamentous fungi.* Adv. Microb. Physiol. **1985.** 26:1-88.

Wieczorke, R., S. Krampe, T. Weierstall, K. Freidel, C. P. Hollenberg, y E. Boles. *Concurrent knock-out of at least 20 transporter genes is required to block uptake of hexoses in Saccharomyces cerevisiae.* FEBS Lett. **1999.** 464:123-128.

Wilcox, L. J., D. A. Balderes, B. Wharton, A. H. Tinkelenberg, G. Rao, y S. L. Sturley. *Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast.* J. Biol. Chem. **2002.** 277:32466-32472.

Wolfger, H., Y. M. Mamnun, y K. Kuchler. *Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification.* Res. Microbiol. **2001.** 152:375-389.

BIBLIOGRAFÍA

Wright, R. M., B. Rosenzweig, y R. O. Poyton. *Organization and expression of the COX6 genetic locus in Saccharomyces cerevisiae: multiple mRNAs with different 3' termini are transcribed from COX6 and regulated differentially.* Nucleic Acids Res. **1989.** 17:1103-1120.

Yamada, M., N. Hayatsu, A. Matsuura, y F. Ishikawa. *Y'-Help1, a DNA helicase encoded by the yeast subtelomeric Y' element, is induced in survivors defective for telomerase.* J. Biol. Chem. **1998.** 273:33360-33366.

Zitomer, R. S. y C. V. Lowry. *Regulation of gene expression by oxygen in Saccharomyces cerevisiae.* Microbiol. Rev. **1992.** 56:1-11.