

DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA
MOLECULAR

MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS
INDUSTRIALES PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE
AROMA SECUNDARIO

GENOVEVA UBER GARCÍA

UNIVERSITAT DE VALENCIA
Servei de Publicacions
2006

Aquesta Tesi Doctoral va ser presentada a València el dia 10 de Novembre de 2005 davant un tribunal format per:

- D. Albert Mas Barón
- D^a. Isabel López Calderón
- D. Ramón González García
- D. José Vicente Gil Ponce
- D. Marcel·lí del Olmo Muñoz

Va ser dirigida per:

D. Daniel Ramón Vidal

D^a. Emilia Matallana Redondo

©Copyright: Servei de Publicacions
Genoveva Uber García

Depòsit legal:

I.S.B.N.:84-370-6481-3

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

MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS INDUSTRIALES PARA MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE AROMA SECUNDARIO

Trabajo realizado por la Lda Genoveva Uber García en el Departamento de Biotecnología del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas para optar al grado de Doctor en Bioquímica por la Universitat de València.

Valencia, julio de 2005.

EMILIA MATALLANA REDONDO, Doctora en Ciencias Biológicas y Profesora Titular del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular de la Universitat de Valencia.

DANIEL RAMÓN VIDAL, Doctor en Ciencias Biológicas y Catedrático del Departamento de Medicina Preventiva y Salud Pública, Bromatología, Toxicología, Medicina Legal de la Universitat de València.

CERTIFICAN que la presente Tesis Doctoral titulada “Modificación genética de levaduras vínicas industriales para mejorar la producción de aroma secundario” ha sido realizada por la Licenciada en Bioquímica, D^a. Genoveva Uber García bajo su dirección en sus laboratorios del Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en Valencia.

Valencia 21 de julio de 2005.

Fdo: EMILIA MATALLANA REDONDO

Fdo: DANIEL RAMÓN VIDAL

ÍNDICE	3
Abreviaturas	8
INTRODUCCIÓN GENERAL	11
1.- El aroma del vino.	11
2.- Calidad e intensidad aromática. Alcoholes y ésteres aromáticos como intermediarios metabólicos relevantes.	16
3.- Metabolismo de alcoholes y ésteres aromáticos: Mecanismos bioquímicos en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	20
3.1.- Mecanismos biosintéticos de alcoholes superiores.	21
3.1.1.- Dualidad funcional de la proteína Thi3p .	25
3.1.2.- Mecanismos de percepción y transporte de aminoácidos.	26
3.2.- Mecanismos biosintéticos de ésteres aromáticos.	32
3.3.- Mecanismos de degradación de ésteres aromáticos.	37
4.- Mejora genética de levaduras vínicas: Aplicaciones biotecnológicas.	39
4.1.- El aroma: paradigma de la biotecnología enológica contemporánea.	41
OBJETIVOS	45
MATERIALES Y MÉTODOS	47
1.- Materiales.	47
1.1.- Cepas de levadura.	47
1.2.- Plásmidos.	50
1.3.- Oligonucleótidos.	51
1.4.- Productos de especial interés.	53

2.- Preparación del material biológico.	55
2.1.- Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.	55
2.1.1.- Crecimiento de la bacteria <i>Escherichia coli</i> .	55
2.1.2.- Crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio.	59
2.1.3.- Crecimiento de levaduras en condiciones de microvinificación.	56
2.1.4.- Medios para la determinación del transporte de leucina.	56
2.2.- Transformación de microorganismos.	58
2.2.1.- Transformación de <i>E. coli</i> .	58
2.2.2.- Transformación de <i>S. cerevisiae</i> .	58
2.3.- Deleción génica por el método de “Short Flanking Homology” (SFH).	58
2.3.1.- Eliminación del marcador de selección integrado en el genoma.	61
2.4.- Obtención de DNA.	62
2.4.1.- Extracción de plásmidos de <i>E. coli</i> .	62
2.4.2.- Extracción de DNA genómico de levadura.	63
2.5.- Extracción de RNA total de levadura.	63
3.- Técnicas de manipulación y análisis de ácidos nucleicos.	64
3.1.- Tratamientos enzimáticos del DNA.	64
3.2.- Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).	64
3.3.- Electroforesis de DNA en geles de agarosa.	64
3.4.- Aislamiento de DNA a partir de geles de agarosa.	65
3.5.- Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa.	65
3.6.- Transferencia de ácidos nucleicos a filtros.	66
3.7.- Marcaje radiactivo del DNA.	66
3.8.- Hibridación de DNA y RNA sobre filtros con sondas radiactivas.	66
3.9.- Autoradiografía de los filtros hibridados.	67

4.- Otras técnicas utilizadas.	67
4.1.- Cuantificación de ésteres y alcoholes por microextracción en fase sólida en espacio de cabeza por cromatografía de gases, HS-SPME-GC.	67
4.2.- Cuantificación de azúcares reductores.	68
4.3.- Determinación del transporte y cuantificación de Leucina.	69
4.3.1.- Ensayo de transporte.	69
4.3.2.- Cuantificación de leucina en el interior y exterior celular.	69

RESULTADOS Y DISCUSIÓN 71

CAPÍTULO 1: Estudio de la contribución de las actividades alcohol acetil transferasa y éster hidrolasa al perfil de ésteres aromáticos producido por *S. cerevisiae*. 71

1.- Selección del perfil aromático.	72
2.- Obtención de mutantes de pérdida de función en los genes que codifican la alcohol acetiltransferasa I y II (Atf1p , Atf2p) y la éster hidrolasa II (Iah1p).	73
3.- Análisis de los mutantes simples 4741 Δ atf1, 4741 Δ atf2, 4741 Δ iah1 y múltiples 4741 Δ atf1 Δ atf2 y 4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1.	76
3.1.-Análisis por cromatografía de gases de las cepas construidas.	77
3.1.1.- Análisis del mutante simple BY4741 Δ atf1.	77
3.1.2.- Análisis del mutante simple BY4741 Δ atf2.	81
3.1.3.- Análisis del mutante simple BY4741 Δ iah1	85
3.1.4.- Análisis de los mutantes doble, BY4741 Δ atf1atf2 y triple BY4741 Δ atf1atf2 Δ iah1.	89
4.- Conclusiones.	95

CAPÍTULO 2: Obtención de cepas de levadura de laboratorio e industriales sobreproductoras de ésteres de acetato.	99
1.- Posibles estrategias orientadas a mejorar la producción de ésteres de acetato.	99
2.- Estrategia 1: Sobreexpresión regulada del gen <i>ATF1</i> .	102
2.1.- Obtención del plásmido de sobreexpresión.	102
2.2.- Sobreexpresión del gen <i>ATF1</i> bajo el control del promotor del gen <i>TDH3</i> en condiciones de laboratorio.	103
2.3.- Conclusiones.	111
3.- Estrategia 2: Deleción del gen <i>IAH1</i> .	113
3.1.- Obtención de mutantes en el gen que codifica la éster hidrolasa <i>Iah1p</i> en cepa vínica industrial.	114
3.2.- Análisis del perfil aromático en condiciones de laboratorio.	115
3.3.- Conclusiones.	120
4.- Estrategia 3: Sobreexpresión del gen <i>THI3</i> .	121
4.1.- Obtención de las cepas recombinantes.	121
4.2.- Análisis de la sobreexpresión del gen <i>THI3</i> y de sus efectos en condiciones de laboratorio.	122
4.3.- Conclusiones.	133
5.- Estrategia 4: Deleción de transportadores de aminoácidos.	136
5.1.- Capacidad de incorporación de leucina.	138
5.2.- Transporte de leucina.	143
5.3.- Cuantificación del “pool” de leucina mediante análisis HPLC.	149
5.4.- Conclusiones.	160

CAPÍTULO 3: Aplicación biotecnológica de las cepas sobreproductoras de ésteres de acetato.	163
1.- Mejora del perfil aromático en condiciones de microvinificación.	164
1.1.- Perfil aromático de la cepa que sobreexpresa el gen <i>ATF1</i> en condiciones de microvinificación.	165
1.2.- Perfil aromático de la cepa carente del gen <i>IAH1</i> en condiciones de microvinificación.	169
2.- Estudio de la utilidad de las cepas sobreproductoras de ésteres de acetato como factorías celulares.	174
2.1.- Estrategia optimizada de delección del gen <i>IAH1</i> : Análisis del perfil aromático en condiciones de laboratorio con limitación de oxígeno.	175
2.2.- Estrategia combinada: sobreexpresión del gen <i>ATF1</i> y delección del gen <i>IAH1</i> . Análisis del perfil aromático en condiciones de laboratorio a distintas concentraciones de glucosa.	180
2.3.- Conclusiones.	194
CONCLUSIONES	197
ANEXO 1: Composición y determinación de las curvas de calibrado para la cuantificación de ésteres de acetato y alcoholes aromáticos.	199
1.- Curva patrón de ésteres y alcoholes.	199
2.- Gráficas resultantes.	204
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	211

ABREVIATURAS.

A	Adenina
aa	Aminoácido
AATasa	Alcohol acetiltransferasa
atm	Atmósferas
ATP	Adenosina trifosfato
C	Citosina
°C	Grados centígrados
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
dCTP	Desoxirribocitosína trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNS	Ácido 3,5-dinitrosalicílico
dNTPs	desoxirribonucleótidos trifosfato
DO ₆₀₀	Densidad óptica a 600 nm
EDTA	Sal disódica del ácido etilen diamino tetraacético
FGM	"Fermentable Growth Medium-induced"
g	Gramo
ng	nanogramo
µg	microgramo
G	Guanina
GC	Cromatografía de gases
GRAS	Generalmente considerado como seguro
h	Hora
kb	Kilobases de RNA o Kilo pares de bases de DNA
kDa	Kilodalton
LiAc	Acetato de litio
L	Litro
µL	Microlitro
mL	Mililitro

LORE	“Low-Oxygen Response Element”
M	Molar
nM	Nanomolar
μM	Micromolar
MCS	Sitio de clonación múltiple
MES	Ácido 2(N-morfolino)etanosulfónico
nm	Nanometro
μm	Micras
min	Minuto
MOPS	Ácido 3-(N-morfolino) propanosulfónico
mRNA	RNA mensajero
NADH	Nicotín adenín dinucleótido reducido
NCI	Inhibición por catabolito de nitrógeno
NCR	Represión por catabolito de nitrógeno
ng	Nanogramo
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDMS	Polidimetilxilosano
PKA	Proteinquinasa A
ppm	Partes por millón
p/v	Relación directa del peso con el volumen
RNA	Ácido ribonucleico
RNAsa	Ribonucleasa
rpm	Revoluciones por minuto
rRNA	RNA ribosómico
s	Segundos
SDS	Dodecil sulfato sódico
SFH	“Short flanking homology”
T	Timina
TPP	Pirofosfato de tiamina
V/cm	Relación directa voltios con centímetros

INTRODUCCIÓN.

1. EL AROMA DEL VINO.

El aroma es una de las propiedades más importantes en la calidad de un vino. En su sentido más amplio, Robinson (1994), lo define como “un conjunto de impresiones sensoriales tales como olor, sabor,..., incorporando aspectos de textura, acidez, intensidad alcohólica, astringencia, dulzura, amargura, etc...”. Sin embargo, podríamos decir que el aroma hace referencia a la fragancia del vino en si misma diferenciándose entre aroma y “bouquet”. El aroma se asocia exclusivamente con el olor, formado por sustancias de naturaleza volátil sintetizadas durante la fermentación y el “bouquet” como la representación figurativa del aroma formado por sustancias aromáticas más complejas, derivadas de la maduración durante los procesos de crianza y envejecimiento del vino.

Al igual que en otros muchos alimentos, el aroma de un vino está determinado por varios cientos de compuestos volátiles de diversa naturaleza química. Entre ellos se han caracterizado alcoholes, ésteres, aldehidos, cetonas e hidrocarburos, todos ellos a concentraciones muy bajas y con umbrales de detección que varían entre 10^{-4} y 10^{-12} g/L (Guadagni *et al.*, 1963). La concentración de estos compuestos en el producto final depende de factores asociados al cultivo de la uva tales como el clima, el suelo, el riego y el momento de la vendimia, así como de las numerosas variables del proceso de fermentación (pH, temperatura, nutrientes y microflora) y de las operaciones que integran la elaboración del vino como los procesos de filtración o clarificación entre otros. El aroma final derivará del balance y de la interacción de todos estos compuestos.

En términos enológicos y atendiendo al origen de los compuestos que lo constituyen, el perfil aromático de un vino se clasifica en tres categorías denominadas, aroma primario, secundario y terciario (Schreier, 1979; Boulton *et al.*, 1995; Rapp, 1998).

El aroma primario se divide a su vez en aroma varietal y aroma prefermentativo. El aroma varietal se compone de aquellas

sustancias que proceden directamente de la variedad de uva utilizada. El aroma prefermentativo está constituido por compuestos que se generan en el transcurso de la manipulación, preparación, extracción y acondicionamiento del mosto en la bodega.

Durante la última etapa de la maduración de la uva los aromas se acumulan en la piel y en la pulpa de la baya. Por tanto, dependiendo de la variedad de uva utilizada como materia prima para la elaboración del mosto, y también de las condiciones geográficas y climatológicas donde se haya cultivado la vid, las características del aroma y su intensidad pueden variar. Los compuestos volátiles que contribuyen al aroma de la uva son principalmente ésteres del ácido acético y monoterpenos tales como linalol, geraniol, nerol, citronerol, α -terpineol y hotrienol (Rapp y Mandery, 1986). Otros grupos de compuestos aromáticos volátiles que influyen de manera determinante en el aroma del mosto son los aldehídos como el trans-2-hexanal y el n-hexanal, las cetonas, como por ejemplo, 2- y 3-n-alcanonas, y los alcoholes compuestos de n-alcoholes entre 4 y 11 átomos de carbono, alcoholes insaturados y ramificados de cadena corta y alcoholes aromáticos como el alcohol bencílico. En general estos compuestos se forman durante los procesos de elaboración y fabricación del mosto, por tanto se incluirían en la clasificación de aroma prefermentativo (Stevens *et al.*, 1967; Ramshaw y Hardy, 1969; Schreier, 1979).

Por otro lado, cabe señalar también que se ha descrito la existencia en uva de una gran cantidad de compuestos aromáticos en forma glicosilada no volátil (Winterhalter *et al.*, 1990). Dentro de este grupo cabe destacar como más abundantes los terpenos y los monoterpenos. El complejo terpeno-azúcar está formado por un disacárido del que siempre forma parte una molécula de glucosa. El enlace de unión se establece entre la molécula de glucosa y el monoterpeno. Los monoterpenos más comunes y destacables, que forman parte de estos complejos son geraniol, nerol y linalol (Günata *et al.*, 1985). Generalmente, durante el proceso de maduración de la uva, los terpenos glicosilados son transportados desde la piel del grano de uva a la pulpa y pueden ser liberados de los residuos de azúcar por hidrólisis enzimática o química a lo largo de los procesos

prefermentativos y fermentativos, contribuyendo a incrementar el aroma del vino (Pérez-González *et al.*, 1993; Benítez *et al.*, 1996; Sánchez-Torres *et al.*, 1996 y 1998).

El aroma secundario o fermentativo, es el que se atribuye a los compuestos generados por el metabolismo de las levaduras, mayoritariamente las pertenecientes a la especie *Saccharomyces cerevisiae*, ya que es la levadura que finalmente se impone durante el proceso de fermentación alcohólica. También contribuyen en menor grado aquellos compuestos sintetizados por distintas especies de bacterias ácido lácticas durante el proceso de fermentación maloláctica y las levaduras oxidativas y apiculadas presentes durante los primeros días de fermentación.

En un proceso de fermentación alcohólica modelo con la levadura *S. cerevisiae*, a una concentración inicial de azúcares reductores del 20% (p/v), el 95% de azúcar reductor se convierte en etanol y dióxido de carbono. Un 1% es utilizado por la célula para generar su propio material celular y el 4% restante se convierte en otros productos finales, generalmente compuestos de naturaleza volátil (Lambrechts y Pretorius, 2000). Dentro de este grupo se incluyen dos tipos de compuestos relevantes, los alcoholes y los ésteres (Mountounet, 1969; Rapp y Mandery, 1986).

Los alcoholes cuantitativamente mayoritarios procedentes del metabolismo de la levadura son el etanol y el glicerol, seguidos por los dioles y los alcoholes superiores alifáticos (1-propanol, 2-metil-1-propanol, 2-metil-1-butanol y 3-metil-1-butanol) y aromáticos (2-feniletanol). Estos últimos se encuentran presentes en un rango de concentración entre 100 y 500 mg/L (Lambrechts y Pretorius, 2000).

Por lo que se refiere a los ésteres, su producción transcurre en paralelo a la formación del etanol. Aunque se producen en pequeñas cantidades son los compuestos que determinan en mayor intensidad el aroma secundario del vino. El éster mayoritario en vinos es el acetato de etilo y tiene connotaciones aromáticas no deseables (Lambrechts y Pretorius, 2000), pero también se forman otros ésteres

de alcoholes superiores (acetato de isobutilo, de isoamilo, de 2-feniletilo) y de ácidos grasos de cadena corta (caproato de etilo, caprilato de etilo) conocidos como “ésteres afrutados” que son responsables del aroma frutal y floral de los vinos (Ferreira *et al.*, 1995). Para el caso del acetato de isoamilo se ha llegado a describir que la odorosidad de determinados vinos conocida como carácter “duco” (Van Wyk *et al.*, 1979) depende directamente de la cantidad de este compuesto. Por tanto, la presencia de acetato de isoamilo y también la de acetato de 2-feniletilo en el mosto fermentado se considera una cualidad positiva que inspira fragancias afrutadas y por consiguiente, realza la calidad del producto.

Además de estos compuestos, las levaduras sintetizan también otros compuestos aromáticos minoritarios que incluyen: i) aldehídos producidos por la oxidación de los alcoholes (acetaldehído), ii) cetonas y ácidos orgánicos cuyo impacto sensorial sobre el aroma del vino es muy débil (acetona, acetoína, 2, 3-pentadiona y ácido acético), iii) fenoles procedentes del metabolismo de la microflora o bien de la hidrólisis de polifenoles presentes en la uva (4-vinilfenol, 4-vinilguiacol), y iv) compuestos orgánicos sulfurados derivados del metabolismo de aminoácidos azufrados (SH₂) (Lambrechts y Pertorius, 2000).

El aroma terciario o post-fermentativo, aparece como consecuencia de una serie de reacciones enzimáticas y/o físico-químicas que tienen lugar en el proceso de envejecimiento y crianza del vino. Por tanto, dependerá de las condiciones en las que se lleve a cabo dicho proceso. Según el tipo de envejecimiento se distinguen dos tipos de “bouquet”. El “bouquet” de oxidación, cuando el proceso tiene lugar en barrica de madera o el “bouquet” de reducción formado durante el envejecimiento en botella.

El “bouquet” de oxidación es el que deriva de la síntesis de acetaldehídos y/o acetales y también de la extracción de una serie de compuestos procedentes de la madera, así como de la difusión del oxígeno a través de los poros de la misma. La interacción con los productos propios del vino permite el enriquecimiento del aroma que da origen al “bouquet”. Ejemplos de este tipo de compuestos son los

compuestos fenólicos que provienen de la degradación de la lignina de la madera, o lactonas como la 3-metil- γ -octalactona (Masuda y Nishimura, 1971).

El “bouquet” de reducción, característico del envejecimiento en botella, está determinado por la interacción entre los compuestos propios del vino sintetizados durante la fermentación vínica. Dentro de este grupo hay que destacar los residuos de carbohidratos como el furfural (Rapp y Mandery, 1986) y los derivados de los precursores norisoprenoides como el vitispirano (Simpson y Miller, 1983). En estrecha relación con la obtención de un “bouquet” maduro se encuentran los compuestos azufrados reducidos como el sulfuroso de dietilo (Marais *et al.*, 1979). Respecto a los ésteres de acetato presentes en el mosto fermentado, a excepción del acetato de etilo, del succinato de dimetilo y de los ésteres etílicos de caproato y caprilato, la concentración del resto disminuye durante el envejecimiento. Consecuentemente, habrá una pérdida del carácter afrutado y de la sensación de frescura del vino joven. Por lo que se refiere a los alcoholes superiores, su concentración durante esta etapa disminuye o permanece prácticamente constante (Simpson, 1979; Marais y Pool, 1980). Por último hay que destacar que la concentración de los alcoholes monoterpénicos del vino procedentes de la uva, como el linalol, geraniol y citronelol, disminuyen a la vez que aumenta la del óxido de nerol, hotrienol, hidroxilinalol e hidroxicitronelol (Rapp y Mandery, 1986).

Pese a la complejidad de esta clasificación, el aroma genérico de fondo, se atribuye mayoritariamente, a compuestos aromáticos sintetizados por la levadura vínica *S. cerevisiae* a lo largo de la fermentación alcohólica (Mauricio *et al.*, 1993; Lilly *et al.*, 2000), es decir, al aroma secundario. Los metabolitos secundarios más relevantes en el aroma genérico de fondo son los ésteres volátiles con fragancias aromáticas y sus correspondientes precursores alcohólicos. En términos generales, se considera que su contribución está íntimamente relacionada con la percepción de la calidad del vino (Lambrechts y Pretorius, 2000; Pisarnitskii, 2001; Verstrepen *et al.*, 2003b y 2003c).

2. CALIDAD E INTENSIDAD AROMÁTICA. ALCOHOLES Y ÉSTERES AROMÁTICOS COMO INTERMEDIARIOS METABÓLICOS RELEVANTES.

Los alcoholes superiores se incluyen dentro del grupo de compuestos aromáticos sintetizados durante la fermentación alcohólica por la levadura *S. cerevisiae*. El término alcohol superior hace referencia a aquellos alcoholes que poseen más de dos átomos de carbono, y poseen un peso molecular y un punto de ebullición superior al del etanol (Lambrechts y Pretorius, 2000). Se caracterizan por su penetrante olor y, consecuentemente, pueden tener un significativo efecto en el sabor y odorosidad de los vinos y bebidas alcohólicas. Generalmente se producen en cantidades elevadas, del orden de 100 a 400 mg/L, y cuando sus concentraciones exceden este intervalo originan un efecto negativo en la percepción sensorial del producto (Rapp y Mandery, 1986). Los alcoholes superiores se clasifican en alcoholes alifáticos y aromáticos. Los alcoholes alifáticos incluyen propanol, isobutanol, hexanol e isoamil alcohol, siendo éste último el más significativo cuantitativa y cualitativamente. Los alcoholes aromáticos incluyen el tirosol, el triptofol y el 2-feniletanol (*Tabla 1*). Independientemente de la influencia que puedan ejercer por si mismos sobre las propiedades organolépticas del vino, la importancia enológica de los alcoholes superiores radica en ser los compuestos precursores de los ésteres de acetato (Soles *et al.*,1982).

ALCOHOL SUPERIOR	AMINOÁCIDOS ¹	CONCENTRACIÓN EN VINO (mg/L)	UMBRAL DE DETECCIÓN (mg/L)	AROMA
Propanol	Treonina/ácido 2-amino-butírico	9 - 68	500* 800**	Disolvente
Isobutanol	Valina	9 - 28	500* 200**	Alcohol
Alcohol amil activo	Isoleucina	15 - 150	65**	Mazapán

Alcohol Isoamílico	Leucina	45 - 490	300* 70**	Mazapán
2-Feniletanol	Fenilalanina	10 - 180	125**	Floral, rosas

Tabla 1: Algunos alcoholes superiores producidos por la levadura durante los procesos de fermentación alcohólica (Lambrechts y Pretorius, 2000). (*) En vino; (**) En cerveza.

1: Indica el aa del cual deriva el correspondiente alcohol superior.

Los ésteres son compuestos volátiles con fragancias aromáticas agradables (*Tabla 2*) que se producen durante el proceso de fermentación de las bebidas alcohólicas. En general se generan en pequeñas cantidades y, aunque en el transcurso de la fermentación pueden formarse muchos tipos de ésteres, los más importantes son: i) ésteres polares (2-etilhidroxipropionato, succinato de dietilo, etil-4-hidroxi-butanoato, malato de dietilo o isopentil-2-hidropropionato), usualmente responsables de la textura, densidad y espesor, por lo que dan al vino cuerpo y consistencia, ii) los ésteres apolares donde se incluyen los ésteres de acetato de alcoholes superiores (acetato de etilo, acetato de isoamilo, acetato de isobutilo, acetato de 2-feniletilo) y los ésteres de etilo de ácidos grasos saturados (butanoato de etilo, octanoato de etilo, también llamado caproato de etilo, hexanoato de etilo denominado caprilato de etilo, o propanoato de etilo) (Baumes *et al.*, 1986). Dentro de este último grupo, los ésteres de acetato de alcoholes superiores se asocian al aroma frutal, floral y fresco de los vinos jóvenes contribuyendo además a modular su calidad aromática. Así por ejemplo, en vinos blancos la presencia de una mezcla de estos compuestos contribuye a proporcionar una percepción afrutada, mientras que en vinos tintos contribuyen a modular su calidad aromática (Ferreira *et al.*, 1995).

Indistintamente, ambos grupos de ésteres se caracterizan por su naturaleza volátil, por ser compuestos derivados del metabolismo secundario de la levadura, por tener un rango de concentración, en la

INTRODUCCIÓN

mayoría de los casos muy bajo y, sobre todo, porque su contribución al aroma individual tiene un efecto sinérgico. Raramente una propiedad aromática particular se asocia con un éster concreto (Van Rooyen *et al.*, 1982). En la *Tabla 2* se muestran algunos de estos compuestos junto a su concentración, su umbral de detección y su aroma característico. Por tanto, el perfil aromático de un producto tan complejo como el vino no es atribuible a un solo compuesto de impacto sino que es el resultado de la combinación proporcional entre los distintos compuestos en conjunción con su adecuada interacción. Dicha combinación e interacción serán las que finalmente determinarán la calidad e intensidad aromática del producto (Noble, 1994; Cole y Noble, 1995; Lambrechts y Pretorius 2000).

ÉSTER	CONCENTRACIÓN EN VINO (mg/L)	UMBRAL DE DETECCIÓN (mg/L)	AROMA
Acetato de etilo	10 - 100	15 - 20	Barniz, disolvente
Acetato de 2-feniletilo	0,01 - 4,5	0,01 - 8,0	Rosa, miel, afrutado y floral
Acetato de isoamilo	0,03 - 8,1	0,26	Plátano, pera
Acetato de isobutilo	0,01 - 0,8	1,6 (cerveza)	Plátano
Acetato de hexilo	0 - 4,8	0,67 - 2,4	Manzana madura
Butanoato de etilo	0,01 - 3	0,4 (cerveza)	Floral, afrutado
Caprilato de etilo	0,05 - 3,8	0,258 - 0,58	Piña, pera
Caproato de etilo	Trazas - 3,4	0,08	Manzana, plátano, violetas
Isovaleriato de etilo	ND - 3,4	0,003	Manzana, afrutado

2-metil butanoato de etilo	ND -0,9	0,018	Fresa, piña
----------------------------------	---------	-------	-------------

Tabla 2: Características de algunos ésteres sintetizados por la levadura durante los procesos de fermentación alcohólica. (ND: no detectado). Esta tabla se ha construido a partir de los datos de Salo, (1970a y 1970b); Peddie, (1990); Riensen (1992); Boulton *et al.*, (1995); Ferreira *et al.*, (2000) y Lambrechts y Pretorius, (2000).

Por otro lado son muchos los factores que pueden afectar a la producción de ésteres aromáticos durante la fermentación alcohólica. Cabe destacar el grado de madurez y el contenido en azúcar de la uva (Houtman *et al.*, 1980a y 1980b), la cepa de levadura utilizada, la temperatura del proceso fermentativo (Piendl y Geiger, 1980), las posteriores fermentaciones alcohólicas o malolácticas, el método de vinificación empleado (Herraiz y Ough 1993; Gómez *et al.*, 1994) o la presencia de materiales insolubles en el mosto (Edwards *et al.*, 1985). También influyen factores posteriores al proceso fermentativo como el tiempo que transcurre en el proceso de envejecimiento, la temperatura o el tipo de almacenamiento (Marais y Pool, 1980; Ramey y Ough, 1980).

En resumen, la concentración final de un éster aromático en el vino, dependerá tanto de su formación y degradación durante las etapas de fermentación y envejecimiento, como de su distribución entre el vino y la levadura (Houtman *et al.*, 1980a y 1980b; Marais y Pool, 1980).

De entre estos compuestos, los más importantes son los ésteres, los alcoholes superiores y los ácidos grasos (Pretorius, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003a y 2003c). Todos ellos derivan de rutas biosintéticas y degradativas de carbohidratos, aminoácidos y de ácidos grasos (*Figura 1*).

3.1. Mecanismos biosintéticos de alcoholes superiores.

Los alcoholes superiores de interés en el aroma del vino son producidos por las levaduras durante la fermentación a partir de la cadena carbonada de los aminoácidos ramificados como la fenilalanina, valina, isoleucina y leucina (*Tabla 1*). Los compuestos alcohólicos pueden sintetizarse *de novo* a partir de la fuente de carbono, a través de la ruta anabólica del metabolismo de aminoácidos, o bien pueden generarse a partir de los procesos catabólicos del metabolismo de aminoácidos, la denominada ruta de Ehrlich, que implica la liberación de amonio mediante un proceso de desaminación oxidativa (*Figuras 2 y 3*). En ambos casos se obtiene una molécula de α -cetoácido que es el intermediario común donde convergen las dos rutas metabólicas. A partir del α -cetoácido la célula puede generar un aminoácido, siguiendo un proceso de transaminación, que constituiría el paso final de la ruta anabólica. Alternativamente, el α -cetoácido puede ser descarboxilado y reducido para generar un alcohol superior (*Figuras 2 y 3*) (Zoecklein *et al.*, 1995).

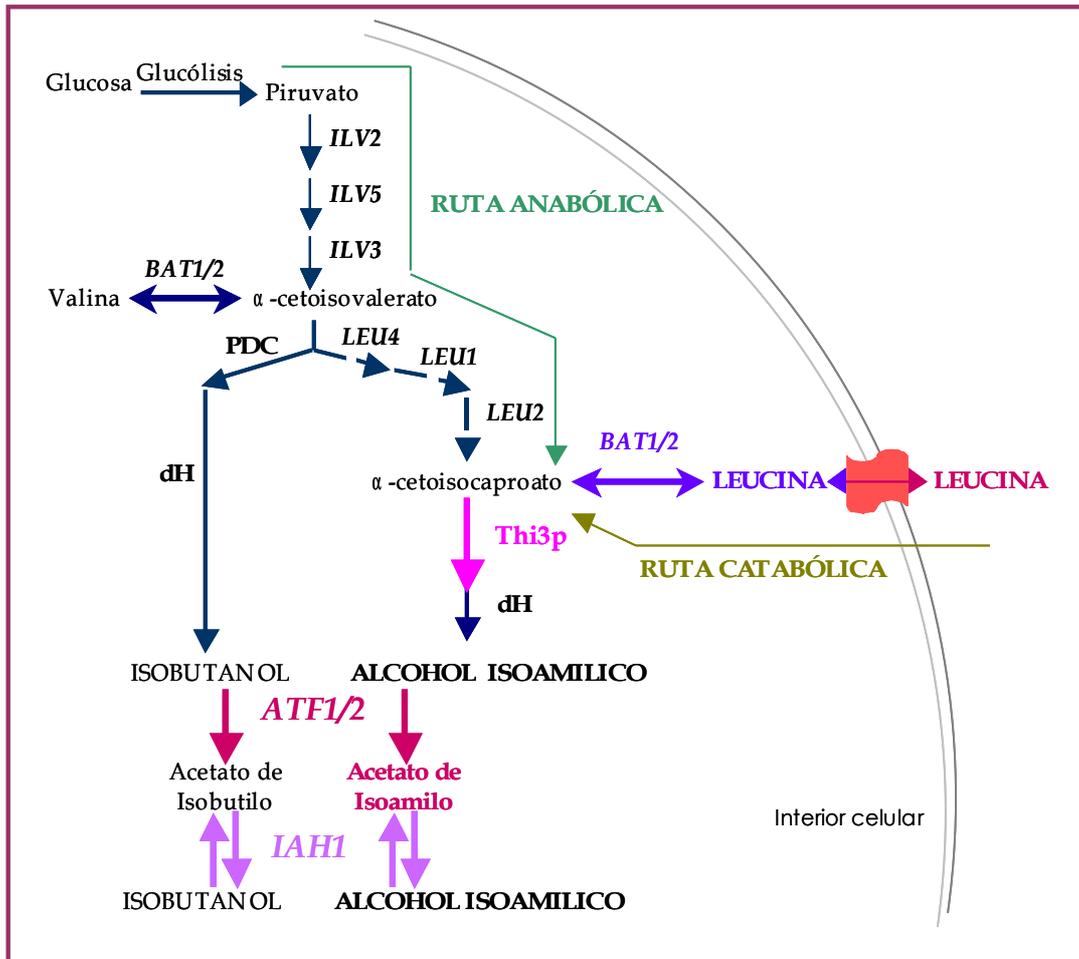


Figura 2: Rutas biosintéticas de los alcoholes superiores isobutanol y alcohol isoamílico y de sus correspondientes ésteres de acetato a partir de las rutas metabólicas de los aminoácidos valina y leucina.

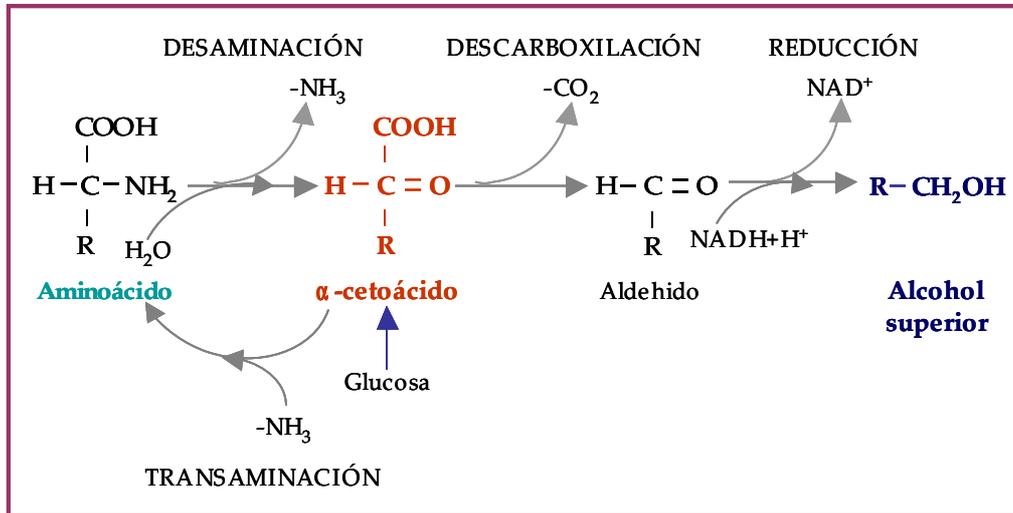


Figura 3: Mecanismo general de producción de alcoholes superiores a partir de cetoácidos procedentes de la desaminación oxidativa de aminoácidos.

Aunque la desaminación oxidativa es un mecanismo de obtención de nitrógeno en condiciones limitantes (Vollbrecht y Radler, 1973) y el proceso de reducción ayuda a mantener el balance redox intracelular por reoxidación del intermediario NADH, no se considera que éstas sean las razones por las que se generan los alcoholes superiores a partir de aminoácidos. Hasta el momento se desconoce su auténtica función fisiológica, no obstante se barajan dos posibilidades. La primera de ellas postula que estos compuestos actúan como un sistema simple para detoxificar el medio intracelular de los aldehídos generados por el catabolismo de aminoácidos (*Figura 3*). La segunda sugiere un mecanismo de regulación del anabolismo de aminoácidos (*Figuras 2 y 3*). La acumulación de alcoholes superiores indicaría un bloqueo o una carencia del nitrógeno útil para la biosíntesis de aminoácidos, por lo que estos compuestos podrían actuar como una señal biológica para modular el metabolismo nitrogenado de las levaduras (Bisson, 1991; Boulton *et al.*, 1995).

Cabe señalar que aunque la obtención de todos los alcoholes superiores derivados de aminoácidos sigue la misma secuencia de reacciones bioquímicas de descarboxilación y reducción (*Figura 3*), existe una batería de actividades enzimáticas descarboxilasa que presentan especificidad por distintos α -cetoácidos y, por tanto, intervienen en la síntesis de distintos alcoholes (Dickinson *et al.*, 2003).

En *S. cerevisiae* se han descrito cinco isoenzimas denominadas **Pdc1p**, **Pdc5p**, **Pdc6p**, YDR380w (**Aro10p**) y YDL080c (**Thi3p**) implicadas en la descarboxilación de los distintos α -cetoácidos. Cada una posee distintos grados de especificidad por los diferentes sustratos. Los datos bibliográficos indican que la descarboxilación del α -cetoisovalerato genera isobutanol procedente de la ruta metabólica del aminoácido valina y está catalizada por las descarboxilasas **Pdc1p**, **Pdc5p**, **Pdc6p** (Dickinson *et al.*, 1998). La descarboxilación del α -ceto- β -metilvalerato, derivado del metabolismo del aminoácido isoleucina, puede ser catalizada por cualquiera de las cinco isoenzimas, y produce alcohol amil activo (Dickinson *et al.*, 2000). La proteína **Aro10p** es la enzima encargada de descarboxilar el fenilpiruvato resultante del metabolismo del aminoácido fenilalanina, para la obtención de 2-feniletanol (Vuralhan *et al.*, 2003). Finalmente, el mecanismo de descarboxilación del α -cetoisocaproato resultante del metabolismo del aminoácido leucina, está catalizado por la proteína **Thi3p** (Dickinson *et al.*, 1997).

Respecto a la reacción de reducción, las investigaciones realizadas hasta la fecha, sugieren que en principio la presencia de cualquiera de las seis alcohol deshidrogenasas descritas en *S. cerevisiae* (**Adh1p**, **Adh2p**, **Adh3p**, **Adh4p**, **Adh5p** y **Sfa1p**), es suficiente para catalizar el paso final en la formación de los compuestos alcohólicos derivados de aminoácidos ramificados (Dickinson *et al.*, 2003).

3.1.1. Dualidad Funcional de la proteína **Thi3p**.

El gen **THI3** fue inicialmente caracterizado como un factor implicado en la regulación positiva del transporte y metabolismo de la tiamina (Nishimura *et al.*, 1992). Sin embargo, estudios posteriores realizados por Dickinson y colaboradores (1997) demostraron que la ruta metabólica de síntesis de alcohol isoamílico requiere la descarboxilación del intermediario α -cetoisocaproato y, que en ausencia del gen **THI3**, la cantidad de alcohol isoamílico sintetizado *in vivo* e *in vitro* disminuía considerablemente. Por otro lado, estudios previos de alineamiento de secuencias de aminoácidos ponían de manifiesto que la secuencia de la proteína **Thi3p** presentaba una elevada homología con las enzimas **Pdc1p**, **Pdc5p** y **Pdc6p**, encontrándose muy conservada la región de unión a pirofosfato de tiamina (Hawkins *et al.*, 1989). Por todo ello, la proteína **Thi3p**, que presenta un dominio de unión para la tiamina (Dickinson *et al.*, 1997, 2003), se incluye en la familia de las descarboxilasas y es responsable del 94% de la descarboxilación del α -cetoisocaproato a alcohol isoamílico (ver *Figura 3*; Dickinson *et al.*, 2003). Otras descarboxilasas de α -cetoácidos, como **Aro10p** (Dickinson *et al.*, 2003) y **Pdc1p** (Yoshimoto *et al.*, 2001) serían las responsables del porcentaje restante del proceso de obtención de alcohol isoamílico.

La presencia de dos dominios protéicos en su estructura molecular junto con la doble caracterización independiente del gen **THI3** muestran la dualidad funcional de su producto génico. La proteína **Thi3p** es un catalizador de la reacción de descarboxilación del α -cetoisocaproato (Dickinson *et al.*, 1997) y un regulador positivo en el metabolismo de la tiamina (Nishimura *et al.*, 1992; Hohmann y Meacock, 1998; Burrows *et al.*, 2000). Hasta el momento se desconoce la relación de una función con la otra en el metabolismo global de la levadura y también cuál es la conexión de esta funcionalidad dual con el estado fisiológico celular. Se sabe que la actividad desacarboxilasa es dependiente *in vitro* de la presencia del cofactor pirofosfato de tiamina (TPP), al igual que en las descarboxilasas **Pdc1p**, **Pdc5p**, **Pdc6p** y **Aro10p** (Hohmann y Meacock, 1998, Dickinson *et al.*, 2003, Vuralhan *et al.*, 2003). En lo concerniente a la función reguladora, distintos autores han demostrado que, a

diferencia del resto de descarboxilasas, la unión de TPP a la proteína **Thi3p** actúa como un sensor-activador de los niveles intracelulares de este compuesto en el metabolismo de la tiamina junto con las proteínas **Thi2p** y **Pdc2p**. La levadura *S. cerevisiae* dispone de un sistema de biosíntesis de TPP endógeno y un sistema de transporte activo. Ambos procesos están sujetos a un fuerte control de regulación por el que en presencia de tiamina exógena los genes implicados en la síntesis *de novo* están reprimidos, mientras que los genes que contribuyen al transporte se activan (Burrows *et al.*, 2000). Al contrario, cuando las células están saturadas de TPP se detiene el transporte y se reprimen la expresión de los genes implicados en los mecanismos de síntesis y de transporte de dicho cofactor (Schweingruber *et al.*, 1986; Nosaka *et al.*, 1989, 1993 y 1994; Praekelt *et al.*, 1994; Kawasaki *et al.*, 1990). En *Schizosaccharomyces pombe*, por ejemplo, la represión ocurre cuando la concentración intracelular de TPP es de 9 pmol/10⁷ células, aproximadamente el doble de la cantidad basal (Maundrell, 1990; Praekelt *et al.*, 1994; Fankhauser *et al.*, 1995). Estos perfiles de expresión oscilante, sugieren que el factor clave que controla la regulación de ambos procesos, síntesis y transporte, es el “pool” de TPP intracelular disponible (Nosaka *et al.*, 1993, 1994; Praekelt *et al.*, 1994; Burrows *et al.*, 2000).

3.1.2. Mecanismos de percepción y transporte de aminoácidos.

La levadura *S. cerevisiae* usa selectivamente una amplia variedad de nutrientes que puede encontrar en su hábitat natural o, en su caso, sintetizar. De entre estas sustancias las más utilizadas son aquellas que contienen átomos de carbono y de nitrógeno. El transporte al interior celular es el primer paso a partir del cual el suministro de nutrientes está altamente regulado en función de las necesidades intracelulares y de las condiciones del entorno.

En particular, la utilización de los aminoácidos está predeterminada por la habilidad de la célula para reconocer estos compuestos e incorporarlos al interior celular a través de la membrana plasmática. Una vez internalizados estos aminoácidos pueden ser utilizados tal cual para sintetizar proteínas celulares *de novo*, pueden ser

acumulados y almacenados en sus reservorios citosólicos, o bien pueden incorporarse al catabolismo celular. En este último caso la célula los utiliza como fuente de nitrógeno, liberando el grupo amino para sintetizar otros compuestos nitrogenados de interés como por ejemplo iones de amonio, glutamato o glutamina. Así mismo, el esqueleto carbonado servirá para la síntesis de otros compuestos carbonados o se liberará al exterior en forma de alcohol o éster (Hórak, 1986; Large, 1986).

En cualquier caso, la eficiencia metabólica de dicha fuente nitrogenada dependerá de la expresión, regulación y eficacia de los sistemas sensores y transportadores de aminoácidos, así como del requerimiento energético y de la regulación de los procesos catabólicos y anabólicos.

Desde el punto de vista de la producción de alcoholes y ésteres volátiles relevantes para el aroma del vino, los mecanismos de percepción y de transporte de aminoácidos son importantes ya que la cantidad de alcoholes superiores sintetizados durante un proceso fermentativo depende sobre todo de la concentración de aminoácidos presente en el medio. Diversos autores han demostrado que los aminoácidos influyen en la producción de alcoholes superiores en función del balance establecido entre sus rutas anabólicas y catabólicas y además, que éstas son controladas a su vez por la cantidad de nitrógeno disponible (Schulthess y Ettliger, 1978; Giudici *et al.*, 1993 y Boulton *et al.*, 1995). Así por ejemplo, en condiciones no restrictivas de nitrógeno, existe un incremento en la producción de alcoholes dependiente de la concentración de aminoácidos en el medio, de tal manera que los niveles elevados de aminoácidos presentes en el medio actúan a modo de inhibidores de la ruta anabólica mientras que la acumulación de alcoholes sigue el mecanismo de Ehrlich. Al contrario, cuando las concentraciones de aminoácidos en el medio a fermentar disminuyen, decrece la represión, las rutas anabólicas se activan y la cantidad de alcoholes generados por esta vía aumenta.

En *S. cerevisiae* la entrada de aminoácidos a través de la membrana plasmática es un proceso mediado por una familia de proteínas de membrana denominadas permeasas de aminoácidos. Dichas permeasas llevan a cabo un transporte activo en forma de simporte con protones aprovechando el gradiente electroquímico a través de la membrana. La fuerza motriz que permite dirigir el cotransporte de aminoácidos y protones viene generada por una bomba de protones activa, la bomba ATPasa, situada en la membrana plasmática (Cooper, 1982). Los organismos eucariotas poseen dos tipos de sistemas de transporte de aminoácidos denominados S1 y S2. Los sistemas de transporte S1 incluyen los transportadores capaces de transportar distintos aminoácidos y se caracterizan por ser sistemas de alta afinidad y baja velocidad de transporte, como por ejemplo la permeasa **Gap1p**. Los sistemas de transporte S2 son específicos para un aminoácido concreto o para una familia estructural de aminoácidos más o menos relacionados y son sistemas de baja afinidad pero con una elevada velocidad de transporte, como por ejemplo las permeasas **Agp1p** o **Bap2**. En la *Tabla 3* se describen algunos de los transportadores de aminoácidos ramificados (Ramos *et al.*, 1980; Kotliar y Ramos, 1983; Hórak, 1986; Wainer *et al.*, 1988). En la membrana periplásmica se encuentran múltiples sistemas transportadores con una especificidad por sustrato parcialmente solapante. Todos estos sistemas poseen dos propiedades. La primera es que el transporte es unidireccional, desde el exterior al interior celular. La segunda que la actividad de los transportadores está controlada por un mecanismo de “transinhibición”. Este mecanismo consiste en un proceso de retroalimentación no competitivo en el que los aminoácidos intracelulares o sus productos inhiben la entrada de aminoácidos del exterior celular a través de un mecanismo que produce la reducción de la concentración de transportadores en la membrana plasmática. De este modo se impide que la concentración de aminoácidos en el interior celular sea elevada y se garantiza que la levadura capte una mezcla de aminoácidos, siempre y cuando esta mezcla se encuentre en el medio de crecimiento (Cooper 1982; Hórak, 1986; Grenson, 1992).

Permeasas	Sustratos principales	Regulación	Otros sustratos	Referencias
Gap1p	Todos los aminoácidos	NCR, NCI	L-aa, D-aa, análogos tóxicos de aa, ornitina, citrulina,	Wiame <i>et al.</i> , 1985; Jauniaux y Grenson, 1990; Stanbrough, y Magasanik, 1995
Gnp1p	glutamina	NCR, NCI	Asparagina, treonina, triptofano	Zhu <i>et al.</i> , 1996
Agp1p	Asparagina, glutamina	Inducible por aa	L-aa	Iraqi <i>et al.</i> , 1999a y 1999b
Bap2p	aa ramificados	Inducible por aa	Requiere fuentes ricas en nitrógeno	André <i>et al.</i> , 1993; Grauslund <i>et al.</i> , 1995; Didion <i>et al.</i> , 1996
Bap3p	aa ramificados	Inducible por aa	Requiere fuentes ricas en nitrógeno	de Boer <i>et al.</i> , 1998
Tat1p	Tirosina	Inducible por aa	Triptofano, aa ramificados	Schmidt <i>et al.</i> , 1994; Didion <i>et al.</i> , 1998
Tat2p	Triptófano	Inducible por aa	Tirosina	Schmidt <i>et al.</i> , 1994; Didion, <i>et al.</i> , 1998
Ptr2p	Dipéptidos	Inducible	aa ramificados	Island <i>et al.</i> , 1987; Perry <i>et al.</i> , 1994

Tabla 3: Permeasas implicadas en el transporte de aminoácidos ramificados. NCR (por las siglas en inglés de “nitrogen catabolite repression”). NCI (por las siglas en inglés de “nitrogen catabolite inhibition”)

Atendiendo a los mecanismos de regulación las permeasas de aminoácidos se clasifican en dos grupos. El primero incluye aquellos transportadores de aminoácidos cuya regulación es dependiente del tipo de fuente de nitrógeno presente en el medio. El segundo lo

integran aquellos transportadores de aminoácidos considerados de expresión constitutiva porque sus niveles de expresión no sufren ningún cambio como respuesta a la fuente de nitrógeno presente en el medio (Wiame *et al.*, 1985; Grenson, 1992; Magasanik, 1992). La regulación dependiente de la fuente de nitrógeno puede ejercerse a nivel transcripcional y post-transcripcional. A nivel transcripcional implica represión por catabolito de nitrógeno (NCR), que afecta a la expresión del transportador y a los enzimas que integran las rutas catabólicas del sustrato transportado. A nivel post-transcripcional el mecanismo de control viene representado por la inhibición por catabolito de nitrógeno (NCI) que afecta exclusivamente a la actividad de la permeasa (Olivera *et al.*, 1993). Generalmente la actividad de los transportadores de aminoácidos es elevada cuando la célula crece en fuentes pobres en nitrógeno como urea o prolina, y disminuye en presencia de otras fuentes de nitrógeno de más fácil asimilación que permiten un crecimiento óptimo como glutamina, glutamato y amonio. La disminución o pérdida total de la actividad del transporte puede ocurrir vía NCR y/o NCI ya que ambos mecanismos parecen actuar de forma independiente (Grenson, 1983).

Además de la regulación ejercida por la fuente de nitrógeno disponible existen otros mecanismos de regulación del transporte de aminoácidos como son la estimulación por fuentes de carbono fermentables (Hórak, 1997), la “transinhibición” y la compartimentalización celular mediada por vacuolas o mitocondrias que almacenan los sustratos que se transportan al interior de la célula (Hórak y Ríhová, 1982).

Otro aspecto importante relacionado con las permeasas de aminoácidos es el que se refiere a su biogénesis. Las investigaciones realizadas sugieren que al menos las permeasas **Gap1p**, **Put4p** y **Can1p** siguen el mecanismo de secreción clásico basado en el transporte de proteínas desde el retículo endoplasmático hasta la membrana plasmática (Tschopp *et al.*, 1984). Este mecanismo de secreción requiere la presencia de la proteína **Shr3p**, una proteína integral de membrana del retículo endoplasmático, con un peso molecular de 23,5 kDa cuyo extremo carboxilo es muy hidrofílico y

está expuesto al citoplasma (Ljungdahl *et al.*, 1992). Su ausencia tiene un fenotipo pleiotrópico, siendo el más destacado la disminución de la entrada de aminoácidos mediada por transportadores. Dicha disminución es debida a una reducción de la cantidad de transportadores en la membrana plasmática. Estos hallazgos sugieren que **Shr3p** cataliza de forma altamente específica el plegamiento de los transportadores de aminoácidos, o bien la traslocación específica de éstos necesaria para la inserción de la proteína en la membrana del retículo endoplasmático (Gilstring *et al.*, 1995).

Al margen de los sistemas de transporte, la célula presenta también, en su membrana plasmática toda una serie de sistemas protéicos sensores de nutrientes. Para el caso particular de los aminoácidos, el sistema sensor **SPS** reconoce la presencia de aminoácidos en el exterior celular y transduce la señal al interior celular (Forsberg y Ljungdahl, 2001; Forsberg *et al.*, 2001a). Se compone de tres proteínas codificadas por los genes *SSY1*, *PTR3*, *SSY5*, todos ellos necesarios para desempeñar la función de señalización. El gen *SSY1* codifica una proteína perteneciente a la familia de las permeasas pero que difiere estructural y funcionalmente del resto de permeasas ya que contiene en su extremo amino una extensión de 200 aminoácidos y no transporta aminoácidos. **Ptr3p** y **Ssy5p** son proteínas periféricas asociadas a la membrana plasmática (Klasson *et al.*, 1999; Forsberg y Ljungdahl, 2001; Forsberg *et al.*, 2001a). Las señales nutricionales derivadas del sistema sensor **SPS** convergen en un ajuste del patrón de expresión génica y/o actividad de las permeasas **Agp1p**, **Bap2p**, **Bap3p**, **Dip5p**, **Gnp1p**, **Tat1p**, **Tat2p**, **Ptr2p** (Didion *et al.*, 1998; Iraqui *et al.*, 1999a y 1999b; Klasson *et al.*, 1999; Forsberg y Ljungdahl, 2001; Forsberg *et al.*, 2001a). También hay NCR total de la síntesis de la permeasa general **Gap1p** (Klasson *et al.*, 1999; Forsberg *et al.*, 2001b), con el objetivo de reorganizar y adaptar el metabolismo celular global en consonancia con su entorno.

3.2. Mecanismos biosintéticos de ésteres aromáticos.

En los microorganismos fermentadores los ésteres volátiles se forman intracelularmente y, al ser moléculas liposolubles, difunden la membrana hacia el medio fermentado. Su mecanismo de síntesis consiste en la condensación química entre un alcohol superior y un ácido (*Figura 4a*). Todos los alcoholes y ácidos podrían en principio reaccionar entre sí para formar ésteres. Sin embargo, esta vía de producción se considera demasiado lenta y poco probable durante la fermentación. De acuerdo con los primeros estudios de Nordström (1964), la síntesis de ésteres demanda energía por tanto el mecanismo necesita la presencia de un alcohol superior y de una molécula activa en forma de acil-CoA, mayoritariamente acetil-CoA (*Figura 4b*). De esta forma el enlace tioéster del sustrato acil/acetil-CoA es el que proporciona la energía para que ocurra la condensación aunque se requiere también la catálisis desempeñada por una enzima.

El sustrato acetil-CoA se forma por la descarboxilación oxidativa del piruvato, mecanismo que requiere ácido lipóico y TPP (Piendl y Geiger, 1980), o por la activación del ácido acético que requiere energía en forma de ATP. Este compuesto interviene en multitud de procesos metabólicos no relacionados con la producción de ésteres, como son la biosíntesis de lípidos, de aminoácidos, de ácidos grasos y también en el ciclo de Krebs (Yoshioka y Hashimoto, 1983; Peddie, 1990; Dufour y Malcorps 1994). Respecto al resto de posibles moléculas acil-CoA, hay que destacar que se generan a partir de la acilación del coenzima A catalizada por la acil-CoA sintasa. La síntesis del éster ocurriría igual que la síntesis de ácidos grasos. En el paso final, se formaría un éster cuando estuviera presente un alcohol, o un ácido graso cuando hubiera una molécula de agua (Lambrechts y Pretorius, 2000). Así, el acetil-CoA reaccionaría con los alcoholes superiores rindiendo los ésteres de acetato, mientras que los compuestos acil-CoA reaccionarían con etanol generando los ésteres de etilo.

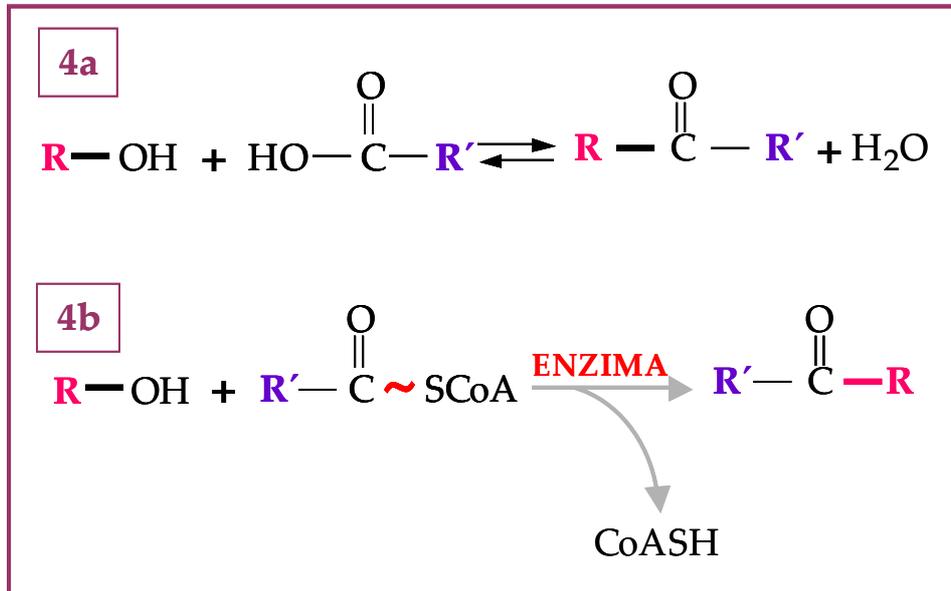


Figura 4: Biosíntesis de ésteres. 4a) Condensación química. 4b) Condensación enzimática.

Como se ha comentado anteriormente, la síntesis de ésteres requiere la catálisis por una enzima. En *S. cerevisiae* hay al menos tres enzimas implicadas en este proceso que se denominan genéricamente éster sintasas, etanol acetiltransferasas o alcohol acetiltransferasas (AATasa).

El gen *ATF1* codifica la alcohol acetiltransferasa I denominada **Atf1p**. Dicho gen fue clonado y secuenciado por Fujii y colaboradores (1994). Se ha descrito un homólogo del gen *ATF1* en *Saccharomyces carlsbergensis* al que se ha nombrado *Lg-ATF1* (Fujii *et al.*, 1996a). Los estudios realizados hasta la fecha demuestran que en la regulación de la expresión génica del gen *ATF1* intervienen multitud de factores convirtiéndolo en un sistema complejo y difícil de caracterizar (*Figura 5*), sobre todo, porque sus niveles de expresión son muy bajos. Aún así, se sabe que se induce en condiciones de crecimiento anaeróbico y que dicha inducción viene regulada por la presencia o ausencia en el medio de oxígeno siguiendo la denominada vía **Rox1p**.

Se conoce también que la expresión del gen *ATF1* se reprime en presencia de ácidos grasos insaturados, especialmente aquellos que tienen un doble enlace en la posición $\Delta 9$ (Fujii *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.* 1998, 1999). Ambos mecanismos están mediados por elementos reguladores en *cis* conocidos como secuencias LORE (por las siglas en inglés de Low-Oxygen Response Element). Estas secuencias se activan en condiciones de hipoxia y se reprimen por ácidos grasos insaturados, estableciendo así un nexo de unión entre ambos sistemas de regulación (Jiang *et al.*, 2001 y 2002; Nakagawa *et al.*, 2002). Finalmente, se ha determinado un tercer mecanismo de regulación de la expresión del gen *ATF1* controlado por la disponibilidad en el medio de compuestos nitrogenados asimilables y por la cantidad de fuente de carbono disponible a través de la proteinquinasa **Sch9p** y la proteinquinasa A (PKA). Este mecanismo se denomina “fermentable growth medium-induced” (FGM) y se activa cuando el medio de crecimiento contiene todos los nutrientes necesarios para el crecimiento fermentativo, incluyendo fuentes de carbono, nitrógeno y fosfatos (Fujiwara *et al.* 1999; Verstrepen *et al.* 2003a y 2003c).

La proteína **Atf1p**, con un peso molecular de 57 kDa, presenta un máximo de actividad a pH 8, es extremadamente lábil (Mason y Dufour, 2000) y se localiza anclada a partículas lipídicas (Verstrepen *et al.* 2004). Su actividad enzimática es dependiente de la composición de ácidos grasos de la membrana celular que la inhiben (Yoshioka y Hashimoto, 1981; Yoshioka y Hashimoto, 1983) y se activa en la etapa final del crecimiento exponencial e inicio de la fase de estacionaria (Malcorps *et al.* 1991; Malcorps y Dufour, 1992; Fujii *et al.*, 1997). En cuanto a su función, se cree que es la responsable mayoritaria en la producción de ésteres de acetato, sobre todo acetato de isoamilo y de etilo (Mason y Dufour, 2000) y que está involucrada en el metabolismo de ácidos grasos, fundamentalmente en la síntesis de triglicéridos y fosfolípidos (Calderbank y Hammond, 1994).

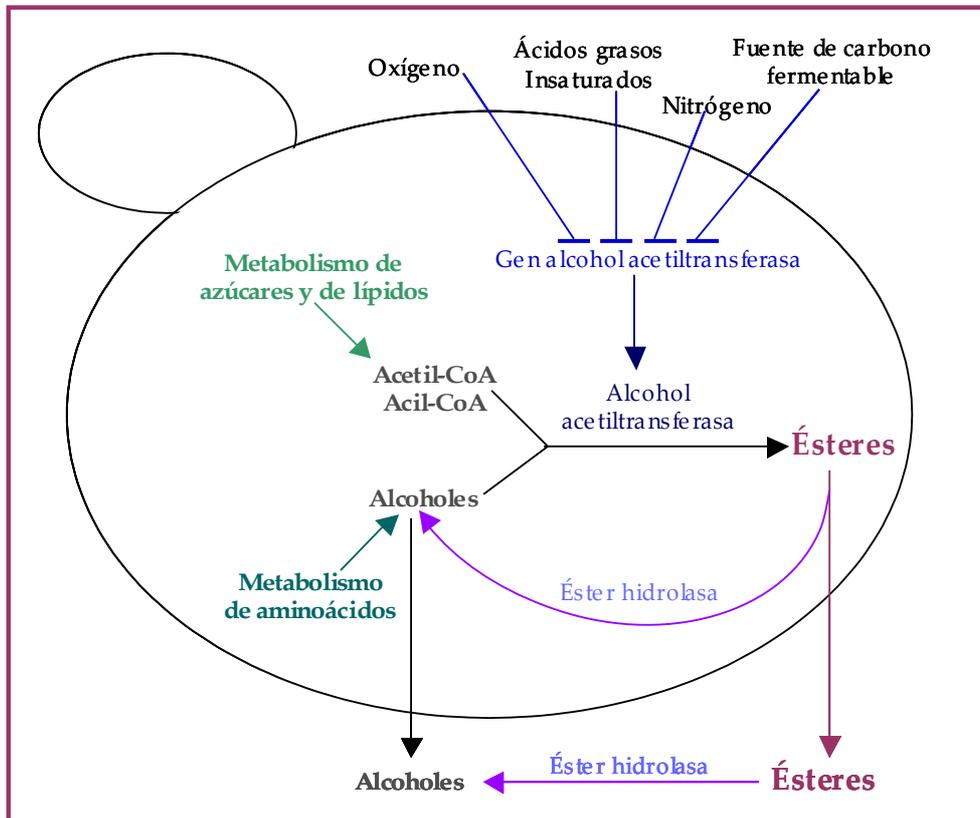


Figura 5: Mecanismos bioquímicos que interviene en los procesos de regulación de la síntesis de ésteres aromáticos (adaptado de Verstrepn *et al.*, 2003b).

El gen *ATF2*, clonado y secuenciado por Nagasawa y colaboradores (1998), codifica la alcohol acetiltransferasa II también denominada *Atf2p*. Presenta niveles de expresión bajos y, al igual que el gen *ATF1*, su transcripción está reprimida por oxígeno, aunque no tanto por la presencia de ácidos grasos insaturados (Mason y Dufour, 2000). Los estudios de homología de secuencia protéica establecen que el grado de identidad entre las proteínas *Atf1p* y *Atf2p* es aproximadamente del 37%, observándose un heptapéptido de secuencia WRLICLP altamente conservado entre las secuencias de ambos genes que, supuestamente, constituye parte del centro activo

de la actividad catalítica alcohol acetiltransferasa (Malcorps y Dufour, 1992; Cauet *et al.*, 1999).

La enzima **Atf2p** se caracteriza por ser una proteína mayoritariamente soluble de 62 kDa que se encuentra en pequeñas cantidades y cuyos niveles de concentración en el medio disminuyen rápidamente tras el agotamiento de nutrientes (Cauet *et al.*, 1999). Por lo que respecta a su función, contribuye en menor grado a la producción de ésteres de acetato, aunque su participación no está bien caracterizada (Fujii *et al.*, 1996b). Además, en los últimos años se ha descrito su implicación en la esterificación de esteroides, en concreto en la esterificación de pregnenolona. Estos últimos hallazgos sugieren una posible participación en procesos de detoxificación (Nagasawa *et al.* 1998; Cauet *et al.*, 1999).

El gen *EHT1* codifica la alcohol acetiltransferasa **Eht1p** que no ha sido estudiada con detalle. Se sabe que cataliza la formación de caprilato de etilo, utilizando como sustratos etanol y hexanoil-CoA. Además, tan solo conserva un 17% de homología con el resto de alcohol acetiltransferasas mencionadas anteriormente, y no incluye el dominio heptapéptido altamente conservado en las proteínas **Atf1p**, **Atf2p** y **Lg-Atf1p** (Malcorps y Dufour, 1992; Mason y Dufour, 2000, Verstrepen *et al.*, 2003c).

Por tanto, las enzimas **Atf1p** y **Atf2p** catalizan mayoritariamente la producción de ésteres aromáticos a partir de acetyl-CoA y alcoholes superiores de cadena corta y media. Los datos bibliográficos sugieren que, aun siendo idéntica la actividad catalítica que ejercen, cada una de ellas presenta distintos grados de afinidad y especificidad por los diferentes sustratos (Mason y Dufour, 2000). Igualmente indican que la síntesis de estos compuestos es un mecanismo gobernado fundamentalmente por la regulación transcripcional donde intervienen multitud de factores. Por consiguiente, el control de la producción de ésteres aromáticos es extremadamente complejo y difícil de predecir (*Figuras 1 y 5*). Finalmente, se sugiere también que la función fisiológica que desempeñan estas enzimas en la síntesis de

ésteres, así como la contribución de cada una de ellas debe ser distinta.

Durante la fase de crecimiento exponencial de las levaduras en una fermentación vínica, las moléculas de oxígeno y de acetil-CoA se consumen rápidamente para mantener la producción de ácidos grasos insaturados y esteroides dirigida al crecimiento celular (Yoshioka y Hashimoto, 1983) y, consecuentemente, la síntesis de ésteres es prácticamente indetectable. Posteriormente, ralentizado el proceso de máxima producción de biomasa, el consumo de acetil-CoA se reparte entre la síntesis de ácidos grasos y la síntesis de ésteres volátiles. Además durante esta etapa de crecimiento los precursores alcohólicos de los ésteres aromáticos comienzan a acumularse, ya que la demanda metabólica de los intermediarios de los cuales derivan los aminoácidos disminuye. Por tanto, la producción de ésteres aumenta. Dicho aumento de producción suele ocurrir a las pocas horas tras el inicio de la fermentación. Finalmente, cuando la síntesis de ácidos grasos y de esteroides concluye, hay un pico en los niveles de acetil-CoA intracelular y, aunque su tiempo de vida media no es muy elevado, contribuye significativamente a que la producción de ésteres aromáticos alcance un valor de producción máxima. Habitualmente este máximo de producción se consigue hacia la mitad del crecimiento fermentativo (Lilly *et al.*, 2000).

3.3. Mecanismos de degradación de ésteres aromáticos.

Una vez sintetizados, los ésteres volátiles pueden ser hidrolizados por ruptura del enlace éster (*Figura 6*). Este proceso hidrolítico también requiere la presencia de una actividad enzimática que lo catalice.

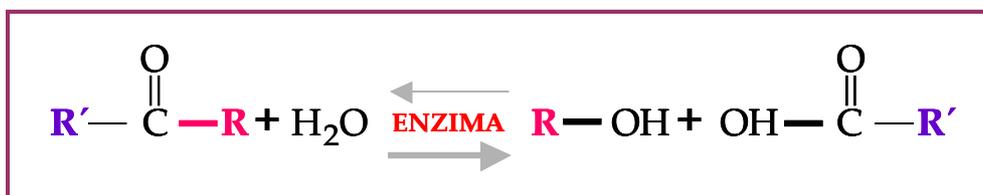


Figura 6. Biodegradación de ésteres de acetato.

Las enzimas éster hidrolasas o esterasas constituyen un grupo muy diverso de proteínas ampliamente distribuidas en la naturaleza que catalizan la hidrólisis de ésteres (Bornscheuer, 2002). Posiblemente también puedan favorecer la síntesis de algunos ésteres, como el acetato de etilo, en ausencia de acetil-CoA (Parkkinen, 1980; Parkkinen y Soumalainen, 1982a, 1982b). No obstante, cabe señalar que dicha capacidad de síntesis de las éster hidrolasas no ha sido demostrada, al menos en levaduras vínicas.

En *S. cerevisiae* se han identificado cuatro genes que codifican las distintas isoenzimas con actividad hidrolasa (Whormann y Lange, 1980). De entre ellas, la más estudiada ha sido la denominada esterasa II o **Iah1p**. El gen que la codifica denominado **IAH1**, fue clonado y caracterizado por Fukuda y colaboradores (1996). Esta hidrolasa preferentemente actúa catalizando la reacción de hidrólisis del acetato de isoamilo (Fukuda *et al.*, 1998b, Fukuda *et al.*, 1998a y 1998b). Aunque es poca la información que se tiene sobre **Iah1p**, se sabe que su masa molecular es de 28 kDa, que en su purificación se puede encontrar actividad hidrolasa, tanto en la fracción soluble como en la insoluble y que es la responsable mayoritaria de la hidrólisis de acetato de isoamilo (Fukuda *et al.*, 1998a y 1998b; Fukuda *et al.*, 2000). Además, diversos estudios realizados demuestran que la actividad éster hidrolasa aumenta en etapas tardías del proceso fermentativo y que, una vez finalizada la fermentación alcohólica, la actividad de hidrólisis sufre un incremento significativo, posiblemente como consecuencia de la lisis celular (Mauricio *et al.*, 1993; Inoue *et al.* 1997).

Dada la existencia de actividades éster hidrolasas y alcohol acetiltransferasas que pueden ser actividades simultáneas, se considera que el balance entre ellas determina los niveles de ésteres producidos en levaduras vínicas (Fukuda *et al.*, 1998a; Lambrechts y Pretorius, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003b).

4. MEJORA GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS: APLICACIONES BIOTECNOLÓGICAS.

La elaboración del vino es un proceso milenario cuya historia se considera intrínseca a la civilización. Las primeras referencias y documentos arqueológicos revelan que hay restos de utensilios arcaicos egipcios y fenicios que testifican la habilidad de estas antiguas civilizaciones en el arte de hacer vino. Desde el año 2000 a. C. en Grecia y Creta se producía esta bebida alcohólica y tras la colonización de los romanos, se extendió por todo el Mediterráneo. En el siglo XVII, antes de conocerse que la elaboración del vino es un proceso de transformación ocasionado por las levaduras, se la consideraba una bebida deliciosa y enormemente saludable. Hasta hoy, el vino continúa acompañando en las comidas y engalanando acontecimientos, es sinónimo de cultura, de estilo de vida e incluso de estatus social.

Tradicionalmente la vinificación era un proceso espontáneo que llevaba a cabo la microflora presente en los fermentadores sin un control microbiológico determinado. Actualmente, el aislamiento y selección de cepas vínicas naturales ha facilitado que la industria vitivinícola moderna pueda usar inóculos de levaduras vínicas exógenas que aseguren una imposición de la cepa seleccionada, el consumo completo de los azúcares del mosto y la finalización de la fermentación en menor tiempo. A pesar de presentar algunos inconvenientes, esta práctica es ya habitual en las bodegas modernas. Permite disminuir la fase de latencia al inicio de la fermentación y controlar microbiológicamente el proceso fermentativo (Longo y Vezinhet, 1993), lo que redundará en un producto de calidad más uniforme a lo largo de las diferentes campañas (Ribéreau-Gayon, 1985; Giudici y Zambonille, 1992; Fleet y Heard, 1992). La identificación por técnicas moleculares de las cepas autóctonas adaptadas a cada región ha permitido su aislamiento y selección para ser utilizadas como inóculos (Querol *et al.*, 1992b; Vezinhet *et al.*, 1992; Guillamón *et al.*, 1996), de manera que hoy por hoy, las bodegas pueden seleccionar la cepa más adecuada para cada vinificación y obtener las características organolépticas y de calidad deseadas. De

esta forma se obtienen unos resultados más satisfactorios en la vinificación (Martini y Vaughan-Martini, 2002).

El surgimiento de la genética molecular moderna, las nuevas tecnologías moleculares y la gran cantidad de conocimientos adquiridos en las últimas décadas sobre la fisiología y genética de *S. cerevisiae* ha hecho que actualmente se disponga de herramientas eficaces y metodologías necesarias para abordar la implantación de mejoras biotecnológicas en el vino. La ingeniería genética ofrece indudablemente, un amplio potencial de oportunidades y sugerencias que ponen de manifiesto el impacto socio-económico que estos progresos innovadores puede aportar tanto a la industria enológica como al consumidor. A pesar de ello, no hay que olvidar el rechazo que un buen sector de los consumidores europeos plantea frente a estos desarrollos (Ramón, 2004)

Aunque las bodegas actuales proporcionan una gran variedad de vinos, la competitividad del mercado asociada a la demanda del consumidor, junto con la exigencia de las industrias del sector de disminuir los costes y aumentar la producción, obliga a las industrias del sector a desarrollar proyectos de optimización y mejora de los procesos de producción, así como a innovar e incrementar la diversidad y variabilidad de los vinos dotándolos de una mayor calidad, reproducible e invariable, o incluso introduciendo nuevas características y propiedades favorables. En este sentido, a pesar de que las levaduras vínicas están adaptadas al proceso de vinificación, hay muchas características potencialmente mejorables orientadas a optimizar aspectos de los procesos industriales utilizando técnicas de ingeniería genética (Querol y Ramón, 1996; Dequin, 2001; Pretorius y Bauer, 2002; Pretorius, 2003).

Además, la demanda por parte de las bodegas de inóculos para las fermentaciones vínicas ha propiciado el desarrollo del proceso de producción de biomasa. Al igual que en la fermentación vínica, es posible introducir mejoras genéticas en cepas de levaduras mediante técnicas de ingeniería genética que les permita conservar una elevada viabilidad y capacidad fermentativa tras ser sometidas a este proceso de producción. De esta forma, el uso como inóculos de estas cepas

mejoradas aseguraría un desarrollo óptimo de la fermentación vínica. De entre las muchas modificaciones realizadas en levaduras vínicas cabe citar como ejemplos la expresión heteróloga de los factores Killer K1 y K2 que conceden a las cepas portadoras una ventaja competitiva durante la vinificación (Boone *et al.*, 1990), o la sobreproducción de la enzima gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa que reduce el tiempo de fermentación alcohólica y el grado alcohólico del producto, aunque también altera las propiedades organolépticas del vino (Michnick *et al.*, 1997; Remize *et al.*, 1999; de Barros Lopes, *et al.*, 2000). Otra estrategia ha sido la desrepresión de rutas de asimilación de fuentes alternativas de nitrógeno para favorecer, en condiciones de NCR, la asimilación de prolina y arginina muy abundantes en los mostos de uva (Salmon y Barre, 1998). También la expresión de L(+)-lactato deshidrogenasa de *Lactobacillus casei* que permite llevar a cabo fermentaciones mixtas ácido-alcohólicas en medios sintéticos produciendo simultáneamente etanol y lactato a partir de la glucosa, con posibles aplicaciones en la obtención de vinos con menor graduación alcohólica pero mayor acidez (Dequin y Barre, 1994; Dequin *et al.*, 1999), o la sobreexpresión del gen que codifica la glucógeno sintasa (*GSY2*) que produce una mayor cantidad de glucógeno incrementando así la viabilidad celular en condiciones de carencia de fuente de carbono (Pérez-Torrado *et al.*, 2002).

4.1. El aroma: paradigma de la biotecnología enológica contemporánea.

El aroma, como ya se ha comentado en otros apartados de este trabajo, es una de las propiedades organolépticas más valorada a la hora de definir la calidad de un vino, pero también una de las más complejas y difíciles de caracterizar puesto que no es atribuible a un solo compuesto de impacto (Van Rooyen *et al.*, 1982), sino que es el resultado de la interacción de cientos de compuestos de distintos orígenes y diversa naturaleza química, siendo la variedad de uva utilizada como materia prima, la cepa vínica predominante en la fermentación alcohólica y la forma de almacenamiento los principales factores de los que depende.

Sin embargo, a pesar de su complejidad, son muchos los esfuerzos encaminados a incrementar y mejorar el perfil sensorial de este producto y, abundante también, el abanico de posibilidades y estrategias que la biotecnología actual nos permite abordar. Así por ejemplo, en la bibliografía encontramos que la expresión de un gen que codifica la α -L-arabinofuranosidasa de *Aspergillus niger* (Sánchez-Torres *et al.*, 1996) u otro que codifica la β -glucosidasa de *Candida molischiana* (Sánchez-Torres *et al.*, 1998) mejora la fracción aromática de los vinos al liberar terpenos aromáticos presentes en el mosto en forma de precursores glicosilados. Un resultado similar se obtiene al expresar una xilanasasa de *Aspergillus nidulans* (Ganga *et al.*, 1999), la ramnosidasa A de *Aspergillus aculeatus* (Manzanares *et al.*, 2003) o la β -(1,4)-endoglucanasa de *Trichoderma longibrachiatum* (Pérez-González *et al.*, 1993). Todas estas estrategias han estado orientadas hacia la mejora del aroma varietal u otros metabolitos no aromáticos *per se*.

Dada la importancia que el metabolismo de la levadura *S. cerevisiae* ejerce en la producción de compuestos volátiles responsables del aroma de fermentación (Pretorius, 2000), en los últimos años se han desarrollado distintos tipos de estrategias moleculares encaminadas a incrementar el aroma secundario originado durante la fermentación alcohólica por la levadura vínica en forma fundamentalmente de alcoholes primarios y ésteres de acetato, (Lambrechts y Pretorius, 2000). Entre ellas cabe citar la sobreexpresión de los genes *LEU4* y *LEU2* (Figura 2), que codifican la α -isopropil malato sintasa y la β -isopropilmalato deshidrogenasa, respectivamente (Hirata e Hirió, 1991; Hirata *et al.*, 1992), o la sobreexpresión del gen *BAT2* (Figura 2), que codifica la enzima aminotransferasa citosólica de aminoácidos ramificados (Eden *et al.*, 2001; Yoshimoto *et al.*, 2002) y la sobreexpresión del gen *BAP2* que codifica el transportador de aminoácidos ramificados específico para la leucina (Kodama *et al.*, 2001). La sobreproducción de todas estas enzimas promueve un aumento de la acumulación de alcohol isoamílico en el medio fermentado.

De particular relevancia, por el contenido de este trabajo, son las estrategias encaminadas a la sobreproducción de ésteres de acetato abordadas por varios autores (Lilly *et al.*, 2000; Mason y Dufour, 2000;

Verstrepen *et al.*, 2003b y 2003c). Buena parte de ellos han sido desarrollados en paralelo con el presente proyecto y, han proporcionado datos similares y/o complementarios sobre el efecto de la manipulación genética al nivel de los mecanismos de biosíntesis (Lilly *et al.*, 2000; Mason y Dufour, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003a, 2003b y 2003c) y de degradación (Fukuda *et al.*, 1998a y 1998b) de ésteres de acetato.

OBJETIVOS DEL TRABAJO.

En el transcurso de este trabajo se han abordado los siguientes objetivos:

- I.** Caracterización de la implicación de las actividades alcohol acetiltransferasa y éster hidrolasa en la producción de ésteres de acetato y alcoholes aromáticos de interés enológico.

- II.** Estudio de estrategias de ingeniería metabólica dirigidas a la sobreproducción de ésteres de acetato asociados al aroma floral y afrutado del vino.

- III.** Estudio de la adecuación biotecnológica de las estrategias de sobreproducción de ésteres de acetato orientadas a la mejora del perfil aromático del vino.

- IV.** Estudio de la adecuación biotecnológica de las cepas sobreproductoras de ésteres de acetato para su uso como factorías celulares.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES.

1.1. Cepas de levadura.

En este trabajo se han empleado las cepas de la levadura *S. cerevisiae* que se incluyen en la **Tabla 4**. En ella se detalla el nombre de la cepa, su genotipo y su procedencia. Cabe señalar que en este estudio se han utilizado las cepas T73 y BY4741 como organismos modelo de levadura industrial y de laboratorio, respectivamente.

Tabla 4

CEPA	GENOTIPO	PROCEDENCIA
BY4741	MAT a, <i>leu2-Δ0</i> , <i>his3-Δ1</i> <i>met15Δ0</i> , <i>ura3-Δ0</i>	Brachmann <i>et al.</i> , (1998)
BY4741atf1	BY4741 <i>atf1Δ1::loxP</i>	Este trabajo
BY4741atf2	BY4741 <i>atf2Δ1::loxP</i>	Este trabajo
BY4741atf1atf2	BY4741 <i>atf1Δ1::loxP</i> <i>atf2Δ1::loxP</i>	Este trabajo
BY4741iah1	BY4741 <i>iah1Δ1::loxP</i>	Este trabajo
BY4741atf1atf2iah1	BY4741 <i>atf1Δ1::loxP</i> <i>atf2Δ1::loxP</i> <i>iah1Δ1::loxP</i>	Este trabajo
BY4741-YCp33	BY4741 transformada con el plásmido YCplac33	Este trabajo
BY4741-TATF1	BY4741 transformada con el plásmido YCpTATF1	Este trabajo
BY4741iah1-YCp33	BY4741 <i>iah1</i> transformada con el plásmido YCplac33	Este trabajo
BY4741iah1-TATF1	BY4741 <i>iah1</i> transformada con el plásmido YCpTATF1	Este trabajo
T73(CECT 1894)	Cepa vínica. Tinto	Querol <i>et al.</i> (1992a y 1992b)

MATERIALES Y MÉTODOS

T73-4	Cepa T73 $ura3::470/ura3::470$	Puig <i>et al.</i> , (1998)
T73-4YCplac33	Cepa T73-4 transformada con el plásmido YCplac33	Este trabajo
T73-4YCpTATF1	Cepa T73-4, transformada con el plásmido YCpTATF1	Este trabajo
T73-4YEp195	Cepa T73-4 transformada con el plásmido YEp195	Este trabajo
T73YEpTHI3	Cepa T73-4 transformada con el plásmido YEpTHI3	Este trabajo
T73uraleu	Cepa T73-4 $leu2\Delta1::loxP/leu2\Delta1::loxP$	Gimeno-Alcañiz (2000)
T73 Δ atf1	Cepa T73uraleu $atf1\Delta1::loxP/atf1\Delta1::loxP$	Este trabajo
T73 Δ atf2	Cepa T73uraleu $atf2\Delta1::loxP/atf1\Delta1::kan^R$	Este trabajo
T73iah1	Cepa T73uraleu $iah1\Delta1::loxP/IAH1$	Este trabajo
T73 Δ iah1	Cepa T73uraleu $iah1\Delta1::loxP/iah1\Delta1::loxP$	Este trabajo
T73YCplac33	Cepa T73uraleu transformada con el plásmido YCplac33	Este trabajo
T73YCpTATF1	Cepa T73uraleu, transformada con el plásmido YCpTATF1	Este trabajo
T73iah1TATF1	Cepa T73iah1 transformada con el plásmido YCpTATF1	Este trabajo
T73 Δ iah1TATF1	Cepa T73 Δ iah1 transformada con el plásmido YCpTATF1	Este trabajo
T73pTTR5	Cepa T73uraleu transformada con el plásmido pTTR5	Este trabajo
T73LEU2	Cepa T73uraleu $leu2\Delta1::LEU2/leu2\Delta1::loxP$	Este trabajo
T73LEU2URA3	Cepa T73LEU2 $ura3::URA3/ura3::470$	Este trabajo
T73iah1LEU2	Cepa T73iah1 $leu2\Delta1::LEU2/leu2\Delta1::loxP$	Este trabajo

T73iah1LEU2URA3	Cepa T73iah1LEU2 <i>ura3::URA3/ura3::470</i>	Este trabajo
T73Δiah1LEU2	Cepa T73Δiah1 <i>leu2Δ1::LEU2/leu2Δ1::loxP</i>	Este trabajo
T73Δiah1LEU2URA3	Cepa T73Δiah1LEU2 <i>ura3::URA3/ura3::470</i>	Este trabajo
Σ1278b	cepa silvestre	Velasco et al., 2004.
23.344c ²	<i>ura3</i>	Velasco et al., 2004.
34.000b ²	<i>ura3Δssy1</i>	Velasco et al., 2004.
30.629c ²	<i>ura3Δgap1</i>	Velasco et al., 2004.
FAO102	<i>ura3Δgap1Δssy1</i>	Velasco et al., 2004.
Ek0411	<i>ura3Δgap1Δgnp1</i>	Velasco et al., 2004.
30.633c2	<i>ura3Δgap1Δagp1</i>	Velasco et al., 2004.
JA2482	<i>ura3Δgap1Δgnp1Δagp1</i>	Velasco et al., 2004.
IVU301 ²	<i>ura3Δgap1Δgnp1Δagp1Δbap2</i>	Velasco et al., 2004.
IVU3112	<i>ura3Δgap1Δgnp1Δagp1Δbap3</i>	Velasco et al., 2004.
IVU3212	<i>ura3Δgap1Δgnp1Δagp1Δtat1</i>	Velasco et al., 2004.
IVU3812	<i>ura3Δgap1Δgnp1Δagp1Δtat2</i>	Velasco et al., 2004.
IVU4112	<i>ura3Δgap1Δgnp1Δagp1Δptr2</i>	Velasco et al., 2004.
MN0432	<i>ura3Δgap1Δgnp1Δagp1Δbap2Δbap3</i>	Velasco et al., 2004.
MN0782	<i>ura3Δgap1Δgnp1Δagp1Δbap2</i> <i>Δbap3Δtat1</i>	Velasco et al., 2004.

♦Todas las cepas son isogénicas de la cepa S288C, a excepción de las cepas industriales cuyo fondo genético es la cepa T73 y las cepas marcadas con el superíndice 2 que son isogénicas de la cepa Σ1268b.

♦CECT: Colección Española de Cultivos Tipo.

En los experimentos de clonación de ácidos nucleicos siempre se utilizó la cepa *Escherichia coli* DH5α, cuyo fenotipo es *supE44 ΔlacU169 (φ80lacZ ΔM15) hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1*.

1.2. Plásmidos.

La relación de plásmidos utilizados o construidos en este trabajo se describe en la *Tabla 5*.

Tabla 5

PLÁSMIDO	DESCRIPCIÓN	PROCEDENCIA
pUG6	Plásmido con el marcador kanMX4 que contiene el gen de resistencia a geneticina flanqueado por los sitios loxP	Wach <i>et al.</i> , (1994)
pSH47	Plásmido con el marcador URA3 que contiene el gen de la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen GAL1	Güldener <i>et al.</i> (1996)
pB-TDH3	Plásmido pBlueScript II SK+ con un inserto <i>EcoRI/SpeI</i> de 450 pb que contiene el promotor del gen TDH3 .	Comunicación personal ¹
pTTR5	Plásmido pRS316 con un inserto <i>Clal/BglI</i> de 3 kb que complementa la mutación <i>thi3</i> .	Nishimura <i>et al.</i> (1992)
YEplac351-cre-cyh	Plásmido episomal que contiene el gen de la recombinasa Cre bajo el control del promotor del gen GAL1 , y el gen marcador <i>cyh2</i> , que confiere resistencia a cicloheximina.	Delneri <i>et al.</i> (2000)
YEplac195	Plásmido episomal que contiene el gen marcador URA3 .	Gietz y Sugino (1988)
YCplac33	Plásmido centromérico que contiene el gen marcador URA3 .	Gietz y Sugino (1988)

YCpTATF1	Plásmido YCplac33 con un inserto <i>Sall/SacI</i> de 1,9 kb que contiene el gen <i>ATF1</i> bajo el control del promotor del gen <i>TDH3</i> .	Este trabajo
YEpl195THI3	Plásmido YEplac195 con un inserto <i>KpnI/XbaI</i> de 3 kb que contiene el gen <i>THI3</i> .	Este trabajo

1: Oscar Herrero, Dpto. de Biotecnología de Alimentos. Instituto de Agroquímica y Tecnología de Alimentos (IATA). Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC). Valencia.

1.3. Oligonucleótidos.

Los oligonucleótidos utilizados en este trabajo fueron usados como cebadores en reacciones de PCR, y se adquirieron a la casa comercial Isogen (Life Science, Barcelona). La secuencia y el uso concreto de cada uno de ellos se detalla en la *Tabla 6*.

Para la interrupción de genes (ver apartado 2.5 de esta sección) se diseñaron cuatro oligonucleótidos denominados como S1, C2, A1, A3. Sus características se detallan en dicho apartado y su posición queda reflejada en la *Figura 7*.

Tabla 6:

OLIGONUCLEÓTIDO	SECUENCIA ¹	USO
ATF1 S1 ²	<u>ATGAATGAAATCGATGA</u> GAAAAATCAGGCCCGTA CGCTGCAGGTCGAC	Casete de delección del gen <i>ATF1</i>
ATF1 C2 ²	<u>GCATCATGTGAGATCTAG</u> GGCCTAAAAGGAGAGC ACTAGTGGATCTGATATC	Casete de delección del gen <i>ATF1</i>

ATF1 A1	ATGGATCTCTGGAAGCGT CTTT	Comprobación de la delección del gen <i>ATF1</i> . Sonda en 5'
ATF1 A2	TAAGCTTATGTTAGAGTA CTT	Comprobación de la delección del gen <i>ATF1</i>
ATF1 A3	ATTTGTTTGTAGCTTTGCAT	Sonda en 3' del gen <i>ATF1</i>
ATF2S1 ²	<u>GACGCAAATTCGCCGATGG</u> TTTGGTAGAAGAGCTTGCAG ACGTACGCTGCAGGTCGAC	Casete de delección del gen <i>ATF2</i>
ATF2C2 ²	<u>GTCCAGGTTAATTATGGAAG</u> ATATAGAAGGATACGAACCA CAACTAGTGGATCTGATATC	Casete de delección del gen <i>ATF2</i>
ATF2 A1	ATGCATCGACTACGAGCG TATT	Comprobación de la delección del gen <i>ATF2</i> . Sonda en 5'
ATF2 A2	AGACTTCTCAATGCTCTAA CA	Comprobación de la delección del gen <i>ATF2</i>
ATF2 A3	TCAGTGGTACTTACTTAC CCA	Sonda en 3' del gen <i>ATF2</i>
IAH1 S1 ²	<u>ATCTAGCACATCTCTCCAA</u> TCTTTCAGTTTGTACTGCA CGTACGTCGCAGGTCGAC	Casete de delección del gen <i>IAH1</i>
IAH1 C2 ²	<u>ATTGAAGATGGCAAAGAT</u> CAGTATGCTCTTGGAGCCG CACTAGTGGATGTGATATC	Casete de delección del gen <i>IAH1</i>
IAH1 A1	CCGTATACGTGATATCTTT ATTCC	Comprobación de la delección del gen <i>IAH1</i> . Sonda en 5'
IAH1 A3	AGAATGTTGACTGATCAA AACTC	Comprobación de la delección del gen <i>IAH1</i> . Sonda en 3'

TDH3 D	TTGCTATTAACGGTTTCG GTA	Sonda en 5' para los genes <i>TDH1/2/3</i>
TDH3 R	TTAACACCCATGACGAA CATT	Sonda en 3' para los genes <i>TDH1/2/3</i>
ATF1 D	GGGGGGACTAGTCGGCAC TTCATCAGTATCA	Cebador en 5' para la clonación del gen <i>ATF1</i>
ATF1 R	GGGGGGGAGCTCGTATAT ACCAGCTCC CACAGG	Cebador en 3' para la clonación del gen <i>ATF1</i>
K2	GGGACAATTCAACGCGTC TG	Comprobación de la integración del gen Kan ^R
K3	CCTCGACATCATCTGCCC AG	Comprobación de la integración del gen Kan ^R

Secuencia de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo.

1: Dirección 5'→3'

2: La secuencia subrayada corresponde al extremo 5' (oligonucleótido S1) o 3' (oligonucleótido C2) de los genes correspondientes. La secuencia sin subrayar corresponde a la secuencia del plásmido pUG6 utilizado como molde.

1.4. Productos de especial interés.

La *Tabla 7* muestra los reactivos de relevancia que fueron utilizados en el transcurso de este trabajo.

Tabla 7

PRODUCTOS	CASA COMERCIAL
Agarosa de bajo punto de fusión	Egogen, SRL (Barcelona)
Acetato de etilo	Sigma-Aldrich (Madrid)
Acetato de 2-feniletanol	Sigma-Aldrich (Madrid)

Acetato de hexilo	Sigma-Aldrich (Madrid)
Acetato de isoamilo	Sigma-Aldrich (Madrid)
Acetato de isobutilo	Sigma-Aldrich (Madrid)
Alcohol isoamílico	Sigma-Aldrich (Madrid)
Caprilato de Etilo	Sigma-Aldrich (Madrid)
Caproato de Etilo	Sigma-Aldrich (Madrid)
Cicloheximida	Sigma-Aldrich (Madrid)
[α - ³² P]-dCTP	Perkilyn Elmer (Barcelona)
Dimetildicarbonato ¹	Fluka (Madrid)
Enzimas de restricción y de modificación de ácidos nucleicos	Roche-Amersham (Barcelona)
2-Feniletanol	Sigma-Aldrich (Madrid)
Fibra PDMS (polidimetilxilosano)	Supelco Sigma-Aldrich (Madrid)
Geneticina (G418)	Gibco BRL-Invitrogen (Madrid)
1-Heptanona	Sigma-Aldrich (Madrid)
1-Hexanol	Sigma-Aldrich (Madrid)
Hybon-N	Amersham-Pharmacia (Madrid)
Isobutanol	Sigma-Aldrich (Madrid)
L-[U- ¹⁴ C]Leucina	Amersham Pharmacia Biotech (Madrid)
Taq polimerasa ²	Bioline (Barcelona) Cultek-Valtekonova
Succinato de dietilo	Sigma-Aldrich (Madrid)

Procedencia comercial de los reactivos relevantes.

1: Nombre comercial: Velcorín.

2: Nombre comercial: Biotaq DNA polimerasa.

2. PREPARACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO.

2.1. Medios de cultivo y condiciones de crecimiento.

2.1.1. Crecimiento de la bacteria *E. coli*.

Como se indicó anteriormente, en todas las construcciones de plásmidos se utilizó la cepa DH5 α de *E. coli*. Para crecer esta cepa se utilizó medio LB (Sambrook y Russell, 2001).

Para el crecimiento de bacterias con plásmidos portadores del gen *Amp^R* se añadió ampicilina al medio LB a una concentración final de 50 mg/L. Las placas de cultivo se solidificaron con 2% (p/v) de agar bacteriológico. Los cultivos líquidos se incubaron a 37 °C y 200 rpm de agitación orbital. Los cultivos sólidos se incubaron en estufa a 37° C.

2.1.2. Crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio.

Los medios para el crecimiento de levaduras en condiciones de laboratorio se describen a continuación. En todos los casos, el crecimiento de cultivos en medio líquido se estimó midiendo su densidad óptica a 600 nm de longitud de onda (DO₆₀₀).

Medio rico (YP): Se compone de extracto de levadura 1% (p/v), bactopectona 2% (p/v), y como fuente de carbono, glucosa al 2% (p/v) (medio rico YPD), glucosa al 10% (p/v) (medio rico YPD10) o galactosa al 2% (p/v) (medio rico YPGal).

Para la selección de transformantes, el medio rico se suplementó con geneticina 200 mg/L o cicloheximida 2 mg/L, según el marcador utilizado en el DNA transformante.

Medio mínimo (SD): Se compone de base nitrogenada para levadura (YNB) sin aminoácido 0,17% (p/v), y sulfato amónico, (NH₄)₂SO₄, 0,5% (p/v) suplementado con glucosa al 2% (p/v). En los casos en los

que la cepa albergaba auxotrofías, los requerimientos necesarios fueron añadidos a una concentración final de 20 mg/L (histidina, triptófano, adenina, uracilo), 30 mg/L (lisina) o 100 mg/L (leucina). Las placas de medio sólido contenían además 2% (p/v) de agar bacteriológico.

Los cultivos se incubaron a 30 °C y en el caso de crecimiento en medio líquido se utilizó agitación orbital a 200 rpm.

2.1.3. Crecimiento de levaduras en condiciones de microvinificación.

Para el crecimiento de las levaduras en condiciones de microvinificación se utilizó mosto de la variedad Bobal (Requena, España; cosechas 1998, 2003 y 2004) esterilizado por tratamiento durante 24 h a 4 °C con dimetildicarbonato a una concentración final de 1 mL/L durante 24 h a 4 °C. Las microvinificaciones se llevaron a cabo en tubos Corning de 50 mL completamente llenos de mosto y con los tapones sin enroscar, lo que permitió el intercambio de gases y mimetizó las condiciones anaeróbicas de la fermentación vínica tradicional.

El medio se inoculó a una densidad celular de $2,5 \times 10^5$ células/mL a partir de precultivos en mosto procedentes de un preinoculo previo en medio YPD (o SD en el caso de cepas con plásmido). Posteriormente, los tubos se incubaron sin agitación a 18 - 22 °C hasta el agotamiento de los azúcares reductores presentes en el mosto.

2.1.4. Medios para la determinación del transporte de leucina.

Los medios utilizados para el desarrollo de esta técnica se describen a continuación. En todos los casos la fuente de carbono fue glucosa al 30% (p/v), y el crecimiento del cultivo en medio líquido se estimó midiendo su DO_{600} .

Medio mínimo sintético (MM): adaptación del medio descrito por Jacobs y colaboradores (1980) y está compuesto por tres soluciones, una de minerales, una de metales traza y una de vitaminas. Para preparar 1 L de medio se requiere:

Solución de minerales (1 L): 0,7 g/L de $\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 1 g/L de KH_2PO_4 , 0,5 g/L de NaCl , 1 g/L de K_2SO_4 , 10,5 g/L de $\text{H}_2\text{C}_6\text{O}_5 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 0,16 M de KOH y pH 6,2.

Solución de metales traza (1 mL/L): 10mg/L de H_3BO_3 , 1 mg/L de $\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$, 2 mg/L de KI , 4 mg/L de $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 14 mg/L de $\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$, 10g/L de $\text{H}_2\text{C}_6\text{O}_5 \times 2\text{H}_2\text{O}$, 400 mg/L de $\text{MnSO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$, 5 g/L de $\text{FeCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$.

Solución de vitaminas (10 mL/L): D-biotina 250 $\mu\text{g/L}$, tiamina 100 mg/L, D-pantotenato cálcico 200 mg/L, piridoxina 100 mg/L.

Medio con amonio (MA): compuesto por medio MM pero con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM como fuente de nitrógeno.

Medio con prolina (MP): medio MM con prolina 8,7 mM, como fuente de nitrógeno.

Medio completo (MC): medio MM que contiene como fuente de nitrógeno una mezcla de todos los aminoácidos en la proporción descrita por Rose y colaboradores (1990), excepto la leucina que no se añade.

Medio completo con amonio (MCA) medio MC con $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 20 mM como fuente de nitrógeno.

MCA 100 contiene medio MCA suplementado con leucina a una concentración final de 100 μM .

MCA 20 contiene medio MCA suplementado con leucina a una concentración final de 20 mM.

Para solidificar los medios se usó 2% (p/v) de agar bacteriológico.

Los cultivos se incubaron a 30 °C. En el caso de crecimiento en medio líquido se utilizaron 100 mL de medio con agitación orbital a 200 rpm. Los medios sólidos se incubaron en estufa a 30 °C.

2.2. Transformación de microorganismos.

2.2.1. Transformación de *E. coli*.

Las transformaciones de cepas de *E. coli* se realizaron siguiendo el sistema de transformación biológica artificial descrito por Hanahan (1983) o el protocolo de electroporación del sistema Gene Pulser (Bio-Rad). En el último caso se siguieron las recomendaciones de la casa suministradora del aparato.

2.2.2. Transformación de *S. cerevisiae*.

Las distintas cepas de *S. cerevisiae* se transformaron siguiendo el protocolo basado en la incubación con acetato de litio optimizado por Gietz y colaboradores (1995). En el caso de las transformaciones con plásmidos que complementaban auxotrofías propias de la cepa, tras el choque térmico, la selección se llevó a cabo en medio mínimo SD sin el complemento nutricional objeto de la selección. En las transformaciones integrativas para la eliminación de secuencias en el genoma (ver apartado 2.3. de esta sección) las células se recuperaron en medio rico YPD a 30 °C con agitación durante 3-4 h. Tras esta recuperación, se sembraron en medios selectivos como medio YPD con geneticina o medio SD con cicloheximida.

2.3. Delección génica por el método “short flanking homology” (SFH).

Las transformaciones integrativas para la eliminación de secuencias en el genoma se llevaron a cabo con la técnica descrita originalmente por Baudin y colaboradores (1993) que fue posteriormente modificada (Wach *et al.*, 1994; Güldener *et al.*, 1996) para generar moléculas de DNA con marcadores de selección. Dichas moléculas de DNA se caracterizan porque el gen marcador está flanqueado por pequeñas secuencias de DNA homólogo al locus a interrumpir (35-50 pb) y por regiones denominadas sitios loxP. Las regiones loxP son secuencias de reconocimiento de la recombinasa Cre del fago P1 que induce la escisión del gen marcador de selección.

En este trabajo se ha utilizado como marcador de selección el gen del transposón bacteriano Tn903 (KanMX4), que codifica una aminoglicósido fosfotransferasa cuya característica principal en levaduras es que confiere un fenotipo de resistencia al antibiótico geneticina, impidiendo su crecimiento por inhibición de la síntesis de proteínas al interactuar con los ribosomas 80S (Hadfield *et al.*, 1990).

La obtención del casete se realizó utilizando el plásmido pUG6 como molde en una reacción de PCR que contenía los oligonucleótidos S1 y C2. El extremo 5' del oligonucleótido S1 contiene entre 35-45 nucleótidos homólogos al extremo 5' del gen a interrumpir seguidos de 20 pb complementarios a la zona del sitio de clonación múltiple (MCS) contigua a la región del marcador Kan^R. El extremo 5' del oligonucleótido C2 comprende 35-45 nucleótidos homólogos al extremo 3' de dicho gen, seguidos de 20 pares de bases complementarias a la zona del MCS contigua a la región 3' del marcador Kan^R. De esta forma, el fragmento de PCR sintetizado (casete de interrupción) contiene el gen marcador flanqueado por secuencias homólogas a los extremos de la secuencia que se desea eliminar. Estos extremos homólogos dirigen la integración hacia el locus deseado y, por recombinación homóloga, producen la sustitución de la secuencia silvestre por la del gen marcador. En la **Figura 7**, se muestra un esquema de lo que acontece siguiendo esta técnica de transformación, así como la posición de cada uno de los cebadores necesarios para construir el casete de interrupción o confirmar la delección del gen objeto de estudio.

La reacción de PCR se realizó siguiendo las condiciones que se detallan en el apartado 3.2 de esta sección.

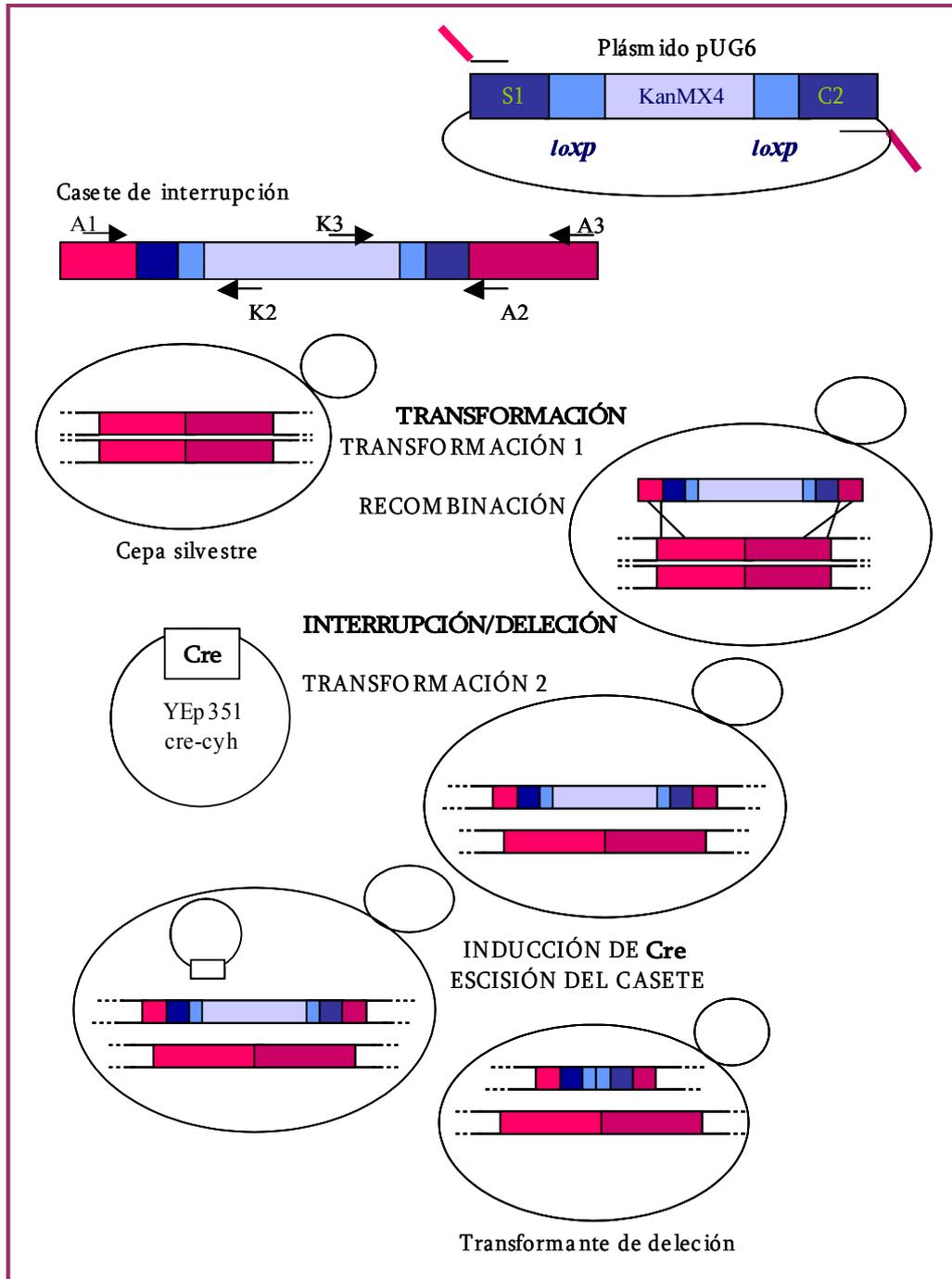


Figura 7: Esquema de transformación *SFH* y localización de los cebadores.

La verificación de la interrupción se llevó a cabo mediante PCR y análisis Southern. Como queda reflejado en la *Figura 7*, se diseñaron dos oligonucleótidos que hibridan fuera del gen a interrumpir (A1 (región 5') y A2 o A3 (región 3')) y otros dos cebadores que hibridan en la zona interna del gen marcador (K2 y K3). Las secuencias de estos oligonucleótidos se describen en la *Tabla 6*.

De esta forma, en un mismo experimento de PCR que utiliza el DNA de un transformante como molde, el par de oligonucleótidos A1/A2-A3 generaría un amplificado correspondiente al alelo silvestre o bien, el correspondiente al alelo que ha sufrido la recombinación siendo ambos de tamaño diferenciable. En caso de que la cepa fuese diploide se obtendrían los dos amplificados. Por otro lado, el par A1/K2 o A2-A3/K3 produciría un único fragmento correspondiente al alelo mutado. Este rastreo se utilizó para seleccionar colonias que albergaban la inserción correcta, seleccionándose algunas de ellas para la confirmación de su genotipo mediante análisis Southern.

El DNA molde se obtuvo por extracción de DNA genómico a partir de una colonia individual de los transformantes seleccionados. La reacción de PCR se realizó siguiendo las condiciones que se detallan en el apartado 3.2 de esta sección.

2.3.1. Eliminación del marcador de selección integrado en el genoma.

El sistema diseñado por Güldener y colaboradores (1996), y optimizado por Delneri y colaboradores (2000) permite la eliminación del marcador al introducir un plásmido, pSH47 o YEp351-cre-cyh, que posee la secuencia codificante de la recombinasa Cre del bacteriófago P1 de *E. coli* bajo el control de un promotor inducible por galactosa. La recombinasa Cre reconoce las secuencias loxP que flanquean el gen de selección y cataliza la recombinación entre ellas promoviendo la eliminación del casete de interrupción. Así, la posibilidad de eliminar el marcador de selección integrado en el genoma permite utilizar sucesivas veces el mismo sistema de selección hasta conseguir mutantes nulos y seguros, esto es, organismos sin ningún tipo de resistencia ni genes heterólogos,

denominados también “organismos generalmente reconocidos como seguros” (Generally Recognized As Safe, GRAS).

Así pues, las cepas en las que se había insertado el casete de interrupción fueron transformadas con uno de estos plásmidos (dependiendo de su genotipo) y, posteriormente se indujo la expresión de la recombinasa Cre en medio YP suplementado con galactosa al 2% durante 2 h a 30 °C con agitación. Completado el tiempo de incubación se sembraron aproximadamente 150 células en placas de medio YPD. Las colonias que crecieron en este medio se replicaron en medio selectivo YPD con geneticina. Finalmente se seleccionaron aquellas colonias con fenotipo de capacidad de crecer en medio rico YPD pero no en medio rico con el antibiótico geneticina. Para comprobar la eliminación del marcador, en una reacción de PCR con la mezcla de oligos A1, A2-A3, K2, K3, se debe obtener el amplificado correspondiente a los oligos A1/A2-A3 cuyo tamaño será distinto entre el alelo silvestre y el mutado sin el marcador, tal y como queda reflejado en la *Figura 7*. Algunas de las colonias que mostraron este patrón de amplificación fueron sometidas a análisis Southern.

2.4. Obtención de DNA.

2.4.1. Extracción de plásmidos a partir de *E. coli*.

Para la extracción de plásmidos a pequeña escala, se inocularon cultivos de 3 - 4 mL en medio LB con ampicilina, y se siguió el método de lisis alcalina descrita por Sambrook y Russell (2001). Para mayor escala se partió de cultivos de 50 - 100 mL y se utilizó un sistema comercial de extracción de plásmidos (Qiagen, Promega, Eppendorf), siguiendo las instrucciones recomendadas por el fabricante.

2.4.2. Extracción de DNA genómico de levadura.

La obtención de DNA genómico de levadura se llevó a cabo a partir de 5 mL de cultivo en medio YPD siguiendo el método de aislamiento descrito por Hoffman y Winston (1987).

2.5. Extracción de RNA total de levadura.

Para la extracción de RNA total de levadura, las células se recogieron por centrifugación y se lavaron con agua estéril, congelándolas a -80°C hasta su procesamiento.

Las células se descongelaron en hielo y se resuspendieron en 0,5 mL de tampón LETS (LiCl 0,1 M, EDTA 0,01 M, Tris-HCl 0,01 M, SDS 0,2%, pH 7,4). Posteriormente se le añadió 0,5 mL de fenol saturado en tampón LETS (pH 4,3) y 0,5 mL de perlas de vidrio (diámetro de 425-600 μm). Las células se rompieron alternando períodos de 30 s de agitación vigorosa en un disruptor de células con períodos de 30 s en hielo. Tras la rotura, las muestras se centrifugaron 15 min a 12000 rpm. El sobrenadante se extrajo dos veces con una mezcla de fenol saturado en tampón LETS, cloroformo y alcohol isoamílico 25:24:1 (v:v:v) y dos veces con cloroformo, alcohol isoamílico 24:1 (v:v). El RNA presente en la fase acuosa se precipitó con un volumen de solución de LiCl 5 M y se mantuvo un mínimo de 3 h a -80°C . Tras recoger por centrifugación, el sedimento se lavó con etanol 70% (p/v) y se resuspendió en agua destilada estéril.

La concentración de RNA se determinó espectrofotométricamente midiendo la absorbancia a 260 nm de una dilución adecuada de la solución.

Todo el material utilizado para la extracción de RNA fue previamente autoclavado durante una hora a 130°C y 2 atm de presión para inactivar las RNasas contaminantes.

3. TÉCNICAS DE MANIPULACIÓN Y ANÁLISIS DE ÁCIDOS NUCLEÍCOS.

3.1. Tratamientos enzimáticos del DNA.

Los tratamientos de digestión con endonucleasas de restricción, desfosforilación de los extremos de vectores de clonación con fosfatasa alcalina y las reacciones de ligación se realizaron siguiendo las recomendaciones descritas en Sambrook y Russell (2001).

3.2. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

Como anteriormente se indicó, la amplificación por PCR se utilizó para la síntesis de los casetes de interrupción y también para la comprobación de las modificaciones genéticas y para la síntesis de sondas utilizadas en las hibridaciones. Estas reacciones se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L o 50 μ L según fuese a escala analítica o preparativa, respectivamente. La mezcla de reacción contuvo 3 ng/ μ L de DNA genómico o 0,5 ng/ μ L de DNA plasmídico, 1 pmol/ μ L de cada cebador, 1U de Taq Polimerasa, 0,25 mM de dNTPS, 3 mM MgCl₂ y el tampón suministrado por la casa comercial.

Las condiciones de la reacción fueron 5 min a 94 °C; 30 ciclos de: 30 s a 94 °C, 30 s a 50-55 °C (dependiendo de los cebadores) y un tiempo variable de 1 min por kilobase a 72 °C. Para terminar la síntesis se llevó a cabo una extensión final de 3 min a 72 °C.

3.3. Electroforesis de DNA en geles de agarosa.

La separación de fragmentos de DNA se realizó en geles de agarosa a una concentración variable entre 0,8 y 1% (p/v) dependiendo del tamaño de los fragmentos a separar. En la preparación de los geles se utilizó tampón TBE (0,5X) compuesto por Tris 44,5 mM, ácido bórico 44,5 mM, EDTA 1,25 mM, que también fue utilizado como tampón de electroforesis. Las muestras se disolvieron en tampón de carga (azul

de bromofenol 0,25% (p/v), xilene cianol 0,25% (p/v), glicerol 30% (p/v) en agua destilada). La electroforesis se realizó a voltaje constante entre 2 y 10 V/cm.

3.4. Aislamiento de DNA a partir de geles de agarosa.

Las electroforesis con fines preparativos se efectuaron en tampón TAE 1x (p/v) (Tris 40 mM, ácido acético glacial 4 M, EDTA 1 mM, pH 8,0) que también fue usado como tampón de electroforesis. La agarosa utilizada fue de bajo punto de fusión para facilitar la recuperación de DNA. Para la obtención de los fragmentos se utilizó el kit comercial ConcertTM: Rapid Gel Extraction (Life Technologies; Alemania), o bien, el método de extracción con fenol y posterior precipitación con etanol descrito en Sambrook y Russell (2001).

3.5. Electroforesis de RNA en geles desnaturalizantes de agarosa.

Las electroforesis de RNA se realizaron según se describe en Sambrook y Russell (2001). Los geles se prepararon con agarosa a una concentración final del 1% (p/v), formaldehido 2,2 M y tampón MOPS 1X (MOPS 5X: 0,1 M de MOPS pH 7,5, 40 mM de acetato sódico, 5 mM de EDTA pH 8,0).

Las muestras contenían entre 30-50 µg de RNA disuelto en agua estéril, 1 µL de MOPS 5X, 1,75 µL de formaldehido y 5 µL de formamida desionizada. Posteriormente, las muestras se incubaron a 65 °C durante 15 min y se dejaron enfriar en hielo. En último lugar se añadió tampón de carga (glicerol 50% (v/v), EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0,4% (p/v) y xilene cianol 0,4% (p/v)). Tras una pre-electroforesis de 5 min, la electroforesis se llevó a cabo en tampón MOPS 1X a 5 V/cm durante 4-6 h. Finalmente los geles se tiñeron durante 2-5 min con bromuro de etidio (1µg/mL), y se destiñeron con agua destilada durante un mínimo de 1 h en agitación.

3.6. Transferencia de ácidos nucleicos a filtros.

La transferencia de DNA desde los geles de agarosa a membranas de nylon se realizó en condiciones alcalinas siguiendo el protocolo descrito en Sambrook y Russell (2001). El RNA se transfirió al mismo tipo de membranas siguiendo el protocolo descrito en Sambrook y Russell (2001). La fijación de los ácidos nucleicos a la membrana se realizó mediante exposición con luz ultravioleta durante al menos 20 s en un aparato BLX-254 (Vibler Lourmat, Francia).

3.7. Marcaje radioactivo del DNA.

El marcaje de fragmentos de DNA se realizó utilizando el kit High Prime (Amershan Biosciences, Madrid) basado en la técnica de cebado aleatorio (Feinberg y Vogelstein, 1983) utilizando como nucleótido marcado [α -³²P]-dCTP.

3.8. Hibridación de DNA y RNA sobre filtros con sondas radiactivas.

Los filtros de nylon se incubaron en solución de prehibridación (SSPE 5X (NaCl 0,9 M, fosfato sódico 50 mM, EDTA 5 mM, pH 7,7), Denhart 5X (BSA 0,1% (p/v), Ficoll 0,1% (p/v), PVP 0,1% (p/v)), SDS 0,5% (p/v) y DNA de arenque (200 μ g/mL)) a 42 °C durante al menos 30 min o 2 h según fuesen filtros de DNA o de RNA, respectivamente.

Posteriormente se incubaron a 42 °C durante 16-24 h en solución de hibridación (SSPE 5X, formamida desionizada 50% (v/v), Denhart 5X, sulfato de dextrano 10% (p/v) y DNA de arenque desnaturalizado 200 μ g/mL) a la que se le añadió la sonda previamente desnaturalizada. Tras la hibridación los filtros se lavaron dos veces durante 10 min con agitación y solución de lavado I (SSPE 2x y SDS 0,1% (p/v)), y a continuación temperatura ambiente y una vez durante 15 min con solución de lavado II (SSPE 1x y SDS 0,1% (p/v)) a 65 °C.

Para eliminar la sonda de los filtros y así poder reutilizarlos se añadió SDS 0,1% (p/v) hirviendo y se dejó enfriar durante 15 min con agitación. Este lavado se realizó un mínimo de dos veces. La eliminación de la sonda se comprobó con un contador Geiger.

3.9. Autorradiografía de los filtros hibridados.

Para la autorradiografía de los filtros hibridados con sondas radiactivas se utilizaron películas X-Omat o Biomax (Kodak), Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech, Madrid) y casetes de exposición (Amersham Pharmacia Biotech, Madrid) provistos de pantallas intensificadoras Kodak X-Omatic. La exposición se realizó en oscuridad a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$. Las películas se revelaron con una reveladora automática Curix 60 (AGFA).

4. OTRAS TÉCNICAS UTILIZADAS.

4.1. Cuantificación de ésteres y alcoholes por microextracción en fase sólida en espacio de cabeza por cromatografía de gases, HS-SPME-GC.

La metodología utilizada para la determinación de compuestos aromáticos presentes en el vino se describe en Rojas y colaboradores (2003). La técnica fue descrita por Belardi y Pawliszyn (1989) y posteriormente fue optimizada por Vas y colaboradores (1998), Pozo-Bayón y colaboradores (2001) y Vianna y Ebeler (2001). Consta de dos fases denominadas fase de adsorción y fase de desorción. La fase de adsorción consiste en la exposición del soluto volátil de interés a una fibra polimérica. La fase siguiente o fase de desorción, se realiza acoplada a un cromatógrafo de gases que analizará los solutos volátiles atrapados en la fibra polimérica.

Para la separación y determinación de los compuestos se utilizó un cromatógrafo de gases HP 5890 Series II equipado con un detector de ionización de llama FID provisto de una columna capilar HP-VOC de 30 m de longitud, 0,20 mm de diámetro interno y 0,10 μm de

espesor de fase. Como gas portador se utilizó helio a un flujo de 1 mL/min. La señal cromatográfica se registró mediante el equipo HP Vectra QS/16S asistido por el programa HP3365 Chemstation.

Para el análisis de los compuestos aromáticos las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 220 °C y 300 °C respectivamente. La temperatura del horno se mantuvo a 40 °C durante 10 min y se incrementó a razón de 1,5 °C/min hasta 150 °C, 4 °C/min hasta 170°C y a 20 °C/min hasta 250 °C. El horno se mantuvo a 250°C durante 2 min.

La cuantificación de los ésteres y alcoholes se realizó por el método del patrón interno como se detalla en el Anexo 1. El patrón interno utilizado fue 20 µL de 2-heptanona 0,005% (p/v).

Todos los experimentos relativos a las cinéticas de producción de ésteres y alcoholes aromáticos, así como cada una de las muestras resueltas por cromatografía de gases realizadas en este trabajo han sido ensayadas un mínimo de tres veces. No obstante, debido a la naturaleza y características de los compuestos detectados, al rango de valores de concentración cuantificado y a la variabilidad de la metodología utilizada, los resultados mostrados son datos correspondientes a un experimento tipo.

4.2. Cuantificación de azúcares reductores.

El método empleado se basa en el descrito por Robyt y Whelan (1972). Se realizaron diluciones con agua de la solución de azúcares a medir en un volumen final de 250 µL y se le añadieron 250 µL de reactivo DNS (ácido 3,5-dinitrosalicílico 1.0% (p/v), NaOH 1,6% (p/v), tartrato doble sódico-potásico 30% (p/v)). Se realizó una recta patrón con concentraciones de glucosa entre 0 y 2 g/L. Las muestras se hirvieron durante 5 min y tras enfriarse en hielo, se midió la absorbancia a 540 nm de una dilución adecuada, tanto de las muestras problemas como de las provenientes de la recta patrón. La concentración de azúcares reductores se calculó interpolando en la recta patrón de glucosa el valor de absorbancia de cada muestra.

4.3. Determinación del transporte y cuantificación de leucina.

4.3.1. Ensayo de transporte.

La metodología aplicada en la determinación del transporte de leucina se basa en el método descrito en Kotliar y colaboradores (1994). En todos los experimentos realizados e independientemente del medio utilizado, el cultivo se encontraba en fase exponencial de crecimiento (DO_{600} 0,4-0,6). Alcanzada esta DO_{600} , se tomaron 13 mL del cultivo y, manteniendo las condiciones de aireación y temperatura en un baño de agua, se adicionó leucina marcada radiactivamente a una concentración final de 100 μ M. Tras la adición de leucina se tomaron muestras de 1 mL a distintos tiempos en un intervalo máximo de 2 h. Las células de cada muestra se recogieron sobre filtros de 0,45 μ m en un multifiltrador Millipore. Finalmente, el filtro se colocó en 4 mL de líquido de centelleo, y la cantidad de marca radiactiva acumulada fue cuantificada en un contador de centelleo. Los datos obtenidos se expresaron en unidades de nM de leucina radiactiva incorporada por mg de proteína.

4.3.2. Cuantificación de leucina en el interior y exterior celular.

Para la cuantificación de leucina interna y externa se partió de un cultivo celular con la DO_{600} deseada en función del estado fisiológico que se quería estudiar. En este trabajo consideraremos que una DO_{600} en el intervalo de 0,4-0,6 unidades se correspondía con un crecimiento en fase exponencial y el intervalo 1,5-2 se referiría a un crecimiento en fase estacionaria. Alcanzada esta DO_{600} , se tomó 1 mL del cultivo para la cuantificación de la leucina externa o bien 30 mL para la cuantificación de la leucina interna.

Para el análisis de la leucina externa se tomaron muestras de los cultivos de 1 mL, se centrifugaron a 12000 rpm durante 15 min y se recuperaron los sobrenadantes. Para el análisis de leucina interna, las células de los 30 mL de cultivo se recogieron por filtración y el filtro se colocó en el mismo volumen de agua. Se tomó 1 mL de la

suspensión celular en agua, se hirvió durante 15 min, se centrifugó a 12000 rpm 15 min y se recuperó el sobrenadante.

Finalizado el proceso de preparación de las muestras, el análisis cuantitativo se llevó a cabo por HPLC según la metodología descrita en Velasco y colaboradores (2004). El equipo cromatográfico utilizado estaba compuesto por una columna Waters AccQ-Tag, un inyector automático (Waters 715 Ultra Wips) y un detector de fluorescencia (Waters 474). La integración y procesamiento de los datos fueron realizadas aplicando el software de Waters Millennium³² (Velasco *et al.*, 2004).

Respecto a la determinación del porcentaje leucina incorporada, consumida y almacenada, se tuvieron en cuenta las siguientes consideraciones:

i) Que la leucina en el interior celular total es el resultado del sumatorio entre la leucina que se incorpora más la que se sintetiza, menos la leucina consumida.

$$\text{Leu Total} = (\text{Leu incorporada} + \text{Leu sintetizada}) - \text{Leu consumida}$$

ii) Que la velocidad de consumo de leucina en todas las cepas analizadas se mantiene constante.

iii) Que la cantidad de leucina inicial de 100 μM es el 100% de leucina en el exterior celular.

Asumiendo estas consideraciones los cálculos realizados fueron:

$$\text{Leu no almacenada} = \text{Leu externa cuantificada}$$

$$\text{Leu incorporada} = 100 - \text{Leu externa cuantificada}$$

$$\text{Leu almacenada} = (\text{Leu interna cuantificada}) / (\text{Leu incorporada}) \times 100$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN:

CAPÍTULO 1.

ESTUDIO DE LA CONTRIBUCIÓN DE LAS ACTIVIDADES ALCOHOL ACETIL TRANSFERASA Y ÉSTER HIDROLASA AL PERFIL DE ÉSTERES AROMÁTICOS PRODUCIDO POR *S. cerevisiae*.

“...Constituido por un sistema complejo de cientos de compuestos que interaccionan entre si en secreta armonía, el **aroma** es una de las cualidades más misteriosa del vino; y a pesar de ello, nuestros sentidos son capaces de inspirar su efluvio, y desvelar su verdadera esencia”...

Anónimo, 1946.

La percepción del aroma es uno de los criterios más importantes al evaluar la calidad final de un vino. En los últimos treinta años se han llevado a cabo numerosos estudios encaminados a identificar y caracterizar la compleja naturaleza aromática de los vinos (Schneider *et al.*, 1998; Cortés *et al.*, 1999). Conocer los compuestos clave, sus mecanismos de síntesis y degradación y la contribución de cada uno de ellos en el mosto, permitiría optimizar e incluso controlar el perfil aromático, favoreciendo la elaboración de vinos de mayor calidad.

Con esta premisa y dada la información que se tenía en el momento de inicio de este trabajo, se planteó determinar la contribución de las distintas actividades enzimáticas que intervienen en la síntesis y

degradación de ésteres, y establecer el grado de especificidad por sustrato de cada una de ellas.

1. SELECCIÓN DEL PERFIL AROMÁTICO.

Dada la gran cantidad de compuestos aromáticos que han sido identificados en el vino (Rapp y Mandery, 1986; Noble, 1994; Cole y Noble, 1995), se estableció un perfil aromático propio de referencia que aparece reflejado en la *Tabla 8*. Este perfil se compone mayoritariamente de ésteres de acetato y ésteres de etilo, con sus alcoholes correspondientes. Todos estos compuestos se han descrito como los componentes aromáticos más relevantes asociados al aroma floral y afrutado del vino (Ferreira *et al.*, 1995; Lambrechts y Pretorius, 2000).

ÉSTERES	ALCOHOLES
Acetato de Etilo	
Acetato de Isoamilo	Alcohol Isoamílico
Acetato de Isobutilo	Isobutanol
Acetato de 2-Feniletilo	2-Feniletanol
Acetato de Hexilo	
Caproato de Etilo	
Caprilato de Etilo	
Succinato de Dietilo	

Tabla 8: Perfil aromático seleccionado.

2. OBTENCIÓN DE MUTANTES DE PÉRDIDA DE FUNCIÓN EN LOS GENES QUE CODIFICAN LAS ALCOHOL ACETILTRANSFERASAS I Y II (*Atf1p*, *Atf2p*) Y LA ÉSTER HIDROLASA II (*Iah1p*).

El propósito de este análisis fue determinar la contribución de estas enzimas al perfil aromático producido por *S. cerevisiae*. Se decidió realizar el estudio con la cepa haploide de laboratorio BY4741. La naturaleza de esta cepa de laboratorio permite la aplicación sencilla de técnicas moleculares de manipulación genética que generan resultados rápidos que posteriormente pueden ser trasladados a levaduras vínicas industriales.

Para estudiar el perfil de especificidad y poder determinar la importancia de cada una de las actividades en la producción de ésteres *in vivo*, se obtuvieron mutantes simples de delección en los genes que codifican las alcohol acetiltransferasas **Atf1p** y **Atf2p** y también en el gen que codifica la éster hidrolasa **Iah1p**. Posteriormente se construyeron cepas donde se combinaron estas mutaciones, con la finalidad de averiguar si entre ellas existía algún tipo de efecto aditivo y/o sinérgico.

La metodología utilizada para la construcción de estos mutantes se basó en la generación por PCR de un fragmento de DNA lineal que contiene el gen de resistencia al antibiótico geneticina flanqueado por secuencias de DNA homólogas al gen que se desea eliminar (apartado 2.3. de Materiales y Métodos). Las **Figuras 8, 9 y 10** muestran el análisis Southern de los mutantes obtenidos para cada una de las mutaciones. En todos los casos, el DNA genómico fue digerido con la enzima de restricción *EcoRV*.

En la **Figura 8** correspondiente a la delección del gen *ATF1*, se muestra que la digestión genera una banda de 3761 pb correspondiente al locus silvestre (carrera 1), de modo que en aquellas cepas donde no se ha producido la interrupción del gen *ATF1* se observa una única banda de este tamaño (carreras 4 y 5). Por el contrario, en aquellas cepas donde ha tenido lugar la inserción del gen marcador y su

posterior escisión se observan dos bandas de aproximadamente 1570 pb y 876pb (carreras 2, 3, 6 y 7).

Igualmente, en la *Figura 9* se muestra el resultado correspondiente a la delección del gen *ATF2*. Del mismo modo que en el caso anterior, el patrón de bandas obtenido difiere dependiendo del tipo de cepa, observándose una banda de 4406 pb en las cepas que contienen el locus silvestre (carreras 1 y 2, 7 y 8), dos bandas de 2353 pb y 2106 pb en los transformantes que tienen el casete de interrupción (carreras 3, 4, 5 y 6) y dos bandas de aproximadamente 2106 pb y 865 pb en los mutantes nulos donde el casete interrupción ha sido escindido (carreras 9 y 10).

En la *Figura 10* se muestran los resultados de la delección del gen *IAH1*. En este caso, aquellas cepas que contienen el alelo silvestre producen una banda de 4419 pb (carreras 1, 2, 3 y 7), mientras que los mutantes nulos que han sufrido el proceso de inserción y posterior escisión del gen Kan^R , presentes dos bandas de 3703 pb y 1840pb (carreras 4, 5, 7, 8 y 9).

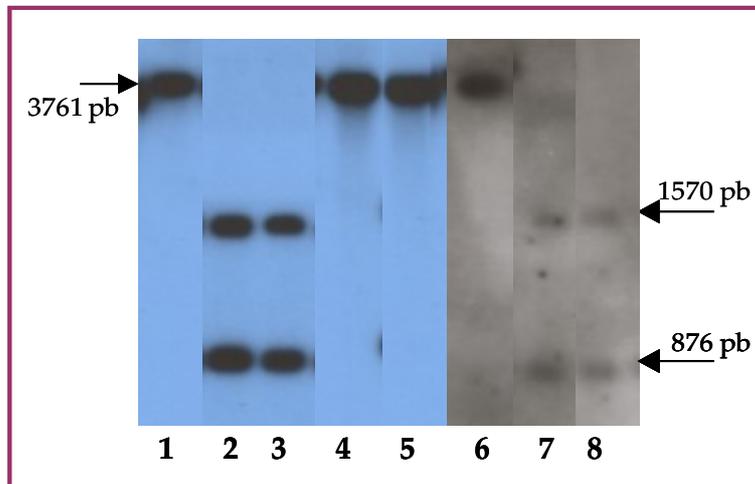


Figura 8: Análisis Southern de las cepas BY4741 (carrera 1 y 6), BY4741 Δ atf1 (carrera 2 y 3), BY4741 Δ atf2 (carrera 4), BY4741 Δ iah1 (carrera 5), BY4741 Δ atf1 Δ atf2 (carrera 7) y BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1 (carrera 8). El DNA genómico fue digerido con el enzima de restricción *EcoRV*. Se utilizó como sonda un fragmento del gen *ATF1* de 2627 pb amplificado con los oligonucleótidos ATF1A1-ATF1A3.

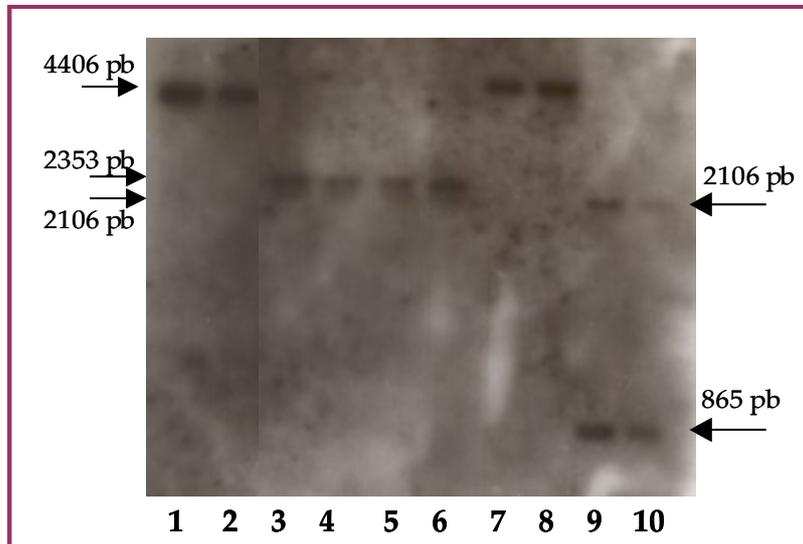


Figura 9. Análisis Southern de las cepas BY4741 (carrera 1), BY4741 Δ atf1 (carrera 2), BY4741 Δ atf2 (carrera 3 y 4), BY4741 Δ iah1 (carrera 7 y 8), BY4741 Δ atf1 Δ atf2 (carrera 5 y 6) y BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1 (carrera 9 y 10). El DNA genómico fue digerido con el enzima de restricción *EcoRV*. Se utilizó como sonda un fragmento de 2770 pb del gen *ATF2* amplificado con los oligonucleótidos ATF2A1-ATF2A3.

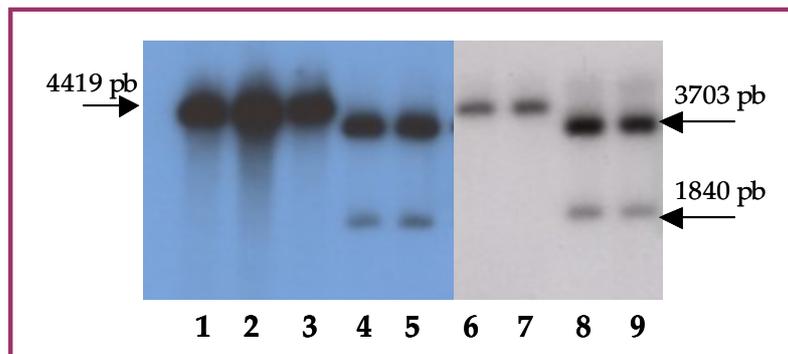


Figura 10. Análisis Southern de las cepas BY4741 (carrera 1 y 6), BY4741 Δ atf1 (carrera 2), BY4741 Δ atf2 (carrera 3), BY4741 Δ iah1 (carrera 4 y 5), BY4741 Δ atf1 Δ atf2 (carrera 7) y BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1 (carrera 8 y 9). El DNA genómico fue digerido con el enzima de restricción *EcoRV*. Se utilizó como sonda un fragmento de 1420 pb del gen *IAH1* amplificado con los oligonucleótidos IAH1A1-IAH1A3.

3. ANÁLISIS DE LOS MUTANTES SIMPLES 4741 Δ atf1, 4741 Δ atf2 y 4741 Δ iah1 y múltiples 4741 Δ atf1 Δ atf2 y 4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1.

Una vez comprobado el genotipo mutante de cada una de las cepas construidas se determinó la cantidad de compuestos aromáticos producidos en condiciones de laboratorio. Para ello las cepas se cultivaron durante 72 h en medio rico YPD, tal y como se describe en el apartado 2.1.2. de Materiales y Métodos. A lo largo del experimento se tomaron muestras a distintos tiempos de crecimiento y cada una de ellas fue analizada por cromatografía de gases. Asimismo, se analizó la evolución del crecimiento microbiano por cuantificación de azúcares reductores y medida de DO₆₀₀ que se muestran en la *Figura 11*.

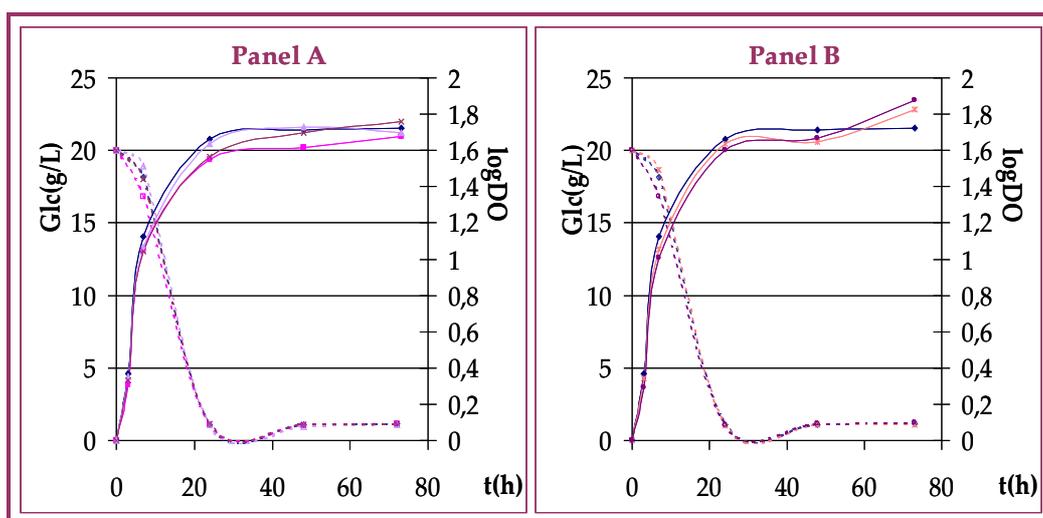


Figura 11: Curva de crecimiento (línea continua) y consumo de azúcares (línea punteada) de las distintas cepas objeto de ensayo. Panel A: Cepas simples mutantes, BY4741 Δ atf1 (\square), BY4741 Δ atf2 (\square) y BY4741 Δ iah1 (\square). Panel B: Cepas mutantes múltiples, BY4741 Δ atf1 Δ atf2 (\square) y BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1 (\square). En ambos paneles aparecen también los resultados de la cepa control BY4741 (\square).

En ellas se compara las cepas que contienen cada una de las mutaciones simples (*Figura 11*, panel A) y las cepas que contienen más de una modificación genética (*Figura 11*, panel B) con la cepa de referencia BY4741. Como se puede observar no se aprecian diferencias significativas entre el crecimiento de la cepa parental y el de los distintos mutantes.

3.1. Análisis por cromatografía de gases de las distintas cepas construidas.

3.1.1. Análisis del mutante simple BY4741 Δ atf1.

Las *Figuras 12* y *13* muestran los resultados obtenidos para la cepa con la delección en el gen *ATF1* comparada con la cepa control. Como se puede observar, la acumulación de los ésteres de acetato de etilo, de isobutilo, de isoamilo, y de 2-feniletilo en ambas cepas (*Figura 12* paneles A, B, C y D), mantiene la misma tendencia ya que apenas hay producción del compuesto a tiempos cortos y su concentración va aumentando progresivamente hasta alcanzar el valor de máxima acumulación en el intervalo 24 h-48 h, coincidiendo con el cambio diáuxico y el inicio de la fase estacionaria. Posteriormente, a medida que avanza la fase estacionaria, la cantidad de éster acumulado disminuye o se mantiene constante.

Además, se observa que la cepa BY4741 Δ atf1 presenta una clara disminución en la producción de los ésteres de isoamilo, de isobutilo y de 2-feniletilo, mientras que las cantidades obtenidas para el acetato de etilo se mantienen más o menos constantes, excepto en el último tiempo del experimento. Posiblemente otras actividades AATasa sean las responsables de catalizar la síntesis de acetato de etilo.

En cuanto al acetato de hexilo, succinato de dietilo, caproato y caprilato de etilo (*Figura 13*, paneles A, B, C y D) la acumulación obtenida es diferente de las descritas para los otros ésteres de acetato. Sólo para el acetato de hexilo y el succinato de dietilo (*Figura 13*, paneles A y B), la cepa mutante en el gen *ATF1* produce una menor cantidad de compuesto que la cepa de referencia. Para el resto de

compuestos no se observa un efecto claro de la delección del gen *ATF1*.

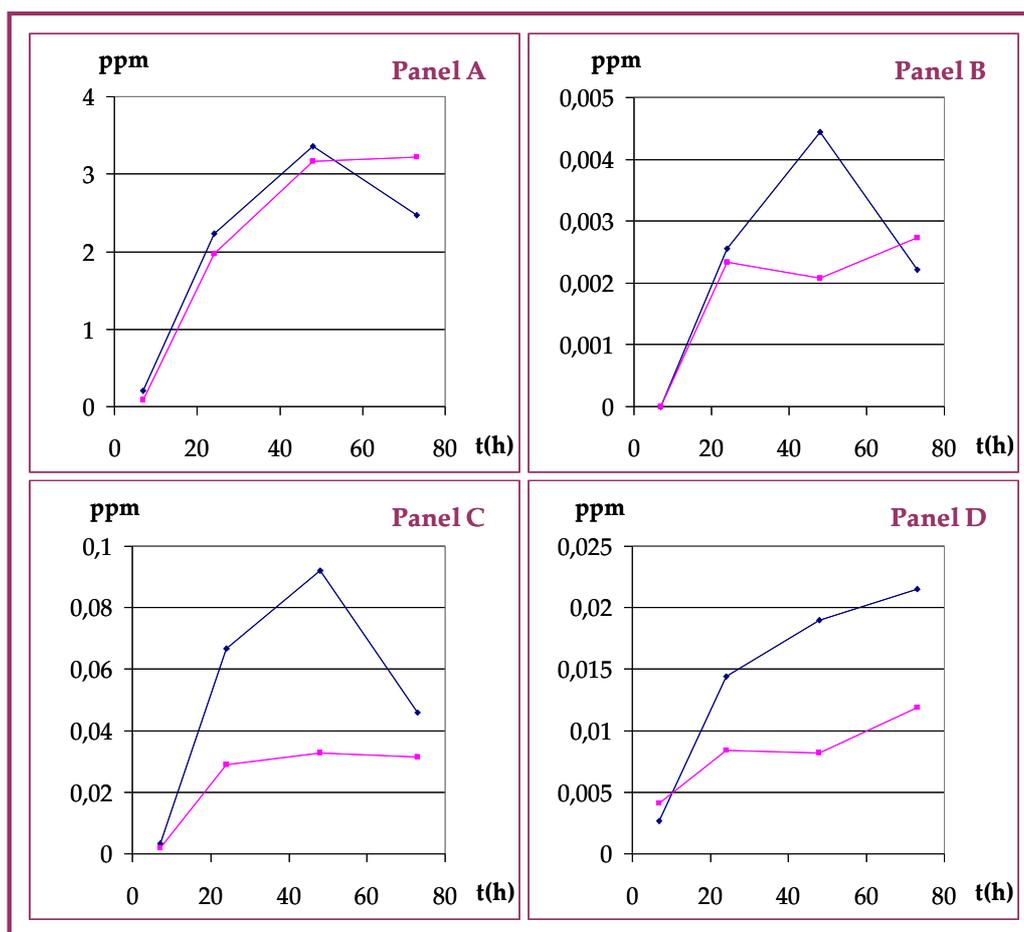


Figura 12: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles del mutante BY4741 Δ atf1 () y de la cepa parental BY4741 (). Panel A: acetato de etilo. Panel B: acetato de isobutilo. Panel C: acetato de isoamilo. Panel D: acetato de 2-feniletilo.

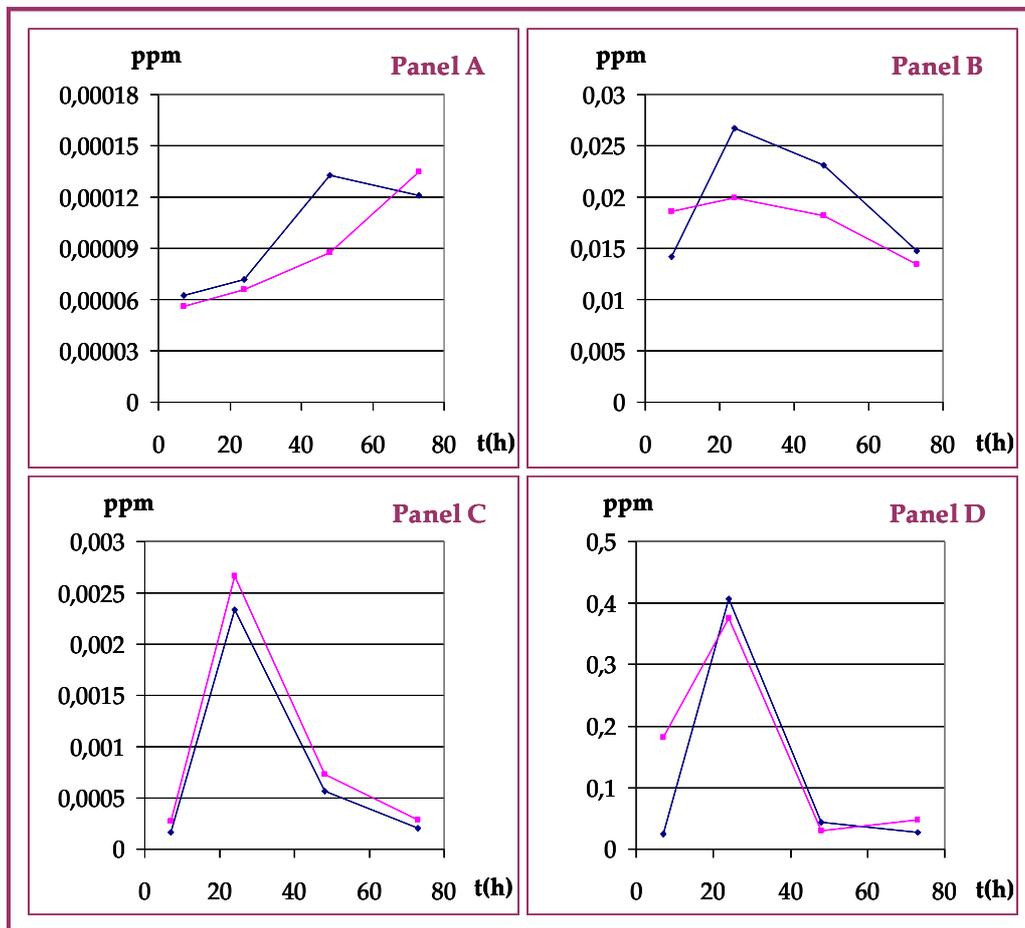


Figura 13: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles del mutante BY4741 Δ atf1 (●) y de la cepa parental BY4741 (○). Panel A: acetato de hexilo. Panel B: succinato de dietilo. C: caproato de etilo. Panel D: caprilato de etilo.

Por lo que respecta a los alcoholes superiores precursores de los ésteres de acetato analizados previamente (*Figura 14*, paneles A, B, C y D), hay que destacar que la cantidad de precursor acumulado sigue una cinética de producción ascendente y, al contrario que los compuestos esterificados, la variabilidad entre cepas no es

significativa, lo que sugiere que la delección del gen *ATF1* no origina efectos en la concentración final de estos precursores.

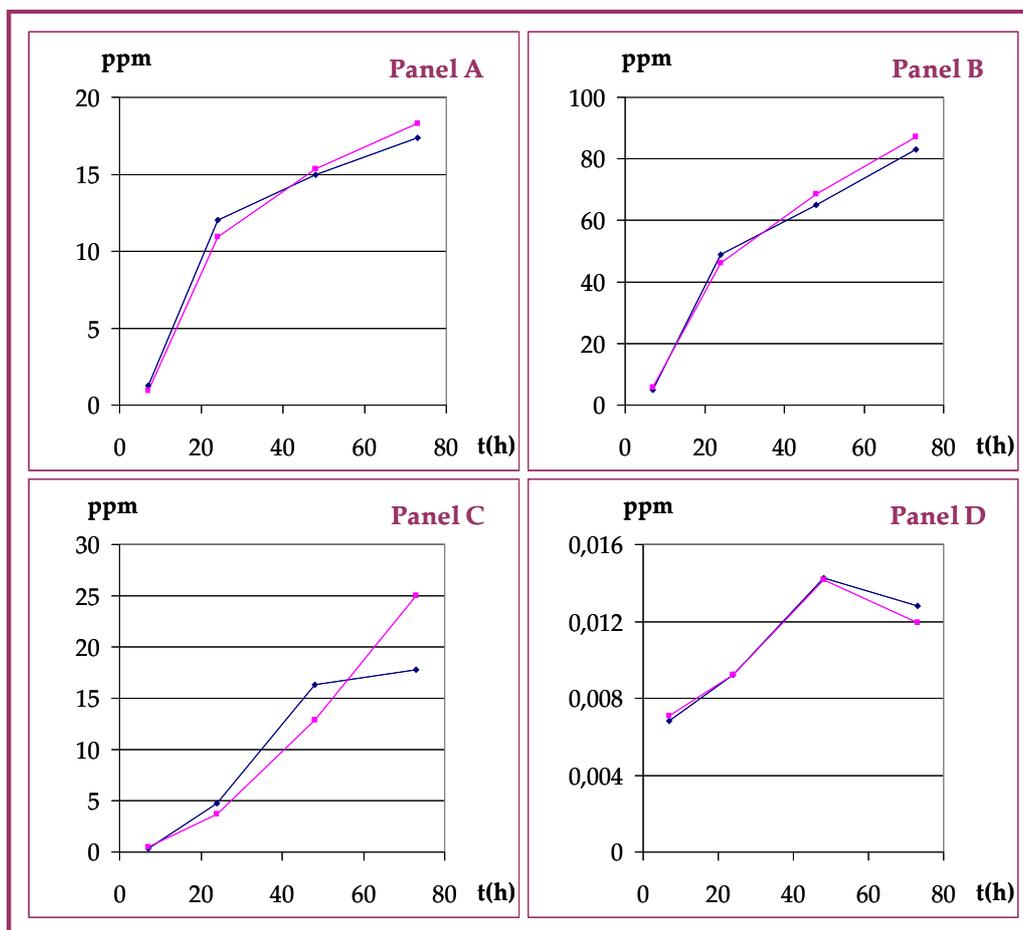


Figura 14: Cinéticas de acumulación de alcoholes volátiles del mutante BY4741 Δ atf1 (■) y de la cepa parental BY4741 (●). Panel A: isobutanol. Panel B: alcohol isoamílico. Panel C: 2-feniletanol. Panel D: 1-hexanol.

Los resultados obtenidos con el mutante BY4741 Δ atf1 indican que la actividad alcohol acetiltransferasa *Atf1p* está implicada al menos en la biosíntesis de los ésteres de acetato de isobutilo, de isoamilo y de 2-feniletilo, puesto que la cepa carente del gen que la codifica acumula menor cantidad de estos tres compuestos (*Figura 12*).

3.1.2. Análisis del mutante simple BY4741 Δ atf2.

Las *Figuras 15* y *16* muestran los resultados obtenidos para la cepa con la delección en el gen *ATF2* comparada con la cepa silvestre. La acumulación para los acetatos de etilo, de isobutilo, de isoamilo y de 2-feniletilo en la cepa mutante BY4741 Δ atf2 es similar a las obtenidas en el mutante BY4741 Δ atf1 (comparar *Figuras 12* y *15*) con máximos de acumulación en fase estacionaria de crecimiento. En ambos casos las cepas mutantes acumulan menor cantidad de ésteres que la cepa control, a excepción del acetato de etilo. Posiblemente existan otras actividades biosintéticas más específicas para este compuesto (*Figura 15* panel A) donde las cantidades acumuladas entre las 7 h y 48 h de crecimiento en la cepa mutante son similares a las de la cepa control. Sin embargo, para el resto de compuestos analizados en esta figura (paneles B, C y D), la delección del gen *ATF2* produce un efecto de disminución de producción de ésteres menor que el observado en el mutante carente del gen *ATF1* (comparar *Figuras 12* y *15*). Este efecto sólo se observa en las muestras correspondientes a los tiempos de 7 h, 24 h y 48 h. En la muestra de 72 h, por el contrario, se observa una acumulación mayor en el mutante BY4741 Δ atf2 que en la cepa parental (*Figura 15*, paneles B, C y D).

Al comparar el resto de compuestos esterificados, acetato de hexilo, succinato de dietilo, caproato de etilo y caprilato de dietilo, entre las cepas BY4741 Δ atf1 y BY4741 Δ atf2 se confirma que la evolución de la acumulación es semejante (*Figuras 13* y *16*). Aunque para este grupo de compuestos, (*Figura 16*, paneles A, B, C y D), los efectos de la delección del gen *ATF2* no son claros.

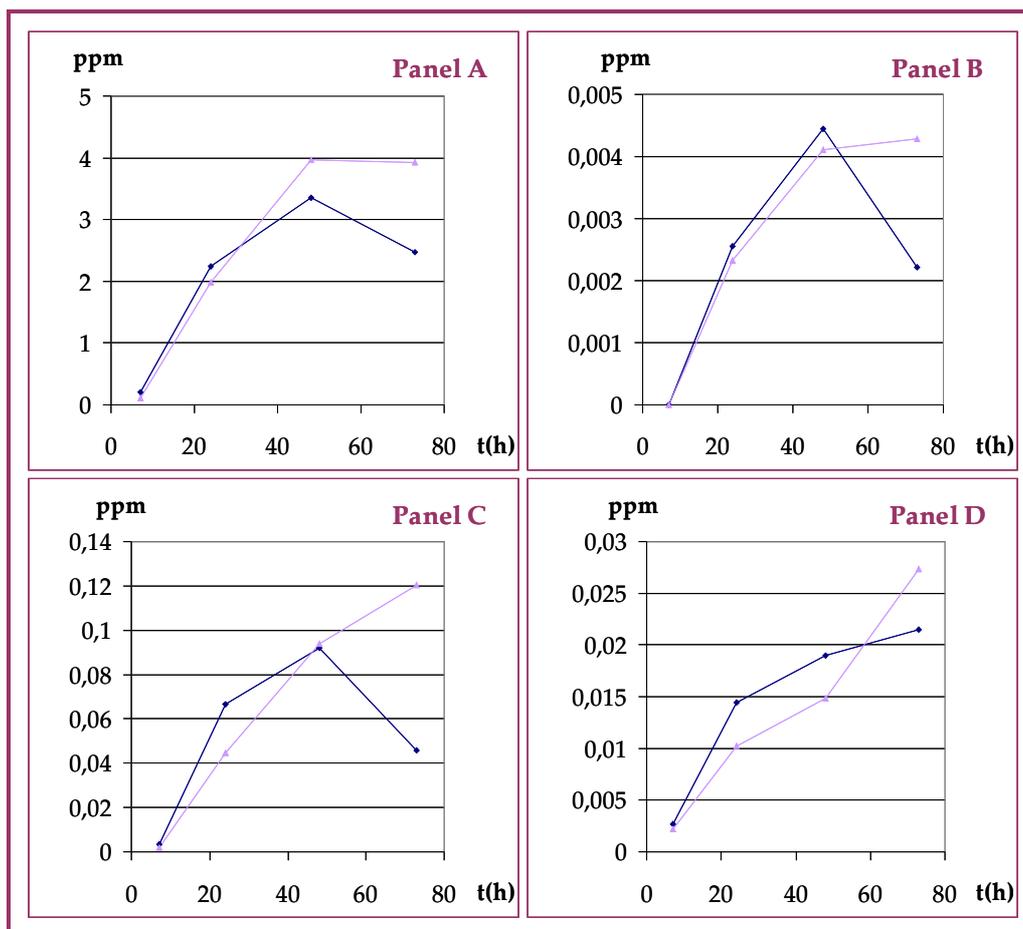


Figura 15: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles del mutante BY4741Δatf2 (●) y de la cepa control BY4741 (○). Panel A: acetato de etilo. Panel B: acetato de isobutilo. Panel C: acetato de isoamilo. Panel D: acetato de 2-feniletilo.

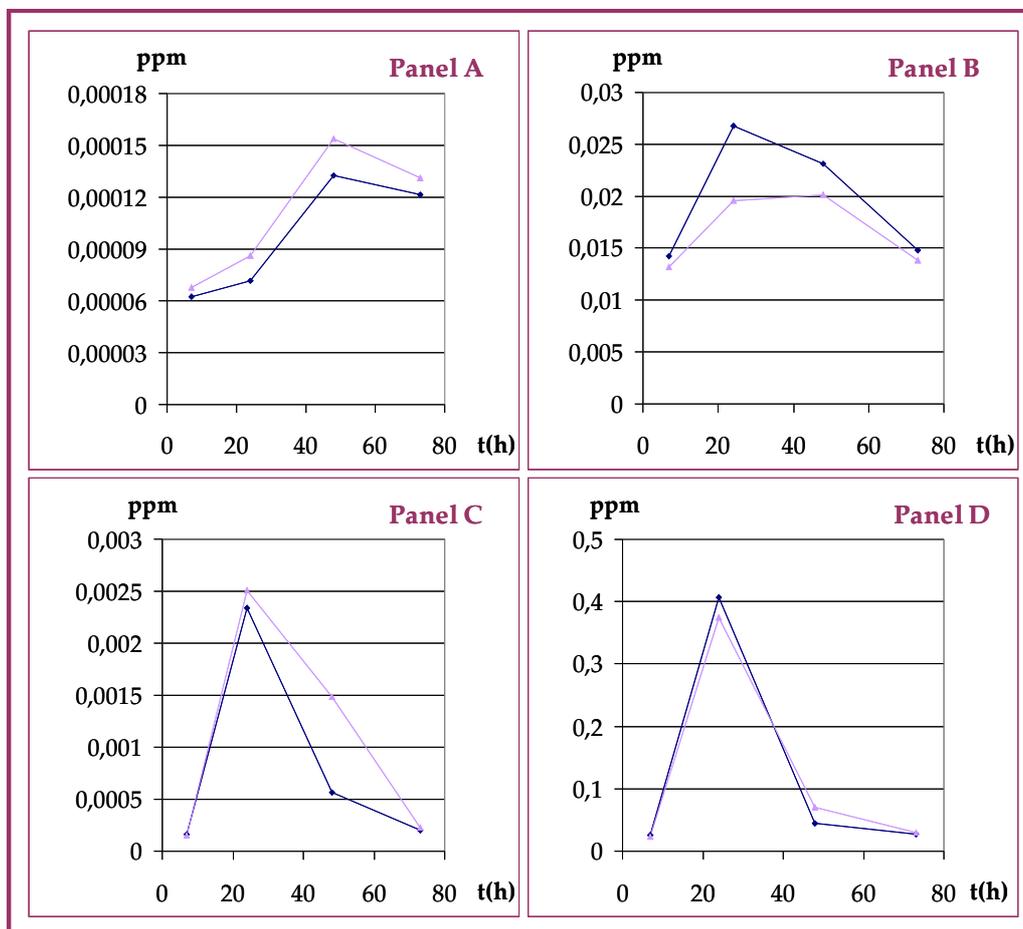


Figura 16: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles del mutante BY4741 Δ atf2 (●) y de la cepa control BY4741 (▲). Panel A: acetato de hexilo. Panel B: succinato de dietilo. Panel C: caproato de etilo. Panel D: caprilato de etilo.

En relación con los alcoholes precursores de los ésteres estudiados (Figura 17, paneles A, B, C, y D) cabe resaltar que la acumulación sigue una cinética de producción ascendente y que no existen diferencias significativas entre la cepa mutante y la parental en el intervalo de 7 h a 48 h, por lo que la delección del gen *ATF2* no parece afectar a la concentración final de estos compuestos, al igual que

sucedía en el mutante simple BY4741 Δ atf1 (ver *Figura 14*). No podemos descartar que la ausencia de efecto de las deleciones en los genes que codifican la acetiltransferasa **Atf1p** y **Atf2p** en la síntesis de estos compuestos alcohólicos pueda deberse a que el flujo de la reacción de esterificación en comparación con el flujo de síntesis del alcohol es muy pequeño y, por tanto, la carencia de estas actividades enzimáticas puede que no sea apreciable.

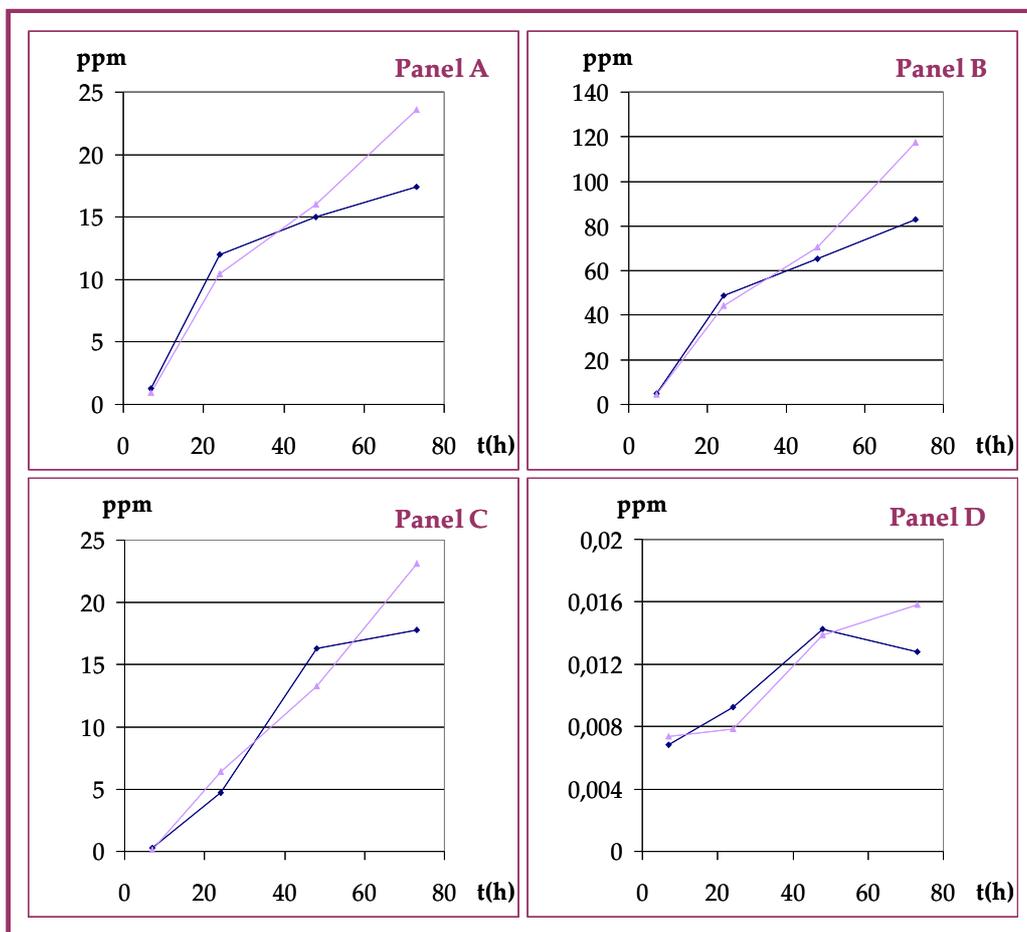


Figura 17: Cinéticas de acumulación de alcoholes volátiles del mutante BY4741 Δ atf2 (●) y de la cepa control BY4741 (▲). Panel A: isobutanol. Panel B: alcohol isoamílico. Panel C: 2-feniletanol. Panel D: 1-hexanol.

Los resultados obtenidos en este apartado sugieren que la alcohol acetiltransferasa **Atf2p** estaría implicada en la biosíntesis de los acetatos de isobutilo, de isoamilo y de 2-feniletilo ya que la delección del gen *ATF2* genera una disminución de la acumulación de estos tres compuestos, al menos en el intervalo de 7 h a 48 h de la cinética de crecimiento (*Figura 15*).

3.1.3. Análisis del mutante simple BY4741 Δ iah1.

Los resultados obtenidos para el mutante portador de la delección del gen *IAH1* (BY4741 Δ iah1) comparados con la cepa parental (BY4741) se muestran en las *Figuras 18* y *19*.

Respecto a los datos obtenidos para los acetatos de isobutilo, de isoamilo y de 2-feniletilo (*Figura 18*, paneles B, C y D), se observa que la eliminación de la actividad esterasa **Iah1p** produce un aumento en la cinética de acumulación de estos compuestos durante todo el crecimiento, siendo ésta más acusada en el intervalo de tiempo de 24h a 72 h. Por el contrario, la acumulación de acetato de etilo es menor en el mutante BY4741 Δ iah1 que en la cepa control (*Figura 18*, panel A).

Para el caso del acetato de hexilo, succinato de dietilo y caproato y caprilato de etilo (*Figura 19*, paneles A, B, C y D) es difícil concluir como ocurría con las delecciones de los genes *ATF1* y *ATF2*, un efecto claro atribuible a la delección del gen *IAH1* sobre estos compuestos.

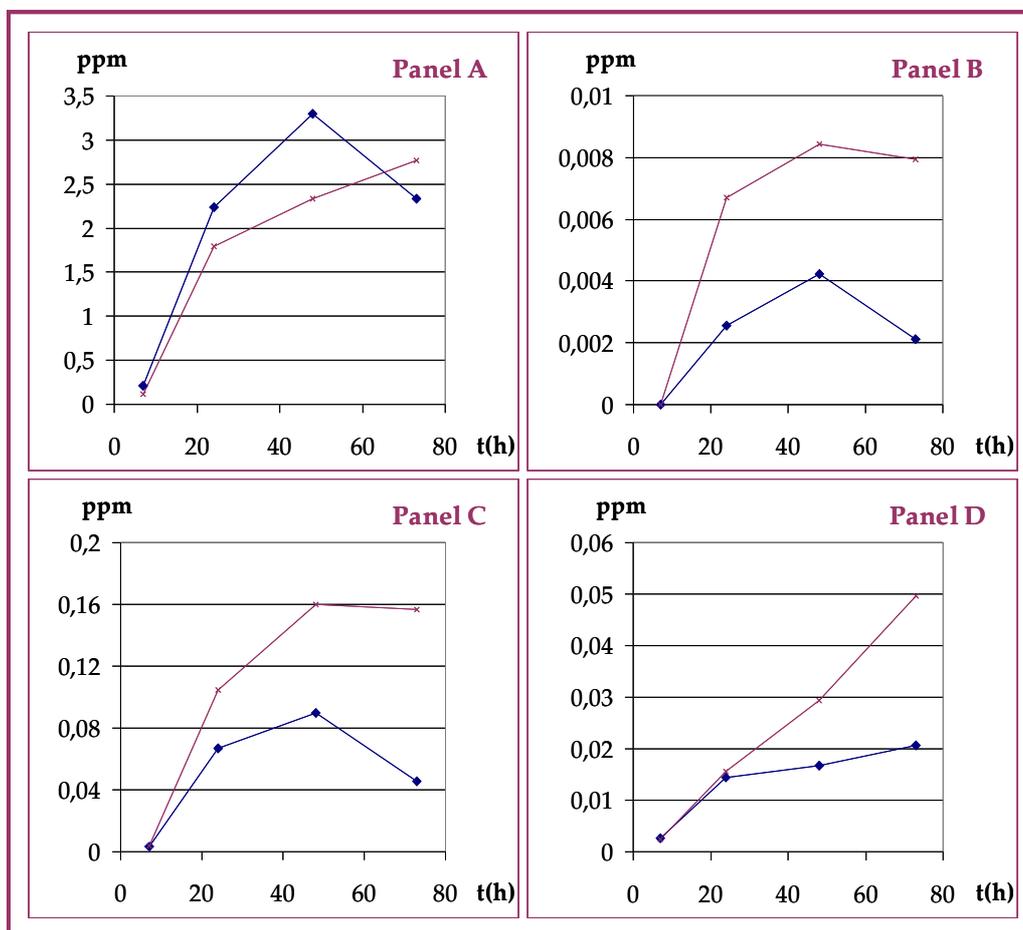


Figura 18: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles del mutante BY4741Δiah1 (x) y de la cepa parental BY4741 (◊). Panel A: acetato de etilo. Panel B: acetato de isobutilo. Panel C: acetato de isoamilo. Panel D: acetato de 2-feniletilo.

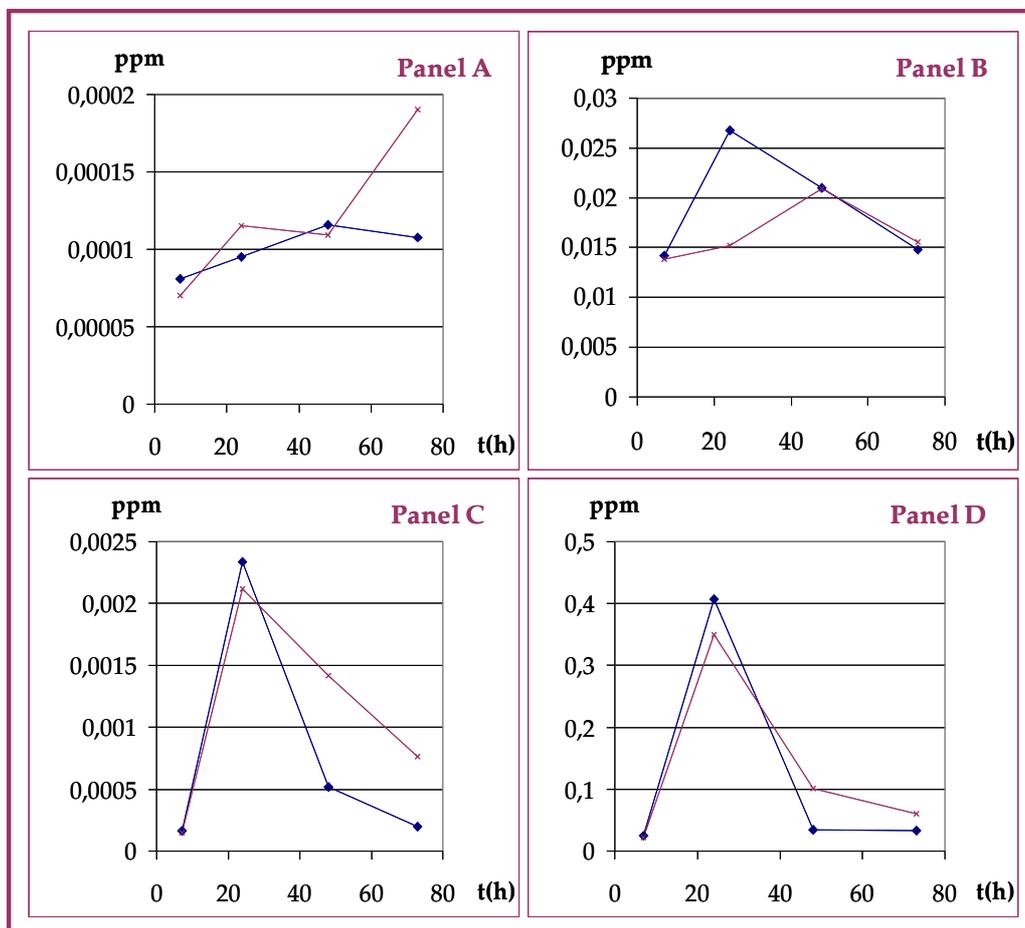


Figura 19: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles del mutante BY4741 Δ iah1 (x) y de la cepa parental BY4741 (◊). Panel E: acetato de hexilo. Panel F: succinato de dietilo. Panel G: caproato de etilo. Panel H: caproato de etilo.

En lo concerniente a los alcoholes precursores de los ésteres analizados (*Figura 20*, paneles A, B, C y D), la acumulación de alcohol isoamílico, isobutanol, 2-feniletanol y 1-hexanol en la cepa mutante sigue una cinética de producción ascendente al igual que en la cepa control. Sin embargo, en todos los casos analizados, se observa una

tendencia de mayor acumulación de estos compuestos en la cepa BY4741 Δ iah1 que en la cepa parental. Este resultado no es explicable desde el punto de vista de la actividad éster hidrolasa de la proteína **Iah1p**. Una posibilidad alternativa sería la producción de efectos reguladores sobre las enzimas implicadas en la biosíntesis de los ésteres de acetato, aunque no existe ninguna información referenciada que apoye esta hipotética explicación.

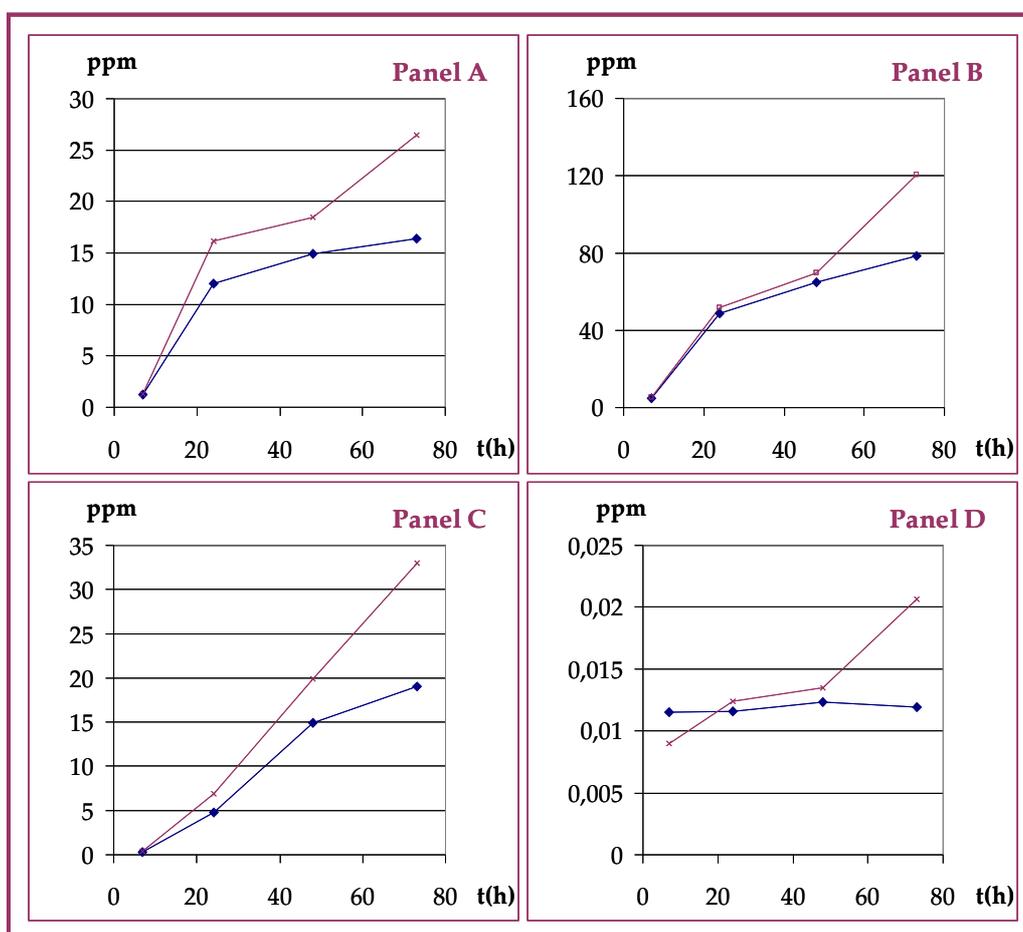


Figura 20: Cinéticas de acumulación de alcoholes volátiles del mutante BY4741 Δ iah1 (x) y de la cepa parental BY4741 (◊). Panel A: isobutanol. Panel B: alcohol isoamílico. Panel C: 2-feniletanol. Panel D: 1-hexanol.

En conclusión, todos los datos obtenidos con los mutantes simples ponen de manifiesto que la enzima **Iah1p** participa de forma mayoritaria en el proceso de degradación de los acetatos de isobutilo, isoamilo y 2-feniletilo (*Figura 18*), y que las enzimas **Atf1p** y **Atf2p**, son las principales responsables de los procesos biosintéticos (*Figuras 12 y 15*; Mason y Dufour, 2000).

Por otro lado, y en el caso del acetato de etilo (*Figura 18* panel A), los cambios que introduce la delección del gen **IAH1** no son explicables ya que las esterasas catalizan principalmente reacciones de degradación hidrolítica de ésteres de acetato rindiendo ácido acético y alcohol. Sin embargo, existen referencias bibliográficas que proponen que en ausencia de acetyl-CoA, las esterasas son capaces de catalizar la reacción en el sentido biosintético (Schermers *et al.*, 1976; Soumalainen, 1981; Peddie, 1990). Si esta función biosintética de las esterasas fuese posible, los datos obtenidos en el mutante BY4741Δ*iah1* para el acetato de etilo serían explicables e implicarían que la enzima **Iah1p** estaría involucrada en el proceso de síntesis del acetato de etilo.

3.1.4. Análisis de los mutantes doble, BY4741Δ*atf1atf2*, y triple BY4741Δ*atf1atf2iah1*.

En este apartado se presentan los resultados obtenidos para las cepas con la doble delección en los genes **ATF1** y **ATF2** (BY4741Δ*atf1atf2*) y la delección triple de los genes **ATF1**, **ATF2** e **IAHI** (BY4741Δ*atf1atf2iah1*) comparadas con la cepa parental BY4741 (*Figuras 21, 22 y 23*).

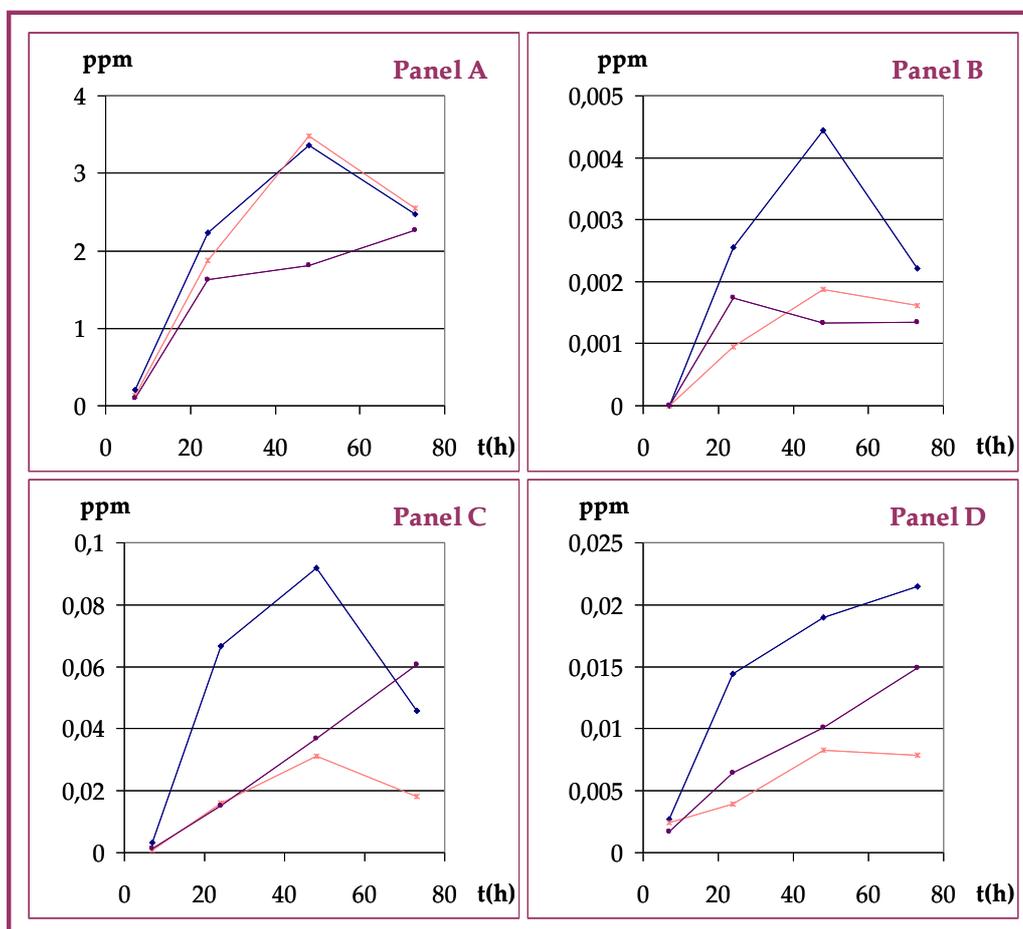


Figura 21: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles de los mutantes doble BY4741 Δ atf1 Δ atf2 (●) y triple BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1 (■), y de la cepa control BY4741 (▲). Panel A: acetato de etilo. Panel B: acetato de isobutilo. Panel C: acetato de isoamilo. Panel D: acetato de 2-feniletilo.

Los datos obtenidos muestran que en lo concerniente al acetato de etilo (*Figura 21*, panel A), la cepa doble mutante BY4741 Δ atf1 Δ atf2 genera la misma cantidad de este volátil que la cepa parental BY4741, mientras que la cepa que carece de las tres actividades enzimáticas, BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1, acumula menos cantidad. De nuevo este

resultado, es difícil de explicar en base a las actividades descritas para las proteínas **Atf1p**, **Atf2p** e **Iah1p**. Sin embargo, es coherente con los datos observados en los mutantes simples BY4741 Δ atf1 (*Figura 12* panel A, apartado 3.1.1), BY4741 Δ atf2 (*Figura 15* panel A, apartado 3.1.2) y BY4741 Δ iah1 (*Figura 18* panel A, apartado 3.1.3) y apoyaría la hipótesis expuesta sobre la existencia de otras actividades biosintéticas más específicas para la síntesis de este compuesto o sobre la posible implicación de la éster hidrolasa **Iah1p** en la síntesis de acetato de etilo.

En cuanto al acetato de isobutilo, isoamilo y 2-feniletilo (*Figura 21*, paneles B, C y D) cabe señalar que la acumulación obtenida en las cepas con las dos o tres deleciones, es significativamente menor que la obtenida en la cepa parental. Además si comparamos la acumulación alcanzada en la cepa BY4741 Δ atf1 (*Figura 12* paneles B, C, D, apartado 3.1.1) con la conseguida en los mutantes múltiples (*Figura 21*), las cantidades de volátiles producidos en estos últimos son cuantitativamente iguales o incluso inferiores que en el mutante simple. Este resultado pone de manifiesto la existencia de mecanismos de síntesis de los ésteres de acetato de interés (isobutilo, isoamilo, y 2-feniletilo) independientes de las alcohol acetiltransferasas **Atf1p** y **Atf2p**. Estos otros mecanismos alternativos sintetizarían un pequeño porcentaje de estos compuestos, mientras que un porcentaje elevado sería sintetizado por la enzima **Atf1p** y **Atf2p** contribuiría en la producción final en menor medida.

Dicha acumulación independiente de las actividades **Atf1p** y **Atf2p** podría explicar, a su vez, las diferencias en cuanto a las cinéticas de acumulación del acetato de isoamilo y de 2-feniletilo entre las cepas BY4741 Δ atf1 Δ atf2 y BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1 (*Figura 21* paneles C y D), puesto que si en ausencia **Atf1p** y **Atf2p** la célula es capaz de generar, por otros mecanismos, cierta cantidad de éster, la deleción simultánea de los genes *ATF1*, *ATF2* e *IAH1* daría lugar a un aumento de la concentración final de estos compuestos como consecuencia de la eliminación de la actividad hidrolítica **Iah1p**, tal y como ocurre en el mutante simple BY4741 Δ iah1 (*Figura 18*, paneles C y D).

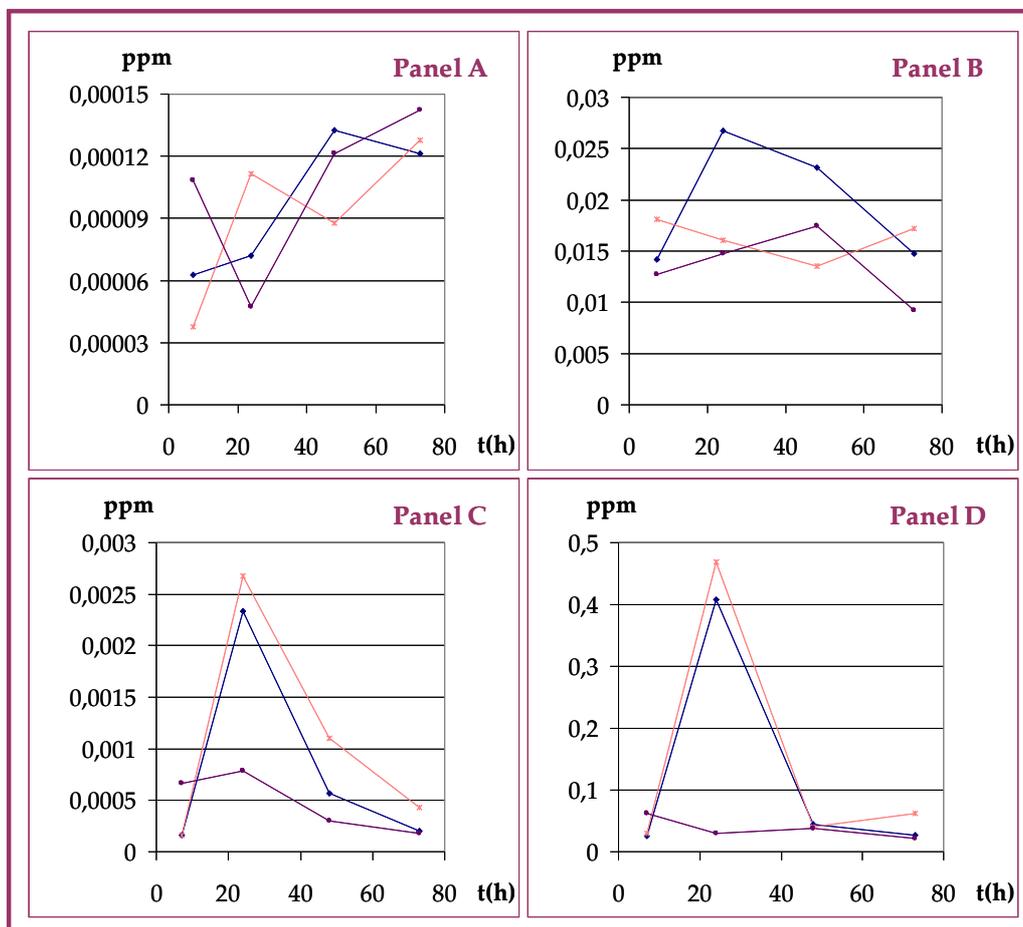


Figura 22: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles de los mutantes doble BY4741 Δ atf1 Δ atf2 () y triple BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1 (), y de la cepa control BY4741 (). Panel E: acetato de hexilo. Panel F: succinato de dietilo. Panel G: caproato de etilo. Panel H: caproato de etilo.

Por lo que respecta al resto de compuestos analizados, es decir acetato de hexilo, succinato de dietilo y los ésteres de etilo caproato y caprilato únicamente el succinato de dietilo (*Figura 22*, panel B) parece seguir el mismo patrón de acumulación que los acetatos de isobutilo, isoamilo y 2-feniletilo. Para el resto de compuestos las

modificaciones genéticas introducidas no producen un efecto claro. Este comportamiento coincide con el observado en los mutantes simples BY4741 Δ atf1 (Figura 13, apartado 3.1.1), BY4741 Δ atf2 (Figura 16, apartado 3.1.2) y BY4741 Δ iah1 (Figura 19, apartado 3.1.3),

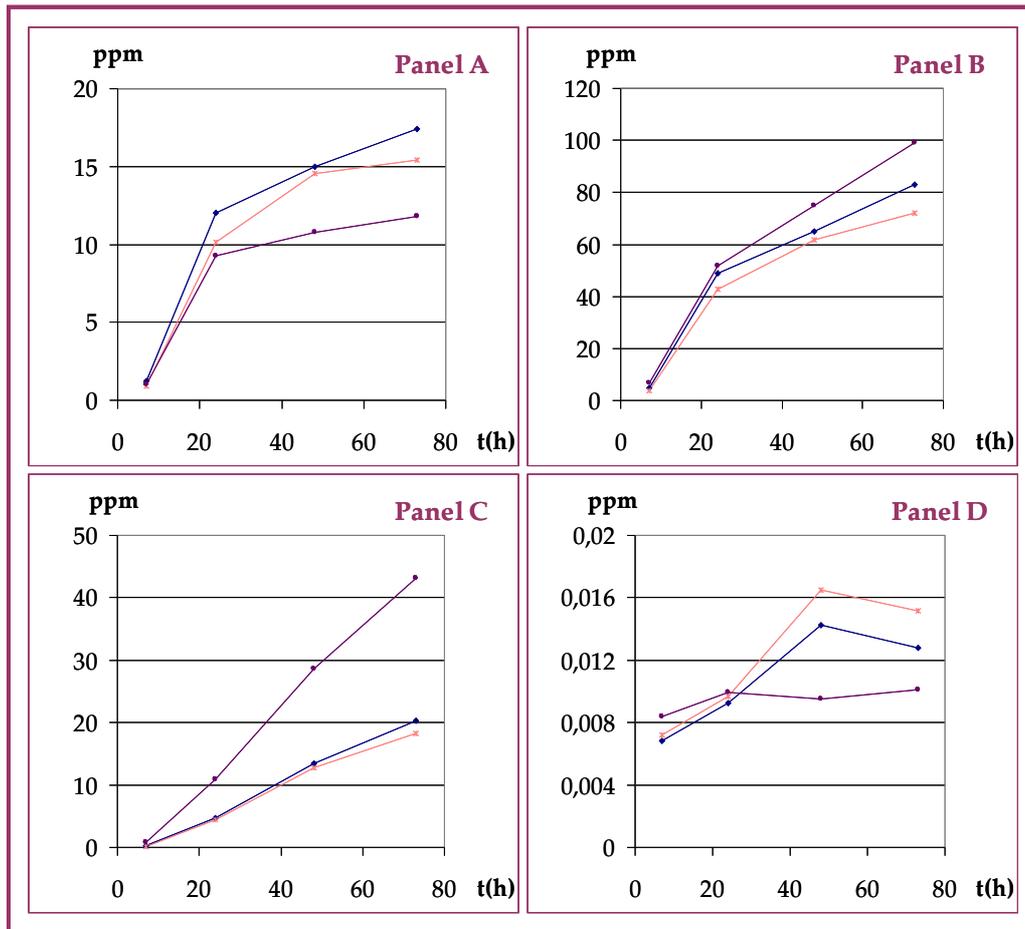


Figura 23: Cinéticas de acumulación de alcoholes volátiles de los mutantes doble BY4741 Δ atf1 Δ atf2 (●) y triple BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1 (■), y de la cepa control BY4741 (▲). Panel A: isobutanol. Panel B: alcohol isoamílico. Panel C: 2-feniletanol. Panel D: 1-hexanol.

En referencia a los datos obtenidos para los precursores alcohólicos isobutanol, alcohol isoamílico, 2-feniletanol y 1-hexanol (*Figura 23*), las cinéticas de acumulación del doble mutante BY4741 Δ atf1 Δ atf2 muestran que la cantidad de compuesto acumulado es similar a la alcanzada en la cepa parental. Estos resultados son coherentes con los obtenidos tras la eliminación individual de las actividades enzimáticas **Atf1p** y **Atf2p** (*Figura 14*, apartado 3.1.1 y *Figura 17*, apartado 3.1.2) y permiten concluir que ninguna de las dos enzimas AATasas, combinadas o no, influye significativamente en la concentración final de los alcoholes precursores de ésteres de acetato.

Sin embargo, en el triple mutante, BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1, la cinética de acumulación es diferente dependiendo del compuesto. En el caso del alcohol isoamílico y el 2-feniletanol (*Figura 23*, paneles B y C) la eliminación de las tres actividades enzimáticas provoca un incremento en la concentración final del alcohol respecto a la cantidad producida en la cepa parental, siendo considerablemente mayor para el 2-feniletanol (*Figura 23*, panel C) que para el alcohol isoamílico (*Figura 23*, paneles B), como ocurría en el mutante simple BY4741 Δ iah1 (*Figura 20* panel C). Las cinéticas de acumulación del isobutanol y el 1-hexanol (*Figura 23* panel A y D) muestran lo contrario, ya que el triple mutante produce menos cantidad que la cepa control BY4741.

Los datos obtenidos en el doble mutante sugieren que la presencia o ausencia de las AATasas no afecta a la concentración final del alcohol. Por el contrario los resultados obtenidos en la cepa triple mutante indican que la combinación de las tres deleciones si que origina un efecto en la acumulación de estos compuestos, sugiriendo un papel relevante para **Iah1p**.

Las rutas de síntesis de alcohol isoamílico, isobutanol y el 2-feniletanol, son ramificaciones de los mecanismos biosintéticos de los aminoácidos leucina, valina y 2-fenilalanina (Dickinson *et al.*, 1997; Dickinson *et al.*, 1998; Dickinson *et al.*, 2003; Vuralhan *et al.*, 2003). Si comparamos los resultados obtenidos al combinar las tres deleciones con los datos obtenidos en los mutantes simples BY4741 Δ atf1 y BY4741 Δ atf2 (comparar *Figura 14* y *Figura 17* paneles A, B y C) y

considerando además que existen otros mecanismos de biosíntesis independientes de las enzimas **Atf1p** y **Atf2p** para estos mismos compuestos, esperaríamos dos tipos de resultados. El primero, que la cantidad de alcohol acumulado en la cepa *BY4741Δatf1Δatf2Δiah1* se mantuviese más o menos constante e igual al de la cepa parental como ocurre en el doble mutante (*Figura 23*) ya que la única diferencia entre el doble y el triple mutante es la adición de la mutación en el gen *IAH1* y éste codifica una proteína con actividad hidrolítica que degrada específicamente acetato de isobutilo, de isoamilo y de 2-feniletilo. Por tanto, si no hay síntesis de los correspondientes ésteres de acetatos, la proteína **Iah1p** no tiene sustrato disponible para degradar y las cantidades de alcohol deberían de mantenerse constantes. El segundo, la ausencia de la enzima **Iah1p**, junto con la delección de las actividades de síntesis promovería un incremento en la acumulación de los tres alcoholes respecto de la cepa parental, como ocurre en el mutante simple *BY4741Δiah1* (ver *Figura 13* paneles A, B y C apartado 3.1.3). Ahora bien, como se indicó anteriormente, no tenemos una explicación razonable para dicho incremento en base a la actividad éster hidrolasa. Si la hubiese, dicho incremento debería observarse en los tres alcoholes y además debería ser cuantitativamente menor en el triple mutante que en el simple ya que la cantidad de éster producido no dependiente de **Atf1p** y **Atf2p** es mínima (*Figura 14* paneles B, C y D). Por tanto, este resultado es difícil de explicar.

4. CONCLUSIONES.

A modo de resumen y para facilitar la comparación de los datos obtenidos y comentados en los apartados anteriores, las *Figuras 24* y *25* muestran el perfil de acumulación de los distintos ésteres de acetato de interés, esto es, acetato de hexilo, de isobutilo, de isoamilo y de 2-feniletilo en las cepas ensayadas. La *Tabla 9* por otro lado, muestra el porcentaje de compuesto no sintetizado en cada una de las cepas modificadas para estos mismos compuestos.

Compuesto	tiempo	BY4741 Δ atf1	BY4741 Δ atf2	BY4741 Δ atf1 Δ atf2	BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1
Acetato de Isobutilo	24 h	9	9	62	31
	48 h	53	8	58	70
Acetato de Isoamilo	24 h	57	33	76	80
	48 h	64	0	66	60
Acetato de 2-Feniletilo	24 h	42	29	72	55
	48 h	57	22	56	46

Tabla 9. Porcentaje de acetato de isobutilo, de isoamilo y de 2-feniletilo no sintetizado a las 24 h y 48 h en la cinética de crecimiento en medio rico YPD. Estos valores han sido calculados aplicando la fórmula: $[1 - (\text{acumulación en la cepa mutante}/\text{acumulación en la cepa parental})] \times 100$

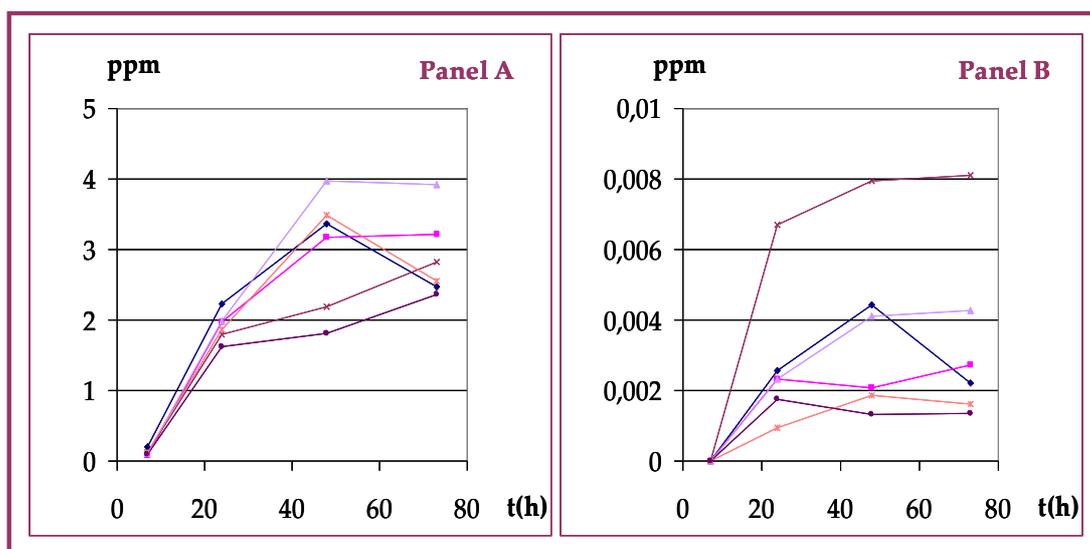


Figura 24. Cinética de acumulación de la cepa control BY4741() y de las cepas mutantes BY4741 Δ atf1 (), BY4741 Δ atf2 (), BY4741 Δ iah1 (), BY4741 Δ atf1 Δ atf2 () y BY4741 Δ atf1 Δ atf2 Δ iah1 (). Panel A: acetato de etilo. Panel B: acetato de isobutilo.

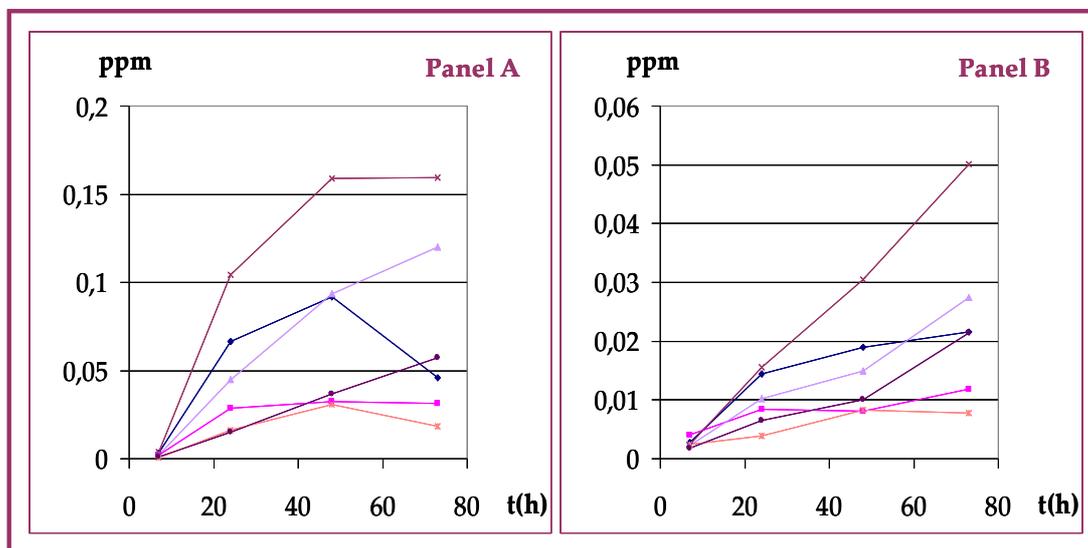


Figura 25: Cinética de acumulación de la cepa parental BY4741() y de las cepas mutantes BY4741Δatf1 (), BY4741Δatf2 (), BY4741Δiah1 (), BY4741Δatf1Δatf2 () y BY4741Δatf1Δatf2Δiah1 (). Panel A: acetato de isoamilo. Panel B: acetato de 2-feniletilo.

Las conclusiones que se pueden extraer del estudio realizado en este capítulo son las siguientes:

1. La participación en los procesos de esterificación de cada una de las AATasas analizadas es distinta, siendo la enzima **Atf1p** la responsable mayoritaria de la síntesis de acetato de isobutilo (*Figura 24* panel B), isoamilo (*Figura 25* panel A), 2-feniletilo (*Figura 25* panel B) y, posiblemente, también del succinato de dietilo (*Figura 20*, panel B).
2. La contribución de la enzima **Atf1p** en la síntesis de acetato de isobutilo, isoamilo y de 2-feniletilo es distinta (ver *Tabla 9*), siendo mayor la contribución en la síntesis de acetato de isoamilo.

3. Existen otras actividades éster sintasa susceptibles de catalizar la producción de acetato de isobutilo, isoamilo y 2-feniletilo aunque son cuantitativamente menos importantes (*Figura 24* panel B, y *Figura 25* panel A y B). Además, debe haber actividades enzimáticas de síntesis con mayor especificidad y/o afinidad por otros sustratos, como sería el caso de la enzima etanol hexanoil transferasa **Eht1p**, que catalizaría la formación de hexanoato de etilo (caprilato de etilo) (Malcorps y Dufour, 1992; Mason y Dufour, 2000).
4. La actividad éster hidrolasa desempeña una función principalmente hidrolítica sobre los acetatos de isobutilo, isoamilo y 2-feniletilo (*Figura 18* paneles B, C y D), una supuesta función biosintética sobre el acetato de etilo (*Figura 18* panel A), y ningún efecto aparente en la degradación del acetato de hexilo, succinato de dietilo, caproato y caprilato de etilo (*Figura 19* paneles A, B, C y D). Este comportamiento sugiere que la proteína **Iah1p** en su función de éster hidrolasa presenta cierto grado de especificidad por sustrato, con preferencia por la hidrólisis de los ésteres de cadena intermedia, esto es, los acetatos de isobutilo, de isoamilo y de 2-feniletilo, que los ésteres de cadena superior como el succinato, caproato y caprilato. Por otro lado, y en el supuesto de que la enzima **Iah1p** pudiera actuar como una enzima catalizadora de la síntesis de ésteres, concluiríamos que **Iah1p** actúa únicamente como una éster sintetasa sobre precursores alcohólicos de cadena corta, como es el caso del etanol.
5. La síntesis y degradación del caproato de etilo, caprilato de etilo y acetato de hexilo, no queda bien definida en el sistema de análisis estudiado. Posiblemente estos procesos sigan mecanismos distintos y dependan de otras actividades enzimáticas diferentes a las ensayadas en este trabajo.
6. Se podrían diseñar estrategias de ingeniería metabólica que, a la vista de los resultados obtenidos en este capítulo, permitan incrementar los niveles de ésteres aromáticos producidos por las levaduras.

CAPÍTULO 2.

OBTENCIÓN DE CEPAS DE LEVADURAS DE LABORATORIO E INDUSTRIALES SOBREPDUCTORAS DE ÉSTERES DE ACETATO.

“...¿Todavía pueden las biotecnologías contemporáneas aportar alguna cosa nueva a los procedimientos milenarios que continuamos utilizando hoy, ya enormemente refinados, para obtener una infinita variedad de vinos, quesos y cerveza?...”

F. Gros

La aparición de las técnicas de ingeniería genética y el aumento del conocimiento de la fisiología y biología molecular de las levaduras, ha permitido el desarrollo de mejoras genéticas en levaduras industriales que introducen conceptos nuevos, en ocasiones complejas de definir, así como la persuasiva idea de poder crear levaduras “a la carta” que respondan a necesidades tecnológicas concretas. Aunque esta idea se convierte cada vez más en una realidad, es importante recordar que cualquier avance o mejora tecnológica ha de considerar dos premisas elementales: que se realice en beneficio del consumidor y/o de la industria y que no elimine la idiosincrasia del producto.

1. POSIBLES ESTRATEGIAS ORIENTADAS A MEJORAR LA PRODUCCIÓN DE ÉSTERES DE ACETATO.

Los ésteres de acetato son metabolitos secundarios generados por la levadura durante la fermentación alcohólica ya que sus procesos de síntesis son ramificaciones de las rutas biosintéticas y degradativas de

aminoácidos. Como se describió en la Introducción, de este trabajo, el mecanismo biosintético para la obtención de estos compuestos requiere la participación de una actividad AATasa y dos sustratos, un alcohol primario y una molécula de acetyl-CoA. Los factores clave para la concentración final de ésteres de acetato son la cantidad de sustratos disponibles y la relación de actividad entre las enzimas de síntesis y las de degradación (Mauricio, *et al.*, 1993). En principio, cualquier efecto sobre el metabolismo de los precursores o sobre las actividades de síntesis y de degradación será crucial para la producción de los compuestos esterificados.

Dentro de este contexto, y atendiendo al engranaje bioquímico que lo integra (*Figura 26*) se diseñaron cuatro estrategias de ingeniería metabólica orientadas a mejorar la producción de ésteres de acetato y, en particular, la de acetato de isoamilo y la de acetato de 2-feniletilo, ya que ambos ocasionan un mayor efecto sobre el aroma floral y afrutado de los vinos. Estas estrategias fueron las siguientes:

1. Sobreexpresión regulada del gen que codifica la enzima **Atf1p** bajo el control del promotor del gen *TDH3* (*Figura 26*).
2. Deleción del gen *IAH1*, cuyo producto génico, la éster hidrolasa **Iah1p**, cataliza la reacción de hidrólisis de los ésteres de acetato (*Figura 26*).
3. Desvío del flujo metabólico de la ruta de síntesis de la leucina hacia la síntesis de alcohol isoamílico modificando los procesos catabólicos y/o anabólicos mediante la sobreexpresión de la α -cetoácido descarboxilasa codificada por el gen *THI3* (*Figura 26*).
4. Sobreactivación de la ruta de biosíntesis de la leucina mediante la deleción de componentes de los sistemas de transporte de aminoácidos para impedir la captación de aminoácidos del medio y estimular la síntesis *de novo* de la leucina (*Figura 26*).

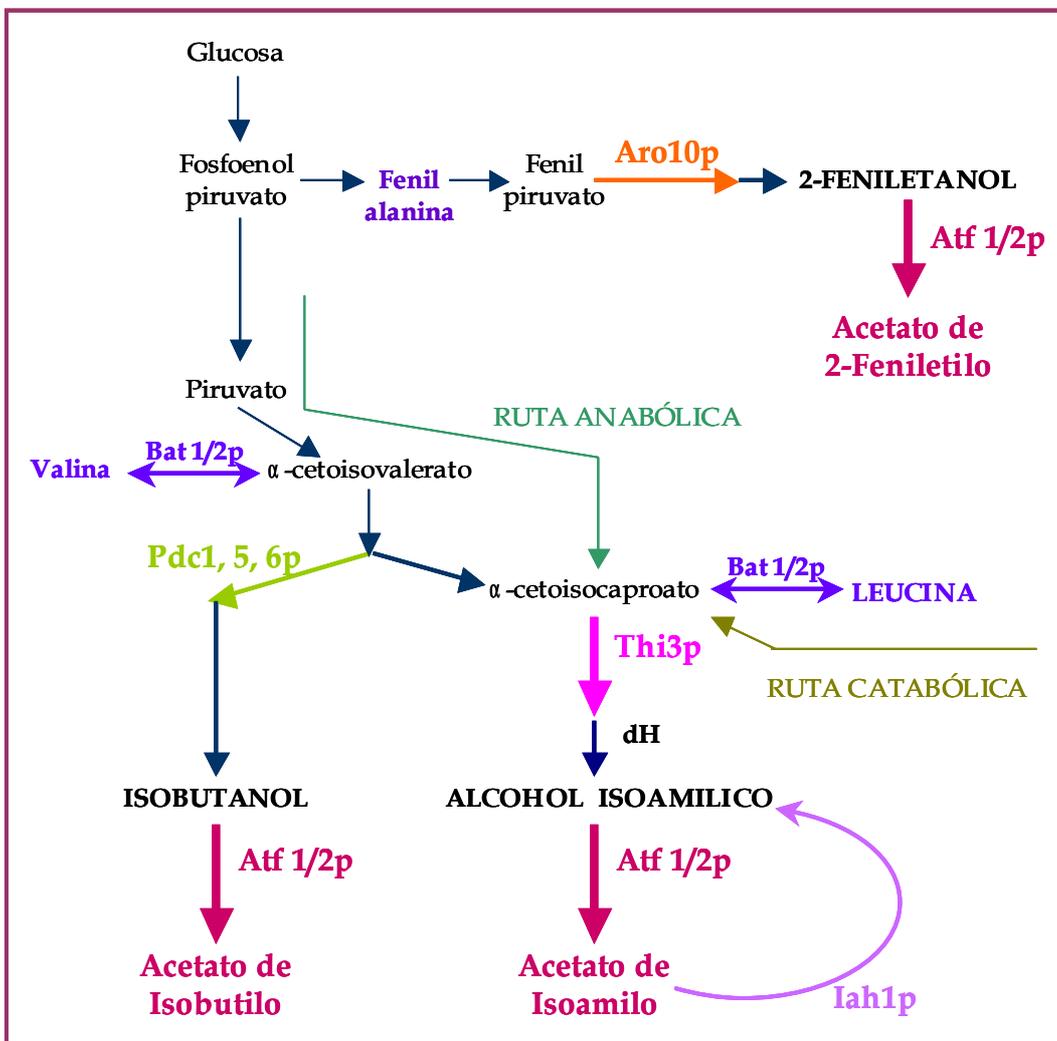


Figura 26: Integración de los mecanismos de síntesis y degradación de los acetatos de isoamilo, isobutilo y 2-feniletilo en las rutas del metabolismo de aminoácidos.

En los apartados siguientes se discutirán los resultados obtenidos en cada una de estas estrategias.

2. ESTRATEGIA 1: SOBREEXPRESIÓN REGULADA DEL GEN *ATF1*.

La enzima **Atf1p** de *S. cerevisiae*, se ha descrito como la responsable mayoritaria de la síntesis de ésteres de acetato (Mason y Dufour, 2000; Lambrechts y Pretorius, 2000), en particular acetato de isoamilo, de isobutilo y de 2-feniletilo, tal como se concluyó en el Capítulo 1 de este trabajo. Una posibilidad para aumentar la producción de ésteres de acetato sería incrementar la actividad de esta proteína al situar el gen que la codifica bajo el control del promotor de un gen con una tasa de transcripción elevada. En este sentido, los promotores de expresión fuerte más utilizados en *S. cerevisiae* son los de genes que codifican enzimas glicolíticas, las cuales llegan a representar hasta el 50% de la proteína soluble en la célula (Bisson 1993; Boulton *et al.*, 1995). La alcohol deshidrogenasa **Adh1p**, la fosfoglicerato quinasa **Pgk1p** o la gliceraldehído 3-fosfato deshidrogenasa **Tdh1/2/3p** son algunos ejemplos. Para el desarrollo de la estrategia de sobreexpresión analizada en este apartado, se escogió el promotor del gen *TDH3* ya que estudios anteriores realizados en nuestro laboratorio demostraron que tanto en condiciones de microvinificación como en condiciones de laboratorio, el patrón de expresión de dicho gen glicolítico es constitutivo y que los niveles de expresión son muy elevados en fase exponencial y estacionaria temprana, aunque en vinificación disminuyen en fase estacionaria tardía (Puig y Pérez-Ortín, 2000).

2.1. Obtención del plásmido de sobreexpresión.

El gen *ATF1* se obtuvo como un producto de PCR de 1,9 kb flanqueado por las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción *SpeI-SacI*. El fragmento amplificado se clonó en el plásmido bacteriano pB-TDH3, derivado de pBluescript que contenía el promotor del gen *TDH3* (apartado 1.2 de Materiales y Métodos). Posteriormente, el fragmento de DNA de 2,3 kb derivado de la digestión *Sall-SacI* que contenía la fusión promotor-gen se subclonó en el vector centromérico YCplac33. El plásmido de sobreexpresión resultante se denominó YCpTATF1 (*Figura 27*). La cepa T73uraleu se

transformó independientemente con el vector vacío YCplac33 y con YCpTATF1.

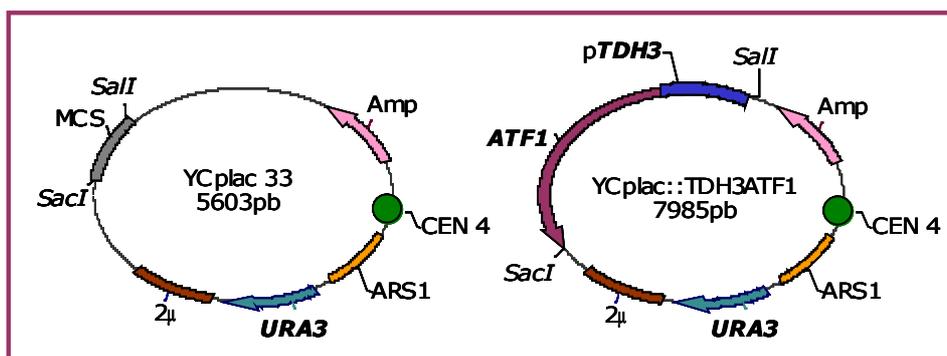


Figura 27: Vectores centroméricos utilizados para la obtención de las cepas recombinantes. Vector de clonación (parte izquierda) y plásmido de sobreexpresión TDH3-ATF1 (derecha).

2.2. Sobreexpresión en condiciones de laboratorio del gen *ATF1* bajo el control del promotor del gen *TDH3*.

Obtenidas las cepas recombinantes T73YCplac33 y T73YCpTATF1 se determinó la cantidad de compuestos aromáticos producidos en condiciones de laboratorio. Para ello se realizó un crecimiento en medio rico YPD durante 72 h con agitación orbital a 200 rpm, tal y como se indica en el apartado 2.1.2 de Materiales y Métodos. Durante el crecimiento en estas condiciones se realizó también un seguimiento de la transcripción del gen *ATF1* mediante análisis northern. La cinética y evolución del crecimiento en ambas condiciones se analizó por cuantificación de azúcares reductores y DO_{600} cuyos perfiles se muestran en la *Figura 28*. Las gráficas resultantes demuestran que en la cepa control y en la cepa con la construcción, las velocidades de crecimiento y de consumo de azúcares son similares.

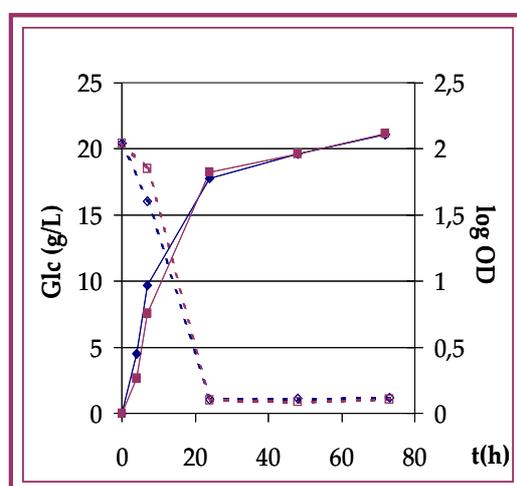


Figura 28: Curva de crecimiento en unidades de densidad óptica (línea continua) y consumo de azúcares reductores en unidades de concentración (g/L) (línea discontinua). Cepas ensayadas: T73YCplac33 () y T73YCpTATF1 ().

El análisis northern de la expresión del gen *ATF1* a lo largo del crecimiento se muestra en la **Figura 29**. En esta figura se observa que para la cepa control (T73YCplac33), no se detecta expresión del gen *ATF1* en el intervalo de tiempo analizado. Sin embargo, en la cepa con la construcción (T73YCpTATF1), se detecta la presencia de transcrito en las mismas condiciones, aunque se restringe a un período de tiempo limitado (**Figura 29**, comparar paneles A y B). El patrón de expresión del gen *ATF1* para la cepa sobreexpresante, T73YCpTATF1, se caracteriza porque presenta un pico de expresión único. Nuestros datos indican que la expresión del gen *ATF1* comienza al final de la fase exponencial coincidiendo con el cambio diáuxico (**Figura 29** carrera 4) y los niveles de máxima acumulación de transcrito se consiguen iniciada la fase estacionaria. Estos datos coinciden con los máximos de actividad alcohol acetiltransferasa descrita por otros autores (Mauricio *et al.*, 1993) (**Figura 29** carreras 5, 6, 7; comparar paneles A, B). La expresión del gen *ATF1* se prolonga hasta alcanzar la fase estacionaria tardía (**Figura 29** carreras 8, 9, 10; comparar paneles A, B).

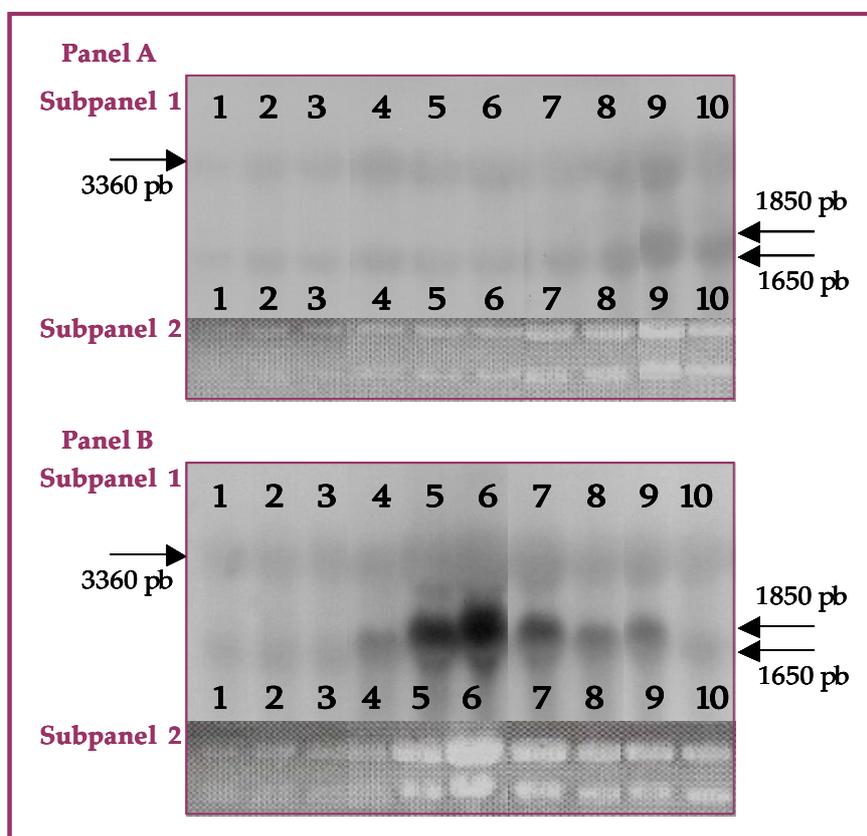


Figura 29. Análisis mediante northern de la expresión del gen *ATF1* en el transcurso de la cinética de crecimiento de las cepas T73YCplac33 (Panel A) y T73YCpTATF1 (Panel B). Las muestras analizadas se incluyen en el intervalo de 3 h-74 h de la cinética de crecimiento. Las distintas carreras enumeradas del 1 al 10 se corresponden con los tiempos 1: 3 h; 2: 5 h; 3: 7,5 h; 4: 13,5 h; 5: 25 h; 6: 29 h; 7: 34,5 h; 8: 48,5 h; 9: 55,5 h; 10: 74 h. Subpaneles 1: autorradiografía del northern hibridado. Se utilizó como sonda el fragmento amplificado con los oligos A1-A3 del gen *ATF1* (2260 pb). Subpaneles 2: tinción con bromuro de etidio del mRNA como control de carga.

Teniendo en cuenta que la expresión del gen *ATF1* está bajo el control del promotor del gen *TDH3* y que *TDH3* es un gen de expresión constitutiva con una elevada tasa de transcripción (Puig y Pérez-Ortín, 2000), el perfil de expresión del gen *ATF1* obtenido podría sugerir que existen diferencias de estabilidad entre los mensajeros de

los genes *TDH3* y *ATF1*, ya que éste último sólo se acumula en fase estacionaria temprana (*Figura 29* carreras 5, 6 y 7).

Respecto a la cuantificación de la concentración de los compuestos esterificados, los resultados obtenidos se muestran en la *Figura 30*. El análisis de producción del acetato de isoamilo, 2-feniletilo, isobutilo, etilo y hexilo en la cepa transgénica que contiene el gen *ATF1* bajo el control del promotor del gen *TDH3* indica que la acumulación para todos ellos mantiene un mismo perfil que presenta las siguientes características. En primer lugar, la cantidad de compuesto aumenta significativamente entre las 7 y 48 h de crecimiento celular en todos los compuestos esterificados ensayados. Dentro de este intervalo se observa que la velocidad de producción sufre un rápido incremento coincidente con el cambio diáuxico (rango de 7 a 24 h) y también con los máximos de expresión génica (*Figura 29* carreras 5, 6 y 7). Posteriormente, entrada la fase estacionaria, la concentración del compuesto varía, observándose un aumento para los acetatos de isoamilo y de 2-feniletilo (*Figura 30*, panel C y D), mientras que para los acetatos de etilo (*Figura 30*, panel A), de isobutilo (*Figura 30*, panel B) y de hexilo (*Figura 30*, panel E) se detecta una disminución.

Estos datos podrían sugerir que en la última etapa del crecimiento celular y en condiciones de sobreexpresión todavía existiera cierta actividad AATasa. Esta actividad intervendría selectivamente en la síntesis de acetato de isoamilo y de 2-feniletilo, ya que son los únicos compuestos cuya acumulación a las 72 h de crecimiento no ha alcanzado la saturación (comparar *Figura 30* paneles A, B y E con paneles C y D). El hecho de que sólo se vea afectada la cantidad final de estos ésteres de acetato podría correlacionarse bien con un problema de disponibilidad de precursor alcohólico, bien como un efecto de afinidad por sustrato, o bien porque los otros compuestos se metabolizan más rápidamente.

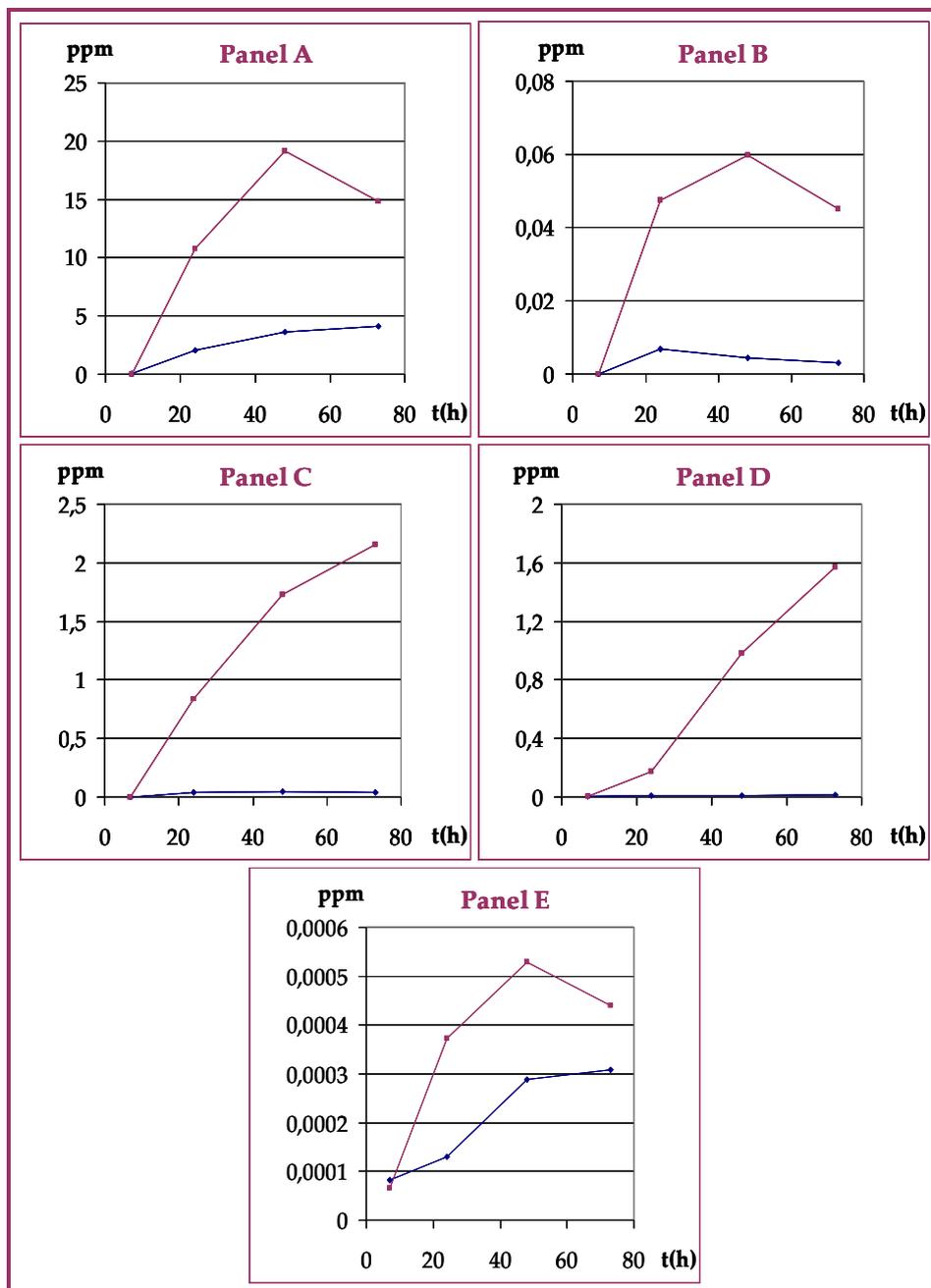


Figura 30. Cinéticas de acumulación de ésteres de acetato en medio rico YPD de las cepas T73YCplac33 (■) y T73YCpTATF1 (●). Panel A: acetato de etilo. Panel B: acetato de isobutilo. Panel C: acetato de isoamilo. Panel D: acetato de 2-feniletilo. Panel E: acetato de hexilo.

En cuanto a la falta de disponibilidad de sustrato, nuestros datos demuestran que al contrario que los otros alcoholes, la acumulación de alcohol isoamílico y de 2-feniletanol a las 72 h de crecimiento no ha alcanzado la saturación (*Figura 31* paneles A, B, C y D). Aun así, hay suficiente cantidad de precursores alcohólicos (alcohol isoamílico, 2-feniletanol, isobutanol y 1-hexanol) susceptibles de ser esterificados (*Figura 31* panel A, B, C y D), lo que resta credibilidad a esta hipótesis. En cuanto a la afinidad por sustrato, tal y como concluimos en el Capítulo 1, la proteína es más específica para la síntesis de acetato de isoamilo y acetato de 2-feniletilo, y, puesto que en etapas tardías del crecimiento celular la actividad decrece pero no es totalmente anulada (Mauricio *et al.*, 1993), podríamos suponer que la poca actividad **Atf1p** que pudiera haber en esta fase de crecimiento en la cepa sobreexpresante catalizara preferentemente la síntesis de estos dos compuestos.

Otra característica importante del patrón de producción obtenido en los ésteres de acetato es que la cinética durante todo el proceso y para todos los compuestos es cuantitativamente mayor en la cepa sobreexpresante que en la cepa control (*Figura 30*, paneles A, B, C, D y E, *Tabla 10*). Estos resultados sugieren que un aumento de la expresión génica en los niveles de transcripción del gen *ATF1* se traduce directamente en un incremento de la acumulación de ésteres de acetato, indicando que la cantidad de estos compuestos en el medio depende fundamentalmente de la expresión del gen *ATF1* y, que la disponibilidad de los sustratos, precursores alcohólicos y acetyl-CoA, no es limitante (*Figura 31*; Yoshioka y Hashimoto, 1981; Yoshioka y Hashimoto, 1984; Malcorps *et al.*, 1991).

Por otro lado, si calculamos la acumulación relativa, es decir, la proporción de éster acumulado entre la cepa control y la cepa sobreexpresante a lo largo del crecimiento (*Tabla 10*), podemos observar que en condiciones de sobreexpresión los ésteres que experimentan un mayor incremento de la producción son los acetatos de isoamilo, de isobutilo y de 2-feniletilo. Estos datos confirman de nuevo que la actividad **Atf1p** presenta una elevada afinidad para la síntesis de estos compuestos.

Acumulación relativa				
Éster	Cinética de crecimiento			
	7 h	24 h	48 h	73 h
Acetato de Isoamilo	0,8	21,4	37,0	53,3
Acetato de Isobutilo	-	6,9	13,6	14,5
Acetato de Etilo	0,3	5,2	5,2	3,6
Acetato de 2-Feniletilo	1,1	15,3	76,5	109,3
Acetato de Hexilo	0,8	2,8	1,8	1,4

Tabla 10. Acumulación relativa de ésteres de acetato de la cepa sobreexpresante (T73YCpTATF1) durante el crecimiento celular en condiciones de laboratorio.

(acumulación de T73YCpTATF1/ acumulación de T73YCplac33).

Respecto a la cuantificación de los compuestos alcohólicos (Figura 31, paneles A, B, C y D) conviene analizar el perfil de acumulación para estos compuestos en la cepa sobreexpresante (T73YCpTATF1) comparada con la cepa de referencia (T73YCplac33) dependiendo del precursor alcohólico estudiado.

La cepa T73YCpTATF1 acumula la misma cantidad de alcohol isoamílico que la cepa control (Figura 31 panel B), mientras que la acumulación del isobutanol y del 2-feniletanol es mayor (Figura 31 paneles A y C), y la cantidad de 1-hexanol, por el contrario, es menor (Figura 31 panel D). No obstante, al calcular la acumulación relativa, los valores obtenidos muestran que existen cambios en la producción de alcoholes pero éstos no son proporcionalmente muy elevados y desde el punto de vista de la aplicación biotecnológica no son cuantitativamente importantes (**Tabla 11**).

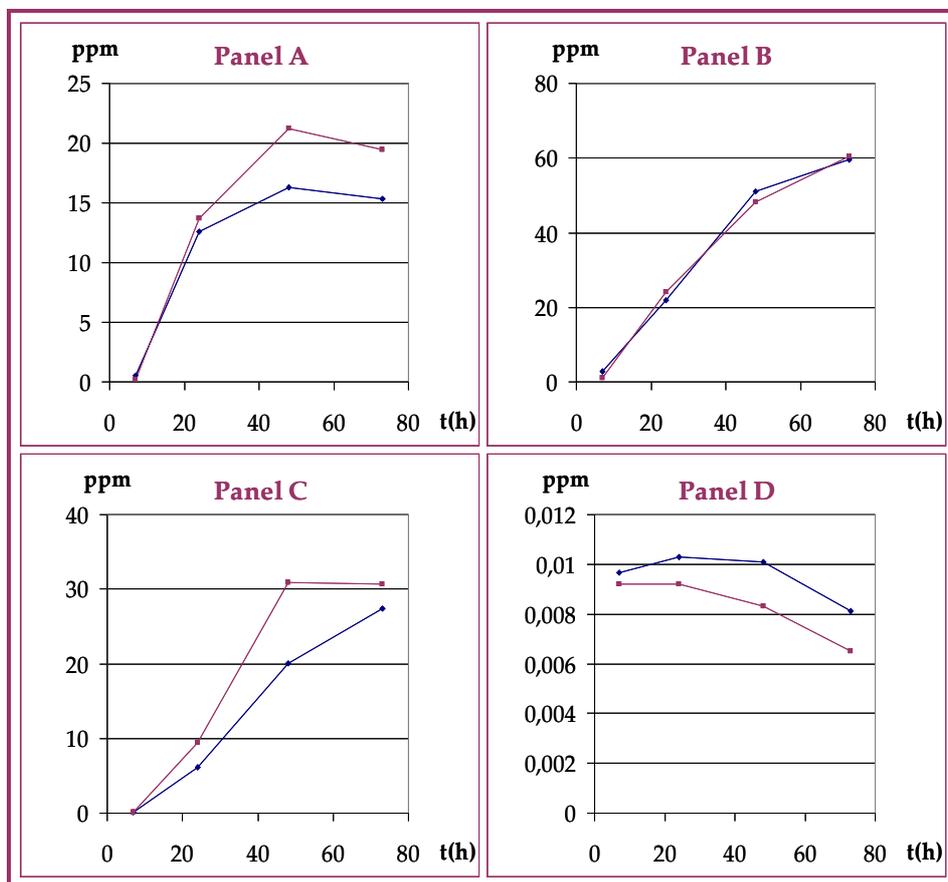


Figura 31: Cinéticas de acumulación alcoholes aromáticos en medio rico YPD de las cepas T73YCplac33 (■) y T73YCpTATF1 (●). Panel A: isobutanol. Panel B: alcohol isoamílico. Panel C: 2-feniletanol. Panel D: 1-hexanol.

Teniendo en cuenta los mecanismos bioquímicos a partir de los cuales se generan estos compuestos alcohólicos, estos resultados indican que la sobreexpresión del gen *ATF1* bajo el control del promotor del gen *TDH3* origina un ligero incremento de activación en la ruta metabólica de síntesis del isobutanol y del 2-feniletanol (Figura 26), ya que sólo para estos compuestos hay correlación entre el aumento de la acumulación de éster y la producción de alcohol.

Este efecto no se da en el acetato de isoamilo aunque todos estos compuestos comparten la ruta de síntesis. Hay dos explicaciones posibles a esta paradoja. La primera sería considerar que realmente no haya una alteración del flujo metabólico inducida por la sobreexpresión para ninguno de estos tres alcoholes, ya que cuantitativamente la cantidad de alcohol y de éster producida por la célula no son comparables. La concentración de alcohol es de dos a tres órdenes de magnitud superior a la concentración del éster. La segunda implica considerar que el flujo metabólico de la ruta de síntesis del alcohol isoamílico no se altere por algún tipo de regulación sobre las proteínas que controlan esta ruta de síntesis (*Figura 26*).

Acumulación relativa				
Alcohol	Cinética de crecimiento			
	7 h	24 h	48 h	73 h
Isoamílico	0,4	1,1	0,9	1,1
Isobutanol	0,4	1,1	1,3	1,3
2-Feniletanol	0,9	1,5	1,5	1,1
1-Hexanol	0,9	0,9	0,8	0,8

Tabla 11: Acumulación relativa de alcoholes aromáticos de la cepa sobreexpresante (T73YCpTATF1) durante el crecimiento celular en condiciones de laboratorio.

(acumulación de T73YCpTATF1/ acumulación de T73YCplac33).

2.3. Conclusiones.

De los resultados obtenidos en este apartado podemos concluir que:

1. La sobreexpresión del gen *ATF1* bajo el control del promotor del gen *TDH3* es una estrategia de ingeniería metabólica eficaz, ya que permite una mayor producción de todos los ésteres de acetato en general (ver *Figura 30*).

2. Dicha sobreexpresión potencia la síntesis de los acetatos que, desde un punto de vista enológico son de mayor relevancia, es decir, acetato de isoamilo (*Figura 30* panel C y *Tabla 10*) y de 2-feniletilo (*Figura 30* panel D y *Tabla 10*).
3. Al obtenerse un incremento elevado de ésteres de acetato en etapas tempranas de la fase estacionaria los niveles de acumulación se mantienen durante un largo período de la fase estacionaria, al menos en las condiciones ensayadas.
4. Los datos obtenidos demuestran que el factor limitante para la síntesis de compuestos esterificados no es tanto la disponibilidad de alcoholes aromáticos, cuya concentración se mantiene más o menos constante, sino la concentración de enzima.

3. ESTRATEGIA 2: DELECIÓN DEL GEN *IAH1*.

En los microorganismos fermentadores, los ésteres volátiles al ser moléculas liposolubles pueden difundir la membrana celular hacia el medio fermentado, o bien pueden ser degradados rindiendo el alcohol de partida y acetato. Este proceso hidrolítico también requiere la acción de una actividad enzimática denominada éster hidrolasa. Por tanto, la concentración final de ésteres volátiles en el caldo de cultivo depende no sólo de las actividades de síntesis, sino también del proceso de difusión a través de la membrana y de los mecanismos de hidrólisis en el citosol y/o en el exterior celular (Verstrepen *et al.*, 2003b).

Como se comentó en la Introducción de este trabajo, en *S. cerevisiae* se han identificado cuatro isoenzimas éster hidrolasas. De entre todas ellas, la más caracterizada ha sido la éster hidrolasa codificada por el gen *IAH1*, cuyo producto génico, la enzima isoamil alcohol hidrolasa (**Iah1p**), se considera la responsable mayoritaria de la degradación de acetato de isoamilo (Fukuda *et al.*, 1996 y 1998b), aunque también cataliza la hidrólisis de otros ésteres de acetato, tal y como se concluyó en el Capítulo 1. Atendiendo a los datos bibliográficos y teniendo en cuenta los resultados obtenidos previamente en este trabajo (Capítulo 1, apartado 3), consideramos que una posible estrategia para conseguir incrementar la concentración final de ésteres de acetato en el mosto fermentado sería la eliminación de la actividad hidrolasa **Iah1p**. Para confirmar la eficacia de dicha estrategia en levaduras industriales y, puesto que nuestra cepa vónica de referencia (T73uraleu) es diploide para el gen *IAH1*, construimos dos tipos de mutantes. Un mutante que contiene la delección de uno de los alelos de *IAH1* y el otro que carece de las dos copias del gen denominados T73iah1 y T73Δiah1, respectivamente (apartado 1.1. de Materiales y Métodos). Con estas cepas mutantes, se determinó la cinética de acumulación de los ésteres de acetato y de los alcoholes aromáticos en condiciones de laboratorio, es decir, medio rico YPD, incubación a 30 °C y agitación orbital a 200 rpm (ver apartado 2.1.2 de Materiales y Métodos).

3.1. Obtención de mutantes en el gen que codifica la éster hidrolasa Iah1p en cepa vínica industrial.

La metodología utilizada para la construcción de estos mutantes se basó en la técnica **SFH** descrita en el apartado 2.3. de Materiales y Métodos. En la **Figura 32** se muestra el análisis Southern de la delección secuencial de ambas copias del gen **IAH1** en la cepa vínica T73uraleu. Al digerir el DNA genómico con la enzima de restricción *EcoRV* se pueden obtener tres tipos de bandas en función del genotipo de la cepa ensayada. Así, la cepa parental T73uraleu produce una banda de 4419 pb correspondiente al locus silvestre del gen **IAH1** (**Figura 32** carrera 1) y la cepa donde haya tenido lugar la inserción y sustitución del alelo silvestre por el gen marcador Kan^R generará dos bandas de 3703 pb y de 1840 pb (**Figura 32** carreras 2 y 4). Aquellas cepas donde se haya producido la inserción y posterior escisión del gen marcador en el locus del gen **IAH1** generarán una única banda de 3703 pb (**Figura 32** carreras 3 y 5).

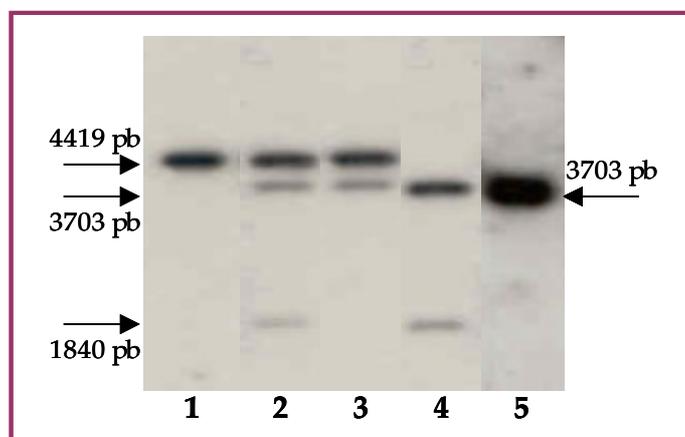


Figura 32. Análisis Southern de las cepas T73uraleu (carrera 1), T73iah1 (carreras 2 y 3) y T73Δiah1 (carreras 4 y 5). El DNA genómico fue digerido con *EcoRV*. Se utilizó como sonda el fragmento del gen **IAH1** amplificado con los oligonucleótidos IAH1A1-IAH1A3 cuyo tamaño aproximado es de 1420 pb.

3.2. Análisis del perfil aromático en condiciones de laboratorio.

Una vez comprobado el genotipo de la deleción en cada una de las cepas industriales construidas (T73iah1 y T73Δiah1), se determinó la cantidad de compuestos aromáticos producido en cada una de ellas. Las cepas se cultivaron durante 72 h en condiciones de laboratorio. A lo largo del experimento se tomaron muestras a distintos tiempos y se analizaron por cromatografía de gases. Asimismo, se determinó la evolución y comportamiento del crecimiento por cuantificación de azúcares reductores y medida de DO_{600} , cuyo perfil se muestra es la **Figura 33**. Como puede observarse en la gráfica, no se aprecian diferencias significativas entre la cepa control y los distintos mutantes ensayados.

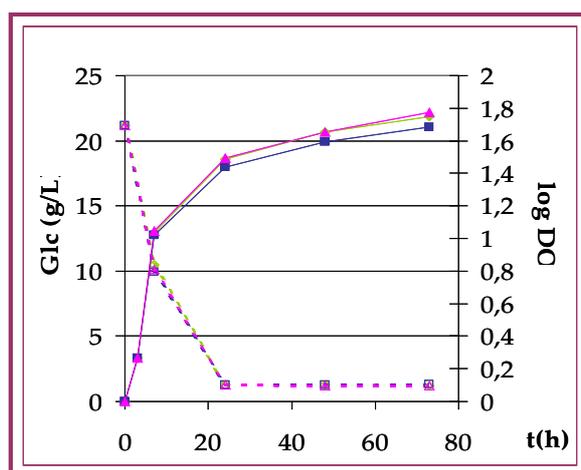


Figura 33. Curva de crecimiento (línea continua) y consumo de azúcares reductores (línea punteada), de las cepas T73uraleu (○), T73iah1 (△) y T73Δiah1 (□).

La cuantificación mediante cromatografía de gases de los ésteres de acetato y sus precursores alcohólicos se muestra en las **Figuras 33** y **34**. Los resultados obtenidos indican que la cinética de acumulación para el acetato de etilo (**Figura 34**, panel A), acetato de 2-feniletilo (**Figura 34**, panel D) y acetato de hexilo (**Figura 34**, panel E) no experimentó cambios significativos entre las cepas mutantes y la cepa

de referencia. Por el contrario, para los acetatos de isoamilo e isobutilo (**Figura 34**, paneles C y B, respectivamente), la ausencia de la proteína **Iah1p** produce, con respecto a la cepa control, un incremento en la concentración final de estos compuestos entre las 48 y 72 h de crecimiento. A las 48 h de crecimiento ambos mutantes acumulan la misma cantidad de ésteres de acetato isoamilo e isobutilo (**Tabla 12A**), pero una vez alcanzada la fase estacionaria la concentración final en el medio para estos compuestos difiere. En el mutante T73iah1, que conserva una copia del gen **IAH1**, la acumulación a las 72 h es aproximadamente la mitad que a las 48 h, mientras que en el mutante nulo T73 Δ iah1 la acumulación en los distintos tiempos se mantiene más o menos constante (**Tabla 12A** y **Figura 34** panel C y B). Además, si comparamos los resultados obtenidos en las cepas industriales (T73uraleu, T73iah1 y T73 Δ iah1) con las cepas de laboratorio (BY4741, BY4741 Δ iah1) podemos observar que la acumulación de los ésteres de acetato entre los dos tipos de cepas son comparables excepto para el acetato de 2-feniletilo (**Tabla 12A**, y **12B**). En ambos tipos de cepas, laboratorio e industrial, el mutante nulo Δ iah1 presenta un incremento en la cantidad de acetato de isoamilo e isobutilo. Al inicio de la fase estacionaria la concentración final de estos compuestos en el medio comienza a aumentar, observándose un incremento mayor en el acetato de isobutilo (aproximadamente el doble) que en el acetato de isoamilo. Este aumento se prolonga llegándose a acumular del orden de tres veces más cantidad de compuesto entrada la fase estacionaria (**Tabla 12A**, y **12B**). La cepa T73iah1, si bien sigue la misma tendencia de acumulación en fase estacionaria acumula una menor cantidad del compuesto.

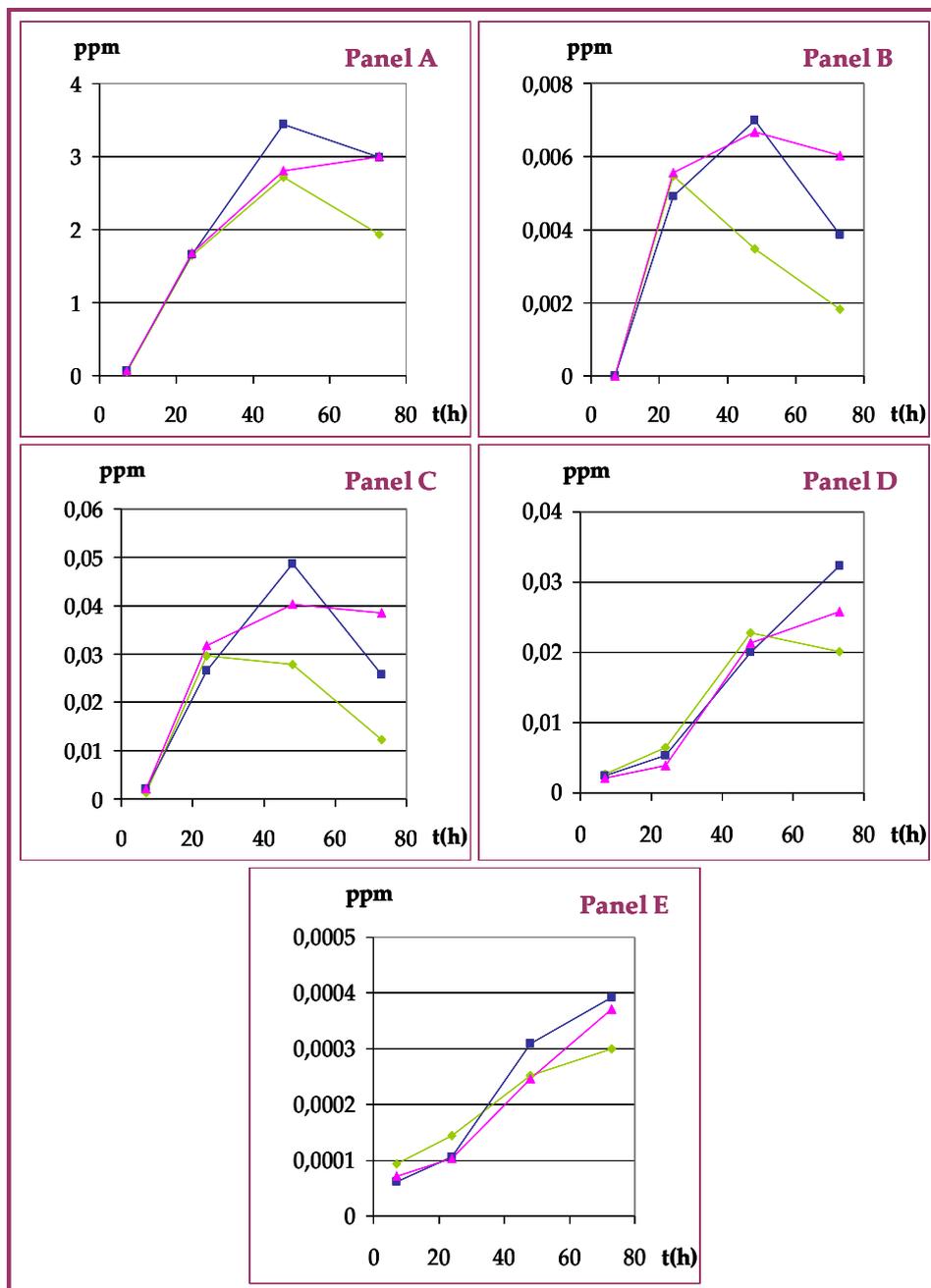


Figura 34: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles. Cepas ensayadas: T73uraleu (□), T73iah1 (△) y T73Δiah1 (◇). Panel A: acetato de etilo. Panel B: acetato de isobutilo. Panel C: acetato de isoamilo. Panel D: acetato de 2-feniletilo. Panel E: acetato de hexilo.

A: Acumulación en el medio (ppm)				
Ésteres Cepa	tiempo	Acetato de Isoamilo	Acetato de Isobutilo	Acetato de 2-Feniletilo
BY4741	48h	0,0900	0,0042	0,0167
	73h	0,0454	0,0021	0,0207
BY4741Δ iah1	48h	0,1569	0,0084	0,0294
	73h	0,1599	0,0079	0,0496
T73uraleu	48h	0,0279	0,0035	0,0227
	73h	0,0123	0,0018	0,0200
T73iah1	48h	0,0487	0,0069	0,0200
	73h	0,0257	0,0039	0,0323
T73Δ iah1	48h	0,0403	0,0067	0,0214
	73h	0,0385	0,0060	0,0257
B: Acumulación relativa				
Ésteres Cepa	tiempo	Acetato de Isoamilo	Acetato de Isobutilo	Acetato de 2-Feniletilo
BY4741Δ iah1	48h	1,74	2	1,76
	73h	3,52	3,76	2,39
T73iah1	48h	1,75	1,97	0,88
	73h	2,17	2,17	1,61
T73Δ iah1	48h	1,43	1,91	0,94
	73h	3,25	3,33	1,28

Tabla 12: A: Acumulación en condiciones de laboratorio de los ésteres de acetato isoamilo, isobutilo y 2-feniletilo a lo largo de la cinética de crecimiento (48h: inicio de la fase estacionaria; 72 h: fase estacionaria). Cepas ensayadas: BY4741, BY4741Δiah1, T73uraleu, T73iah1 y T73Δiah1. B: Acumulación relativa (cepa mutante/cepa control).

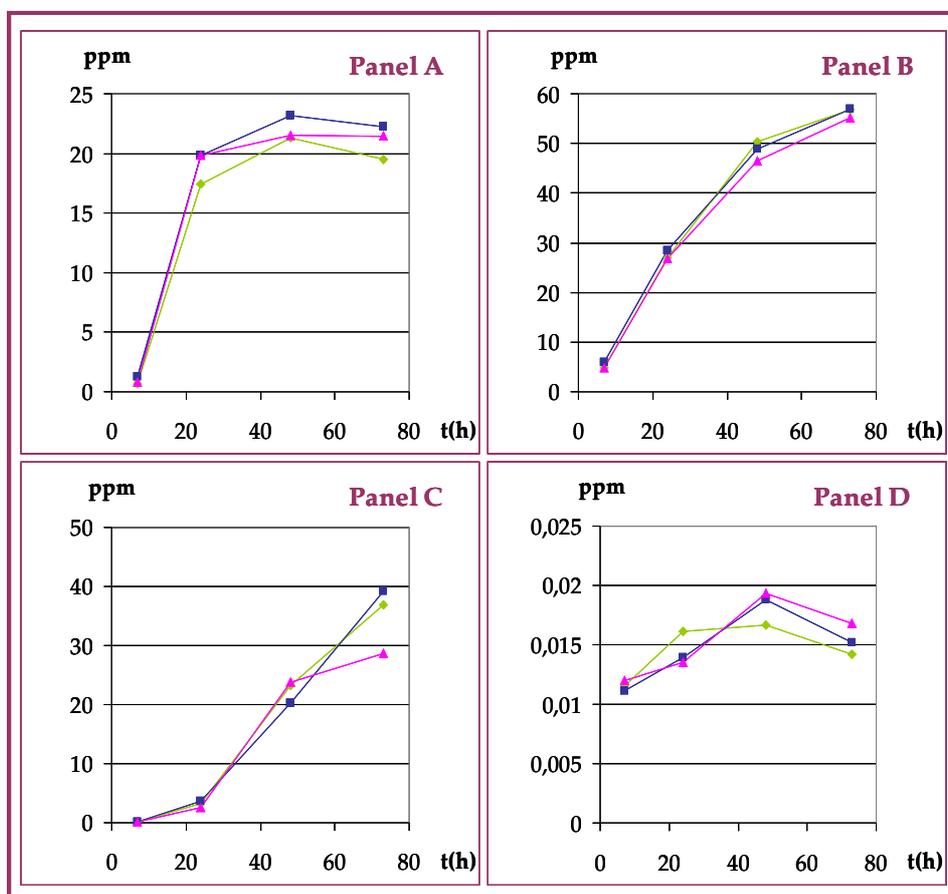


Figura 35: Cinéticas de acumulación de alcoholes aromáticos en la cepa control T73uraleu (○) y los mutantes T73iah1 (■) y T73Δiah1 (▲). Panel A: Isobutanol. Panel B: Alcohol Isoamílico. Panel C: 2-Feniletanol. Panel D: 1-Hexanol.

Los resultados obtenidos sugieren que dependiendo de la cepa la funcionalidad de la enzima **Iah1p** en la hidrólisis de los ésteres de acetato difiere, siendo más amplia en la cepa de laboratorio que en la cepa industrial. A este respecto, sería interesante conocer la secuencia de los genes provenientes de ambas cepas. La proteína **Iah1p** no hidroliza acetato de 2-feniletilo en la cepa industrial (*Tabla 12A*). Sin embargo, en ambas cepas el grado de afinidad se mantiene, siendo mayor para el acetato de isoamilo que para el acetato de isobutilo ya

que el efecto de la delección del gen *IAH1* es menor para este último compuesto (*Tabla 12B*, tiempo 48 h). Finalmente, podemos concluir también que la cantidad de compuesto acumulado puede correlacionarse con el número de copias del gen que contenga la cepa, de forma que el máximo de acumulación para los ésteres de acetato se consigue al eliminar los dos alelos del gen.

Respecto a las cinéticas de acumulación de los alcoholes aromáticos (*Figura 35*) la acumulación de isobutanol, alcohol isoamílico, 2-feniletanol y 1-hexanol en las cepas mutantes es similar a las cantidades acumuladas en la cepa control. Por consiguiente, la eliminación de una o ambas copias del gen *IAH1* no origina ningún efecto en la concentración final de dichos compuestos.

3.3. Conclusiones.

Atendiendo a los resultados obtenidos en este apartado podemos concluir que:

1. En la cepa industrial ensayada, la enzima **Iah1p** hidroliza específicamente acetato de isoamilo y acetato de isobutilo. Sin embargo, el resto de acetatos (acetato de etilo, de hexilo y de 2-feniletilo) no parecen ser sustratos de **Iah1p** (*Figura 34*).
2. Los efectos de la delección del gen *IAH1* sólo son detectables en fases avanzadas del crecimiento, lo cual podría deberse a que los mecanismos de regulación de la actividad o de la expresión del gen *IAH1* dependen del crecimiento celular, por lo que se consiguen máximos de actividad y/o de expresión entrada la fase estacionaria (Mauricio *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1997).
3. En cepa vínica industrial la acumulación relativa para el acetato de isoamilo y de isobutilo puede correlacionarse con el número de copias del gen *IAH1* que contenga la cepa (*Tabla 12B*).
4. La delección del gen *IAH1* no induce ningún efecto en la acumulación de alcoholes aromáticos (*Figura 35*).

4. ESTRATEGIA 3: SOBREEXPRESIÓN DEL GEN *THI3*.

El propósito de esta aproximación consiste en desplazar el flujo metabólico de la ruta de biosíntesis y utilización de la leucina hacia la acumulación de alcohol isoamílico por sobreexpresión del gen *THI3*, codificante de la α -cetoisocaproato descarboxilasa. Puesto que el α -cetoisocaproato es el intermediario común donde convergen la ruta anabólica y catabólica para este aminoácido (*Figura 2* apartado 3.1. de la Introducción) un aumento en el número de copias del gen *THI3* podría producir un aumento del flujo en la dirección de síntesis de dicho alcohol. Para confirmar esta hipótesis se insertó el gen *THI3* en un vector episomal y el DNA recombinante obtenido se introdujo en distintas cepas vnicas isogénicas de T73.

4.1. Obtención de las cepas recombinantes.

El gen *THI3* se obtuvo como un fragmento de restricción *KpnI/XbaI* de 3 kb a partir del plásmido centromérico pTTR5 que contiene un inserto genómico de 3 kb que complementa la mutación *thi3* (Nishimura *et al.*, 1992). Dicho fragmento de DNA se subclonó en el vector episomal YEplac195. El plásmido resultante (*Figura 36*), denominado YEpTHI3 y, en paralelo el vector YEplac195, se utilizaron para transformar las cepas T73ura (denominada T73- 4 en el apartado 1.1 de Materiales y Métodos) y T73uraleu.

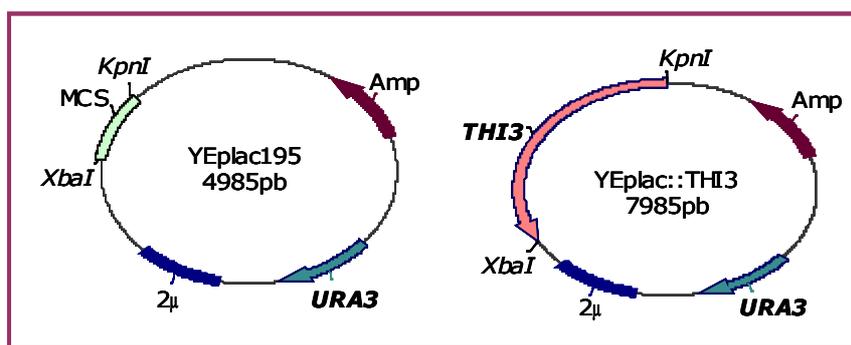


Figura 36: Vectores multicopia utilizados para la obtención de las cepas recombinantes. Plásmido vacío (izquierda) y plásmido con el gen *THI3* (derecha).

La cepa T73uraleu fue seleccionada al principio del trabajo como cepa vínica para la generación de modificaciones genéticas por poseer dos auxotrofías. Esta característica facilita la aplicación de estrategias basadas en el uso de marcadores de selección de auxotrofías. Sin embargo, para esta estrategia concreta, se decidió utilizar también la cepa T73ura que, a pesar de ser menos versátil en cuanto a posibilidades de transformación, presenta la ventaja de ser protótrofa para la leucina. El hecho de ser protótrofa implica que la ruta de biosíntesis para el aminoácido leucina objeto de nuestro estudio, funciona (*Figura 2* apartado 3.1. de la Introducción).

4.2. Análisis de la sobreexpresión del gen *THI3* y de sus efectos en condiciones de laboratorio.

Una vez obtenidas las cepas recombinantes T73uraYEp, T73uraYEpTHI3, T73uraleuYEp y T73uraleuYEpTHI3 se determinó la cantidad de compuestos aromáticos producida por cada una de ellas en condiciones de laboratorio. Para ello las cepas se cultivaron durante 72 h en medio rico YPD a una temperatura de 30 °C con agitación orbital a 200 rpm. Durante el crecimiento se realizó un seguimiento de la expresión del gen *THI3* mediante análisis northern y se tomaron muestras a distintos tiempos para determinar los alcoholes y ésteres aromáticos producidos a lo largo del experimento. La cinética y evolución del crecimiento de las cepas se analizó por cuantificación de azúcares reductores y medida de la DO₆₀₀, cuyos perfiles se muestran en la *Figura 37*. En esta gráfica se comparó la cepa recombinante T73uraYEpTHI3 con la cepa control T73uraYEp y la cepa T73uraleuYEpTHI3 con la cepa T73uraleuYEp. En ambos casos, no se aprecian diferencias significativas entre las cepas control y las cepas sobreexpresantes.

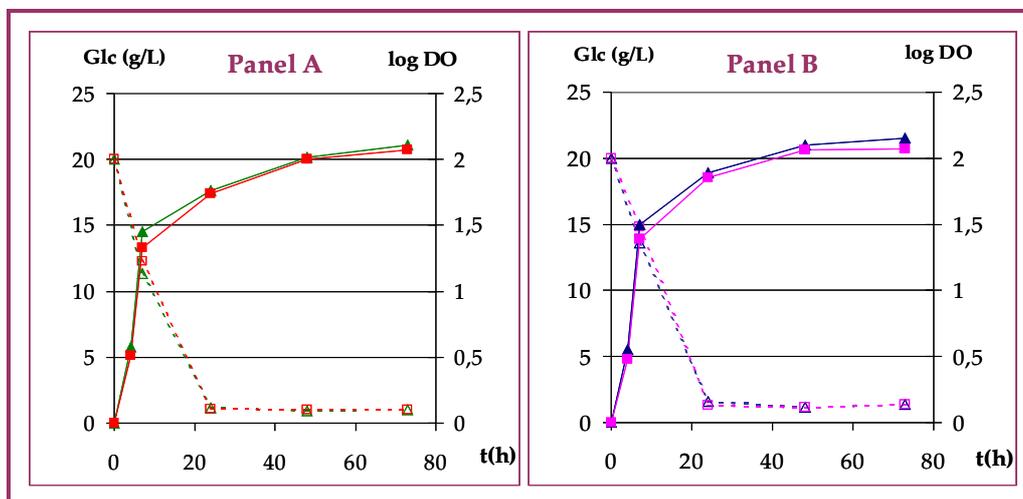


Figura 37: Curva de crecimiento en unidades de densidad óptica (línea continua) y consumo de azúcares reductores en unidades de concentración (g/L) (línea discontinua). Cepas ensayadas: T73uraYEp (●) y T73uraYEpTHI3 (▲). Panel B: T73uraleuYEp (●) y T73uraleuYEpTHI3 (▲).

Los resultados obtenidos en la determinación de la expresión del gen *THI3* a lo largo del crecimiento de las cepas T73uraYEpTHI3 y su control T73uraYEp se muestran en la **Figura 38**. Como se puede observar no se detecta expresión del gen *THI3* en la cepa control (T73uraYEp), lo que indica que los niveles de expresión de dicho gen son inferiores al umbral de detección de la técnica. Por el contrario, en la cepa T73uraYEpTHI3, con un número de copias incrementado del gen la técnica permite la detección del mRNA a lo largo del experimento.

En el patrón de expresión del gen *THI3* de la cepa T73uraYEpTHI3, podemos diferenciar tres picos de expresión en función del tiempo de crecimiento. El primer pico se da en fase exponencial e incluiría el intervalo de 2 a 10 h (**Figura 38** panel A, subpanel 1), con un máximo de expresión a las 4 h. Un segundo pico de expresión aparece en fase estacionaria, entre las 30 y las 52 h del cultivo celular (**Figura 38** panel B, subpanel 1), con un máximo de expresión a las 48 h. El tercer pico

se detecta al final de la fase estacionaria en el intervalo de 62 a 77 h (*Figura 38* panel C, subpanel 1) con un máximo de expresión que se alcanza en el rango de 73 a 77 h del crecimiento. Estos resultados indican que el gen *THI3* sigue un patrón de expresión oscilante que quizás podría correlacionarse con la disponibilidad de TPP en el interior celular. Puesto que dentro del contexto del metabolismo de la tiamina se considera que la proteína **Thi3p** actúa como un regulador positivo de la expresión de genes regulados por tiamina (Nishimura *et al.*, 1992; Hohmann y Meacock, 1998) y también como un sensor de la cantidad de TPP intracelular (Burrows *et al.*, 2000), podríamos suponer que la expresión del gen que codifica **Thi3p** podría estar sometido al mismo proceso de regulación transcripcional dependiente de TPP. Si esta hipótesis fuese cierta, cuando el “pool” intracelular de TPP disminuyese, se induciría la expresión del gen *THI3*. En estas condiciones, habría una activación del transporte y de la síntesis del cofactor y, por tanto, los niveles de TPP intracelular aumentarían. Al detectar **Thi3p** un incremento del “pool” de TPP se reduciría su expresión y también la expresión de los genes que regula. Por lo que podríamos concluir que el patrón ondulatorio obtenido en nuestros resultados (*Figura 38*), sería un reflejo del efecto que ejerciese la molécula de TPP sobre su propio metabolismo.

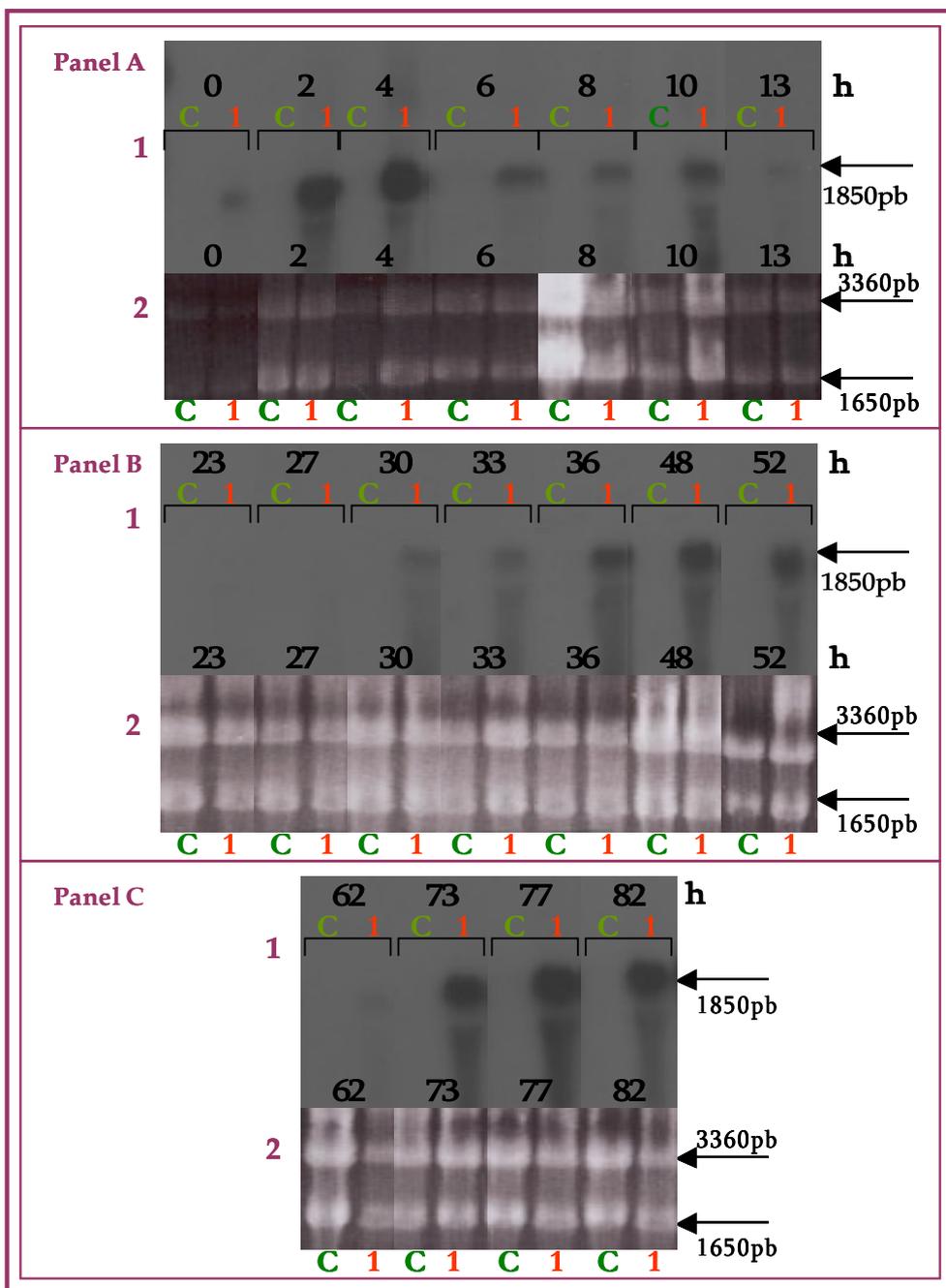


Figura 38: Análisis northern de la expresión del gen *THI3* a lo largo de la cinética de crecimiento de las cepas T73uraYEp (C) y T73uraYEpTHI3 (1). Panel A: intervalo de tiempo 0h-13h. Panel B: intervalo de tiempo 23h-52h. Panel C: intervalo de tiempo 62-82h. Subpanel 1: autoradiografía del northern hibridado. Se utilizó como sonda el fragmento amplificado con los oligos THI3D-THI3R del gen *THI3* (400 pb). Subpanel 2: tinción con bromuro de etidio del mRNA como control de carga.

Las cinéticas de producción de los alcoholes aromáticos (isobutanol, alcohol isoamílico, 2-feniletanol y 1-hexanol) y de los ésteres de acetato (acetato de etilo, de isoamilo, de isobutilo, de 2-feniletilo y de hexilo) resultantes de la cuantificación mediante GC en cada una de las cepas ensayadas se muestran en las *Figuras 39* y *40* y en las *Tablas 13* a *17*.

Con relación a los alcoholes aromáticos, los resultados obtenidos para la cepa T73uraYEpTHI3 comparados con la cepa control T73uraYEp se muestran en la *Figura 39*, donde observamos que las cinéticas de acumulación siguen un comportamiento distinto para cada uno de los alcoholes analizados. Para el caso del isobutanol (*Figura 39* panel A), la acumulación alcanza su máximo en el intervalo de 7 a 24 h después del cambio diáuxico e inicio de la fase estacionaria. Posteriormente, entrada la fase estacionaria, la producción de alcohol aumenta ligeramente manteniéndose más o menos constante en el tiempo. Igualmente podemos observar que la cepa de referencia alcanza un máximo de acumulación ligeramente mayor al obtenido con la cepa que sobreexpresa el gen *THI3* (*Tabla 13*). Por otro lado, la acumulación de alcohol isoamílico y 2-feniletanol (*Figura 39* paneles B y C), sigue una cinética ascendente sin llegar a alcanzar un máximo de acumulación en el intervalo de tiempo analizado. Si comparamos la acumulación obtenida entre ambas cepas podemos observar que para el caso del alcohol isoamílico (*Figura 39* panel B y *Tabla 14*) existe una pequeña diferencia a favor de la cepa sobreexpresante. Para el 2-feniletanol (*Figura 39* panel C) en el intervalo de 48 h a 72 h se produce un ligero incremento en la concentración final de este compuesto siendo mayor en la cepa sobreexpresante que en la cepa de referencia (*Tabla 15*). En cuanto al alcohol 1-hexanol (ver *Figura 32* panel D) los resultados obtenidos indican que la cinética de acumulación se mantiene más o menos constante y que no existen diferencias significativas entre ambas cepas (*Tabla 16*). Por todo ello podemos concluir que las modificaciones introducidas no producen efecto en la acumulación de este alcohol.

En cualquier caso, cabe destacar que es difícil de evaluar la significación de las diferencias observadas en cuanto a la cantidad de compuesto acumulado entre ambas cepas dada la variabilidad

intrínseca de este tipo de experimentos. Sin embargo, aún suponiendo que la producción de algunos alcoholes en la cepa sobreexpresante del gen *THI3* fuese mayor respecto a la cepa control y que dicha diferencia fuese significativa, no es cuantitativamente importante desde el punto de vista de su utilidad industrial.

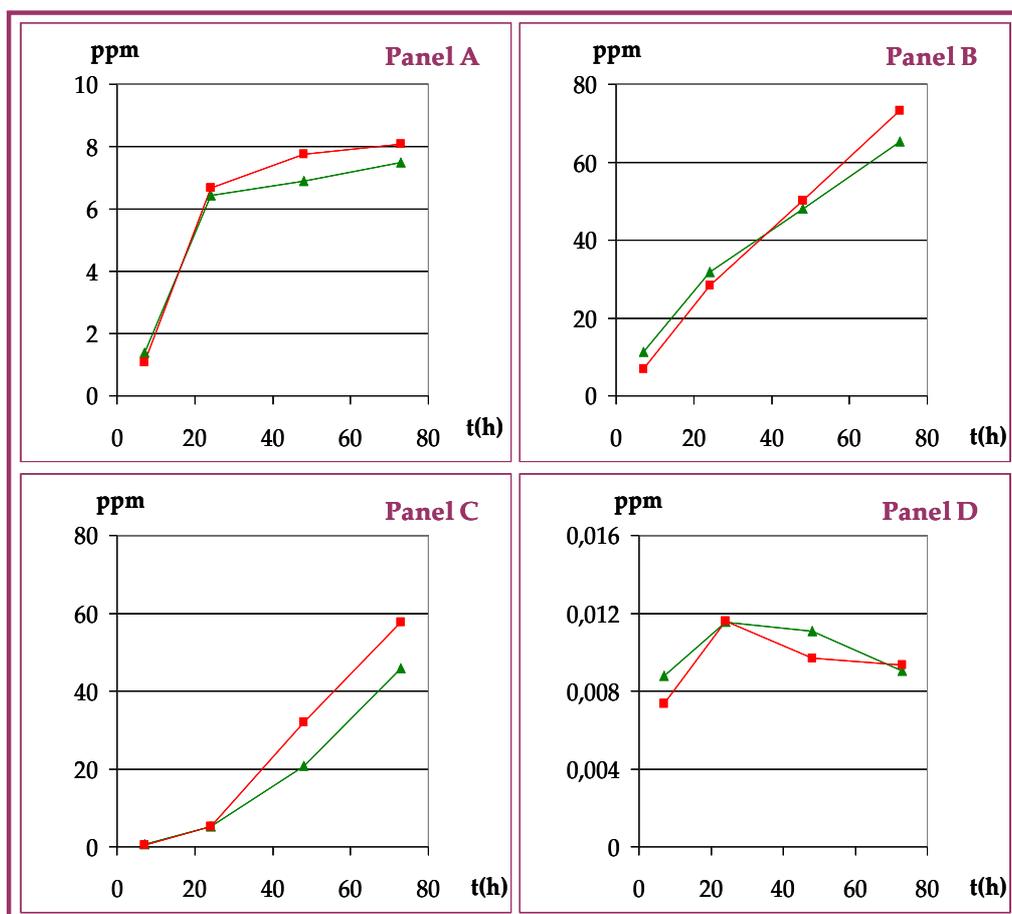


Figura 39: Cinética de acumulación en medio rico YPD de los alcoholes aromáticos: isobutanol (panel A), alcohol isoamílico (panel B), 2-feniletanol (panel C), 1-hexanol (panel D). Cepas ensayadas: T73uraYEp () y T73uraYEpTHI3 ().

En lo concerniente a las cinéticas de acumulación para los ésteres de acetato, las posibles diferencias observadas entre ambas cepas no son significativas (*Tablas 17*), por lo que se puede concluir que un aumento en el número de copias del gen *THI3* no altera la concentración final de estos compuestos en el medio.

Los resultados conseguidos con la cepa T73uraleuYEpTHI3 comparados con la cepa control T73uraleuYEp se muestran en la *Figura 40*. Las cinéticas de acumulación son análogas a las obtenidas con las cepas T73uraYEp y T73uraYEpTHI3. Para estas cepas, la producción de alcoholes aromáticos (*Figura 39* panel A, B, C y D) al igual que la producción de ésteres de acetato (*Tabla 17*), es similar en todos los casos y las diferencias observadas entre la cepa sobreexpresante y la de referencia no son significativas. Sin embargo, cabe señalar algunas observaciones importantes que se deducen al comparar las cinéticas de producción de los precursores alcohólicos en las cuatro cepas analizadas.

En primer lugar, y para el caso del isobutanol, la cantidad de alcohol producida en la cepa auxotrófica para la leucina (T73uraleu) es considerablemente mayor que la cantidad de isobutanol producida en la cepa que no presenta dicha auxotrofia (T73ura), independientemente del plásmido que contenga (*Tabla 13*). Este dato sugiere que el "pool" de α -cetoisovalerato posiblemente sea mayor en la cepa T73uraleu como consecuencia de la delección del gen *LEU2*, ya que la ausencia de este gen bloquea la ramificación de la ruta hacia la síntesis de leucina (*Figura 2* apartado 3.1. de la Introducción). De esta manera, al aumentar el número de moléculas de α -cetoisovalerato susceptibles de descarboxilación se produciría un incremento en la cantidad de isobutanol. En ese caso, podríamos suponer que existe una relación directa entre la cantidad de alcohol producida y la cantidad de intermediario disponible (*Figura 2* apartado 3.1. de la Introducción). Puesto que no existen diferencias entre la cepa sobreexpresante y la cepa control, podemos deducir que la sobreexpresión de la proteína *Thi3p* no origina ningún efecto en el proceso de descarboxilación del α -cetoisovalerato hacia la síntesis de isobutanol.

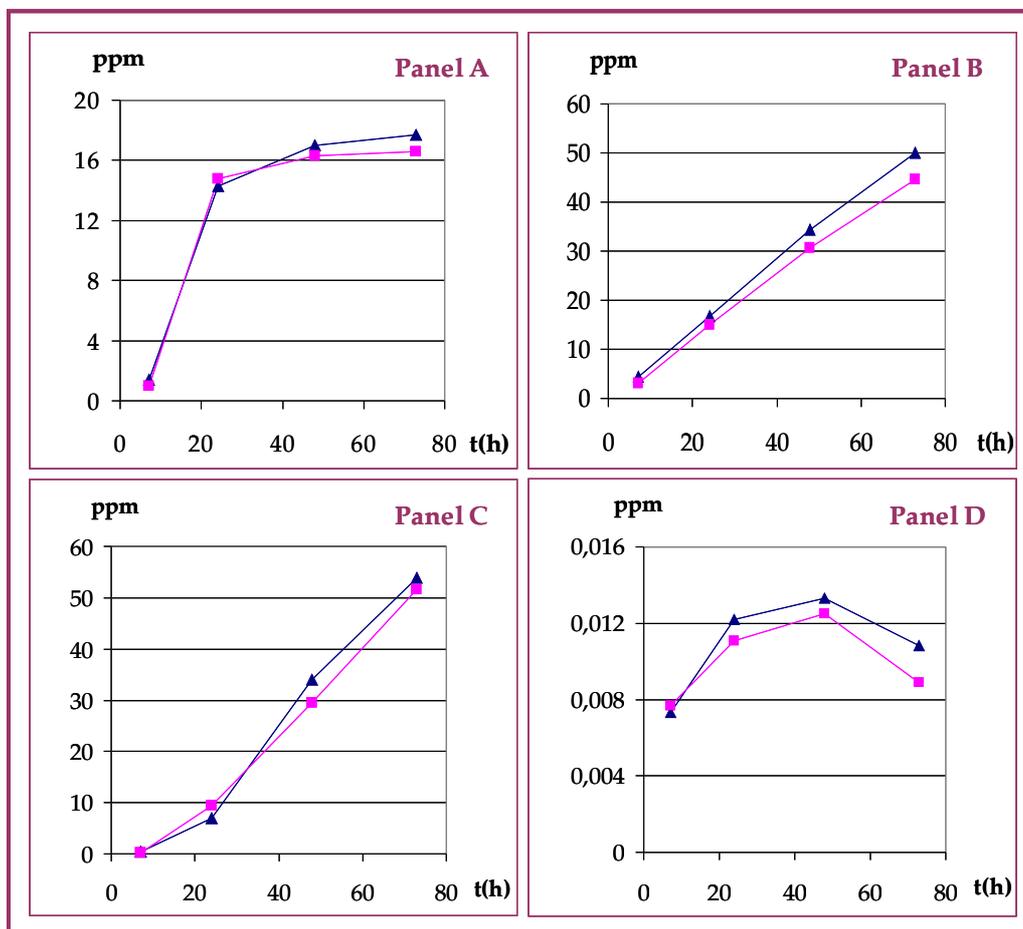


Figura 40. Cinética de acumulación en medio rico YPD de los alcoholes aromáticos: isobutanol (panel A), alcohol Isoamílico (panel B), 2-feniletanol (panel C), 1-hexanol (panel D). Cepas ensayadas T73uraleuYEp () y T73uraleuYEpTHI3 ().

En segundo lugar y respecto a la producción de 2-feniletanol y 1-hexanol nuestros datos indican que no existen diferencias significativas entre las cepas ensayadas (*Tablas 15 y 16* respectivamente). Podríamos concluir, por tanto que ni la auxotrofia ni las modificaciones introducidas producen un efecto en la acumulación de 2-feniletanol y de 1-hexanol.

ISOBUTANOL (ppm)				
t(h)	T ₇₃ uraYE _p	T ₇₃ uraYTHI3	T ₇₃ uraleuYE _p	T ₇₃ uraleuYTHI3
7	1,4	1,1	1,4	0,9
24	6,4	6,7	14,3	14,8
48	6,9	7,8	17	16,5
73	7,5	8,1	17,7	16,7

Tabla 13: Cantidad de isobutanol acumulado a lo largo del crecimiento celular en medio rico YPD.

ALCOHOL ISOAMILICO (ppm)				
t(h)	T ₇₃ uraYE _p	T ₇₃ uraYTHI3	T ₇₃ uraleuYE _p	T ₇₃ uraleuYTHI3
7	11,3	6,9	4,5	2,9
24	31,8	28,2	16,7	14,9
48	48	50,3	34,5	31,3
73	65,4	73,3	50	45,3

Tabla 14: Cantidad de alcohol isoamílico acumulado a lo largo del crecimiento celular en medio rico YPD.

2-FENILETANOL (ppm)				
t(h)	T ₇₃ uraYE _p	T ₇₃ uraYTHI3	T ₇₃ uraleuYE _p	T ₇₃ uraleuYTHI3
7	0,67	0,33	0,33	0,19
24	5,1	5,3	6,9	9,3
48	20,7	32	34,1	34,8
73	45,9	57,8	53,8	54,5

Tabla 15: Cantidad de 2-feniletanol acumulado a lo largo del crecimiento celular en medio rico YPD.

1-HEXANOL (ppm)				
t(h)	T ₇₃ uraYEp	T ₇₃ uraYTHI3	T ₇₃ uraleuYEp	T ₇₃ uraleuYTHI3
7	0,009	0,007	0,007	0,008
24	0,012	0,012	0,012	0,011
48	0,011	0,010	0,013	0,012
73	0,009	0,009	0,011	0,011

Tabla 16: Cantidad de 1-hexanol acumulado a lo largo del crecimiento celular en medio rico YPD.

Finalmente, la producción de alcohol isoamílico es menor en la cepa T73uraleu que en la cepa T73ura (*Tabla 14*), independientemente del plásmido que contenga. Estas diferencias podrían deberse a una disminución del “pool” de α -cetoisocaproato utilizado como consecuencia de la ausencia del gen *LEU2*. La delección del gen *LEU2* interrumpe la ruta anabólica hacia la síntesis de leucina, de manera que el “pool” de α -cetoisocaproato tendrá como única vía de procedencia la ruta catabólica (*Figura 2* apartado 3.1. de la Introducción). En este caso, podríamos deducir que la producción de alcohol isoamílico depende directamente de la cantidad de α -cetoisocaproato disponible en la célula, al igual que el isobutanol dependía de la cantidad de α -cetoisovalerato. Además, puesto que en la síntesis de estos intermediarios α -cetoácidos convergen dos rutas metabólicas (*Figura 2* apartado 3.1. de la Introducción) podríamos deducir también que la participación de la ruta anabólica, aunque cuantitativamente menor, no es despreciable, ya que en presencia del gen *LEU2* la acumulación de alcohol isoamílico aumenta (*Tabla 14*).

A: ACETATO DE ISOAMILO				
t (h)	T73uraYEp	T73uraYEpTHI3	T73uraleuYEp	T73uraleuYEpTHI3
7	0,00277	0,00171	0,00092	0,00088
24	0,06418	0,04807	0,04778	0,03234
48	0,04089	0,03069	0,05313	0,03120
73	0,02382	0,02288	0,04215	0,02314
B: ACETATO DE ISOBUTILO				
t (h)	T73uraYEp	T73uraYEpTHI3	T73uraleuYEp	T73uraleuYEpTHI3
7	0	0	0	0
24	0,00308	0,00317	0,00836	0,00715
48	0,00148	0,00150	0,00491	0,00366
73	0,00097	0,00116	0,00254	0,00199
C: ACETATO DE ETILO				
t (h)	T73uraYEp	T73uraYEpTHI3	T73uraleuYEp	T73uraleuYEpTHI3
7	0,088	0,075	0,045	0,025
24	2,069	1,793	2,985	2,946
48	3,099	3,169	5,515	4,684
73	3,591	3,308	6,502	5,334
D: ACETATO DE 2-FENILETILO				
t (h)	T73uraYEp	T73uraYEpTHI3	T73uraleuYEp	T73uraleuYEpTHI3
7	0,00892	0,00678	0,00652	0,00554
24	0,01837	0,01611	0,1872	0,01719
48	0,02295	0,02651	0,04848	0,03939
73	0,02560	0,03544	0,04639	0,03701

E: ACETATO DE HEXILO

t (h)	T73uraYEp	T73uraYEpTHI3	T73uraleuYEp	T73uraleuYEpTHI3
7	0,00009	0,00007	0,00009	0,00007
24	0,00013	0,00012	0,00009	0,00010
48	0,00013	0,00014	0,00017	0,00016
73	0,00023	0,00030	0,00031	0,00027

Tabla 17: Acumulación de los ésteres acetato de isoamilo (A), acetato de isobutilo (B), acetato de etilo (C), acetato de 2-feniletilo (D) y acetato de hexilo (E) en ppm y medio rico YPD de las cepas T73uraYEp, T73uraYEpTHI3, T73uraleuYEp y T73uraleuYEpTHI3.

4.3. Conclusiones.

Atendiendo a los resultados obtenidos en este apartado, se puede concluir que:

1. La sobreexpresión de la proteína **Thi3p** no tiene ningún efecto en el proceso de descarboxilación del α -cetoisovalerato ni del 3-fenilpiruvato hacia la síntesis de isobutanol (*Tabla 13*) o del 2-feniletanol (*Tabla 15*), respectivamente. Nuestros datos coinciden con los resultados obtenidos por otros autores (Dickinson *et al.*, 2003, Vuralhan *et al.*, 2003), quienes sugieren que la especificidad en el proceso de obtención de los precursores aromáticos alcohólicos, esto es alcohol isoamílico, isobutanol y 2-feniletanol, reside en la reacción de descarboxilación, siendo **Pdc1p**, **Pdc5p** y **Pdc6p** las proteínas responsables de descarboxilar el α -cetoisovalerato (Dickinson *et al.*, 1998), **Aro10p** (Ydr380w) la enzima que descarboxila el 3-fenilpiruvato (Vuralhan *et al.*, 2003) y **Thi3p** la encargada de descarboxilar el α -cetoisocaproato (Dickinson *et al.*, 1997) (*Figura 26*).

2. La sobreexpresión del gen *THI3* no afecta a los niveles de acumulación de alcohol isoamílico. La ausencia de efecto aunque haya acumulación del mensajero (*Figura 38*), y a pesar de que **Thi3p** sea la descarboxilasa implicada casi exclusivamente en el primer paso hacia la obtención de alcohol isoamílico (Dickinson *et al.*, 1997; Dickinson *et al.*, 2003), podría explicarse de distintas formas.

En primer lugar es posible que la ausencia de efecto se deba a que todo el alcohol sintetizado en exceso como consecuencia de la sobreexpresión esté transformándose en acetato de isoamilo, en cuyo caso detectaríamos un incremento en la acumulación del éster de acetato. Nuestros datos indican lo contrario (*Tabla 16*), por tanto esta posibilidad no parece ser la explicación a nuestros resultados. En segundo lugar, es posible que la proteína **Thi3p** producida no sea funcional como consecuencia de un error en la construcción del plásmido sobreexpresante YEpTHI3 obtenido en este trabajo o porque exista algún proceso de regulación post-traducciona que impida su funcionalidad. En principio, consideramos que la primera opción es poco probable ya que partimos de un vector centromérico, pTTR5, cuyo fragmento de DNA de 3 kb clonado en su MCS y que complementa la mutación *thi3* (Nishimura *et al.*, 1992), es digerido e íntegramente subclonado en el vector episomal YEplac195. Aunque se realizaron las comprobaciones pertinentes mediante restricción y el patrón de bandas obtenido para YEpTHI3 fue el teóricamente esperado, no se realizó la comprobación por secuenciación. Por tanto, esta opción aunque poco probable, no está descartada.

Con respecto a la modificación post-traducciona, la proteína **Thi3p** cataliza el proceso de descarboxilación y en su secuencia aminoacídica se encuentra un dominio de unión para la tiamina, al igual que **Pdc1p**, **Pdc5p** y **Pdc6p** (Dickinson *et al.*, 1997, y Hohmann and Meacock 1998), por eso se la incluye en la familia de las descarboxilasas. Pero a diferencia de éstas que necesitan el TPP como cofactor, **Thi3p** se ha descrito como un sensor-activador del metabolismo de la tiamina (Nishimura *et al.*, 1992 y Burrows *et al.*, 2000), en el que la unión a TPP tiene una función reguladora sobre la expresión de los genes implicados en el metabolismo de dicho

cofactor. Hasta el momento se desconoce exactamente como funciona el mecanismo molecular global que gobierna el metabolismo de la tiamina en *S. cerevisiae*, pero se sabe que es muy complejo, altamente regulado, esencial y que **Thi3p** junto con **Thi2p** y **Pdc2p** son proteínas clave en este proceso. Teniendo en cuenta estas consideraciones podemos suponer que la función reguladora es lo suficientemente importante como para que la célula hubiese desarrollado un mecanismo de control a nivel de la proteína. Dicho control sería dependiente de las condiciones que afectasen al metabolismo de la tiamina y, dejaría en un segundo plano la función catalítica de **Thi3p**. Si esto fuese así, por mucho que incrementásemos el número de copias del gen *THI3* no observaríamos efecto en la concentración final de alcohol isoamílico, ya que el número de moléculas de **Thi3p** funcional podría no ser mayor en la cepa sobreexpresante que en la cepa de referencia.

Finalmente, se podría asumir que la ausencia de efecto pudiese deberse al “pool” de α -cetoisocaproato intracelular disponible. En la bibliografía encontramos algunas aproximaciones exitosas encaminadas a obtener un incremento en la producción de alcohol isoamílico, (Hirata y Hiroi, 1991; Hirata *et al.*, 1992, Eden *et al.*, 2001, Kodama *et al.*, 2001, y Yoshimoto *et al.*, 2002). Si nos detenemos a analizar el diseño de dichas aproximaciones observamos que comparten una misma particularidad ya que en todas las modificaciones que se introducen, se altera el “pool” de α -cetoisocaproato bien porque se sobreexpresan los genes *LEU4* y *LEU2* (Hirata y Hiroi, 1991; Hirata *et al.*, 1992), bien porque se incrementa la cantidad transaminasa **Bat2p** (Eden *et al.*, 2001 y Yoshimoto *et al.*, 2002) o bien porque se aumenta la concentración de la permeasa **Bap2p** presente en la membrana plasmática (Kodama *et al.*, 2001) (*Figura 2* apartado 3.1. de la Introducción). En todas ellas se incrementa la cantidad de α -cetoisocaproato disponible y se consigue aumentar también la cantidad de alcohol isoamílico acumulado. Nuestra estrategia por el contrario es una modificación que altera el mecanismo por debajo de este intermediario, por lo que el “pool” del intermediario α -cetoisocaproato permanece invariable. Sin embargo si que obtenemos diferencias en la producción de este alcohol entre una cepa que contiene el gen *LEU2* (T73ura) y otra que lo tiene

interrumpido (T73uraleu) (*Tabla 14*). Estas evidencias sugieren que el α -cetoácido es el metabolito clave en la acumulación de alcohol. Por consiguiente, sólo se conseguiría incrementar la producción de un alcohol aromático cuando se aumentara la cantidad de su correspondiente α -cetoácido. Si esta hipótesis fuese cierta, podríamos concluir que la sobreexpresión de **Thi3p** no inducirá ningún efecto en la acumulación de acetato de isoamilo.

5. ESTRATEGIA 4: DELECIÓN DE TRANSPORTADORES DE AMINOÁCIDOS.

Los alcoholes aromáticos precursores de los ésteres de acetato de interés en este trabajo forman parte del contexto metabólico de los aminoácidos, tal y como comentamos en el apartado 3.1.2 de la Introducción, puesto que sus rutas de síntesis son ramificaciones de rutas biosintéticas de aminoácidos (*Figura 2* apartado 3.1. de la Introducción). Otra posible estrategia encaminada a aumentar los niveles de producción de ésteres de acetato sería estimular las rutas biosintéticas de las que proceden sus precursores alcohólicos bloqueando la captación de los aminoácidos presentes en el medio. La delección de los sistemas de percepción y/o de transporte de aminoácidos podría ser una buena aproximación para conseguir dicho bloqueo.

Dada la disponibilidad de una amplia colección de cepas de levadura de laboratorio mutantes en los sistemas de percepción y/o de transporte de aminoácidos, nuestro propósito en este trabajo fue encontrar mutantes cuya capacidad de incorporar aminoácidos del medio, en particular leucina, valina y fenilalanina estuviese casi o totalmente anulada. En caso de encontrar mutantes con el fenotipo adecuado, se podría verificar si dicho bloqueo supone la sobreactivación de alguna de las rutas anabólicas de dichos aminoácidos. En el supuesto de que estos mutantes presentasen un flujo mayor en las rutas biosintéticas de estos metabolitos, podría ocurrir que fuesen mayores productores de precursores alcohólicos (alcohol isoamílico, isobutanol y 2-feniletanol) y quizás también, de

sus correspondientes ésteres de acetato (acetato de isoamilo, de isobutilo y de 2-feniletilo).

Para comprobar dicha hipótesis, se realizó un escrutinio en cepas de laboratorio mutantes en los distintos sistemas de percepción y de transporte de aminoácidos. A fin de facilitar la lectura de este apartado, las cepas analizadas aunque también se incluyen en la *Tabla 4*, se muestran en la *Tabla 18*. El rastreo se centró en tres tipos de ensayos. En primer lugar un test de crecimiento en medio sólido añadiendo leucina como única fuente de nitrógeno. En segundo lugar la determinación de la cantidad de leucina que la célula es capaz de transportar cuantificando la cantidad de leucina radiactiva incorporada. Finalmente se abordó la cuantificación de leucina interna mediante análisis HPLC. La metodología y procedimiento de los tres tipos de ensayos realizados se describe en el apartado 4.3. de Materiales y Métodos.

Controles positivos		Control negativo	
Σ1278b	23.344c (ura3)	FGY145 (ura3-52 shr3Δ6)	
Mutantes dobles			
34.000b (ura3Δssy1)		30.629c (ura3Δgap1)	
Mutantes triples			
FAO10 (ura3Δgap1Δssy1)	Ek041 (ura3Δgap1Δgnp1)	30.633c (ura3Δgap1Δagp1),	
Mutantes múltiples			
IVU321 (ura3Δgap1 Δ gnp1Δagp1 Δ tat1)	IVU301 (ura3 Δgap1 Δ gnp1Δagp1 Δ bap2)	IVU311 (ura3 Δgap1 Δ gnp1Δagp1 Δ bap3)	JA248 (ura3Δgap1 Δgnp1Δagp1)
IVU381 (ura3Δgap1 Δ gnp1Δagp1 Δ tat2)	IVU411 (ura3Δgap1 Δ gnp1Δagp1 Δ ptr2)	MNO43 (ura3Δgap1 Δ gnp1Δagp1 Δ bap2Δbap3)	MNO78 (ura3Δgap1 Δgnp1Δ agp1 Δbap2Δbap3 Δ tat1)

Tabla 18: Cepas analizadas, en este apartado.

5.1. Capacidad de incorporación de leucina.

El test de crecimiento en medio sólido se realizó con el objetivo de conocer el efecto de cada mutación en los diversos sistemas de percepción y de transporte de aminoácidos con respecto a la capacidad de reconocer e incorporar la leucina como única fuente de nitrógeno. Para obtener esta información las células se cultivaron en placas de medio mínimo MM al que se añadió leucina a distintas concentraciones, desde 1 mM a 10 mM, y se incubaron a 30 °C durante un máximo de seis días (apartado 2.1.4. de Materiales y Métodos).

El rango de concentraciones de leucina elegido delimita el intervalo donde un defecto en el crecimiento puede atribuirse a posibles alteraciones en la utilización de este aminoácido, concretamente, en lo referente a su reconocimiento e internalización, provocadas por las mutaciones introducidas (Iraqi *et al.*, 1999b). En este sentido, 1 mM es el umbral mínimo por debajo del cual no se observa crecimiento, es decir, independientemente de la mutación no hay suficiente cantidad de sustrato para que la célula pueda incorporarlo y utilizarlo como fuente de nitrógeno. Por el contrario, 10 mM es el umbral máximo establecido a partir del cual siempre hay crecimiento y en el que independientemente de la mutación introducida, la célula es capaz de crecer porque la cantidad de sustrato es tan elevada que el crecimiento no estará comprometido debido a la redundancia y baja especificidad de los mecanismos de transporte de aminoácidos. Cabe señalar que dentro de este intervalo es posible establecer una correlación entre crecimiento y efecto de la mutación siempre y cuando las mutaciones introducidas afecten exclusivamente a los sistemas de percepción y/o de transporte a nivel de la membrana plasmática.

El ensayo se realizó sobre las cepas anteriormente descritas (*Tabla 18*). Como controles positivos del test de crecimiento se utilizaron las cepas **Σ1278b** y **23.344c** (*ura3*) que no presentan ninguna mutación en las permeasas. Como control negativo, se utilizó la cepa **FGY145** (*ura3-52 shr3Δ6*) que presenta una mutación en la carabina del retículo endoplasmático **Shr3p** que anula la capacidad de la célula

para reconocer e incorporar aminoácidos (Ljungdahl *et al.*, 1992; Gilstring *et al.*, 1995).

Los resultados obtenidos en el ensayo de crecimiento que se muestran en la *Figura 41* y permiten concluir que existen tres tipos de fenotipos que se detallan a continuación.

Fenotipo I (*Figura 41*, (*)), relativo a cepas mutantes que crecen igual que los controles positivos **Σ1278b** y **23.344c** (ura3). Su crecimiento es independiente de la cantidad de leucina presente en el medio. En este grupo se incluyen los mutantes simples, ura3Δgap1, ura3Δssy1, y el doble mutante ura3Δgap1Δgnp1. Este fenotipo de independencia sugiere que en estos mutantes la célula conserva la capacidad de reconocer e incorporar leucina. Posiblemente la presencia de otras permeasas como **Agp1p**, **Bap2p** o **Tat1p** entre otras, es suficiente para compensar la ausencia de las permeasas generales **Gap1p** y **Gnp1p** y del sistema sensor **SPS** que incluye la proteína **Ssy1p** (Iraqi *et al.*, 1999a y 1999b).

Fenotipo II (*Figura 41*, (**)), consistente en cepas mutantes que crecen poco a bajas concentraciones de leucina pero que a medida que aumenta la cantidad de sustrato en el medio aumentan su crecimiento, hasta alcanzar un valor de concentración a partir del cual dicho crecimiento se mantiene. Se incluirían en este grupo el doble mutante **30.633c** (ura3 Δgap1 Δagp1), el triple **JA248** (ura3 Δgap1 Δgnp1 Δagp1), y los mutantes múltiples **IVU301** (ura3 Δgap1 Δgnp1 Δagp1 Δbap2), **IVU311** (ura3 Δgap1 Δgnp1 Δagp1 Δbap3), **IVU321** (ura3 Δgap1 Δgnp1 Δagp1 Δtat1), **IVU411** (ura3 Δgap1 Δgnp1 Δagp1 Δptr2), **MN043** (ura3 Δgap1 Δgnp1 Δagp1 Δbap2 Δbap3), y **MN078** (ura3 Δgap1 Δgnp1 Δagp1 Δbap2 Δbap3 Δtat1). En este fenotipo el crecimiento se ve comprometido a medida que se acumulan las deleciones en las permeasas, pero la dependencia desaparece al incrementar la cantidad de leucina en el medio. Esta característica fenotípica dependiente de la concentración de sustrato sugiere que sigue habiendo transporte aunque con baja afinidad, de manera que a altas concentraciones de sustrato, aunque queden pocas permeasas en la membrana plasmática y sean de baja afinidad para la leucina, las

que hay son suficientes para asegurar el crecimiento. Por tanto, la supervivencia celular sólo se verá afectada cuando las condiciones sean extremas, esto es, baja concentración de sustrato combinada con la falta de funcionalidad del sistema sensor SPS y/o la ausencia de las permeasas generales de gran capacidad como Gap1p, Agp1p, Gnp1p y de las específicas con alta afinidad como Bap2p, Tat1p, Bap3p o Ptr2p (Iraqi et al. 1999a y 1999b).

Fenotipo III (*Figura 41 (***)*), correspondiente a cepas que no crecen independientemente de la cantidad de leucina en el medio. Dentro de este grupo se incluirían el control negativo **FGY145** (ura3-52shr3Δ6), cuya membrana plasmática carece de transportadores de aminoácidos, y la cepa mutante **FAO10** (ura3Δgap1Δssy1) donde los genes que codifican la permeasa general **Gap1p** y el sensor **Ssy1p** han sido eliminados. En ambos casos la célula es incapaz de reconocer la presencia de leucina en el medio y/o es incapaz de incorporarla. La ausencia de crecimiento en el mutante ura3Δgap1Δssy1 probablemente se deba a un problema de percepción y/o transducción de la señal (Didion *et al.*, 1996 y 1998; Iraqi *et al.* 1999a y 1999b).

Los resultados obtenidos con el test de crecimiento indican que de todas las cepas mutantes ensayadas sólo la cepa **FAO10** (ura3Δgap1Δssy1) presenta un fenotipo en el que los mecanismos de percepción y/o transporte de leucina están casi o totalmente anulados.

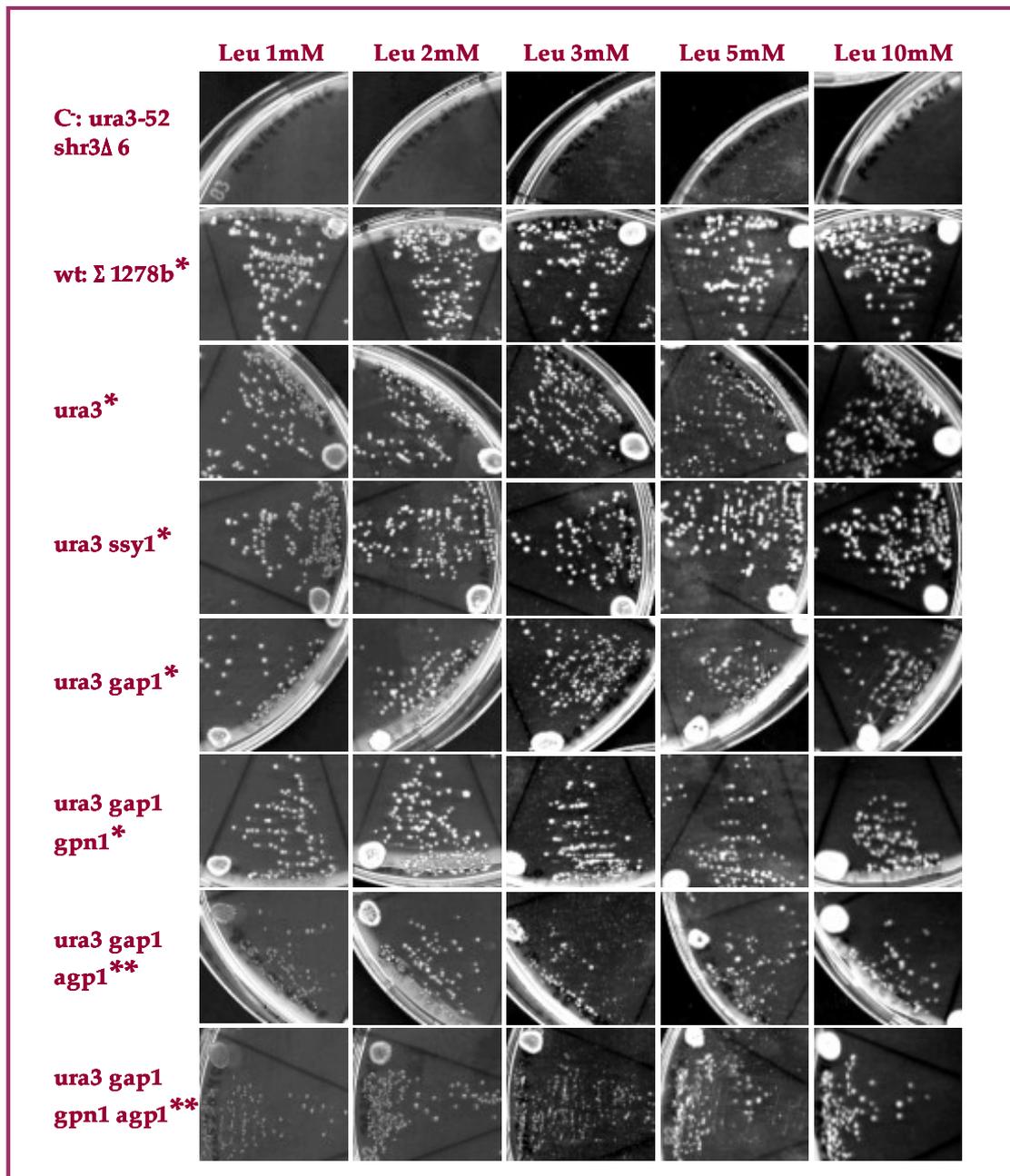


Figura 41: Capacidad de incorporar leucina como única fuente de nitrógeno. Se compara el crecimiento en medio mínimo (MM) a distintas concentraciones de leucina de las cepas control Σ1278b y ura3 con cepas que presentan simples, dobles o múltiples mutaciones en los genes que codifican permeasas de aminoácidos. (*); (**);(***)

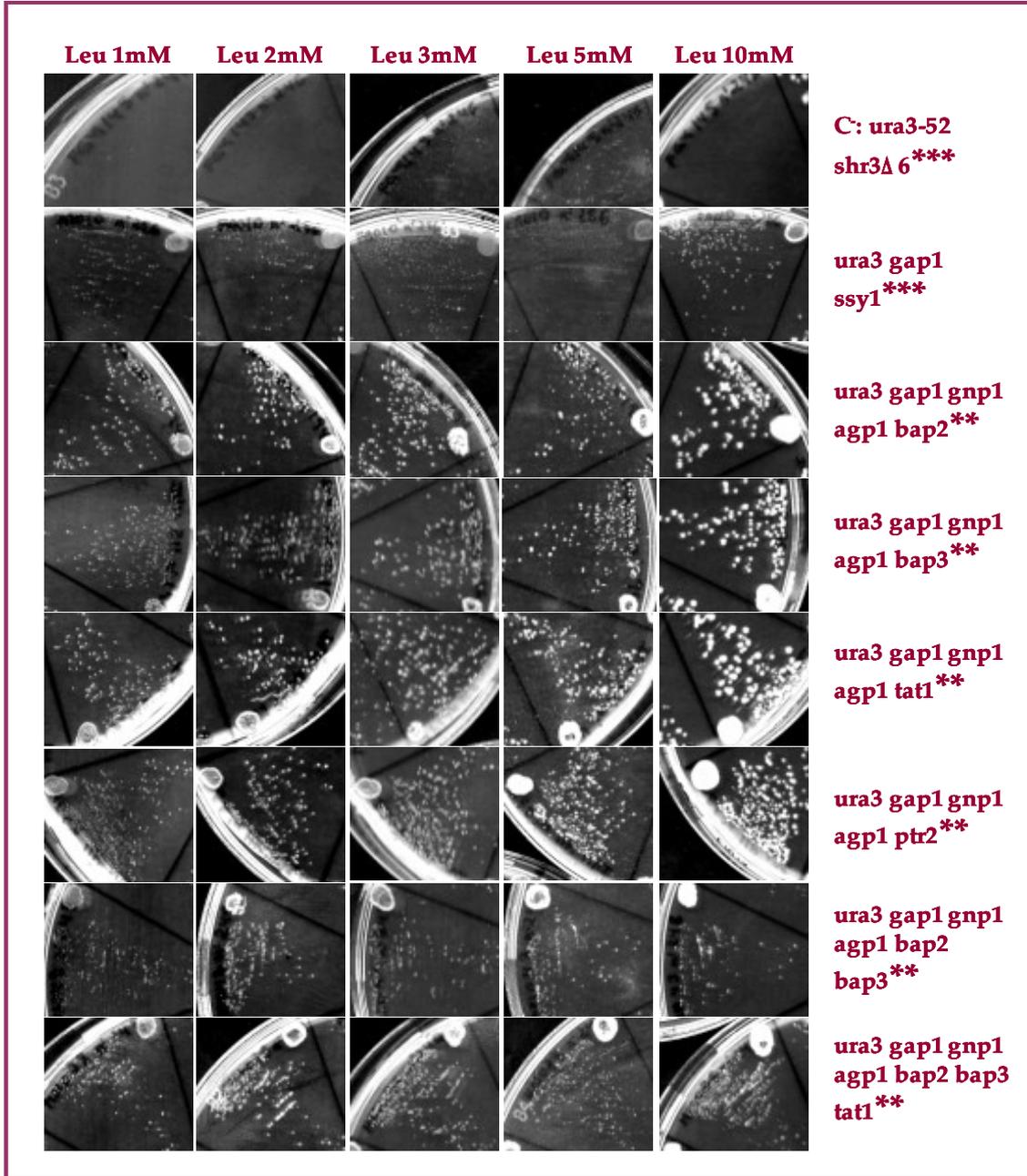


Figura 41: Continuación. (*) Crecimiento no dependiente de la cantidad de leucina en el medio. Crecimiento dependiente de la cantidad de leucina en el medio (**). Ausencia de crecimiento (***).

5.2. Transporte de leucina

Considerando los resultados obtenidos en el apartado anterior se determinó el transporte de leucina en el doble mutante *ura3Δgap1Δssy1* en comparación con la cepa control *ura3* y los mutantes simples *ura3Δgap1* y *ura3Δssy1*. El objetivo de este análisis fue comprobar si la ausencia de crecimiento observada en el test de crecimiento se correspondía con una dificultad real en el transporte de este aminoácido.

La cuantificación del transporte se realizó utilizando distintos tipos de compuestos nitrogenados como fuente de nitrógeno atendiendo a la capacidad de asimilación y a los posibles efectos que ejercen en el metabolismo celular (Cooper, 1982; Wiame *et al.*, 1985; Hinnebusch, 1992; Magasanik, 1992). Los medios de cultivo empleados fueron medio con amonio (MA), medio con prolina (MP), medio con una mezcla de aminoácidos excepto leucina (MC), y medio con aminoácidos y amonio (MCA) (apartado 2.1.4 de Materiales y Métodos). En todos los experimentos el cultivo se realizó a 30 °C hasta alcanzar la fase exponencial (DO_{600} 0,4-0,6) y entonces, se suministró un pulso de leucina marcada radiactivamente (L-[U-¹⁴C] Leucina) a una concentración de 100 μM tal y como se describe en el apartado 4.3.1. de Materiales y Métodos. A esta concentración la célula es capaz de incorporar el aminoácido sin llegar a saturación (ver cepa control *ura3* (↗) en las Figuras 42 a 45). Este estado de falta de saturación, nos permite detectar alteraciones de la permeabilidad celular para la leucina en los distintos mutantes.

Los resultados obtenidos para las cepas **23.344c** (*ura3*), **30.629c** (*ura3Δgap1*), **34.000b** (*ura3Δssy1*) y **FAO10** (*ura3Δgap1Δssy1*) en las condiciones analizadas se muestran en las Figuras 42 a 45. Como se puede observar en dichas gráficas, el perfil de acumulación, y por tanto el transporte para la leucina en cada uno de los mutantes varía en función de la fuente de nitrógeno utilizada, pudiéndose diferenciar dos tipos de comportamiento claramente dependientes de la presencia o ausencia de amonio en el medio. En ausencia de amonio, es decir, en ausencia de una fuente de nitrógeno de fácil asimilación

(medios MP y MC), la célula incorpora de una forma rápida y transitoria una gran cantidad de leucina radiactiva que decae hasta alcanzar un valor estable en las cepas mutantes *ura3* (◆) y *ura3Δssy1* (▲) (Figuras 43 y 44). Sin embargo, en presencia de esta fuente nitrogenada (medios MA y MCA), el transporte de leucina para estos mismos mutantes (*ura3* (◆) y *ura3Δssy1* (▲)) se da a una velocidad más o menos constante en el tiempo (Figuras 42 y 45). Este último comportamiento, se observa independientemente de la fuente de nitrógeno en las cepas *ura3Δgap1* (■) y *ura3Δgap1Δssy1* (●) (Figuras 42 a 45). El hecho de que este fenómeno de rápida captación de sustrato ocurra sólo en condiciones de falta de NCR y el que la cepa mutante *ura3Δgap1* (■) en las mismas circunstancias no siga el mismo perfil cinético de transporte (Figura 43 cinética de acumulación para la cepa *ura3Δgap1* (■)), sugiere que la permeasa Gap1p podría estar implicada en dicho comportamiento. En medio MC, el mutante *ura3Δgap1* (■) si muestra un pico, aunque éste es menos acusado (Figura 43 cinética de acumulación para la cepa *ura3Δgap1* (■)).

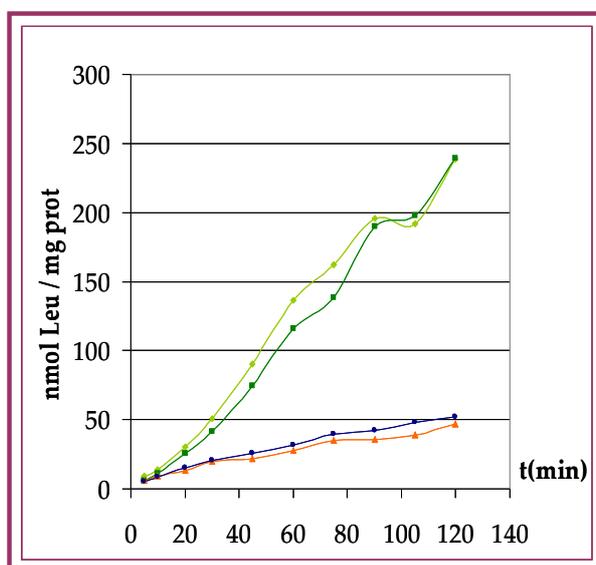


Figura 42. Acumulación de leucina tras un pulso de este aminoácido a una concentración final de 100 μ M a cultivos creciendo en medio con amonio como única fuente de nitrógeno (MA). Cepas ensayadas: control *ura3* (○), mutantes *ura3Δgap1* (■), *ura3Δssy1* (△) y *ura3Δgap1Δssy1* (●).

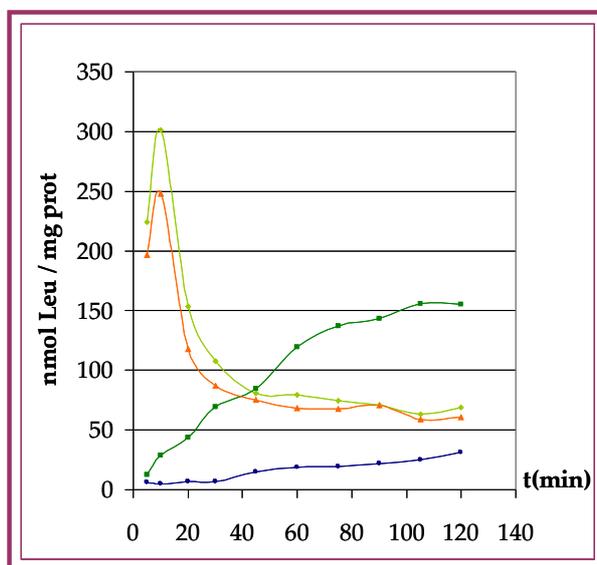


Figura 43. Acumulación de leucina tras un pulso de este aminoácido a una concentración final de 100 μ M a cultivos creciendo en medio con prolina como única fuente de nitrógeno (MP). Cepas ensayadas: control ura3 (○), mutantes ura3Δgap1 (△), ura3Δssy1 (□) y ura3Δgap1Δssy1 (▽).

Hasta el momento desconocemos las razones por las cuales en estas condiciones la leucina es incorporada de esta forma. Tampoco conocemos la forma en que contribuye la permeasa general en este proceso. Sin embargo, se puede afirmar que la leucina está siendo incorporada ya que se detecta radiactividad intracelular (*Figuras 43 y 44*). También se puede afirmar que la caída de radiactividad incorporada que se observa en el transcurso del ensayo no es debida a un proceso de excreción, ya que al cuantificar la cantidad de leucina externa no se observa un aumento de la concentración residual de leucina en el medio sino una disminución (*Figura 46*). Estos resultados sugieren que posiblemente la leucina internalizada durante los primeros 15 min del ensayo sea rápidamente transformada en otro metabolito que sale al exterior celular.

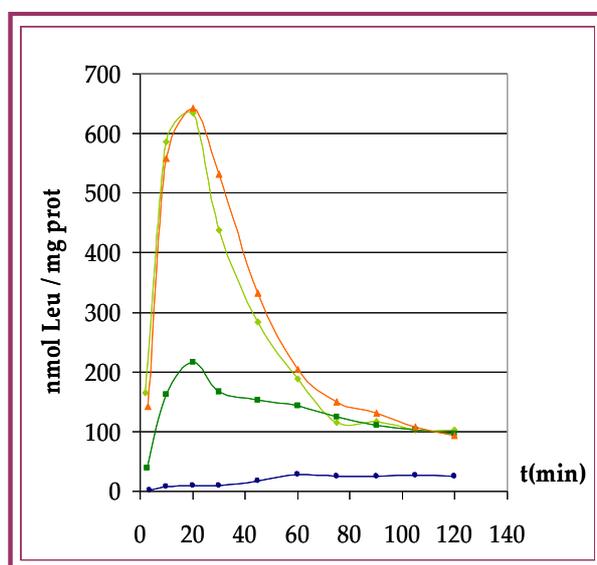


Figura 44: Acumulación de leucina tras un pulso de este aminoácido a una concentración final de 100 μ M a cultivos creciendo en medio con aminoácidos excepto leucina como única fuente de nitrógeno (MC). Cepas ensayadas: control ura3 (◆), mutantes ura3Δgap1 (▲), ura3Δssy1 (▲) y ura3Δgap1Δssy1 (●).

Al margen de estas evidencias y atendiendo a los resultados obtenidos observamos que los mutantes ura3Δssy1 (▲) y ura3Δgap1Δssy1 (●) presentan una permeabilidad menor para el aminoácido leucina que la cepa control ura3 (◆) puesto que la cantidad de leucina marcada radiactivamente que se incorpora es menor durante toda la cinética de acumulación (observar la cinética de transporte para ambas cepas en las Figuras 42 y 45, símbolos (▲) y (●)). Cabe destacar que la disminución del transporte de leucina para el mutante simple ura3Δssy1 (▲) es observable únicamente en medios con amonio (MA, MCA) en los que la permeasa general **Gap1p** está reprimida por NCR. En condiciones de desrepresión de **Gap1p**, el efecto de la mutación Δssy1 sobre el transporte de leucina no es apreciable ya que **Gap1p** no es dependiente de **Ssy1p** (Iraqi *et al.*, 1999a y 1999b) y permite un transporte generalizado de aminoácidos.

En el mutante simple *ura3Δgap1* el transporte de leucina es similar a la cepa control *ura3* en condiciones de represión (medios MA y MCA) (Figuras 42 y 45 símbolos (*ura3* (◆) y *ura3Δgap1* (■)). Sin embargo, en condiciones de no represión (medio MP y MC) la cinética de transporte para el mutante *ura3Δgap1* difiere respecto a la obtenida para la cepa control. En estas condiciones el perfil del transporte se asemeja al del mutante *ura3Δssy1* (▲) (Figuras 43 y 44, comparar símbolos *ura3Δssy1* (▲) y *ura3Δgap1* (■)).

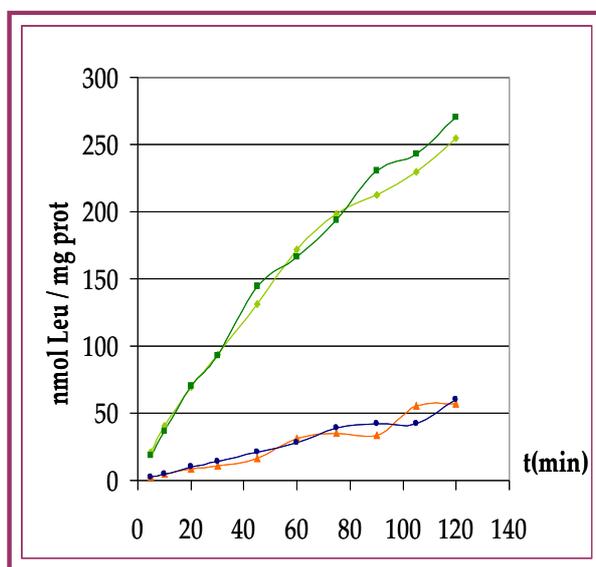


Figura 45: Acumulación de leucina tras un pulso de este aminoácido a una concentración final de 100 μ M a cultivos creciendo en medio con aminoácidos excepto leucina y amonio como única fuente de nitrógeno (MCA). Cepas ensayadas: control *ura3* (◆), mutantes *ura3Δgap1* (■), *ura3Δssy1* (▲) y *ura3Δgap1Δssy1* (●).

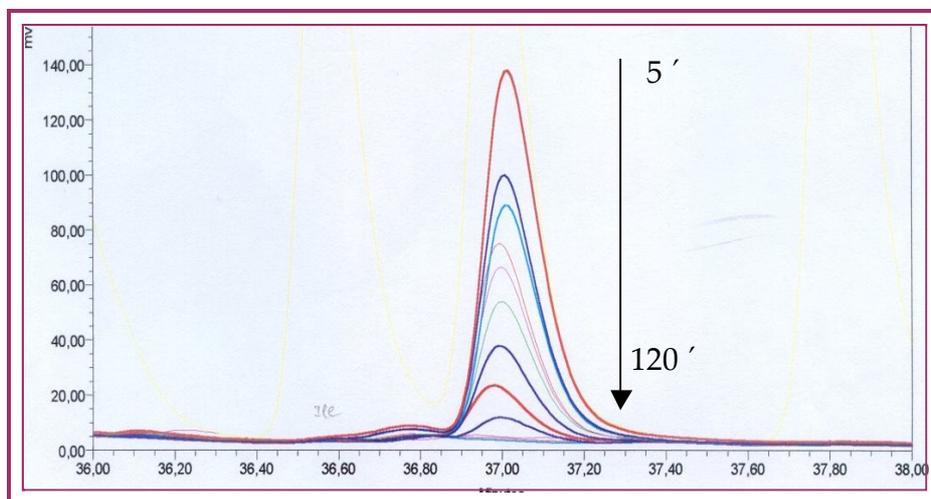


Figura 46. Cromatograma resultante de la cuantificación mediante análisis de HPLC de la leucina externa residual en el caldo de cultivo durante la cinética de acumulación tras un pulso de leucina a cultivos creciendo en medio MP como única fuente de nitrógeno. Como se observa en la gráfica, el pico de señal registrado por el cromatógrafo correspondiente con el tiempo de retención del aminoácido leucina, disminuye con del tiempo.

De los resultados obtenidos en este apartado podemos concluir que independientemente de las características del medio de cultivo, la cepa *ura3Δgap1Δssy1* (●) transporta menos leucina al interior celular que la cepa control. Así mismo, podemos afirmar que la ausencia de crecimiento de la cepa *ura3Δgap1Δssy1* en medios con leucina como única fuente de nitrógeno se corresponde con una dificultad real para la permeabilidad del aminoácido leucina y, además, que este efecto es consecuencia de la mutación $\Delta ssy1$. Por tanto, la ausencia de la proteína **Ssy1p** acoplada a la inactividad de **Gap1p** anula prácticamente la capacidad de la célula para percibir la presencia de leucina en el medio.

5.3. Cuantificación del “pool” de leucina mediante análisis HPLC.

Una vez analizado el transporte de leucina, se cuantificó la concentración interna de aminoácidos, especialmente la de leucina, en los mutantes *ura3Δgap1*, *ura3Δssy1* y *ura3Δgap1Δssy1* respecto de la cepa control *ura3*. El objetivo de este análisis fue comprobar si las dificultades en el transporte de leucina de los mutantes *ura3Δssy1* y *ura3Δgap1Δssy1* en presencia de amonio se reflejan en el contenido intracelular de leucina, y si dicho contenido revela alguna información sobre la mayor o menor actividad de la ruta biosintética de leucina.

En este caso los medios de cultivo empleados fueron medio rico YPD y medios MCA 100 o MCA 20. La concentración de 100 μM garantiza un estado de falta de saturación con respecto a la permeabilidad de la leucina, ya que a esta concentración las alteraciones en el transporte de leucina pueden correlacionarse con variaciones en la actividad y afinidad de las permeasas. La posible existencia de diferencias en los niveles intracelulares de leucina podrían correlacionarse también con deficiencias en los sistemas de percepción y transporte de aminoácidos y con efectos indirectos sobre las rutas de biosíntesis de los mismos. Por el contrario, la concentración de 20 mM establece un estado de saturación global además de ser la cantidad de leucina que se encuentra en medio rico YPD (*Tabla 19*).

mmol de aa / L			
Leucina	Valina	Isoleucina	Fenilalanina
19,19	12,18	8,40	7,68

Tabla 19. Cuantificación mediante análisis HPLC de la concentración de leucina, valina, isoleucina, y fenilalanina presentes en medio YPD.

En los distintos medios de cultivo, el crecimiento celular se realizó a 30 °C con agitación orbital a una velocidad de 200 rpm. La cuantificación de la leucina interna se llevó a cabo en células

procedentes de la fase exponencial (DO_{600} : 0,4-0,6) y estacionaria (DO_{600} : 1,5-2) de crecimiento.

La cuantificación de leucina interna en unidades de concentración (nmol/mg proteína) para el conjunto de cepas analizadas en las condiciones descritas se muestra en la *Figura 47* y en las *Tablas 20* a *25*. En los resultados obtenidos se observa que la cantidad de leucina interna varía en función de las condiciones del medio de cultivo en que se realice el ensayo.

En medio rico YPD (ver *Figura 47* panel C, *Tablas 20* y *21*) el “pool” de leucina interna en fase exponencial en el mutante *ura3Δgap1* es semejante al de la cepa control *ura3*, posiblemente como consecuencia de un proceso NCR, ya que la proteína **Gap1p** se reprime en medios con fuente de nitrógeno de fácil asimilación como es el caso del medio rico YPD.

	nmol(mg proteína) ⁻¹			
	Leucina	Valina	Isoleucina	Fenilalanina
ura3	26,10	33,52	21,97	12,10
gap1	29,49	40,76	24,43	13,76
ssy1	20,46	35,85	16,36	6,66
gap1ssy1	22,49	30,85	15,00	7,04

Tabla 20. Cuantificación mediante análisis HPLC de la concentración de leucina, valina, isoleucina y fenilalanina interna en medio rico YPD de cultivos creciendo en fase exponencial.

Cabe señalar que este mismo efecto también se observa en el “pool” de los aminoácidos isoleucina y fenilalanina (*Tabla 20*). Sin embargo, en los mutantes *ura3Δssy1* y *ura3Δgap1Δssy1* la cantidad de leucina interna en estas mismas condiciones (*Figura 47*), es similar entre ellos aunque ligeramente menor en comparación a la cantidad obtenida en la cepa control (*Tabla 20*).

Respecto al “pool” de leucina celular en fase estacionaria (*Figura 47, Tabla 21*), se observa que al igual que en fase exponencial la cantidad de aminoácidos en el interior celular de las cepas *ura3Δssy1* y *ura3Δgap1Δssy1* es menor que en la cepa de referencia. Además, los niveles de leucina, valina, isoleucina y fenilalanina cuantificados en la cepa *ura3Δgap1* en estas mismas condiciones son mayores respecto a los de la cepa control (comparar *Tablas 20 y 21*).

	nmol(mg proteína) ⁻¹			
	Leucina	Valina	Isoleucina	Fenilalanina
ura3	41,44	39,36	28,81	17,15
gap1	57,95	51,97	36,90	22,28
ssy1	28,63	33,10	25,40	12,56
gap1ssy1	32,04	27,82	17,16	11,73

Tabla 21: Cuantificación mediante análisis HPLC de la concentración de leucina, valina, isoleucina y fenilalanina interna en medio rico YPD de cultivos creciendo en fase estacionaria.

Asimismo, al comparar la cuantificación del “pool” interno de aminoácidos en las distintas fases del crecimiento celular comprobamos que, para todas las cepas analizadas, la concentración de aminoácidos almacenada en fase estacionaria es cuantitativamente mayor que en fase exponencial (*Figura 47* panel C, comparar *Tablas 20 y 21*). Posiblemente esto sea debido a que en la fase exponencial del crecimiento celular la velocidad de consumo de aminoácidos es mayor debido al incremento en la demanda de aminoácidos dirigida a la obtención de biomasa celular.

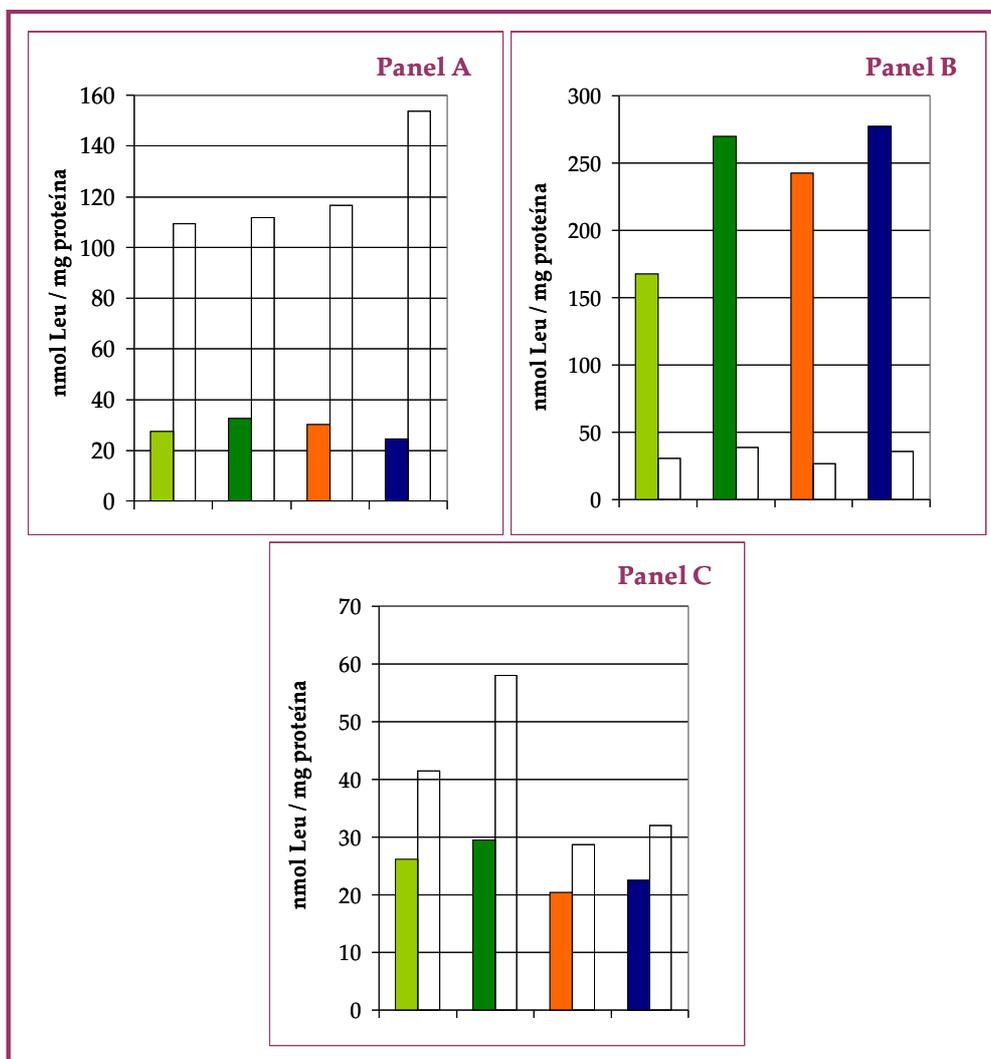


Figura 47: Cuantificación de leucina interna mediante análisis de HPLC en distintos medios y etapas del crecimiento celular. Cepas ensayadas: cepa control *ura3* (□); cepas mutantes *ura3Δgap1* (■), *ura3Δssy1* (■) y *ura3Δgap1Δssy1* (■). Panel A: medio MCA 100. Panel B: medio MCA 20. Panel C: medio rico YPD. Cuantificación en fase exponencial en barras lisas; cuantificación en fase estacionaria en barras rayadas.

En medio MCA 20, al contrario que en medio rico YPD (ver *Figura 47* panel B, *Tablas 22* y *23*) el “pool” intracelular de aminoácidos en fase exponencial es cuantitativamente mayor que en fase estacionaria (comparar *Tablas 22* y *23*; comparar panel B y C de la *Figura 47*).

	nmol mg proteína ⁻¹			
	Leucina	Valina	Isoleucina	Fenilalanina
ura3	167,43	50,08	22,09	13,46
gap1	270,02	56,00	24,74	10,65
ssy1	242,61	63,93	26,14	12,03
gap1ssy1	277,44	64,91	20,36	9,58

Tabla 22: Cuantificación mediante análisis HPLC de la concentración de leucina, valina, isoleucina y fenilalanina interna en medio MCA 20 de cultivos creciendo en fase exponencial.

	nmol(mg proteína) ⁻¹			
	Leucina	Valina	Isoleucina	Fenilalanina
ura3	30,69	46,59	22,75	13,73
gap1	38,88	54,28	23,46	13,53
ssy1	26,83	40,05	19,74	11,46
gap1ssy1	35,58	57,39	27,30	14,84

Tabla 23: Cuantificación mediante análisis HPLC de la concentración de leucina, valina, isoleucina y fenilalanina interna en medio MCA 20 de cultivos creciendo en fase estacionaria.

Teniendo en cuenta que el metabolismo celular en fase exponencial es más activo desde el punto de vista de la producción de biomasa, el resultado esperable, al menos para la cepa control *ura3*, sería que el “pool” durante este período de crecimiento exponencial fuese menor,

al igual que en medio rico YPD (ver *Figura 47* panel C, comparar *Tablas 20* y *21*). Sin embargo, las propiedades nutricionales del medio MCA 20 no son totalmente comparables con las del medio rico YPD excepto para la cantidad de leucina presente que, en ambos casos, es aproximadamente de 20 mM. Para el resto de aminoácidos la concentración inicial teórica en medio MCA 20 comparada con la cantidad cuantificada en medio YPD (*Tabla 19* y composición del medio apartado 2.1.4 de Materiales y Métodos) es tres órdenes de magnitud inferior. Por tanto podríamos pensar en base a la permeabilidad de los transportadores, que las diferencias observadas en el “pool” intracelular en las distintas condiciones analizadas son un reflejo de las propiedades intrínsecas del medio, ya que la concentración de leucina inicial en medio MCA 20 es muy elevada en comparación a la concentración del resto de aminoácidos. Por consiguiente sería posible que la competitividad por sustrato en los transportadores estuviese prácticamente anulada debido a un efecto de saturación de leucina. Por el contrario, en medio YPD si que es probable que exista competitividad por sustrato dado que todos los aminoácidos se encuentran en el mismo orden de magnitud de concentración. Esta suposición podría explicar porque en medio MCA 20 el pool intracelular en fase exponencial para la cepa control es mayor que en fase estacionaria.

Por otro lado, los datos obtenidos en estas condiciones indican que no es posible establecer una correlación entre las mutaciones introducidas, la cantidad de aminoácido intracelular cuantificado y las distintas fases de crecimiento. En fase exponencial los mutantes, *ura3Δgap1*, *ura3Δssy1* y *ura3Δgap1Δssy1* presentan un pool interno de leucina mayor que la cepa control *ura3* (*Tabla 22*). Sin embargo, en fase estacionaria sólo el mutante simple *ura3Δssy1* muestra un pool interno de leucina menor al de la cepa *ura3*. Para el resto de mutantes, los valores obtenidos son muy similares a los de la cepa de referencia (*Tabla 23*).

En referencia a los resultados obtenidos en medio MCA 100 (*Figura 47* panel A, *Tablas 24* y *25*) podemos destacar que la cantidad de leucina interna cuantificada en los mutantes simples *ura3Δgap1* y *ura3Δssy1* se mantiene más o menos constante y los valores alcanzados son similares a los de la cepa control independientemente de la fase de crecimiento (*Tablas 24* y *25*). Sin embargo, en el doble mutante *ura3Δgap1Δssy1* el “pool” intracelular de leucina con respecto a la cepa control es muy similar en fase exponencial pero mayor en fase estacionaria (comparar *Tablas 24* y *25*).

nmol(mg proteína) ⁻¹				
	Leucina	Valina	Isoleucina	Fenilalanina
ura3	27,37	48,32	25,06	10,77
gap1	32,68	52,22	19,32	9,10
ssy1	30,52	60,80	28,83	11,10
gap1ssy1	24,56	63,48	23,45	9,68

Tabla 24: Cuantificación mediante análisis HPLC de la concentración de leucina, valina, isoleucina y fenilalanina interna en medio MCA 100 de cultivos creciendo en fase exponencial.

nmol(mg proteína) ⁻¹				
	Leucina	Valina	Isoleucina	Fenilalanina
ura3	109,20	36,55	23,63	12,39
gap1	111,84	32,46	18,32	9,54
ssy1	116,54	41,42	22,86	11,74
gap1ssy1	153,59	46,60	21,01	11,29

Tabla 25: Cuantificación mediante análisis HPLC de la concentración de leucina, valina, isoleucina y fenilalanina interna en medio MCA 100 de cultivos creciendo en fase estacionaria.

El hecho de que el mutante simple *ura3Δgap1* se comporte de forma similar a la cepa control es un resultado esperado, ya que la síntesis de **Gap1p** se reprime por amonio, por tanto el fenotipo de ambas cepas debe ser el mismo (comparar la cantidad de leucina en *Tablas 24* y *25*). Sin embargo, desde el punto de vista de la permeabilidad de la leucina, no era previsible que el “pool” de leucina interna en el mutante *ura3Δssy1* fuese similar al de la cepa control *ura3* (comparar la cantidad de leucina en *Tablas 24* y *25*). Por el contrario se debería producir un “pool” semejante al del doble mutante como ocurre en medio rico YPD (*Tablas 20* y *21*) e incluso la disminución debería ser más significativa que en medio rico, sobre todo en fase de crecimiento exponencial, por varias razones. En primer lugar porque según los ensayos de acumulación anteriores, ambas cepas *ura3Δssy1* y *ura3Δgap1Δssy1* tienen mermada la capacidad para transportar leucina (*Figura 45*) respecto a las cepas *ura3* y *ura3Δgap1*, por tanto, deberían incorporar menos cantidad de sustrato. En segundo lugar porque en las condiciones ensayadas (medio MCA 100), la cantidad de leucina externa es aproximadamente tres órdenes de magnitud inferior a la cantidad de leucina presente en medio YPD o en medio MCA 20 (*Tabla 19* y composición del medio apartado 2.1.4 de Materiales y métodos) y por consiguiente, no se establece un estado de saturación que pudiera explicar una incorporación adicional de leucina.

En cualquier caso, independientemente de las diferencias obtenidas y descritas en los distintos ensayos realizados, el hecho de que la célula sea capaz de mantener un reservorio de leucina citosólica y, por extensión de valina, isoleucina y fenilalanina (*Figura 47* paneles A, B, C; *Tablas 20* a *25*), en aquellos mutantes que carecen del sensor **Ssy1p** sugiere que o bien la célula es capaz de transportarlos vía otras permeasas cuya expresión no está regulada por **Ssy1p**, o bien los sintetiza. Como consecuencia de los resultados obtenidos, ambas hipótesis serían factibles. La primera porque en cualquiera de los medios utilizados en este experimento (YPD, 20 o MCA 100) hay aminoácidos y en algunas condiciones, particularmente el aminoácido leucina, se encuentran a concentraciones elevadas. Por tanto sería posible que la cantidad de leucina interna detectada en todas las cepas analizadas procediese del exterior celular, inclusive para las cepas *ura3Δssy1* y *ura3Δgap1Δssy1*. A pesar de que estos

mutantes dispongan de un escaso número de permeasas generales, ya que **Ssy1p** controla la expresión de **Agp1p**, **Gnp1p**, **Bap2p**, **Bap3p**, **Tat1p**, **Tat2p**, **Gnp1p** (Iraqi, *et al.* 1999a y 1999b) y **Gap1p** está inactiva por la presencia de amonio, es posible que la capacidad de transportar leucina, en estas cepas, no esté totalmente anulada puesto que disponen de otras permeasas, seguramente de menor afinidad, capaces de incorporar leucina tal y como lo indican los resultados del test de crecimiento (*Figura 41*).

La segunda hipótesis es también factible porque en caso de que el "pool" intracelular de leucina en los mutantes *ura3Δssy1* y *ura3Δgap1Δssy1* no procediese del exterior celular, es decir, que la leucina no estuviera siendo incorporada tal y como sugieren los experimentos de transporte y acumulación (*Figura 45*), la explicación más plausible sería que la célula tuviera activada la ruta de biosíntesis y, por consiguiente, los estuviera produciendo. En este caso el flujo de la ruta biosintética de la leucina en los mutantes *ura3Δssy1* y *ura3Δgap1Δssy1* sería mayor.

Para intentar esclarecer cual de las dos hipótesis era más probable, se determinó la cantidad de leucina no incorporada (leucina externa) en medio MCA 100. Para ello se realizaron en paralelo dos experimentos de transporte en los que se añadió leucina radiactiva para determinar la leucina interna resultante del transporte a modo de control, o leucina fría para determinar la leucina externa que no es incorporada y la leucina intracelular en las distintas fases de crecimiento. Cabe señalar que se escogieron estas condiciones y no otras porque son las mismas condiciones en las que se realizaron los experimentos de transporte y porque la cantidad de leucina presente en el medio MCA 100 es lo suficientemente elevada como para poder determinar cambios atribuibles a las modificaciones introducidas y también lo suficientemente baja para ser detectada de una forma directa sin manipular la muestra. Los valores resultantes de la cuantificación de leucina interna y externa en fase exponencial y fase estacionaria se muestran en la *Figura 48*.

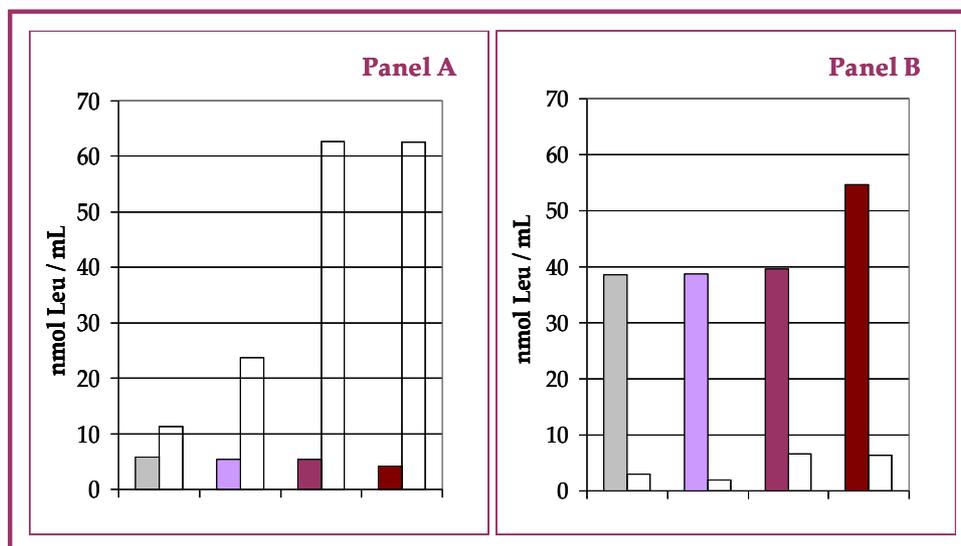


Figura 48: Cuantificación mediante análisis HPLC de la concentración de leucina interna en las células (barras lisa) y externa en el sobrenadante (barras rayadas) en 1 mL de cultivo creciendo en medio MCA 100. Panel A: Fase exponencial. Panel B: Fase estacionaria. Cepas ensayadas: control ura3 (), y mutantes ura3Δgap1 (), ura3Δssy1 () y ura3Δgap1Δssy1 ().

Con los valores obtenidos se calculó el porcentaje de leucina incorporada, consumida y almacenada de las cepas ura3, ura3Δgap1, ura3Δssy1 y ura3Δgap1Δssy1 en las distintas fases del crecimiento celular (*Tablas 26 y 27*). La determinación de los distintos porcentajes se realizó tal y como se indica en el apartado 4.3.2. de Materiales y Métodos.

Concentración de Leucina (%)			
Cepa	No incorporada	Incorporada	almacenada
ura3	11,35	88,65	6,5
gap1	23,82	76,18	6,98
ssy1	62,64	37,36	14,4
gap1ssy1	62,50	37,5	10,89

Tabla 26: Porcentajes de la concentración de leucina en medio MCA 100 y fase exponencial.

Concentración de Leucina (%)			
Cepa	No incorporada	Incorporada	almacenada
ura3	27,29	72,71	52,96
gap1	17,57	82,43	46,91
ssy1	58,56	41,44	95,56
gap1ssy1	57,21	42,79	127,72

Tabla 27: Porcentajes de la concentración de leucina en medio MCA 100 y fase estacionaria.

Los datos obtenidos confirman que las cepas *ura3Δssy1*, *ura3Δgap1Δssy1* transportan al menos un 40% menos de leucina y, a pesar de ello, la cantidad de aminoácido que se encuentra en sus reservorios es aproximadamente el doble que en las cepas control *ura3* y *ura3Δgap1*, independientemente de la fase de crecimiento (ver *Tablas 26* y *27*). Este resultado sugiere que al menos en estas condiciones, en estos mutantes, *ura3Δssy1*, *ura3Δgap1Δssy1*, aunque no hay transporte, el flujo de la ruta biosintética de la leucina debe ser mayor que en las cepas de referencia (*Figura 45; Tablas 26* y *27*).

5.4. Conclusiones.

Atendiendo a los resultados obtenidos en los tres tipos de ensayos realizados podemos concluir que:

1. La cepa **FAO10** (*ura3Δgap1Δssy1*) sería la candidata ideal para conseguir bloquear la entrada de aminoácidos en el medio y de este modo forzar un estado de sobreactivación de la ruta biosintética, es decir, obligar a la célula a incrementar el flujo metabólico de la síntesis de leucina.
2. Aún habiendo encontrado un mutante cuyo fenotipo se ajusta a nuestro propósito inicial, existen una serie de argumentos que limitan la aplicación biotecnológica de esta estrategia.

En primer lugar, la concentración de ésteres y alcoholes en las condiciones de medio ensayadas en todas las experiencias anteriores no es cuantificable con las técnicas analíticas utilizadas en este trabajo. Posiblemente, los medios de cultivo utilizados son nutricionalmente tan pobres que la cantidad de ésteres volátiles y alcoholes aromáticos que se sintetizan no sobrepasan el umbral de detección de la metodología empleada. Por consiguiente, no podemos comprobar el efecto de nuestra aproximación sobre el perfil aromático de la cepa mutante **FAO10** (*ura3Δgap1Δssy1*).

En segundo lugar, las experiencias realizadas sugieren que el fenotipo caracterizado en la cepa **FAO10** (*ura3Δgap1Δssy1*) sólo se observa en condiciones muy limitantes, esto es medio MCA 100. A medida que el medio es nutricionalmente más complejo el efecto de la modificación se hace menos evidente, dificultándose la interpretación de los resultados (ver descripción de resultados en medio MCA 20). Estos resultados sugieren que presumiblemente, este fenotipo no sería tan manifiesto en condiciones industriales, ya que los medios utilizados son nutricionalmente mucho más complejos.

Finalmente, las cepas analizadas en este estudio presentan graves problemas de crecimiento debido a las modificaciones genéticas que contienen. Esta característica es suficientemente significativa, desde el punto de vista biotecnológico, como para excluir su aplicabilidad a nivel industrial.

CAPÍTULO 3:

APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA DE LAS CEPAS SOBREPDUCTORAS DE ÉSTERES DE ACETATO.

“¿Quién se molestará en producir compuestos cuando puede hacerlo un microbio?...”

J. B. S. Haldane, 1929

“...En biotecnología utilizamos a los microbios y a las células como si fueran fábricas, y a las enzimas como sus trabajadores. Juntos fabrican alimentos, gasolina, medicinas, y un amplio rango de productos cotidianos, con un valor en el mercado de miles de millones de dólares...”

S. Aldridge, 1996

En el capítulo anterior nuestro objetivo se centró en la búsqueda y comprobación de estrategias de ingeniería metabólica que potenciaran la acumulación de ésteres de acetato en el medio con la intención de mejorar el perfil aromático del vino intensificando su aroma afrutado. Sin embargo, la biotecnología de alimentos proporciona también otras aplicaciones de gran interés como la producción a escala industrial de determinadas sustancias actualmente utilizadas en alimentación, producidas a partir de organismos vivos. En este sentido, las nuevas industrias biotecnológicas emplean el trabajo de millones de microorganismos que son usados como una factoría celular para la fabricación a gran escala de compuestos de interés. Desde esta perspectiva, algunas de las estrategias de ingeniería metabólica ensayadas en el capítulo anterior podrían presentarse como procesos alternativos para la

producción a escala industrial de compuestos aromáticos esterificados, en particular la producción de ésteres de acetato. Nos referimos a la estrategia de delección del gen *IAH1* y la de sobreexpresión regulada del gen *ATF1*, puesto que en ambas se produce un aumento de la concentración de estos compuestos en el medio. En principio, cualquiera de estas dos aproximaciones, y también la combinación de ambas, sería una alternativa potencialmente utilizable para la producción a escala industrial de estos compuestos.

En este capítulo se determinará en primer lugar la adecuación biotecnológica de las cepas sobreproductoras de ésteres de acetato para el proceso de vinificación. Para ello se analizará el perfil aromático en condiciones de vinificación empleando aquellas estrategias de ingeniería metabólica que resultaron ser más favorables desde el punto de vista de mejora del aroma afrutado para la obtención de vinos de mayor calidad. En segundo lugar, se analizará la utilidad de las cepas sobreproductoras de ésteres de acetato como factoría celular a nivel de producción industrial, donde la obtención de grandes cantidades de un determinado compuesto a bajo coste, es uno de los factores más relevantes. Para esta segunda aplicación se realizaron dos tipos de aproximaciones. La primera se centrará en la optimización de la estrategia de delección del gen *IAH1*. La segunda en combinar la delección del gen *IAH1* con la sobreexpresión controlada del gen *ATF1*.

1. MEJORA DEL PERFIL AROMÁTICO EN CONDICIONES DE VINIFICACIÓN.

Como se comentó en apartados anteriores los ésteres de acetato, fundamentalmente los acetatos de isoamilo y de 2-feniletilo, son compuestos que ejercen un gran efecto sobre la odorosidad de las bebidas alcohólicas, siendo relevantes para determinar la calidad de estos productos, especialmente la calidad del vino. Por estas razones el objetivo principal de este trabajo fue diseñar varias estrategias de ingeniería metabólica orientadas a mejorar la producción de estos compuestos por la levadura *S. cerevisiae* y determinar cual de ellas

origina un mayor efecto. Una vez establecida la eficiencia de dichas estrategias en condiciones de laboratorio, el siguiente paso fue confirmar si en condiciones de microvinificación se conservaba la eficiencia de aquellas estrategias que resultaron tener un efecto positivo.

1.1. Perfil aromático de la cepa que sobreexpresa el gen *ATF1* en condiciones de microvinificación.

Tras comprobar en el Capítulo 2 la funcionalidad de la estrategia de sobreexpresión del gen *ATF1* en condiciones de laboratorio, se cuantificó el perfil aromático en condiciones de microvinificación de las cepas industriales T73YCplac33 y T73YCpTATF1 (*Tabla I*). La fermentación se llevó a cabo en mosto natural tal y como se describe en el apartado 2.1.3 de Materiales y Métodos. A lo largo del experimento se tomaron muestras a distintos tiempos y cada una de ellas fue analizada por cromatografía de gases. En la *Figura 49* se muestra la medida de DO_{600} , el consumo de azúcares reductores y la producción de etanol de las distintas cepas durante el proceso de microvinificación. Los resultados obtenidos indican que en ambas cepas el crecimiento de las levaduras en el mosto y las velocidades de consumo de glucosa y de producción de etanol son similares. Estos datos sugieren que la modificación genética introducida no altera el proceso fermentativo.

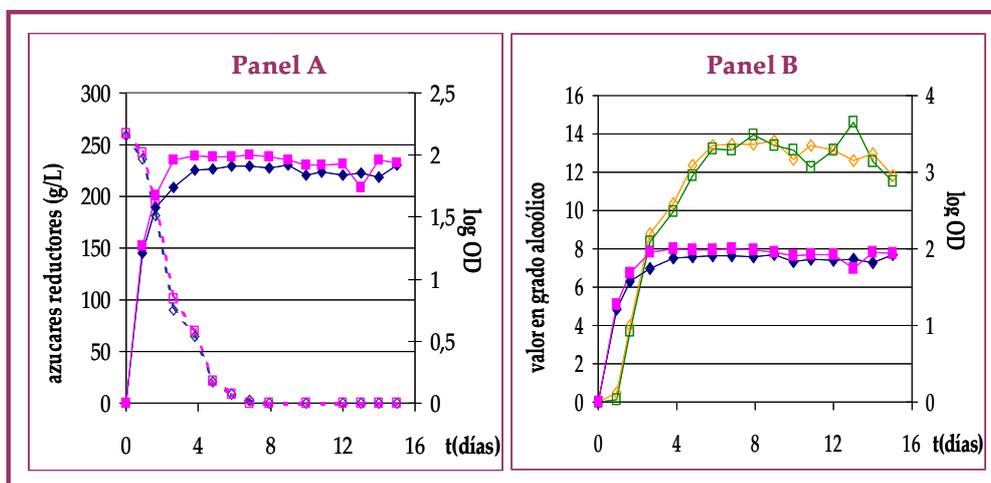


Figura 49. Panel A: Curva de crecimiento en unidades de densidad óptica (línea continua) y consumo de azúcares reductores en unidades de concentración (g/L) (línea discontinua). Cepas ensayadas: T73YCplac33 (□) y T73YCPtATF1 (●). Panel B: Curva de producción de etanol en unidades de grado alcohólico T73YCplac33 (□) y T73YCPtATF1 (●) y curva de crecimiento T73YCplac33 (□) y T73YCPtATF1 (●)

La determinación mediante cromatografía de gases de los ésteres de acetato de isoamilo, de isobutilo, de 2-feniletilo y de hexilo, así como los precursores alcohólicos isoamílico y 2-feniletanol, analizados durante todo el proceso fermentativo se muestran en las *Figura 50* y *51*. Los datos obtenidos indican que la acumulación para todos los ésteres de acetato analizados (*Figura 50* paneles A, B, C y D) fue significativamente mayor en la cepa modificada que en la cepa control. Al igual que ocurría en condiciones de laboratorio la acumulación máxima de estos compuestos se consigue al inicio de la fase estacionaria, cuando más de la mitad de los azúcares reductores han sido consumidos (apartado 2.2. Capítulo 2). Dicho máximo de acumulación se prolongó durante esta fase y comenzó a disminuir en etapas tardías de la fase estacionaria. Al calcular la acumulación relativa, se obtiene que los compuestos que más se acumulan en estas condiciones son el acetato de isoamilo y el acetato de 2-feniletilo (*Tabla 28*).

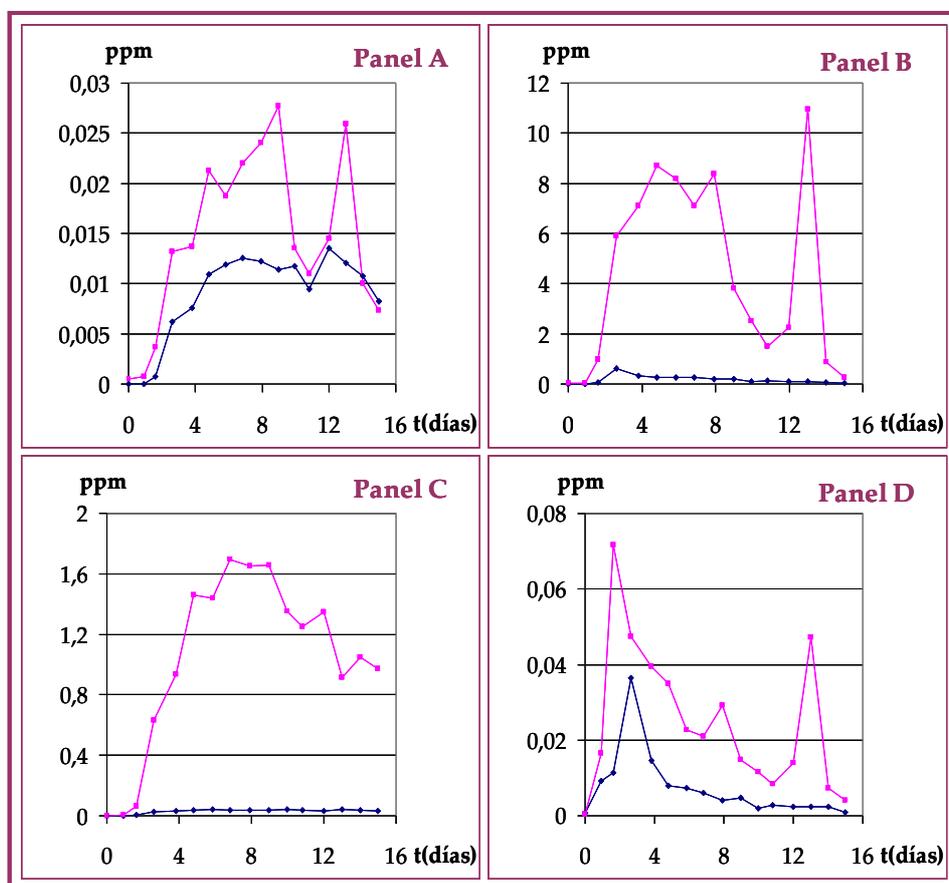


Figura 50. Cinéticas de acumulación de ésteres de acetato en microvinificación de las cepas T73uraYCplac33 (●) y T73uraYCPATF1 (■). Panel A: acetato de isobutilo. Panel B: acetato de isoamilo. Panel C: acetato de 2-feniletilo. Panel D: acetato de hexilo.

Acumulación relativa				
Éster	Días de fermentación			
	5 días	8 días	11 días	15 días
Acetato de Isoamilo	35,5	44,7	12,46	12
Acetato de Isobutilo	1,95	1,96	1,16	0,89
Acetato de 2-Feniletilo	39,8	43,4	32,38	29
Acetato de Hexilo	4,4	7,3	3,11	5,2

Tabla 28. Acumulación relativa de ésteres de acetato a los 5, 8, 11 y 15 días de fermentación (T73uraYCPATF1/T73uraCplac33).

Respecto a la producción de los precursores alcohólicos isoamílico y 2-feniletanol (*Figura 51* paneles A y B), su acumulación aumentó hasta alcanzar un máximo entre los 4 y 5 días de la microvinificación y se mantuvo más o menos constante hasta que concluyó el proceso fermentativo. Además los resultados obtenidos en estas condiciones, indicaron que la cantidad de alcohol isoamílico y de 2-feniletanol acumulada en la cepa modificada fue cuantitativamente menor que en la cepa control (*Tabla 29*). Estos resultados muestran que en condiciones de microvinificación, a diferencia de los datos obtenidos en condiciones de laboratorio (comparar *Tabla 11* apartado 2.2, Capítulo 2 con *Tabla 29*), un aumento de la producción de compuesto esterificado (*Tabla 28*) se refleja en una disminución de la cantidad de precursor alcohólico (*Tabla 29*).

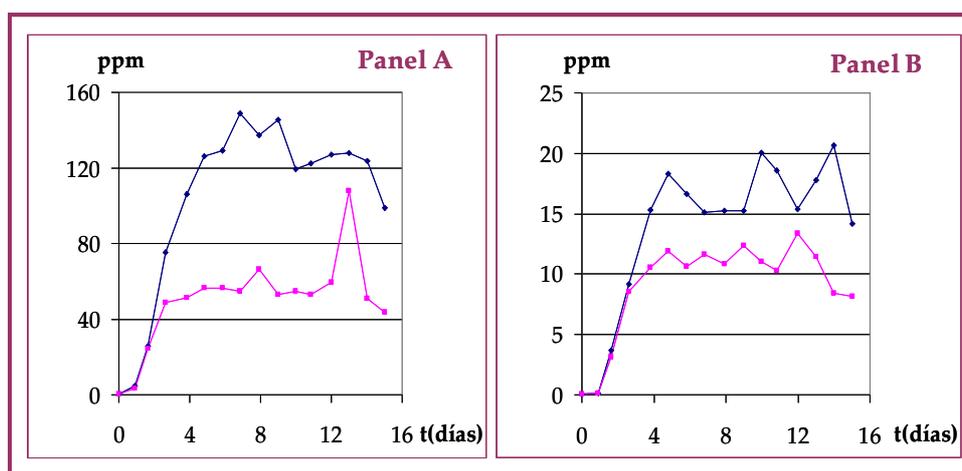


Figura 51: Cinéticas de acumulación de alcoholes aromáticos en microvinificación de las cepas T73uraYCplac33 () y T73uraYCPtATF1 (). Panel A: alcohol isoamílico. Panel B: 2-feniletanol.

Acumulación relativa				
Alcohol	Días de fermentación			
	5 días	8 días	11 días	15 días
Isoamílico	0,45	0,48	0,43	0,44
2-Feniletanol	0,65	0,7	0,55	0,58

Tabla 29: Acumulación relativa de alcoholes aromáticos a los 5, 8, 11 y 15 días de fermentación.

Atendiendo a los resultados obtenidos en este apartado podemos concluir que:

1. La sobreexpresión del gen *ATF1* bajo el control del promotor del gen *TDH3* es una estrategia de ingeniería metabólica eficaz ya que la cantidad de compuestos acumulados en la cepa sobreexpresante es significativamente mayor que en la cepa control (*Figura 50* y *Tabla 28*).
2. Dicha estrategia permite una mayor producción de todos los ésteres de acetato en general y potencia la síntesis de aquellos ésteres que, desde un punto de vista enológico, son de mayor relevancia, estos son acetato de isoamilo y de 2-feniletilo. Además, al obtenerse en estas condiciones un acumulo mayor en etapas tempranas de la fase estacionaria que en condiciones de laboratorio, los niveles de acumulación aumentados se mantienen durante un largo período en dicha fase, al menos en las condiciones ensayadas (comparar *Figura 50* y *Figura 30* apartado 2.2., Capítulo 2).
3. Los datos obtenidos sugieren que el factor limitante de la síntesis de compuestos esterificados no es la disponibilidad de precursores alcohólicos aromáticos sino que debe depender de los mecanismos de regulación transcripcional y/o post-traducciona que controlan la actividad enzimática AATasa.

1.2. Perfil aromático de la cepa carente del gen *IAH1* en condiciones de microvinificación.

Para comprobar el perfil aromático de los mutantes en el gen *IAH1* en condiciones de microvinificación se utilizaron las cepas T73uraleu y T73Δiah1, previa complementación auxotrofías *ura3* y *leu2* para recuperar la capacidad de fermentar el mosto natural a vino. Dicha capacidad está seriamente afectada en los mutantes auxótrofos. La metodología utilizada para la complementación auxotrofica se basó en la técnica de **SFH** descrita en el apartado 2.3. de Materiales y Métodos. En este caso, se amplificó por PCR el gen *URA3* y *LEU2* y el

fragmento de DNA obtenido se utilizó para transformar las cepas T73iah1 y T73 Δ iah1, primero con el fragmento correspondiente al gen *URA3* y posteriormente con el fragmento del gen *LEU2*.

Con las cepas complementadas T73URALEU y T73 Δ iah1URALEU se realizó un cultivo en mosto natural de la variedad Bobal tal y como se describe en el apartado 2.1.3. de Materiales y Métodos. A lo largo del experimento se tomaron muestras a distintos tiempos y cada una de ellas fue analizada por cromatografía de gases. En la *Figura 52* se muestra la medida de DO_{600} y el consumo de azúcares reductores de las distintas cepas analizadas durante la fermentación como indicadores del progreso de la fermentación. Los valores alcanzados respecto a estos dos parámetros fueron similares en ambos casos, por lo que la delección del gen *IAH1* no afectó al proceso fermentativo.

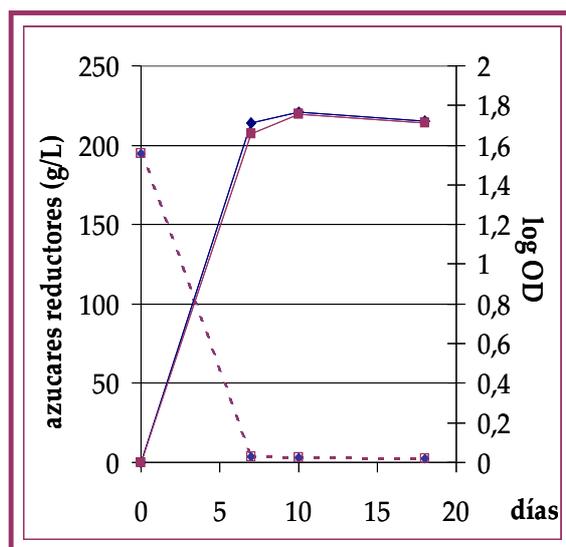


Figura 52: Crecimiento celular medido en unidades de DO_{600} (línea continua) y consumo de azúcares reductores (línea discontinua) durante la fermentación. Cepas ensayadas: control T73LEU2URA3 (○), mutante T73 Δ iah1LEU2URA3 (□).

La cuantificación mediante GC de los ésteres de acetato y sus correspondientes precursores alcohólicos analizados a los siete y dieciocho días del proceso fermentativo se presenta en la *Tablas 30 y 31*.

Ésteres	T73LEU2URA3		T73Δ iah1LEU2URA3	
	7 días	18 días	7 días	18 días
Acetato de Isoamilo	0,909	0,141	1,136	0,285
Acetato de Isobutilo	0,0212	0,0029	0,0296	0,0059
Acetato de Etilo	53,40	6,51	57,98	14,80
Acetato de 2-Feniletilo	0,403	0,279	0,498	0,269
Acetato de Hexilo	0,0192	0,0032	0,0230	0,0061

Tabla 30. Acumulación de ésteres de acetato en ppm a los 7 y 18 días de fermentación. Cepas ensayadas: control T73LEU2URA3 y mutante T73Δ iah1LEU2URA3.

Como se puede observar en la *Tabla 30* la cantidad de ésteres de acetato acumulados en la cepa mutante a los siete días de la fermentación fue similar a la alcanzada en la cepa de referencia. Por el contrario, a los dieciocho días de fermentación la concentración final para los acetatos de isoamilo, isobutilo, etilo y hexilo en la cepa mutante fue aproximadamente el doble que en la cepa control (*Tabla 31*). Sin embargo, para el acetato de 2-feniletilo la producción en ambas cepas se mantuvo constante (*Tablas 30 y 31*). Por consiguiente, en condiciones de microvinificación, **Iah1p** es susceptible de hidrolizar acetato de isoamilo, de isobutilo, de etilo y de hexilo a tiempos tardíos del proceso fermentativo.

Acumulación relativa		
Ésteres	T73Δiah1LEU2URA3	
	7d	18d
Acetato de Isoamilo	1,25	2,02
Acetato de Isobutilo	1,4	2,03
Acetato de Etilo	1,08	2,27
Acetato de 2-Feniletilo	1,24	0,96
Acetato de Hexilo	1,20	1,91

Tabla 31: Acumulación relativa de ésteres de acetato a los 7 y 18 días de fermentación. (T73Δiah1LEU2URA3/T73LEU2URA3).

En cuanto a los precursores alcohólicos, los resultados indicaron que la cantidad acumulada en ambas cepas se mantuvo constante durante todo el proceso fermentativo (*Tabla 32*)

Alcohol	T73LEU2URA3		T73Δiah1LEU2URA3	
	7 días	18 días	7 días	18 días
Isoamílico	321,37	254,29	344,42	274,44
Isobutanol	66,67	43,90	67,75	49,13
2-Feniletanol	56,43	48,70	53,63	49,60
1-Hexanol	0,650	0,567	0,796	0,620

Tabla 32: Acumulación de precursores alcohólicos en ppm a los 7 y 18 días de fermentación. Cepas ensayadas: control T73LEU2URA3 y mutante T73Δiah1LEU2URA3.

El análisis de los resultados obtenidos en este apartado se resume en la **Tabla 31** y permite extraer las siguientes conclusiones:

1. **Iah1p** hidroliza específicamente acetato de isoamilo, de isobutilo, de etilo, y de hexilo. Su ausencia produce acumulaciones relativas similares para todos ellos (*Tabla 31*). Además cabe destacar que en condiciones de vinificación, la especificidad por sustrato es más amplia que en condiciones de laboratorio, donde la carencia de actividad **Iah1p** no tiene efecto sobre los niveles de acetato de etilo y de hexilo (*Figura 34* apartado 3.2 del Capítulo 2) Posiblemente, la ausencia de efecto sea un problema de cantidad éster de acetato disponible para ser hidrolizado ya que en condiciones de vinificación la concentración de estos compuestos es aproximadamente 10 veces superior que en condiciones de laboratorio. Por ello se podría afirmar que en la cepa industrial la proteína **Iah1p** presenta distintos grados de afinidad por sustrato, siendo mayor la afinidad para acetato de isoamilo y de isobutilo que la afinidad para acetato de etilo y/o de hexilo.
2. La enzima **Iah1p** no hidroliza acetato de 2-feniletilo. Independientemente de las condiciones ensayadas, microvinificación (*Tablas 30 y 31*) o medio rico YPD (*Figura 34 y Tabla 12*, apartado 3.2, Capítulo 2), la cepa genéticamente modificada acumula la misma cantidad de compuesto que la cepa de referencia.
3. Los efectos de la delección del gen **IAH1** en cepa industrial sólo son detectables en etapas tardías del proceso fermentativo (*Tabla 30* comparar las concentraciones alcanzadas a los siete y a los dieciocho días), al igual que ocurría en condiciones de laboratorio (*Figura 34* y apartado 3.3, Capítulo 2).
4. Aunque la delección del gen **IAH1** permite acumular más cantidad de ésteres de acetato en el mosto fermentado, la eficiencia de esta estrategia no es elevada ya que sólo consigue duplicar la cantidad de estos compuestos (*Tabla 31*).

2. ESTUDIO DE LA UTILIDAD DE LAS CEPAS SOBREPDUCTORAS DE ÉSTERES DE ACETATO COMO FACTORÍAS CELULARES.

Como se apuntó en el Capítulo 2 y en el apartado anterior, las estrategias con las que se consiguió producir una mayor cantidad de ésteres de acetato, fundamentalmente acetato de isoamilo y de 2-feniletilo, fueron las relacionadas con la estrategia de sobreexpresión regulada del gen *ATF1* (*Figura 30* y *Tablas 10* apartado 2.2, Capítulo 2; *Figura 50*, *Tabla 28* apartado 1.1, Capítulo 3) y la estrategia de delección del gen *IAH1* (*Figura 34* y *Tabla 12* apartado 3.2., Capítulo 2; *Tabla XXIII* apartado 1.2, Capítulo 3). De entre éstas dos la menos eficaz resultó ser la estrategia de delección puesto que el incremento que se obtiene en la cepa modificada no es cuantitativamente muy elevado respecto al obtenido en la cepa control (*Tabla 12* apartado 3.2. Capítulo 2; *Tablas 30* a *32*, apartado 1.2. Capítulo 3). Estos resultados indicaron que para la sobreproducción, la estrategia de sobreexpresión sería la más adecuada. No obstante, ambas podrían mejorarse en el supuesto de encontrar una forma de optimizarlas.

Con la finalidad de optimizar la producción de ésteres de acetato en las cepas genéticamente modificadas se ensayaron diferentes condiciones de crecimiento en base a la información disponible en la bibliografía sobre la regulación transcripcional y/o enzimática de la actividad *Atf1p*, principal responsable de la síntesis de los ésteres de acetato de interés (Lambrechts y Pretorius, 2000; Verstrepn *et al.*, 2003a, 2003b, 2003c, Capítulo 1 de este trabajo). Se sabe que la biosíntesis de estos compuestos deriva directamente de la actividad enzimática AATasa y que la actividad total para este enzima parece ser dependiente de la expresión de los genes *ATF*, (Yoshioka y Hashimoto, 1981 y 1984, y Malcorps *et al.*, 1991, Capítulo 2 apartado 2.2). También se conoce que la expresión del gen *ATF1* está reprimida por la presencia de oxígeno (Fujii *et al.*, 1997, Fujiwara *et al.*, 1999) y que los niveles de mRNA de dicho gen varían dependiendo de las características nutricionales del medio, esto es, de la disponibilidad de compuestos nitrogenados (Fujiwara *et al.*, 1999) y de la cantidad y tipo de fuente de carbono (Pollock y Weir 1975; Dufour *et al.*, 2003; Verstrepn *et al.*, 2003c). Además, en lo concerniente al mecanismo de

hidrólisis, tanto nuestros resultados (apartado 2.4 del Capítulo 2) como los de otros autores (Fukuda *et al.*, 1998a y 1998b) demuestran que la ausencia de la enzima **Iah1p** promueve un incremento de la producción de ésteres de acetato y que dicha acumulación depende del balance de ambas actividades enzimáticas.

Por todo ello se puede postular que la cantidad de ésteres de acetato acumulados podría incrementarse combinando ambas estrategias o modificando algunas condiciones, como por ejemplo limitar la cantidad de oxígeno disuelto y/o variando la concentración de fuente de carbono disponible en el medio de cultivo.

2.1. Estrategia optimizada de delección del gen **IAH1**: Análisis del perfil aromático en condiciones de laboratorio con limitación de oxígeno.

Para comprobar el efecto de la limitación de oxígeno disuelto en la estrategia de delección del gen **IAH1**, se realizó un cultivo de las cepas T73uraleu, T73iah1 y T73Δiah1 durante 72 h en medio rico YPD a una temperatura de 30 °C con agitación y sin agitación. A lo largo del experimento se tomaron muestras a distintos tiempos y cada una de ellas fue analizada por cromatografía de gases. La evolución y comportamiento del crecimiento se comprobó por cuantificación de azúcares reductores y DO₆₀₀. En la **Figura 53** se representa la cinética de crecimiento y el consumo de azúcares reductores de las distintas cepas analizadas en ausencia de agitación y, como se puede observar, no se aprecian diferencias entre la cepa control y los distintos mutantes.

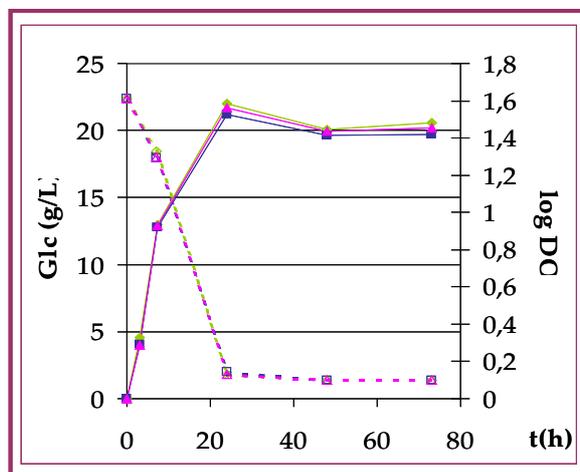


Figura 53. Curva de crecimiento (línea continua) y consumo de azúcares reductores (línea punteada), de las cepas T73uraleu (\square), T73iah1 (\circ) y T73 Δ iah1 (\diamond) en ausencia de agitación.

La cuantificación mediante GC de los ésteres de acetato analizados en condiciones de ausencia de agitación en el transcurso de la cinética y a tiempo final del crecimiento celular se muestra en la *Figura 54* y en la *Tabla 33*.

Los resultados obtenidos muestran que la acumulación de todos los ésteres de acetato analizados sigue una tendencia a saturación, donde el máximo de concentración se alcanza a las 24 h y se mantiene más o menos constante hasta las 48 h del crecimiento celular. Posteriormente, la cantidad de compuesto acumulado disminuye a tiempos finales del experimento (*Figura 54*, paneles A, B, C, D y E). En estas gráficas observamos también que en todas las cepas ensayadas tanto modificadas (T73iah1 y T73 Δ iah1) como de referencia (T73uraleu), se obtienen cantidades similares de compuesto acumulado (*Figura 54* y *Tabla 33*).

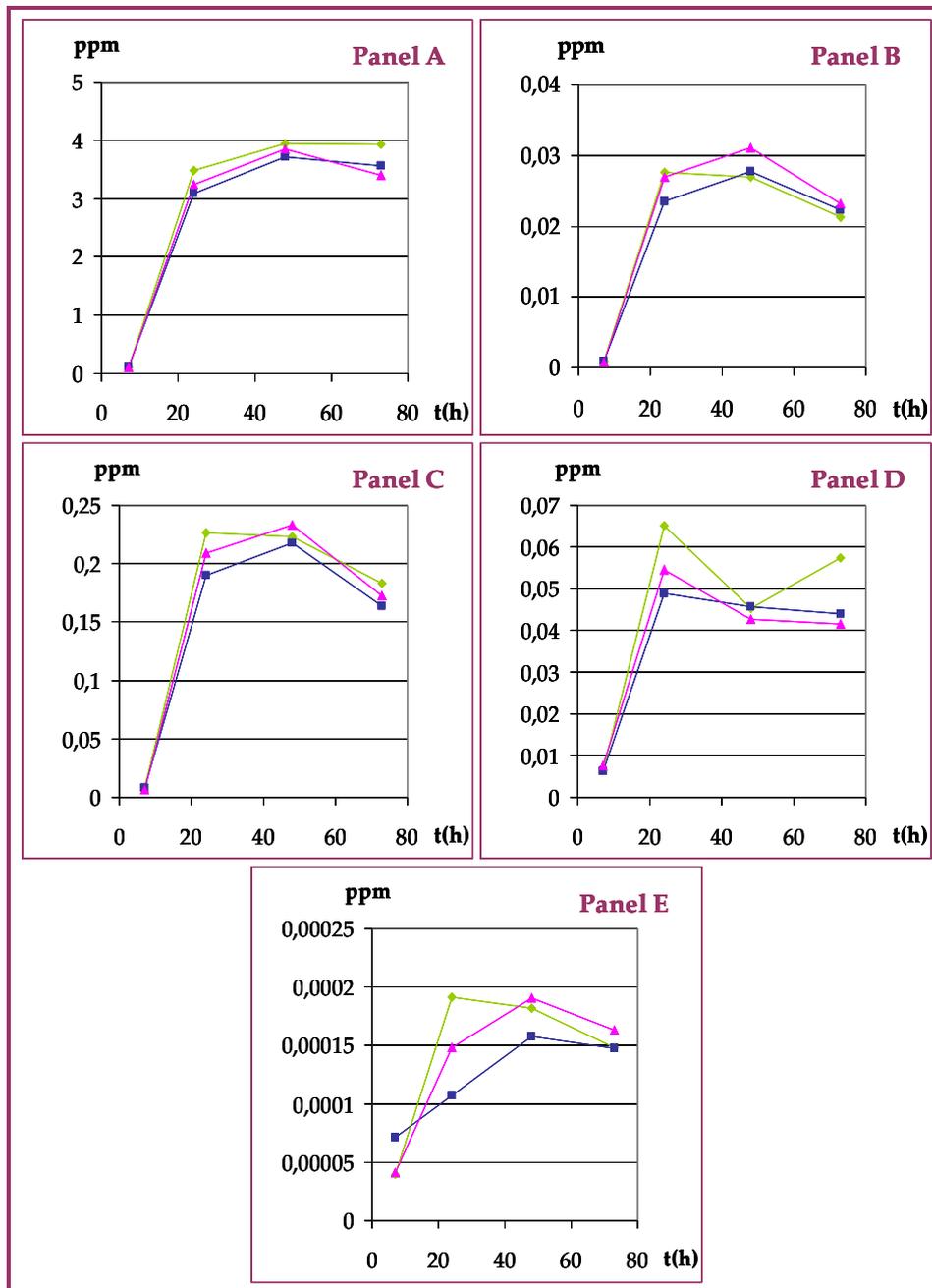


Figura 47: Cinéticas de acumulación de ésteres volátiles en ausencia de agitación. Cepas ensayadas: T73uraleu (○), T73iah1 (□) y T73Δiah1 (△). Panel A: acetato de etilo. Panel B: acetato de isobutilo. Panel C: acetato de isoamilo. Panel D: acetato de 2-feniletilo. Panel E: acetato de hexilo.

Acumulación en el medio (ppm)			
Éster	T73uraleu	T73iah1	T73Δiah1
Acetato de Isoamilo	0,1832	0,1637	0,1727
Acetato de Isobutilo	0,0213	0,0223	0,0231
Acetato de Etilo	3,93	3,56	3,40
Acetato de 2-Feniletilo	0,0573	0,0441	0,0415
Acetato de Hexilo	0,000148	0,000147	0,000163

Tabla 33: Acumulación de ésteres volátiles a tiempo final (72 h de crecimiento) de la cepa control T73uraleu y los mutantes T73iah1, T73Δiah1 en condiciones de ausencia de agitación

Respecto a la acumulación de los precursores alcohólicos, en todas las cepas se consigue acumular la misma cantidad de compuesto (*Tabla 34*).

Por todo ello podemos concluir que la limitación de oxígeno en condiciones de laboratorio no supone un incremento de la cantidad de ésteres de acetato acumulados en las cepas carentes del gen *IAH1*. No obstante, al comparar la cantidad de compuesto acumulada en condiciones de agitación, donde si que se observa un efecto de la delección (*Tabla 12* apartado 3.2., Capítulo 2) y condiciones de falta de agitación, podemos observar que a excepción del acetato de hexilo, la acumulación de ésteres de acetato en las tres cepas es significativamente mayor en estas últimas condiciones, aunque no existan diferencias entre las cepas modificadas y la cepa de referencia (*Tabla 34*).

A: Acumulación en el medio (ppm)						
Éster	T73uraleu		T73iah1		T73Δiah1	
	Agitación	No Agitación	Agitación	No Agitación	Agitación	No Agitación
Acetato de Isoamilo	0,0123	0,1832	0,0257	0,1637	0,0385	0,1727
Acetato de Isobutilo	0,0018	0,0213	0,0039	0,0223	0,0060	0,0231
Acetato de Etilo	1,93	3,93	2,99	3,56	3,00	3,40
Acetato de 2-Feniletilo	0,0200	0,0573	0,0323	0,0441	0,0257	0,0415
Acetato de Hexilo	0,00029	0,00015	0,00039	0,00015	0,00037	0,00016

B: Acumulación en el medio (ppm)						
Alcohol	T73uraleu		T73iah1		T73Δiah1	
	Agitación	No Agitación	Agitación	No Agitación	Agitación	No Agitación
Isoamilico	56,80	38,24	56,91	35,41	55,13	34,95
Isobutanol	19,48	24,69	22,26	23,23	21,42	21,91
2-Feniletanol	36,91	2,78	39,16	3,43	28,71	4,18
1-Hexanol	0,0142	0,0091	0,0152	0,0140	0,0168	0,0135

Tabla 34: Acumulación de compuestos a tiempo final (72 h de crecimiento) en condiciones de laboratorio de la cepa control T73uraleu y los mutantes T73iah1 y T73Δiah1. Condiciones ensayadas agitación (200 rpm), limitación de oxígeno (no agitación). A: Ésteres de acetato. B: Alcoholes aromáticos.

Estos datos confirman que en condiciones de limitación de oxígeno la cantidad de éteres de acetato acumulado aumenta (comparar columnas agitación-no agitación en la *Tabla 34*), probablemente debido a una mayor actividad AATasa en esas condiciones tal y como se indica en la literatura (Fujii *et al.*, 1997; Fujiwara *et al.*, 1999). También sugieren que a pesar de ser éstas condiciones las más favorables para la síntesis de estos compuestos, los distintos mutantes, T73iah1 y T73Δiah1 acumulan la misma cantidad de compuestos esterificados que la cepa control T73uraleu, sugiriendo que la delección total o parcial del gen *IAH1* no aporta ninguna ventaja en la producción de ésteres de acetato en condiciones de falta de aireación. Dos posibles hipótesis explicarían estos resultados.

En primer lugar, es posible que la actividad éster hidrolasa **Iah1p** no sea suficientemente activa en la cepa T73uraleu en condiciones de limitación de oxígeno (Mauricio *et al.*, 1993; Inoue *et al.*, 1997), por lo que el efecto de la delección sería inapreciable. En segundo lugar, puede que otra u otras éster hidrolasas compensen la ausencia de **Iah1p** cuando la cantidad de oxígeno es limitada (Whormann y Lange, 1980), en cuyo caso aunque la levadura sintetice más cantidad de compuesto, la velocidad de degradación se ajustaría a las condiciones establecidas y por tanto, no se observarían cambios de la concentración final en el medio para estos compuestos.

En cualquier caso podemos concluir que la estrategia de delección del gen *IAH1* no sería una alternativa suficientemente eficaz para la aplicación biotecnológica orientada a la producción industrial de ésteres de acetato, ya que el aumento en la cantidad de compuesto producido que se obtiene no es muy elevada.

2.2. Estrategia combinada: sobreexpresión del gen *ATF1* y delección del gen *IAH1*. Análisis del perfil aromático en condiciones de laboratorio a distintas concentraciones de glucosa.

Los resultados obtenidos en el apartado 2 del Capítulo 2 permiten concluir que la sobreexpresión regulada por el promotor *TDH3* del gen *ATF1* produce sobreacumulación de ésteres de acetato

cuantitativamente importantes. Por ejemplo, en el caso del acetato de isoamilo se consigue incrementar su concentración en el medio del orden de cincuenta veces la concentración de la cepa control (ver *Tabla 10*, apartado 2.2, Capítulo 2). Estos datos sugieren que la sobreexpresión del gen *ATF1* podría ser una potente estrategia para la producción biotecnológica de ésteres de acetato.

No obstante, dado que nuestro propósito en este apartado fue utilizar a la levadura como una factoría celular para conseguir la máxima producción de estas sustancias en el medio, decidimos desarrollar una nueva aproximación que combinara la sobreexpresión regulada del gen *ATF1* con la delección del gen *IAH1*. La finalidad de esta aproximación era comprobar el efecto producido sobre la acumulación de ésteres de acetato cuando la célula tiene una gran capacidad de actividad de síntesis y, simultáneamente, carece de la actividad éster hidrolasa. Para determinar la eficacia de esta aproximación se utilizaron tanto cepas de laboratorio, derivadas de la cepa BY4741, como cepas industriales derivadas de la cepa T73. En ambos casos se usó la correspondiente cepa genéticamente modificada carente del gen *IAH1* transformada con el plásmido YCplac33 vacío como control y la cepa carente del gen *IAH1* transformada con el plásmido YCplac33 portador del gen *ATF1* bajo el control del promotor del gen *TDH3*. Todas las cepas se cultivaron en cuatro condiciones distintas:

Medio YPD con glucosa al 2% y con agitación.

Medio YPD con glucosa al 2% y sin agitación.

Medio YPD con glucosa al 10% y con agitación.

Medio YPD con glucosa al 10% y sin agitación.

En el transcurso de los experimentos se tomaron muestras a distintos tiempos y cada una de ellas fue analizada por GC. La evolución y comportamiento del crecimiento se comprobó por cuantificación de azúcares reductores y medida de la DO_{600} .

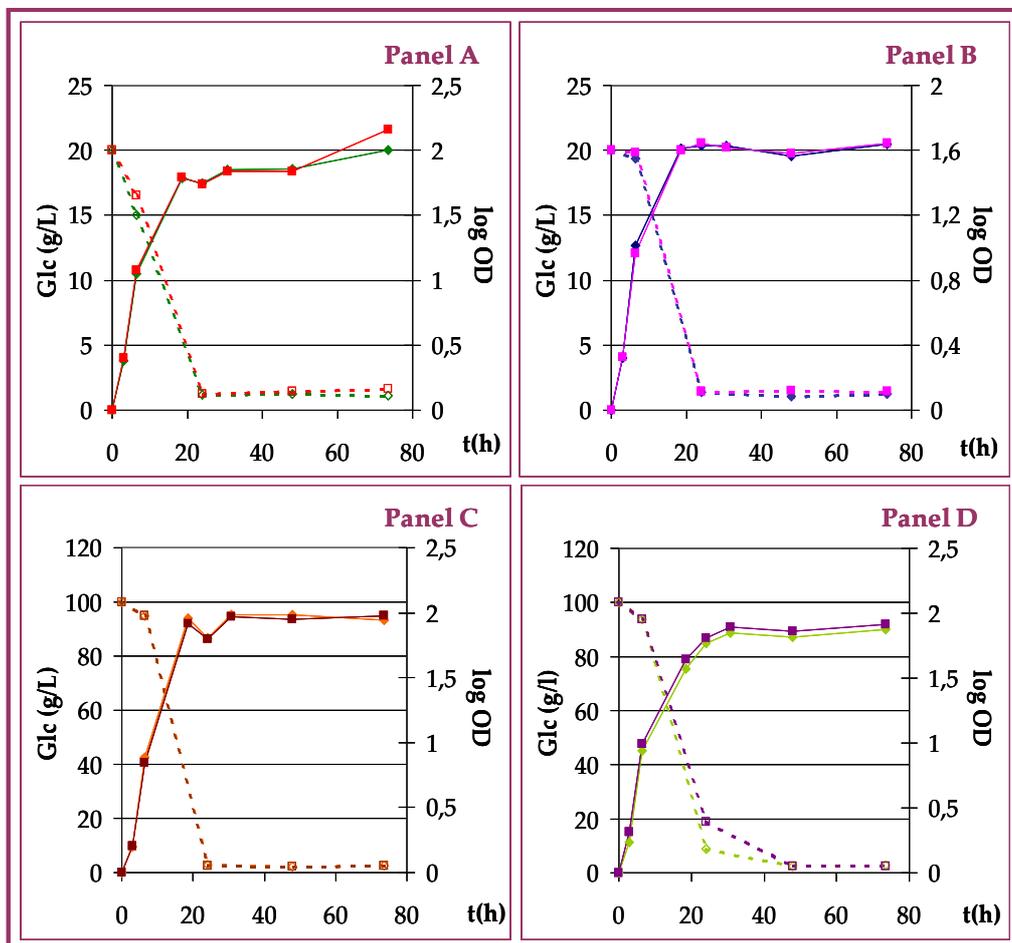


Figura 55: Curva de crecimiento (línea continua) y consumo de azúcares reductores (línea punteada). Cepas ensayadas: control 4741Δiah1-YCplac33 (□) y modificada 4741Δiah1-YCpTATF1 (○). Panel A: Glucosa 2%, agitación (○). Panel B: Glucosa 2% no agitación (○). Panel C: Glucosa 10% agitación (○). Panel D: Glucosa 10% no agitación (○).

En la *Figura 55* se representa la cinética de crecimiento y el consumo de azúcares reductores de las cepas de laboratorio BY4741Δiah1-YCp33 y BY4741Δiah1-TATF1 en las distintas condiciones. Como se puede observar en los distintos paneles, la cepa modificada, BY4741Δ

iah1-YCpTATF1, mantiene la misma velocidad de crecimiento y de consumo de azúcares que la cepa control, BY4741 Δ iah1-YCplac33.

La cuantificación mediante GC de los ésteres de acetato analizados en a lo largo de los distintos crecimientos se muestra en las *Figuras 56*, a 60 y en las *Tablas 35* a 38.

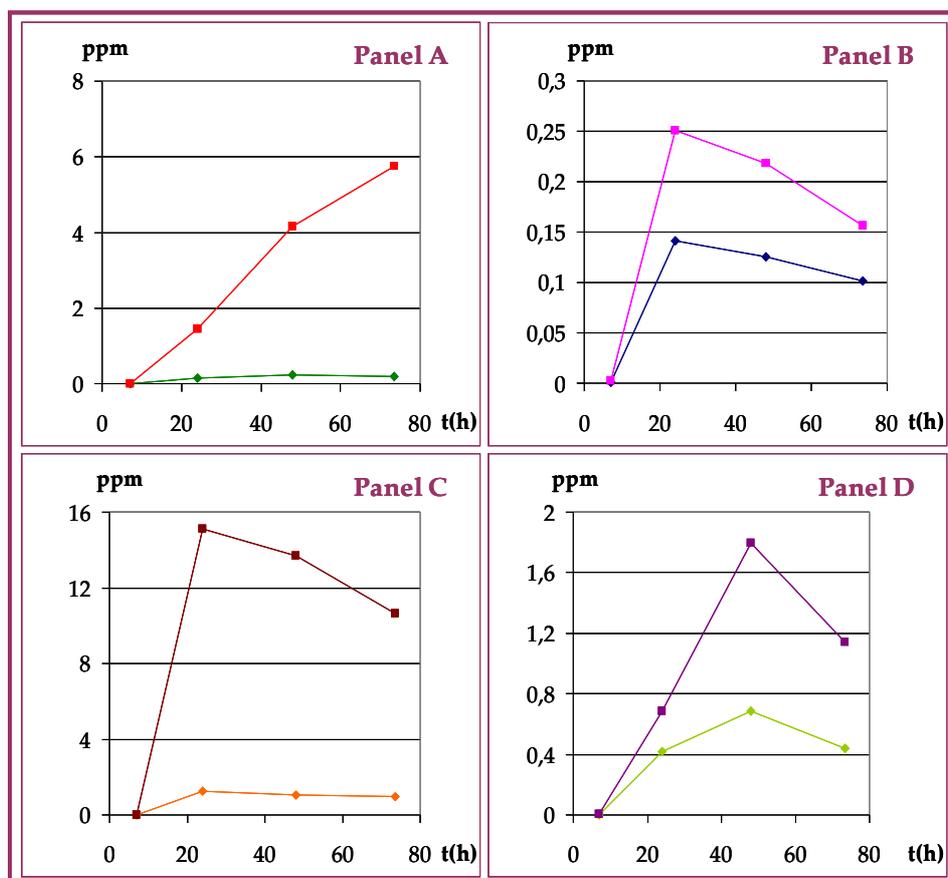


Figura 56: Acumulación de acetato de isoamilo de las cepas control BY4741 Δ iah1-YCplac33 (.) y modificada BY4741 Δ iah1-YCpTATF1 (■). Panel A: Glucosa 2%, agitación (■). Panel B: Glucosa 2% no agitación (■). Panel C: Glucosa 10% agitación (■). Panel D: Glucosa 10% no agitación (■).

Acumulación relativa a tiempo final				
Acetato de Isoamilo	Agitación		No Agitación	
	2%	10%	2%	10%
	30,40	11,21	1,54	2,58

Tabla 35: Acumulación relativa de acetato de isoamilo a tiempo final, 72 h de crecimiento. (acumulación cepa BY4741 Δ iah1-YCpTATF1/acumulación cepa BY4741 Δ iah1-YCplac33).

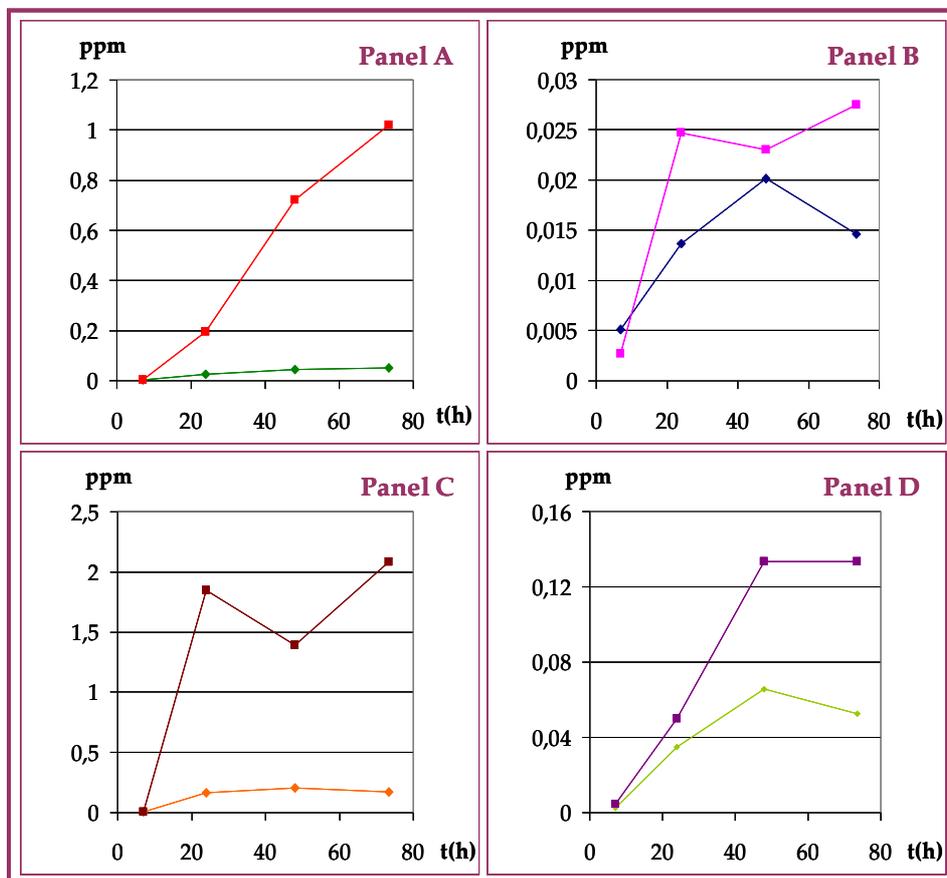


Figura 57: Acumulación de acetato de 2-feniletilo de las cepas control BY4741 Δ iah1-YCplac33 (●) y modificada BY4741 Δ iah1-YCpTATF1 (□). Panel A: Glucosa 2% agitación (●, □). Panel B: Glucosa 2% no agitación (●, □). Panel C: Glucosa 10% agitación (●, □). Panel D: Glucosa 10% no agitación (●, □).

Acumulación relativa a tiempo final				
Acetato de 2-Feniletilo	Agitación		No Agitación	
	2%	10%	2%	10%
	28,25	12,27	1,63	2,54

Tabla 36: Acumulación relativa de acetato de 2-feniletilo a tiempo final, 72 h de crecimiento. (acumulación cepa BY4741 Δ iah1-YCpTATF1/acumulación cepa BY4741 Δ iah1-YCplac33).

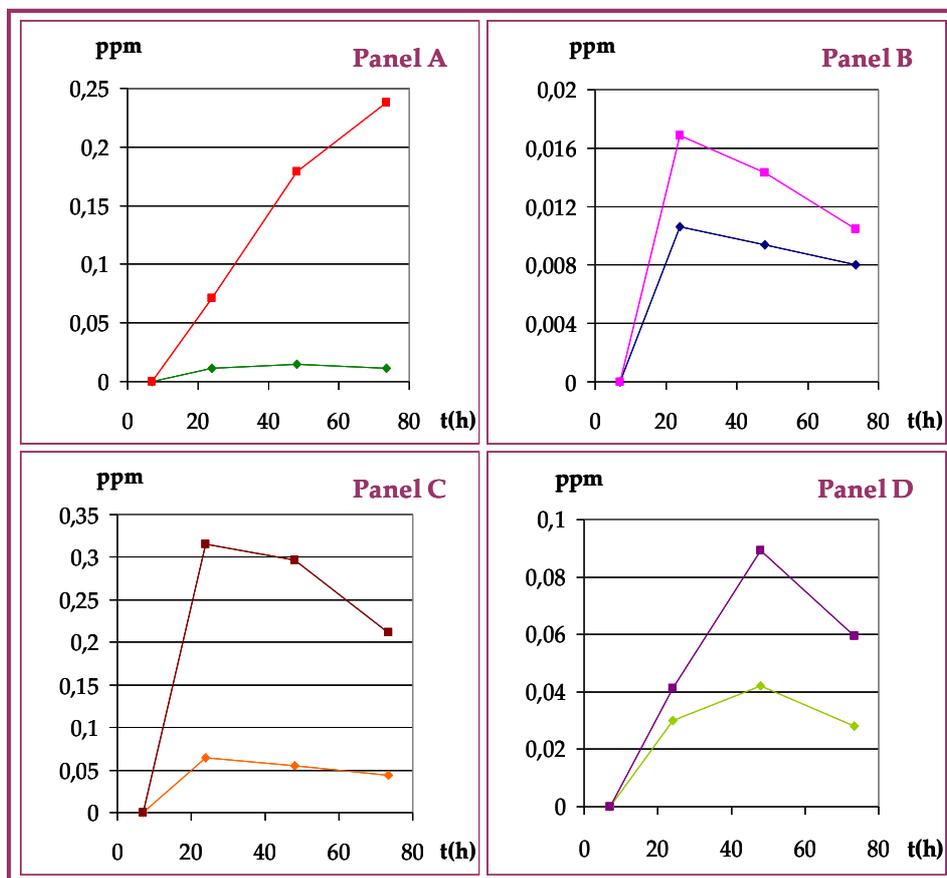


Figura 58: Acumulación de acetato de isobutilo de las cepas control 4741 Δ iah1-YCplac33 (○) y modificada 4741 Δ iah1-YCpTATF1 (◼). Panel A: Glucosa 2%, agitación (○, ◼). Panel B: Glucosa 2% no agitación (○, ◼). Panel C: Glucosa 10% agitación (○, ◼). Panel D: Glucosa 10% no agitación (○, ◼).

Acumulación relativa a tiempo final				
Acetato de Isobutilo	Agitación		No Agitación	
	2%	10%	2%	10%
	20,71	9,21	1,30	2,12

Tabla 37: Acumulación relativa de acetato de isobutilo a tiempo final, 72 h de crecimiento. (acumulación cepa 4741 Δ iah1-YCpTATF1 /acumulación cepa 4741 Δ iah1-YCplac33).

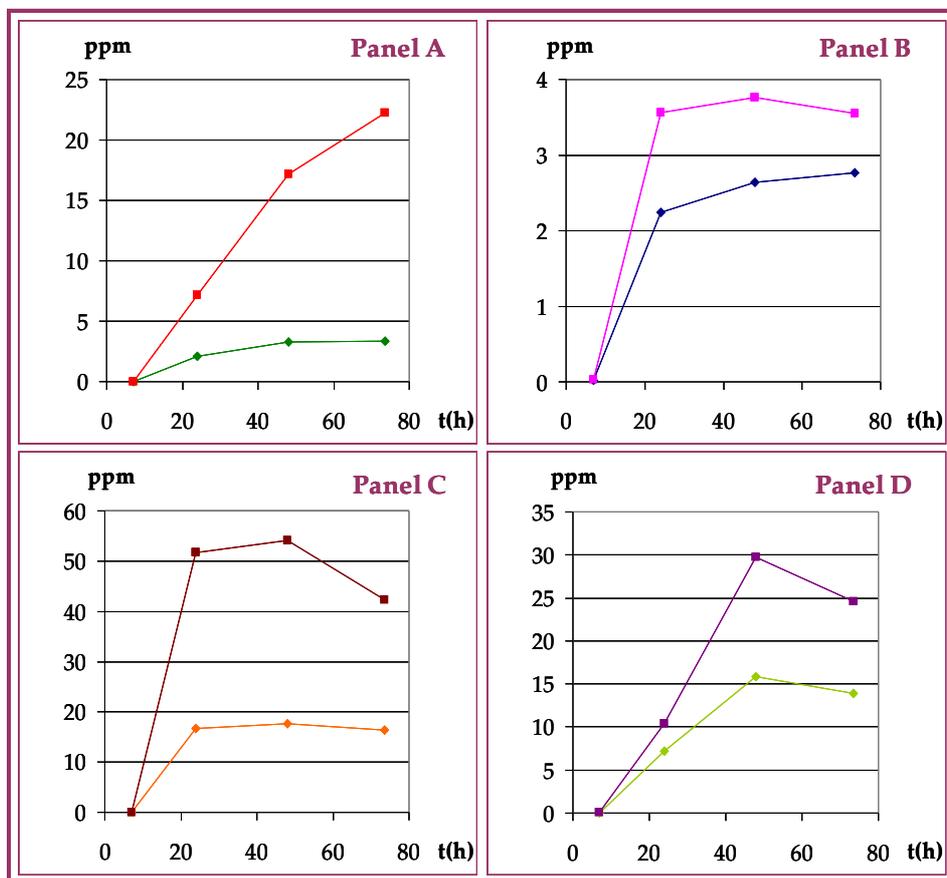


Figura 59. Acumulación de acetato de etilo de las cepas control 4741 Δ iah1-YCplac33 () y modificada 4741 Δ iah1-YCpTATF1 (). Panel A: Glucosa 2%, agitación (). Panel B: Glucosa 2% no agitación (). Panel C: Glucosa 10% agitación (). Panel D: Glucosa 10% no agitación ().

Acumulación relativa a tiempo final				
Acetato de Etilo	Agitación		No Agitación	
	2%	10%	2%	10%
	6,68	3,86	1,28	1,77

Tabla 38: Acumulación relativa de acetato de etilo a tiempo final, 72 h de crecimiento.
(acumulación cepa BY4741 Δ iah1-YCpTATF1/acumulación cepa BY4741 Δ iah1-YCp Δ lac33).

Los datos muestran que la acumulación de todos los ésteres de acetato analizados en las distintas condiciones de ensayo es mayor en la cepa 4741 Δ iah1-YCpTATF1 que en la cepa 4741 Δ iah1-YCp Δ lac33. También indican que dependiendo de las condiciones ensayadas el perfil de producción varía. Así por ejemplo, para el caso del acetato de isoamilo (*Figura 56*), al igual que para el resto de acetatos (*Figuras 57 a 59*) se observa que en condiciones de agitación en glucosa al 10% (ver paneles C) y condiciones de no agitación en glucosa al 2% y 10% (ver paneles B y D), dicho perfil sigue una tendencia a saturación donde el máximo de concentración se alcanza a las 24 h del crecimiento. Seguidamente, en etapas tardías, la producción se mantiene más o menos constante y finalmente disminuye a las 72 h de iniciado el crecimiento (paneles B, C y D). Sin embargo, en condiciones de agitación y al 2% de glucosa, la cantidad de compuesto producido en el transcurso del ensayo sigue una cinética ascendente sin llegar a la saturación (panel A).

Por todo lo expuesto se concluye que:

1. Independientemente de las condiciones de ensayo, y para todos los compuestos analizados, la cepa modificada, 4741 Δ iah1-YCpTATF1 produce una mayor cantidad de compuesto que la cepa control 4741 Δ iah1-YCp33 (*Figuras 56 a 59*).
2. Dependiendo de las condiciones de ensayo la acumulación relativa varía en función del compuesto analizado. En condiciones de falta

agitación e independientemente de la cantidad de glucosa, los valores de acumulación relativa son similares para todos los compuestos analizados (comparar *Tablas 35 a 38*). Sin embargo, en condiciones de agitación la acumulación relativa varía en función del compuesto. Para los acetatos de isoamilo y de 2-feniletilo la acumulación relativa es similar (*Tablas 35 y 36*), para el acetato de isobutilo la acumulación relativa es ligeramente menor (*Tabla 37*) y mucho menor para el acetato de etilo (*Tabla 38*). Estos resultados sugieren que la estrategia combinada, al menos en cepa de laboratorio, favorece selectivamente y por este orden la producción de acetato de isoamilo, de 2-feniletilo, de isobutilo y de etilo.

3. Los resultados obtenidos indican que las cantidades absolutas para todos los compuestos acumulados en condiciones de agitación son mayores que en condiciones de falta agitación (comparar paneles A-B, C-D *Figuras 49, 50, 51 y 52*) y que en glucosa al 10% se alcanzan valores absolutos de compuesto acumulado superiores al caso del crecimiento al 2% (comparar paneles A-C, B-D *Figuras 56, y 59*). Por tanto, podríamos concluir que las condiciones de máxima producción para estos compuestos en valores absolutos serían condiciones de agitación y una concentración de glucosa al 10%. Sin embargo, si se tienen en cuenta los valores de acumulación relativa se observa que los efectos de la diferente concentración de glucosa no son los mismos en condiciones de agitación y de falta de agitación. Con agitación, se acumula mayor cantidad de ésteres de acetato en glucosa al 2%, mientras que en condiciones de falta de agitación la acumulación es mayor en glucosa al 10%.

Una vez establecidas las condiciones de máxima producción aplicando la estrategia de combinación, esto es, con aireación, se realizó el análisis del perfil aromático en la cepa industrial T73uraleu. La finalidad de esta experiencia fue comprobar la eficiencia de dicha estrategia en comparación con la de sobreexpresión en estas condiciones de producción máxima. Para ello se determinó la acumulación en condiciones de laboratorio, tal y como se describe en

el apartado 2.1.2 de Materiales y Métodos, durante 72 h de las cepas T73YCplac33, T73YCpTATF1 y T73 Δ iah1YCpTATF1, variando la concentración de glucosa disponible en el medio de cultivo (2% y 10%).

La cuantificación de azúcares reductores y de DO₆₀₀ de las distintas cepas analizadas en el transcurso del ensayo se muestra en la *Figura 60*. Los resultados obtenidos indican que en estas condiciones, no existen diferencias significativas entre las cepas ensayadas.

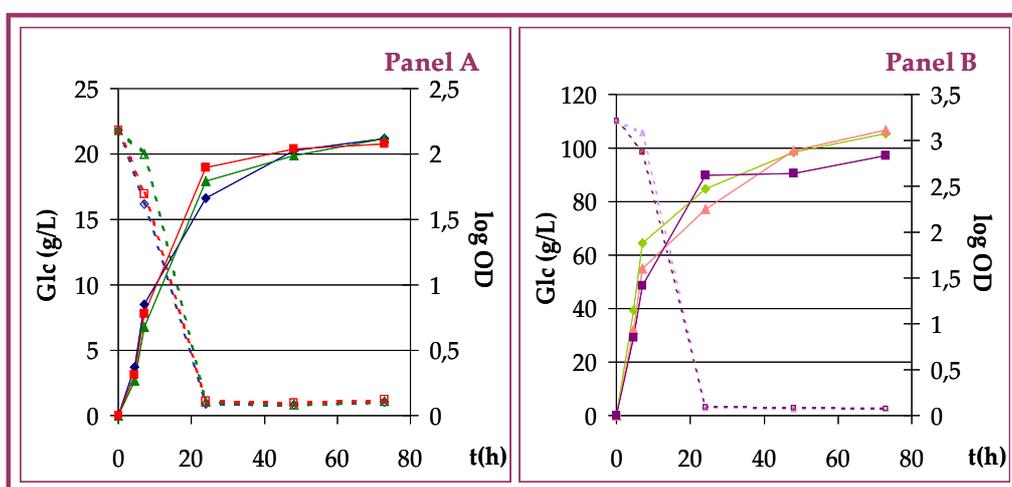


Figura 60. Curva de crecimiento (línea continua) y consumo de azúcares reductores (línea punteada). Cepas ensayadas: control T73YCplac33 (○) y modificadas T73YCpTATF1 (△), T73 Δ iah1YCpTATF1 (□). Panel A: glucosa al 2% (○, △, □). Panel B: glucosa al 10% (○, △, □).

El análisis de producción de los compuestos esterificados acetato de isoamilo, de 2-feniletilo, de isobutilo y de etilo, obtenido durante la cinética de crecimiento se muestra en las *Figuras 61 a 64*, respectivamente.

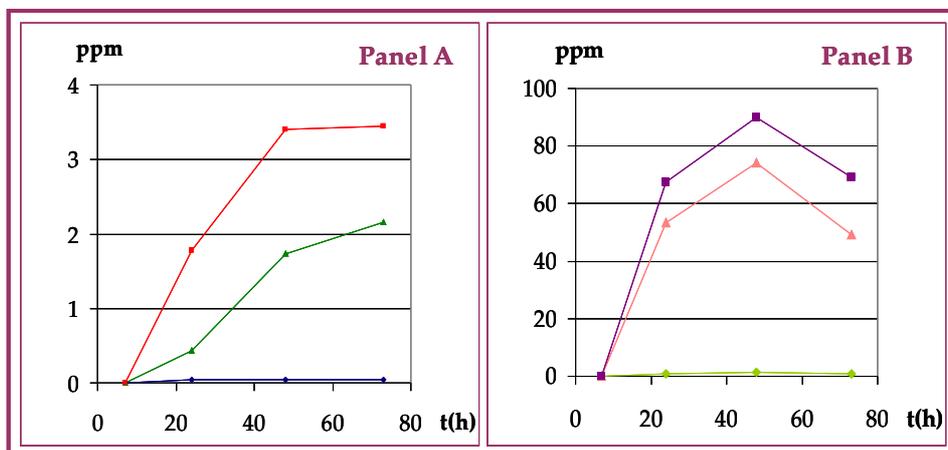


Figura 61: Cinética de acumulación del acetato de isoamilo. Cepas ensayadas: control T73YCplac33 (●) y modificadas T73YCpTATF1 (▲), T73Δiah1YCpTATF1 (○). Panel A: glucosa al 2% (●, ▲). Panel B: glucosa al 10% (●, ▲).

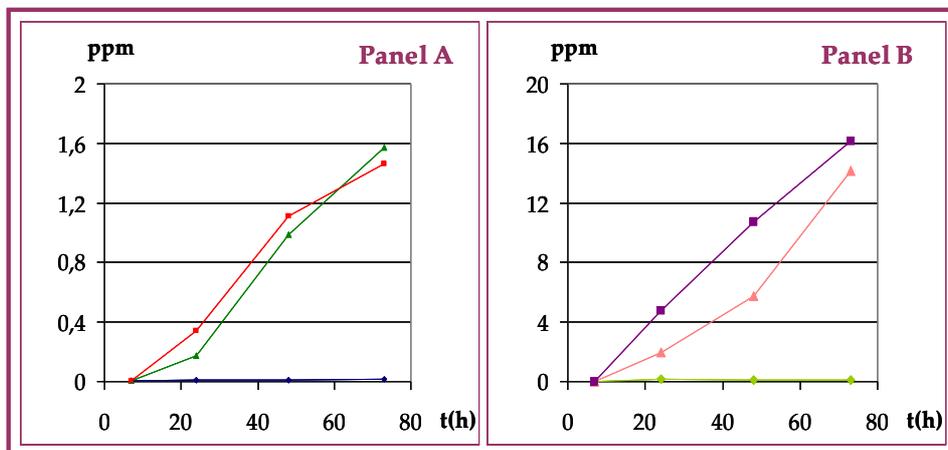


Figura 62: Cinética de acumulación del acetato de 2-feniletilo. Cepas ensayadas: control T73YCplac33 (●) y modificadas T73YCpTATF1 (▲), T73Δiah1YCpTATF1 (○). Panel A: glucosa al 2% (●, ▲). Panel B: glucosa al 10% (●, ▲).

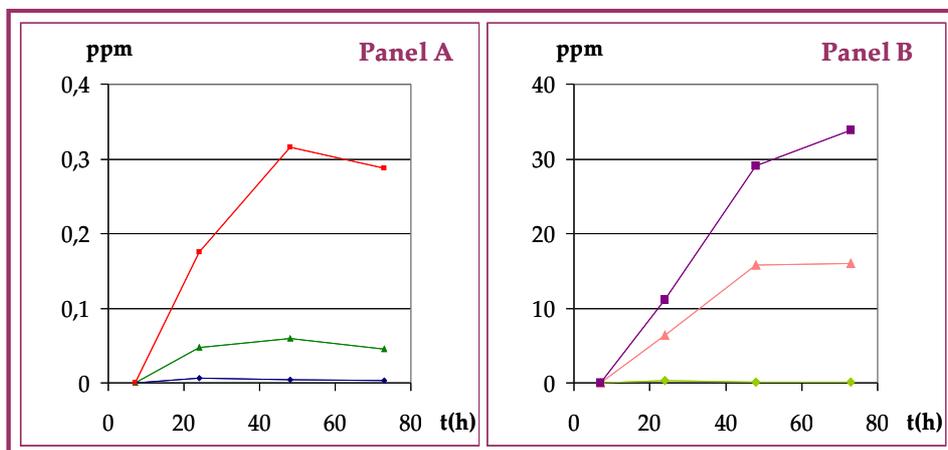


Figura 63: Cinética de acumulación del acetato de isobutilo. Cepas ensayadas: control T73YCplac33 (●) y modificadas T73YCpTATF1 (▲), T73Δiah1YCpTATF1 (■). Panel A: glucosa al 2% (,,). Panel B: glucosa al 10% (,,).

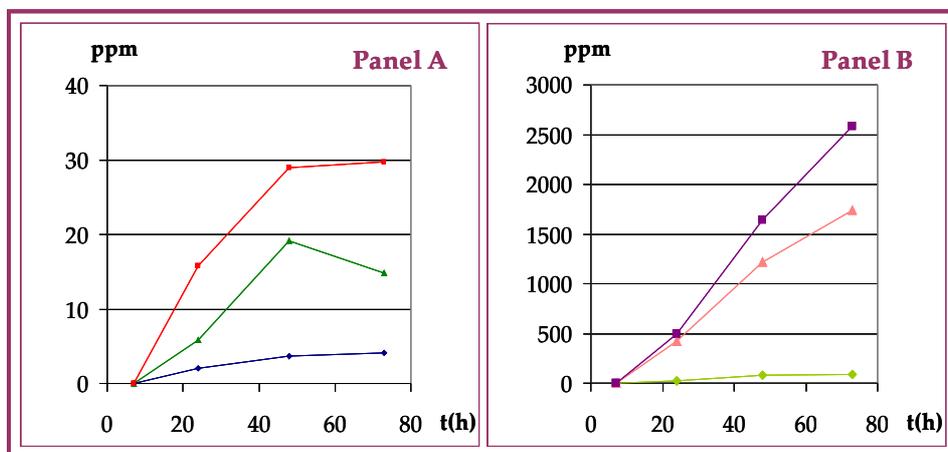


Figura 64: Cinética de acumulación del acetato de etilo. Cepas ensayadas: control T73YCplac33 (●) y modificadas T73YCpTATF1 (▲), T73Δiah1YCpTATF1 (■). Panel A: glucosa al 2% (,,). Panel B: glucosa al 10% (,,).

Los resultados obtenidos indican que las cepas T73YCpTATF1 y T73Δiah1YCpTATF1 acumulan una mayor cantidad de compuestos esterificados que la cepa de referencia T73YCplac33. Además dicha acumulación es mayor en medio con un 10% de glucosa (*Figuras 61 a 64*). También muestran que el perfil de acumulación para los acetatos de isoamilo y de isobutilo sigue una tendencia a la saturación, independientemente de la concentración de glucosa en el medio, donde el máximo de producción se alcanza a las 48 h del crecimiento celular (*Figuras 61 y 63*), mientras que el perfil de acumulación para los acetatos de 2-feniletilo y de etilo sí que es dependiente de la cantidad de glucosa en el medio, observándose que con glucosa al 10% dicho perfil sigue una tendencia de producción ascendente que a las 72 h aún no ha alcanzado la saturación (*Figuras 62 y 64*).

A pesar de todo lo expuesto, la acumulación relativa de los ésteres sólo es mayor en la estrategia de combinación para algunos de ellos (*Tablas 39 y 40*).

Subtabla A	7 h	24 h	48 h	72 h
Acetato de Isoamilo	0,78	10,97	37,03	53,32
Acetato de Isobutilo	0	6,90	13,60	14,53
Acetato de 2-Feniletilo	0,92	15,31	76,54	109,35
Acetato de Etilo	0,49	2,84	5,24	3,60
Subtabla B	7 h	24 h	48 h	72 h
Acetato de Isoamilo	1,31	45,34	72,61	85,22
Acetato de Isobutilo	0	25,46	71,64	92,86
Acetato de 2-Feniletilo	0,95	30,02	86,43	101,69
Acetato de Etilo	1,07	7,66	7,94	7,23

Tabla 39: Acumulación relativa de los ésteres de acetato durante la cinética de crecimiento al 2% de glucosa. Subtabla A: acumulación cepa T73YCpTATF1/acumulación cepa T73YCplac33. Subtabla B: acumulación cepa T73Δiah1YCpTATF1/acumulación cepa T73YCplac33.

Subtabla A	7 h	24 h	48 h	72 h
Acetato de Isoamilo	2,40	59,14	57,21	50,09
Acetato de Isobutilo	1,59	23,26	105,95	174,58
Acetato de 2-Feniletilo	1,13	33,97	55,72	162,59
Acetato de Etilo	1,00	15,17	15,25	19,35
Subtabla B	7 h	24 h	48 h	72 h
Acetato de Isoamilo	4,22	74,66	69,15	70,35
Acetato de Isobutilo	1,31	40,33	195,67	369,27
Acetato de 2-Feniletilo	1,34	27,38	104,19	185,26
Acetato de Etilo	1,38	17,81	20,50	28,72

Tabla 40: Acumulación relativa de los ésteres de acetato durante la cinética de crecimiento al 10% de glucosa. Subtabla A: acumulación cepa T73YCpTATF1/acumulación cepa T73YCplac33. Subtabla B: acumulación cepa T73Δiah1YCpTATF1/acumulación cepa T73YCplac33.

Por consiguiente, las conclusiones que podemos extraer en este apartado son:

1. Independientemente del compuesto analizado, las cepas T73YCpTATF1 y T73Δiah1YCpTATF1 acumulan una mayor cantidad de compuestos esterificados que la cepa de referencia T73YCplac33. (*Figuras 61 a 64*).
2. La producción de ésteres de acetato en ambos tipos de cepas modificadas aumenta al incrementar la cantidad de fuente de carbono disponible (comparar paneles A y B de las *Figuras 61 a 64*), pero el máximo de acumulación conseguido para cada uno de los compuestos difiere. Se observa que, en cualquiera de las condiciones ensayadas el acetato de etilo es el compuesto que presenta los niveles de acumulación más elevados (*Figura 64* paneles A y B, comparar con las *Figuras 61 a 63*) y también que

cuando la concentración de glucosa en el medio es del 2%, los compuestos que más se acumulan en el medio son, por este orden, acetato de isoamilo, de 2-feniletilo y de isobutilo (panel A de las *Figuras 61 a 63*). En medio con glucosa al 10%, sin embargo, la ordenación establecida en función de la cantidad de compuesto acumulado es acetato de isoamilo, de isobutilo y de 2-feniletilo (panel B de las *Figuras 61 a 63*).

3. Aunque la estrategia de combinación produce una mayor acumulación relativa de los ésteres de acetato analizados, sólo en el caso de algunos de ellos puede considerarse esa mayor acumulación relativa es proporcionalmente relevante (*Tablas 39 y 40*, comparar subtablas A y B).

2.3. Conclusiones.

Los resultados obtenidos en los apartados de esta sección permiten concluir:

1. Las condiciones óptimas para la máxima producción biotecnológica de ésteres de acetato dependen de la estrategia utilizada. Aplicando la estrategia de delección la condición de máxima acumulación de ésteres es la falta de oxígeno. Sin embargo, con la estrategia de combinación las condiciones óptimas son niveles elevados de disponibilidad de fuente de carbono y presencia de oxígeno (*Figura 54, Tabla 34*, apartado 2.1 y *Figuras 56 a 59 y Tablas 35 a 38* apartado 2.2).
2. La eficiencia de la estrategia de delección es menor que la eficiencia de la estrategia de sobreexpresión y que la estrategia de combinación (ver *Figura 54, Tabla 34*, apartado 2.1; *Figura 30, Tabla 10*, apartado 2.2, Capítulo 2 y *Figuras 56 a 59 y Tablas 35 a 38* apartado 2.2).
3. La eficiencia de la estrategia de combinación es mayor que la estrategia de sobreexpresión, ya que los niveles de producción de

ésteres de acetato en valores absolutos (*Figuras 62 a 65*) y relativos (*Tablas 39 y 40*) son menores en ésta última.

4. El efecto producido por la delección del gen *IAH1* en la producción de ésteres de acetato es cuantitativamente poco significativo, incluso cuando está acoplado a la estrategia de sobreexpresión. Por tanto, aunque la estrategia de combinación es más eficaz, la sobreexpresión del gen *ATF1* bajo el control del promotor *TDH3* es, desde el punto de vista de la aplicación biotecnológica, la mejor alternativa para conseguir aumentar el flujo metabólico de la síntesis de ésteres de acetato. Las razones que conducen a esta afirmación son dos. En primer lugar el hecho de que dicha estrategia de sobreexpresión es una estrategia metodológicamente sencilla basada en una única modificación genética. En segundo lugar porque se consigue un desbalance considerablemente elevado dirigido hacia el proceso biosintético, de forma que la célula en condiciones de sobreexpresión es incapaz de compensar y neutralizar el efecto producido por la modificación introducida.

CONCLUSIONES.

Las conclusiones generales que se deducen de este trabajo se detallan a continuación:

- I. La actividad AATasa I es la responsable mayoritaria en la síntesis de acetato de isoamilo, de 2-feniletilo y de isobutilo en *S. cerevisiae*. La enzima AATasa II también participa pero en menor grado.
- II. La proteína Iah1p hidroliza específicamente acetato de isoamilo y de isobutilo.
- III. La cantidad de ésteres de acetato producida por las levaduras depende del balance entre las actividades de síntesis y de hidrólisis por lo que la sobreproducción de estos compuestos se consigue al desestabilizar el equilibrio en el sentido de síntesis. La sobreexpresión del gen codificante de la actividad AATasa mayoritaria, **ATF1**, es cuantitativamente la mejor estrategia aunque la delección del gen **IAH1**, codificante de la actividad éster hidrolasa I, también produce un ligero aumento en la acumulación de ciertos ésteres de acetato.
- IV. Otras estrategias de ingeniería metabólica ensayadas, como el desvío de flujo de la ruta de biosíntesis de la leucina hacia la producción de alcohol isoamílico por sobreexpresión del gen **THI3**, y el aumento de flujo de dicha ruta por delección de sistemas de percepción y transporte de aminoácidos, no resultan interesantes desde el punto de vista industrial. En el primer caso,

esto es debido a la ausencia del efecto metabólico esperado, y en el segundo, a los defectos de crecimiento de las cepas modificadas y a las estrictas condiciones nutricionales necesarias para observar el aumento de flujo de la ruta metabólica de interés.

- V. Las cepas vínicas genéticamente modificadas para la sobreproducción de ésteres de acetato conservan su comportamiento adecuado en condiciones de microvinificación en mosto natural y, respecto de la correspondiente cepa parental, producen vino con niveles más altos de todos los compuestos analizados, así por ejemplo tras el agotamiento total de la glucosa, se consigue aumentar del orden de 45 veces la cantidad de acetato de isoamilo y de 2-feniletilo en la cepa genéticamente modificada.
- VI. La sobreproducción de ésteres de acetato de las cepas vínicas genéticamente modificadas puede optimizarse en medios con alto contenido en glucosa (10%) y crecimiento en condiciones de agitación para su uso como factorías celulares. En estas condiciones, la cepa sobreexpresante del gen **ATF1** produce una acumulación relativa de acetato de isoamilo, por ejemplo, del orden de 5-6 veces superiores a la obtenida en condiciones de microvinificación y niveles absolutos de concentración de este compuesto alrededor de 20 veces más altos que en medios con 2% de glucosa.

ANEXO I:

COMPOSICIÓN Y DETERMINACIÓN DE LAS CURVAS DE CALIBRADO PARA LA CUANTIFICACIÓN DE ÉSTERES DE ACETATO Y ALCOHOLES AROMÁTICOS.

Las muestras utilizadas para realizar la curva patrón son disoluciones a distintas concentraciones de los alcoholes y ésteres que se desean cuantificar. Estos compuestos se encuentran disueltos en una disolución denominada "Vino sintético" formada por tampón McIlvaine 50 mM, pH 3,5 (Rojas *et al.*, 2001) con una concentración de etanol del 12% (v/v) que mimetizan las condiciones físico-químicas del vino.

1. CURVA PATRÓN DE ÉSTERES Y ALCOHOLES.

Las siguientes tablas muestran la composición y las concentraciones de la disolución denominada "Vino sintético", así como las distintas diluciones que se analizaron mediante cromatografía de gases para realizar la curva patrón.

Vino sintético: 0,25 L						
Compuestos	Densidad (mg/L)	Volumen (μL)	mg teóricos	mg/L teóricos	mg reales	mg/L reales
Alcohol Isoamílico	0,809	124	100	400	106,3	425,2
2-Feniletanol	1,02	98	100	400	104	416
Isobutanol	0,802	25	20	80	20	80

ANEXO I

1-Hexanol	0,820	24	20	80	23,1	92,4
Acetato de Etilo	0,9	22	20	80	20,7	82,8
Acetato de Isoamilo	0,87	57	50	200	56,6	226,4
Acetato de 2-Feniletilo	1,033	19	20	80	20,5	82
Acetato de Isobutilo	0,87	11	10	40	12,4	49,6
Acetato de hexilo	0,873	11	10	40	13,1	52,4
Caproato de Etilo	0,871	115	100	400	106,7	426,8
Caprilato de Etilo	0,867	115	100	400	105,8	423,2

Tabla 41: Composición y concentración de los distintos compuestos que constituyen el “Vino sintético”.

Soluciones patrón (ppm) Vino Sintético					
Compuesto	Dilución 1:1	Dilución 1:5	Dilución 1:10	Dilución 1:25	Dilución 1:50
Alcohol Isoamílico	425,2	85,04	42,52	17,008	8,504
2-Feniletanol	416	83,2	41,6	16,64	8,32
Isobutanol	80	16	8	3,2	1,6
1-Hexanol	92,4	18,48	9,24	3,696	1,848
Acetato de Etilo	82,8	16,56	8,28	3,312	1,656

Acetato de Isoamilo	226,4	45,28	22,64	9,056	4,528
Acetato de 2-Feniletilo	82	16,4	8,2	3,28	1,64
Acetato de Isobutilo	49,6	9,92	4,96	1,984	0,992
Acetato de hexilo	52,4	10,48	5,24	2,096	1,048
Caproato de Etilo	426,8	85,36	42,68	17,072	8,536
Caprilato de Etilo	423,2	84,64	42,32	16,928	8,464
Soluciones patrón Vino Sintético					
Compuesto	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	Dilución 1:5000	Dilución 1:10000	
Alcohol Isoamílico	4,252	0,4252	0,08504	0,04252	
2-Feniletanol	4,16	0,416	0,0832	0,0416	
Isobutanol	0,8	0,08	0,016	0,008	
1-Hexanol	0,924	0,0924	0,01848	0,00924	
Acetato de Etilo	0,828	0,0828	0,01656	0,00828	
Acetato de Isoamilo	2,264	0,2264	0,04528	0,02264	
Acetato de 2-Feniletilo	0,82	0,082	0,0164	0,0082	
Acetato de Isobutilo	0,496	0,0496	0,00992	0,00496	
Acetato de hexilo	0,524	0,0524	0,0148	0,00524	
Caproato de Etilo	4,268	0,4268	0,08536	0,04268	

ANEXO I

Caprilato de Etilo	4,232	0,4232	0,08464	0,04232
--------------------	-------	--------	---------	---------

Tabla 42. Concentraciones de los compuestos que constituyen el “Vino sintético” en las distintas disoluciones ensayadas.

Relación: Área del compuesto / Área del patrón interno (2-heptanona)				
Compuesto	Dilución 1:5	Dilución 1:10	Dilución 1:25	Dilución 1:50
Alcohol Isoamílico	4,28048	2,27421	0,92968	0,49410
2-Feniletanol	1,89729	0,66999	0,34779	0,12002
Isobutanol	0,14385	0,09831	0,03255	0,01847
1-Hexanol	4,09979	2,04898	0,84871	0,44817
Acetato de Etilo	0,18542	0,13424	0,07155	0,03724
Acetato de Isoamilo	118,19598	60,36989	24,40568	12,07357
Acetato de 2-Feniletilo	4,29760	1,74085	0,72271	0,37963
Acetato de Isobutilo	8,88792	4,80185	1,92289	0,95877
Acetato de hexilo	65,51973	31,85439	14,37094	7,07375
Caproato de Etilo	545,82053	265,86320	119,07171	58,41804
Caprilato de Etilo	348,86249	167,79413	131,67007	76,98443
Compuesto	Dilución 1:100	Dilución 1:1000	Dilución 1:5000	Dilución 1:10000
Alcohol Isoamílico	0,25690	0,01965	0,01974	0,01666
2-Feniletanol	0,04224	0,00509	0,00149	0,00051

Isobutanol	0,00779	0,00026	0,00078	0,00148
1-Hexanol	0,22778	0,02888	0,01679	0,01632
Acetato de Etilo	0,01656	0,00338	0,00315	0,00271
Acetato de Isoamilo	5,36958	0,57479	0,11753	0,06208
Acetato de 2-Feniletilo	0,16177	0,01924	0,00353	0,00183
Acetato de Isobutilo	0,41409	0,04628	0,00991	0,00653
Acetato de hexilo	3,04436	0,31356	0,06545	0,03415
Caproato de Etilo	25,07127	2,59406	0,53744	0,28336
Caprilato de Etilo	28,98852	2,36670	0,53389	0,30873

Tabla 43: Relación de áreas: área del compuesto / área del patrón interno.

2. GRÁFICAS RESULTANTES.

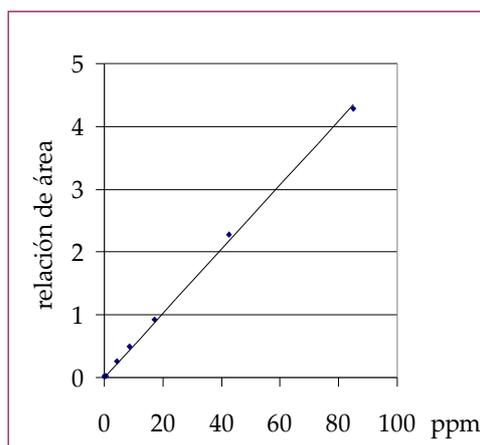


Figura 65: Curva patrón del compuesto alcohol isoamílico
($y = 0,0512x$; $r^2 = 0,9985$).

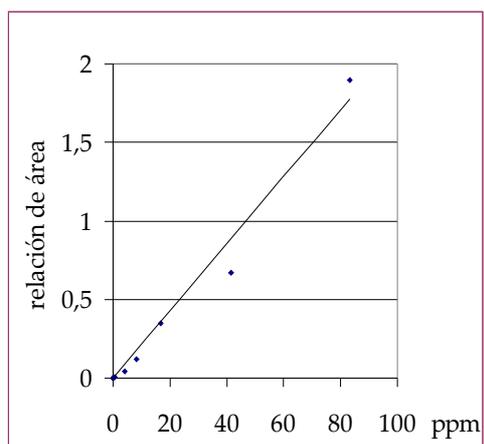


Figura 66: Curva patrón del compuesto 2-feniletanol
($y = 0,0214x$; $r^2 = 0,9774$).

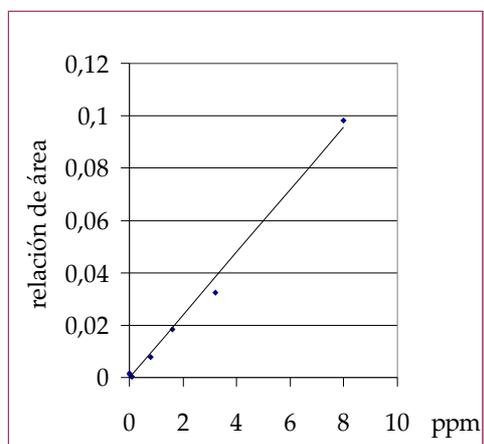


Figura 67: Curva patrón del compuesto isobutanol
($y = 0,012x$; $r^2 = 0,9939$).

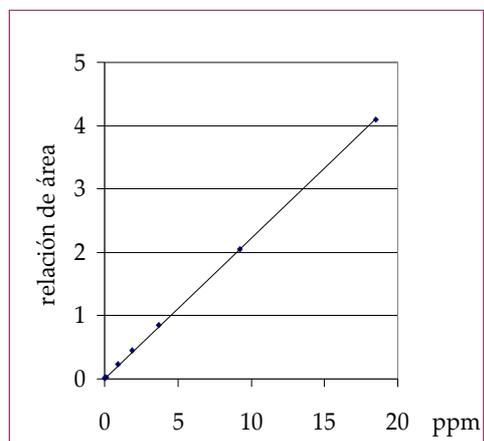


Figura 68: Curva patrón del compuesto 1-hexanol
($y = 0,2223x$; $r^2 = 0,9998$).

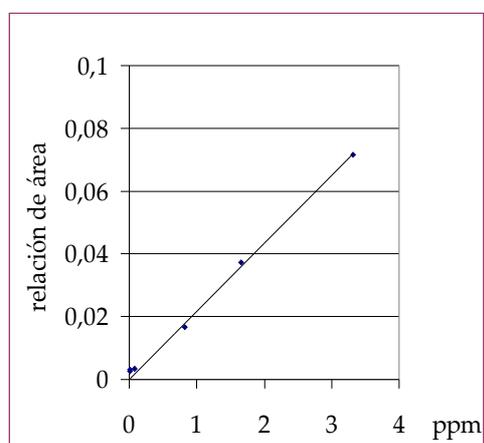


Figura 69: Curva patrón del compuesto acetato de etilo
($y = 0,0217x$; $r^2 = 0,9946$).

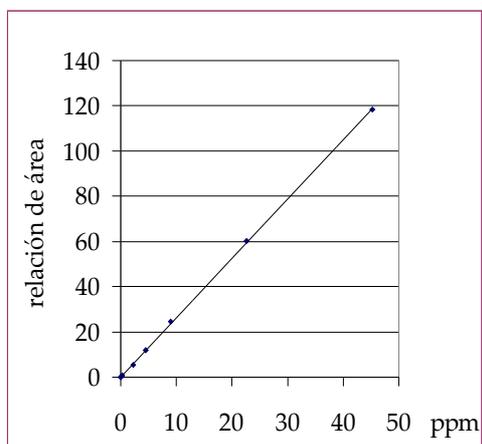


Figura 70: Curva patrón del compuesto acetato de isoamilo
($y = 2,6237x$; $r^2 = 0,9998$).

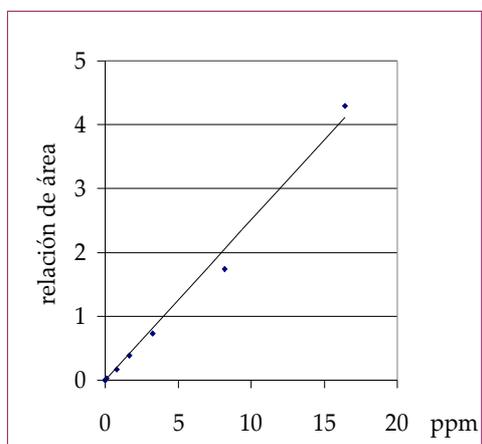


Figura 71: Curva patrón del compuesto acetato de 2-feniletilo
($y = 0,2509x$; $r^2 = 0,9905$).

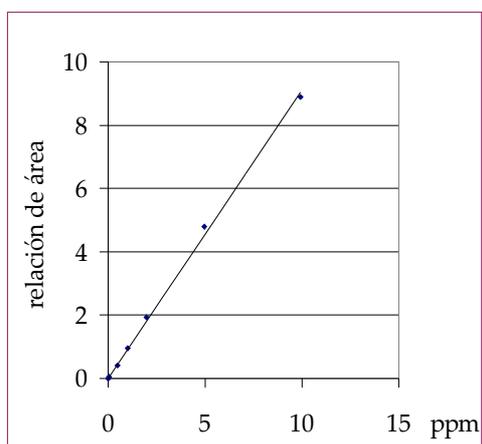


Figura 72: Curva patrón del compuesto acetato de isobutilo
($y = 0,9125x$; $r^2 = 0,9983$).

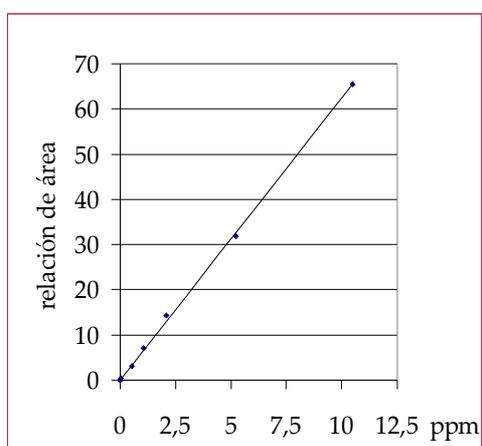


Figura 73: Curva patrón del compuesto acetato de hexilo
($y = 6,2402x$; $r^2 = 0,9993$).

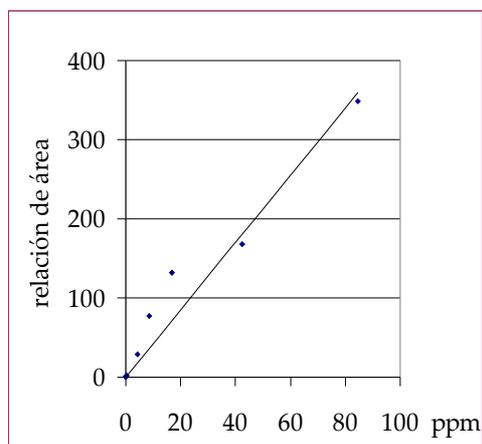


Figura 74: Curva patrón del compuesto caprilato de etilo
($y = 4,2474x$; $r^2 = 0,9449$).

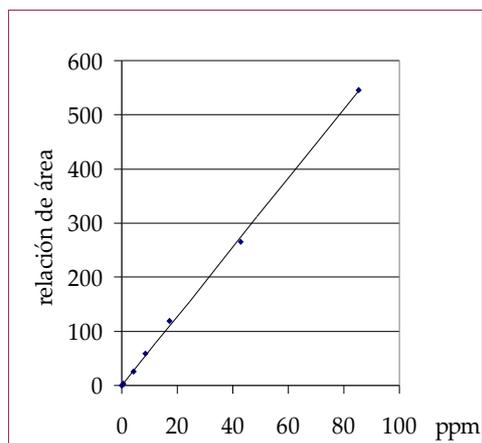


Figura 75: Curva patrón del compuesto caproato de etilo
($y = 6,3829x$; $r^2 = 0,9994$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

André, B., Hein, C., Grenson, M. y Jauniaux, J. C. (1993). Cloning and expression of the UGA4 gene coding for the inducible BABA-specific transport protein of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Gen. Genet.*, **237**: 17-25.

de Barros Lopes, M., Rehman, A.U., Gockowiak, H., Heinrich, A.J., Langridge, P. y Henschke, P.A. (2000). Fermentation properties of a wine yeast overexpressing the *Saccharomyces cerevisiae* glycerol 3-phosphate dehydrogenase gene (*GPD2*). *Aust. J. Grape Wine Res.*, **6**: 208-215.

Baudin, A., Ozier-Kalogeropoulos, O., Denouel, A., Lacroute, F. y Cullin, C. (1993). A simple and efficient method for direct gene deletion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res.*, **21**, 3329-3330.

Baumes, R., Cordonnier, R., Nitz, S. y Drawert, F. (1986). Identification and determination of volatile constituents in wines from different wine cultivars. *J. Sci. Food Agric.*, **37**: 927-943.

Benítez, T., Gasent-Ramírez, M., Castrjon, F. y Codón, A. (1996). *Development of new strain for the food industry. Biotechnol. Progr.*, **12**: 149-163.

Belardi, R. P., Pawliszyn, J. B.. (1989). The application of chemically modified fused silica fibers in the extraction of organics of water matrix samples and their rapid transit to capillary columns. *Water Pollut. Res. J. Can.*, **24**: 179-189.

Bisson, L. F. (1991). Influence of nitrogen on yeast and fermentation of grapes. Rantz, J.M., (Ed) *Proceedings of the international symposium of Nitrogen in Grapes and Wine*, Seattle, Washington. Davis CA: American Society for Enology and Viticulture, pp: 172-184.

Bisson, L. F. (1993). Wine microbiology and biotechnology. Fleet, G. H. (Ed) Harwood academic publishers, pp: 55-75.

de Boer, M., Bebelman, J. P., Gonçalves, P. M., Maat, J., van Heerikhuizen, H. y Planta, R.J. (1998). Regulation of expression of the amino acid transporter gene *BAP3* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **30**: 603-613.

Boone, C., Sdicu, A. M., Wagner, J., Degre, R., Sánchez, V. y Bussey, H. (1990). Integration of the yeast K1 toxin gene into the genome of marked wine yeast and its effect on vinification. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**: 37-41.

Bornscheuer, U. T. (2002). Microbial carboxyl esterases: Classification, properties and applications in biocatalysis. *FEMS Microbiol. Rev.*, **26**: 73-81.

Boulton, R. B., Singleton, V. L., Bisson, L. F. y Kunkee, R. E. (1995). *Principles and practices of winemaking*. Champan Hall, New York, pp: 102-192.

Brachmann, C. B., Davies A., Cost, G. J., Caputo, E., Hieter, P. y Boeckle, J. D. (1998). Designer deletion strain derived from *Saccharomyces cerevisiae* S288C: a useful set of strain and plasmids for PCR-mediated gene disruption and other applications. *Yeast*, **14**: 115-132.

Burrows, R. J., Byrne, K. L. y Meacock, P. A. (2000). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with derepressed thiamine gene expression. *Yeast*, **16**: 1497-1508.

Calderbank, J. y Hammond, J.R.M. (1994). Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **52**: 84-90.

Cauet, G., Degryse, E., Ledoux, C., Spagnoli, R., Achstetter, T. (1999). Pregnenolona esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism. *Eur. J. Biochem.*, **261**: 317-324.

Cole, V. C., y Noble A.C. (1995). Flavor chemistry and assessment. En A. G. H. Lea and J. R. Pigott (Ed.), *Fermented beverage production*. Blackie Academic and Professional, London, United Kingdom, pp: 361-385.

Cooper, T. G. (1982). Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. The molecular biology of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: metabolism and gene expression. Strathern, J. M., Jones, E. W. I Broach, J. R., (Ed.) *Cold Spring Harbor Laboratory*, Cold Spring Harbor, New York, pp: 399-462.

Cortés, M. B., Moreno, J., Zea, L., Moyano, L., and Medina, M. (1999). Response of the aroma fraction in sherry wines subjected to accelerated biological aging *J. Agric. and Food Chem.*, **47**: 3297-3202.

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

Dequin, S. (2001). The potential of genetic engineering for improving brewing, wine-making and baking yeasts. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **56**: 577-588.

Dequin, S., Baptista, E. y Barre, P. (1999). Acidification of grape musts by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast genetically engineered to produce lactic acid. *Am. J. Enol. Vitic.*, **50**: 45-50.

Dequin, S. y Barre, P. (1994). Mixed lactic acid-alcoholic fermentation by *Saccharomyces cerevisiae* expressing the *Lactobacillus casei* L(+)-LDH. *Biotechnology*, **12**: 173-177.

Dickinson, J. R, Harrison, S. J., Dickinson, J. A. y Hewlins, M. J. E. (2000). An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **275**: 10937-10942.

Dickinson, J. R, Harrison, S. J. y Hewlins, M. J. E. (1998). An investigation of the metabolism of valine to isobutyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **273**: 25751-25756.

Dickinson, J. R, Lanterman, M. M., Danner, D. J., Pearson, B. M., Sanz, P., Harrison, S. J. y Hewlins, M. J. E. (1997). A ¹³C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **272**: 26871-26878.

Dickinson, J. R., Salgado, L., Eshantha J., and Hewlins M. J. E. (2003). The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **278**: 8028-8034.

Didion, T., Grauslund, M., Kielland-Brandt, C. y Andersen, A. H. (1996). Amino acids induce expression of *BAP2*, a branched-chain amino acid permease gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **178**: 2025-2029.

Didion, T., Regenber, B., Jorgensen, M. U., Kielland-Brandt, C. y Andersen, A. H. (1998). The permease homologue Ssy1p controls the expression of amino acids and peptide transporter gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Microbiol.*, **27**: 643-650.

Dufour, J. P. y Malcorps, P. (1994). Ester synthesis during fermentation: enzyme characterization and modulation mechanism. *Eur. Brew. Congr., Proc. Congr. 4th Londres*, pp: 137-151.

Dufour, J. P., Malcorps, P. y Silcock, P. (2003). Control of ester synthesis during brewery fermentation. En: *Brewing Yeast Fermentation performance*, Smart, K. (2nd Ed). Blackwell Science, Oxford, pp: 213-233.

Eden, A., Van Nederveelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N. Y Debourg, A. (2001). Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **55**: 296-300.

Edwards, T. L., Singleton, V. L. y Boulton, R. (1985). Formation of ethyl esters of tartaric acid during wine ageing: chemical and sensory effects. *Am. J. Enol. Vitic.*, **36**: 118-124.

Fankhauser, H., Zurlinden, A., Schweingruber, A-M., Edenharter, E. y Schweingruber, M. E. (1995). *Schizosaccharomyces pombe* thiamine pyrophosphoquimase is encoded by *tnr3* and is a regulator of thiamine metabolism, phosphate metabolism, mating and growth. *J. Biol. Chem.*, **270**: 28457-28462.

Feinberg, A. P. y Vogelstein, B. (1983). A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. *Anal. Biochem.*, **132**: 6-13.

Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A y Cacho, J. F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young spanish wines by multivariate análisis. *J. Sci. Food Agric.*, **67**: 381-392.

Ferreira, V., López, R. y Cacho, J. F. (2000). Quantitative determination of the odorants of young red wines from different grape varieties. *J. Sci. Food Agric.*, **80**: 1659-1667.

Fleet, G. H. y Heard, G. M. (1992) Yeast growth during fermentation. En: *Wine Microbiology and Biotechnology*. G. R. Fleet, (Ed) Harwood Academic Publisher, Chur, Switherland, pp: 27-54.

Forsberg, H., Gilstring, F. C., Zargari, A., Martinez, P. y Ljungdahl, P. O. (2001a). The role of the yeast plasma membrane SPS nutrient sensor in the metabolic response to extracellular amino acids. *Mol. Microbiol.*, **42**: 215-228.

Forsberg, H., Hammar, M., Andreasson, C., Moliner, A. y Ljungdahl, P. O. (2001b). Supressors of *ssy1* and *ptr3* null mutations define novel amino acid sensor-independent genes in and unsaturated fatty acids on expresión of the *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, **158**: 973-988.

Forsberg, H. y Ljungdahl, P. O. (2001). Genetic and biochemical analysis of the yeast plasma membrane Ssy1p-Ptr3p-Ssy5p sensor of extracellular amino acids. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 814-826.

Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Fukurama, S. y Tamai, Y. (1997). Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **63**: 910-915.

Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, Y. y Hamachi, M. (1994). Molecular cloning, sequence, analysis and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**: 2786-2792.

Fujii, T., Yoshimoto, H., Nagasawa, N., Bogaki, T., Tamai, Y. y Hamachi, M. (1996a). Nucleotide sequences of alcohol acetyltransferase genes from lager brewing yeast, *Saccharomyces carlsbergensis*. *Yeast*, **12**: 593-598.

Fujii, T., Yoshimoto, H. y Tamai, Y. (1996b). Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the *ATF1* gene encoding the alcohol acetyltransferase. *J. Ferment. Bioeng.*, **81**: 538-542.

Fujiwara, D., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Harishama, S. y Tamai, Y. (1998). Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene *ATF1* and Δ -9 fatty acid desaturase gene *OLE1* by unsaturated fatty acids. *Yeast*, **14**: 711-721.

Fujiwara, D., Yoshimoto, H., Sone, H., Harishama, S. y Tamai, Y. (1999). Molecular mechanisms of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *ATF1* gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast*, **15**: 1183-1197.

Fukuda, K., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y. y Kimura, A. (2000). Purification and characterization of isoamyl acetate-hydrolyzing esterase encoded by *IAH1* gene of *Saccharomyces cerevisiae* from a recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **53**: 596-600.

Fukuda, K., Kuwahata, O., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamito, K., Inoue, Y y Kimura A. (1996). Molecular cloning and nucleotide sequence of the isoamyl acetate-hidrolizing esterase gene (*EST2*) from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ferment. Bioeng.*, **82**: 8-15.

Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y., Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y y Kimura A. (1998a). Balance of activities of alcohol acetyltransferase and esterase in *Saccharomyces cerevisiae* is important for production of isoamyl acetate. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **64**: 4076-4078.

Fukuda, K., Yamamoto, N., Kiyokawa, Y, Yanagiuchi, T., Wakai, Y., Kitamoto, K., Inoue, Y., Kimura, A. (1998b). Brewing properties of sake yeast whose *EST2* gene encoding isoamyl acetate-hydrolyzing esterase was disrupted. *J. Fermt. and Bioeng.*, **85**: 101-106.

Ganga MA, Piñaga F, Vallés S, Ramón D, Querol A. (1999). Aroma improving in microvinification processes by the use of a recombinant wine yeast strain expressing the *Aspergillus nidulans xlnA* gene. *Int J Food Microbiol*, **47**: 171-178.

Gietz, R. D. y Sugino, A. (1988). New yeast- *Escherichia coli* shuttle vectors constructed with mutagenized yeast genes lacking six-base pair restriction sites. *Gene*, **74**: 527-534.

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

Gilstring, C. F., Larsson, M. M., Joki, A. y Ljungdahl, P.O. (1995). *Abstr. Yeast Cell Biol. Meet.*, Cold Spring Harbor, USA, p: 265.

Gimeno-Alcañiz, J. V. Modificación de rutas metabólicas de utilización de la glucosa en cepas vínicas de *Saccharomyces cerevisiae*: Aplicaciones biotecnológicas. (2000). Tesis Doctoral, Universitat de València.

Giudici, P. y Zambonelli, C. (1992). Criteri di selezioni dei lieviti per enologia. *Vignevini*, **9**: 29-34.

Giudici, P., Zambonelli, C., y Kunkee, R. E. (1993). Increased production of n-propanol in wine by yeast strains having an impaired ability to form hydrogen sulphide. *Am. J. Enol. Vitic.*, **44**: 123-127.

Gómez, E., Laencina, J. y Martinez, A. (1994). Vinification effects on changes in volatile compounds of wine. *J. Food Sci.*, **59**: 406-409.

Grauslund, M., Didion, T., Kielland-Brandt, M. C. y Andersen, H. A. (1995). *BAP2*, a gene encoding a permease for branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1269**: 275-280.

Grenson, M. (1983). Inactivation-reactivation process and repression of permease formation regulate several ammonia-sensitive permeases in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **133**: 135-139.

Grenson, M. (1992). New Comprehensive Biology. En: *Molecular Aspects of Transport Proteins*. Neuberger, A. and Van deenen, L. L. M. (Ed) **21**: 219-245.

Guadagni, D.G., Buttery, R. G. y Okano, S. (1963). Odour thresholds of some organic compounds associated with flavours. *J. Sci. Food Agric.*, **14**: 761-765.

Guillamón, J. M., Barrio, E., y Querol, A. (1996) Characterization of wine yeast strains of the *Saccharomyces* genus on the basis of molecular markers: Relationships between genetic distance and geographic or ecological origin. *Systematic and Applied Microbiology*, **19**: 122-132.

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

Günata, Z., Bayonove, C., Baumes, R. y Cordonnier, R. (1985). The aroma of grapes. Localization and evolution of free and bound fractions of some grape aroma components c.v. muscat during first development and maturation. *J. Sci. Food Agric.*, **36**: 857-862.

Hadfield, C., Jordan, B. E., Mount, R. C., Pretorius, G. H. J. y Burak, E. (1990). G418-resistance as a dominant marker and reporter for gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **18**: 303-313.

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

Hawkins, C. F., Borges, A. and Perham, R. N. (1989). A common structural motif in thiamin pyrophosphate-binding enzymes. *FEBS Lett.*, **255**: 77-82.

Herraiz, T. y Ough, C.S. (1993). Formation of ethyl esters of amino acids by yeast during the alcoholic fermentation of grape juice. *Am. J. Enol. Vitic.*, **41**: 313-318.

Hinnebusch, A. G. (1992). En: *The Molecular and Cellular Biology of the yeast Saccharomyces: Gene expression*. Jones, E. W., Pringle, J. R. And Broach, J. R. (Ed). Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp: 319-414.

Hirata, D. e Hiroi, T. (1991). Genes that cause overproduction of isoamyl alcohol by increased gene-dosage effect in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.*, **55**: 919-924.

Hirata, D., Aoki, S., Watanabe, K., Tsukioka, M. y Suzuki, T. (1992). Stable over production of Isoamyl Alcohol by *Saccharomyces cerevisiae* with chromosome-integrated multicopy *LEU4* genes. *Biosci. Biotech. Biochem.*, **56**: 1682-1683.

Hoffman, C. S. y Winston, F. (1987). A ten-minute DNA preparation from yeast efficiently releases autonomous plasmids for transformation of *Escherichia coli*. *Gene*, **57**: 267-272.

Hohmann, S. y Meacock, P. A. (1998). Thiamin metabolism and thiamin diphosphate-dependente enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*: genetic regulation. *Biochim. Biophys. Acta.*, **1385**: 201-219.

Hórák, J. y Ríhová, L. (1982). L-Proline transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **691**: 144-150.

Hórak, J. (1986). Amino acids transport in eucaryotic microorganisms. *Biochim. Biophys. Acta*, **864**: 223-256.

Hórak, J. (1997). Yeast nutrient transporters. *Biochim. Biophys. Acta*, **1331**: 41-79.

Houtman, A. C., Marais, J. y Du Plessis, C. S. (1980a). The possibilities of applying present-day knowledge of wine aroma components: Influence of several juice factors on fermentation rate and ester production during fermentation. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **1**: 27-33.

Houtman, A. C., Marais, J. y Du Plessis, C. S. (1980b). Factors affecting the reproducibility of fermentation of grape juice and of the aroma composition of wines. I. Grape maturity, sugar, inoculum concentration, aeration, juice turbidity, and ergosterol. *Vitis*, **19**: 37-54.

Inoue, Y., Trevanichi, S., Fukuda, K., Izawa, S., Wakai, Y. y Kimura, A. (1997). Roles of esterase and alcohol acetyltransferase on production of isoamyl acetate in *Hansenula mrakii*. *J. Agric. Food Chem.*, **45**: 644-649.

Iraqui, I., Vissers, S., André, B., Urrestarazu, A (1999a). Transcriptional induction by aromatic amino acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 3360-3371.

Iraqui, I., Vissers, S., Bernard, F., De Craene, J. O., Boles, E., Urrestarazu, A y André, B. (1999b). Amino acid signaling in *Saccharomyces cerevisiae*: a permease-like sensor of external amino acids and F-box protein Grr1p are required for transcriptional induction of the *AGP1* gene, which encodes a broad-specificity amino acid permease. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 989-1001.

Island, M. D., Naider, F. y Becker, J. M. (1987). Regulation of dipeptide transport in *Saccharomyces cerevisiae* by micromolar amino acid concentrations. *J. Bacteriol.*, **169**: 2132-2136.

Jacobs, P., Jauniaux, J. C. y Grenson, M. (1980). A cis-dominant regulatory mutation linked to the *argB-argC* gene cluster in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Mol. Biol.*, **139**: 691-704.

Jauniaux, J. C. y Grenson, M. (1990). *GAP1*, the general amino acid permease gene of *Saccharomyces cerevisiae*. Nucleotide sequence, protein similarity with the other baker's yeast amino acid permeases, and nitrogen catabolic repression. *Eur. J. Biochem.*, **190**: 39-44.

Jiang, Y., Vasconcelles, M. J., Wretzel, S., Light, A., Gilooly, L., McDaid, K., Oh, C.S., Martin, C. E. y Goldberg, M. A. (2002). Mga2p processing by hypoxia and unsaturated fatty acid in *Saccharomyces cerevisiae*: Impact on LORE-dependent gene expression. *Eukaryot. Cell*, **1**: 481-490.

Jiang, Y., Vasconcelles, M. J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C. E. y Goldberg, M. A. (2001). *MGA2* is involved in the low-oxygen-response element hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell. Biol.*, **21**: 751-762.

Kawasaki, Y., Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H. y Iwashima, A. (1990). Regulation of thiamine biosynthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **172**: 6145-6147.

Klasson, H., Fink, G. R. y Ljungdahl, P. O. (1999). Ssy1p and Ptr3p are plasma membrane components of a yeast system that senses extracellular amino acids. *Mol. Cell. Biol.*, **19**: 5405-5416.

Kodama, Y., Omura, F., Miyajima K. y Ashikari, T. (2001). Control of higher alcohol production by manipulation of the *BAP2* gen in brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **54**: 157-162.

Kotliar, N. y Ramos, E. H. (1983). Systems of L-leucine transport into *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts. *Biochim. Biophys. Acta*, **734**: 378-380.

Kotliar, N., Stella C. A., Ramos, E. H. y Mattoon, J. R. (1994). L-leucine transport systems in *Saccharomyces cerevisiae* participation of *GAP1*, S1 and S2 transport systems. *Cell. Mol. Biol.*, **40**: 833-842.

Lambrechts, M. G. y Pretorius, I. S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma. A review. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **21**: 97-129.

Large, P. J. (1986). Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. *Yeast*, **2**: 1-34.

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

Ljungdahl, P. O., Gimeno, C. J., Styles, C. A. y Fink, G. R. (1992). *SHR3*: a novel component of the secretory pathway specifically required for localization of amino acid permeases in yeast. *Cell*, **71**: 463-478.

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

Magasanik, B. (1992). Regulation of nitrogen utilization. En: *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces cerevisiae: gene expression*. J. R. Broach, E. W. Jones, and J. R. Pringle (Ed). Cold Spring Harbord Laboratory Press, Cold Spring Harbord, N. Y.

Malcorps, P., Cheval, J. M., Jamail, S. and Dufour, J. P. (1991). A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **49**: 47-53.

Malcorps, P. y Dufour, J. P. (1992). Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.*, **210**: 1015-1022.

Manzanares P, Orejas M, Gil JV, de Graaff L, Visser J, Ramón D. (2003). Construction of a genetically modified wine yeast strains

expressing the *Aspergillus aculeatus rhaA* gene, encoding an α -L-rhamnosidase of enological interest. *Appl Environ Microbiol*; **69**: 7558-7562.

Marais, J., Van Rooyen, P. C. y du Plessis, C. S. (1979). Objective quality rating of Pinotage wine. *Vitis*, **18**: 31-39.

Marais, J. y Pool, H. J. (1980). Effect of storage time and temperature on the volatile composition and quality of dry white table wines. *Vitis*, **19**: 151-164.

Marais, J., (1990). Wine aroma composition. *Food Rev.*, **17**: 18-21.

Martini, A. y Vaughan-Martini, A. (2002) Grape must fermentation: past and present. En: *Yeast Technology*. J.F.T.D.Spencer y M.Spencer, (Eds.). Springer Verlag, Berlin, Germany, pp: 105-123.

Mason, A. B. y Dufour, J. P. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, **16**: 1287-1289.

Masuda, M. y Nishimura, K. (1971). Branched nonalactones from some *Quercus* species. *Phytochem.*, **10**: 1401-1402.

Maundrell, K. (1990). *nmt1* of Fission Yeast. *J. Biol. Chem.*, **265**: 10857-10864.

Mauricio, J. C., Moreno, J. J., Valero, E. M., Zea, L., Medina, M. Y Ortega, J.M. (1993). Ester formation and specific activities of in vitro alcohol acetyltransferase and esterase by *Saccharomyces cerevisiae* during grape must fermentation. *J. Agric. Food Chem.*, **41**: 2086-2091.

Michnick, S., Roustan, J. L., Remize, F., Barre, P. y Dequin, S. (1997). Modulation of glycerol and ethanol yields during alcoholic fermentation in *Saccharomyces cerevisiae* strains overexpressed or disrupted for *GPD1* encoding glycerol 3-phosphate dehydrogenase. *Yeast*, **13**: 783-793.

Mountounet, M. (1969). Biosynthèse des alcools supérieurs des boissons fermentées. *Ann. Technol. Agric.*, **18**: 249-261.

Nagasawa, N., Bogaki, T., Iwamatsu, A., Hamachi, M., Kumagai, C. (1998). Cloning and nucleotide sequence of the alcohol acetyltransferase II gene (*ATF2*) from *Saccharomyces cerevisiae* Kyokai No. 7. *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, **62**: 1852-1857.

Nakagawa, Y., Sakumoto, N., Kaneko, Y. y Harashima, S. (2002). Mga2p is a putative sensor for low temperature and oxygen to induce *OLE1* transcription in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **291**: 707-713.

Nishimura H., Kawasaki, Y., Kaneko, Y., Nosaka, K. y Iwashima, A. (1992). A positive regulatory gene *THI3*, is required for thiamine metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **174**: 4701-4706.

Nishimura H., Kawasaki, Y., Nosaka, K., Kaneko, Y. y Iwashima, A. (1991). A constitutive thiamine metabolism mutation, *thi80*, causing reduced thiamine pyrophosphokinase activity in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.*, **173**: 2716-2719.

Noble, A. C. (1994). Wine flavour. En: *Understanding natural flavour*. J. R. Piggott and A. Patterson. (Ed) Blackie Academic and Profesional, Glasgow, Reino Unido, pp:228-242.

Nordström, K. (1964). Formation of esters from acids by brewer's yeast. *J. Inst. Brew.*, **70**: 42-55.

Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H. y Iwashima, I. (1989). A possible role for acid phosphatase with thiamine-binding activity encoded by *PHO3* in yeast. *FEMS Microbiol. Lett.*, **60**: 55-60.

Nosaka, K., Kaneko, Y., Nishimura, H. y Iwashima, I. (1993). Isolation and characterization of thiamin pyrophosphokinase gene, *THI80*, from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **268**: 17440-17447.

Nosaka, K., Nishimura, H., Kaneko, Y., Ysujihara, T. y Iwashima, A. (1994). Isolation and characterization of the *THI6* gene encoding a

bifunctional thiamine-phosphate pyrophosphokinase/hydroxyethylthiazole kinase from *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **269**: 30510-30516.

Olivera, H., González, A. y Pena, A. (1993). Regulation of the amino acid permeases in nitrogen-limited continuous cultures of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **9**: 1065-1078.

Parkkinen, E. (1980). Multiple forms of carboxylesterases in bakers yeast. *Cell. Mol. Biol.*, **26**: 147-154.

Parkkinen, E. y Soumalainen, H. (1982a). Esterases of bakers-yeast. 2. Substrate specificities towards esters formed during sugar fermentations. *J. Inst. Brew.*, **88**: 34-38.

Parkkinen, E. y Soumalainen, H. (1982b). Esterases of bakers-yeast. 3. The ester/acid ratio in model solutions. *J. Inst. Brew.*, **88**: 98-101.

Peddie, H. A. B., (1990). Ester formation in brewery fermentations. *J. Inst. Brew.*, **96**: 327-331.

Pérez-González, J. A., González, R., Querol, A., Sendra, J. M. Y Ramón, D. (1993). Construction of a recombinant wine yeast expressing β -(1-4)-endoglucanase and its use in microvinification processes. *Appl. Environ. Microbiol.*, **59**: 28001-28006.

Pérez-Torrado, R., Gimeno-Alcaniz, J. V., y Matallana, E. (2002) Wine yeast strains engineered for glycogen overproduction display enhanced viability under glucose deprivation conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, **68**: 3339-3344.

Perry, J. R., Basrai, M. A., Steiner, H. Y., Naider, F. y Becker, J. M. (1994). Isolation and characterization of *Saccharomyces cerevisiae* peptide transport gene. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 104-115.

Piendl, A. y Geiger, E. (1980). Technological factors in the formation of esters during fermentation. *Brew. Dig.*, **55**: 26-35.

Pisarnitskii, A. F. (2001). Formation of wine aroma: Tones and imperfections caused by minor components. *Appl. Biochem. Microbiol.*, **37**: 552- 560.

Pollock, J. R. A. y Weir, M. J. (1975). Adjunct fermentation: volatile substances formed during the fermentation of individual sugars. *J. Am. Soc. Brew. Chem.*, **34**: 70-75.

Pozo-Bayon, M. A., Pueyo, E., Martín-Álvarez, P. J. y Polo, M. C. (2001). Olydimethylsiloxane-solid-phase microextraction-gas chromatography method for the analysis of volatile compounds in wines. *J. Chromatogr. A.*, **922**: 267-275.

Praekelt U., Byrne K. L., Meacock P. A. (1994). Regulation of *THI4* (MOL 1), a thiamine-biosynthetic gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**: 481-490.

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

Pretorius, I. S. (2003) The genetic analysis and tailoring of wine yeasts. En: *Functional Genetics of Industrial Yeasts*. J.H.de Winde (Ed). Springer Verlag, Berlin, Germany, pp:99-134.

Pretorius, I. S. y Bauer, F. F. (2002). Meeting the consumer challenge through genetically customized wine-yeast strains. *Trends Biotechnol.*, **20**: 426-432.

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

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

- Querol, A., Barrio, E., y Ramon, D. (1992a). A Comparative-Study of Different Methods of Yeast-Strain Characterization. *Systematic and Applied Microbiology*, **15**: 439-446.
- Querol, A., Huerta, T., Barrio, E. y Ramón, D. (1992b). Dry yeast for use fermentation of Alicante wines: selection and DNA patterns. *J. Food Sci.*, **57**: 183-185.
- Querol, A., y Ramon, D. (1996). The application of molecular techiques in wine microbiology. *Trends Food Sci. Technol.*, **7**: 73-78.
- Ramey, D. D. y Ough, C. S. (1980). Volatile ester hydrolysis on formation during storage of model solutions and wines. *J. Agric. Food Chem.*, **28**: 928-934.
- Ramón, D. (2004). Presente y futuro de los alimentos transgénicos. *Sistema*, **179-180**: 31-40
- Ramos, E.H., De Bongioanni, L. C. y Stoppani, A. O. M. (1980). Kinetics of L-[¹⁴C] Leucine Transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim. Biophys. Acta*, **599**: 214-231.
- Ramshaw, E. H. y Hardy, P.J. (1969). Volatile compounds in dried grapes. *J. Sci. Food Agric.*, **20**: 619-621.
- Rapp, A., y Mandery, H. (1986). *Wine aroma. Esperientia*, **42**: 873-884.
- Rapp, A. (1998). Volatile flavour of wine: Correlation between instrumental analysis and sensory perception. *Nahrung*, **42**: 351-363.
- Remize, F., Roustan, J. L., Sablayrolles, J. M., Barre, P. y Dequin S. (1999). Glycerol overproduction by engineered *Saccharomyces cerevisiae* wine yeast strains leads to substantial changes in by-product formation and to a stimulation of fermentation rate in stationary phase. *Appl. Environ. Microbiol.*, **65**: 143-149.
- Riberéreau-Gayon, P. (1985) New developments in wine microbiology. *American Journal of Enology and Viticulture*, **36**:1-10.

Riensen, R. (1992). Undesirable fermentation aromas. En: *Wine aroma defects. Proc. Of the ASEV/ES workshop*. T. Henick-Kling. Corning (Ed), NY, America Society of Enology and Viticulture, pp: 1-43.

Robinson, J. (1994). *The Oxford Companion to Wine*. Oxford University Press, Oxford, pp:15.

Roby, J. F. y Whelan, W. J. (1972) Reducing value methods for maltodextrins. I. Chain-length dependence of alkaline 3,5-dinitrosalicylate and chain-length independence of alkaline copper. *Anal. Biochem.*, **45**: 510-516.

Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F. y Manzanares P. (2001). Studies on acetate ester production by non-*Saccharomyces* wine yeast. *Int. J. Food Microb.*, **70**: 283-289.

Rojas, V., Gil, J. V., Piñaga, F., Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. *Int. J. Food Microbiol.*, **86**: 181-188.

Van Rooyen, P. C., De Wet, P., Van Wyk, C. J. y Tromp, A. (1982). Chenin blanc wine volatiles and the intensity of guava-like flavour. *S. Afr. J. Enol. Vitic.*, **3**: 1-7.

Rose M. D., Winston F., Hieter P. (1990). *Methos in yeast genetics: a laboratory course manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York.

Salmon, J. M. y Barre, P. (1998). 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.*, **64**: 3831-3837.

Salo, P. (1970a). Determining the odour thresholds for some compounds in alcoholic beverages. *J. Food Sci.*, **35**: 95-99.

Salo, P. (1970b). Variability of odour thresholds for some compounds in alcoholic beverages. *J. Food Sci.*, **21**: 597-600.

Sambrook, J. y Russell, D. W. (2001) *Molecular Cloning. A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.

Sánchez-Torres, P., González- Candelas, L. y Ramón, D. (1996). Expresión in a wine yeast strain of *Aspergillus niger* *abfB* gene. *FEMS Microbiol. Lett.*, **145**: 189-194.

Sánchez-Torres, P., González-Candelas, L. y Ramón, D. (1998). Heterologous expression of a *Candida molischiana* anthocyanin- β -glucosidase in a wine yeast strain. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 354-360.

Schmidt, A., Hall, M. N. y Koller, A. (1994). Two FK506 resistance-conferring genes in *Saccharomyces cerevisiae* *TAT1* y *TAT2*, encode amino acid permeases mediating tyrosine and tryptophan uptake. *Mol. Cell. Biol.*, **14**: 6597-6606.

Schneider, R., Baumes, R., Bayonove, C. (1998). Volatile Compounds Involved in the Aroma of Sweet Fortified Wines (Vins Doux Naturels) from Grenache Noir. *J. Agric. Food Chem.*, **46**: 3230-3227.

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

Schermers, F. H., Duffus, J. H. y Mcleod, A. M. (1976). Studies on yeast esterase. *J. Inst. Brew.*, **82**: 170-174.

Schulthess, D. y Ettlinger, L. (1978). Influence of the concentration of branched chain amino acids on the formation of fusel alcohols. *J. Inst. Brew.*, **84**: 240-243.

Schweingruber, M.E., Fluri, R., Maundrell, K. y Schweingruber, A-M, Dumermuth E. (1986). Identification and characterization of thiamine-repressible acid phosphatase in yeast. *J. Biol. Chem.*, **261**: 15877-15882.

Simpson, R. F. (1979). Aroma compositional of bottle aged white wine. *Vitis*, **1**: 148-154.

Simpson, R. F. y Miller, G. C. (1983). Aroma composition of aged Riesling wine. *Vitis*, **22**: 51-63.

Soles, R. M., Ough, C. S. y Kunkee, R. E. (1982). Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeast. *Am. J. Enol. Vitic.*, **33**: 94-98.

Stanbrough, M. y Magasanik, B. (1995). Transcriptional and posttransductional regulation of the general amino acid permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bact.*, **177**: 94-102.

Stevens, K. L., Bomben, J. L. y Mc Fadden, W. H. (1967). Volatiles from grapes. *Vitis vinifera* (Linn) cultivar Grenache. *J. Agric. Food Chem.*, **15**: 378-380.

Soumalainen, H. (1981). Yeast esterases and aroma esters in alcoholic beverages. *J. Inst. Brew.*, **87**: 296-300.

Tschopp, J., Esmon, P. C. y Schekman, R. (1984). Defective plasma membrane assembly in yeast secretory mutants. *J. Bacteriology*, **160**: 966-970.

Vas, G., Kótelery, K., Farkas, M., Dobó, A. y Vékey, K. (1998). Fast screening method for wine headspace compounds using solid-phase microextraction (SPME) and capillary GC technique. *Am. J. Enol. Vitic.*, **49**: 100-104.

Velasco, I., Tendreiro, S., Calderon, I., L., Bruno, A. (2004). *Saccharomyces cerevisiae* Aqr1 is an internal membrane transporter involved in excretion of amino acids. *Eucar, Cell*, **3**: 1492-1503.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M. y Delvaux, F. R. (2003a). The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gen *ATF1* is a target

of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast Res.*, **4**: 285-296.

Verstrepen, K. J., Van Laere, S. D. M., Vanderhaegen, B. M. P., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M. y Delvaux, F. R. (2003c). Expression levels of the yeast alcohol acetyltransferase genes *ATF1*, *Lg-ATF1* and *ATF2* control the formation of broad range of volatile esters. *Appl. Envir. Microbiol.*, **69**: 5228-5237.

Verstrepen, K. J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Winderickx, J., Thevelein, J. M., Pretorius, I. S. y Delvaux, F. R. (2003b). Flavor-Active Esters: Adding Fruitiness to Beer. *J. Biosci. Bioeng.*, **96**: 110-118.

Verstrepen, K.J., Van Laere, S. D. M., Vercammen, J., Derdelinckx, G., Dufour, J. P., Pretorius, I. S., Winderickx, J., Thevelein, J. M., y Delvaux, F. R. (2004). The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase Atf1p is localized in lipid particles. *Yeast*, **21**: 367-377.

Veziñhet, F., Hallet, J. N., Valade, M., y Poulard, A. (1992) Ecological survey of wine yeast strains by molecular methods of identification. *Am. J. Enol. Vitic.*, **43**: 83-86.

Vianna, E. y Ebeler, S. (2001). Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *J. Agric. Food Chem.*, **49**: 589-595.

Vollbrecht, D. y Radler, F. (1973). Formation of higher alcohols by amino acids deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. I. The decomposition of amino acids to higher alcohols. *Arch. Microbiol.*, **94**: 351-358.

Vuralhan, Z., Morais, M. A., Tai, S. L., Piper, M. D. W. y Pronk, J. T. (2003). Identification and characteritazation of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Env. Microbiol.*, **69**: 4534-4541.

Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R. y Philippsen, P. (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **10**: 1793-1808.

Wainer, S. R., Boceris, A. y Ramos, E. H. (1988). Control of leucine transport in yeast by periplasmic binding proteins. *Arch. Biochem. Biophys.*, **262**: 481-490.

Wiame, J. M., Grenson, M. y Arts, H. N. (1985). Nitrogen catabolite repression in yeast and filamentous fungi. *Advan. Microbiol. Physiol.*, **26**: 1-88.

Van Wik, C. J., Augustyn, O. P. H., De Wet, P. y Joubert, W.A. (1979). Isoamilacetate—a key fermentation volatile of wines of *Vitis vinifera* cv Pinotage. *Am. J. Enol. Vitic.*, **30**: 167-173.

Winterhalter, P., Sefton, M. y Williams, P. (1990). Two-dimensional GC-DCCC analysis of the glycoconjugates of monoterpenes, norisoprenoids and shikimate-derived metabolites from Riesling wine. *J. Agric. Food Chem.*, **38**: 1041-1048.

Whormann, K. y Lange, P. (1980). The polymorphism of esterases in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Bew.*, **86**: 174-179.

Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T., Sakai, Y., Okawa, K., Iwamatsu, A., Sone, H. y Tamai, Y. (2001). Pyruvate decarboxylase encoded by the *PDC1* gene contributes at least partially, to the decarboxylation of α -ketoisocaproate for isoamyl alcohol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosoc. Bioeng.*, **92**: 83-85.

Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonozawa, T. and Sone, H. (2002). Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **59**: 501-508.

Yoshioka, K. y Hashimoto, H. (1981). Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewer's yeast. *Agric. Biol. Chem.*, **45**: 2183-2190.

Yoshioka, K. y Hashimoto, H. (1983). Cellular fatty acid and ester formation by brewer's yeast. *Agric. Biol. Chem.*, **43**: 2287-2294.

Yoshioka, K. y Hashimoto, N. (1984). Acetyl-CoA of brewer's yeast and formation of acetate esters. *Agric. Biol. Chem.*, **48**: 207-209

Zhu, X., Garret, J., Schreve, J. y Michaeli, T. (1996). *GNP1*, the high-affinity glutamine permease of *Saccharomyces cerevisiae*. *Curr. Genet.*, **30**: 107-114.

Zoecklein, B. W., Fugelsang, K. C., Gump, B. H. y Nury, F. S. (1995). Alcohol and extract. En: *Wine analysis and production*. The Chapman and Hall Enology Library. pp: 97-114.