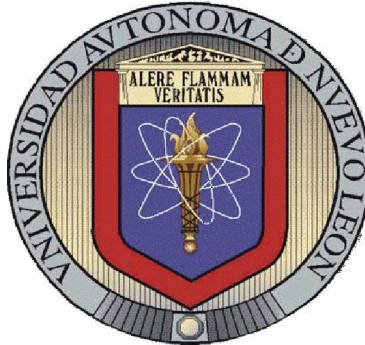


Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Ciencias Biológicas

Instituto de Biotecnología

RC-07-098



Análisis de la expresión genética en la síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo en *Saccharomyces cerevisiae*, en distintas condiciones de fermentación en el proceso cervecero.

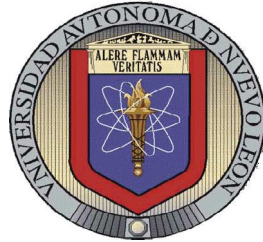
Por

QFB. Gabriela Alejandra Quintero Vásquez

Como requisito parcial para obtener el Grado de  
Maestría en Ciencias con Acentuación en Microbiología

Universidad Autónoma de Nuevo León  
Facultad de Ciencias Biológicas  
Instituto de Biotecnología

RC-07-098



Análisis de la expresión genética en la síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo en *Saccharomyces cerevisiae*, en distintas condiciones de fermentación en el proceso cervecero.

QFB. Gabriela Alejandra Quintero Vásquez

Comité de Tesis

Presidente

Dr. Benito Pereyra Alférez

\_\_\_\_\_

Secretario

Dr. Carlos E. Hernández Luna

\_\_\_\_\_

Vocal

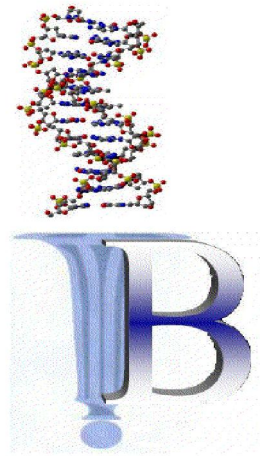
Dr. Luis J. Galán Wong

\_\_\_\_\_

Asesor Externo

Dr. Luis Cástulo Damas Buenrostro

\_\_\_\_\_



El presente trabajo de tesis fue desarrollado en el Laboratorio 4 del Instituto de Biotecnología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León bajo la dirección del Dr. Benito Pereyra Alférez en colaboración con el laboratorio de Microbiología de Oficina central en Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma - Monterrey a cargo del Dr. Luis Cástulo Damas Buenrostro

## **DEDICATORIA**

*A ti mamá, por todo el apoyo incondicional desde que supiste mi deseo por alcanzar otra de mis metas. Esto es el fruto de lo que siempre me has enseñado.*

*Gracias porque siempre, aunque lejos, has estado a mi lado.*

*Te amo.*

*A mi hermano, Yuré, por todo tu apoyo y buenos consejos. Eres el mejor gran hermano que una gran hermana puede tener.*

*A ti mi amor, Luis, que a pesar de la distancia me apoyaste en cada momento, gracias por tu paciencia y comprensión para alcanzar mis metas.*

## AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial al Dr. Benito Pereyra por brindarme la oportunidad de formar parte de su grupo de investigación y ofrecerme este proyecto tan maravilloso. Agradezco su apoyo, comentarios, sugerencias y correcciones con las que he podido crecer personal y profesionalmente, pero sobre todo le agradezco su amistad.

Mil gracias Al Dr. Luis Damas, que con su gran calidad científica y humana me abrió las puertas de su laboratorio en cervecería. Le agradezco sinceramente su confianza, apoyo y disposición permanente e incondicional. Gracias por darme la oportunidad de crecer en mi formación como investigadora.

A sí mismo, quiero agradecer a mi comité de tesis al Dr. Carlos Hernández y al Dr. Luis Galán por sus comentarios, ya que siempre enriquecieron este trabajo. También les agradezco la disponibilidad que siempre mostraron para ayudarme a conseguir esta meta.

A Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma, por permitirme realizar parte de este proyecto en sus instalaciones, pero especialmente al laboratorio de Química Analítica, Evaluación sensorial y Planta Experimental por el apoyo en la realización de las pruebas especiales.

Agradezco el apoyo económico otorgado por CONACYT a través de la beca durante toda la maestría.

A Clara Leal, Astrid Espino, Jessica Herrera y Claudia López, mil gracias por todos los momentos que hemos pasado juntas, por su valiosa amistad, por poder hacer del trabajo de todos los días un espacio para compartir alegrías, tristezas, problemas y proyectos, gracias por su apoyo durante todo el tiempo que estuve en el laboratorio del Instituto.

A Juan Rodríguez y Mirza Sandoval, por su especial apoyo, su ayuda en muchas ocasiones y por todas las conversaciones y los buenos momentos de amistad y compañerismo que compartimos en el laboratorio de cervecería.

A Gilberto Rodríguez y Eurídice Muñiz por su valiosa ayuda en la realización de este proyecto, son excelentes estudiantes.

A Alejandra, Rigoberto y Yuré por su amor, comprensión y apoyo incondicional, sin ustedes no hubiera sido posible.

A todos los que de alguna manera tuvieron que ver en la realización de este proyecto y a todos los que están por leer esta tesis que fue mi vida durante dos años.

El hombre encuentra a Dios detrás de cada puerta que la ciencia logra abrir.  
Einstein

Sabio hombre el que inventó la cerveza.

Platón

Para la ciencia hay que tener mucha paciencia.

Gabriela Quintero

## TABLA DE CONTENIDO

<b>Sección:</b>	<b>Página</b>
LISTA DE TABLAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
NOMENCLATURA	Vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	3
3. OBJETIVOS	3
3.1 Objetivo general	3
3.1 Objetivos particulares	3
4 ANTECEDENTES	4
4.1 Proceso de elaboración de la cerveza.	4
4.2 La importancia del aroma en la cerveza.	5
4.3 Características de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	6
4.4 Características de alcoholes superiores y ésteres en la fermentación.	7
4.5 Biosíntesis de alcoholes superiores y ésteres en la fermentación	9
4.6 Genética y regulación en la producción de acetato de etilo e isoamilo.	16
5 MÉTODOS	20
5.1 Cepas	20
5.2 Mosto	20
5.3 Fermentaciones	20
5.4 Microarreglos	21
5.5 Diseño de oligonucleótidos	21
5.6 Extracción de ADN genómico y ARN total	21
5.7 Cuantificación de ADN y ARN	22
5.8 Reacción en cadena de la ADN polimerasa PCR punto final	22
5.9 Electroforesis.	22
5.9.1 Electroforesis en gel de agarosa	22
5.9.2 Electroforesis en gel de agarosa con formaldehído	23

5.10	Obtención de cADN.	23
5.11	Análisis de expresión génica por PCR Tiempo Real (qPCR)	23
6	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.	25
6.1	Análisis de microarreglos.	25
6.2	Diseño de oligonucleótidos.	33
6.3	Diseño de fermentaciones.	35
6.4	Identificación de genes	39
6.4.1	Extracción de ácidos nucleicos.	39
6.4.2	Electroforesis en gel de agarosa.	39
6.5	Expresión genética por qPCR	43
6.5.1	Eficiencia de la reacción de PCR.	43
6.5.2	Análisis de expresión en la curva temporal de fermentación.	44
6.5.3	Análisis de expresión en las condiciones experimentales.	49
6.5.3.1	Condición experimental: Temperatura de fermentación y temperatura de arranque.	49
6.5.3.2	Condición experimental: Composición del mosto.	57
6.5.3.3	Condición experimental: Oxigenación.	60
7	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	66
	APÉNDICES	68
A)	Soluciones y Medios de cultivo.	68
B)	Conteo de células	71
C)	Vitalidad y viabilidad de levadura mediante microcultivo.	71
D)	Extracción de ADN genómico.	72
E)	Extracción de ARN total	72
F)	Cuantificación de DNA y RNA	73
G)	Elaboración de microarreglos.	74
H)	Extracción de ARN con Tripure (Roche Applied Science).	76
	LITERATURA CITADA	77
	RESÚMEN BIBLIOGRÁFICO	81
	GLOSARIO	82



## LISTA DE TABLAS

<b>Tabla</b>		<b>Página</b>
I	Características aromáticas de acetato de etilo e isoamilo durante los procesos de fermentación alcohólica	6
II	Características de los genes que participan en la ruta biosintética de acetato de etilo y acetato de isoamilo	12
III	Descripción de genes que participan en la ruta biosintética de acetato de etilo y acetato de isoamilo.	13
IV	Condiciones del termociclador para la detección de amplicones por qPCR.	24
V	Condiciones de las fermentaciones para el análisis de microarreglos.	25
VI	Valores de z-score y expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de acetato de etilo e isoamilo. + inducido, - reprimido, SC sin cambio.	31
VII	Características de los oligonucleótidos diseñados	33
VIII	Diseño de fermentaciones. Condición control.	35
IX	Diseño de fermentaciones. Condición experimental: Oxigenación.	35
X	Diseño de fermentaciones. Condición experimental: Temperatura de arranque	35
XI	Diseño de fermentaciones. Condición experimental: Temperatura de fermentación	36
XII	Diseño de fermentaciones. Condición experimental: Composición de mosto.	36
XIII	Curso temporal de las fermentaciones, células en suspensión, análisis microbiológico y vitalidad.	37
XIV	Eficiencias de cada par de oligonucleótidos diseñados.	44
XV	Resultado del análisis de acetato de etilo y acetato de isoamilo en la curva temporal de fermentación para las cepas 790 y 820.	45
XVI	Determinación de las condiciones experimentales evaluadas.	46
XVII	Resultados de los análisis de los mostos y fermentaciones, en la condición composición de mosto.	57

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>		<b>Página</b>
1	Producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo a partir de un alcohol superior y Acetil-CoA.	11
2	Síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo. Ruta metabólica desde Piruvato hasta la producción de ésteres de acetato, y la biosíntesis de acetil CoA y Acetato.	15
3	Imágenes del resultado del análisis del software GenArise, tomando como criterio un valor Z score de $\pm 1.5$ A) Cepa 790 B) Cepa 820	26
4	Resultado del análisis global de los microarreglos, de la cepa 790 y 820. Genes inducidos, reprimidos y sin cambio	26
5	Imágenes del análisis global de los microarreglos en el programa KEGG2 para las cepas 790 (Panel A) y 820 (Panel B). Genes inducidos (negro), genes reprimidos (rojo). La flecha indica la biosíntesis del metabolismo de los aminoácidos y la ruta biosintética de acetato de etilo y acetato de isoamilo.	28
6	Resultado del análisis mediante el software de FatiGO de los principales procesos biológicos de los genes que mostraron cambios significativos en su expresión para las cepas 790 (Panel A) y 820 (Panel B).	29
7	Expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de acetato de etilo e isoamilo en los análisis de microarreglos.	32
8	Curso temporal de las células en suspensión del proceso de fermentación. Condiciones: Panel A) control, Panel B) oxigenación, Panel C) temperatura de arranque y Panel D) temperatura de fermentación	38
9	Electroforesis en gel de agarosa al 1% de Panel A) ADN <sub>g</sub> con marcador de 1 kb y Panel B) RNA total (Las figuras presentan inversión de color).	40
10	Visualización de los productos de PCR para distintos genes. ADH1, ADH2, ADH3, ADH4, ADH5, BAT1, BAT2, SFA1, LEU1, LEU2, LEU3, LEU4, LEU9, PDC1, PDC5, PDC6. Cepas 790 y 820.	41
11	Visualización de los productos de PCR para distintos genes. ADH1, ACT, ATF1, ATF2, ARO10, THI3, ILV2, ILV5, ILV6, PDB1, LPD1, PDA1, ACH1, LAT1, IRC15, ACS1. Cepas 790 y 820.	42
12	Resultado del patrón de expresión en la curva temporal de fermentación de la cepa 790, en genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo. ( $\sigma \pm$ Desviación estándar).	46
13	Resultado del patrón de expresión en la curva temporal de fermentación de la cepa 820, en genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo. ( $\sigma \pm$ Desviación estándar).	47

14	Porcentaje de expresión de cada gen relacionado en la producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo en la curva temporal del proceso de fermentación. Cepas 790 (Panel A) y 820 (Panel B).	48
15	Expresión relativa de la condición experimental: Temperatura de fermentación en la cepa 790 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.	52
16	Expresión relativa de la condición experimental: Temperatura de fermentación en la cepa 820 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.	52
17	Expresión relativa de la condición experimental: Temperatura de arranque en la cepa 790 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.	53
18	Expresión relativa de la condición experimental: Temperatura de arranque en la cepa 820 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.	53
19	Resultados de la expresión relativa (RQ), en los genes relacionados a la síntesis de acetato de etilo e isoamilo en las condiciones de temperatura, que presentaron una expresión mayor a diez veces con respecto a la condición control. Inserto análisis químicos y sensoriales (menos valor menos aroma frutal) ND=No determinado	56
20	Expresión relativa de la condición experimental: Composición del mosto en la cepa 790 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.	59
21	Expresión relativa de la condición experimental: Composición del mosto en la cepa 820 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.	59
22	Expresión relativa de la condición experimental: Oxigenación en la cepa 790 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.	62
23	Expresión relativa de la condición experimental: Oxigenación en la cepa 820 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.	62
24	Resultados de la expresión relativa (RQ), en los genes relacionados a la síntesis de acetato de etilo e isoamilo en la condición de oxigenación, que presentaron una expresión mayor a diez veces con respecto a la condición control.	65

## NOMENCLATURA

%GC	Porcentaje de guanina-citosina
°C	Grado Celsius
°P	Grado plato
Acetil-CoA	Acetil Coenzima A
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNg	Ácido desoxirribonucleico genómico
ARN	Ácido ribonucleico
ATP	Adenosina trifosfato
cADN	Ácido desoxirribonucleico complementario
cel/mL	Células por mililitro
Chr	Cromosoma
Cp	Punto de corte
DEPC	Pirocarbonato de dietilo
dNTP	Desoxinucleósido trifosfato
EDTA	Acido etilendiaminotetracético
FAN	Amino nitrógeno libre
g	Gramos
G	Fuerza centrífuga
Kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litro
M	Concentración molar
Milli Q	Agua ultradestilada
Min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
MOPS	Ácido (3-[N-morfolino]) propano sulfónico
NADH	Nicotinamida adenina dinucleótida
Pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de hidrógeno
Ppm	Partes por millón
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
RQ	Expresión relativa
SDS	Dodecilsulfato sódico.
Tris	(Hidroximetil) Aminometano Clorhidrato
V	Voltios
YPD	Agar glucosa-peptona-extracto de levadura
µg/L	Microgramo por litro

## RESUMEN

Se considera que la etapa más importante en el proceso cervecero es la fermentación, donde la levadura sintetiza compuestos volátiles que constituyen el perfil aromático de las bebidas alcohólicas. Entre estos compuestos se encuentran los alcoholes y ésteres, siendo acetato de etilo y acetato de isoamilo los más importantes sensorialmente. Estos compuestos se generan por la actividad de ciertos genes y aunque se han realizado avances en la investigación y se sabe que la producción de ésteres es influenciada por aspectos tales como: cepa, composición del mosto, temperatura, presión, cantidad de inóculo y oxígeno disuelto; aun se desconocen los niveles de expresión e interacción de estos genes en distintas condiciones de fermentación industrial. En este trabajo determinamos el nivel de expresión de los genes relacionados a la biosíntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo en las cepas tipo lager 790 y 820. Las levaduras fueron sometidas a las siguientes condiciones experimentales: a) composición de mosto (35% - 50% malta); b) temperatura de fermentación (12.5°C - 17.5°C); c) temperatura de arranque (8.5°C - 12.5°C); y d) oxigenación (25 ppm - 35 ppm) El análisis global del transcriptoma fue obtenido por microarreglos de ADN y verificado por qPCR. Analizamos la transcripción de 32 genes implicados en la biosíntesis de ambos acetatos, partiendo de piruvato y la incorporación de valina y leucina, la producción de alcoholes superiores y la biosíntesis de acetyl CoA. Los resultados de los microarreglos revelaron diferencias importantes en los patrones de expresión genética en ambas cepas en diversas rutas metabólicas. Sin embargo, el impacto en la síntesis de los acetatos fue diferente. La composición del mosto no influyó, de manera significativa, en la transcripción de la ruta biosintética analizada. Sin embargo, cuando la temperatura de fermentación se mantuvo a 12.5°C, la cepa 790 sobre expresó los genes ILV2, LEU4, LEU9, BAT1 responsables de la incorporación de valina y leucina para la biosíntesis de acetato de isoamilo. El resultado con la cepa 820 fue distinto, observándose sobre expresión en cinco genes de alcohol deshidrogenasas, ADH1, ADH3, ADH4, ADH5 y SFA1 encargadas de catalizar el paso final en la formación de los compuestos alcohólicos derivados de aminoácidos ramificados. Otro gen sobre expresado fue el ATF1, el cual se encuentra expresado en ambas cepas, sugiriendo que cuando la fermentación se inicia a temperaturas relativamente altas, y posteriormente se disminuye, hay un incremento en la producción de ésteres que afecta la actividad de las AATase. En cuanto a la condición de oxigenación ambas cepas producen mayor cantidad de ésteres cuando se oxigena el mosto a 25 ppm, los genes que codifican las enzimas acetiltransferasa, se expresan en ambas cepas determinando que el oxígeno ejerce una influencia a través del crecimiento de la levadura y por lo tanto de la disponibilidad de acetyl-CoA, ya que los genes PDB1 y LAT1 involucrados en el complejo multienzimático de la síntesis de piruvato a acetyl Co-A, muestran expresión en las dos cepas, observándose que el oxígeno directamente está reprimiendo la expresión de los genes que codifican AATase. Nuestros resultados demuestran que la producción de ésteres depende, especialmente de la constitución genética de cada cepa y de su interacción con las distintas condiciones de fermentación.

## ABSTRACT

It is considered that the most important stage in the beer process is fermentation, where yeast synthesizes volatile compounds that constitute the aromatic profile of the alcoholic drinks. Between these compounds are alcohols and esters, being an acetate of ethyl and acetate of isoamyl the most important sensory. These compounds are generated by the activity of certain genes, and although progress has been made in the investigation and it is known that the production of esters is influenced by factors such as strain, wort composition, temperature, pressure, amount of inoculum and dissolved oxygen; still unknown levels of expression and interaction of these genes in different industrial fermentation conditions. In this paper we determine the level of expression of genes related to the biosynthesis of ethyl acetate and isoamyl acetate in the strains type lager 790 and 820. The yeasts were submitted to the following experimental conditions: a) composition of wort (35% - 50% malt), b) fermentation temperature (12.5 ° C - 17.5 ° C), c) starting temperature (8.5 ° C - 12.5 ° C) and d) oxygen (25 ppm - 35 ppm). The global analysis of the transcriptome was obtained by DNA microarray and verified for qPCR. We analyzed the transcription of 32 genes involved in biosynthesis of both acetates, starting of pyruvate and the incorporation of valine and leucine, the production of higher alcohols and the biosynthesis of acetyl CoA. The microarray results revealed significant differences in gene expression patterns in both strains in different metabolic pathways. However, the impact on the synthesis of acetates was different. The composition of the wort did not influence significantly in the transcription of the biosynthetic pathway analysis. However, when fermentation temperature was maintained at 12.5 ° C, strain 790 expressed the genes *ILV2*, *LEU4*, *LEU9*, *BAT1* responsible for the incorporation of valine and leucine for the biosynthesis of isoamyl acetate. The result with the strain 820 was different, showing over-expression of five genes of alcohol dehydrogenase, *ADH1*, *ADH3*, *ADH4*, *ADH5* and *SFA1* responsible for catalyze the final step in the formation of the alcoholic compounds derived from branched amino acids. Another gene was overexpressed was the *ATF1*, which is expressed in both strains, suggesting that when fermentation starts at relatively high temperatures, and then decreases, there is an increase in the production of esters which affects the activity of AATase. As for the condition of oxygenation both strains produce more esters when the wort is oxygenated to 25 ppm, the genes encoding the acetyltransferase enzymes are expressed in both strains determining that the oxygen has an influence through the growth of yeast and therefore the availability of acetyl-CoA, the genes *PDB1* y *LAT1* involved in the multienzyme complex of the synthesis of pyruvate to acetyl Co-A, show expression in both strains, being observed that oxygen directly suppressing the expression of genes that encode AATase. Our results demonstrate that the production of esters depends in particular on the genetic constitution of each strain and their interaction with different fermentation conditions.

## 1.- INTRODUCCIÓN

La cerveza es una bebida alcohólica resultante de fermentar mediante levadura seleccionada, el mosto elaborado con malta de cebada, arroz, maíz, lúpulo y agua; se dice que es una de las bebidas más antiguas que existe ya que su origen se remonta a la prehistoria. Actualmente la industria cervecera ha logrado un gran desarrollo, sin embargo se ha enfrentado con problemas relacionados en la optimización del proceso cervecero en cuanto a la calidad sensorial del producto (Klimovitz, 2002).

Los atributos que más condicionan la aceptabilidad de un producto por parte del consumidor son los relacionados con la calidad sensorial que incluye la apariencia, la textura, el aroma y el gusto. Siendo el aroma, el aspecto más complejo y determinante en la calidad, se asocia exclusivamente con el olor, compuesto por centenares de compuestos que pertenecen a distintas familias químicas y que se encuentran en concentraciones muy variable entre los que podemos encontrar ácidos orgánicos, alcoholes, ésteres, carbonilos y compuestos de azufre, siendo los ésteres y principalmente acetato de etilo y acetato de isoamilo, los que contribuyen de manera importante en las propiedades sensoriales de la cerveza y que son sintetizadas durante la fermentación, resultado del metabolismo de la levadura (Meilgaard, 2001).

Se considera que la etapa más importante en el proceso de elaboración de la cerveza es durante la fermentación alcohólica, donde la levadura cervecera utiliza los azúcares reductores (sacarosa, fructosa, glucosa, maltosa y maltotriosa), presentes en el mosto para producir etanol, dióxido de carbono y, en paralelo, toda una serie de compuestos secundarios volátiles y semivolátiles que son capaces de difundir la membrana celular y de constituir el perfil aromático de las bebidas alcohólicas (Boulton y Quain, 2003).

Son muchos los factores que pueden afectar la producción de ésteres durante la fermentación alcohólica, la concentración final de un éster dependerá de su formación y degradación durante las etapas de fermentación. Los factores clave para la concentración final de ésteres de acetato son: la cantidad de sustrato disponible, relación de actividad entre las enzimas de síntesis y las de degradación (Mauricio *et al.*, 1993) y ciertos parámetros de fermentación, tales como la temperatura, presión, diseño geométrico del

fermentador, tipo y condición fisiológica de la cepa, cantidad de inóculo, oxígeno disuelto y composición del mosto (Anderson y Kirsop, 1975; Thurston *et al.*, 1982; Dufour *et al.*, 2003).

Los alcoholes superiores presentan gran relevancia al ser los compuestos precursores de los ésteres de acetato (Soles *et al.*, 1982), ya que se sabe que para la producción de ésteres su mecanismo de síntesis consiste en la condensación química entre un alcohol superior y un ácido, en donde se requiere la catálisis de una enzima implicada en este proceso que se denominan acetiltransferasa (Verstrepen *et al.*, 2003).

Sin embargo, la ausencia de un conocimiento y control general sobre la síntesis de los compuestos volátiles en diferentes condiciones de fermentación representa un problema en la industria cervecera, siendo importante poder caracterizar los niveles de expresión de los genes involucrados en la síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo en diferentes condiciones de fermentación, ya que aun es muy limitado el conocimiento de estos mecanismos en el proceso industrial cervecero.

Es por ello que nos generamos las siguientes preguntas: ¿La expresión de los genes implicados en la biosíntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo, es la misma para ambas cepas?, ¿Cómo se ve afectado el nivel de expresión de los genes implicados en la producción de esterres de acetato en las distintas condiciones del proceso de fermentación? ¿Qué otros genes presentan importancia en su expresión en las distintas condiciones de fermentación? ¿Qué condición favorece la producción de esterres de acetato y qué impacto se está observando en la expresión génica?. Actualmente se carece de información sobre la expresión de los genes implicados en la biosíntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo, en las condiciones de oxigenación, temperatura de arranque, temperaturas de fermentación y composición del mosto por lo que el estudio de la expresión génica nos ayudara a entender la manera de cómo estos modulan la expresión de dichos genes, lo que conducirá a un manejo más racional de los procesos de fermentación.



## **2.- HIPÓTESIS**

Variables en las condiciones de fermentación en el proceso cervecero afectan de manera distinta los niveles de expresión en los genes involucrados en la síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo.

## **3.- OBJETIVOS**

### **3.1 Objetivo general**

Cuantificar la expresión de genes implicados en la síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo en diferentes condiciones del proceso de fermentación en levaduras cerveceras tipo lager.

### **3.2 Objetivos particulares**

- ❖ Diseñar diferentes condiciones de proceso de fermentación que impactan en la producción de compuestos volátiles principalmente alcoholes y ésteres.
- ❖ Realizar un análisis transcripcional de las levaduras 790 y 820, por medio de microarreglos en condiciones del proceso que afectan la producción de compuestos volátiles.
- ❖ Diseño de oligonucleótidos específicos para evaluar la presencia de los genes seleccionados en la síntesis de los ésteres y alcoholes superiores.
- ❖ Cuantificar la expresión genética mediante la reacción en cadena de la polimerasa (qPCR).
- ❖ Comparar los resultados de las expresiones genéticas, los análisis sensoriales y los análisis analíticos para determinar la producción de acetato de etilo e isoamilo bajo diferentes condiciones de fermentación.

## 4.- ANTECEDENTES

### 4.1 Proceso de elaboración de la cerveza.

La fabricación de la cerveza es una industria muy antigua que usa la malta que es el grano de cebada que se convierte en los hidratos de carbono, dextrina y maltosa (Kramer, 2006), que ha sido sometido al proceso de remojo, germinación y secado. Dentro de la elaboración de la cerveza también se agregan adjuntos que son ingredientes utilizados como fuente de almidones que no son malta, entre los principales adjuntos utilizados en la industria cervecera se encuentran: maíz, arroz, trigo y sorgo. Esto se somete a un cocimiento con el objetivo de producir el mosto, dentro del cocedor se colocan todos los ingredientes, para ser acondicionados en una solución acuosa con el auxilio de enzimas y temperatura.

El macerado obtenido se coloca junto con agua (el agua se considera de suma importancia en la elaboración de la cerveza ya que más del 90% de la cerveza es agua) y con el efecto de la temperatura y las enzimas, los almidones son transformados en azúcares. Por efecto de las amilasas de la malta todos los almidones se convierten en azúcares simples, enriqueciendo la concentración de sólidos disueltos (Grado plato, °P), al que se le llama mosto. Al líquido procedente del macerado se le remueve la cascarilla proveniente de la malta por medio de un filtro.

En la olla de cocimientos se calienta el mosto hasta la temperatura de ebullición y se adiciona el lúpulo que es la flor hembra sin fecundar de la planta *Humulus lupulus*. El lúpulo es un ingrediente que proporciona el sabor amargo y aroma a la cerveza, también se sabe que las resinas del lúpulo inhiben el crecimiento de la mayoría de las bacterias lo cual permite mantener la fermentación libre de contaminación ayudando a conservar las características de la cerveza (Sidor, 2006). El mosto es enfriado y aereado para proporcionarle oxígeno a la levadura al inicio de la fermentación.

La fermentación alcohólica es el proceso de transformar los azúcares en etanol y dióxido de carbono. Es en este punto donde se lleva a cabo la inoculación del mosto con la levadura que pertenece al género *Saccharomyces*, la fermentación ha sido considerada el paso más importante y complejo, se sabe que los productos desarrollados durante la fermentación impactan el sabor y aroma final de la cerveza.

Desde el punto de vista del tipo de fermentación la cerveza se ha clasificado en: levaduras bajas, que se emplean comúnmente en la elaboración de la cerveza lager donde la levadura desciende al fondo del fermentador, mientras la fermentación se acerca a su término y en levaduras altas, empleadas en las cervezas inglesas ale y que se concentran en la parte superior del fermentador (Hardwick, 1995). Actualmente las levaduras lager se denominan *S. cerevisiae* var. *uvarum* mientras que las ale se identifican como *S. cerevisiae* var. *cerevisiae* (Priest y Campbell, 1987).

En esta última etapa la cerveza entra a la etapa de maduración, terminando este proceso el líquido es enviado a filtración y finalmente a las líneas de envasado.

#### **4.2 La importancia del aroma en la cerveza**

Se considera que la etapa más importante en el proceso de elaboración de la cerveza es durante la fermentación alcohólica, donde la levadura reduce el 95% de azúcar a etanol y dióxido de carbono, 1% es utilizado por la célula para generar su propio material celular y el 4% restante se convierte en compuestos volátiles, que son los responsables de las características sensoriales de la cerveza. Dentro de este grupo se incluyen dos tipos de compuestos relevantes, los alcoholes y los ésteres (Mountounet, 1969; Verstrepen, 2003).

El aroma es considerado como una de las propiedades más importantes en la calidad de la cerveza, ya que es uno de los factores determinantes para la aceptación del producto por el consumidor. El aroma se puede definir como la sensación global producida por los compuestos que interaccionan con las terminaciones nerviosas sensitivas del gusto y del olfato. El aroma se asocia exclusivamente con el olor, compuesto por centenares de compuestos volátiles y semivolátiles que pertenecen a distintas familias químicas y que se encuentran en muy variables concentraciones entre los que podemos encontrar ácidos orgánicos, alcoholes, ésteres, carbonilos y compuestos de azufre, que son sintetizadas durante la fermentación (Meilgaard, 1999).

Los ésteres volátiles constituyen el grupo más importante en los compuestos aromáticos en la cerveza y principalmente el acetato de etilo y acetato de isoamilo. (Heggart *et al.*, 1999) (Tabla I).

Tabla I: Características aromáticas de acetato de etilo e isoamilo durante los procesos de fermentación alcohólica

Ester	Concentración (mg/l)	Umbral de detección (mg/l)	Aroma
Acetato de etilo	10-100	15-20	Barniz, Disolvente
Acetato de isoamilo	0.003-8.1	0.026	Plátano, Pera

### 4.3 Características de *Saccharomyces cerevisiae*.

La levadura de cerveza, *Saccharomyces cerevisiae*, es un microorganismo eucariota unicelular, se consideran organismos facultativos anaeróbicos, esto es que pueden sobrevivir y crecer con o sin oxígeno y son responsables de convertir los azúcares fermentables en alcohol y otros subproductos (Goldammer, 2000). Las levaduras cerveceras son capaces de asimilar una amplia variedad de carbohidratos como glucosa, fructosa, sacarosa, maltosa, maltotriosa y trehalosa. El orden de absorción de los azúcares por parte de la levadura, generalmente inicia con la glucosa continúa con la fructosa y finalmente los monosacáridos y al igual que en el caso de los azúcares la asimilación de compuestos nitrogenados por parte de la levadura también es en forma ordenada (Stewart y Russell, 1993).

*S. cerevisiae* es un sistema genético que a diferencia de la mayoría de otros microorganismos, presenta dos fases biológicas estables: haploide y diploide. El ciclo de vida puede ser asexual (por gemación) como es el caso de levaduras cerveceras y donde una célula puede dar lugar a más de 30 gemas a lo largo de su vida, y sexual (por ascosporas) como son las levaduras de panificación (Hough *et al.*, 1982)

Una levadura haploide contiene 16 cromosomas variando en tamaño de 200 a 2200 Kpb, en los cuales como resultado del análisis de la secuencia del genoma, se localizaron un total de 6183 marcos de lectura abiertos (ORF, Open Reading Frame) y se predijo que de éstos, 5800 corresponde a genes que codificaban para proteínas. El tamaño promedio de los genes de levadura es de 1.45 kpb, o 483 codones, y solamente el 3.8% de los ORFs contienen intrones (Dujon, 1996).

Aproximadamente el 30% de los genes se han caracterizado experimentalmente; y del 70% restante aún no se conoce por completo su función. El ARN ribosomal se encuentra codificado por 120 copias repetidas y arregladas en tandem en el cromosoma,

en tanto que existen 262 genes que codifican para ARNs de transferencia, 80 de los cuales poseen intrones. Los cromosomas contienen elementos movibles, retrotransposones, que varían en número y posición en las diferentes cepas de *S. cerevisiae* (Mewes *et al.*, 1997).

#### **4.4 Características de alcoholes superiores y ésteres en la fermentación.**

La levadura *S. cerevisiae* usa una amplia variedad de nutrientes que puede encontrar en su hábitat natural o sintetizar. Los alcoholes superiores se incluyen dentro del grupo de compuestos aromáticos sintetizados durante la fermentación alcohólica por la levadura. Los alcoholes de fusel son un grupo que la mayoría de las veces se los denomina "alcoholes superiores" o también "alcoholes o aceites de fusel". 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. Se caracterizan por su penetrante olor y, consecuentemente, pueden tener un significativo efecto en el sabor de las 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 (Meilgaard, *et al.*, 1999).

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. La importancia de los alcoholes superiores radica en ser los compuestos precursores de los ésteres de acetato (Soles *et al.*, 1982). Su formación está ligada a la síntesis de proteínas y se forman a partir de  $\beta$  ácidos, que a su vez pueden ser formados por la transaminación y desaminación de aminoácidos, ó sintetizados a partir de carbohidratos del mosto (Russell, 1995).

Por lo que se refiere a los ésteres, se forman intracelularmente y al ser moléculas liposolubles, difunden la membrana hacia el medio fermentado, su producción transcurre en paralelo a la formación del etanol y aunque se producen en pequeñas cantidades son los compuestos que determinan en mayor intensidad el aroma secundario generado por el metabolismo fermentativo de la levadura. Se consideran los compuestos aromáticos

más importantes de la cerveza siendo más deseables en cervezas ale's que en cervezas lager's (Wolfgang, 1996) y en general proporcionan una característica típica "afrutada". El acetato de etilo con su característico aroma solvente-frutal y el acetato de isoamilo que confiere un aroma a plátano o pera, son los ésteres con mayor importancia en el perfil sensorial de la cerveza (Boulton y Quain, 2003).

Los ésteres son de dos tipos: los ésteres de etilo- ácidos grasos y ésteres de acetato, los dos tipos están formados enzimáticamente durante la fermentación, siendo los más importantes los ésteres de acetato. Los ésteres de acetato son el resultado de la reacción de acetylCoA con los alcoholes superiores. Los alcoholes superiores se forman a partir de la degradación de aminoácidos. La hidrólisis enzimática de ésteres también se produce durante la fermentación (a través de esterases), mientras que la hidrólisis química se produce durante el almacenamiento y el envejecimiento. La síntesis de ésteres es un proceso intracelular y es catalizado por enzimas como la alcohol acetiltransferasa (Verstrepen, 2003).

En el transcurso de la fermentación pueden formarse muchos tipos de ésteres, los más importantes son: ésteres polares (2-etilhidroxipropionato, succinato de dietilo, etil-4 hidroxibutanoato, malato de dietilo o isopentil-2-hidropropionato), usualmente responsables de la textura, densidad y espesor, 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).

Son muchos los factores que pueden afectar la producción de ésteres durante la fermentación alcohólica, donde la concentración final de un éster dependerá de su formación y degradación durante las etapas de fermentación. Los factores clave para la concentración final de ésteres de acetato son: la cantidad de sustratos disponibles, relación de actividad entre las enzimas de síntesis y las de degradación (Mauricio *et al.*, 1993) y ciertos parámetros de fermentación, tales como la temperatura, presión, diseño geométrico del fermentador, tipo y condición fisiológica de la cepa, cantidad de inóculo, oxígeno disuelto y composición del mosto. (Anderson y Kirsop, 1975; Thurston, 1982; Dufour *et al.*, 2003).

#### 4.5 Biosíntesis de alcoholes superiores y ésteres en la fermentación

Los alcoholes 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. 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. En ambos casos se obtiene una molécula de  $\alpha$ -cetoácido que es el intermediario común donde convergen las dos rutas metabólicas. A partir del  $\alpha$ -cetoácido la célula puede generar un aminoácido, siguiendo un proceso de transaminación, que constituye el paso final de la ruta anabólica. Alternativamente, el  $\alpha$ -cetoácido puede ser descarboxilado y reducido para generar un alcohol superior.

Se ha 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; Boulton y Quain, 2003).

Los aminoácidos del mosto son metabolizados en dos maneras. Primeramente son tomados dentro de la célula e incorporados directamente a la formación de proteínas, la otra opción es por la ruta de Ehrlich en donde el grupo amino es transferido por una transaminasa y el esqueleto de carbón es secretado o utilizado para la regeneración de NAD<sup>+</sup>, en este segundo caso el oxo-ácido producido por transaminación es descarboxilado para producir CO<sub>2</sub> y un aldehído. El aldehído es entonces reducido a un alcohol, los alcoholes producidos son alcoholes superiores (Lewis y Young, 1995).

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. Estos aminoácidos pueden ser utilizados para sintetizar proteínas celulares, 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 (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.

En el caso de la producción de ésteres su mecanismo de síntesis consiste en la condensación química entre un alcohol superior y un ácido. Los ésteres se forman en una reacción catalizada enzimáticamente entre dos sustratos, un alcohol superior y una molécula activada de Acil-coenzima A. La reacción requiere energía proporcionada por la vinculación tioéster del acil-coenzima A (CoA). El más abundante de acil-CoA reductasa es la acetil-CoA, que puede ser formada por la descarboxilación oxidativa de piruvato o por activación directa de acetato con el ATP. La mayoría de la acetil-CoA se forma por la descarboxilación oxidativa del piruvato.

Por otro lado el piruvato es un metabolito que puede ser oxidativamente descarboxilado para formar acetil coenzima A (acetil-CoA) un compuesto intermediario clave en el metabolismo común en las reacciones de degradación de todas las moléculas orgánicas. Acetil-CoA es sintetizado a partir de piruvato a través de una descarboxilación oxidativa catalizada por el complejo multienzimático del piruvato deshidrogenasa. En general los complejos multienzimáticos son grupos de enzimas asociados de manera no covalente, que catalizan dos o más pasos secuenciales en una vía metabólica. El complejo multienzimático consiste de tres enzimas: piruvato deshidrogenasa ( $E_1$ ), dihidrolipoamida transacetilasa ( $E_2$ ) y dihidrolipoamida deshidrogenasa ( $E_3$ ).

En la figura 1 se muestra la ruta biosintética y las formulas químicas de acetato de etilo y acetato de isoamilo desde la síntesis del alcohol superior, la incorporación de Acetil CoA y la obtención final del éster de acetato, mientras que en la figura dos se aprecia la síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo desde Piruvato con la incorporación de los aminoácidos de leucina y valina, la formación de alcohol superior y la producción final de esteres de acetato, así como la biosíntesis de acetil CoA y acetato.



En la tabla II y III se muestran las características y descripción de los genes analizados que participan en la ruta biosintética de acetato de etilo y acetato de isoamilo.

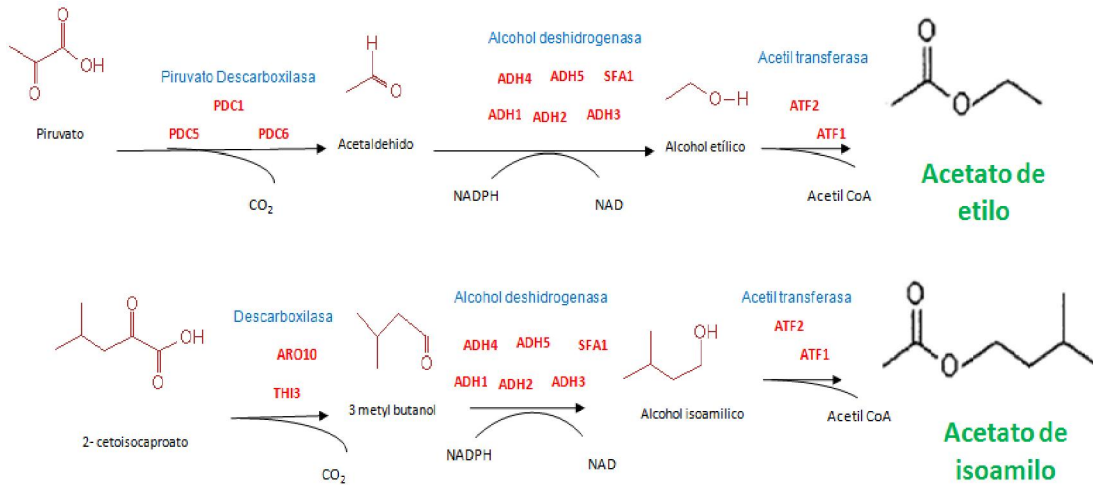


Figura 1: Producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo a partir de un alcohol superior y Acetil-CoA.

Tabla II. Características de los genes que participan en la ruta biosintética de acetato de etilo y acetato de isoamilo.<sup>a</sup>

<b>Nombre común</b>	<b>Nomenclatura sistemática</b>	<b>Cromosoma</b>	<b>Enzima</b>
ARO10	YDR380W	ChrIV:1234211 a 123611	Descarboxilasa
ADH1	YOL086C	ChrXV:160594 a 159548	Alcohol deshidrogenasa
ADH2	YMR303C	ChrXIII:874336 a 873290	Alcohol deshidrogenasa
ADH3	YMR083W-R	ChrXIII:434787 a 435914	Alcohol deshidrogenasa
ADH4	YGL256W	ChrVII:15159 a 16307	Alcohol deshidrogenasa
ADH5	YBR145W	ChrII:533756 a 534811	Alcohol deshidrogenasa
ATF1	YOR377W	ChrXV:1046224 a 1047801	Alcohol acetiltransferasa
ATF2	YGR177C	ChrVII:850441 a 848834	Alcohol acetiltransferasa
BAT1	YHR208W	ChrVIII:517532 a 518713	Aminotransferasa
BAT2	YJR148W	ChrX:705734 a 706864	Aminotransferasa
ILV2	YMR108W	ChrXIII:484083 a 486146	Acetolactato sintetasa
ILV5	YLR355C	ChrXII:839252 a 838065	Acetohidroxiacido reductoisomerasa
ILV6	YCL009C-R	ChrIII:105548 a 104619	Acetolactato sintetasa
LEU1	YGL009C	ChrVII:478657 a 476318	Isopropilmalato isomerasa
LEU2	YCL018W	ChrIII:91324 a 92418	Beta isopropilmalato deshidrogenasa
LEU3	YLR451W	ChrXII:1036090 a 1038750	Factor de transcripción dedos de zinc
LEU4	YNL104C	ChrXIV:426756 a 424897	Alfa isopropilmalato sintetasa
LEU9	YOR108W	ChrXV:523028 a 524842	Alfa isopropilmalato sintetasa
PDC1	YLR044C	ChrXII:234082 a 232391	Piruvato descarboxilasa
PDC5	YLR134W	ChrXII:410724 a 412415	Piruvato descarboxilasa
PDC6	YGR087C	ChrVII:652985 a 651294	Piruvato descarboxilasa
SFA1	YDL168W	ChrIV:159605 a 160765	Alcohol deshidrogenasa
THI3	YDL080C	ChrIV:312471 a 310642	Descarboxilasa
PDA1	YER178W	ChrV:546817 a 548079	Piruvato deshidrogenasa
PDB1	YBR221C	ChrII:666253 a 665153	Piruvato deshidrogenasa
LAT1	YNL071W	ChrXIV:491523 a 492971	Dihidrolipoamida transacetilasa
LPD1	YFL018C	ChrVI:103127 a 101628	Dihidrolipoamida deshidrogenasa
IRC15	YPL017C	ChrXVI:520233 a 518734	Dihidrolipoamida deshidrogenasa
ACS1	YAL054C	ChrI:45022 a 42881	Acetil CoA sintetasa
ACS2	YLR153C	ChrXII:447575 a 445524	Acetil CoA sintetasa
ACH1	YBL015W	ChrII:194122 a 195702	Acetil CoA hidrolasa

<sup>a</sup> Adaptada Global Gene Hunter de Stanford Genome Database, 2010

Tabla III. Descripción de los genes que participan en la ruta biosintética de acetato de etilo y acetato de isoamilo. <sup>a</sup>

<b>Nombre común</b>	<b>Descripción</b>
ARO10	Cataliza la descarboxilación de fenilpiruvato a fenilacetaldehído, primer paso en el metabolismo de Ehrlich.
ADH1	Isoenzima fermentativa, necesaria para la reducción del acetaldehído a etanol, el último paso en la vía glucolítica.
ADH2	Cataliza la conversión de etanol a acetaldehído, se reprime por glucosa y es regulado por ADR1.
ADH3	Isoenzima mitocondrial; participa en transportar el NADH mitocondrial al citosol en condiciones anaeróbicas y en la producción de etanol.
ADH4	Isoenzima dimérica dependiente de zinc, la transcripción se induce en respuesta a la deficiencia de zinc.
ADH5	Alcohol deshidrogenasa isoenzima V, que participan en la producción de etanol.
ATF1	Responsable de la mayor parte de la producción de acetato de ésteres volátiles durante la fermentación.
ATF2	Importante en la desintoxicación de esteroides; ésteres volátiles se forma durante la fermentación.
BAT1	Aminotransferasa mitocondrial de cadena ramificada de aminoácidos, expresada en fase logarítmica y reprimida en fase estacionaria.
BAT2	Aminotransferasa citosólica de cadena ramificada de aminoácidos, expresada en fase estacionaria y reprimida en fase logarítmica.
ILV2	Cataliza el primer paso común en la biosíntesis de isoleucina y valina y es el blanco de varias clases de inhibidores.
ILV5	Proteína mitocondrial participan en la biosíntesis de cadena ramificada de aminoácidos.
ILV6	Cataliza el primer paso de cadena ramificada de la biosíntesis de aminoácidos, se localiza en las mitocondrias.
PDC1	Enzima clave en la fermentación alcohólica, autorregulación sujeta a glucosa-etanol, involucrada en el catabolismo de aminoácidos.
PDC5	Enzima clave en la fermentación alcohólica, regulación dependiente de glucosa y etanol reprimido por tiamina.
PDC6	Participan en el catabolismo de aminoácidos, es dependiente de a glucosa - etanol, fuertemente inducida durante limitaciones de azufre.

(continua)

Nombre común	Descripción
LEU1	Cataliza el segundo paso en la ruta de biosíntesis de leucina.
LEU2	Cataliza el tercer paso en la ruta de biosíntesis de leucina.
LEU3	Factor de transcripción, regula genes implicados en la cadena de aminoácidos ramificados, regulado por la alfa isopropilmalato.
LEU4	Isoenzima principal responsable del primer paso en la ruta de biosíntesis de leucina.
LEU9	Cataliza el primer paso en la ruta de biosíntesis de leucina.
SFA1	Enzima bifuncional, tanto para alcohol deshidrogenasa como la actividad de formaldeído deshidrogenasa, regulada por Hog1p.
THI3	Implicada en el catabolismo de los aminoácidos de cadena larga y alcoholes complejos, necesaria en la biosíntesis de tiamina.
PDA1	Subunidad alfa del complejo piruvato deshidrogenasa, cataliza la descarboxilación oxidativa; regulada por la glucosa.
PDB1	Codifica la subunidad beta del piruvato deshidrogenasa, es el componente (E1) del complejo piruvato deshidrogenasa multienzimático.
LAT1	Dihidrolipoamida transacetilasa (E2) del complejo piruvato deshidrogenasa, cataliza la descarboxilación oxidativa de piruvato en acetil-CoA.
LPD1	Dihidrolipoamida deshidrogenasa componente lipoamida deshidrogenasa (E3) de la piruvato deshidrogenasa.
IRC15	(E3) del complejo piruvato deshidrogenasa, proteína asociada a microtúbulos y necesario para la segregación de cromosomas meióticos.
ACS1	Isoenzima Acetil-CoA sintetasa, proporciona acetil-CoA para la acetilación de las histonas en el núcleo en condiciones aeróbicas, implicada en el crecimiento de las fuentes de carbono no fermentables como el glicerol y etanol.
ACS2	Cataliza la producción de acetil-CoA, proporcionando acetil-CoA para la acetilación de las histonas en el núcleo en condiciones anaeróbicas, isoenzima de la acetil-coenzima A sintetasa, que se requiere para el crecimiento de las fuentes de carbono fermentables como la glucosa.
ACH1	Actividad de acetil-CoA-hidrolasa; necesaria en la utilización de acetato.

a Adaptada del Global Gene Hunter de Stanford Genome Database, 201

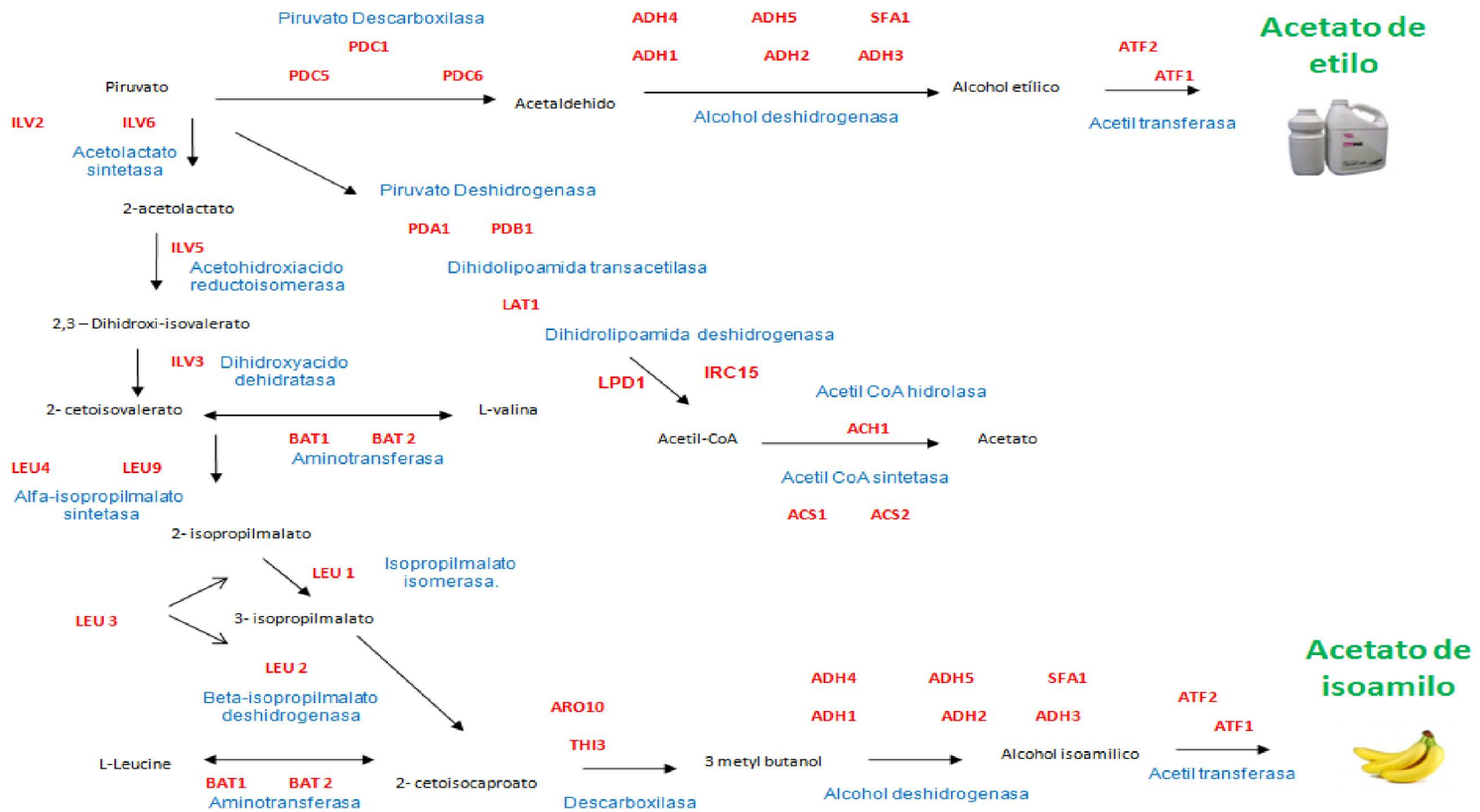


Figura 2: Síntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo. Ruta metabólica desde Piruvato hasta la producción de ésteres de acetato, y la biosíntesis de Acetil CoA y Acetato.

#### 4.6 Genética y regulación en la producción de acetato de etilo e isoamilo.

En cuanto a los elementos regulatorios en la expresión de los genes involucrados en la producción de acetato de etilo e isoamilo en fermentaciones industriales, aún se conoce muy poco, sin embargo se sabe que en cuanto a la obtención de todos los alcoholes superiores derivados de aminoácidos, éstos siguen la misma secuencia de reacciones bioquímicas de descarboxilación y reducción, y que existe un gran número de actividades enzimáticas descarboxilasas que presentan especificidad por distintos  $\alpha$ -cetoácidos y éstos intervienen en la síntesis de distintos alcoholes (Dickinson *et al.*, 2003).

En lo que respecta a *S. cerevisiae* se han identificado 5 genes involucrados en la descarboxilación de los oxoácidos y sus correspondientes aldehídos: las piruvato descarboxilasas PDC1, PDC5 y PDC6 y las descarboxilasas ARO10 y THI3 (Vuralhan *et al.*, 2003, 2005). Se sabe que la PDC1 es la única piruvato descarboxilada que se expresa en presencia de glucosa y constituye por lo tanto, la actividad piruvato descarboxilasa más importante en la célula de levadura. PDC5 sólo se expresa en glucosa ante la falta de PDC1 (Yoshimoto *et al.*, 2001), mientras que PDC6 no se expresa en presencia de glucosa pero si cuando el etanol es utilizado como fuente de carbono. Aunque todas las enzimas participan en la descarboxilación de oxoácidos, la presencia de sustrato de cada proteína limita su participación en la formación de los diferentes alcoholes superiores.

En lo que corresponde al gen THI3, Dickinson y colaboradores (1997) demostraron que la ruta metabólica de síntesis de alcohol isoamílico requiere la descarboxilación del intermediario alfa-cetoisocaproato y, que en ausencia del gen, la cantidad de alcohol isoamílico sintetizado disminuía considerablemente, por lo tanto se menciona que es responsable del 94% de la descarboxilación del alfa-cetoisocaproato a alcohol isoamílico mientras que el gen ARO10 serían responsables del porcentaje restante (Dickinson *et al.*, 2003) .

Los genes BAT1 y BAT2 codifican para dos transaminasas de aminoácidos de cadena ramificada, la proteína Bat1p que se localiza en mitocondria y Bat2p que se encuentra en el citoplasma, transfieren un grupo amino del glutamato hacia los alfa-cetoácido precursores de valina, isoleucina y leucina, y esta reacción la pueden llevar a cabo las dos enzimas en forma reversible catabolizando al aminoácido para obtener el alfa-cetoácido y ser utilizado para otros fines dentro de la célula. Aunque las dos isoenzimas llevan a cabo la misma reacción y también en forma reversible, existe una evidencia genética que sugiere que las enzimas Bat1 y Bat2 han divergido en función ya que Bat1p está más involucrada en la biosíntesis de aminoácidos y Bat2p en el catabolismo de ellos (Dickinson, *et al.*, 2000).

Respecto a la reacción de reducción, se sugiere 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).

Las alcohol deshidrogenasas (ADHs) son enzimas que catalizan la oxidación reversible de alcoholes a los correspondientes aldehídos o cetonas, con la consiguiente reducción de NAD o NADP.

Los enzimas Adh1p y Adh2p tienen 347 aminoácidos y una identidad de secuencia mutua de un 93% aproximadamente (las dos enzimas sólo difieren en 22 aminoácidos). Las enzimas Adh1p y Adh2p se encuentran en el citoplasma, uniendo dos átomos de Zn en cada subunidad. La afinidad de la Adh2p hacia el etanol y hacia el acetaldehído es unas 20 veces superior a la que tiene la Adh1p. Los niveles de expresión de las enzimas Adh1p y Adh2p están regulados por la asequibilidad de azúcar “fermentable” y ello es llevado a cabo vía inducción/represión de la transcripción de los genes ADH1 y ADH2 respectivamente (Ramaswamy, 1994).

La Adh3p es sintetizada como una proteína de 375 aminoácidos con 28 aminoácidos en su extremo amino, que constituyen una pre-secuencia que dirige a la

proteína hacia la matriz mitocondrial, donde está presente como proteína. La ADH3 muestra una identidad de secuencia del 80% con la Adh1p y Adh2p.

Existe una cuarta (ADH) que está codificada por el gen ADH4. La Adh4p que es una proteína de 465 aminoácidos y actualmente el proyecto del genoma de la levadura ha revelado la existencia de un quinto gen ADH5 cuya proteína muestra aproximadamente un 80% de identidad con los enzimas Adh1 y Adh2, y un 72% de identidad con la Adh3. Y finalmente el gen SFA1 con un tamaño de subunidad de 385 aminoácidos (Wehner, 1993).

Por lo que corresponde a la síntesis de ésteres esta requiere la catálisis de una enzima 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. Estudios realizados en la regulación de la expresión génica del gen ATF1 demuestran que es un sistema complejo y difícil de caracterizar ya que intervienen varios factores y sobre todo, sus niveles de expresión son muy bajos, sin embargo 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, se conoce también que la expresión del gen ATF1 se reprime en presencia de ácidos grasos insaturados. (Fujii *et al.*, 1996; Fujiwara *et al.* 1998, 1999). 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.* 2003; 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).

El gen ATF2, clonado y secuenciado por Nagasawa y colaboradores (1998), codifica la alcohol acetiltransferasa II 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%.

La enzima Atf2p se caracteriza por ser una proteína mayoritariamente soluble de 62 kDa que se encuentra en pequeñas cantidades, por lo que respecta a su función, contribuye en menor grado a la producción de ésteres de acetato. (Fujii *et al.*, 1996)

Acetil-CoA es el producto común de la degradación de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, se forma por descarboxilación oxidativa del piruvato, por la acción del complejo enzimático piruvato deshidrogenasa localizada en la matriz mitocondrial de las células eucariotas. Estructuralmente el complejo multienzimático, además de otras proteínas, está formado por 3 enzimas catalizando cada una de estas uno de los pasos de la reacción completa. Los genes PDA1 y PDB1 codifican las subunidades alfa y beta respectivamente del complejo multienzimático en la enzima piruvato deshidrogenasa ( $E_1$ ), el gen LAT1 codifica la dihidrolipoamida transacetilasa ( $E_2$ ) y tiene función tanto enzimática como estructural actuando como unión entre  $E_1$  y  $E_3$ , mientras los genes LPD1 y IRC15 (proteína asociada a microtubulos) codifican la dihidrolipoamida deshidrogenasa ( $E_3$ ).

La piruvato deshidrogenasa está regulada por dos mecanismos. Por una parte está alostericamente inhibida cuando las proporciones de ATP y NADH son altas, y se activa cuando las demandas energéticas crecen. Por otra parte está regulada por un mecanismo de modificación covalente. La piruvato deshidrogenasa fosforilada es inactiva, mientras que la enzima defosforilada es activa. La interconversión entre las formas fosforilada y defosforilada está catalizada por las enzimas piruvato deshidrogenasa quinasa y la piruvato deshidrogenasa fosfatasa. La quinasa es activada por ATP (cuando la concentración de ATP es alta, mientras que la piruvato deshidrogenasa se inactiva por fosforilación).

## 5.- METODOS

### 5.1 Cepas:

Las cepas de *Saccharomyces cerevisiae* utilizadas en este trabajo pertenecen a la colección de la Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma (CCM) y están registradas como tipo lager, 820 y 790. Trabajamos con levadura de 2<sup>a</sup> generación y de generaciones posteriores.

### 5.2 Mosto:

Los mostos fueron proporcionados por planta experimental de CCM, oxigenados con las diferentes concentraciones (ppm) que se iban a evaluar. Con una concentración de extracto fermentable de aproximadamente 17°P.

### 5.3 Fermentaciones:

Las fermentaciones se llevaron a cabo en probetas de 2000 ml y una incubadora refrigerada regulada con las diferentes temperaturas a evaluar. Los cálculos del inóculo se ajustaron a 1.2 mill/ml por cada grado Plato quedando a  $21 \times 10^6$  mill/ml para mostos con 17°P. Los parámetros se monitoreados durante los siete días de la fermentación usando cámara de Neubauer. En el día siete de fermentación se realizaron cultivos microbiológicos con el fin de verificar que el proceso haya estado libre de microorganismos contaminantes. Las células fueron cultivadas en los medios UBA, LWYM, LIN-315, LIN-550 y MRS siguiendo los métodos de American Society of Brewing Chemists (1992). La viabilidad (porcentaje de células vivas) y vitalidad (actividad metabólica y estado fisiológico) fueron evaluadas en microcultivo (Apéndice C). El análisis sensorial y cuantificación de acetato de etilo y acetato de isoamilo presentes en la muestra, también fueron realizadas al día siete. La parte analítica fue realizada con cromatografía de gases mientras y los análisis sensoriales con un panel de catadores entrenados en la detección de compuestos aromáticos.

#### **5.4 Microarreglos:**

Los chips de ADN se realizaron en la unidad de microarreglos del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM a cargo del Dr. Jorge Ramírez Salcedo. (<http://microarrays.ifc.unam.mx/>). El estudio inicial de los datos se elaboró con el *software* libre GenArise, desarrollado por la unidad de Computación del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM y posteriormente se realizó un análisis en el programa BABELOMICS 4.1 utilizando las bases de datos para *Saccharomyces cerevisiae*, (SGD ([www.yeastgenome.org](http://www.yeastgenome.org)) y Gene Ontology ([www.geneontology.com](http://www.geneontology.com))).

#### **5.5 Diseño de oligonucleótidos:**

Incluimos los criterios siguientes: 20 a 24 pb; GC entre 30% - 60%; y que el tamaño del producto amplificado se encontrara dentro de los parámetros para qPCR (100 a 300 pb). Para tal efecto usamos las secuencias depositadas en los bancos de datos del GenBank y Global Gene Hunter de Stanford Genome Database (SGD). Las secuencias fueron alineadas y comparadas con los programas ClustalW (Marzo de 2010), Esript (Marzo de 2010) (Gouet *et al.*, 1999), Basic Local Alignment Search Tool (BLAST. Marzo de 2010) (Henegariu *et al.*, 1997) y simulación de PCR *in silico* mediante los programas Fast PCR 6.0 (Rusland Kalendar Univ. Helsinki, Iceland) y Amplify 3.1 (Engels, Univ. Wisconsin US), finalmente los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando los programas de OLIGO 4.1. (Primer analysis software. Published by National Biosciences. Inc.), DNA STAR Inc, v 4.5: Megalingn y Gene Quest, Los oligonucleótidos se mandaron sintetizar y se utilizaron diluidos en agua miliQ estéril.

#### **5.6 Extracción de ADN genómico y ARN total:**

El ADNg fue extraído con el método de fenol-cloroformo del manual Twintrack Advanced Labs (Siebel Inst. of Technology) (Apéndice D). Mientras que para el ARN utilizamos el estuche comercial High Pure RNA Isolation (Roche Applied Science), siguiendo el protocolo del fabricante. Se extrajo el ARN los primeros tres días de fermentación de cada condición experimental (Apéndice E).

## 5.7 Cuantificación de ADN y ARN:

La cuantificación de ADN y ARN a partir de muestras de levadura se hicieron en un espectrofotómetro Smart Spec 300 (Biorad) diluyendo 1:100 en agua Milli Q libre de nucleasas. Las muestras se cuantificaron a absorbancias de 260 y 280. Los resultados se obtuvieron en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$  (Apéndice F)

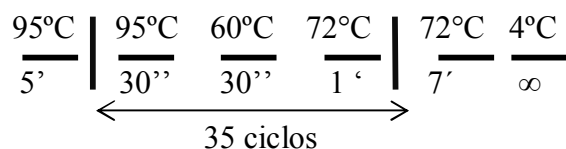
## 5.8 Reacción en cadena de la polimerasa punto final:

Para la amplificación de los genes por PCR punto final, se utilizó el kit Go Taq (Promega) y la mezcla de reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se agregó lo siguiente para una reacción de 50  $\mu\text{L}$ : 35  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$  estéril Milli Q, 10  $\mu\text{l}$  de Buffer verde PCR 5X, 0.5  $\mu\text{l}$  de dNTPs 25 mM, 1  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido F (Forward) a 20  $\mu\text{M}$ , 1  $\mu\text{l}$  del oligonucleótido R (Reverse) a 20  $\mu\text{M}$ , 2  $\mu\text{l}$  de DNA molde a 250ng/ $\mu\text{l}$  y 0.5  $\mu\text{l}$  de Taq Polimerasa .

Se utilizó un termociclador Gene Amp PCR system 2004 (Perkin-Elmer).

Las condiciones de PCR fueron las siguientes:



## 5.9 Electroforesis:

### 5.9.1 Electroforesis en gel de agarosa:

Se hizo electroforesis para observar el tamaño de los amplicones, las muestras se cargaron en los carriles con buffer de carga 1X (Buffer de carga: glicerol 30%, azul de bromofenol 0.25% y azul de xilencianol 0.25%). Los productos de PCR se separaron en geles de agarosa al 2% en buffer TBE 0.5X con un voltaje de 100 V por aproximadamente 40 minutos. Se utilizaron los marcadores de peso molecular. Hyperladder IV de Bioline con una rango de 25 a 500 pb y el marcador de 1kb de Promega con un rango de 250 a 10,000 pb. Los geles fueron teñidos con Bromuro de etidio a una concentración de 0.5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , posteriormente se observaron bajo luz ultravioleta y las imágenes fueron digitalizadas. Estos fragmentos se compararon según lo estimado por los programas *in silico*.

### **5.9.2 Electroforesis en gel de agarosa con formaldehído:**

La integridad física de los RNA extraídos fue analizada en geles de agarosa con formaldehído. Lavar previamente el material de electroforesis con SDS 1% y enjuagar con agua tratada con DEPC (inhibidor de RNAasas). Para preparar el gel, mezclar 0.3g de agarosa, 3 ml de MAE 10X y 25.2 ml agua- DEPC (Ver Anexos). Calentar a ebullición, enfriar ~ 55°C y añadir 1.8 ml de formaldehído. Mezclar perfectamente para verter a la cámara y gelificar. Se corrió 3 µl de RNA más 12 µl de buffer y 0.6 µl de bromuro de etidio, preparado con agua-DEPC. Mezclar perfectamente y colocar a 65°C por 15 min. La electroforesis se llevo a cabo a 70 V por aproximadamente 90 min.

### **5.10 Obtención de cADN:**

Se utilizó el kit Reverse Transcription M MLV (Promega) de acuerdo al protocolo del fabricante. Las muestras de ARN fueron cuantificadas en el espectrofotómetro Smart Spec 3000 (BIO RAD). Ajustando la cantidad a 2.0 µg. Una vez obtenido el cADN se almacenó a -20°C para su posterior uso.

Se agregó lo siguiente para una reacción de 25 µl: - µL de H<sub>2</sub>O estéril Milli Q, 5 µL de Buffer 5x, 0.5 µL de RNasin 40U/µl, 5 µL de dNTPs 10 mM , 1 µL de Oligo(dT) 0.5µg/ml, - µL de ARN total, y 2 µL de M MLV-RT 200U/µl

Se incubó a 25°C por 5 min, 37°C por 60 min y finalmente a 7°C por 10 min.

### **5.11 Análisis de expresión génica por PCR Tiempo Real (qPCR):**

Para determinar la expresión de los genes seleccionados se utilizó el equipo qPCR Light Cycler 480 (Roche Diagnostics) al igual que el kit LightCycler® 480 SYBR Green I Master (Roche Applied Science). Las condiciones se muestran en la tabla IV y la mezcla de reacción se llevó a cabo de la siguiente manera:

Se agregó lo siguiente para una reacción de 10 µL: 1.5 µL de H<sub>2</sub>O estéril Milli Q, 2.5 µL de cDNA 2.0 µg, 5 µL de Master Mix 2X (SYBR Green I Master ), 0.5 µL de oligonucleótido F (Forward) 10µM y 0.5 µL de oligonucleótido R (Reverse) 10µM

Tabla IV: Condiciones del termociclador para la detección de amplicones por qPCR

Tipo de Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura °C	Tiempo (hh:mm:ss)
Pre-incubación				
Desnaturalización	1		95	00:05:00
Amplificación				
Cuantificación	45	Desnaturalización	95	00:00:10
		Alineamiento	60	00:00:10
		Extensión	72	00:00:10
Curva de disociación				
Curva “melting”	1	Desnaturalización	95	00:00:01
		Alineamiento	65	00:00:01
		“Melting”	95	-
Enfriamiento				
Ninguno	1		40	00:00:30

Se realizaron cuantificaciones relativas y se obtuvieron la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de cada gen en estudio en comparación con un gen de referencia (Pfaffl, 2004). Los cálculos de cuantificación relativa de expresión genética se basaron en la comparación de los valores Cp (punto donde hay un aumento en la fluorescencia en el equipo y es inversamente proporcional a la cantidad inicial de cADN) y utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección.

Las eficiencias de la PCR en tiempo real (capacidad de la reacción de duplicar el número de copias de las cadenas de ADN o cADN en cada ciclo (Bustin y Nolan, 2004) fue calculada a partir de las pendientes de la curva estándar obtenidas después de realizar diluciones seriadas (Pfaffl, 2004). Los resultados se expresaron mediante la fórmula  $2^{(-\Delta\Delta C_p)}$  (Pfaffl, 2001; Fu W. et al., 2006) y la estadística se realizó usando el programa Minitab 16 (Minitab Inc, 2010).

## 6.-RESULTADOS Y DISCUSIÓN.

### 6.1 Análisis de microarreglos.

Con el fin de identificar los genes involucrados en la regulación de la expresión en la biosíntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo se realizaron análisis de expresión global mediante microarreglos de ADN en células de levadura analizadas en la combinación de tiempo y temperatura de almacenamiento de la levadura así como porcentaje de malta en mosto, del día dos del proceso de fermentación. Se realizaron cuatro fermentaciones (Tabla V) y se considero como control la condición a la que la levadura se almaceno a una temperatura de 4°C por un tiempo de 4 hrs y 50% de malta en mosto, para ambas cepas. Estas fermentaciones fueron realizadas escala laboratorio por Leal, 2011.

Tabla V: Condiciones de las fermentaciones para el análisis de microarreglos.

Fermentación	Cepa	Temperatura de almacenamiento °C	Tiempo de almacenamiento (hrs)	Mosto (%Malta)
1	790	4	4	50
2	790	18	18	35
3	820	4	4	50
4	820	18	18	35

El diseño de las combinaciones dieron por resultado 4 microarreglos con su respectivo análisis “swap” (invertir el marcaje fluorescente para evitar datos espurios) marcando el cADN de los transcritos de la levadura con Cy3 y Cy5; siguiendo el protocolo de Promega (Apéndice G).

Los microarreglos incluyeron los 6480 genes de *S. cerevisiae*, cubriendo el total del genoma publicado en el SGD (Saccharomyces Genome Database). Los resultados de los microarreglos fueron proporcionados como archivos .txt, y se analizaron utilizando el software GenArise, tomando como criterio un valor Z score de 1.5 (Fig. 3). El valor de Z score, es la media estadística de un valor expresando que tanto se aparta de la media,

mayor a 2, es considerado altamente significativo, mientras que un valor de Z score mayor de 1.5 es considerado significativo e indica cambio en la expresión (Gómez *et. al* 2006).

Los signos positivos o negativos del Z score indican los niveles de transcritos inducidos o reprimidos respectivamente. En las figuras 3 y 4 se muestran los resultados globales de este análisis.

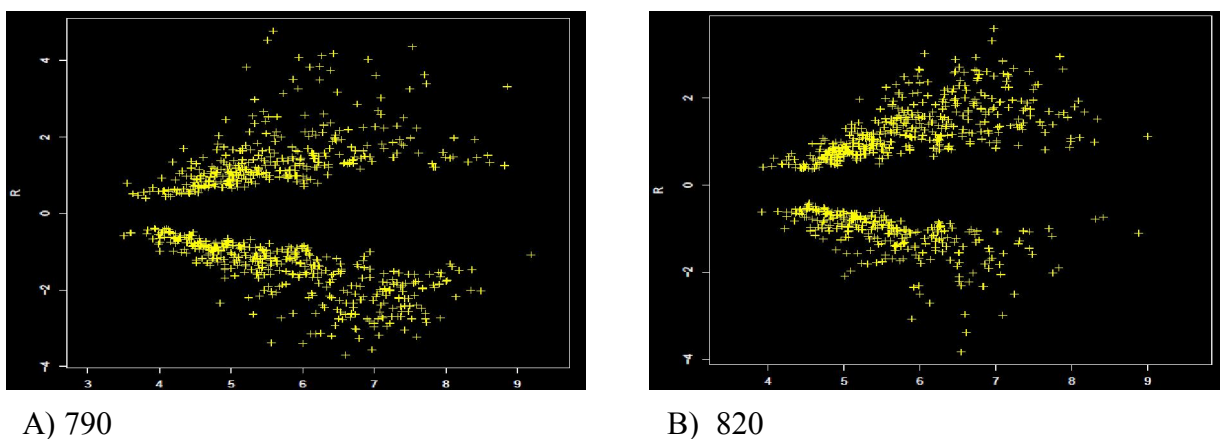


Figura 3: Imágenes del resultado del análisis del software GenArise, tomando como criterio un valor Z score de  $\pm 1.5$  A) Cepa 790 B) Cepa 820

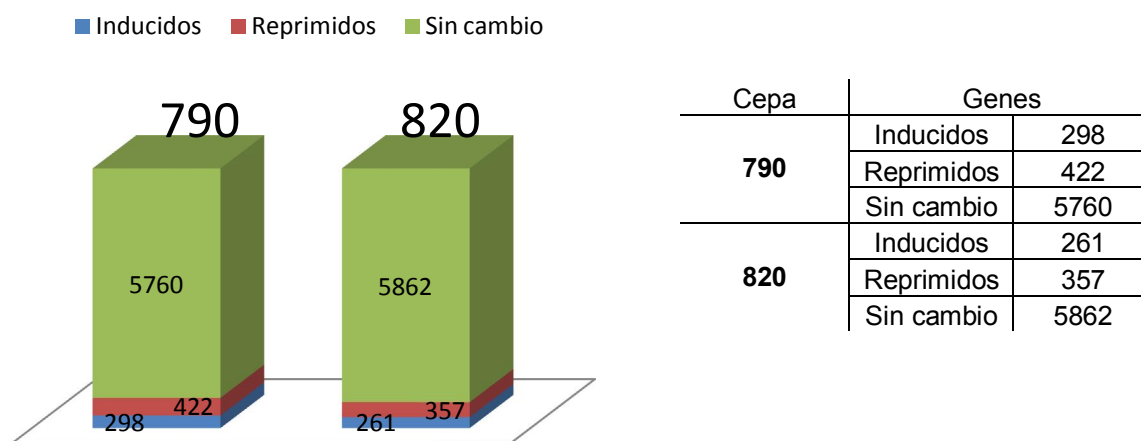


Figura 4: Resultado del análisis global de los microarreglos, de la cepa 790 y 820. Genes inducidos, reprimidos y sin cambio

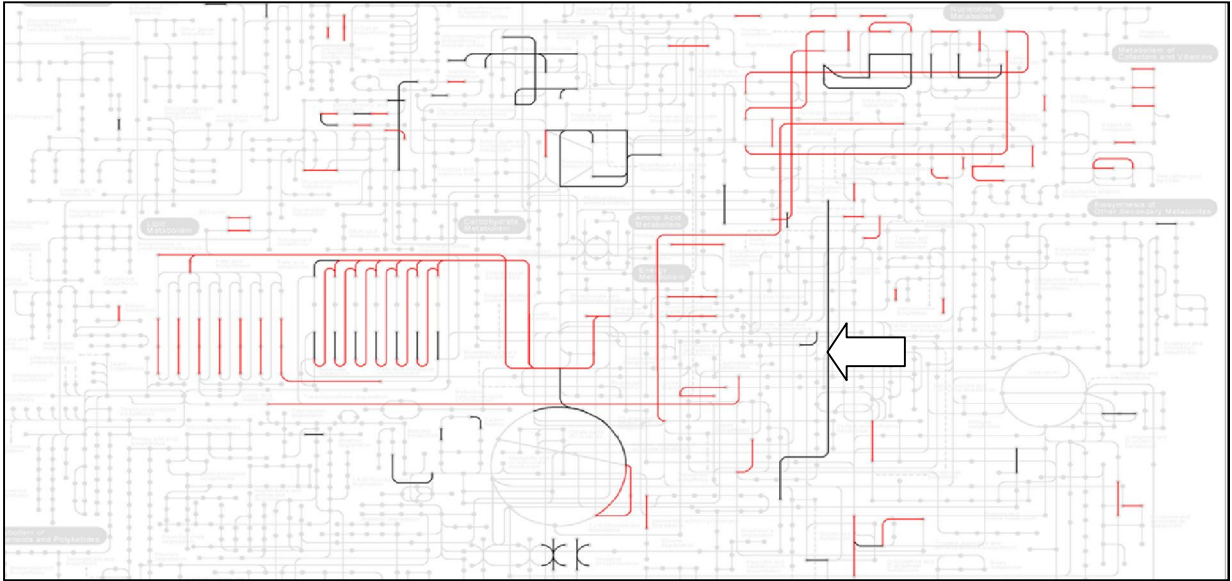


Los datos se analizaron en el programa GenArise (<http://www.ifc.unam.mx/genarise>) y se transformaron a base  $\log_2$ , donde se obtuvieron los resultados de los valores “Z score”. Los análisis calculan el valor de la media y la desviación estándar de la distribución en razón de los valores  $\log_2$ , definiendo un cambio global de magnitud y límites de confianza (Gómez *et. al* 2006). Los resultados espurios o anómalos identificados fueron eliminados del set de datos, mediante normalización con el uso del “swap”.

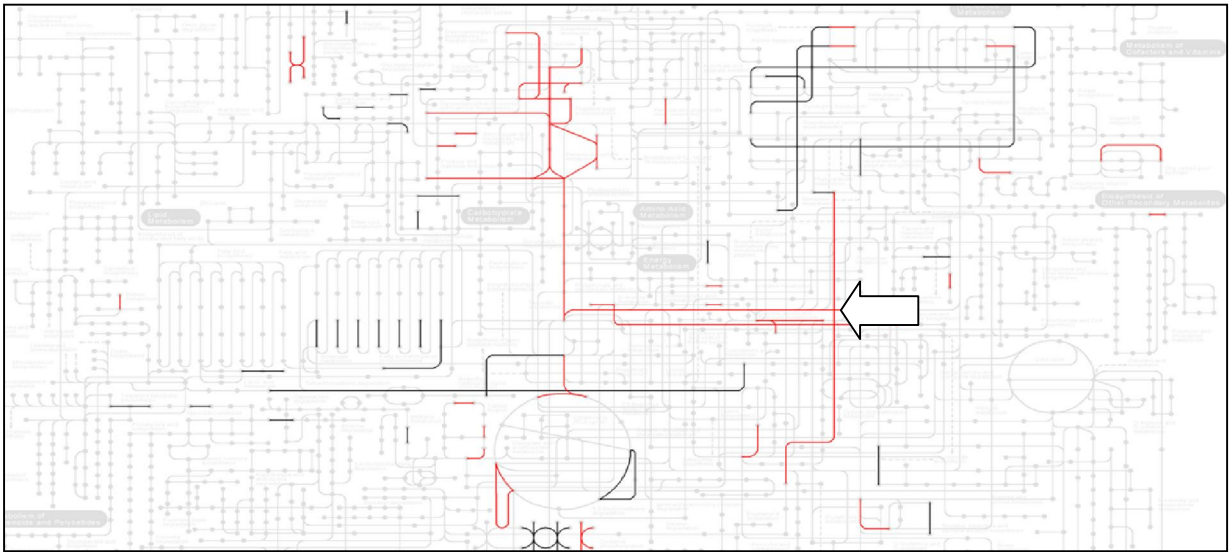
Los grupos de genes identificados con cambio significativo de expresión fueron analizados mediante los programas KEGG2 (<http://www.genome.jp>), (Fig. 5) y FatiGO (<http://babelomics2.bioinfo.cipf.es>), a fin de identificar y determinar procesos biológicos y genes de interés en la biosíntesis de acetato de etilo e isoamilo.

En la figura 5 se puede observar que los procesos biológicos identificados que mostraron cambios significativos en la expresión de cada una de las cepas son distintos, comprobando así que cada cepa tiene diferente patrón de expresión. En lo que respecta a la biosíntesis del metabolismo de los aminoácidos se observa que mientras en la cepa 790 los genes se están induciendo, en la cepa 820 está ocurriendo lo contrario, los genes se están reprimiendo. Esto corrobora lo ya mencionado por Sablayrolles en 1995 donde se menciona que el tipo de cepa es altamente dependiente en la producción de esteres de acetato y que la expresión de los genes involucrados en la producción de esteres de acetatos depende de cada cepa.

A fin de determinar los principales procesos biológicos que están implicados en los genes que mostraron cambios significativos en su expresión se realizó un análisis mediante el software FatiGO, en donde se determinó que en la cepa 790 los procesos principalmente implicados son: respuesta a estímulos bióticos, transposición, adhesión celular y proliferación celular, mientras que en la cepa 820 son: respuesta a estímulos bióticos, envejecimiento, procesos catabólicos y floculación (Fig. 6).



A) 790



B) 820

Figura 5: Imágenes del análisis global de los microarreglos en el programa KEGG2 para las cepas 790 (Panel A) y 820 (Panel B). Genes inducidos (negro), genes reprimidos (rojo). La flecha indica la biosíntesis del metabolismo de los aminoácidos y la ruta biosintética de acetato de etilo y acetato de isoamilo.

Term	#1 vs #2	p value
response to biotic stimulus (GO:0009607)	71.35% 28.65%	2.51e-3
transposition (GO:0032196)	73.83% 26.17%	6.93e-3
autophagy (GO:0006914)	18.8% 81.2%	1.78e-1
cell adhesion (GO:0007155)	70.66% 29.34%	1.14e-1
cell proliferation (GO:0008283)	75.06% 24.94%	1.86e-1
biosynthetic process (GO:0009058)	46.26% 53.74%	1.34e-1
response to chemical stimulus (GO:0042221)	57.15% 42.85%	5.91e-2
regulation of biological process (GO:0050789)	46.04% 53.96%	19e-1

A) 790

Term	#1 vs #2	p value
response to biotic stimulus (GO:0009607)	76.47% 23.53%	4.3e-5
aging (GO:0007568)	0% 100%	3.06e-2
catabolic process (GO:0009056)	57.54% 42.46%	2.38e-2
flocculation (GO:0000128)	68.8% 31.2%	2.67e-1
conjugation (GO:0000746)	38.07% 61.93%	2.61e-1
response to stress (GO:0006950)	53.69% 46.31%	2.52e-1
cell communication (GO:0007154)	39.9% 60.1%	8.01e-2
cell proliferation (GO:0008283)	76.78% 23.22%	1.62e-1

B) 820

Figura 6: Resultado del análisis mediante el software de FatiGO de los principales procesos biológicos de los genes que mostraron cambios significativos en su expresión para las cepas 790 (Panel A) y 820 (Panel B).

En lo que respecta a la expresión de los genes relacionados a la biosíntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo, se observa que un gran número de ellos se presentan sin cambios bajo esta condición experimental (Tabla VI). En la figura 7 se observa el resultado de las expresiones en los genes involucrados en la ruta biosintética de acetato de etilo y acetato de isoamilo.

Los genes involucrados en la descarboxilación de los oxoácidos y sus correspondientes aldehídos; PDC1, PDC5 y ARO10 (Vuralhan *et al.*, 2003; 2005), muestran cambios importante en la expresión.

Mientras el gen ARO10 que está involucrado en la descarboxilación de 2-cetoisocaproato a 3 metil butanol se encuentra inducido en la cepa 790, y reprimido en la cepa 820, y esto podría indicar una mejor asimilación del aminoácido de leucina presente en el mosto por parte de la cepa 790 en el día dos de la fermentación. Los genes PDC1 y PDC5 que codifican para piruvato descarboxilasa involucradas en la biosíntesis del aminoácido de vallina se encuentran reprimidos en la cepa 820, mientras que en la 790 no muestran cambios.

Por lo que se refiere a al grupo de las alcohol deshidrogenasas, el gen SFA1 en la cepa 790 se encuentra inducido, mientras que en la 820 no presenta cambio, sin embargo los genes ADH1, ADH3 y ADH4 se encuentran inducidos en la cepa 820, estos genes codifican enzimas que catalizan la oxidación reversible de alcoholes a los correspondientes aldehídos y se sabe que los niveles de expresión están regulados por la asequibilidad de azúcar fermentable y ello es llevado a cabo vía inducción/represión (Ramaswamy, 1994).

En cuantos a los genes que catalizan la acetil-coenzima A sintetasa, el gen ACS2 se encuentra reprimido en la cepa 790, mientras que el gen ACH1 con actividad de acetil-CoA-hidrolasa; necesaria en la utilización de acetato esta reprimido en la 820.

Tabla VI: Valores de "Z-score" y expresión de los genes relacionados con la biosíntesis de acetato de etilo e isoamilo.

Nombre común	Valor de Z score		Expresión	
	CEPA 790	CEPA 820	CEPA 790	CEPA 820
ARO10	1.59843003	-4.92591131	+	-
ADH1	0.58610681	-1.79574584	SC	-
ADH2	-0.02829241	-0.90553158	SC	SC
ADH3	-0.44978955	-2.73578394	SC	-
ADH4	-0.29624247	-1.86156699	SC	-
ADH5	0.27570337	-0.27954476	SC	SC
ATF1	0.46437775	-0.76311732	SC	SC
ATF2	-0.9501199	-0.970661	SC	SC
BAT1	0.15993409	-0.73557069	SC	SC
BAT2	-0.14765678	-0.69093454	SC	SC
ILV2	1.34966179	0.13280447	SC	SC
ILV5	-0.35683037	-0.0843904	SC	SC
ILV6	0.43972744	-0.9199467	SC	SC
LEU1	-0.5939032	0.00572231	SC	SC
LEU2	-0.83869132	0.04544002	SC	SC
LEU3	-0.84700921	0.31817891	SC	SC
LEU4	0.5205442	-0.05903673	SC	SC
LEU9	1.35241414	-0.53167687	SC	SC
PDC1	-0.8936394	-1.56431088	SC	-
PDC5	-0.04264434	-1.55475687	SC	-
PDC6	0.33167624	-0.3678296	SC	SC
SFA1	-2.12865392	-1.16889376	-	SC
THI3	-0.3768661	-0.24161723	SC	SC
PDA1	.06098990	-.95346234	SC	SC
PDB1	.419867655	.60447890	SC	SC
LAT1	.024791267	-.06535897	SC	SC
LPD1	-1.3120967	-.07895638	SC	SC
IRC15	-0.9368945	-0.6528901	SC	SC
ACS1	-1.10167618	-0.48958138	SC	SC
ACS2	-1.86274679	0.67120753	-	SC
ACH1	0.64820102	-1.70511355	SC	-
ACT	-1.31901868	-0.20486763	SC	SC

+ inducido, - reprimido, SC sin cambio.

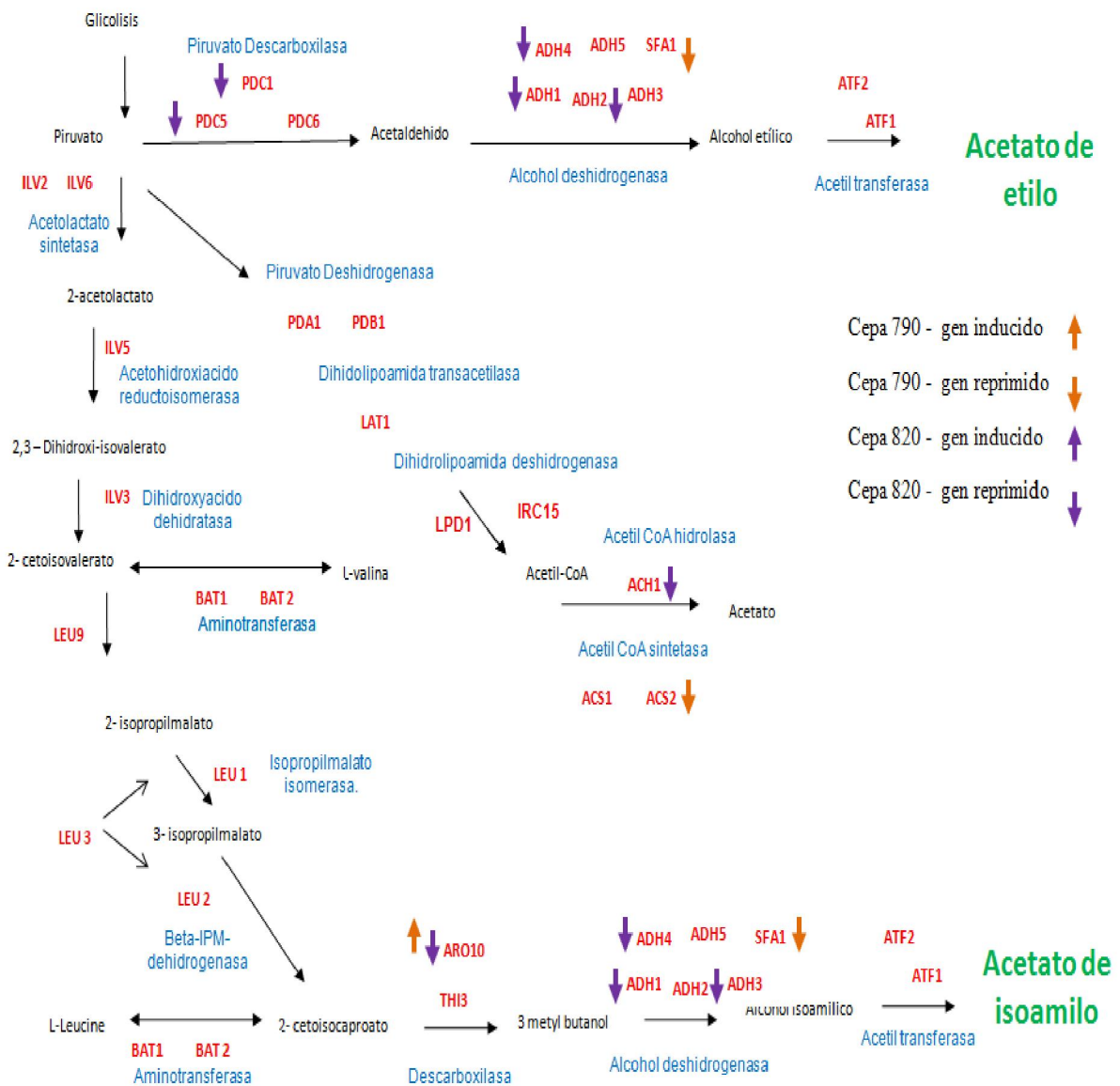


Figura 7: Expresión de los genes involucrados en la biosíntesis de acetato de etilo e isoamilo en los análisis de microarreglos.

## 6.2 Diseño de oligonucleótidos

Para el diseño de los oligonucleótidos, se analizaron los genes que tuvieron un cambio significativo en la expresión, dentro del análisis de los microarreglos, así como genes que se consideran importantes en la ruta biosintética de los esteroides. Para el diseño se obtuvieron las secuencias codificantes y se realizaron ensayos *in silico*. En la tabla VII se muestran las propiedades de cada oligonucleótido diseñado. Todos los oligonucleótidos fueron diseñados en este trabajo, excepto los oligonucleótidos de actina (ACT), utilizados como gen de referencia. (Leal, 2011). Con el análisis *in silico* se definió la posición exacta de los oligonucleótidos, el tamaño del oligonucleótido en pares de bases (pb), la temperatura óptima de amplificación ( $T_m$ ), el porcentaje de Guanina-Citocina (%GC) y la longitud del fragmento amplificado.

Tabla VII: Características de los oligonucleótidos diseñados

Nombre	Oligonucleótido ( 5'-3' )	%GC	$T_m$ °C	Tamaño (pb)
ADH1/FW	CCAAGTCGCCCCCATCTTGTGTGC	50	60.0	82
ADH1/RV	AACCCAGTGACCGGCCATCAAGTT	50	60.0	
ADH2/FW	GCATAAGGATATCCCAGTTCCAAA	50	60.1	85
ADH2/RV	CAAATCGGTGTGGCAGACACCAGA	50	60.1	
ADH3/FW	GCTGATGCTATTCAAGCCGCCAAA	50	60.1	122
ADH3/RV	TCACCAGCTTTCAAGTCTGCCTCT	50	60.0	
ADH4/FW	TTGGTTTGCCACCTGCTTTGACTG	50	60.2	104
ADH4/RV	ACAGGCATCGGTGATTGGGTTAGA	50	60.0	
ADH5/FW	ATGTGATACCAGGCCAATGGGTCA	50	60.2	86
ADH5/RV	ACCCATAGCAAGGGCGTATTGGAT	50	60.2	
ARO10 /FW	AGCATTCGGAGACTTCGACGGAAA	50	60.0	182
ARO10 /RV	CCGCTGCTTCAACCATGCACTTTA	50	60.0	
ATF1/FW	AGCATCTCCATGGCTTAGGGTTCA	50	59.9	159
ATF1/RV	ATTTGGCATCGGGCTCCTCTAACT	50	60.1	
ATF2/FW	AGCGTGCTTTCTTGTAGCCCTGTA	50	60.2	96
ATF2/RV	CTTGCGTTGCTTGGAAATAGCCACA	50	60.0	
IRC15/FW	ACTGTGTATAAAGGCACGGCTGCT	50	60.7	135
IRC15/RV	ACCAGGACACTGAATAACCGCAGA	50	60.1	

(continua).

BAT1/FW	TCTGGTACTGCTGCTGTCGTTTCA	50	60.0	95
BAT1/RV	GCACCACATTGTTCCACCAGGCAAT	50	60.4	
BAT2/FW	GAAATCGGCTGGAAAGGCGAACAA	50	60.0	135
BAT2/RV	CCTTGACCAATTGCCATGCTCAGT	50	59.8	
ILV2/FW	GGTGCTCAAGTTGCAAAGCCAGAA	50	60.2	103
ILV2/RV	TACCAGCTTGAACGGCAGAACTCA	50	60.1	
ILV5/FW	TTCTTACGCCGTCTGGAACGATGT	50	60.0	85
ILV5/RV	AACGTAACCGGAACCAATGGCAAC	50	60.0	
ILV6/FW	ACCCACACGTATCTCTGCCTTCTT	50	59.6	114
ILV6/RV	TCCTCGGTGCTTGTCTTCAAAGGA	50	60.0	
LEU1/FW	TCGGTCCCGAAGAAGGTTTCACTT	50	59.9	102
LEU1/RV	CAATACCAAAGGCCAGCGAACCAA	50	59.9	
LEU2/FW	ATGGTGATGGTGTCTGCTTGGGATA	50	60.0	81
LEU2/RV	CCATGAAAGCGGCCATTCTTGTGA	50	59.9	
LEU3/FW	TGCTGAACATCCGGCAAATCAACC	50	60.1	83
LEU3/RV	AAGAGTTGGCTTGTGTCTGCAGGTA	50	60.4	
LEU4/FW	TGGTCAAGTCAAAGTAGGCGACCA	50	59.9	81
LEU4/RV	AGGGCGTCGACCAAAGAAGAGATT	50	60.0	
LEU9/FW	AGTGGGCCAGGTAGAAATCAACGA	50	59.9	175
LEU9/RV	TATGAAAGATGCCGCTTGGGTTGC	50	59.9	
PDC1/FW	TGTCGAATTCCACTCCGACCACAT	50	60.0	114
PDC1/RV	TAACCCTTAGCGGGCGTCAGCAATA	50	60.0	
PDC5/FW	AGATGGGCTGGTAACGCTAACGAA	50	60.0	86
PDC5/RV	GGATGGAACACCAACAACGTGCAA	50	60.1	
PDC6/FW	TGGGCTGGTAATGCAAATGAGCTG	50	59.8	113
PDC6/RV	ACACCGACGTGTTCTGCATACGAT	50	60.2	
PMA1/FW	AGGCTAAGGACGCTTTGACCAAGT	50	60.0	181
PMA1/RV	TGGACATCTTCTGGGATTGGGTGA	50	60.1	
SFA1/FW	TGCTTTGTACTGCTGAGTGTGG	50	59.2	113
SFA1/RV	TGGTCCCATCAGGCATTACACCTT	50	60.1	
THI3/FW	TTGCATGCTCTCCGAATTCAGCAC	50	59.8	194
THI3/RV	TGGGTTGTTTCGCTTGGTTGGTAAG	50	59.5	
PDB1 /FW	CCGCTTTGAAGGGTTTGAAGCCAA	50	60.5	158
PDB1/RV	TGCAGCACCATTAGGACCTCTGAA	50	60.2	
PDA1/FW	ATTGATGGGTAGAAGAGCCGGTGT	50	60.1	158
PDA1/RV	AGCAGGCGTCCTCGTTCTTGTATT	50	60.4	
LPD1/FW	AGAGGCAAATTAGGCGGTACCTGT	50	60.2	99
LPD1 /RV	CGCTTCCGTATGCATTTGGTGGAA	50	60.1	
LAT1/RW	AGGAACTAGTCAAGCGTGCCAGAA	50	60.2	178
LAT1/RV	TCCACAGCGACCCTTTCAACAGTA	50	60.2	
ACT1/FW	ACGTTCCAGCCTTCTACGTTTCCA	50	60.0	103
ACT1/RV	ACGTGAGTAACACCATCACCGGAA	50	60.5	



### 6.3 Diseño de fermentaciones:

A fin de determinar que variables operativas tienen más efecto en la biosíntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo en las levaduras industriales, se realizaron fermentaciones de ambas cepas, bajo cuatro condiciones experimentales y una condición control. Las condiciones experimentales fueron: **oxigenación** 25 ppm - 35 ppm, **temperatura de arranque** (las primeras 24 horas de la fermentación) 8.5°C - 12.5°C, **temperaturas de fermentación** (se mantuvieron desde el segundo día de fermentación hasta el día siete) 12.5°C - 17.5°C y **composición del mosto** 35% malta - 50% malta.

Las condiciones y variables de cada fermentación por cada cepa se muestran en las tablas VIII, IX, X, XI y XII

Tabla VIII: Diseño de fermentaciones. Condición control.

Fermentación	Cepa	Condiciones			
		Oxigenación	T. Arranque	T. Fermentación.	C. Mosto
1	790	32ppm	11°C	16°C	50% Malta
2	820	32 ppm	11°C	16°C	35% Malta

Tabla IX: Diseño de fermentaciones. Condición experimental: Oxigenación.

Fermentación	Cepa	Condiciones			
		<b>Oxigenación</b>	T. Arranque	T. Fermentación.	C. Mosto
3	790	<b>25 ppm</b>	11°C	16°C	50% Malta
4	790	<b>35 ppm</b>	11°C	16°C	50% Malta
5	820	<b>25 ppm</b>	11°C	16°C	35% Malta
6	820	<b>35 ppm</b>	11°C	16°C	35% Malta

Tabla X: Diseño de fermentaciones. Condición experimental: Temperatura de arranque

Fermentación	Cepa	Condiciones			
		Oxigenación	<b>T. Arranque</b>	T. Fermentación.	C. Mosto
7	790	32ppm	<b>8.5°C</b>	16°C	50% Malta
8	790	32ppm	<b>12.5°C</b>	16°C	50% Malta
9	820	32 ppm	<b>8.5°C</b>	16°C	35% Malta
10	820	32ppm	<b>12.5°C</b>	16°C	35% Malta

Tabla XI: Diseño de fermentaciones. Condición experimental: Temperatura de fermentación

Fermentación	Cepa	Condiciones			
		Oxigenación	T. Arranque	<b>T. Fermentación.</b>	C. Mosto
11	790	32ppm	11°C	<b>12.5°C</b>	50% Malta
12	790	32ppm	11°C	<b>17.5°C</b>	50% Malta
13	820	32 ppm	11°C	<b>12.5°C</b>	35% Malta
14	820	32ppm	11°C	<b>17.5°C</b>	35% Malta

Tabla XII: Diseño de fermentaciones. Condición experimental: Composición de mosto.

Fermentación	Cepa	Condiciones			
		Oxigenación	T. Arranque	T. Fermentación.	<b>C. Mosto</b>
15	790	32ppm	11°C	16°C	<b>35% Malta</b>
16	790	32ppm	11°C	16°C	<b>50% Malta</b>
17	820	32 ppm	11°C	16°C	<b>35% Malta</b>
18	820	32ppm	11°C	16°C	<b>50% Malta</b>

La levadura se monitoreo antes de inocular y en el día siete de la fermentación, se analizo: viabilidad y vitalidad por medio de microcultivo (Apéndice C) y se realizaron cultivos microbiológicos para descartar contaminación con otras levaduras, o de alguna bacteria láctica, ya que la presencia de estos microorganismos podían influir en un dato erróneo en el aroma final del proceso. También durante la fermentación se realizo conteo de células y en el día siete se determino la cantidad de acetato de etilo e asoamilo presentes en la muestra. Se realizo un análisis de perfil de aminoácido en los mostos, para determinar que no hubiera diferencias significativas de los aminoácidos presentes en cada uno de los mostos utilizados en los ensayos. Estos análisis se realizaron utilizando el método de HPLC (High Performance Liquid Chromatography) fase reversa y se cuantificación por detector de fluorescencia.

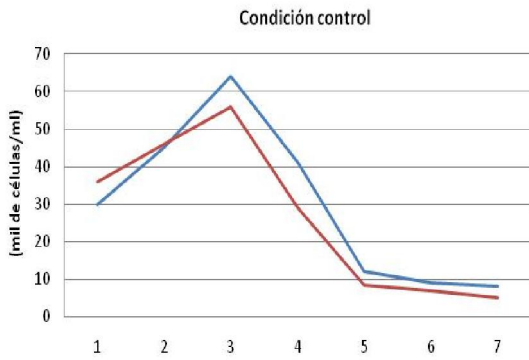
En lo que respecta a la vitalidad y viabilidad las células se cuantificaron y se observo capacidad de formar microcolonias a las 18hrs de incubación a  $30^{\circ}\text{C}\pm 1$ , se obtuvieron valores por debajo del 10% de células muertas, estos resultados son valores aceptados en el proceso. Con lo que respecta a los análisis microbiológicos no hubo

crecimiento, confirmando ausencia de una contaminación. Respecto al conteo de células en suspensión durante el curso de la fermentación se observó un patrón de crecimiento normal, en forma logarítmica los primeros dos o tres días para pasar a un decremento hasta alcanzar valores mínimos (Tabla XIII). Todos los procesos de fermentación, fueron realizadas por duplicado a excepción de la condición de temperatura de arranque. En el caso de la condición de composición del mosto estas fermentaciones se realizaron por Leal 2011.

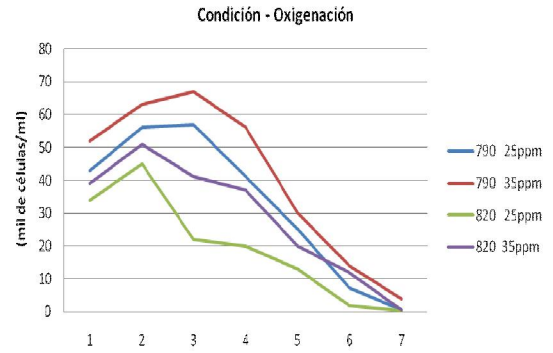
Tabla XIII: Curso temporal de las fermentaciones, células en suspensión, análisis microbiológico y vitalidad.

Fermentación			Células en suspensión (mil de células/ml)							Análisis Micro.	% células muertas
	Cepa	Condición	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7		
1	790	Control	30	45	64	41	12	9.0	8.0	(-)	4.65
2	820	Control	36	46	56	29	8.4	7.0	5.0	(-)	6.40
3	790	Oxigenación	43	56	57	41	25	7.2	.57	(-)	6.14
4	790	Oxigenación	52	63	67	56	30	14	4.0	(-)	7.39
5	820	Oxigenación	34	45	22	20	13	2.0	.40	(-)	7.89
6	820	Oxigenación	39	51	41	37	20	12	.60	(-)	6.34
7	790	T. arranque	33	50	68	57	51	20	19	(-)	6.82
8	790	T. arranque	45	61	60	58	34	29	26	(-)	8.80
9	820	T. arranque	24	36	47	32	22	17	12	(-)	3.44
10	820	T. arranque	27	45	54	36	35	24	23	(-)	4.18
11	790	T. Fermen.	48	58	51	25	16	12	9.0	(-)	5.78
12	790	T. Fermen.	37	42	39	24	13	7.8	5.0	(-)	6.39
13	820	T. Fermen.	51	54	62	22	11	9.3	7.0	(-)	8.45
14	820	T. Fermen.	42	41	40	36	22	14	4.0	(-)	6.79

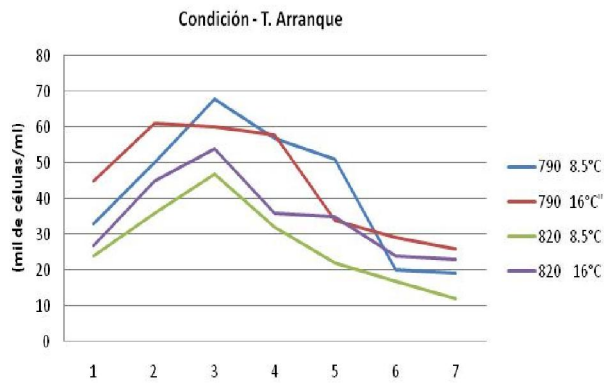
Con el fin de determinar el día con mayor expresión en los genes de interés se realizaron graficas mostrando los cursos temporales de cada cepa (790 y 820), correspondientes al número de células en suspensión, tanto en la condición control como en las condiciones experimentales (Fig. 8). Se observó en el curso temporal de las fermentaciones que dentro de los tres primeros días del proceso hay un crecimiento logarítmico de la levadura y a partir del cuarto día la levadura empieza a activar su maquinaria de floculación para posteriormente decrece hasta alcanzar valores mínimos, esto ocurre en ambas cepas y en las cuatro condiciones a evaluar, determinando por lo tanto que se extraerá ARN de la levadura en los tres primeros días de la fermentación donde probablemente hay una mayor intensidad en la expresión de los genes.



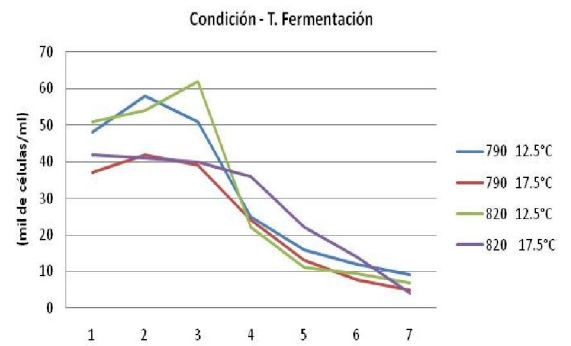
A)



B)



C)



D)

Figura 8: Curso temporal de las células en suspensión del proceso de fermentación. Condiciones: Panel A) control, Panel B) oxigenación, Panel C) temperatura de arranque y Panel D) temperatura de fermentación

## **6.4 Identificación de genes**

### **6.4.1 Extracción de ácidos nucleicos.**

Se extrajo el ADN<sub>g</sub> utilizando la técnica de fenol-cloroformo del manual Twintrack Advanced Labs con algunas modificaciones (Apéndice D).

Se cuantificaron las muestras (Apéndice F) en el espectrofotómetro Smart Spec diluyendo 1:100 en agua Milli Q libre de nucleasas y los resultados se obtuvieron en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , se determinó la pureza de las muestras y todas las extracciones presentaron una pureza entre 1.8 a 2.0.

Para la extracción de ARN total se probaron dos métodos el kit de High Pure RNA Isolation (Roche Applied Science) y el de Tripure (Roche Applied Science) (Apéndice H). Finalmente se utilizó el kit High Pure RNA Isolation ya que nos dio mejores resultados en cuanto a concentración y pureza de las muestras después de tratarlas con DNasa. La extracción del RNA se realizó los tres primeros días de cada fermentación., y al igual que el ADN<sub>g</sub> las muestras se cuantificaron y se obtuvieron en  $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ , con valores de pureza entre 1.8 a 2.0.

### **6.4.2 Electroforesis en gel de agarosa.**

Se realizó electroforesis para verificar tamaño e integridad del ADN<sub>g</sub> extraído, ambas cepas se observaron en un gel de agarosa al 1%, el ADN<sub>g</sub> tuvo el tamaño esperado y no se observó degradación (Figura 11).

Después de haber extraído el ADN<sub>g</sub> se realizaron los PCR punto final para verificar que el ADN<sub>g</sub> fuera amplificable, y que los oligonucleótidos estuvieran bien diseñados. Dado que los oligonucleótidos diseñados tenían temperaturas de amplificación que oscilaban entre 59.2°C y 60.5°C, se determinó trabajar todos los oligonucleótidos a una temperatura de amplificación de 60°C por 35 ciclos.

Se cargó 5  $\mu\text{l}$  de la muestra y 2  $\mu\text{l}$  de buffer de carga en cada pocillo, se utilizó como marcador de peso molecular, Hyperladder IV de Bioline con un rango de 25 a 500 pb y el marcador de 1kb de Promega con un rango de 250 a 10,000 pb.

Después de analizar el conteo de células en suspensión durante el curso temporal de cada una de las fermentaciones (Fig. 8) se determinó extraer el ARN de los días uno, dos y tres, ya que son los días que se observa un crecimiento logarítmico en el conteo y por lo tanto podría indicar mayor intensidad en la expresión de los genes de interés. El RNA total se observó en un gel con formaldehído y se determinó su integridad para cuantificar y obtener el cDNA ajustando a 2.0 µg. En la figura 9 se observa el ARN total extraído de las fermentaciones en la condición control de los días dos de ambas cepas. El RNA muestra las características adecuadas y no se observa degradación.

Los amplificados obtenidos fueron del tamaño esperado y predicho por el análisis *in silico*. En las figuras 10 y 11 se muestran los gels de agarosa al 2% de los PCR de los diferentes oligonucleótidos diseñados utilizando ambos ADNg (790 y 820).

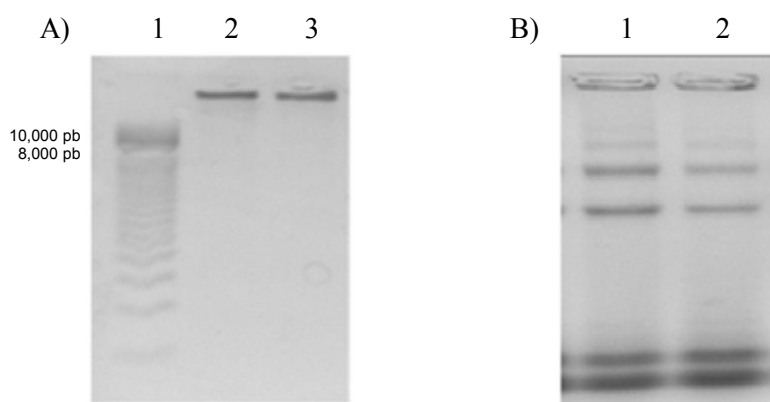


Figura 9: Electroforesis en gel de agarosa al 1% de Panel A) ADNg con marcador de 1 kb y Panel B) RNA total (Las figuras presentan inversión de color).

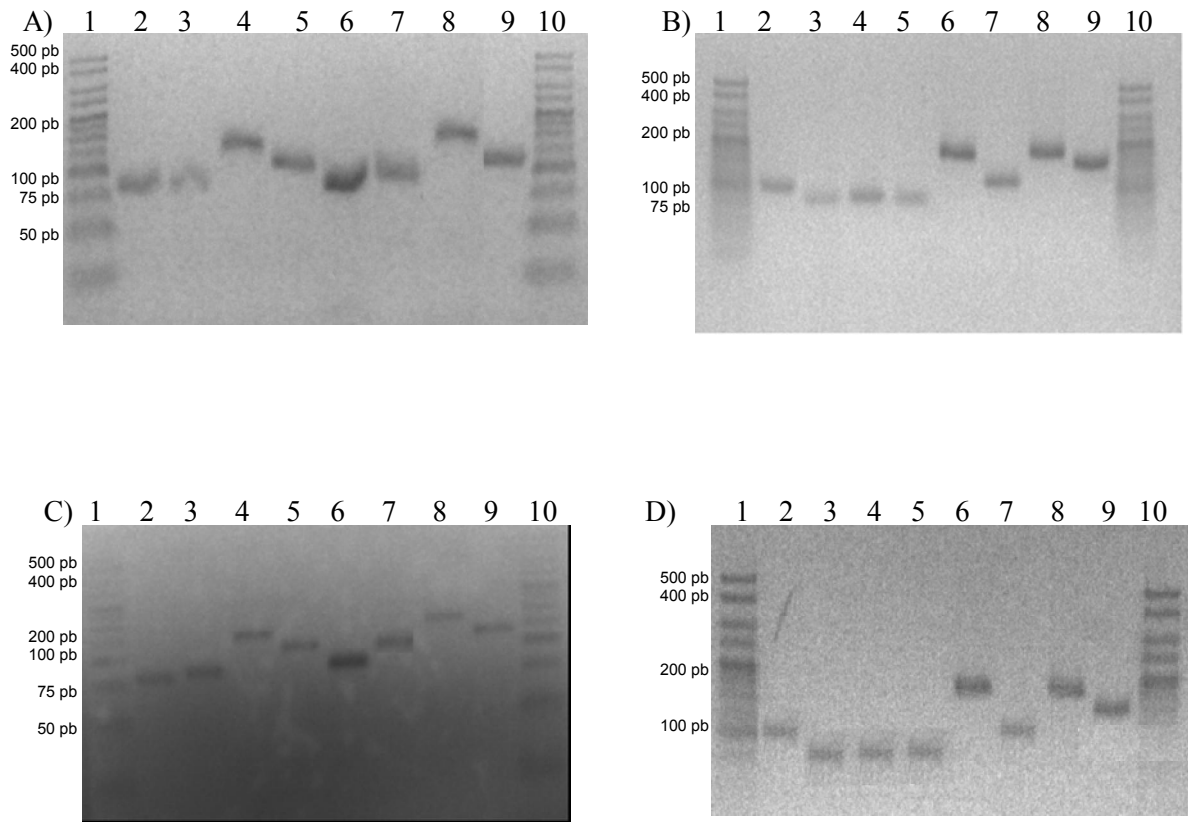


Figura 10: Visualización de los productos de PCR para distintos genes. Panel A y B cepa 790, panel C y D cepa 820. Panel A y C Carriles: 1 y 10, marcador de 500 pb; 2, ADH1 (82 pb); 3, ADH2 (85 pb); 4, ADH3 (122 pb); 5, ADH4 (104 pb); 6, ADH5 (85 pb); 7, BAT1 (95 pb); 8, BAT2 (135 pb); 9, SFA1 (113 pb). Panel B. Carriles: 1 y 10, marcador de 500 pb; 2, LEU1 (102 pb); 3, LEU2 (81 pb); 4, LEU3 (83 pb); 5, LEU4 (81 pb); 6, LEU9 (175 pb); 7, PDC1 (114 pb); 8, PDC5 (180 pb); 9, PDC6 (152 pb). (Las figuras presentan inversión de color).

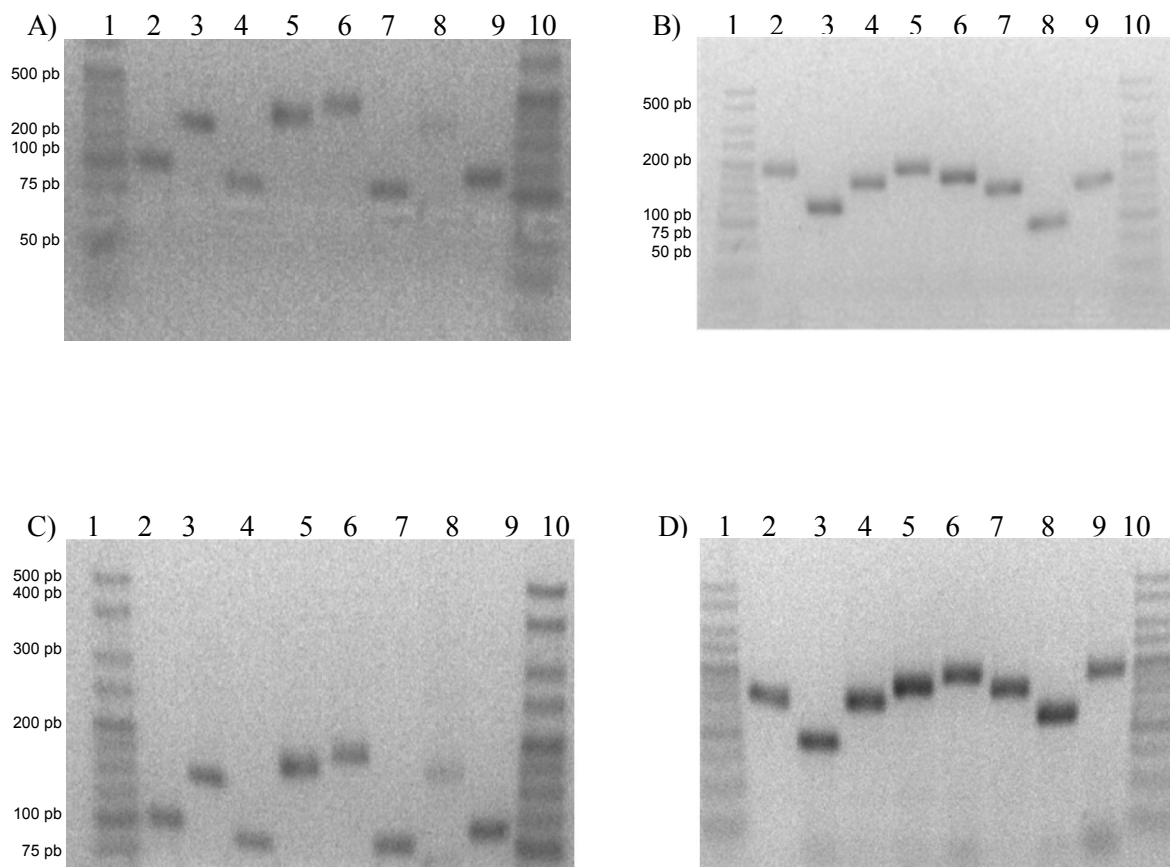


Figura 11: Visualización de los productos de PCR para distintos genes. Panel A y B cepa 790, panel C y D cepa 820. Carriles: 1 y 10, marcador de 500 pb; ACT (103 pb); 3, ATF1 (159 pb); 4, ATF2 (96 pb); 5, ARO10 (182 pb); 6, THI3 (194 pb); 7, ILV2 (103 pb); 8, ILV5 (85 pb); 9, ILV6 (114 pb). Panel B. Carriles: 1 y 10, marcador de 500 pb; 2, PDB1 (158 pb); 3, LPD1 (99 pb); 4, PDA1 (158 pb); 5, ACH1 (183 pb); 6, ACS2 (195 pb); 7, LAT1 (178 pb); 8, IRC15 (135 pb); 9, ACS1 (199 pb). (Las figuras presentan inversión de color).



## **6.5 Expresión genética por qPCR**

Para determinar la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión de los genes seleccionados, se optó por un análisis de cuantificación relativa, en este análisis el gen en estudio es comparado con uno o más genes de referencia también llamados genes constitutivos. Los genes de referencia son genes expresados constitutivamente y que intervienen en las funciones básicas de las células, para este análisis se utilizó actina (ACT1), una proteína estructural implicada en la polarización de la célula, endocitosis, y otras funciones del citoesqueleto.

Cada muestra se colocó en una placa de 96 pozos por triplicado con el fin de confirmar la exactitud y repetitividad del ensayo. Se obtuvieron los Cp de todos los genes analizados y se realizó una corrección de Cp' en base a la eficiencia de la reacción de PCR. Se normalizaron los Cp mediante la diferencia entre el Cp del gen de interés - Cp del gen constitutivo para cada condición y por cada cepa, obteniendo como resultado un "ΔCp".

### **6.5.1 Eficiencia de la reacción de PCR.**

Los cálculos de cuantificación relativa de expresión genética se basan en la comparación de los valores Cp utilizando la eficiencia de la reacción de la PCR como factor de corrección. La eficiencia se define como la duplicación del producto en cada ciclo y está se calcula a partir de la pendiente de la curva estándar y debe ser aproximadamente igual a dos.

Por lo tanto se realizó una curva estándar, con diluciones seriadas de 7 a 9 puntos por triplicado de una concentración de ADN conocida en este caso se utilizaron amplicones generados de las reacciones de qPCR. La eficiencia de los oligonucleótidos se determinó utilizando el "LightCycler 480 software release 1.5.0" (Tabla XIV), todos presentaron eficiencias mayores a 1.8.

Tabla XIV: Eficiencias de cada par de oligonucleótidos diseñados.

Gen	Eficiencia	Gen	Eficiencia	Gen	Eficiencia
ACT	1.955	ATF1	1.905	BAT1	1.882
ADH1	1.974	ATF2	2.050	BAT2	1.996
ADH2	1.894	LEU1	1.890	PDA1	1.977
ADH3	1.998	LEU2	1.970	PDB1	1.946
ADH4	1.944	LEU3	1.930	LAT1	2.026
ADH5	1.874	LEU4	1.922	IRC15	2.045
ILV2	1.975	LEU9	1.953	ACS1	1.942
ILV5	1.923	PDC1	1.902	ACS2	1.980
ILV6	1.911	PDC5	1.937	LPD1	2.037
SFA1	1.974	PDC6	1.909	ACH1	2.054
THI3	1.924	ARO10	1.955		

### 6.5.2 Análisis de expresión en la curva temporal de fermentación.

Se analizó el patrón de expresión en el curso temporal del proceso de fermentación (desde el día uno hasta el día siete) tanto en la cepa 790 como en la cepa 820. Los resultados  $\Delta C_p'$  se expresaron en número de veces utilizando la fórmula  $2^{(-\Delta C_p)}$ , por día y en cada gen de interés. Las fermentaciones se realizaron sin modificar ninguna condición, estas condiciones se muestran en la tabla VIII.

En las figuras 12 y 13 se muestran las expresiones de cada gen con respecto al gen de referencia; dentro de los siete días de fermentación, los resultados mostrados corresponden a la media de tres repeticiones con sus correspondientes desviaciones estándar. Los resultados muestran que los días donde hay un mayor aumento de expresión de los genes de interés con respecto al gen de referencia son en los días uno, dos y tres, siendo el tercer día, donde se presenta un mayor número de genes con mayor expresión, además cabe resalta que desde el día cuatro hasta el día siete la expresión de los genes se ve disminuida en ambas cepas.

En la tabla XV se observa los resultados del análisis analítico en donde se determinó la cantidad de acetato de etilo y acetato de isoamilo en el día siete de fermentación para ambas cepas, determinando que la cepa 820 tiene un pequeño aumento en la producción de acetato de etilo con respecto a la cepa 790, mientras que acetato de isoamilo se mantienen sin cambio.

Tabla XV: Resultado del análisis de acetato de etilo y acetato de isoamilo en la curva temporal de fermentación para las cepas 790 y 820.

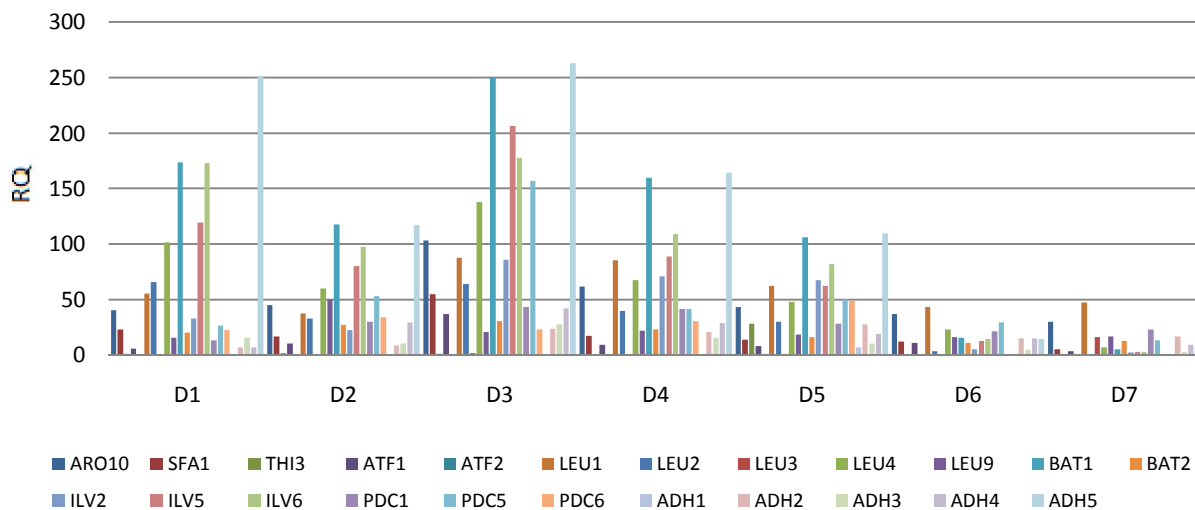
<b>Ester</b>	<b>Cepa 790</b>	<b>Cepa 820</b>
Acetato de etilo mg/l	23.10	27.10
Acetato de isoamilo mg/l	1.90	1.90

Cabe resalta que aunque ambas cepas presentan el mismo patrón de expresión, los resultados muestran que mientras algunos genes en la cepa 790 se expresan en más de 150 veces con respecto al gen constitutivo, en la cepa 820 los genes se expresan en no más de 12 veces, es interesante comentar que a pesar de que la cepa 820 está teniendo expresiones relativamente bajas, la producción de acetato de etilo es mayor que en la cepa 790.

De igual manera se determino por gen y por cepa, el día donde se observa su mayor expresión, expresado en porcentaje (Fig. 14).

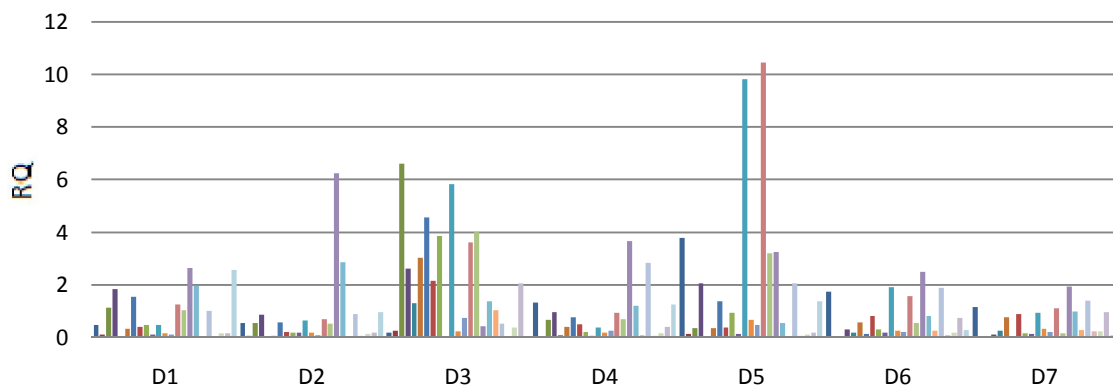
En lo que respecta a la cepa 790 se observa un aumento de expresión de los genes de interés de manera general en el tercer día, seguido del segundo día, siendo los genes ADH1 que cataliza una isoenzima alcohol deshidrogenasa y THI3 que cataliza una descarboxilasa los que presentan mayor expresión en el tercer día de la fermentación. Mientras que para la cepa 820 se observa una mayor expresión en el día dos siendo los genes ATF1 que codifica una acetil tranferasa y LEU4 que codifica una alfa isopropilmalato sintetasa los que presentaron mayor expresión con respecto al gen constitutivo.

Las muestras para la extracción de ARN para todos los ensayos de expresión se tomaron en puntos fijos de la fermentación, siendo interesante observar que hubo diferencias en el patrón de expresión entre las cepas 790 y la 820, sin embargo en ambas cepas se puede determinar que el día con mayor expresión con respecto al gen constitutivo en los genes de interés fue el tercer día.



Día	D1		D2		D3		D4		D5		D6		D7	
Gen	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$
ARO10	40.14	$\pm 0.31$	45.03	$\pm 0.85$	103.22	$\pm 0.28$	61.82	$\pm 0.05$	43.04	$\pm 1.01$	36.95	$\pm 0.31$	29.87	$\pm 0.31$
SFA1	23.28	$\pm 0.95$	16.75	$\pm 0.11$	54.84	$\pm 1.00$	17.27	$\pm 0.66$	13.82	$\pm 0.98$	12.25	$\pm 0.68$	5.04	$\pm 0.95$
THI3	1.02	$\pm 0.90$	1.46	$\pm 0.76$	1.07	$\pm 0.98$	0.69	$\pm 0.97$	28.06	$\pm 0.81$	0.05	$\pm 0.91$	0.05	$\pm 0.90$
ATF1	6.00	$\pm 0.79$	10.31	$\pm 0.72$	37.06	$\pm 0.69$	9.30	$\pm 0.75$	7.99	$\pm 0.17$	11.12	$\pm 0.29$	3.56	$\pm 0.79$
ATF2	0.01	$\pm 0.29$	0.07	$\pm 0.27$	0.07	$\pm 0.27$	0.04	$\pm 0.24$	0.16	$\pm 0.14$	0.07	$\pm 0.21$	0.11	$\pm 0.29$
LEU1	55.50	$\pm 0.20$	37.56	$\pm 0.36$	87.52	$\pm 0.22$	85.31	$\pm 0.19$	62.45	$\pm 0.80$	42.98	$\pm 0.33$	47.46	$\pm 0.20$
LEU2	65.46	$\pm 0.89$	32.80	$\pm 0.69$	64.20	$\pm 0.91$	39.75	$\pm 0.83$	29.93	$\pm 0.27$	3.27	$\pm 0.20$	0.50	$\pm 0.89$
LEU3	0.80	$\pm 0.27$	0.16	$\pm 0.38$	1.41	$\pm 0.43$	0.54	$\pm 0.28$	0.58	$\pm 0.74$	0.17	$\pm 0.21$	15.84	$\pm 0.27$
LEU4	101.19	$\pm 1.01$	59.90	$\pm 0.98$	138.07	$\pm 0.17$	67.43	$\pm 1.02$	47.69	$\pm 0.98$	23.21	$\pm 0.28$	7.08	$\pm 1.01$
LEU9	15.52	$\pm 0.98$	50.36	$\pm 0.64$	20.56	$\pm 0.74$	21.61	$\pm 0.91$	18.17	$\pm 0.78$	16.05	$\pm 0.12$	16.88	$\pm 0.98$
BAT1	173.34	$\pm 0.81$	117.71	$\pm 0.71$	250.11	$\pm 0.07$	159.55	$\pm 0.73$	106.01	$\pm 0.17$	15.61	$\pm 0.03$	4.91	$\pm 0.81$
BAT2	19.99	$\pm 0.17$	27.11	$\pm 0.15$	30.29	$\pm 0.17$	22.88	$\pm 0.22$	15.88	$\pm 0.13$	10.79	$\pm 0.03$	12.37	$\pm 0.17$
ILV2	32.86	$\pm 0.14$	22.18	$\pm 1.00$	85.73	$\pm 0.07$	70.94	$\pm 0.17$	67.30	$\pm 0.56$	5.34	$\pm 0.12$	2.19	$\pm 0.14$
ILV5	119.15	$\pm 0.80$	79.98	$\pm 0.43$	206.27	$\pm 0.31$	88.90	$\pm 0.85$	62.41	$\pm 0.16$	12.83	$\pm 0.08$	2.95	$\pm 0.80$
ILV6	172.76	$\pm 0.27$	97.31	$\pm 0.65$	177.40	$\pm 0.68$	109.17	$\pm 0.38$	81.67	$\pm 0.15$	14.62	$\pm 0.22$	2.87	$\pm 0.27$
PDC1	13.51	$\pm 0.74$	30.03	$\pm 0.66$	43.45	$\pm 0.91$	41.26	$\pm 0.72$	28.24	$\pm 0.42$	21.44	$\pm 0.27$	22.81	$\pm 0.74$
PDC5	26.32	$\pm 0.98$	52.98	$\pm 0.60$	156.58	$\pm 0.29$	41.30	$\pm 0.90$	50.16	$\pm 0.07$	29.27	$\pm 0.10$	13.03	$\pm 0.98$
PDC6	22.72	$\pm 0.78$	33.79	$\pm 0.86$	23.24	$\pm 0.21$	30.77	$\pm 0.92$	49.02	$\pm 0.27$	0.33	$\pm 0.54$	0.11	$\pm 0.78$
ADH1	0.04	$\pm 0.17$	0.05	$\pm 0.56$	0.14	$\pm 0.33$	0.10	$\pm 0.07$	6.67	$\pm 0.74$	0.26	$\pm 0.09$	0.02	$\pm 0.17$
ADH2	6.61	$\pm 0.13$	8.78	$\pm 0.16$	23.57	$\pm 0.20$	20.98	$\pm 0.18$	27.84	$\pm 0.98$	15.04	$\pm 0.10$	16.56	$\pm 0.13$
ADH3	15.79	$\pm 0.38$	10.44	$\pm 0.15$	27.83	$\pm 0.21$	15.29	$\pm 0.78$	10.52	$\pm 0.10$	4.72	$\pm 0.21$	2.59	$\pm 0.38$
ADH4	7.11	$\pm 0.34$	29.15	$\pm 0.42$	42.35	$\pm 0.05$	28.98	$\pm 0.43$	18.78	$\pm 0.04$	15.14	$\pm 0.25$	9.44	$\pm 0.81$
ADH5	251.57	$\pm 0.13$	117.34	$\pm 0.07$	262.88	$\pm 0.16$	164.57	$\pm 0.38$	109.81	$\pm 0.09$	14.66	$\pm 0.12$	6.71	$\pm 0.17$

Figura 12: Resultado del patrón de expresión en la curva temporal de fermentación de la cepa 790, en genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo. ( $\sigma \pm$  Desviación estándar).



■ ARO10 ■ SFA1 ■ THI3 ■ ATF1 ■ ATF2 ■ LEU1 ■ LEU2 ■ LEU3 ■ LEU4 ■ LEU9 ■ BAT1 ■ BAT2  
 ■ ILV2 ■ ILV5 ■ ILV6 ■ PDC1 ■ PDC5 ■ PDC6 ■ ADH1 ■ ADH2 ■ ADH3 ■ ADH4 ■ ADH5

Día	D1		D2		D3		D4		D5		D6		D7	
Gen	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$	RQ	$\sigma$
ARO10	0.46	± 0.34	0.54	± 0.36	0.17	± 0.65	1.31	± 0.29	3.79	± 1.01	1.74	± 0.31	1.15	± 0.49
SFA1	0.09	± 0.13	0.05	± 0.02	0.24	± 0.66	0.03	± 0.21	0.12	± 0.98	0.02	± 0.68	0.00	± 0.62
THI3	1.13	± 0.26	0.54	± 0.38	6.61	± 0.60	0.66	± 0.33	0.35	± 0.81	0.04	± 0.91	0.01	± 0.27
ATF1	1.84	± 0.14	0.85	± 0.09	2.61	± 0.86	0.95	± 0.20	2.05	± 0.17	0.29	± 0.57	0.10	± 0.28
ATF2	0.01	± 0.13	0.01	± 0.02	1.30	± 0.56	0.07	± 0.21	0.01	± 0.14	0.17	± 1.09	0.25	± 0.62
LEU1	0.31	± 0.03	0.04	± 0.14	3.02	± 0.16	0.40	± 0.28	0.34	± 0.80	0.56	± 0.90	0.77	± 0.44
LEU2	1.55	± 0.14	0.57	± 0.15	4.56	± 0.15	0.77	± 0.12	1.36	± 0.27	0.12	± 0.78	0.01	± 0.20
LEU3	0.38	± 0.38	0.20	± 0.14	2.15	± 0.78	0.50	± 0.03	0.36	± 0.74	0.82	± 1.45	0.88	± 0.45
LEU4	0.46	± 0.09	0.19	± 0.16	3.86	± 0.17	0.19	± 0.03	0.93	± 0.98	0.30	± 0.68	0.15	± 0.56
LEU9	0.11	± 0.21	0.19	± 0.16	0.02	± 0.13	0.05	± 0.12	0.13	± 0.25	0.16	± 0.91	0.13	± 0.18
BAT1	0.46	± 0.07	0.65	± 0.08	5.82	± 0.56	0.38	± 0.08	9.83	± 0.80	1.91	± 0.31	0.92	± 0.22
BAT2	0.16	± 0.09	0.18	± 0.38	0.22	± 0.16	0.18	± 0.22	0.66	± 0.27	0.26	± 0.95	0.31	± 0.56
ILV2	0.11	± 0.07	0.08	± 0.12	0.74	± 0.15	0.24	± 0.27	0.46	± 0.74	0.19	± 0.90	0.21	± 0.16
ILV5	1.25	± 0.16	0.69	± 0.05	3.62	± 0.07	0.92	± 0.10	10.46	± 0.98	1.57	± 0.79	1.10	± 0.14
ILV6	1.02	± 0.30	0.51	± 0.09	4.00	± 0.07	0.67	± 0.54	3.19	± 0.78	0.53	± 0.29	0.14	± 0.12
PDC1	2.64	± 0.09	6.24	± 0.12	0.41	± 0.27	3.67	± 0.09	3.24	± 0.17	2.49	± 0.20	1.94	± 0.08
PDC5	1.94	± 0.18	2.85	± 0.36	1.37	± 0.39	1.19	± 0.10	0.54	± 0.07	0.82	± 0.42	0.97	± 0.22
PDC6	0.02	± 0.09	0.02	± 0.50	1.02	± 0.13	0.07	± 0.21	0.02	± 0.27	0.24	± 0.11	0.28	± 0.27
ADH1	1.01	± 0.09	0.89	± 0.09	0.51	± 0.12	2.84	± 0.89	2.06	± 0.74	1.89	± 0.29	1.38	± 0.10
ADH2	0.03	± 0.06	0.05	± 0.09	0.00	± 0.23	0.05	± 0.27	0.05	± 0.98	0.08	± 0.88	0.22	± 0.54
ADH3	0.15	± 0.15	0.12	± 0.06	0.36	± 0.13	0.14	± 1.01	0.11	± 0.10	0.17	± 0.11	0.21	± 0.09
ADH4	0.14	± 0.09	0.17	± 0.15	2.04	± 0.10	0.39	± 0.98	0.18	± 0.04	0.74	± 0.15	0.96	± 0.08
ADH5	2.57	± 0.09	0.96	± 0.09	0.03	± 0.19	1.25	± 0.81	1.38	± 0.09	0.28	± 0.22	0.07	± 0.09

Figura 13: Resultado del patrón de expresión en la curva temporal de fermentación de la cepa 820, en genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo. ( $\sigma$  ± Desviación estándar).

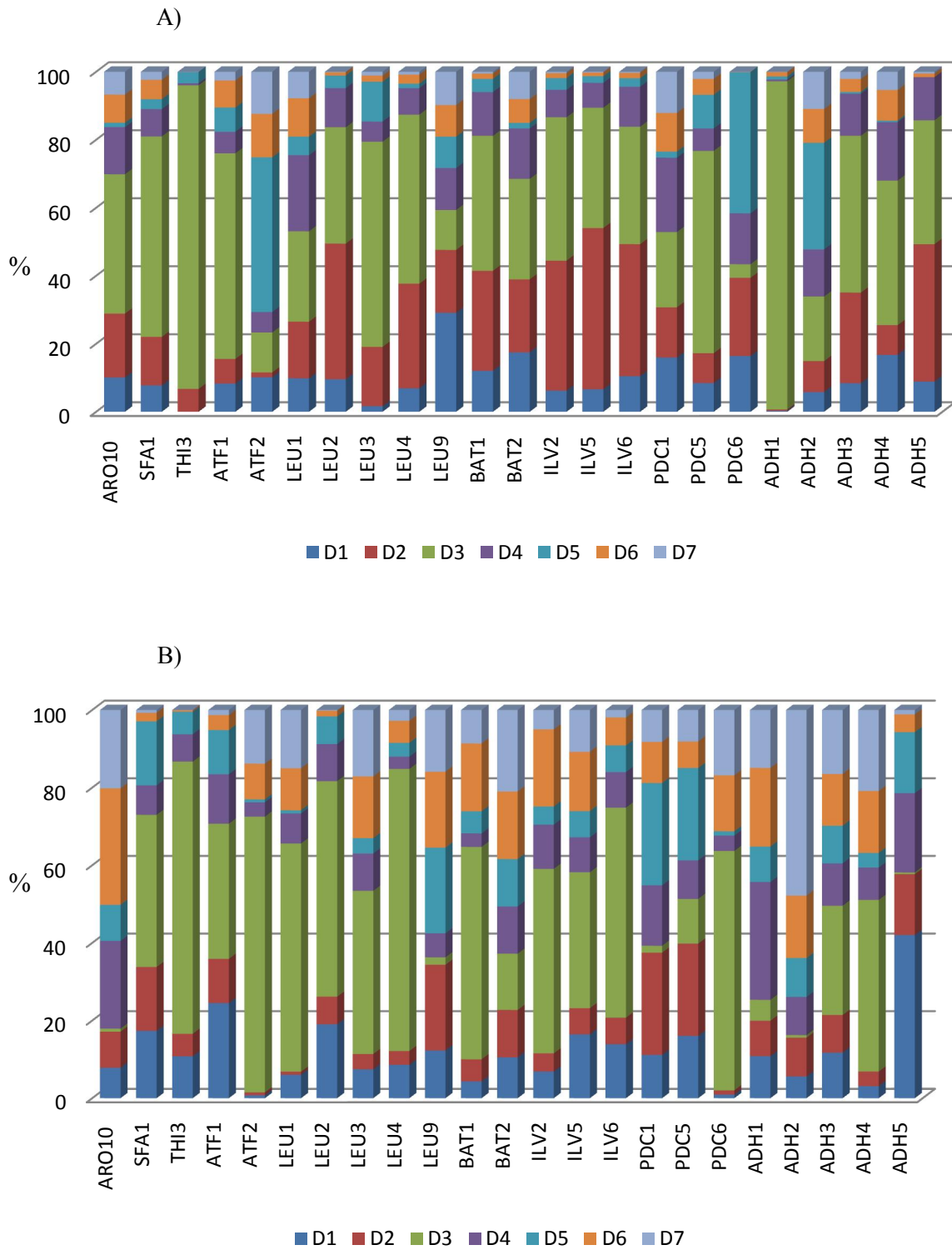


Figura 14: Porcentaje de expresión de cada gen relacionado en la producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo en la curva temporal del proceso de fermentación. Cepas 790 (Panel A) y 820 (Panel B).

### 6.5.3 Análisis de expresión en las condiciones experimentales.

Con el fin de comparar los resultados de expresión relativa entre las condiciones experimentales se utilizó el método “ $\Delta\Delta C_p$ ”, que expresa la proporción obtenida de la relación entre los valores  $\Delta C_p$  de la condición experimental “A” menos los valores de  $\Delta C_p$  de la condición experimental “B”.

La condición experimental “B” se determinó tomando en cuenta, la condición según la literatura con menor producción de compuestos volátiles y es la muestra experimental utilizada como control (Tabla XVI). La cuantificación relativa se realizó utilizando la fórmula  $2^{(-\Delta\Delta C_p)}$  (Pfaffl, 2001; Fu *et al.*, 2006) que expresa el “número de veces” (RQ) que el transcrito se expresa en relación a la muestra de referencia control. RQ “Relative Quantification”, cuantificación relativa.

Tabla XVI: Determinación de las condiciones experimentales evaluadas.

Variable a evaluar	Condición experimental “A” (más volátiles)	Condición experimental “B” (menos volátiles)
Oxigenación	25ppm	35ppm
T. Arranque	12.5°C	8.5°C
T. Fermentación.	17.5°C	12.5°C
C. Mosto	50% malta.	35% malta.

#### 6.5.3.1 Condición experimental: Temperatura de fermentación y temperatura de arranque.

En cuanto a la calidad de las bebidas alcohólicas obtenidas por fermentación, hay que destacar el papel que la temperatura de fermentación desempeña pues tiene una gran influencia en la producción de aromas y compuestos volátiles (Attfield, 1997).

En un estudio realizado por Titica y colaboradores en el 2000 se determinó que si se mantenía una temperatura de entre 10°C a 16°C se observaba un aumento del 40 % al 50% en la formación de ésteres, y de manera general se sabe que un aumento en la

temperatura de fermentación en un rango de 10°C a de 25 ° C, incrementaría la producción de esteres; sin embargo también se ha determinado que no solo una temperatura es importante en la producción de esteres sino en general las temperaturas que se manejen a lo largo de todo el proceso de fermentación.

Es por ello que se realizaron dos pruebas importante a lo que concierne las temperaturas dentro del proceso, las primeras pruebas en lo que respecta a la variable de temperatura de fermentación y en donde en las figuras 15 y 16 se observa los resultado del análisis que se hicieron de la cuantificación relativa y la temperatura de arranque donde los resultados se graficaron en las figuras 17 y 18, los resultados mostrados corresponde a la media de tres repeticiones con sus correspondientes desviaciones estándar. El punto negro indican diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) en el  $\Delta Cp'$  entre el estado control y el experimental, solo se marcaron aquellos genes con relevancia en la expresión relativa.

En cuanto a los resultados en la condición de temperatura de fermentación se observo que para la cepa 790 los genes ILV2, PDC5 y PDC6 se encuentran expresados más de 20 veces con respecto al control, y que el gen ILV2 que cataliza el primer paso común en la biosíntesis de isoleucina y valina se expresa en el día tres de la fermentación, mientras que los genes PDC5 y PDC6 que están involucrados en la descarboxilación del piruvato a acetaldehído y que son clave en la fermentación alcohólica se encuentran expresado en el día dos y tres respectivamente, cabe resalta que un gran número de genes se encuentran expresados en menos de 20 veces en los días uno, dos y tres, (Fig. 19) y aunque su expresión sea en menor número de veces, estos cambios pudieran crear un cambio importante en la producción de acetato de etilo e isoamlio, como es el caso del gen ATF1 en el segundo día del proceso, el cual codifica la alcohol acetiltransferasa I, y que aunque sus niveles de expresión son muy bajos es la principal responsable de la producción de esteres de acetato durante la fermentación, también se puede observar que los genes ARO10 y THI3 que codifican para la descarboxilasa se encuentran expresados en el días dos y tres respectivamente y que ambos se consideran importantes en la ruta metabólica de la síntesis de alcohol isoamlio, se sabe que la formación de alcoholes superiores también depende de la temperatura, por lo que el cambio en la temperatura puede provocar cambios en la disponibilidad de los alcoholes de superiores que son necesarios para la formación de los ésteres.



Por otro lado en cuanto a la cepa 820 se observa claramente que en el día dos, hay un mayor número de genes que se están expresando en más de 20 veces con respecto al control. El resultado mostro que varios genes que codifica para alcoholes deshidrogenasas encargadas de catalizar el paso final en la formación de los compuestos alcohólicos derivados de aminoácidos ramificados, se encuentran expresadas (SFA1, ADH1, ADH3, ADH4 y ADH5) así mismo se observa la expresión de dos piruvato descarboxilasas (PDC1 y PDC5) y del gen ATF1 el cual codifica la alcohol acetiltransferasa I.

En este caso y de la misma manera que en la cepa 790 varios genes se encuentran expresados en menos de 20 veces con respecto a la condición control en los días uno, dos y tres, (Fig. 19).

En lo que respecta al análisis de expresión en temperatura de arranque en la cepa 790, en el primer día de fermentación se observa una expresión del gen LEU2 de más de 100 veces, este gen codifica una beta-isopropilmalato deshidrogenasa, esta enzima cataliza el tercer paso en la biosíntesis de leucina y es reprimido transcripcionalmente en presencia de leucina, sin embargo su principal mecanismo de regulación es por Leu3p, todos los demás genes en esta condición se encuentran por debajo de 5 veces su expresión.

Para la cepa 820 en el día tres, el gen LEU2 también se observa expresado al igual que en la cepa 790 en más de 100 veces, mientras los genes ILV2, ILV6 y ADH4 presentan una expresión mayor a 20 veces con respecto a la condición control.

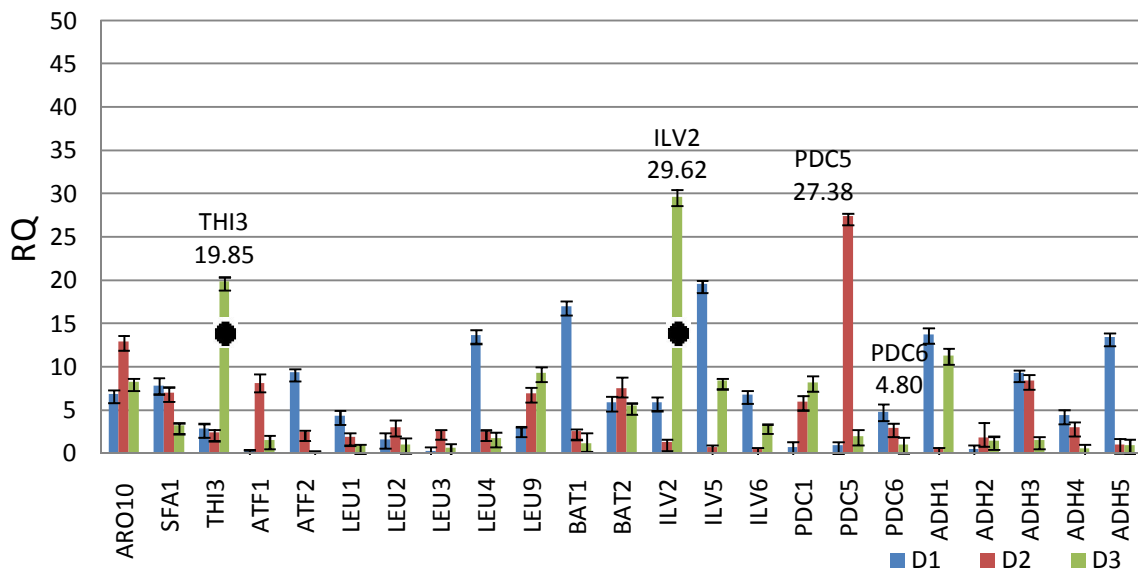


Figura 15: Expresión relativa de la condición experimental: Temperatura de fermentación en la cepa 790 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación. El punto negro indican diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) en el  $\Delta C_p$ .

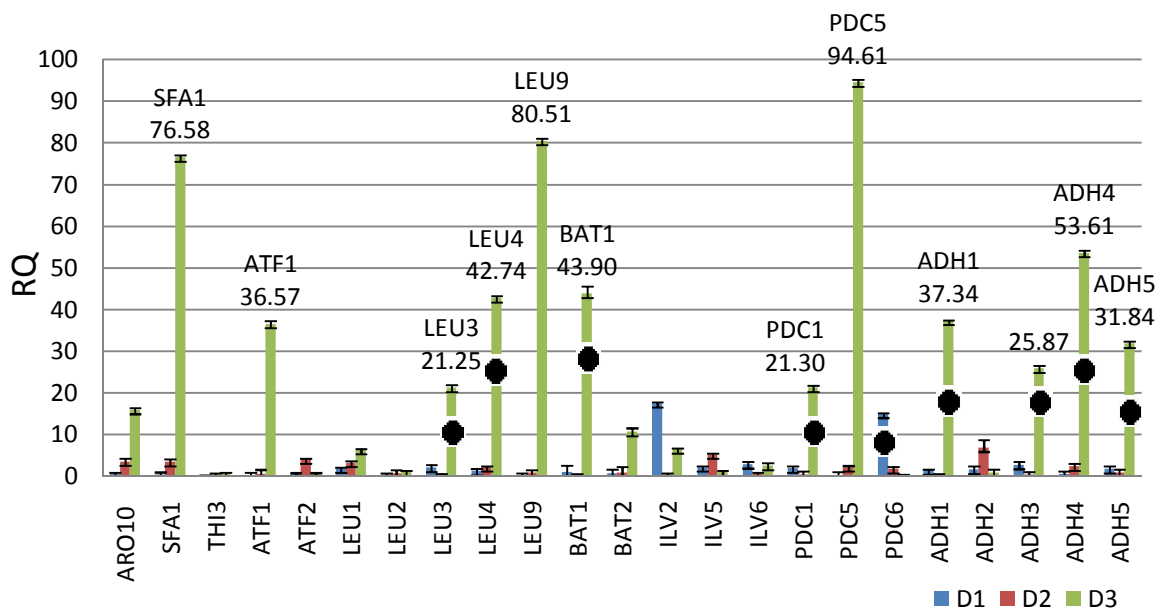


Figura 16: Expresión relativa de la condición experimental: Temperatura de fermentación en la cepa 820 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación. El punto negro indican diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) en el  $\Delta C_p$ .

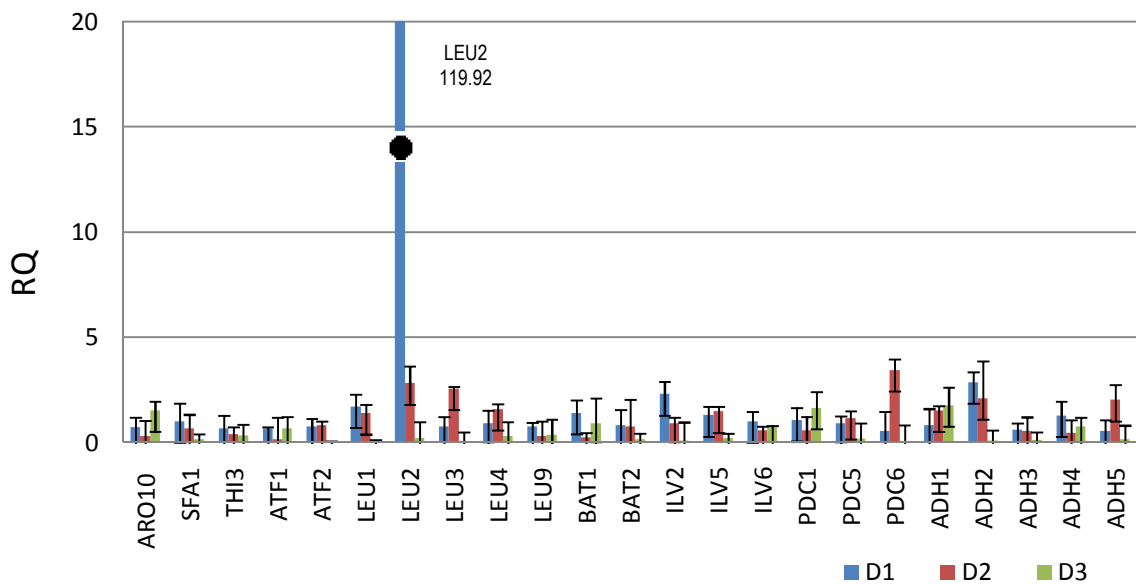


Figura 17: Expresión relativa de la condición experimental: Temperatura de arranque en la cepa 790 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación. El punto negro indican diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) en el  $\Delta C_p$ .

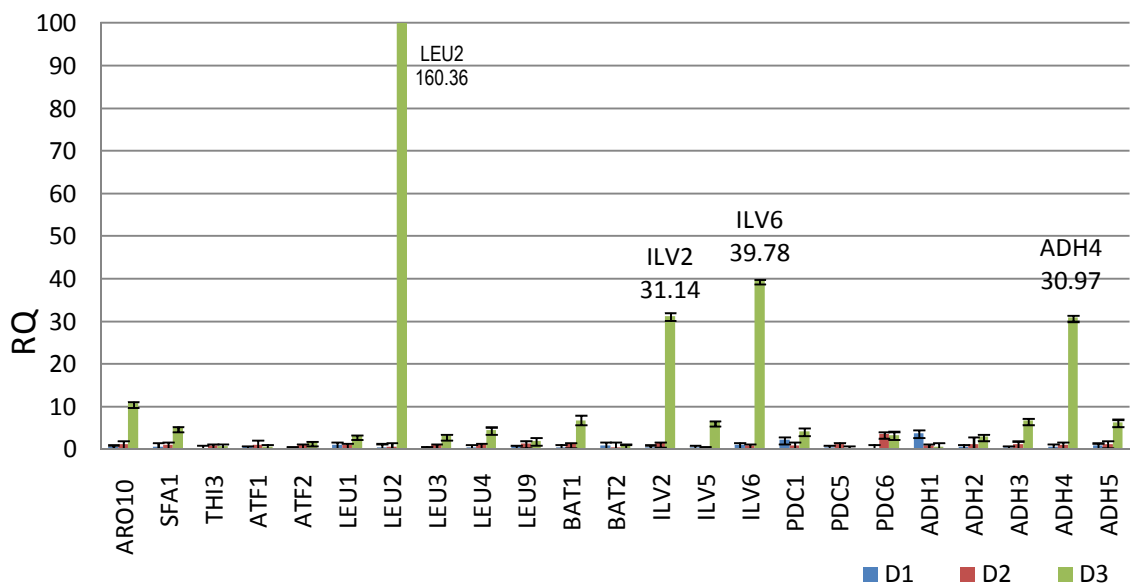


Figura 18: Expresión relativa de la condición experimental: Temperatura de arranque en la cepa 820 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.

En lo que respecta al análisis de la expresión relativa en resultados de expresiones mayores a 10 veces con respecto a la condición control, en genes involucrados en la biosíntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo (Fig. 19) se puede observar que la condición de temperatura de fermentación, en el tercer día del proceso y en la cepa 820 es la que mostro más impacto.

De manera general se observa que el gen ATF1 se encuentra expresado en el día dos en la cepa 790 y en el día tres en la cepa 820 con respecto a la variable de temperatura de fermentación y que esto podría estar regulado por la incorporación de aminoácidos en la ruta metabólica también cabe mencionar que Sablayrolles (1995) demostró que hay un incremento en la producción de esteres cuando la fermentación se inicia a temperaturas relativamente altas, y posteriormente se disminuye, esto sugiere que la temperatura podría estar afectando la actividad de las AATase.

A lo que respecta a los genes que codifican las alcoholes deshidrogenasas, en su mayoría se están expresando en el tercer día en la cepa 820, y solo los genes ADH1 y ADH3 se expresan en los días tres y dos respectivamente de la cepa 790. En cuanto a las descarboxilasas el gen ARO10 se encuentra expresado en los días dos y tres de ambas cepas, mientras que el gen THI3 se expresa en el día tres de la cepa 790.

Los genes BAT1 y BAT2 que codifican las transaminasas de aminoácidos en la cadena ramificada se expresan en el tercer día de la cepa 820 y en el primero de la cepa 790. Se sabe que BAT1 regula cuando se necesita biosintetizar aminoácidos mientras que BAT2 podría ser regulado positivamente en un ambiente en donde se utilicen aminoácidos como fuente de carbono.

En lo que se refiere a las piruvato descarboxilasas el gen PDC1 se expresa al tercer día en la cepa 820, mientras que PDC5 se expresa en los días dos de las cepas 790 y 820 y en el tercer día de la cepa 820 y finalmente el gen PDC6 se encuentra expresado en el primer día en ambas cepas.

Los resultados en temperatura de arranque muestran que los genes ADH4, ILV2, ILV6, LEU2 y ARO10 se encuentran expresados en la cepa 820 en el tercer día de fermentación, mientras que LUE2 se encuentra expresado en el primer día en la cepa 790.

En cuanto a los resultados de los análisis de compuestos volátiles se observó que a la temperatura de fermentación a 12.5°C se observa mayor producción de acetato de etilo y de acetato de isoamilo en ambas cepas en comparación con la temperatura de 17.5°C, mientras que en la variable de temperatura de arranque se observa que a 12.5°C se obtuvo mayor producción de acetato de etilo e isoamilo que a la temperatura de 8.5°C, sugiriendo que no por mantener una temperatura alta se producirán mayor cantidad de compuestos volátiles, ni por el contrario a menores temperaturas habrá menos volátiles, sino que al parecer ambas levaduras tienen mejor producción de compuestos volátiles a una temperatura de 12°C, esto corrobora lo mencionado por Casey 1985, en donde la producción de ésteres y principalmente los de acetato pueden producirse al presentar un rango óptimo de temperatura en el proceso de fermentación, destacando que al parecer es mejor mantener la levadura a 12.5°C evitando un cambio brusco en la temperatura.

Los resultados de los aminoácidos presentes en el mosto en la variable de temperatura de fermentación determinó que la concentración de aminoácidos presentes en los mostos utilizados en ambas cepas no presentan diferencias significativas, en cuanto a los resultados en la prueba sensorial se realizó por duplicado y el servido se apejó a las buenas prácticas sensoriales de orden de presentación aleatorio con identificación de vasos usando números aleatorios de tres dígitos (Pedrero y Pangborn, 1989), los resultados fueron analizados mediante una prueba estadística de ANOVA (Análisis de varianza de un factor). En el inserto de la figura 23 se muestra el promedio de los grupos evaluados en donde un menor número indica mayor intensidad de aroma frutal, en ese caso se observan que las muestras a la variable de temperatura de fermentación a 12.5°C mostraron mayor intensidad de aroma frutal, cabe resaltar que en los resultados estadísticos se determinó que estas diferencias son mínimas pero significativas.

Bajo las condiciones de temperatura ambas cepas presentan patrones de expresión similares sin embargo en la cepa 820 los genes tienen mayor incremento en su expresión con respecto a la condición control, cabe resaltar que ambas cepas producen más ésteres de acetato a 12°C, esto se corrobora con el análisis sensorial y que al parecer la presencia de aminoácidos en el mosto no fue un factor importante de impacto en la condición de temperatura.

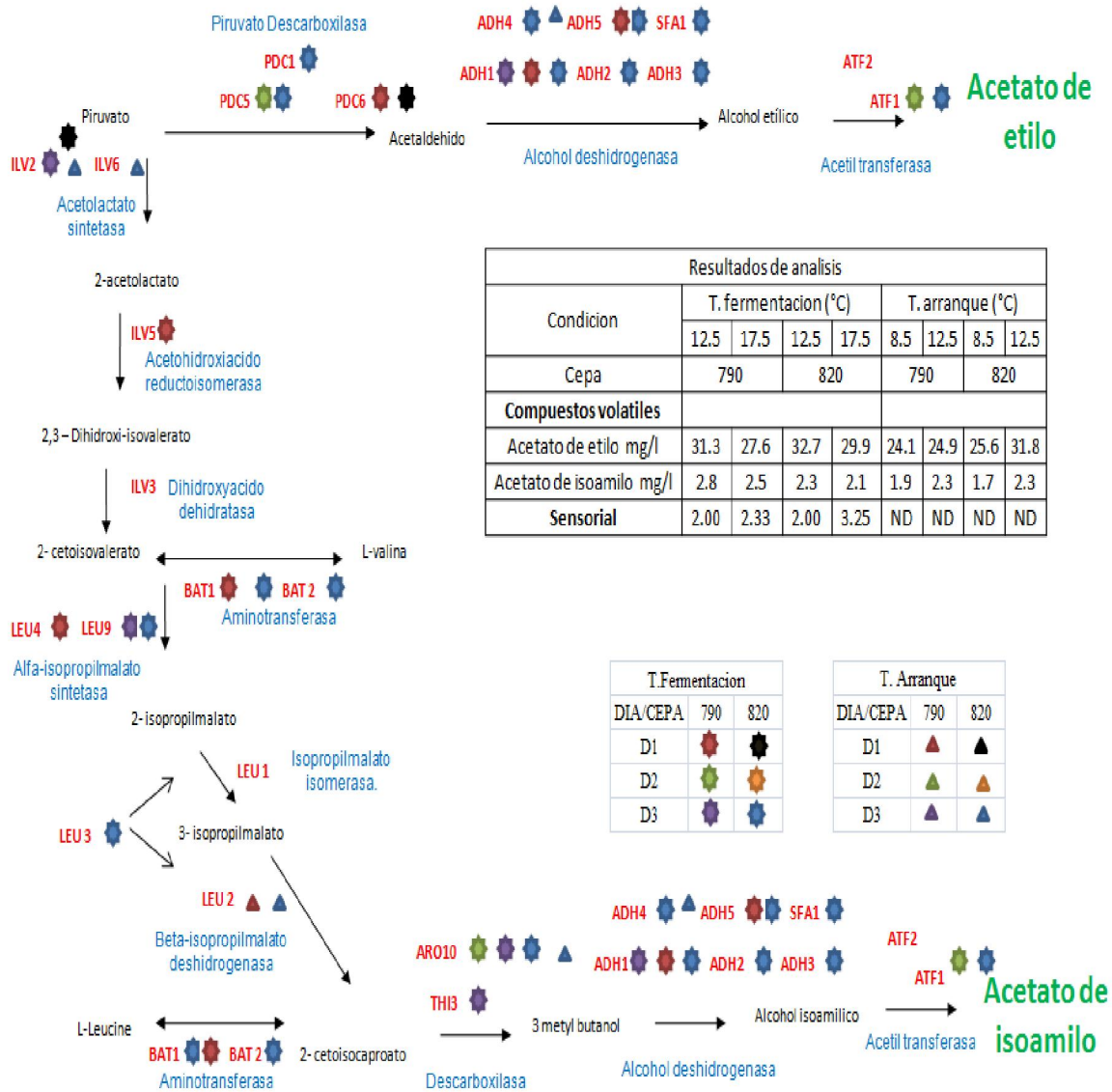


Figura 19: Resultados de la expresión relativa (RQ), en los genes relacionados a la síntesis de acetato de etilo e isoamilo en las condiciones de temperatura, que presentaron una expresión mayor a diez veces con respecto a la condición control. Inserto análisis químicos y sensoriales (menor valor menor aroma frutal) ND=No determinado.

### 6.5.3.2 Condición experimental: Composición del mosto.

Para realizar los análisis experimentales en cuanto a la variable de composición del mosto, se determinaron los datos analíticos para ambos mostos (50% malta y 35% malta) (Tabla XVII) y se observó que en el mosto de 50% malta se apreciaba un mayor porcentaje de maltosa, fructosa y glucosa. Se sabe que generalmente los mostos que contienen altos niveles de glucosa y fructosa producen más ésteres que aquellos con un alto contenido de maltosa, estudios realizados por Younis en el 2000 demostraron que un mosto con un 70% de maltosa muestra una reducción del 10% en las concentraciones de acetato de etilo, e incluso hasta un 40% en las concentraciones de acetato isoamílico, esto ha sugerido que el metabolismo de la glucosa produce una mayor cantidad de acetyl-CoA, lo que podría resultar en un aumento en la producción de ésteres, también se ha sugerido que las células que crecen en medio con glucosa producen más alcoholes de fusel y por consiguiente habría una mayor producción de ésteres, finalmente se ha propuesto que la glucosa podría causar una fuerte expresión de los genes ATF1 y/o ATF2, resultando en una elevada actividad de las acetil transferasas.

Tabla XVII: Resultados de los análisis de los mostos y fermentaciones, en la condición composición de mosto.

Resultados de análisis				
Condición	C. Mosto			
	35% malta		50% malta	
<b>Análisis Analíticos</b>				
Maltosa (%)	9.3		9.45	
Glucosa (%)	0.95		1.4	
Fructosa (%)	0.16		0.22	
<b>Aminoácidos en mosto</b>				
Valina mg/l	52.99		61.96	
Leucina mg/l	84.98		102.15	
<b>Compuestos volátiles</b>				
Cepa	790		820	
%Malta	35%	50%	35%	50%
Acetato de etilo mg/l	24.7	30.5	23.1	29.5
Acetato de isoamilo mg/l	2.8	2.9	2.2	2.6

En tanto a los análisis de aminoácidos se muestra una mayor cantidad de valina y leucina en el mosto 50% malta, considerando que se ha demostrado que la adición de valina, leucina e isoleucina aumenta considerablemente la producción de los correspondientes alcoholes y niveles altos en los alcoholes de fusel puede a su vez dar lugar a una mayor producción de ésteres, como lo demuestra Calderbank y Hammond en 1994. Además, se ha sugerido que el nitrógeno y el carbono afectan la transcripción del gen ATF1, siendo esta hipótesis apoyada por el hecho de que la transcripción de ATF1 es mediada a través de Sch9p, una proteína quinasa que participa en la detección de glucosa y nitrógeno (Fujiwara *et al.*, 1999; Crauwels *et al.*, 1997).

En cuanto a los análisis de compuestos volátiles en ambas cepas se observa una mayor producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo en el mosto con 50% malta, sin embargo en los resultados de expresión no se observan cambios importantes ya que solo en la cepa 820 LEU2 en el primer día de fermentación se expresa en más de 100 veces con respecto a la condición control y en el tercer día el gen ILV2 tiene una expresión mayor a 15 veces (Figs. 20y 21), todos los demás genes mostraron expresiones por debajo de las  $RQ = 6$  en ambas cepas y en los tres días del análisis. Los resultados mostrados corresponden a la media de tres repeticiones con sus correspondientes desviaciones estándar.

Considerando que bajo esta variable de composición del mosto no se observan cambios importantes en la expresión génica, sin embargo si en los análisis de compuestos volátiles, sugiriendo que estos pequeños cambios de expresión podrían generar un cambio importante en la producción de los ésteres volátiles. Como podría ser el caso del gen ATF1 que se expresa por debajo de 2 veces la condición control en el segundo día en la cepa 790 y tercer día en la cepa 820, y aunque sus niveles de expresión son muy bajos se sabe que es la principal responsable de la producción de acetato de ésteres volátiles durante la fermentación.



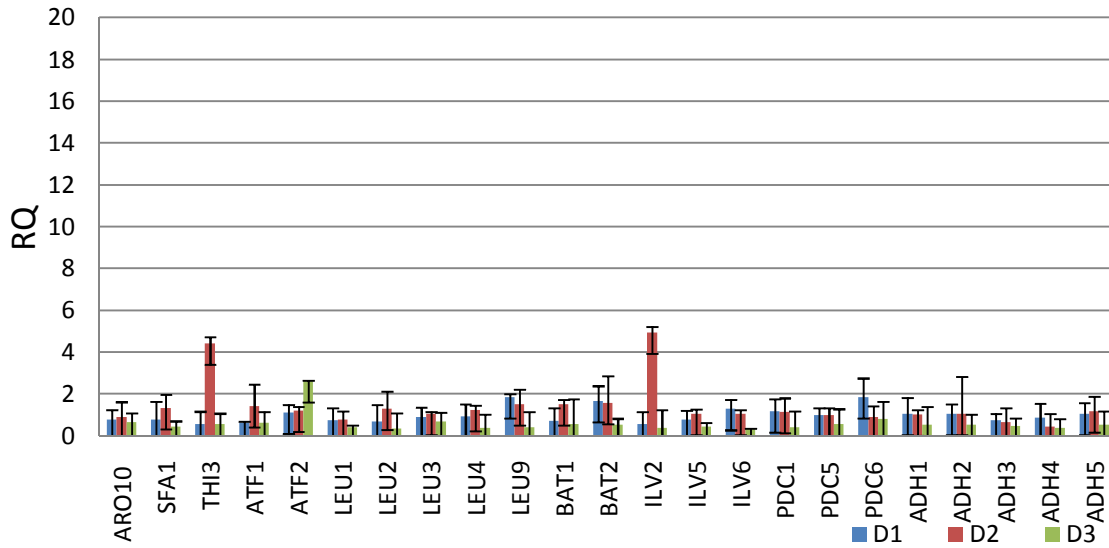


Figura 20: Expresión relativa de la condición experimental: Composición del mosto en la cepa 790 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.

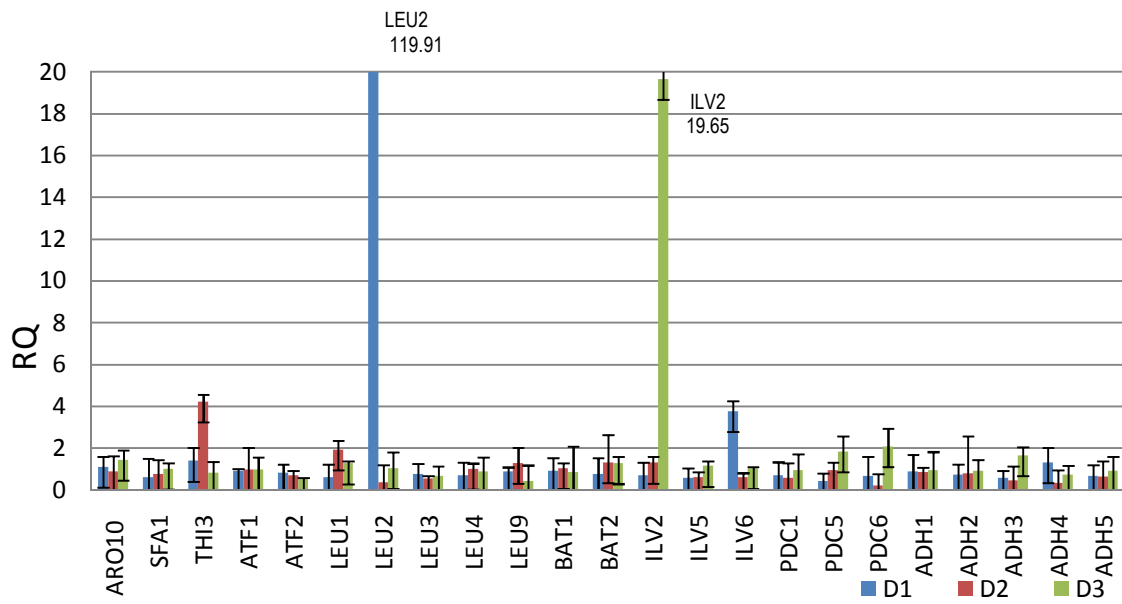


Figura 21: Expresión relativa de la condición experimental: Composición del mosto en la cepa 820 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación.

#### 6.5.3.4 Condición experimental: Oxigenación.

Cuando la levadura se inocula en el mosto, es necesario contar con cierta cantidad de oxígeno, ya que este promueve que la levadura sintetice ácidos grasos y esteroides para producir los componentes de la membrana celular necesarios para su crecimiento adecuado durante la fermentación, sin embargo se sabe que la formación de esteres volátiles es reprimida cuando se encuentra oxígeno disuelto en la fermentación (Anderson, 1975).

De acuerdo a la literatura se ha considerado que en la variable experimental de oxigenación un compuesto intermediario clave en el metabolismo e importante en la oxigenación es acetyl -CoA, un producto común del metabolismo de carbohidratos, ácidos grasos y aminoácidos, por lo tanto fue importante incluirlo en estos análisis.

Se sabe que Acetil-CoA es sintetizado a partir de piruvato a través de una descarboxilación oxidativa catalizada por el complejo multienzimático de la piruvato deshidrogenasa o por activación directa de acetato con el ATP. La mayoría de la acetil-CoA se forma por la descarboxilación oxidativa del piruvato.

En cuanto a los resultados de expresión relativa en la figuras 22 y 23 se muestran los resultados correspondientes a la media de tres repeticiones con sus correspondientes desviaciones estándar. El punto negro indican diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) en el  $\Delta C_p$  entre el estado control y el experimental, solo se marcaron aquellos genes con relevancia en la expresión relativa.

En donde se observa que en la cepa 790 en el tercer día de fermentación (Fig. 22), varios genes se están expresando en más de 20 veces con respecto a la condición control, el gen THI3 que codifica una alfa decarboxilasa y que tiene un papel importante en el catabolismo de los aminoácidos de cadena larga y alcoholes complejos se está expresando en más de 50 veces con respecto a la condición control; los genes LEU2 que codifica la enzima beta isopropilmalato deshidrogenasa y LEU9 que cataliza la enzima isopropilmalato sintetasa, y que tienen como función catalizar el tercer y primero paso respectivamente en la biosíntesis de leucina, se encuentran expresadas en más de 50 veces.

Los genes las PDC5 y PDC6 que catalizan el piruvato descarboxilasas también se encuentran expresadas en más de 50 veces.

Y por último los genes que codifican las enzimas alcohol deshidrogenasa ADH2, ADH3 y ADH4 que presentan una expresión mayor a 20 veces con respecto a la condición control, en donde se sabe que la enzima Adh2p localizada en el citosol, y que oxida eficientemente los alcoholes de cadena larga (Ganzhorn *et al.*, 1987) se encuentra más expresada con respecto a las otros dos alcoholes deshidrogenasa y que cuando el metabolismo es aeróbico, Adr1p bloquea la represión de ADH2 para que Adh2p oxide el etanol a acetaldehído, siendo Adh2p la principal alcohol deshidrogenasa oxidativa en la levadura, mientras que la proteína Adh3p que al parecer forma parte, de un conjunto que junto con otras alcoholes deshidrogenasas catalíticas, permiten el intercambio de equivalentes redox entre el citosol y la mitocondria del etanol y el acetaldehído, por último el gen ADH4 expresado en más de 20 veces con respecto a la condición control codifica la enzima Adh4p que al igual que las dos anteriores cataliza la oxidación del etanol, aunque su eficiencia catalítica es bastante inferior a las otras alcoholes deshidrogenasa, no es activa con alcoholes primarios con más de cuatro carbonos ni con alcoholes secundarios. (Ciriacy, 1988). En cuanto a los genes involucrados en la síntesis de piruvato a acetyl-CoA y la activación del acetato se observó que el gen PDB1 que codifica la subunidad beta del piruvato deshidrogenasa, y que es el componente E1 del complejo multienzimático se encuentra expresado en más de 20 veces, así mismo el gen IRC15 expresado en los días uno y tres y que forma parte del complejo piruvato deshidrogenasa E3. En el caso del gen ACH1 este se encuentra expresado en los días dos y tres.

Los resultados de la cepa 820 muestran la expresión de tres genes importantes, la piruvato descarboxilasa PDC5 y los genes PDB1 (expresado en ambas cepas) y LAT1 del complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa; PDC5 se expresa en el día dos, mientras PDB1 en el día uno y LAT1 en el día tres. Como se mencionó PDB1 y LAT1 pertenecen al complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa, que consta de las subunidades alfa (Pda1 p) y beta (Pdb1 p), este complejo mitocondrial también consta de E2 (LAT1p) que une E1 (Pda1 p y Pdb1 p) y E3 (Lpd1 p), estos componentes actúan de manera conjunta para pasar de piruvato a acetyl-CoA. El gen ACS1 que codifica una Acetyl-CoA sintetasa, se encuentra expresada en el día tres de la fermentación. Hay otros genes de relevancia en la producción de ésteres que se encuentran expresados en menos de 20 veces con respecto a la condición control, esto se comenta más adelante para ambas cepas (Fig. 24).

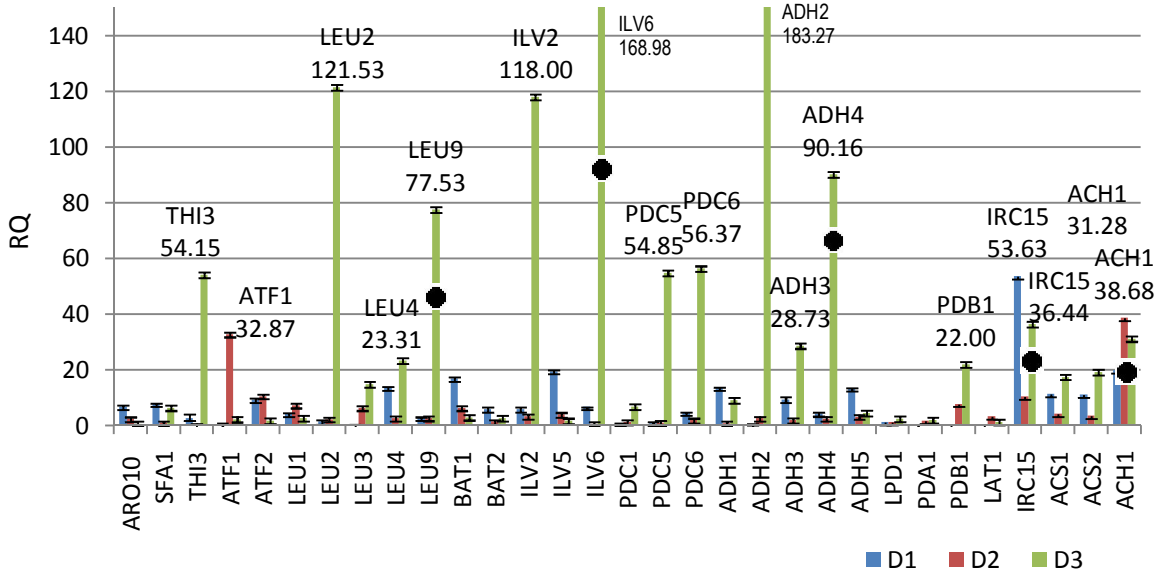


Figura 22: Expresión relativa de la condición experimental: Oxigenación en la cepa 790 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación. El punto negro indican diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) en el  $\Delta C_p$ .

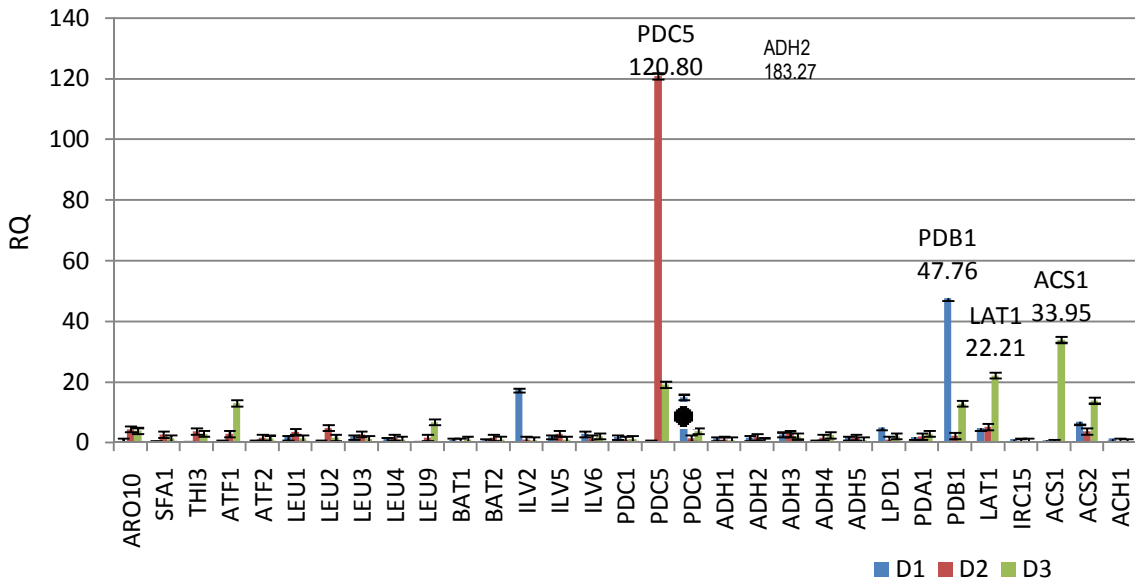


Figura 23: Expresión relativa de la condición experimental: Oxigenación en la cepa 820 en los genes relacionados a la producción de acetato de etilo e isoamilo en el proceso de fermentación. El punto negro indican diferencias significativa ( $p < 0.05$ ) en el  $\Delta C_p$ .

En cuanto al análisis de la expresión relativa en genes expresado en más de 10 veces con respecto a la condición control, (Fig. 24) se puede observar que la condición oxigenación muestra relevancia en la expresión de los genes que codifican las enzimas acetil transferasa, observándose que en la cepa 790 en el día uno y dos el gen ATF1 se encuentra expresado mientras que ATF2 solo en el día dos, por otro lado en la cepa 820 el gen ATF1 en el día tres de la fermentación se expreso en más de 10 veces con respecto a la condición control. Algunos investigadores han sugerido que el oxígeno ejerce una influencia a través del crecimiento de la levadura y por lo tanto de la disponibilidad de acetil-CoA. Sin embargo trabajos más reciente han proporcionado fuertes evidencia de que el oxígeno directamente reprime la expresión de los genes que codifican AATase (ATF1 y ATF2), esto implicaría en que no hay enzimas que sinteticen los esterés y que estos se formaran siempre y cuando esté presente el oxígeno en el medio. Por otra parte se sabe también que cuando el contenido de oxígeno en el mosto es extremadamente bajo (1 mg / l), las concentraciones de ésteres también disminuyen debido a un limitado crecimiento de la levadura (Fuji, 1974).

Los genes que tiene que ver con la síntesis de piruvato a acetyl CoA también mostraron resultados interesantes, el gen PDB1 en el tercer día se expresa en la cepa 790 mientras que en los días dos y tres se expresa en la cepa 820, dentro de este complejo multienzimático también se encuentra el gen LAT1 que se expresa en el tercer día de la fermentación en la cepa 820, por otro lado el gen IRC15 se expresa en la cepa 790 en el día uno y tres de la fermentación. determinando así que la levadura se desarrolla hasta que el suministro de oxígeno disminuye y en un mosto donde hay abundantes amino nitrógeno libre y cuando todavía este se encuentra disponible, los metabolitos incluyendo acetil-CoA, son aún formados, estimulando la síntesis de éster, es decir que un mosto con bajo amino nitrógeno libre propicia niveles bajos de acetil CoA y por lo tanto tenderán a tener menores ésteres, en condiciones similares, de ahí la importancia de la presencia en la expresión de estos genes.

En cuanto a los genes relacionados en la obtención de acetato a partir de acetil CoA el gen ACH1 se expresa en los días dos y tres de la cepa 790, mientras el gen ASC1 se expresa en el día tres de la cepa 820.

Por otro lado a excepción de SFA1, todas las alcoholes deshidrogenasas se están viendo expresadas en la cepa 790, en el día uno y tres de la fermentación, en la 820 no se observan cambios importantes en la expresión de estos genes. El gen BAT1, que codifica la transaminasa de aminoácidos en la cadena ramificada y que regula cuando se necesita biosintetizar aminoácidos se expreso en la cepa 790 en el primer día de la fermentación, estos aminoácidos al igual que los acidos grasos se encuentran presentes en el mosto y se sabe que el oxígeno tiene una gran influencia en la composición de ácidos grasos, debido a que la ausencia de oxígeno, impide la síntesis de ácidos grasos insaturados y esteroides (Ingledeew, 1990), reprimiendo la formación de ésteres a través de la represión directa de la transcripción del gen ATF1 y ATF2.

En cuanto a los resultados de los análisis de compuestos volátiles se observo que al oxigenar el mosto en 25ppm se producía mayor cantidad acetato de etilo y acetato de isoamilo en ambas cepas, mientras los resultados de los aminoácidos presentes en el mosto, no mostraron diferencias significativas.

El análisis sensorial se realizó con un panel de 6 catadores entrenados en la detección de compuestos aromáticos, y por medio de una prueba de ordenamiento de intensidad, los catadores otorgaron la primera posición a la muestra que percibieran con mayor intensidad a aroma frutal, y así sucesivamente, las prueba sensorial se realizó por duplicado y los resultados fueron analizados mediante una prueba estadística de ANOVA (Análisis de varianza de un factor), en donde se observa el promedio de los grupos evaluados en donde un menor número indica mayor intensidad de aroma frutal, en ese caso se muestra que las fermentaciones utilizando un mosto oxigenado a 25ppm presentan una mayor intensidad de aroma frutal en ambas cepas , en cuanto a los resultados estadístico se determino que estas diferencias son mínimas pero significativa.

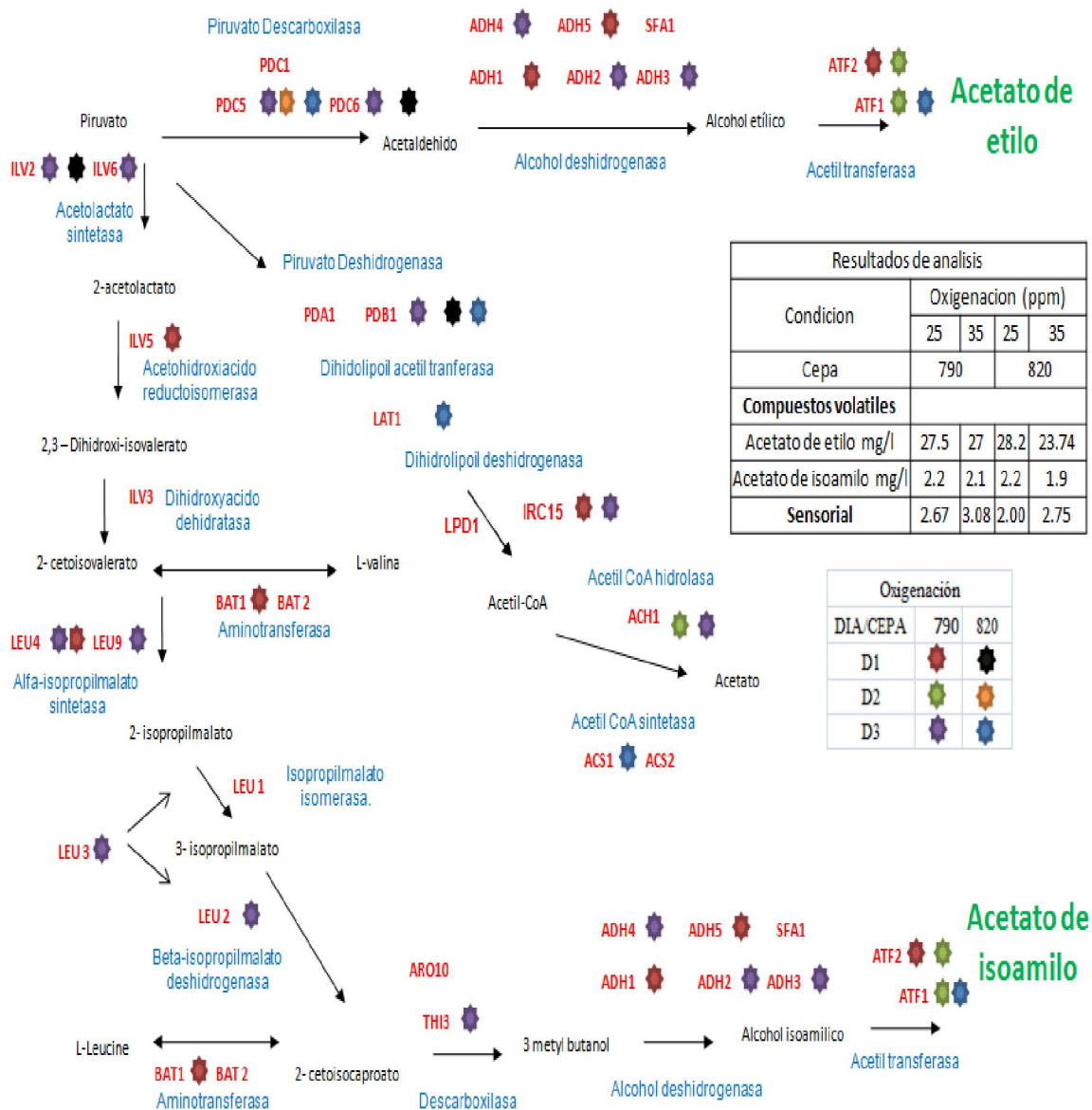


Figura 24: Resultados de la expresión relativa (RQ), en los genes relacionados a la síntesis de acetato de etilo e isoamilo en la condición de oxigenación, que presentaron una expresión mayor a diez veces con respecto a la condición control.

## 7.- CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

### Conclusiones

- ❖ Los oligonucleótidos para amplificar los genes relacionados a la biosíntesis de acetato de etilo y acetato isoamilo resultaron ser altamente específicos.
- ❖ Los microarreglos demostraron que cepa tiene un patrón de expresión muy diferente en genes relacionados a la biosíntesis de acetato de etilo acetato de isoamilo y que la combinación de estas condiciones no impactan de manera importante en la expresión genética de la levadura en cuanto a la síntesis de esteres.
- ❖ El análisis del curso temporal en el proceso de la fermentación mostro que la expresión de genes involucrados en la síntesis de esteres de acetato, presentan un patrón de expresión genético muy similar en ambas cepas, siendo el día tres con mayor cantidad de genes expresado.
- ❖ Se determino que en ambas cepas a una temperatura de arranque y de fermentación de 12.5°C se observa una mayor producción de acetato de etilo y de acetato de isoamilo, siendo la cepa 820 la que expresa un mayor número de genes.
- ❖ Mostos de 50% de malta no presentaron cambios importantes en la expresión génica de las cepas. Sin embargo los resultados analíticos mostraron mayor producción de acetato de etilo y acetato de isoamilo.
- ❖ Los resultados de oxigenación mostraron mayor expresión de genes en los mostos oxigenados a 25 ppm en ambas cepas y esto se confirma con los análisis sensoriales y analíticos, sin embargo la cepa 790 es la que mostro mayor expresión de genes en la biosíntesis de acetato de etilo y acetato de isoamilo.



## Recomendaciones

- Evaluar el impacto de otras variables de proceso de fermentación sobre la producción de esteres de acetato, (diferentes rangos de temperaturas, mostos ricos en compuestos nitrogenados y ácidos grasos, adición de los aminoácidos de valina y leucina, diferentes presiones y cantidad de inóculo).
- Evaluar el impacto mediante la combinación de condiciones en el proceso de fermentación.
- Analizar el impacto de las variables de fermentación en otros aspectos como los compuestos reductores de diacetilo y la producción de otros esteres de acetato o de alcoholes superiores.
- Analizar la expresión por la técnica de qPCR de los genes relacionados en la síntesis de piruvato a Acetil CoA, en las variables de temperaturas de fermentación y composición del mosto.

## APÉNDICES

### A) Soluciones y Medios de cultivo.

Soluciones:

- TE: EDTA 1mM pH=8.0 y Tris-HCl 10 mM pH=8.0
- TED: Tris 50 mM, EDTA 20 mM, ajustar el pH=8
- FENOL-CIA: Se prepara mezclando volúmenes iguales de fenol neutro y de CIA.
- Fenol Neutro: Se mezcla por agitación 4 volúmenes de fenol ácido con 1 volumen de Tris HCl 1M pH=8. Se mantiene la mezcla en reposo hasta que se separen la fase superior acuosa y la inferior fenólica. El fenol así preparado se conserva a 4°C en un recipiente opaco, manteniéndose durante un mes.
- CIA: Se prepara mezclando 24 volúmenes de cloroformo con un volumen de alcohol isoamílico.
- ARNasa: Se disuelve la ARNasa, a una concentración de 10 mg/mL, en una solución con NaCl 15 mM y tampón Tris-HCl 10 Mm pH=7.5.
- TBE 0.5X (0.045 M Tris borato, 0.001 M EDTA)
- MAE10X (50 mM Acetato de Na, 10 mM EDTA, 0.2 M MOPS) Ajustar pH 7.0 con NaOH Agregar los reactivos en el orden descrito. Esterilizar por filtración y guardar a 4°C protegido de la luz
- Buffer de muestra para electroforesis con formaldehído 1.25X. Prepara 4 ml (Formamida desionizada 2.2 ml, Formaldehído 0.8 ml, MAE 10X, Azul de Bromofenol 0.1 ml) Guardar a -20°C
- Buffer de corrida para electroforesis con formaldehído Preparar 280 ml (MAE 10X 28 ml, Formaldehído 1.1 % 8.4 ml, Agua-DEPC 243.6 ml)
- Agua DEPC o libre de ARNasa. (Agregar 1 ml de 0.1% (v/v) de pirocarbonato de dietilo (DEPC) a 1000 ml de agua. Dejar agitar toda la noche y esterilizar en autoclave)
- 50TE-10% SDS (EDTA, 3.7 g; Tris, 3.03 g en 1 L. Ajustar pH a 7.5. Posteriormente se mezcla 200 ml de la solución anterior con 20 mL de SDS 10% previamente esterilizada por filtración.)

Medios de Cultivo:

### Agar YPD

Extracto de levadura	10 g/l
Peptona	20 g/l
Glucosa	20 g/l
Agar	20 g/l

### Caldo YPD

Extracto de levadura	10 g/l
Peptona	20 g/l
Glucosa	20 g/l

### Universal Beer Agar (UBM)

Jugo de tomate	24.4 ml
Extracto de levadura	0.6g
Dextrosa	1.6g
Leche peptonizada	1.5g
Agar-agar	1.6 gml
Solución A	0.5ml
Solución B	0.5ml
Verde de Bromocresol	0.22
Agua destilada	50.6ml
Cerveza	25.0 ml

Añadir actidione después de esterilizar a una concentración de 1ppm.

**LIN (Sulfato de Cobre)**

Extracto de levadura	4.0 g
Extracto de malta	2.0 g
Peptona de caseina	2.0 g
Dextrosa	10.0 g
Fosfato dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.10g
Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl)	.50 g
Agar-agar	20.0 g
Agua destilada	1000 ml
Sol. Sulfato de cobre (55mg/ml)	**

Añadir 1 ml de la solución de sulfato de cobre para LIN-550 y .0572 para LIN-315 (esterilizar por filtración)

**LWYM (Cristal Violeta)**

Extracto de levadura	4.0 g
Extracto de malta	2.0 g
Peptona de caseina	2.0 g
Dextrosa	10.0 g
Fosfato dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	1.10g
Cloruro de amonio (NH <sub>4</sub> Cl)	.50 g
Agar-agar	20.0 g
Agua destilada	1000 ml
Mezcla fuschina-sulfito	1.0 g
Sol. de cristal violeta (1mg/ml)	0.3 ml

## MRS

Extracto de carne	10.0 g
Extracto de levadura	8.0 g
Glucosa	4.0 g
Monoleato de sorbitán	20.0 ml
Fosfato dipotásico (K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> )	2.00g
Acetato de sodio	5.0 g
Citrato de amonio	2.0 g
Sulfato de magnesio	0.2 g
Sulfato de manganeso	0.05 g
Agar	13.0 g

### B) Conteo de células

El conteo de células en suspensión se realiza diluyendo la fermentación 1:10 en solución salina y homogenizando perfectamente. Utilizando una cámara Neubauer observar al microscopio con el objetivo 40X, se recomienda estandarizar el criterio de conteo, (las levadura que estén gemando son contadas como una célula si la gema es menor que la mitad del tamaño de la célula madre). El área central de la cámara Neubauer mide 1 mm de cada lado con una profundidad de 0.1 mm. Multiplicar por 10,000, tomar en cuenta la dilución.

### C) Vitalidad y viabilidad de levadura mediante microcultivo.

Trabajar en esterilidad. Diluir la levadura 1:100 en solución salina estéril, cortar un cuadrado de agar YPD y colocarlo sobre un portaobjetos. Depositar una gota de la dilución de levaduras 1:100 sobre el cuadro de agar y cubrir con un cubreobjetos evitando la formación de burbujas, colocar dentro de una caja Petri y cubrir. Incubar por 18 horas a 30°C ±1. Observar al microscopio con el objetivo 40X se cuentan como células viables aquellas que formaron microcolonia y como muertas las células aisladas sin crecimiento. Contar 500 células en total y calcular % células viables.

$$\% \text{ de células muertas} = \frac{\text{células muertas} \times 100}{\text{Total de células (vivas y muertas)}}.$$

#### **D) Extracción de ADN genómico.**

Técnica de extracción de fenol-cloroformo del manual Twintrack Advanced Labs (Siebel Inst. of Technology). Con las siguientes modificaciones.

1. Tomar una asada de la cepa e inocular en un tubo de 50 mL tapón rosca conteniendo 10 mL de caldo YPD, e incubar por 72 hrs. en agitación a 150 rpm a 30° C.
2. . Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos y descartar el sobrenadante para formar el Pellet de la levadura (como 200  $\mu$ L)
3. Agregar 660  $\mu$ L de 50TE 10% SDS (EDTA 3.7g Tris 3.03 g en 1 L. Ajustar pH a 7.5) Mezclar 200 ml de la solución anterior con 20 ml de SDS 10% (previamente esterilizado por filtración)
4. Agitar en incubar a 65 °C por 10 minutos. Homogenizar por inversión.
5. Agregar 660  $\mu$ L de Fenol-Cloroformo- Isoamilo 25:24:1
6. Homogenizar por Vortex , centrifugar 2 minutos a 14000 rpm
7. Transferir 600  $\mu$ L de sobrenadante a un tubo limpio
8. Agregar 600  $\mu$ L de isopropanol absoluto, mezclar por inversión e incubar 8 hrs a 4 °C (se puede dejar todo la noche)
9. Centrifugar 10 minutos a 14,000 rpm
10. Descartar el sobrenadante y lavar con pellet con 100  $\mu$ L de etanol al 70 % frio
11. Remover el etanol y dejar secar (2 veces)
12. Adicionar 0.5uL de RNAsa One (Promega) a concentración 10 U/ $\mu$ L y se incubó a 37°C por 30 min
13. Resuspender en 50  $\mu$ L de Te o agua milli Q. Conservar a -20°C.

#### **E) Extracción de ARN total**

Extracción de ARN total kit de High Pure RNA Isolation (Roche Applied Science), protocolo del fabricante.

1. En un tubo de 1.5 ml. Centrifugar la fermentación a 14,000 rpm por 5 minutos.
2. Descartar el sobrenadante y formar el Pellet de la levadura (como 200  $\mu$ L).
3. Resuspender el pellet de 200  $\mu$ L PBS.
4. Agregar 10  $\mu$ L de lincasa (0.5 mg/mL) incubar 15 min a 30 °C.
5. Agregar 400  $\mu$ L Lysis/binding buffer.
6. Vortex 15 segundos.
7. Transferir la muestra a un tubo de High Pure Filter (insertar en el tubo de recolección).
8. Pipetear 700  $\mu$ L max y centrifugar al máximo por 15 segundos.
9. Tirar el liquido (quedarse con la membrana).
10. Cambiar la membrana a un tubo limpio.
11. Agregar 90  $\mu$ L de DNase incubation buffer y 10  $\mu$ L de DNasa I.
12. Incubar 15 minutos de 15 a 25 °C.
13. Agregar 500  $\mu$ L de Wash buffer I a la membrana.
14. Centrifugar a 14,000rpm por 15 segundos.
15. Pasar la membrana a un tubo limpio.
16. Agregar 200  $\mu$ L de Wash Buffer II
17. Centrifugar a 14,000rpm por 2 minutos. (2 veces).
18. Pasar la membrana a un tubo limpio. Agregar 50  $\mu$ L de elution buffer.
19. Centrifugar al máximo por 1 minuto.
20. Se obtiene el RNA listo.
21. Guardar alicuota a -70°C.

#### **F) Cuantificación de DNA y RNA**

Para cuantificar los ácidos nucleídos se diluye las muestras 1:10 y se colocan en el espectrofotómetro. La absorbancia se mide a 260 y 280, la pureza de los ácidos nucleídos se determina con el cociente 260/280 el cual debe estar entre un rango de 1.8 a 2.0 La concentración se obtiene mediante la siguiente relación:

$$[\text{ADN}] = 50 * A_{260 \text{ nm}} * \text{Factor de dilución} \quad [\mu\text{g/mL}]$$

$$[\text{RNA}] = 40 * A_{260 \text{ nm}} * \text{Factor de dilución} \quad [\mu\text{g/mL}]$$

### G) Elaboración de microarreglos.

Para la elaboración de los microarreglos se hacen hibridaciones del cADN proveniente del ARN total aislado. La preparación del cADN a partir de los transcritos de todo el genoma y su marcaje con Cy3 y Cy5 se realiza de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Promega kit Z3604).

Para la síntesis y marcaje del cADN adaptado a aminoalilo se hacen dos mezclas A y B, el RNA se incuba a 70°C por 10 min y posteriormente se coloca en hielo por 5 minutos, se mezclan las reacciones A y B. Se centrifuga e incuba 10 minutos a 25°C, luego 2 horas a 42°C.

#### Mezcla A

Componente	μL/reacción
ARN total	2.0
Oligo (dT)	1.0
Random primers	1.0
Agua	1.0
Total	20.0

#### Mezcla B

Componente	μL/reacción
Buffer ChipShot RT 5X	8.0
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4.8
Aminoalil-NTP mix	4.0
Transcriptasa reversa	3.2
Total	20.0

Transcurrido el tiempo se hace un tratamiento con RNAsa para eliminar los restos del ARN y dejar solo el cADN; para esto se agrega 1.0 μL de RNAsa H y 0.35 μL de solución buffer de RNAsa a los 40 μL de reacción, se mezcla suavemente y se incuba a 37°C durante 5 min.



En lo que concierne a la purificación del aminoalil cADN (kit de Promega 23613), se agrega 4  $\mu\text{L}$  de acetato de Sodio 3M y 225  $\mu\text{L}$  de Solución Binding a los 40  $\mu\text{L}$  de aminoacil-cADN, se mezcla con vortex 5 -10 s, y se aplica la mezcla a la columna, se deja en reposo 5 minutos. Se centrifuga a 14000 rpm por 1 minuto y se lava con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80%, se centrifuga a 14000 rpm por 1 min. (3 veces). Se centrifuga para remover completamente el exceso de etanol. En un tubo limpio se eluye dos veces con 30  $\mu\text{L}$  de agua desionizada y se deja secar en el Speed Vac Savant. Posteriormente, se resuspende en 4.5  $\mu\text{L}$  de Bicarbonato de Sodio 100 mM (pH 9.0).

Para la reacción de conjugación, se disuelve el colorante con 4.5  $\mu\text{L}$  de DMSO, dando vortex por 10 s. Se mezcla con los 4.5  $\mu\text{L}$  de aminoalil-cADN purificado, se resuspende en vortex y se incuba a temperatura ambiente durante 60 minutos sin centrifugar y protegiendo la reacción de la luz. Posteriormente se agregaron 72  $\mu\text{L}$  de agua.

Para la purificación del aminoalil-cADN marcado. (kit de Promega Z3613), se agrega 8  $\mu\text{L}$  de Acetato de Sodio y 440  $\mu\text{L}$  de Solución de Binding. Se mezcla suavemente y se aplica a la columna. Se deja en reposo 5 min. y se centrifuga 1 min. Posteriormente se lava con 500  $\mu\text{L}$  de etanol 80% y se centrifuga 1 min (3 veces) Se centrifugó 1 min para eliminar el exceso de etanol. En un tubo limpio se eluyó dos veces con 50  $\mu\text{L}$  de agua desionizada.

Para el pretratamiento del microarreglo, la laminilla se prehidra exponiendo el lado impreso a vapor de agua a 50°C durante 10 seg, se voltea para secar y se vuelve a exponer al vapor (3 veces). Se fija con dos ciclos de luz U.V. (0.12 J x  $\text{cm}^2$ ), y enseguida se lava con SDS 0.1% durante 1 min a temperatura ambiente. Se lava 2 veces con agua desionizada durante 1 min y se pasa inmediatamente a la solución de Prehibridación (SSC 5X, SDS al 0.1%, BSA al 1 %), se incuba en agitación suave por una hora a 42°C. Posteriormente se lava 5 veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente y se seca por centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos.

Para la hibridación del microarreglo, se toma el volumen necesario para tener aproximadamente 0.1 Unidades de D.O. de la muestra marcada con Cy3 y lo mismo de la muestra marcada con Cy5 por separado, y se secan completamente en el Speed-vac Savant. Se resuspenden ambas sondas con 3.5  $\mu\text{L}$  de agua desionizada estéril y 14  $\mu\text{L}$  de Solución de Hibridación UniHyb (Array It) preincubada a 65°C. Ambas soluciones se mezclan dando

un volumen final de 35  $\mu$ L. La mezcla se desnaturalizó a 94°C por 5 min y finalmente a 65°C por 30 seg. Se aplica suavemente la mezcla sobre el área del microarreglo y se cubre la superficie con un cubreobjetos (HybriSlipt Schleicher & Schuell). Se coloca la laminilla en la cámara de Hibridación (Corning 2551). Los microarreglos se incuban por 12 horas a 42°C.

Para el lavado de los microarreglos hibridados, se hacen los siguientes lavados a temperatura ambiente y en agitación: Un lavado de 2 min con 50 mL de SSC1X-SDS al 0.05%, un lavado de 2 min con 50 mL de SSC 0.06X y un lavado de 2 min con 50 mL de SSC 0.06X. Las laminillas son secadas por centrifugación a 1500 rpm por 5 min.

Finalmente para la lectura y análisis de los microarreglos, estos son leídos en un escáner ScanArray 4000 Packard Biochips. Los resultados son obtenidos como imágenes .tiff. Los arreglos son analizados usando el programa Spotfinder y transformados en valores de intensidad relativa de fluorescencia, considerando el offset y background de cada spot y guardados como archivos .txt para posteriormente ser y analizados en el programa GenArise (<http://www.ifc.unam.mx/genarise>).

#### **H) Extracción de ARN con Tripure (Roche Applied Science).**

Centrifugar la fermentación a 14,000 rpm por 5 minutos, descartar el sobrenadante y formar el Pellet de la levadura (como 200  $\mu$ L). Agregar 1 mL de Tripure y homogenizar. Dejar reposar 5 minutos y agregar 200  $\mu$ L de cloroformo. Vortex 1 minuto vigorosamente y centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos. Se forman 3 fases: Sobrenadante (contiene ARN), Interfase (contiene DNA) y Precipitado (contiene proteínas). Para extraer el ARN retirar sobrenadante y agregar 500  $\mu$ L de isopropanol. Agitar y dejar reposar 5 minutos. Centrifugar a 14,000 rpm por 5 minutos. Decantar y agregar 500  $\mu$ L de etanol al 75%. Centrifugar a 8000 rpm por 5 minutos. (Repetir dos veces). Dejar secar el pellet y resuspender en 50  $\mu$ L de agua DEPC. Adicionar 1  $\mu$ l de RNAsa One (Promega) y 10  $\mu$ l de buffer, incubar a 37°C por 30 min y agregar 1  $\mu$ l de DNasa stop, incubar 10 min a 65°C. Conservar a -70°C.

## LITERATURA CITADA

1. Anderson, R., and Kirsop, B. 1975. Quantitative aspects of the control by oxygenation of acetate ester formation of worts of high specific gravity. *J. Inst. Brew.* **81**:296–301.
2. Attfield, PV. 1997. Stress tolerance: the key to effective strains of industrial baker's yeast. *Nature Biotechnol.* **15**:1351-1357.
3. Boulton, C., and D. Quain. 2003. *Brewing yeast and fermentation*. Oxford, UK: Blackwell Science. pp 69-144.
4. Bustin, SA., and T. Nolan. 2004. Analysis of mRNA Expression by Real-Time PCR. En: *Real-Time PCR; An Essential Guide*. K. J. Edwards *et al.*, editors. Horizon Bioscience. Wymondham, pp. 125-184
5. Calderbank, J., and JRM. Hammond. 1994. Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **52**:84-90.
6. Casey, GP., and WM. Ingledew. 1985. Re-evaluation of alcohol synthesis and tolerance in brewers. yeast. *J. Amer. Soc. Brew. Chem. Technol. Amer.* **43**:75-83.
7. Ciriacy, M. 1975. Genetics of alcohol dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. II. Two loci controlling synthesis of the glucose-repressible ADH II. *Mol. Gen. Genet.* **138**: 157-164
8. Crauwels, M., MC. Donaton, MB. Pernambuco, J. Winderickx, JH. de Winde, and JM. Thevelein. 1997. The Sch9 protein kinase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* controls cAPK activity and is required for nitrogen activation of the fermentable-growth-medium-induced (FGM) pathway. *Microbiology* **143**:2627-2637.
9. Dickinson, J., Salgado, L., Eshantha, J. and Hewlins, M. 2003. The catabolism of amino acids to long chain and complex alcohols in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **278**:8028-8034.
10. Dickinson, J., Lanterman, M., Danner, D., Pearson, B., Sanz, P., Harrison, S and Hewlins, M. 1997. A <sup>13</sup>C nuclear magnetic resonance investigation of the metabolism of leucine to isoamyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.*, **272**: 26871-26878.
11. Dickinson, J., Harrison, S., and Hewlins, M. 2000. An investigation of the metabolism of isoleucine to active amyl alcohol in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **275**:10937-10942.
12. Dufour, J., Malcorps, P. and Silcock, P. 2003. Control of Ester Synthesis during Brewery Fermentation. En K. Smart (Ed.), *Brewery Yeast Fermentation Performance*. Oxford: Blackwell Publishing. pp. 213 - 230
13. Dujon, B. 1996. The yeast project: what did we learn. *Trends Genet.* **7**:263-270.
14. Fujii, T., Yoshimoto, H., and Y. Tamai, Y., 1996. Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the ATF1 gene encoding the alcohol acetyltransferase. *J. Ferment. Bioeng.* **81**: 538-542.
15. Fujiwara, D., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Harishama, S., and Y. Tamai. 1998. Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene ATF1 and D-9 fatty acid desaturase gene OLE1 by unsaturated fatty acids. *Yeast* **14**: 711-721.
16. 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.
17. Ganzhorn, A. J., Green, B. W., Hersley, A. D., Gould, R. M. and Plapp, B. V. 1987. Kinetic characterization of yeast alcohol dehydrogenases. *Biol. Chem.* **262**: 3754-3761

18. Goldammer, T. 2000. The Brewers' Handbook. Apex Publishers. USA
19. Gómez Mayén A. P., G. Corral Guillé, L. Riego Ruiz y G. Coello Coutiño. 2006. The GenArise Package. Instituto de Fisiología Celular UNAM. Mexico DF. pp. 1-27
20. Gouet P., Courcelle E., Stuart D., Metoz F. 1999. ESPript: multiple sequence alignments in PostScript. *Bioinformatics*. pp 305-308
21. Hardwick W. 1995. Handbook of Brewing. Marcel Dekker Inc N.Y USA Priest F.G y I. Campbell. Brewing Microbiology. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Great Britain, Cambridge pp 39-44
22. Heggart, H., Margaritis, H. Pikington, R. Stewart, T. Dowhanick E. and Russell, I. 1999. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *MBAA Tec. Quart.* **36**:383-406.
23. Hough S., Briggs R., Dtevens, S. y Yuong, W. 1982. Maitling and Brewing Science Volumen II Hopped Wort and Beer Second Edition Chapman and Hall, USA pp527-567
24. Ingledew W.M., 1999. Alcohol Production by *Saccharomyces cerevisiae*: a Yeas Primer. In: The Alcohol Textbook. 3<sup>rd</sup> Edition.
25. Klimovitz, R. 2002. Manual del cervecero en la práctica. Asociación de Maestros Cerveceros de las Américas. USA.
26. Kramer, P. 2006. Barley, Malt and Malting. En K. Ockert (Ed.), MBAA Practical Handbook for Specialty Brewer. St Paul, Minnesota, USA: Master Brewers Association of the Americas. pp 15-16.
27. Large, P. 1986. Degradation of organic nitrogen compounds by yeast. *Yeast*, **2**: 1-34.
28. Lewis, J., and Young, T. 1995. Brewing. London, UK: Chapman and Hall.
29. Malcorps, P., and J.-P. Dufour. 1992. Short-chain and medium chain aliphatic ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* **210**:1015–1022.
30. Malcorps, P., J. M. Cheval, S. Jamil, and J.-P. Dufour. 1991. A new model for the regulation of ester synthesis by alcohol acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* **49**:47–53.
31. 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
32. Mauricio, J., Moreno, J., Valero, E., Zea, L., Medina, M. y Ortega, J. 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.
33. Meilgaard, M. 2001. Effects on flavour of innovations in brewery equipment and processing: a review. *J. Inst. Brew.* **107**:271–286.
34. Meilgaard, M., Civille, G. and Carr, T. 1999. Sensory Evaluation Techniques (3rd Edition ed.). Boca Raton, FL: CRC Press.
35. Mewes, H., Alberman, K., Bahr, M., Frishmann, D., Gleissner, A., Hani, M., Heumann, K., Kleine, K., Maieri, A., Oliver, S., Pfeifer, F. and Zollner, A. 1997. Overview of the yeast genome. *Nature* **387**: 7-9.
36. Mountounet, M. 1969. Biosynthèse des alcools supérieurs des boissons fermentées. *Ann. Technol. Agric.*, **18**: 249-261.
37. 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.

38. Pedrero, D., & Pangborn, R. M. (1989). Evaluación sensorial de los alimentos. México: Ed. Alhambra.
39. Pfaffl, M.W. 2004. Quantification Strategies in Real-Time PCR. In: A-Z of Quantitative PCR S.A. Bustin, editor. International University Line. La Jolla, p. 87-120.
40. Priest F.G. e I. Campbell. 1987. Brewing Microbiology. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Great Britain, Cambridge, pp 39-44.
41. Ramaswamy S, Kratzer D., Hershey A., Rogers P., Arnone A., Eklund H., Plapp B. 1994. *J.Mol.Biol.* **14**: 777-779
42. Russell I. 1995. Levadura. Handbook of Brewing. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA, Cap. 10, pp.169
43. Sablayrolles, J. M., and C. B. Ball. 1995. Fermentation kinetics and the production of volatiles during alcoholic fermentation. *J. Am. Soc. Brew Chem.* **53**:71-78.
44. 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.
45. Sidor, L. 2006. Hops and Preparation of Hops. En K. Ockert (Ed.) MBAA Practical Handbook for the Specialty Brewers St Paul, Minnesota: Master Brewers Association of the Americas, págs. 73-74.
46. Soles, R., Ough, C. y Kunkee, R. 1982. Ester concentration differences in wine fermented by various species and strains of yeast. *Am. J. Enol. Vitic*, **33**: 94-98.
47. Stewart, G., and Russell, I. 1993. Fermentation - The Black Box of the Brewery Process. *MBAA Tech. Quart.* , **30**: 159-168.
48. Thurston, P., Quain, E. and Tubb, R. 1982, Lipid metabolism and the regulation of volatile synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Inst. Brew.* **88**:90-94.
49. Titica, M; Landaud, S., Trelea, I.C., Latrille, E., Corrieu, G. and Cheruy, A. (2000), Modeling of the kinetics of higher alcohol and ester production based on CO<sub>2</sub> emission with a view to control of beer flavor by temperature and top pressure. *J. Am. Soc. Brewing Chemists*, 2000, **58**, 167-174.
50. 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. 2003. 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.
51. 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.
52. Vuralhan, Z., Luttik, M., Tai, S., Boer, B., Morais, M., Schipper, D., Almering, M., Kotter, P., Dickinson, J., Daran, J. y Pronk, M. 2005. Physiological characterization of the ARO-10 dependt, broad substrate specificity 2- oxo- acid-decarboxylase activity in *Sacharomyces cerevisiae* *Appl. Environ. Microbio.*, **71**: 3276-3284
53. Vuralhan, Z., Morais M.A., Tai, S.L., Piper M.d y Pronk, J.T. 2003 Identification and characterization of phenylpyruvate decarboxylase genes in *Sacharomyces cerevisiae* *Appl. Environ. Microbio.*, **69**:8
54. Wehner, E. P., E. Rao, and M. Brendel. 1993. Molecular structure and genetic regulation of *SFA*, a gene responsible for resistance to formaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae*, and characterization of its protein product. *Mol. Gen. Genet.* **237**:351-358.
55. Wolfgang K, 1996. Technology Brewing and Malting Hardcover, USA

56. 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  $\alpha$ -ketoisocaproate for isoamyl alcohol formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biosoc. Bioeng.*, **92**: 83-85.
57. Yoshioka, K. y Hashimoto, H. 1981. Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewer's yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 45: 2183-2190.
58. Yoshioka, K. y Hashimoto, H., 1983. Cellular fatty acid and ester formation by brewer's yeast. *Agric. Biol. Chem.*, 43: 2287-2294.
59. Younis, O. and Steward, G. The effect of wort maltose content on volatile production and fermentation performance in brewing yeast, 2000. In Smart K. ed, *Brewing yeast fermentation performance*, 1<sup>st</sup> ed. Blackwell Science, Oxford, UK pp. 170-176

## RESUMEN BIOGRÁFICO

### Datos personales

Nombre: Gabriela Alejandra Quintero Vásquez  
Fecha de nacimiento: 29 de enero de 1984      Curp: QUVG840129MDFNSB08  
Lugar de nacimiento: México D.F      Estado civil: Soltera  
Dirección: Victoria Emperatriz #603D Col. Céntrica, Monterrey Nuevo León C.P 63520  
Dirección de correo electrónico: gabot\_2000@hotmail.com  
Teléfono casa: 0155-5364-65-88      Teléfono celular: 81-11-83-43-94

### Formación académica:

2009-a la fecha Maestría en ciencias con acentuación en Microbiología en la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León Titulo de la Tesis: Análisis en la expresión genética de la síntesis de acetato de etilo e isoamilo en *saccharomyces cerevisiae*, en distintas condiciones de fermentación en el proceso cervecero.

2007-2008 Tesis de Licenciatura en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN) Titulo de la tesis: Diseño de un método de PCR múltiple para la identificación de agentes infecciosos importantes en *Lycopersicon esculentum*. (Obtención de una patente con este trabajo)

2002-2007 Licenciatura de Químico Farmacéutico Biólogo, Facultad de Química de la Universidad Autónoma del Estado de México (UAEM), Titulada.

1999-2002 Preparatoria “Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey, campus Estado de México (TEC-CEM). Curso de Historia del Arte en Florencia, Italia. Estancia en Winnipeg, Canadá.

### Congresos y cursos

Junio 2010 XXXVIII Congreso Nacional de Microbiología, Morelia, Michoacán.

Junio 2009 XI Congreso Internacional / XXXVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, A.C. Acapulco Guerrero.

Junio 2010 Participación como instructor en el 5° Curso Teórico Práctico “Técnicas Básicas de Biología Molecular” moleculares”. Instituto de Biotecnología FCB-UANL

Marzo 2010 Participación como asistente en el curso teórico “Bioinformática Genómica: Ensembl y ArrayExpress” Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, Baja California Sur.

Marzo 2010 Participación como asistente en el curso teórico “Bioinformática Genómica: Ensembl y ArrayExpress” Centro de Investigaciones Biológicas del Noreste, Baja California Sur.

### Experiencia profesional

2006-2008 Asesor externo de sanidad en el invernadero “Hidropónicos Especializados de Chihuahua, Hech” en Delicias Chihuahua.

## GLOSARIO

**ADN (ácido desoxiribonucleico)** - la molécula que codifica la información genética. El ADN es una molécula constituida por dos cadenas (doble-hebra) que se mantienen unidas por enlaces débiles entre los pares de nucleótidos. Los cuatro nucleótidos en el ADN contienen las bases: (A) adenina, (G) guanina, (C) citosina y (T) timina. En la naturaleza, los pares de bases se forman solamente entre A y T, y entre G y C; así la secuencia de cada cadena (hebra) se puede deducir a partir de la secuencia de su pareja.

**ADN complementario (cADN)** - El ADN sintetizado, a partir de un modelo de ARN, por una enzima transcriptasa reversa.

**Agarosa** - es un producto obtenido de una alga marina (sobre todo las algas rojas), que cuando se mezcla con agua y se hierve se vuelve gelatinoso, y se vuelve sólido cuando se enfría.

**Aminoácidos** - elementos de construcción de las proteínas. Hay 20 tipos diferentes de aminoácidos. Una proteína consiste en una secuencia específica de aminoácidos. Los aminoácidos son los elementos de construcción de los péptidos y de las proteínas.

**ARN (ácido ribonucleico)** - un producto químico que se encuentra en el núcleo y en el citoplasma de las células; desempeña un papel importante en la síntesis de proteínas y otras actividades químicas de la célula. La estructura del ARN es similar a la del ADN. Hay varias clases de moléculas de ARN, incluyendo el ARN mensajero, el ARN de transferencia, el ARN ribosomal, y otros ARN pequeños, cada uno sirve para un propósito diferente.

**ARN de transferencia (ARNt)** - una clase de ARN que tiene estructuras con secuencias de nucleótidos cifradas en tripletes, que son complementarias a los tripletes de nucleótidos de las secuencias codificadoras del ARNm. El papel del ARN de transferencia en la síntesis de proteínas es unirse a los aminoácidos y transferirlos a los ribosomas, donde se ensamblan las proteínas según el código genético del ARNm.

**ARN Mensajero (ARNm)** - el ARN que sirve como molde o templado para la síntesis de proteínas.

**ATP** - Una molécula que consiste de la base nitrogenada adenina unida a la molécula del azúcar ribosa con una cadena de tres grupos fosfatos unida a la ribosa. El ATP está presente en todas las células vivas, es una fuente de energía para muchos procesos metabólicos

**Base** - Una de las moléculas que forman las moléculas del ADN y del ARN.

**Bases Nucleótidas Modificadas** - nucleótidos que se diferencian de los desoxinucleótidos (dNTP). Como los ddNTPs que tienen un átomo de hidrógeno en el carbón 3' en lugar de un grupo OH, de tal modo que impide el alargamiento de la cadena o hebra (es incapaz de formar el enlace fosfodiéster con el siguiente desoxinucleótido).



**Biología molecular** - el estudio de la estructura, función, composición de moléculas biológicas importantes.

**Biotecnología** - un sistema de técnicas biológicas desarrolladas a través de la investigación básica, y que son aplicadas en la investigación y en el desarrollo de un producto. En particular, la biotecnología se refiere al ADN recombinante, la fusión celular, y las nuevas técnicas de bioprosesamiento que se usan en la industria.

**Célula** - la unidad estructural más pequeña de la materia viva capaz de funcionar autónomamente. La unidad básica de cualquier organismo vivo que lleva a cabo los procesos bioquímicos de la vida.

**Citoesqueleto:** Es un entramado tridimensional de proteínas que provee el soporte interno para las células, ancla las estructuras internas de la misma e interviene en los fenómenos de movimiento celular y en su división

**Código genético** - la secuencia de nucleótidos, cifrada en los tripletes (codones) a lo largo del ARNm, que determina la secuencia de aminoácidos en la síntesis de proteínas. La secuencia del ADN se puede utilizar para predecir la secuencia del ARNm, y el código genético se puede utilizar a su vez para predecir la secuencia de aminoácidos.

**Cromosoma** - un sistema de autorreplicación que consiste en un complejo de ADN con varias proteínas y que está implicado en el almacenaje y transmisión de información genética.

**Desoxiribosa** - un tipo de azúcar que es uno de los componentes del ADN (ácido desoxiribonucleico).

**Diploide** - un sistema completo de material genético que consiste en los cromosomas emparejados, uno de cada padre. La mayoría de las células de los animales, excepto los gametos, tienen un sistema diploide de cromosomas. El genoma humano diploide tiene 46 cromosomas.

**Doble hélice** - Es la estructura de escalera en espiral que se forma entre dos hebras de ADN cuando los nucleótidos complementarios en cada hebra se unen mediante enlaces.

**Electroforesis** - Técnica para separar moléculas de diferentes tamaños y cargas, ADN ó proteínas. La muestra se pone en una matriz que generalmente es un gel (acrilamida para proteínas; agarosa para RNA y DNA), se somete a la acción de un campo eléctrico y las moléculas se separan de acuerdo a carga y tamaños. Para moléculas de DNA y RNA donde todas tienen igual carga, migran más rápido aquellas de menor tamaño.

**Endocitosis** - proceso de transporte activo de grandes moléculas o partículas a través de la membrana celular.

**Enzima** - una proteína que actúa como un catalizador, aumentando la velocidad a la que ocurre una reacción bioquímica, pero no cambia la dirección o la composición de la reacción.

**Eucariota** - célula u organismo que posee un núcleo verdadero (discreto) rodeado por una membrana, y otros compartimientos subcelulares bien desarrollados. Todos los organismos excepto los virus, las bacterias y las algas azules y verdes son eucariotas.

**Fosforilación** - es la adición de un grupo fosfato inorgánico ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) a cualquier otra molécula.

**Gel de agarosa** - un gel hecho de agarosa, proporciona una base sólida para cargar y correr las muestras de ADN y ARN.

**Gen** - la unidad física y funcional fundamental de la herencia. Un gen es una secuencia de nucleótidos situados en una posición específica respecto a un cromosoma particular que codifica un producto con una función específica. (Es decir, una proteína o una molécula de ARN).

**Genética molecular** - estudio de las macromoléculas importantes en la herencia biológica.

**Genoma** - todo el material genético en los cromosomas de un organismo particular; generalmente, su tamaño está dado como el número total de sus pares de bases.

**Inhibición no competitiva** (o alostérica) es un tipo de inhibición que reduce la tasa máxima de una reacción química ya que la presencia del inhibidor produce un cambio en la estructura y la forma de la enzima.

**Intron** - una región no codificadora de un gen, que se transcribe, pero más adelante se elimina, y por lo tanto no se representa en el ARNm final.

**Kilobase (kb)** - unidad de longitud usada para medir fragmentos del ADN que es igual a 1000 nucleótidos.

**Megabase (Mb)** - unidad de longitud para los fragmentos del ADN iguales a 1 millón de nucleótidos.

**Microarreglo ("microarray") de ADN** - serie ordenada de datos. Un microarreglo ("microarray") de ADN es una serie ordenada de muestras de ADN que se pueden estudiar para determinar patrones en la expresión de los genes

**Microtúbulos** estructuras tubulares de las células, que se originan en los centros organizadores de microtúbulos y que se extienden a lo largo de todo el citoplasma. Se hallan en las células eucariotas y están formadas por la polimerización de un dímero de dos proteínas globulares, la alfa y la beta tubulina.

**Molaridad:** Es el número de moles de soluto por litro de disolución.

**Normalidad:** Es el número de equivalentes de soluto por litro de disolución.

**Nucleótido** - una subunidad del ADN o del ARN que consiste en una base nitrogenada (adenina, guanina, timina, o citosina en el ADN; adenina, guanina, uracilo, o citosina en el ARN), una molécula del fosfato, y una molécula del azúcar (desoxiribosa en el ADN y la ribosa en el ARN). Los millares de nucleótidos se unen para formar una molécula de ADN o de ARN. Vea también: ADN, par de bases, y ARN.

**Oligonucleótido, primer o iniciador:** Secuencia lineal de nucleótidos que tienen distintas funciones: como cebador, iniciador o primer en reacciones de amplificación.

**Par de bases (pb)** - Dos bases nitrogenadas (adenina y timina o guanina y citosina) unidas por enlaces débiles. Los enlaces entre los pares de bases, mantienen unidas las dos hebras de ADN en forma de doble hélice.

**Polarización celular:** diferenciación morfológica entre un polo y otro. Sucede incluso cuando el estímulo es homogéneo (en ausencia de gradiente).

**Procariota** - célula u organismo que no tiene un núcleo discreto rodeado por una membrana ni otros compartimientos subcelulares. Las bacterias son ejemplos de procariotas.

**Proteína** - una molécula grande compuesta por una o más cadenas de aminoácidos en un orden específico; el orden es determinado por la secuencia de nucleótidos del gen que codifica para la proteína. Las proteínas se requieren para la estructura, la función, y la regulación de las células, de los tejidos, y de los órganos del cuerpo; y cada proteína tiene funciones únicas. Ejemplos de proteínas son hormonas, enzimas, y anticuerpos.

**Puente de Hidrógeno:** Atracción electrostática que estabiliza a las moléculas de ácidos nucleicos. Ocurre entre un átomo de H enlazado a otro átomo fuertemente electronegativo (O ó N).

**Replicación del ADN** - el uso del ADN existente como molde (templado) para la síntesis de una nueva cadena (hebra) de ADN. En seres humanos y otros eucariotas, el proceso de la replicación ocurre en el núcleo de la célula.

**Retrotransposon** - un transposon (segmento móvil del ADN) que ha sido creado por la transcripción reversa de una molécula de ARN.

**Traducción** - el proceso en el cual el código genético del ARNm dirige la síntesis de proteínas a partir de los aminoácidos.

**Transcripción** - la síntesis de una copia de ARN a partir de una secuencia del ADN (un gen); el primer paso en la expresión de un gen.

