

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA



Tesis Doctoral

**Identificación y caracterización de los genes
espumantes *FPG1* de *Saccharomyces cerevisiae* y
CFG1 de *Saccharomyces pastorianus*
(*carlsbergensis*)**

Lucía Blasco Otero

Santiago de Compostela, 2011

ISBN 978-84-9887-825-7 (edición digital PDF)

UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

FACULTAD DE FARMACIA

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA Y PARASITOLOGÍA

Tesis Doctoral

**Identificación y caracterización de los genes
espumantes *FPG1* de *Saccharomyces cerevisiae* y
CFG1 de *Saccharomyces pastorianus*
(*carlsbergensis*)**

Memoria presentada por la Licenciada Lucía Blasco Otero para optar al
grado de Doctor en Biología

Santiago de Compostela, 30 de junio de 2011

Fdo. Lucía Blasco Otero

Tomás González Villa, Catedrático de Microbiología del Departamento de Microbiología y Parasitología de la Universidad de Santiago de Compostela.

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada “Identificación y caracterización de los genes espumantes *FPGI* de *Saccharomyces cerevisiae* y *CFG1* de *Saccharomyces pastorianus (carlsbergensis)*” que presenta **Doña Lucía Blasco Otero** para optar al grado de Doctor en Biología, ha sido realizada bajo mi dirección y la de la Dra. Patricia Veiga Crespo, en el Departamento de Microbiología y Parasitología de la Facultad de Farmacia de la Universidad de Santiago de Compostela, y hallándose concluida, autorizo su presentación para que sea evaluada por el tribunal correspondiente.

Y para que así conste, firmamos en la presente en Santiago de Compostela, a 30 de Junio de 2011.

Fdo. Dr. Tomás González Villa

Fdo. Dra. Patricia Veiga Crespo

Agradecimientos

Me gustaría expresar mi agradecimiento a todas aquellas personas que de un modo u otro han contribuido a la realización de este trabajo, pero especialmente:

Al Dr. Tomás González Villa, por haberme permitido formar parte de su grupo de investigación, por haber confiado en mí para desarrollar este trabajo, por su apoyo y por sus enseñanzas durante todo este tiempo.

A la Dra. Patricia Veiga Crespo, codirectora de este trabajo, por sus consejos y la supervisión de este trabajo.

A Lucía Feijoo Siota, que además de compañera es una gran amiga, por todo lo que hemos compartido en estos años de trabajo.

A todos mis compañeros de laboratorio, los que aún están en él y los que han seguido otros caminos, por los buenos momentos y por todo lo que he aprendido con vosotros.

A mi familia, siempre están ahí, para lo bueno y para lo malo. Especialmente a Matías e Inés, por ahora los pequeños de la familia, que siempre te alegran el día.

A Luis, porque siempre ha estado conmigo, por su paciencia, por su apoyo y por sus consejos. Por todo lo que vamos a compartir.

A mi familia

Abreviaturas

| | |
|-------------------|---------------------------------------|
| A | Alanina |
| ADN | Acido desoxiribonucleico |
| C | Cisteína |
| °C | Grado Centígrado |
| cm | Centímetro |
| CWP | Proteína de la pared celular |
| D | Acido Aspártico |
| Da | Dalton |
| DIG | Digoxigenina |
| D.O. | Densidad óptica |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| dNTP | Desoxiribonucleótidos |
| DUTP | Deoxiuridin trifosfato |
| EDTA | Acido etilendiaminotetracético |
| G | Glicina |
| g | Gramo |
| GDP-manosa | Gunosina difosfato manosa |
| GPI | Glicosil fosfatidil inositol |
| h | hora |
| hl | Hectolitro |
| IPTG | Isopropyl- β -D-tio-galactosido |
| KDa | Kilodalton |
| l | Litro |

Abreviaturas

| | |
|--------------|------------------------------------|
| M | Molar |
| mA | Miliamperios |
| min | Minuto |
| mM | Milimolar |
| ml | Mililitro |
| N | Asparagina |
| nM | Nanomolar |
| ORF | Open Reading frame |
| p | Peso |
| pb | Par de bases |
| pI | Punto isoeléctrico |
| PIR | Proteína con repeticiones internas |
| PFGE | Pulse Field Gel Electrophoresis |
| PMSF | Fluoruro de fenilmetilsulfonilo |
| S | Serina |
| SDS | Dodecilsulfato sódico |
| seg | Segundo |
| TEMED | Tetrametiletildiamina |
| Tris | Trihidroximetil-aminometano |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| RE | Retículo endoplasmático |
| U | Unidad enzimática |
| UV | Ultravioleta |

| | |
|--------------------------|---|
| V | Voltios |
| v | Volúmen |
| W 34/70 | Weihenstephan 34/70 |
| X-Gal | 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-galactósido |
| μg | Microgramo |
| μm | Micrómetro |
| μl | Microlitro |

Indice

| | |
|---|----|
| INTRODUCCION | 1 |
| 1. Origen de la bebidas alcohólicas..... | 1 |
| 2. El vino y la cerveza en la actualidad..... | 2 |
| 2.1. El vino..... | 2 |
| 2.2. La cerveza..... | 3 |
| 3. Levaduras asociadas a la elaboración del vino y la cerveza..... | 4 |
| 4. Selección y mejora de las levaduras..... | 7 |
| 5. Homotalismo y heterotalismo..... | 9 |
| 5.1. Cambio del alelo <i>MAT</i> | 11 |
| 5.2. Significado biológico del intercambio del locus <i>MAT</i> | 13 |
| 5.3. Homotalismo en <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. pastorianus</i> | 14 |
| 6. La pared celular de las levaduras..... | 15 |
| 6.1. Las manoproteínas..... | 16 |
| 6.1.1. Tipos de manoproteínas de la pared celular..... | 17 |
| 6.1.2. Función celular de las manoproteínas..... | 20 |
| 7. Espuma..... | 20 |
| 7.1. Formación de la espuma..... | 22 |
| 7.2. Proteínas espumantes..... | 23 |
| 7.2.1. Proteínas espumantes en el vino..... | 23 |
| 7.2.2. Proteínas espumantes en la cerveza..... | 27 |
| 7.3. Genes espumantes en levaduras..... | 31 |
| OBJETIVOS | 34 |
| MATERIALES Y METODOS | 37 |
| 1. Microorganismos, medios de cultivo, plásmidos y oligonucleótidos utilizados..... | 39 |
| 1.1. Microorganismos..... | 39 |
| 1.1.1. Cepas de levadura..... | 39 |
| 1.1.2. Cepas bacterianas..... | 40 |
| 1.2. Medios de Cultivo..... | 40 |
| 1.2.1 Cultivo de bacterias..... | 40 |
| 1.2.2. Cultivo de levaduras..... | 40 |
| 1.3. Oligonucleótidos..... | 42 |
| 1.4. Plásmidos..... | 43 |
| 1.4.1. PCR BluntII TOPO..... | 43 |
| 1.4.2. pUC19..... | 44 |
| 1.4.3. pYES2..... | 45 |
| 1.4.4. pUG6..... | 45 |
| 1.4.5. YEp351-cre-cyh..... | 46 |
| 1.5. Vector de interrupción pDHO..... | 46 |
| 2. Técnicas de manipulación del ADN..... | 48 |
| 2.1. Extracción del ADN..... | 48 |
| 2.1.1. Extracción del ADN plasmídico de <i>E. coli</i> | 48 |
| 2.1.2. Extracción de ADN genómico de levaduras..... | 48 |
| 2.2. Digestión enzimática del ADN..... | 48 |
| 2.3. Defosforilación del ADN..... | 49 |

| | |
|--|----|
| 2.4. Ligación del ADN..... | 49 |
| 2.5. Amplificación del ADN..... | 49 |
| 2.6. Electroforesis del ADN..... | 50 |
| 2.6.1. Electroforesis en geles de agarosa..... | 50 |
| 2.6.2. Electroforesis en campo pulsante..... | 51 |
| 2.7. Purificación del ADN..... | 51 |
| 2.7.1. Purificación a partir de geles de agarosa..... | 51 |
| 2.7.2. Purificación desde una reacción enzimática..... | 51 |
| 2.8. Cuantificación del ADN..... | 52 |
| 2.9. Hibridación de ácidos nucleicos mediante Southern Blot..... | 52 |
| 2.9.1. Preparación de sondas de ADN marcadas con digoxigenina..... | 52 |
| 2.9.2. Detección de las secuencias de ADN específicas..... | 52 |
| 3. Transformación de los microorganismos..... | 54 |
| 3.1. Transformación de <i>E. coli</i> | 54 |
| 3.1.1. Preparación de células competentes..... | 54 |
| 3.1.2. Transformación de células competentes..... | 55 |
| 3.2. Transformación de <i>S. cerevisiae</i> y de <i>S. pastorianus</i> | 55 |
| 4. Expresión de los genes <i>FPG1</i> y <i>CFG1</i> en <i>S. cerevisiae</i> y <i>S. pastorianus</i> | 56 |
| 5. Generación de cepas con deleciones para los genes <i>FPG1</i> , <i>CFG1</i> y <i>URA3</i> | 56 |
| 5.1. Interrupción génica mediada por PCR..... | 56 |
| 5.2. Eliminación del marcador de resistencia..... | 57 |
| 6. Conjugación, Esporulación y Análisis de Tétradas..... | 58 |
| 7. Mapeo genético..... | 59 |
| 7.1. Mapeo mitótico..... | 59 |
| 7.2. Mapeo meiótico..... | 59 |
| 8. Técnicas de manipulación de proteínas..... | 60 |
| 8.1. Purificación de la pared de <i>S. cerevisiae</i> y de <i>S. pastorianus</i> | 60 |
| 8.2. Extracción de proteínas..... | 60 |
| 8.2.1. Extracción desde la pared celular mediante SDS..... | 60 |
| 8.2.2. Extracción de proteínas de la pared celular desde células viables con liticasa..... | 60 |
| 8.2.3. Extracción post-alcali de las proteínas de la pared celular..... | 61 |
| 8.3. Concentración de proteínas..... | 61 |
| 8.3.1. Ultrafiltración..... | 61 |
| 8.3.2. Precipitación con KDS y acetona..... | 61 |
| 8.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)..... | 62 |
| 8.5. Tinción de proteínas..... | 63 |
| 8.5.1. Tinción con azul de Commassie..... | 63 |
| 8.5.2. Tinción con PAS-Schiff..... | 64 |
| 9. Análisis de las secuencias..... | 64 |
| 10. Fermentaciones en laboratorio..... | 65 |
| 11. Selección de cepas espumantes..... | 66 |
| 12. Análisis organoléptico del vino y la cerveza..... | 66 |
| 13. “Shaking Method” para medida de la estabilidad de la espuma de la cerveza..... | 66 |

| | |
|--|-----------|
| 14. Pruebas fenotípicas..... | 67 |
| 14.1. Sensibilidad a la liticasa..... | 67 |
| 14.2. Sensibilidad osmótica..... | 67 |
| 14.3. Sensibilidad al SDS (Sodio Dodecil Sulfato)..... | 67 |
| 14.4. Sensibilidad al Calcofluor White (CFW)..... | 67 |
| 14.5. Tinción con Calcofluor White (CFW)..... | 67 |
| 14.6. Tolerancia al etanol..... | 68 |
| 14.7. Sensibilidad a la temperatura..... | 68 |
| 14.8. Hidrofobicidad de la superficie celular..... | 68 |
| CAPITULO 1: Delección de los genes <i>HO</i> de <i>S. cerevisiae</i> y <i>Sc-HO</i> de <i>S. pastorianus</i>. | |
| Objetivos..... | 71 |
| Resultados..... | 73 |
| 1. Interrupción del gen <i>HO</i> en <i>S. cerevisiae</i> | 75 |
| 2. Estudio de la capacidad conjugativa de las cepas Δ ho de <i>S. cerevisiae</i> | 77 |
| 3. Interrupción del gen <i>Sc-HO</i> en <i>S. pastorianus</i> | 77 |
| 4. Estudio de la capacidad para conjugar de las cepas Δ Sc-ho de <i>S. pastorianus</i> | 79 |
| Discusión..... | 81 |
| CAPITULO 2: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa vínica 145A211 de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>. | |
| Objetivos..... | 89 |
| Resultados..... | 91 |
| 1. Selección de cepas espumantes de <i>S. cerevisiae</i> | 93 |
| 2. Identificación y secuenciación del gen <i>FPGI</i> | 93 |
| 3. Análisis de la secuencia de la proteína Fpg1p..... | 94 |
| 4. Estudio de homología..... | 95 |
| 4.1. Homología del gen <i>FPGI</i> | 95 |
| 4.2. Homología de la proteína Fpg1p..... | 96 |
| 5. Localización cromosómica del gen <i>FPGI</i> | 100 |
| 5.1. Southern Blot..... | 100 |
| 5.2. Mapeo genético del gen <i>FPGI</i> | 101 |
| 5.1.1. Mapeo mitótico por pérdida de cromosomas..... | 101 |
| 5.1.2. Mapeo meiótico..... | 102 |
| 6. Delección del gen <i>FPGI</i> | 102 |
| 7. Pruebas fenotípicas..... | 104 |
| 7.1. Sensibilidad a la temperatura..... | 104 |
| 7.2. Crecimiento en SDS al 1%..... | 104 |
| 7.3. Tolerancia al etanol..... | 104 |
| 7.4. Sensibilidad osmótica..... | 104 |
| 7.5. Sensibilidad al Calcofluor White..... | 104 |
| 7.6. Sensibilidad a la liticasa..... | 105 |
| 7.7. Tinción con Calcofluor White..... | 105 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 7.8. | Hidrofobicidad de la superficie celular..... | 106 |
| 8. | Microfermentaciones..... | 107 |
| 8.1. | Velocidad de fermentación..... | 107 |
| 8.2. | Producción de etanol..... | 108 |
| 8.3. | Producción de ácido acético..... | 108 |
| 8.4. | Producción de glicerol..... | 108 |
| 8.5. | pH..... | 109 |
| 9. | Clonación y expresión del gen <i>FPG1</i> en la cepa MI2B de <i>S. cerevisiae</i> | 109 |
| 9.1. | Clonación del gen <i>FPG1</i> en el vector pYES2..... | 109 |
| 9.2. | Expresión del gen <i>FPG1</i> | 111 |
| 10. | Extracción e identificación de la proteína Fpg1p..... | 111 |
| 10.1. | Extracción a partir de la pared celular..... | 111 |
| 10.2. | Presencia de la proteína Fpg1p en el sobrenadante..... | 112 |
| 11. | Estudio de la implicación de la proteína Fpg1p en el fenotipo espumante..... | 113 |
| 11.1. | 145A211 vs DHA2-16..... | 113 |
| 11.2. | MI2B-FPG1 vs MI2B-pYES2..... | 113 |
| 11.3. | Recuperación del fenotipo espumante..... | 114 |

| | |
|------------------------|-----|
| Discusión | 115 |
|------------------------|-----|

CAPITULO 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces pastorianus*

| | |
|------------------------|-----|
| Objetivos | 127 |
|------------------------|-----|

| | |
|-------------------------|-----|
| Resultados | 129 |
|-------------------------|-----|

| | | |
|------|--|-----|
| 1. | Identificación y secuenciación del gen <i>CFG1</i> | 131 |
| 2. | Análisis de la secuencia de la proteína Cfg1p..... | 132 |
| 3. | Estudio de homología..... | 133 |
| 3.1. | Homología del gen <i>CFG1</i> | 133 |
| 3.2. | Homología de la proteína Cfg1p..... | 133 |
| 4. | Localización cromosómica del gen <i>CFG1</i> | 137 |
| 4.1. | Southern Blot..... | 137 |
| 4.2. | Mapeo mitótico por pérdida de cromosomas..... | 138 |
| 5. | Delección del gen <i>CFG1</i> | 139 |
| 6. | Pruebas fenotípicas..... | 140 |
| 6.1. | Sensibilidad a la temperatura..... | 141 |
| 6.2. | Crecimiento en SDS al 1%..... | 141 |
| 6.3. | Tolerancia al etanol..... | 141 |
| 6.4. | Sensibilidad osmótica..... | 142 |
| 6.5. | Sensibilidad al Calcofluor White..... | 142 |
| 6.6. | Tinción con Calcofluor White..... | 142 |
| 6.7. | Sensibilidad a la liticasa..... | 143 |
| 6.8. | Hidrofobicidad de la superficie celular..... | 143 |
| 7. | Microfermentaciones..... | 144 |
| 7.1. | Velocidad de fermentación..... | 144 |
| 7.2. | Producción de etanol..... | 145 |
| 7.3. | Producción de ácido acético..... | 145 |

| | |
|---|-----|
| 7.4. Producción de glicerol..... | 146 |
| 7.5. pH..... | 146 |
| 8. Clonación y expresión del gen <i>CFG1</i> en la cepa MI2B de <i>S. cerevisiae</i> | 146 |
| 8.1. Clonación del gen <i>CFG1</i> en el vector pYES2..... | 147 |
| 8.2. Expresión del gen <i>CFG1</i> | 148 |
| 9. Extracción e identificación de la proteína Cfg1p..... | 148 |
| 9.1. Extracción desde la pared celular..... | 148 |
| 9.2. Contenido proteico en el sobrenadante..... | 149 |
| 10. Estudio de la implicación de la proteína Cfg1p en el fenotipo espumante..... | 149 |
| 10.1. Weihenstephan 34/70 vs SPDHA1b..... | 150 |
| 10.2. MI2B-CFG1 vs MI2B-pYES2..... | 152 |
| 10.3. Recuperación del fenotipo espumante..... | 152 |
| Discusión | 155 |
| CONCLUSIONES | 163 |
| BIBLIOGRAFIA | 167 |

Introducción

1. Origen de las bebidas alcohólicas

Las bebidas alcohólicas son el producto de mayor producción dentro de las empresas biotecnológicas. En esencia estas bebidas son soluciones aromatizadas de etanol derivadas de numerosos sustratos, como los cereales (cebada en la cerveza), frutas (uva en el vino) o cualquier carbohidrato (licores destilados). La bebida de mayor consumo y producción a nivel mundial es la cerveza seguida por los vinos de mesa.

La fermentación alcohólica es probablemente el proceso biotecnológico más antiguo desarrollado por el hombre del que existen evidencias arqueológicas de más de 7000 años. Las primeras bebidas debieron ser hechas a partir de sustratos muy azucarados, y zumos de frutas, que al entrar en contacto con las levaduras silvestres presentes en la superficie de las frutas habrían fermentado. Las bebidas alcohólicas elaboradas a partir de sustratos amiláceos son más complejas, ya que es necesario un paso previo de germinación para que actúen las enzimas amilolíticas, de manera que el hombre debió desarrollar el proceso del malteado. No fue hasta el siglo XV que se elaboraron las primeras bebidas destiladas (García Garibay & López-Mungía Canales, 2004).

El vino ha evolucionado al mismo tiempo que las civilizaciones humanas. Las primeras evidencias de la elaboración del vino se remontan a 6000 años a.C. en el Caucaso y Mesopotamia. Existen también evidencias de su elaboración por parte de los egipcios y los fenicios sobre el año 5000 a.C y así mismo en Grecia y Creta en el 2000 a.C. La gran distribución del vino tuvo lugar con la expansión del Imperio Romano por el Mediterráneo en el año 500 a.C., expandiéndose finalmente a los Balcanes y norte de Europa, así como a Gran Bretaña. En América fue introducido por los conquistadores españoles en el siglo XVI, plantando *Vitis vinifera* por primera vez en 1530 en Méjico, Argentina, Perú y Chile. En siglo XVII se introdujo en Sudáfrica y finalmente en el siglo XIX en Australia y Nueva Zelanda (Robinson, 1994).

También la elaboración de la cerveza ha evolucionado con las civilizaciones humanas. En este caso, las primeras evidencias se remontan a 4000 a.C. en Mesopotamia, donde se elaboró por primera vez. También los egipcios entre los años 1550-1070 a. C. llevaron a cabo la elaboración de cervezas y se mantuvo hasta que los musulmanes conquistaron la región en el siglo VIII. Sin embargo, la cerveza ya se había extendido más allá del Oriente Medio, llegando de mano de los mercaderes a las islas británicas, donde los romanos la encontraron en el año 55 a.C. (Hornsey, 1999). Ya en la Edad

Media la cerveza estaba extendida por toda Europa, y su elaboración había quedado más o menos confinada a los monasterios, que eran los encargados de abastecer del producto a la comunidad local. Fue en estos monasterios donde comenzaron a realizarse mejoras en la producción cervecera, y donde se lograron distintos tipos de cerveza, algunos de los cuales perduran en la actualidad. Por ejemplo, los monjes de Babiera observaron que algunas levaduras tendían a hundirse mientras que otras flotaban, y que la cerveza elaborada con las primeras era más estable, ya que las cervezas elaboradas con levaduras de fermentación alta eran más susceptibles de sufrir infecciones. Además las cervezas elaboradas con levaduras de fermentación baja eran más claras, más espumosas y más estables. También observaron que la estabilidad mejoraba cuando se almacenaban a baja temperatura en bodegas, lo que permitió que se elaborase cerveza durante todo el año. Otra mejora introducida por los frailes cerveceros por primera vez en el año 736 d.C., fue el lúpulo, que aromatizaba y favorecía la conservación de la cerveza (Hornsey, 1999)

2. El vino y cerveza en la actualidad

2.2. El vino

En la década de los noventa del siglo XX, la industria vitivinícola sufrió un cambio debido a la globalización. La entrada en el mercado internacional de los vinos llamados del “Nuevo Mundo”, procedentes de Estados Unidos, Australia, Chile, Argentina, Sudáfrica y Nueva Zelanda, supuso la pérdida de mercado y el incremento en la competencia para los vinos europeos también llamados “Tradicionales”. Al mismo tiempo se produjeron cambios en el consumo de los vinos, desencadenándose una crisis que ya se había ido gestando en los ochenta. Así el consumo de vino, dominado por vinos de mesa de bajo coste y escasa diferenciación, cayó a razón de 5 Hl/año. A partir de 1995 la situación se estabilizó y el consumo comenzó a aumentar alcanzando en algunos países el 40% de del consumo total de bebidas alcohólicas. Al mismo tiempo que aumentó el consumo también se produjeron cambios en los hábitos de los consumidores observándose una preferencia por los vinos de calidad, los vinos varietales y los vinos tintos, mientras que la demanda de vinos de mesa sufrió un decrecimiento continuo. Actualmente se observa que es el consumidor de vino el que modela el mercado con sus gustos y preferencias (Calderón & Blanco, 2005).

La producción mundial de vino en el año 2009 fue de 268.700.000 Hl, lo que convierte la elaboración de esta bebida en una gran industria. La industria del vino está sujeta a la dinámica de cambios que caracterizan el mundo del siglo XXI, y que no tiene precedentes en ninguna época anterior. Por ello, aunque la industria del vino sea una industria tradicional, las regiones productoras tienen que elaborar planes de mejora en función de la tendencia del mercado, de manera que si no lo hacen están abocadas a desaparecer. La competencia creada de esta manera da lugar al aumento de la diversidad y la innovación en la industria del vino (Calderón & Blanco, 2005; Pretorius, 2000).

A principios del siglo XVII el vino era considerado como una bebida sana fácilmente almacenable, mientras que actualmente el vino es considerado como una bebida universal de uso moderado, que es sinónimo de cultura y de un estilo de vida social. La actual visión del vino hace que sea necesaria la existencia de un equilibrio entre la elaboración tradicional y las innovaciones tecnológicas, de manera que haya un encuentro entre las demandas de los productores y las preferencias de los consumidores. La innovación tecnológica es un punto clave en el éxito de la industria vinícola en el siglo XXI, y esto incluye la innovación biotecnológica orientada a resolver los problemas de la industria, así como a crear nuevas oportunidades estratégicamente importantes que armonicen con la complejidad que suman el mercado, la cultura, la sociedad, el medioambiente y los factores tecnológicos (Pretorius, 2000).

Las mejoras hasta el momento han tenido lugar sobre los procesos de elaboración del vino, en las prácticas enológicas y de viticultura. Sin embargo, actualmente ha surgido una nueva línea de innovación, que es la mejora genética de las uvas y de las levaduras implicadas en la producción del vino (Pretorius, 2000).

2.2. La cerveza

La cerveza en el siglo XX se ha convertido en la bebida alcohólica de mayor consumo mundial en términos de volumen. En EEUU se ha convertido en la bebida más popular después del té y el agua (Schmitt, 2011). Si en la década de los sesenta el consumo de cerveza era el doble que el del vino, en el año 2005 era seis veces mayor. En el año 2005 la producción de cerveza ha generado 130 billones de dólares frente a los 65 billones de dólares generados por el vino (Colen & Swinnen, 2010).

En la actualidad el mercado de la cerveza también ha ido cambiando, así aunque las ventas de cerveza en Europa y América del Norte han descendido, han aumentado en China, Rusia, América Latina, Europa de este, Asia y África. A pesar de ello los mayores consumidores mundiales de cerveza son EEUU y China (Schmitt, 2011).

La distribución del consumo de cerveza tradicionalmente ha estado ligado a zonas de producción de cebada y cereales, debido a los distintos tipos de cereales empleados en la elaboración de las distintas variedades cerveceras. Por este motivo la producción de cebada se ha convertido en un mercado importante para los países productores, convirtiéndose además en un producto con sus propios impuestos. Así la producción mundial de cebada entre 2001 y 2003 fue de 140.000.000 de toneladas de las que 25.000.000 de toneladas fueron empleadas para el malteado, siendo las áreas de mayor producción mundial de cebada, Europa y el Oriente Medio. La demanda de variedades de cebada ha hecho que se desarrollen distintos programas de cultivo, con lo que cada año se obtienen nuevas variedades de cebada que enriquecen el mercado (Riese & Eßlinger, 2009).

Desde sus orígenes han surgido distintas variedades de cerveza en función de la zona de producción, como consecuencia de las materias primas disponibles. La tecnología ha tenido un papel fundamental en el desarrollo de la cerveza durante todo el milenio, dentro de estas tecnologías se incluyen el desarrollo del malteado, la utilización del lúpulo para mejorar el sabor y el aroma, o el conocimiento de los microorganismos implicados en la fermentación. En la actualidad los procesos y los equipos han evolucionado permitiendo el desarrollo de nuevos productos acordes con la demanda de los consumidores, como la cerveza sin alcohol o la cerveza dietética (Burberg & Zarnkow, 2009).

3. Levaduras asociadas a la elaboración del vino y la cerveza

El primero en evidenciar la actividad de organismos microbianos durante la fermentación fue Louis Pasteur en 1863. Demostró que las levaduras eran los principales responsables de la fermentación en los vinos, basándose en los trabajos de Antonie van Leewenhoek, quien en 1680 fue el primero en observar levaduras al microscopio, y de otros tres investigadores, Cagniard-Latour, Kützing y Schwann, que en 1830 demostraron que eran organismos vivos (Barnett, 1998).

La fermentación alcohólica es el proceso por el cual las levaduras transforman el azúcar del mosto en etanol y CO₂ en ausencia de oxígeno. Tanto la fermentación del mosto como la producción del vino son procesos bioquímicos y ecológicamente complejos, en los que hay desarrollo secuencial de especies de microorganismos, condicionado por el ambiente, en el que interaccionan especies de hongos, levaduras y bacterias ácido lácticas y ácido acéticas (Fleet, 1993; Fleet, 1998; Pretorius, 2000).

Las levaduras son microorganismos eucariotas unicelulares que se encuentran tanto en el grupo de los ascomicetes, los basidiomicetes como en el de los *fungi imperfecti*, que se dividen fundamentalmente por gemación (división asimétrica) y raramente por fisión, y que en estado sexual no producen cuerpos fructíferos (Kurtzman & Fell, 1998).

El zumo de las uvas es un medio muy rico en el que pueden crecer multitud de microorganismos, sin embargo, el bajo pH, entre 3 a 3.5, y el alto contenido en azúcar (200mg/l) ejercen una presión selectiva sobre las poblaciones de microorganismos. Una vez que la fermentación comienza, las condiciones anaeróbicas creadas contribuyen a seleccionar solamente los microorganismos capaces de crecer sin oxígeno (Rainieri & Pretorius, 2000).

En los vinos elaborados tradicionalmente, que se producen a partir de fermentación espontánea sin inóculo, las levaduras pueden proceder de la superficie de las uvas, de la bodega, del material empleado durante el procesamiento de las uvas, del personal responsable del proceso, e incluso de los insectos visitantes (principalmente especies del género *Vespa*). Así, según el viñedo y la bodega, existen levaduras consideradas autóctonas y otras consideradas alóctonas. Además la microflora presente en las uvas varía con el tipo de uva, la temperatura, la lluvia y otras influencias climáticas como el suelo, la fertilización, irrigación y prácticas de viticultura. Hasta el momento se han identificado 15 géneros de levadura distintas implicadas en el proceso de elaboración del vino: *Brettanomyces* y su equivalente sexual *Dekkera*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaryomyces*, *Hanseniaspora* y su equivalente sexual *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia*, *Rhodotorula*, *Saccharomyces*, *Saccharomycodes*, *Schizosaccharomyces* y *Zygosaccharomyces* (Pretorius *et al.*, 1999; Pretorius, 2000).

Las distintas especies de levaduras se van sustituyendo secuencialmente en función de los cambios que van ocurriendo en las uvas y en el mosto hasta la obtención del vino. Las especies mayoritarias en la superficie de la uva son *Kloeckera apiculata* y

Hanseniaspora uvarum, que constituyen entre el 50% y el 75% de la población. Otras especies menos numerosas pertenecen a los géneros *Candida*, *Brettanomyces*, *Cryptococcus*, *Kluyveromyces*, *Metschnikowia*, *Pichia* y *Rhodotorula* (Fleet, 1993; Fleet, 1998; Pretorius, 2000). Estos géneros, también conocidos como no-*Saccharomyces*, están presentes sobre todo al inicio de las fermentaciones espontáneas, pero hacia la mitad y hasta el final del proceso de fermentación, *S. cerevisiae* se convierte en la especie dominante debido a su tolerancia a niveles altos de etanol (Pretorius, 2000; Rainieri & Pretorius, 2000; Fleet, 2008).

Aunque *S. cerevisiae* apenas está presente en los hábitats naturales, siendo el hábitat primario las especies del género *Quercus*, no es una especie particularmente asociada a la uva hasta bien entrada la maduración de las bayas tras ser visitados los viñedos por diferentes insectos sin embargo esta especie es abundante en el mosto y en las superficies de los equipos bodegueros, siendo la levadura más abundante de entre las que están presentes en las superficies de las bodegas (Davenport, 1976; Martini, 1993; Martini *et al.*, 1996; Fleet, 1998). *S. cerevisiae* presenta el catabolismo fermentativo más eficiente y, por ello, es la especie preferida por los productores de vino como iniciadora de la fermentación alcohólica (Pretorius, 2000).

Originalmente la fermentación de la cerveza ocurría de manera espontánea gracias a las levaduras presentes en las cervecerías y en la materia prima empleada en el proceso. A partir del descubrimiento de que las responsables de la fermentación alcohólica eran las levaduras, comenzaron a aislarse cultivos microbianos puros, de manera que en 1881 Hansen aisló por primera vez un cultivo de levadura cervecera que denominó “Carlsberg Yeast Number 1” (Saerens *et al.*, 2010).

Tradicionalmente los cerveceros han distinguido dos tipos de levaduras cerveceras: ale y lager, clasificadas en función de su capacidad de floculación. Así, las levaduras tipo ale tienden a flotar a la superficie de los tanques de fermentación por lo que también son conocidas como “top fermenting yeast”. Las levaduras de tipo lager sedimentan en el fondo de los tanques por lo que son también conocidas como “bottom fermenting yeast”. Una diferencia importante entre ambos tipos de levaduras es la temperatura de fermentación, de manera que las levaduras de tipo ale fermentan entre 15°C y 26°C mientras que las de tipo lager lo hacen entre 8°C y 15°C (Saerens *et al.*, 2010).

Las levaduras ale y lager pertenecen al género *Saccharomyces* sin embargo los análisis fisiológicos y genéticos han demostrado que se trata de dos especies distintas. En un principio las levaduras tipo ale fueron clasificadas como *S. cerevisiae* y las de tipo lager como *S. carlsbergensis*, aunque posteriormente se incluiría en la especie *S. pastorianus* (Vaughan-Martini & Martini, 1987; Nakao *et al.*, 2009; Saerens *et al.*, 2010). Estudios de hibridación ADN-ADN demostraron que la especie *S. pastorianus* es un híbrido de las especies *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, y que tiene tres tipos de cromosomas, los cromosomas tipo *S. cerevisiae*, cromosomas tipo *S. bayanus* y, finalmente, cromosomas resultantes de la recombinación de los dos tipos anteriores; estos resultados fueron confirmados cuando se analizó el genoma completo de la cepa Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus* (Tamai *et al.*, 1998; Querol & Bond, 2009; Nakao *et al.*, 2009).

En el mosto cervecero aparte de las levaduras fermentadoras empleadas como cultivos iniciadores pueden existir bacterias y otras especies de levaduras que pueden pertenecer o no al género *Saccharomyces* conocidas como levaduras silvestres.

Las levaduras silvestres se encuentran presentes en el mosto y en la cerveza terminada, pero su presencia no es deseada. Existen diversos géneros de levaduras que han sido aisladas de las plantas cerveceras y que se consideran levaduras silvestres: *Brettanomyces*, que es necesario para la producción de cerveza lámbica debido a su capacidad de producir ácidos deseables; *Hansenula*, forman una película que si se dispersa aumenta la turbidez general; *Pichia*, forman un película superficial en la cerveza como consecuencia de su naturaleza aerobia; *Candida*; *Torulopsis*; *Debaryomyces*; *Kloeckera*; *Kluyveromyces*; *Rhodotorula* (Hornsey, 1999).

La mayoría de los microbios indígenas procedentes del agua de la cervecería, la malta y los lúpulos no sobreviven a la fase de ebullición, lo que en la práctica conlleva que hay pocas especies de bacterias y hongos capaces de alterar las características de la cerveza (Hornsey, 1999).

4. Selección y mejora de las levaduras

La práctica de las fermentaciones espontáneas prevaleció hasta la década de los 80 ya que se consideraba que las levaduras asociadas a los viñedos y bodegas conferían un estilo y calidad distintivos a los vinos. Sin embargo, la contribución individual y colectiva de las levaduras indígenas a las características del vino es variable, y supone

que no se puedan predecir ni reproducir sus características finales. Esta pérdida de reproducibilidad y predictibilidad ha supuesto el desarrollo de cultivos iniciadores de la fermentación también llamados cultivos “starter”, que son cultivos de levaduras, generalmente *S. cerevisiae*, que han sido seleccionados por sus características y que permiten controlar las fermentaciones y las características finales del producto (Pretorius, 2000; Moreno-Arribas & Polo, 2005; Cebollero *et al.*, 2007).

A pesar de que actualmente hay viticultores que realizan fermentaciones espontáneas, los productores de vino a gran escala utilizan los cultivos iniciadores, de manera que se aseguran una fermentación rápida y segura esencial para obtener un vino con características organolépticas de calidad predecible. Por ello las grandes bodegas son las beneficiarias de los programas de producción de nuevas levaduras que conllevan una mayor seguridad en el proceso, y permiten obtener productos asequibles y de gran calidad (Pretorius, 2000).

La selección de las levaduras consiste en la identificación de aquellos cultivos que fermenten el mosto de manera eficiente y que produzcan vinos de calidad. Las cepas seleccionadas suelen ser aisladas de mosto y de vino debido a que están adaptadas al ambiente enológico. Esta selección, también conocida como selección clonal, se realiza en función de las propiedades enológicas de los cultivos aislados. Las propiedades pueden ser tecnológicas, que son aquellas que mejoran la eficiencia del proceso de fermentación, y cualitativas, que son las que determinan la composición e influyen en las características sensoriales del vino (Zambonelli, 1998; Rainieri & Pretorius, 2000; Saerens *et al.*, 2010). Con el proceso de selección clonal raramente se consiguen clones puros que contengan todas las características deseadas, pero sin embargo constituyen una fuente de biodiversidad que es fundamental para los programas de mejora genética a los que se someterán posteriormente las levaduras (Giudici, 2005).

La mejora genética de las levaduras se ha realizado tradicionalmente mediante técnicas de hibridación sexual y parasexual, y por mutagénesis al azar. Sin embargo, estas técnicas aunque permiten mejorar las características deseadas, también suponen la modificación y pérdida de otras debido a la recombinación o a la separación de las esporas en el primer caso, o a que las mutaciones son aleatorias en el segundo (Cebollero *et al.*, 2007). La mejora de las levaduras silvestres del género *Saccharomyces* se ve dificultada porque son prototróficas, con bajos niveles de

esporulación y esporas con baja viabilidad y suelen ser homotáticas, heterozigóticas, diploides o aneuploides y en algunos casos poliploides (Pretorius, 2000; Puig *et al.*, 2000; Blasco *et al.*, 2008).

Una línea de actuación que permite la mejora de distintos caracteres consiste en la obtención de cepas heterotáticas a partir de las cepas homotáticas mediante la interrupción del gen *HO* responsable del homotalismo, de manera que se obtiene cepas con la mitad de la carga cromosómica. La heterotalización permite la expresión de alelos génicos que estaban enmascarados debido a la heterozigosis en las cepas homotáticas. Además, la heterotalización permite la mejora de las nuevas cepas mediante técnicas clásicas de hibridación como la del ADN recombinante (Van Zyl *et al.*, 1993; Tamai *et al.*, 2001; Saerens *et al.*, 2010)

La mejora de un determinado rasgo en las levaduras es complicado ya que muchos de los caracteres enológicos son epistáticos (o hipostáticos) y muchos de los genes tienen efectos pleiotrópicos. Es necesario conocer la naturaleza genética de los mismos. Actualmente se conoce la secuencia completa del genoma de distintas cepas de especies de levaduras como *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* lo que supone un gran avance en la mejora de estas levaduras (Giudici *et al.*, 2005; Cebollero *et al.*, 2007).

Los organismos genéticamente modificados tienen que cumplir una serie de requisitos para poder ser empleados en la industria, y su uso está estrictamente regulado en la mayoría de los países del mundo. Actualmente existen dos líneas de investigación orientadas a conseguir organismos genéticamente modificados que sean mejor aceptados por los consumidores; por un lado en obtener levaduras con la menor cantidad posible de ADN exógeno de otras especies evitando también el uso de genes de resistencia a antibióticos; y por otro lado, obtener transformantes genéticamente estables en ausencia de presión selectiva, con modificaciones génicas integradas en el genoma y sin plásmidos con replicación autónoma (Cebollero *et al.*, 2007).

5. Homotalismo y heterotalismo

Las levaduras de género *Saccharomyces* tienen dos tipos de ciclos de vida, como haploides o como diploides. Las células haploides pueden ser de dos tipos conjugantes, a o α , que se unen entre sí por conjugación para dar lugar a un diploide a/α , este a su vez se divide por meiosis para dar de nuevo células haploides a y α , pero no puede conjugarse.

Introducción

El diploide puede crecer vegetativamente en este estado o puede esporular dando lugar a cuatro esporas contenidas en un saco que es conocido como asca.

Según su ciclo de vida las levaduras del género *Saccharomyces* se clasifican como heterotálicas u homotálicas (Figura 1). Las células heterotálicas son de tipo conjugante estable, de manera que cuando se dividen por vegetativamente las células α dan lugar a células α , y las células a dan lugar a células a . Solamente conjugan dos células de tipo opuesto para formar un diploide que por meiosis dará lugar a células haploides de ambos tipos conjugantes. En el caso de las células homotálicas las células diploides esporulan dando lugar a cuatro esporas haploides, éstas se dividen por mitosis y la célula madre cambia su tipo conjugante fusionándose con la hija y dando lugar de esta manera a un nuevo diploide a/α (Herskowitz & Jensen, 1991; Rainieri *et al.*, 2003).

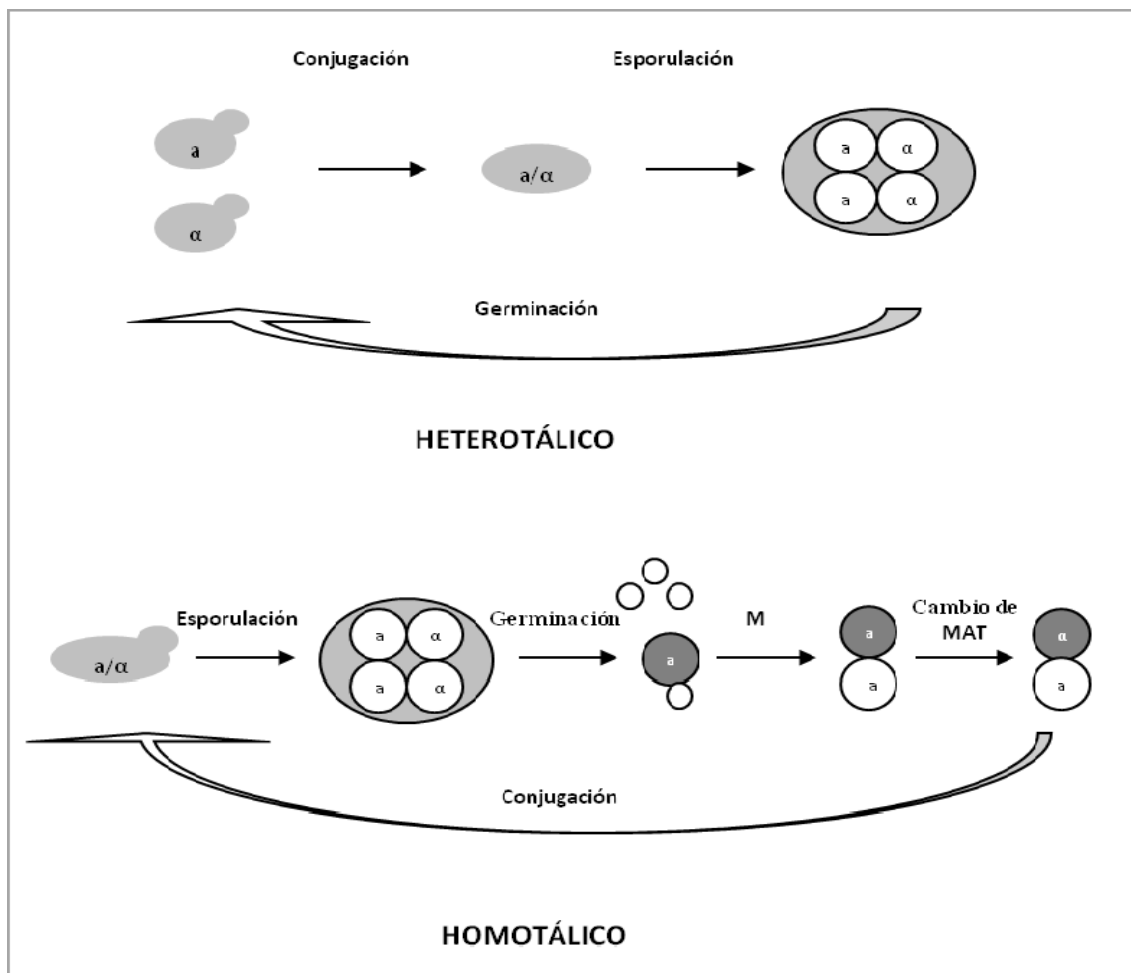


Figura 1. Ciclo de vida de una levadura heterotálica y de una levadura homotálica.

El tipo conjugante de las células haploides está determinado genóticamente en el locus *MAT* ubicado en el cromosoma III. Las dos variantes del locus *MAT*, *MATa* y *MAT α* ,

difieren en su secuencia, tamaño y contenido genético. Además, en cierto modo son responsables de la producción y respuesta a feromonas, aglutinación, apareamiento y esporulación (Herskowitz & Oshima, 1981; Metzenberg & Glass, 1990). *MAT α* codifica para dos proteínas, *Mata1p* y *Mata2p*, la primera activa un set de genes α específicos como los que codifican para la feromona factor- α y para un receptor transmembrana del factor α , la segunda es un represor de los genes α específicos como los que codifican para el factor α y para un receptor transmembrana del factor α (Keleher *et al.*, 1989; Herschbach *et al.*, 1994; Patterson & Simson., 1994; Haber, 1998). *MAT α* codifica a su vez para dos proteínas, *Mata1p* y *Mata2p*. *Mata1p* se combina con *Mata2p* para formar un complejo represor que inhibe la expresión de *Mata1p*, de todos los genes específicos de α , y de todos los genes específicos de α con lo que el diploide no puede conjugar (Haber, 1998; Soll *et al.*, 2009).

El tipo de *MAT* conlleva muchas diferencias entre las células, y no solamente entre haploides y diploides, sino también entre diploides *MAT α /MAT α* y diploides homocigotos (*MAT α / MAT α* ó *MAT α / MAT α*). Así los diploides heterocigotos para *MAT* pueden iniciar la meiosis y esporular mientras que esto es imposible para los diploides homocigotos. La forma de dividirse vegetativamente también está influenciada por este hecho, de manera que tanto las células haploides como los homocigotos para *MAT* tienen un patrón axial de producción de yemas que facilita la conjugación, mientras que las células diploides heterocigotas presentan un patrón de formación de yemas polar (Chant, 1996).

5.1. Cambio del alelo *MAT*

El cambio del locus *MAT* depende de cuatro fenómenos: (a) el linaje celular, ya que solamente la mitad de las células de una población cambian cada vez; (b) la presencia de dos copias silenciadas de los genes *MAT*, que actuarán como donantes cuando ocurra el cambio; (c) la existencia de un sitio específico de corte de la doble hebra, de manera que se produzca la recombinación en *MAT* y se reemplace la secuencia *Ya* o la *Y α* ; y, (d) un mecanismo que regule el uso selectivo de los donantes (Haber, 1998).

Los primeros estudios sobre el cambio del locus *MAT* identificaron dos loci adicionales necesarios para el reemplazamiento de los alelos *MAT* que son *HML* y *HMR*, que contienen versiones silenciadas de *MAT*. El locus *HML* contiene información silenciada equivalente a la expresada en *MAT α* en el alelo *HML α* , mientras que el locus *HMR*

contiene información silenciada equivalente a *MAT α* , en el alelo *HML α* (Santa María & Vidal, 1970; Naumov & Tolstorukov, 1973; Harashima & Oshima, 1976).

La transposición de estos alelos se explica mediante el “modelo de transposición del cassette” (Figura 2) (Hicks & Herskowitz, 1977; Herskowitz, 1988). El segmento de información que determina el tipo conjugante de las células se denomina “casete genético” porque se expresa en una posición (en el locus *MAT*) pero no en la otra (en los loci *HML* y *HMR*) (Herskowitz, 1988). Según este modelo el cambio de α a a consistiría en la eliminación del locus *MAT* y su substitución por la información localizada en *HMR*. Esta transposición no altera la composición de la secuencia donante *HMR*, sino que las secuencias de *HML α* y de *HMR a* son copiadas e insertadas en el locus *MAT* en el lugar del alelo *MAT* (Hicks *et al.*, 1979).

La presencia de copias intactas pero no expresadas de los genes de conjugación en los loci *HML* y *HMR*, implican que mantienen una configuración silenciada por la acción de genes situados a ambos lados de estos loci y que actúan como silenciadores (Brand *et al.*, 1985; Loo & Rine, 1994; Braunstein *et al.*, 1996; Stone & Pillus, 1998; Weiss & Simpson, 1998).

La transposición de la información del casete de *HML* o de *HMR* a *MAT* está catalizado por el producto del gen *HO*, que codifica para una endonucleasa específica que inicia la conversión del tipo conjugante. La endonucleasa HO reconoce un sitio de 18 pares de bases en el locus *MAT* y provoca la rotura de la doble hebra en esta posición. Una vez que se ha producido la rotura y el locus es reparado por un proceso mediante el cual la información contenida en *HML* o en *HMR* se copia y reemplaza las secuencias eliminadas del locus *MAT*, quedando los dos loci donantes intactos (Strathern *et al.*, 1982; Kostriken *et al.*, 1983; Kostriken & Heffron, 1984). Cuando la endonucleasa HO corta la doble hebra en *MAT*, deja 4 pb en el extremo 3', que son procesadas por una o dos exonucleasas 5'-3' que crean largas colas en el extremo 3'. Estas colas se crean porque este extremo es muy resistente a la eliminación por parte de las exonucleasas, aunque también es posible que no existan exonucleasas que actúen en sentido 3'-5' o bien que los extremos estén protegidos. Las colas en el extremo 3' se pueden asociar con recombinasas que facilitan la búsqueda de regiones homólogas para iniciar la recombinación (Szostak *et al.*, 1983; Haber, 1998).

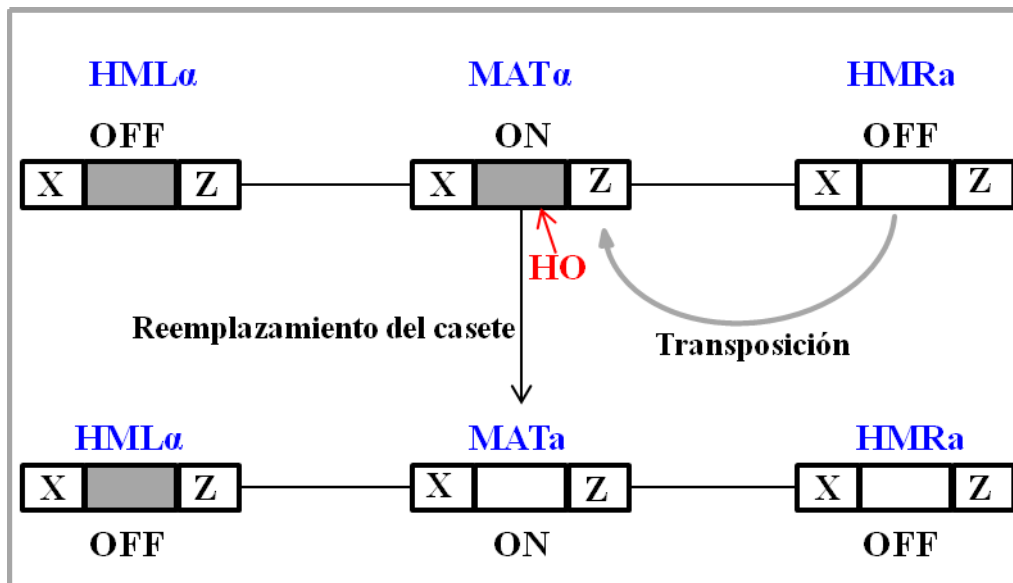


Figura 2. Modelo de transposición del cassette.

La elección entre *HML* y *HMR* no es aleatoria, las células α preferentemente reparan la hebra rota con el cassette α del *HMR*, mientras que las células a utilizan preferentemente el cassette α del *HML* (Klar *et al.*, 1982; Herskowitz, 1988). La direccionalidad del intercambio refleja la imposibilidad de la endonucleasa para cortar la secuencia de reconocimiento en los loci *HML* y *HMR* debido a que estos se encuentran ocluidos por los nucleosomas en el ADN silenciado, así, solamente se corta el locus *MAT* convirtiéndose en el recipiente de ADN en este intercambio (Nasmyth, 1982; Weiss & Simpson, 1998). Las células *MAT* α eligen el *HMR* α en un 85 a 90% de las veces. Existen dos mecanismos que determinan la preferencia por el donante. Las células *MAT* a activan el locus *HML* para recombinar preferentemente con el locus *MAT*, a pesar de que el donante en *HMR* está disponible como copia de seguridad para reparar la rotura de la doble hebra. Las células *MAT* α no activan el locus *HMR* del mismo modo, sino que en lugar de ello, inactivan los donantes en *HML* haciendo de *HMR* el único donante disponible (Wu *et al.*, 1996; Wu *et al.*, 1997).

5.2. Significado biológico del intercambio del locus *MAT*

El resultado principal del cambio en el tipo conjugante es que a partir de células haploides se forman células diploides estables, a/α , que son homocigotas para el gen *HO*, y que permanecen estables debido a que este gen se encuentra inactivo por la acción de los genes *MAT* $a1$ y *MAT* $\alpha2$ (Jensen *et al.*, 1983).

El cambio del tipo conjugante sigue dos reglas fundamentales: (1) Las células procedentes de una división celular son del mismo tipo conjugante que la célula madre. (2) Únicamente las células que han formado una yema al menos una vez son competentes para cambiar su tipo conjugante *MAT* (Hicks *et al.*, 1977; Strathern & Herskowitz, 1979). De manera que el cambio de *MAT* ocurre solo en las células madre y nunca en las células hijas ni en las esporas, ya que el gen *HO* se expresa exclusivamente en las células madre y únicamente durante la fase G1 del ciclo celular (Cosma, 2004).

5.3. Homotalismo en *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*

Tanto *S. cerevisiae* como *S. pastorianus* pertenecen al grupo de las *Saccharomyces sensu stricto*, que son aquellas especies del género *Saccharomyces* que están altamente relacionadas entre sí, y que en un principio fueron definidas por Van der Walt *et al.* (1995) como aquellas especies del género *Saccharomyces* estrictamente asociadas a la industria fermentativa. Estas especies están tan íntimamente relacionadas, que en algunos casos pueden hibridar y producir una progenie viable y fértil. La mayoría de las cepas pertenecientes a especies del grupo de las *Saccharomyces sensu stricto* son homotáticas, tal como ocurre en las cepas silvestres de la especie *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* (Rainieri *et al.*, 2003).

En *S. cerevisiae* el gen *HO* se encuentra en el cromosoma IV y codifica para la endonucleasa responsable del cambio de tipo conjugante. Por tanto es responsable del homotalismo y está presente en la mayoría de las cepas silvestres diploides de *S. cerevisiae* (Butler *et al.*, 2004).

S. pastorianus es una especie resultante de una hibridación entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, presentando dos tipos de genes *HO*, el gen Sc-*HO* (*HO* de tipo *S. cerevisiae*) y el gen Lg-*HO* (gen *HO* específico de levaduras tipo lager), ambos funcionales y localizados en su respectivo tipo de cromosoma (Tamai *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2001). Aunque ambos genes confieren el carácter homotático a las cepas, la delección del gen Lg-*HO* implica la conversión de éstas en heterotáticas a pesar de conservar el gen Sc-*HO* (Tamai *et al.*, 2001; Nakao *et al.*, 2009).

6. La Pared celular de las levaduras

La pared celular de las levaduras era considerada un exoesqueleto rígido y estático que desempeñaba fundamentalmente una función estructural. Actualmente la pared celular es considerada un orgánulo dinámico que cambia en función del estado fisiológico de la célula (Stratford, 1994; Popolo & Vai, 1999). Las funciones más importantes de la pared celular son la regulación osmótica y la protección física de la membrana plasmática y del citoplasma, pero también representa una barrera de permeabilidad selectiva y actúa como soporte para las enzimas inmovilizadas. La pared celular actúa en el reconocimiento y adhesión célula-célula especialmente durante la conjugación y la floculación (Stratford, 1994).

La pared celular de las levaduras está compuesta en gran medida por polisacáridos (85%) y proteínas (15%). Los polisacáridos presentes en la pared son glucosa (80-90%), N-acetilglucosamina (GlcNAc) (1-2%) y manosas (10-20%). Los residuos de glucosa se unen entre sí mediante enlaces β -1,3 y β -1,6 glucanos y mediante enlaces β -1,4 glucano a la GlcNAc, mientras que las manoproteínas se enlazan a las cadenas de β -1,6 glucosa mediante un anclaje al glicosil fosfatidil inositol (GPI) procesado, o bien al β -1,3 glucano mediante enlaces alcalino sensibles. Así la pared celular en su cara más interna está formada por una red de moléculas de β -1,3 glucano unido entre sí por puentes de hidrógeno, haciendo de esqueleto al que se unen covalentemente el β -1,6 glucano y a la quitina. La cara externa de la pared celular, sin embargo, está compuesta por las manoproteínas que están unidas a los glucanos de la pared (Kollár *et al.*, 1997; Lipke & Ovalle, 1998; Molina *et al.*, 2000; Klis *et al.*, 2002; Lesage & Bussey, 2006; Yin *et al.*, 2005). Los glucanos y la quitina dan forma y resistencia a la pared, mientras que las manoproteínas actúan como barrera para retener las proteínas periplásmicas y protegen a la célula de los daños causados por enzimas externas (Figura 3) (Lipke & Ovalle, 1998; Kapteyn *et al.*, 1999).

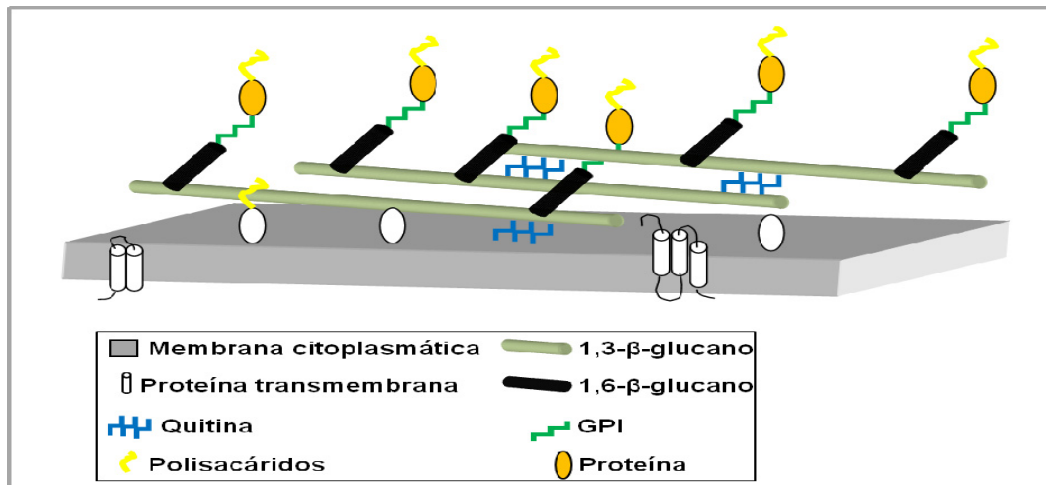


Figura 3. Estructura de la pared celular de las levaduras.

6.1. Las manoproteínas

Las manoproteínas son proteínas que se modifican por unión a oligosacáridos de dos formas, bien por N-glicosilación o bien por O-glicosilación.

- O-glicosilación

Las proteínas O-manosiladas, reciben pequeñas cadenas de manosa en el extremo hidroxilo de los residuos de serina y treonina a través de un enlace α -glicosídico con el grupo hidroxílico del carbono anomérico de la manosa. Los oligosacáridos O-ligados consisten en pequeñas cadenas de hasta 5 manosas, con los dos primeros residuos unidos por enlaces α -1,2 y los siguientes por α -1,3. A pesar del pequeño tamaño de estas cadenas de manosa, estas proteínas tienen dominios ricos en serina-treonina, por lo que el número de manosas ligadas por enlace O-glicosídico es significativo. El primer paso de la O-glicosilación ocurre en el retículo endoplasmático donde se une un único residuo de manosa que es transferido desde un precursor dolichyl-fosfato-manosa en los residuos serina/treonina mediante una O-manosiltransferasa. Los siguientes pasos tienen lugar en el aparato de Golgi y se catalizan por medio de una manosiltransferasa que utiliza el GDP-manosa como donante de manosa (Figura 4A) (Lesage & Bussey, 2006).

- N-glicosilación

El proceso de N-glicosilación comienza cuando el complejo oligosacaril-transferasa transfiere la estructura $\text{Glc}_3\text{Man}_9\text{GlcNAc}_2$ desde el dolicol fosfato a un residuo de asparragina que forme parte en la secuencia Asn-X-Ser/Thr , donde X representa cualquier residuo aminoacídico excepto la prolina. Posteriormente tres residuos de

glucosa y uno de manosa son eliminados por la actividad de la glucosidasas I y II y la manosidasa I, dando lugar a la estructura $\text{Man}_8\text{GlcNAc}_2$. Este proceso ocurre como parte del control del plegamiento de las proteínas para entrar en el aparato de Golgi (Lesage & Bussey, 2006).

Todas las glicoproteínas adquieren el mismo oligosacárido inicial en el retículo endoplasmático. Las glicoproteínas intracelulares son modificadas con cadenas que contienen de 9 a 13 residuos de manosa. Las glicoproteínas que son secretadas o que forman parte de la pared celular, son ampliamente manosiladas en el aparato de Golgi, quedando con una estructura final compuesta por una cadena de 50 residuos de manosa unida en α -1,6, que se extiende desde el núcleo de N-glicano y que tiene enlazadas cadenas de residuos α -1,2 que acaban en uniones α -1,3 ligados a residuos de manosa, formando de esta manera una estructura ramificada con hasta 200 residuos de manosa (Figura 4B) (Lesage & Bussey, 2006).

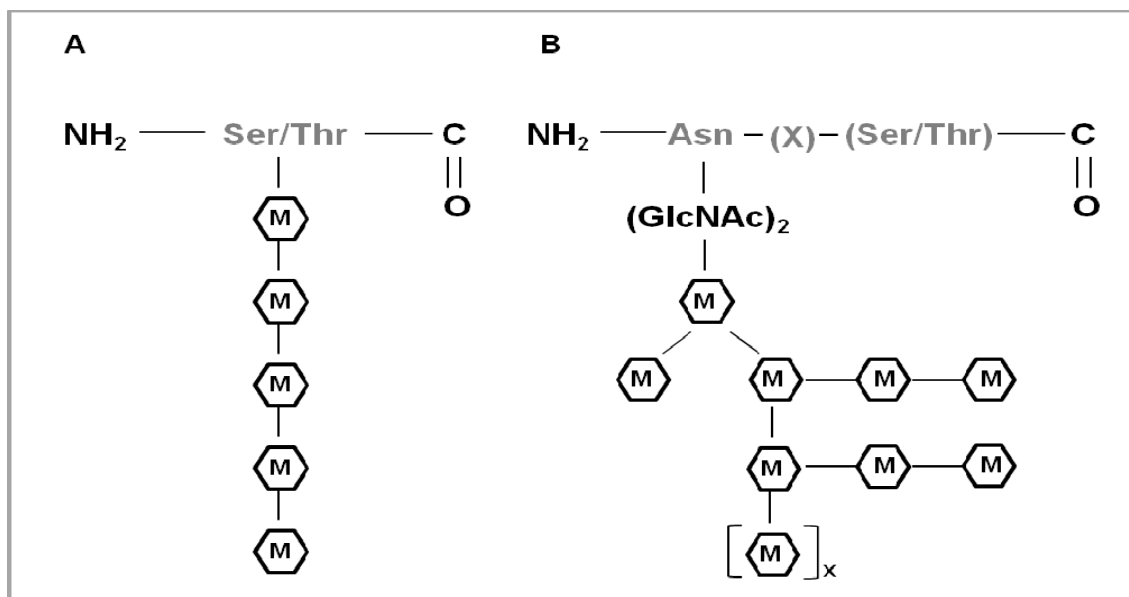


Figura 4. Patrón de glicosilación de las manoproteínas. A) O-glicosilación. **B)** N-glicosilación. Asn (Asparagina); GlcNAc (N-acetilglucosamina); M (manosa); Ser (serina); Thr (treonina).

6.1.1. Tipos de manoproteínas de la pared celular

Las proteínas de la pared celular (CWP) se dividen en proteínas ancladas al GPI (GPI-CWPs) y las proteínas PIR (PIR-CWPs). Las primeras están covalentemente ligadas al β -1,6 glucano por medio de una forma acortada del anclaje al GPI. La adquisición del anclaje al GPI ocurre en el RE, donde un anclaje pre-ensamblado es transferido al extremo C terminal de una proteína diana. Generalmente el anclaje del GPI ocurre en

los residuos N/S/G/A/D/C que se encuentran entre los últimos 40 aminoácidos del extremo C terminal. La unión del anclaje del GPI conlleva una corte proteolítico en el extremo C terminal del residuo de unión y la transamidación entre el aminoácido generado y la etanolamina-fosfato del GPI. Una vez que son exportadas se unen a las cadenas de β -1,6 glucano a través del residuo de anclaje al GPI. Como el β -1,6 glucano está unido covalentemente al β -1,3 glucano o a la quitina, esto resulta en que las GPI-CWPs están fuertemente ancladas por enlaces covalentes a la pared celular, con lo que se pueden liberar de la misma empleando β -glucanasas (Figura5) (Caro *et al.*, 1997; Molina *et al.*, 2000; Jaafar & Zueco, 2004; De Groot *et al.*, 2005; Lesage & Bussey, 2006).

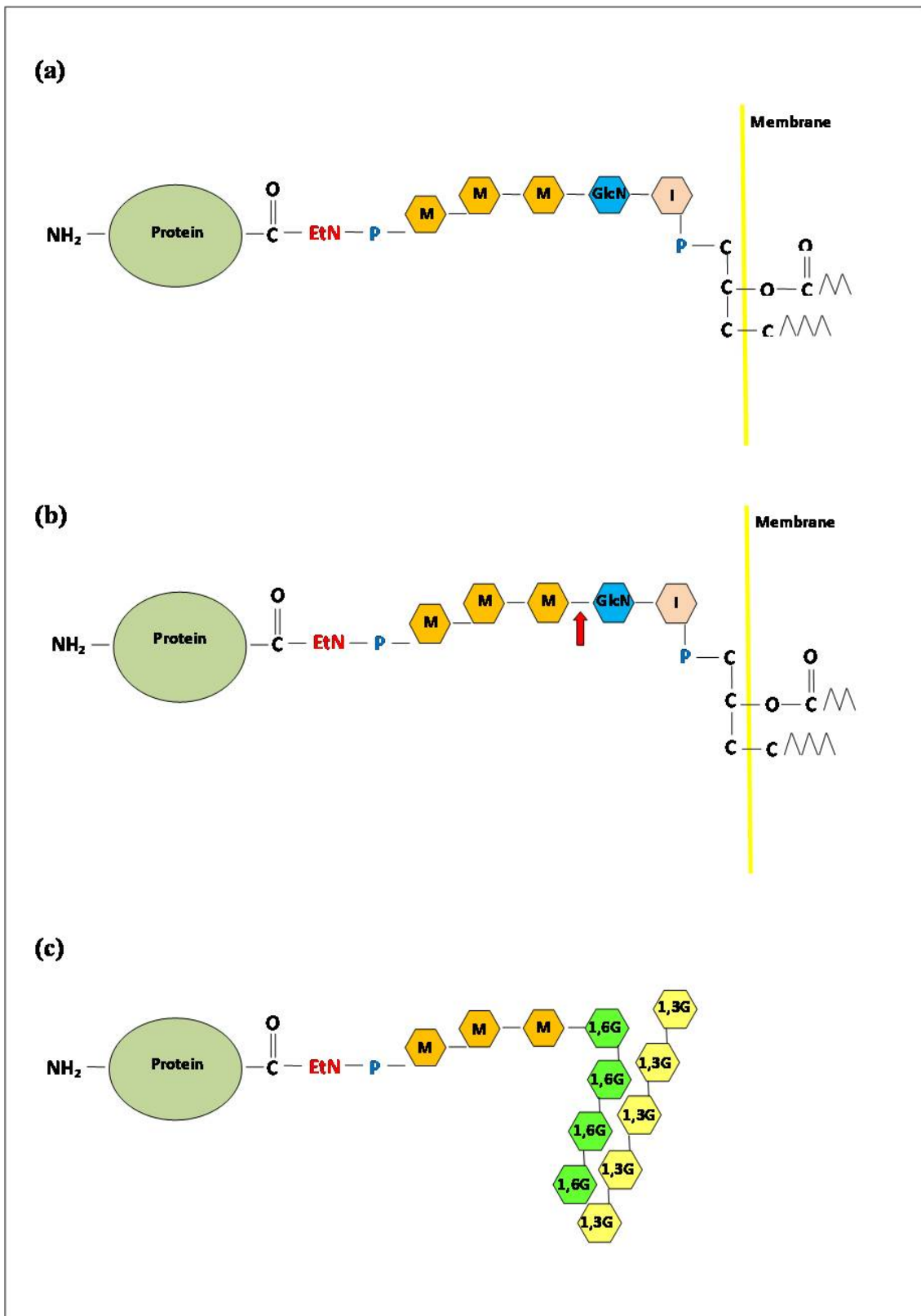


Figura 5. Unión de las proteínas de la pared celular enlazadas a GPI (CWP-GPI) con la pared celular. a) Estructura de la CWP-GPI unida a la membrana. b) Corte proteolítico del GPI. c) Unión de la CWP-GPI a la pared celular. EtN (etanolamina); GlcN (glucosamina); I (inositol); P (fosfato); M (manosa); 1,6G (1,6-β-glucano); 1,3G (1,3-β-glucano).

Las proteínas PIR-CWPs son también llamadas ASL-CWPs, ya que son proteínas de unión sensible al alkali (alkali-sensitive linkage). Son proteínas con repeticiones internas, ricas en serina/treonina, que están muy O-manosiladas. Tienen un péptido señal seguido por un punto de corte para la endoproteasa Kex2, una región interna repetitiva y un motivo basado en cisteína en el extremo C terminal. La presencia de estas proteínas unidas a β -1,3 glucano, pero que son liberadas por tratamientos alcalinos suaves, sugiere que hay un enlace glicosídico que une el β -1,3 glucano con un residuo de manosa de las cadenas O-ligadas a las proteínas PIR. También son liberadas con tratamientos con β -mercaptoetanol y con ditioteitrol, lo que demuestra que están unidas a otras proteínas de la pared celular por medio de puentes disulfuro (Molina *et al.*, 2000; De Groot *et al.*, 2005; Klis *et al.*, 2006; Lesage & Bussey, 2006).

6.1.2. Función celular de las manoproteínas

Las manoproteínas tienen diversas funciones en la célula, y muchas vienen determinadas por el patrón de glicosilación que presentan. Así, las cadenas manosa O-ligada son cortas y rígidas y están ligadas de manera cruzada con el β -1,3 glucano, jugando un papel muy importante en el fortalecimiento de la pared celular. Esto se incrementa cuando hay N-glicosilación. Las manoproteínas que están ligadas covalentemente a la pared intervienen en su porosidad, en la retención de agua, en su mantenimiento así como en la protección contra el estrés de la pared, propiedades de adhesión célula-célula, virulencia, formación de material intersticial y biofilms, antigenicidad, captación de hierro, hidrofobicidad y diversas funciones enzimáticas (De Groot *et al.*, 2005).

7. Espuma

Tanto en vinos espumosos como en la cerveza, la espuma es una de las características sensoriales más importantes ya que es percibida por el consumidor desde el momento en que se sirve y posteriormente cuando se bebe (Evans & Bamforth, 2009; Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009).

La calidad de la espuma en los vinos espumosos es provocada por la lenta liberación del CO₂ en forma de burbujas que contribuyen a la formación de una corona de espuma en la superficie de la copa de vino formada por dos o tres capas de burbujas. En los vinos espumosos la formación de la espuma tiene dos fases, una inicial en la que se forma

mucha espuma debido a la descompresión que sufre el CO₂ cuando se abre la botella, y una segunda fase en la que se produce un rápido colapso de la espuma quedando como un anillo en el borde de la copa (Suarez-Lepe & Iñigo-Leal, 2003; Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009) Para formar la espuma de la cerveza es necesario un cierto grado de supersaturación en CO₂, además de que exista un punto de nucleación, típicamente una superficie rugosa, en la que se forme la burbuja. La calidad de la espuma de la cerveza está determinada por la estabilidad de manera que para que se considere que tiene una espuma de calidad, ésta debe ser estable, no colapsarse rápidamente, y dejar anillos a medida que se va consumiendo (Hornsey, 1999; Senée *et al.*, 1999, Lewis & Bamforth, 2006).

A pesar de ser uno de las características organolépticas más importantes, dependiendo del momento en el que aparezca, la espuma puede ser un factor perjudicial cuando ésta se produce durante la fermentación de los mostos. Así, un exceso de espuma causada por determinadas cepas de levaduras durante las fases tempranas de la fermentación puede resultar en una pérdida de mosto, o reducir la capacidad del tanque de fermentación. Debido a ello hay que dejar un volumen del tanque de fermentación, alrededor de un 5 %, vacío que será ocupado por la espuma. Esto supone una mayor inversión en equipos que se utilizan durante un corto periodo de tiempo al año. La aparición de una capa gruesa de espuma durante las fases tempranas de la fermentación puede provocar una ralentización de la misma e incluso su detención total debido a la pérdida de azúcares (Edwards *et al.*, 1982; Pretorius, 2000). Además, el exceso de espuma durante la fermentación puede resultar en la pérdida de higiene y va a comprometer en el caso de la cerveza las operaciones de “fitting” en la superficie de la cuba como consecuencia de la pérdida del CO₂ con la espuma que cae fuera de la cuba. Es más, la pérdida de compuestos espumantes como los polipéptidos hidrofóbicos que van unidos a la espuma que se pierde, tiene como consecuencia una disminución en la capacidad espumante de la cerveza (Kordialik-Bogacka & Ambroziak, 2007).

La sobreproducción de espuma se solventa empleando sustancias antiespumantes autorizadas como es la silicona y ácidos grasos esterés. Otra estrategia empleada para reducir la formación de espuma es la disminución de los niveles de oxígeno disuelto en los cultivos de levaduras ya que una elevada aireación durante las fases iniciales de los cultivos favorece la superproducción de espuma por parte de las levaduras. La presión también es empleada para evitar la superproducción de espuma (Hough *et al.*, 1982;

Kordialik-Bogacka & Ambroziak, 2004). La obtención de cepas de levadura no productoras de espuma durante la fermentación es uno de los objetivos de la industria (Pretorius, 2000).

7.1. Formación de la espuma

La espuma es un sistema de dos fases que consiste en burbujas de gas separadas por finas películas de líquido llamada fase lamelar (Figura 6A). En los alimentos, la espuma es un sistema complejo que incluye una mezcla de gases, líquidos, sólidos y surfactantes.

El conocimiento del proceso de formación de la espuma es importante para poder mejorar o bien para evitar su producción. La espuma se forma cuando una burbuja de gas, CO₂ producido durante la fermentación en bebidas alcohólicas, queda retenida dentro de la fase lamelar. Las propiedades de las interfases gas/líquido de las paredes son las responsables de la formación o la ruptura de la burbuja. La distribución por tamaños de las burbujas en la espuma influye en la apariencia y textura de la misma. Así, una distribución uniforme de las burbujas de aire de pequeño tamaño confiere cuerpo y suavidad a la espuma (Wilde & Clarck, 1996; Zayas, 1997).

La espuma tiene una gran área interfacial que la hace inestable debido a que la tensión superficial tiende hacia un valor mínimo, favoreciendo el colapso de la espuma. La estabilidad de la espuma se recupera mediante dos mecanismos, uno es propio del surfactante y otro de las proteínas. Para restablecer el equilibrio, los surfactantes migran rápidamente hacia las regiones más delgadas de las paredes de la burbuja, contra gradiente en la tensión superficial. Por el contrario, las proteínas se unen a la interfase e interaccionan con otras por medio de uniones electrostáticas, hidrofóbicas, puentes de hidrógeno y enlaces covalentes que formaran una capa viscoelástica fuerte que puede resistir los estiramientos y amortiguar las fluctuaciones en el espesor de la película (Figura 6B). Para una estabilización efectiva es esencial que las proteínas interaccionen unas con otras y no queden libres difundiendo así en el plano de la interfase (Wilde & Clarck, 1996).

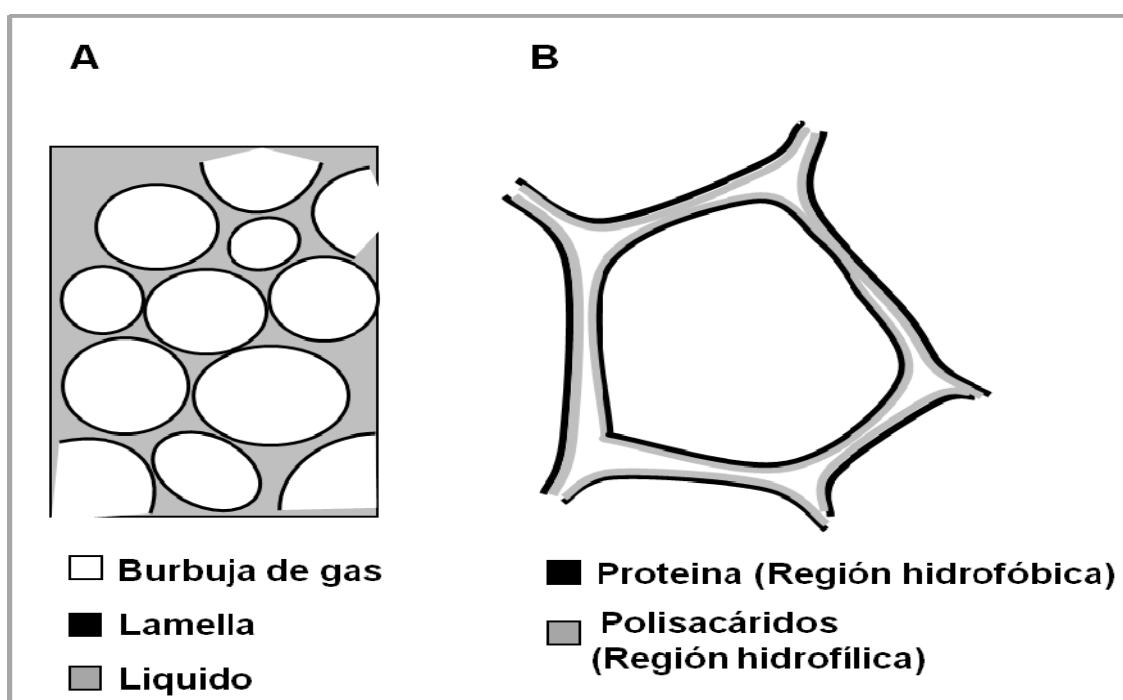


Figura 6. Estructura de la espuma. A) Distribución de las burbujas de gas en la espuma. B) Distribución de las glicoproteínas alrededor de la burbuja de gas.

7.2. Proteínas espumantes

La calidad de la espuma viene determinada por diversos factores, como la variedad de uva en el caso de los vinos espumosos o la variedad de cebada o de trigo en caso de la cerveza, la cosecha y también los procesos tecnológicos a que se someten los mostos y que van a afectar a la composición química del producto final (Andrés-Lacueva *et al.*, 1996; Depraetere *et al.*, 2004). Las bebidas alcohólicas son sistemas multicomponentes que además de proteínas y alcohol contienen otras macromoléculas, muchas de ellas con actividad superficial por sí mismas o bien por interacción con otras. Por este motivo se han realizado estudios para determinar cuáles son los compuestos con mayor capacidad espumante en bebidas espumosas y se ha observado que en el caso de los vinos espumosos las macromoléculas con mayor capacidad espumante son las glicoproteínas (Senée *et al.*, 1999; Moreno-Arribas *et al.*, 2000; Douglas *et al.*, 2006).

7.2.1. Proteínas espumantes en el vino

Las proteínas son cuantitativamente los componentes minoritarios presentes en los vinos, responsables de muchos fenómenos como la estabilización de la espuma en los vinos espumosos, la reducción de la turbidez en los blancos, la interacción con compuestos aromáticos y la protección frente a la precipitación tartárica. Las proteínas

procedentes de las uvas pueden tener un efecto negativo como productoras de turbidez (Brissonet *et al.*, 1991; Waters *et al.*, 1992; Waters *et al.*, 1994; Lubbers *et al.*, 1994; Andrés-Lacueva *et al.*, 1996a; Moine-Ledoux *et al.*, 1997; Dambrouck *et al.*, 2003). La espuma es un carácter altamente influenciado por la presencia de proteínas, ya que éstas juegan un papel muy importante en su estabilización y como surfactantes en productos alimenticios (Brissonet & Maujean, 1991; Brissonet & Maujean, 1993; Puff *et al.*, 2001; Murray *et al.*, 2004).

El contenido proteico del mosto y del vino no es equiparable debido a que durante el proceso de vinificación ocurren procesos proteolíticos así como cambios de pH, lo que provoca la desnaturalización de las proteínas (Murphy *et al.*, 1989; Ferreira *et al.*, 2002; Dambrouck *et al.*, 2003). Las proteínas presentes en el vino, a una concentración entre 4 y 20 mg/l, son altamente resistentes a la proteólisis y al bajo pH (Waters *et al.*, 1992; Marchal *et al.*, 1996; Ferreira *et al.*, 2002).

Las proteínas del vino pueden tener su origen tanto en las uvas como en las levaduras, que liberan mayoritariamente manoproteínas y proteasas (Feuillat, 2003; Palmisano *et al.*, 2010). Tienen un tamaño muy variable (desde 10 KDa hasta 100 KDa) (Péron *et al.*, 2000). Las proteínas procedentes de la uva presentan un tamaño entre 14 KDa y 60 KDa. Las glicoproteínas son la fracción mayoritaria entre aquellas que presentan un tamaño desde los 25 KDa hasta los 60 KDa y con un pI cercano a 3.9 (Marchal *et al.*, 1996). En el caso de las proteínas procedentes de las levaduras, la mayoría son glicoproteínas implicadas en el ensamblaje y desensamblaje de la pared celular y en el proceso catabólico de los lípidos (Palmisano *et al.*, 2010).

Se han realizado numerosos estudios sobre el aislamiento y caracterización de las manoproteínas de levaduras presentes en el vino. Así, Waters *et al.*, (1994) aislaron una manoproteína con un elevado peso molecular de 420 KDa, de la cual el 30% era proteína y el 70 % restante correspondía a residuos de azúcares, de los cuales el 98% eran manosas y el 2% glucosas. Gonçalves *et al.*, (2002) encontraron en un vino blanco tres grupos de manoproteínas de 53.4 KDa, 252 KDa y 560 KDa. Su análisis permitió diferenciar dos fracciones; la fracción I contenía aquellas manoproteínas de mayor peso molecular y cuyos residuos azúcar eran mananos puros asociados a la fracción proteica (10.3 %); la fracción II correspondía con las manoproteínas de menor tamaño con un 87.5 % de su peso de residuos manosa, un 2.5 % de proteínas y el resto correspondiente

a otro tipo de azúcares. Dambrouck *et al.*, (2003) empleando anticuerpos de levaduras en vino, detectaron una fracción que se correspondía con manoproteínas de tamaño entre 20 y 100 KDa.

Las glicoproteínas han sido identificadas como las macromoléculas dominantes en la espuma de los vinos espumosos. Esto es debido a la naturaleza hidrofóbica de las glicoproteínas, que favorece la unión de estas a las burbujas de gas; así, los glucanos hidrofílicos se localizarán en la capa acuosa entre las burbujas y la región hidrofóbica correspondiente a la región proteica se situará hacia la cara interior de la burbuja. Esta disposición provoca que cuando la capa acuosa se hace más fina, las glicoproteínas aumenten la viscosidad retardando el drenaje. Se produce así un aumento de la tensión superficial de las burbujas y, con ello, un aumento de la estabilidad de la espuma (Marchal *et al.*, 1996; Hornsey, 1999; Senée *et al.*, 1999; Flanzy, 2003; Dambrouck *et al.*, 2005; Núñez *et al.*, 2006). A este fenómeno se debe la capacidad de flotación de ciertas cepas de *S. cerevisiae* hasta la superficie del mosto en fermentación favoreciendo la formación y estabilización de la espuma. Esta capacidad de producir espuma en estas cepas ha sido atribuida a la capacidad de las proteínas de la pared celular, y sobre todo de las manoproteínas, para adherirse a las burbujas de CO₂ (Chiavari *et al.*, 2000).

El origen de las glicoproteínas presentes en el vino es el mismo que el del resto de proteínas, es decir, las uvas y las levaduras. A pesar de que se conoce que un gran número de glicoproteínas procedentes de las uvas están implicadas en la producción de espumas, solamente una ha sido identificada: la invertasa vacuolar de la uva, que es la enzima responsable de la conversión de la sacarosa en glucosa y fructosa, y es una de las proteínas más abundantes en el vino, así supone entre 9 % - 14 % del contenido proteico total de los vinos Chardonay (Puff *et al.*, 2001; Dambrouck *et al.*, 2005; Jégou *et al.*, 2009). La invertasa de la uva es una N-glicoproteína con un peso molecular rondando los 65 KDa y un pI de 3.9, que mantiene su actividad enzimática en el vino y que es muy hidrofóbica lo que es característico de las glicoproteínas productoras de espuma. Además se ha observado que un descenso significativo en el contenido de invertasa supone un descenso en la capacidad de producción de espuma en los vinos (Dambrouck *et al.*, 2005).

Las levaduras son una gran fuente de glicoproteínas espumantes, especialmente en los vinos espumosos (Senée *et al.*, 1999; Moreno-Arribas *et al.*, 2000). Las glicoproteínas

procedentes de las levaduras son principalmente manoproteínas de la pared celular que son liberadas al vino durante la fermentación como consecuencia de la acción de la enzima β -1,3 glucanasa durante la fermentación cuando las levaduras están creciendo activamente, este proceso hidrolítico está controlado por la célula madre y permite la emergencia de la yema (Giovani & Rosi, 2007). Durante la autólisis las glicoproteínas y los polisacáridos de la pared celular de las levaduras son hidrolizados por las glucanasas que actúan sobre enlaces de los glucanos de la pared celular liberando las manoproteínas que estaban enlazadas covalentemente a estos glucanos (Charpentier & Freyssinet, 1989; Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009). Así pues, las proteínas estabilizadoras de espuma pueden tener su origen tanto en las uvas (invertasa) o en las levaduras (las manoproteínas) (Andrés-Lacueva *et al.*, 1996b; Nunez *et al.*, 2005; Núñez *et al.*, 2006; Martínez-Rodríguez & Pueyo, 2009; Cilindre *et al.*, 2010).

Existen numerosos estudios que relacionan el descenso de macromoléculas y proteínas con el descenso en la espumabilidad de los vinos. Así, los vinos tratados con bentonita tienen menos cantidad de manoproteínas y se observa una disminución de las propiedades superficiales y espumantes de las proteínas (Péron *et al.*, 2000). También disminuye la espumabilidad cuando se utilizan tratamientos de clarificación para reducir el contenido proteico (Puig-Deu *et al.*, 1999). Se vio que cuando se añadían enzimas hidrolíticas al mosto o al vino existía una correlación entre la disminución del contenido proteico de los vinos y su capacidad generadora de espuma (Lao *et al.*, 1996; Lao *et al.*, 1999). Finalmente, existen diversos trabajos en los que la disminución de la espuma se relacionó con el contenido en etanol, SO₂, y la acidez total de los vinos, ya que tanto el etanol como la acidez alteran las propiedades hidrofóbicas de las proteínas, mientras que el SO₂ tiene un efecto desnaturalizante (Brissonet & Maujean, 1993; López-Barajas *et al.*, 1997; Senée *et al.*, 1999; Girbau-Solá *et al.*, 2002).

Diversos estudios han demostrado la relación positiva que existe entre las proteínas, los polisacáridos y la calidad de la espuma, pero también, se ha comprobado que los vinos espumosos tienen un tiempo óptimo de envejecimiento desde el punto de vista de la calidad de la espuma, a partir del cual ésta se ve mermada (Pueyo *et al.*, 1995; Andrés-Lacueva *et al.*, 1996a; Moreno-Arribas *et al.*, 2000). Núñez *et al.* (2005) empleando cepas autolíticas mutantes de *S. cerevisiae* mejoraron las propiedades espumantes del vino en un periodo de tiempo más corto de lo normal gracias al proceso de autólisis

acelerada. Además observaron que el polisacárido mayoritario liberado por las levaduras era la manosa, y así como que cuando se empleaban cepas autolíticas, las cantidades de manosa eran mayores junto con una mejor calidad de la espuma. En un trabajo posterior, Nuñez *et al.* (2006) enriquecieron el vino con un extracto de pared celular de levadura, compuesto por manoproteínas de peso molecular entre 10 KDa y 21.5 KDa, consiguiendo mejorar la calidad y la estabilidad de la espuma debido a los dominios hidrofóbicos e hidrofílicos de las proteínas.

7.2.2. Proteínas espumantes en la cerveza

El origen de las proteínas de la cerveza es diverso, pueden proceder de la cebada y otros cereales como el trigo, del lúpulo, o de la levadura. La mayoría de las proteínas presentes en la cerveza se encuentran en forma de polipéptidos de tamaño variable, desde 10 KDa hasta 100 KDa, y en una concentración aproximada de 500 mg/l. Sin embargo, debido al complejo proceso de elaboración de la cerveza, que incluye malteado, macerado, cocción, y fermentación, se produce la hidrólisis de los polipéptidos y proteínas, por lo que hay poca variedad de polipéptidos (Leiper *et al.*, 2003a). Las proteínas presentes en la cerveza están glicosiladas en distintos grados, y se clasifican en tres grupos en función de que actúen como promotoras de turbidez en la cerveza, como estabilizadores de la espuma, y aquellas que no tienen ningún papel en la estabilidad ni en la física de la espuma (Leiper *et al.*, 2003b).

Existen tres grupos mayoritarios de proteínas implicadas en la producción y estabilización de la espuma de la cerveza, la proteína Z es un polipéptido de 40 KDa, la proteína LTP1 (lipid transfer protein) de 9.7 KDa, y un tercer grupo de polipéptidos derivados de las hordeínas con tamaños comprendidos entre 10 KDa y 30 KDa, todos ellos procedentes de la cebada (Hejgaard, 1977; Asano *et al.*, 1982; Sørensen *et al.*, 1993; Leiper *et al.*, 2003a,b).

La proteína LTP1, de 91 aminoácidos, se origina en la aleurona de la cebada donde se expresa en los estadios finales de desarrollo del grano y en los primeros momentos de la germinación (Mundy & Rogers, 1986; Skiver *et al.*, 1992). Esta proteína se encuentra concentrada en la espuma de la cerveza y mediante ELISA se ha determinado que constituye el 1% de la proteína procedente de la malta (Evans & Hejgaard, 1999). La proteína LTP1 sufre modificaciones durante el proceso de hervido que aumentan su potencial espumante (Bech *et al.*, 1995). La proteína LTP1 parece tener diferentes

modos de acción en relación con la calidad de la espuma. Cuando es aislada la LTP1 de la cerveza es un excelente formador de espuma pero no es un buen estabilizador, sin embargo sus propiedades estabilizadoras se incrementan sustancialmente cuando se combina con hordeínas de bajo peso molecular o bien la fracción de espuma de alto peso molecular en la que se encuentra la proteína Z (Sørensen *et al.*, 1993; Douma *et al.*, 1997). El papel de la proteína LTP1 en la estabilización de la espuma no está claro ya que existen discrepancias entre distintos estudios, así Bech *et al.* (1995) observaron que aumentando la cantidad de LTP1 se mejoraba la estabilidad de la espuma cuando empleaban un sistema digital de análisis de la espuma, a la misma conclusión llegaron Lusk *et al.* (1995) empleando test de análisis constante de la espuma. Sin embargo, Evans *et al.* (1999) empleando el sistema Rudin obtuvieron resultados ambiguos que establecían relaciones positivas, negativas o ninguna relación entre la espuma y la proteína Ltp1. Estas discrepancias entre ensayos se explican gracias a la actividad de la Ltp1 uniéndose a los lípidos, de manera que la estabilidad de la espuma varía en función del nivel de desnaturalización de la proteína LTP1 durante el hervido ya que se reduce la habilidad de ésta para unirse a los lípidos que de otra manera están libres desestabilizando la espuma (Van Nierop *et al.*, 2004).

La proteína Z fue la primera proteína específica propuesta como promotora de la estabilización de la espuma (Kaersgaard & Hejgaard, 1979). La proteína Z se origina en la albumina de la cebada y constituye el 2% del total de proteínas presentes en la cerveza. La proteína Z tiene dos isoformas, la proteína Z4 y la proteína Z7, aunque en la cerveza la proteína Z4 es dominante, además es la proteína presente en la cerveza que posee una mayor elasticidad y viscosidad superficial, sin embargo no es tan abundante en la espuma como la proteína LTP1 (Yokoi *et al.*, 1989; Maeda *et al.*, 1991; Sørensen *et al.*, 1993; Evans & Hejgaard, 1999; Leiper *et al.*, 2003b). Yokoi *et al.* (1989) determinaron que la proteína Z presentaba un nivel de hidrofobicidad que le confería la propiedad de estabilizar la espuma. Sin embargo algunos estudios obtuvieron resultados contradictorios, así, Evans *et al.* (1999), observaron que no siempre el nivel de proteína Z estaba positivamente correlacionado con los valores de estabilidad de la espuma obtenidos con el aparato de Rudin. Por otra parte, Vaag *et al.* (1999) empleando una columna de inmuno-afinidad, observaron que la estabilidad de la espuma disminuía cuando la proteína Z era eliminada de la cerveza. Estos resultados contradictorios parecen ser debidos al nivel de modificación de la malta, de manera que cuando la malta

está poco modificada la contribución de la proteína Z a la estabilidad de la espuma es baja, mientras que cuando la modificación de la malta es mayor también aumenta la contribución a la estabilización de la espuma por parte de la proteína Z (Evans *et al.*, 1999). Bamforth (2004) explica la influencia de la modificación de la malta sobre la proteína Z como una consecuencia de la hidrólisis de las hordeínas, ya que éstas al estar hidrolizadas excluyen a las albúminas como la proteína Z.

Las hordeínas son las principales proteínas de almacenamiento de la cebada, son insolubles en agua y solo se vuelven solubles cuando están hidrolizadas (Evans & Bamforth, 2009). Son un grupo muy diverso que se solubiliza al interactuar con las proteasas lo que genera un gran número de promotores de espuma. Sheehan & Skerritt (1997), empleando anticuerpos monoclonales identificaron una banda de 23 KDa cuya concentración era mayor en la espuma sugiriendo que tenía mayor superficie activa con mayor potencial como promotor de la espuma. Vaag *et al.* (1999) identificaron otra proteína de 17 KDa que aparecía muy concentrada en la espuma y que constituía un nuevo tipo de hordeína, la épsilon-1-hordeína. En ensayos posteriores se observó que la vida media de la espuma estaba relacionada de manera significativa con la cantidad de proteína correspondiente a la combinación de la LTP1 y de la proteína de 17 KDa cuando la cerveza estaba moderadamente carbonatada pero no cuando estaba muy carbonatada. Aunque la proteína LTP1 desnaturalizada es mejor estabilizador de la espuma que las hordeínas desnaturalizadas, la situación se invierte cuando el proceso proteolítico se reduce (Kapp & Bamforth, 2002).

La relación de las levaduras en la producción y estabilización de la espuma en la cerveza no es tan importante como en los vinos espumosos, si bien son las responsables de la espuma que se produce durante la fermentación. La presencia de proteínas de levadura en la cerveza se describió en diversos estudios en los que se caracterizaron las proteínas presentes en la cerveza. Muchos de ellos tenían la finalidad de mejorar procesos tecnológicos y la calidad final de la cerveza, como son los que estudian la implicación de las manoproteínas con la eliminación de la turbidez de la cerveza o la floculación de las levaduras. Sin embargo son menos los estudios que se han llevado a cabo para detectar su presencia e implicación en la producción y estabilización de la espuma (Sørensen & Ottesen, 1978; Straver *et al.*, 1994; Sieiro *et al.*, 1995; Reboredo *et al.* 1996; Sieiro *et al.*, 1997; Dupin *et al.*, 2000; Caridi, 2006; Douglas *et al.*, 2006; Omura *et al.*, 2009; Iimure *et al.*, 2010). Mediante ensayos inmunológicos a partir de la

espuma de la cerveza se detectó por primera vez la presencia de antígenos correspondientes a proteínas de levaduras, que tenían un tamaño entre 70000 y 120000 daltons y en otros estudios aparecían en las fracciones de 200000 daltons (Hejgaard & Sørensen, 1975; Mohan *et al.*, 1992). Aunque son muchos los estudios en los que se describe la presencia de proteínas de levaduras en la espuma, la relación de éstas con la espuma no ha sido muy estudiada.

La presencia de polipéptidos hidrofóbicos en la cerveza favorece la producción y estabilidad de la espuma, y se ha demostrado que la mayor cantidad de éstos en la espuma coincide con la mayor cantidad de levaduras, y con los mayores niveles de espuma (Dixon & Kirsop, 1969; Kordialik-Bogacka & Ambroziac, 2004). La implicación de las levaduras en el mantenimiento de la espuma se estableció mediante ensayos en los que se realizaban fermentaciones de mosto sintético donde se producía la espuma artificialmente, que se mantenía estable durante más tiempo que en el mosto que no era fermentado, gracias a las manoproteínas liberadas por las levaduras al medio. En estos estudios también se establecieron diferencias en el mantenimiento de la espuma en función de la cepa empleada, con lo quedaba demostrada la implicación de las levaduras en la formación de espuma. Finalmente los estudios realizados han llegado a la conclusión de que las levaduras no contribuyen tanto la producción como al mantenimiento y la estabilización de la espuma en la cerveza (Kordialik-Bogacka & Campbell, 2000; Kordialik-Bogacka & Ambroziak, 2004; Douglas *et al.*, 2006).

La calidad de la espuma en la cerveza también está influenciada negativamente por una proteína de la levadura, la proteinasa A que es liberada por las levaduras cerveceras al medio durante la fermentación. La proteinasa A está codificada por el gen *PEP4*. Esta enzima que se localiza en las vacuolas, actúa disminuyendo la hidrofobicidad de las proteínas, por lo que afecta negativamente a calidad de la espuma. La LTP1, es una proteína muy hidrofóbica, que se encuentra en la cerveza en un proporción de 50-90 mg/L y que está especialmente concentrada en la espuma. Esta proteína actúa como un sustrato perfecto para la proteinasa A, pero solamente tras el proceso del malteado, ya que en su forma nativa es resistente a la proteinasa A. Cuando la LTP1 es hidrolizada, la calidad de la espuma se ve perjudicada (Ormrod *et al.*, 1991; Sørensen *et al.*, 1993; Leisegang & Stahl, 2005; Stewart *et al.*, 2006).

7.3. Genes espumantes en levaduras

La pared celular de las levaduras ha sido objeto de estudio desde hace décadas, aunque no fue hasta finales de la década de los 90 cuando se estableció exactamente su estructura y las interacciones entre los componentes de la misma (Kóllar *et al.*, 1997; Lipke & Ovalle, 1998). Actualmente muchos estudios están enfocados hacia la identificación de las proteínas que forman parte de la pared celular, la identificación de estas proteínas ha progresado sobre todo desde que se conoce el genoma de la levadura *Saccharomyces cerevisiae*, ya que muchas proteínas han sido identificadas in silico en base a motivos típicos de las proteínas de la pared celular como son los péptidos señal o las secuencias correspondientes al punto de anclaje al GPI (Caro *et al.*, 1997; Terashima *et al.*, 2002; Coronado *et al.*, 2007). Hasta el momento se han identificado múltiples proteínas de la pared celular de *S. cerevisiae*, de éstas 14 han sido reconocidas como manoproteínas y solamente 1 de ellas implicada en la producción de espuma, la proteína Awa1p, procedente de una cepa fermentadora de sake.

Kasahara *et al.* (1974) identificó por primera vez los genes de un cepa de sake de *S. cerevisiae* responsables del carácter espumante, a partir de ensayos de hibridación entre cepas no espumantes y cepas espumantes, así llegó a la conclusión de que este carácter debía estar determinado por al menos dos genes. Thornton (1978a,b), estudió el carácter espumante en una cepa vínica de *S. cerevisiae*, y mediante técnicas de hibridación de tétradas estableció que el carácter espumante estaba determinado dos genes, *FRO1* y *FRO2*, situados a una distancia el uno del otro de 21 centimorgans en el cromosoma VII. Concluyó que eran dominantes y que eran genes no aditivos, de manera que aunque hubiese varias copias la cantidad de espuma obtenida era la misma. Además estableció que estos genes eran alélicos de otros dos genes presentes en las cepas de sake (Kasahara *et al.*, 1974; Thornton, 1978a, b).

Un nuevo gen implicado en la producción de espuma fue aislado a partir de la cepa de sake K7 de *S. cerevisiae*. Este gen llamado *AWA1*, codifica para la proteína Awa1p que ha sido clasificada como una manoproteína con punto de anclaje al GPI que confiere hidrofobicidad a la superficie celular, de manera que favorece el mantenimiento de la espuma al adsorberse a la superficie de las burbujas. La implicación de esta proteína en la espuma quedó demostrada cuando al deleccionar el gen se observaba que el nivel de

Introducción

espuma que se producía al fermentar era menor que cuando se utilizaba la cepa silvestre (Shimoi *et al.*, 2002; Miyashita *et al.*, 2004).

Objetivos

- Obtención de cepas heterotáticas competentes para la conjugación a partir de la cepa vínica 145A211 de *Saccharomyces cerevisiae* y de la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces pastorianus*.
- Identificación y estudio de los genes responsables de la producción de espuma en las bebidas fermentadas, presentes en la cepa vínica 145A211 de *Saccharomyces cerevisiae* y de la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces pastorianus*.

Materiales y Métodos

1. Microorganismos, medios de cultivo, plásmidos y oligonucleótidos utilizados.

1.1 Microorganismos.

1.1.1. Cepas de levadura

Tabla 1: Cepas de *Saccharomyces cerevisiae*

| Cepa | Genotipo | Espuma | Origen |
|---------------------------------|--|--------|------------------|
| 145 | <i>Vinica, silvestre</i> | + | Este laboratorio |
| 145A211 | <i>Vinica, MATa/MATα, HO/HO, FPG1</i> | + | Este estudio |
| SC22 | <i>MATa, hoΔ</i> | + | Este estudio |
| SCH2 | <i>MATa, hoΔ, fpg1::FPG1-loxPKanMXloxP</i> | - | Este estudio |
| DHA6C | <i>MATa/MATα, HO/HO, fpg1::FPG1-loxPKanMXloxP</i> | - | Este estudio |
| DHA2-16 | <i>MATa/MATα, HO/HO, fpg1Δ</i> | - | Este estudio |
| DHA2-16 <i>ura</i> ⁻ | <i>MATa/MATα, HO/HO, fpg1Δ, uraΔ</i> | - | Este estudio |
| MI2B | <i>MATα, ura3-52, trp1</i> | - | Benítez T |
| MI2B-pYES2 | <i>MATα, trp1, pYES2</i> | - | Este estudio |
| MI2B-FPG1 | <i>MATα, trp1, pYES2-FPG1</i> | - | Este estudio |
| MI2B-CFG1 | <i>MATα, trp1, pYES2-FPG1</i> | - | Este estudio |
| CSH84L | <i>MATα, spo11, ura3, can1, cyh2, ade2, his7, hom3</i> | - | Benítez T |
| CSH88L | <i>MATα, spo11, ura3, his2, leu1, lys1, met4, pet18</i> | - | Benítez T |
| CSH89L | <i>MATa, spo11, ura3, adel, his1, leu2, lys7, met3, trp5</i> | - | Benítez T |

Benitez T. Universidad de Sevilla. Departamento de genética.

Tabla 2: Cepas de *Saccharomyces pastorianus*

| Cepa | Genotipo | Espuma | Origen |
|---------------------------------|---|--------|----------------------|
| Weihenstephan 34/70 | <i>Cervecera tipo Lager, silvestre</i> | + | Hijos de Rivera S.A. |
| SP5 | <i>MATa, hoΔ</i> | + | Este estudio |
| SPH5 | <i>MATa, hoΔ, cfg1::FPG1-loxPKanMXloxP</i> | - | Este estudio |
| SPDHA1 | <i>MATa/MATα, HO/HO, cfg1::FPG1-loxPKanMXloxP/cfg1::FPG1loxPKanMXloxP</i> | - | Este estudio |
| SPDHA1b | <i>MATa/MATα, HO/HO, cfg1Δ</i> | - | Este estudio |
| SPDHA1b <i>ura</i> ⁻ | <i>MATa/MATα, HO/HO, cfg1Δ, uraΔ</i> | - | Este estudio |

1.1.2 Cepas bacterianas

Tabla 3: Cepas de *Escherichia coli*

| Cepa | Genotipo | Origen |
|-------|---|------------|
| TOP10 | $F^- mcrA\Delta(mrrhsdRMSmcrBC)\Phi80lacZ$ $\Delta lacX74recA1araD139\Delta(araleu)7697galUgalK$ $rpsL(Str^R)endA1nupG$ | Invitrogen |

1.2. Medios de cultivo

1.2.1. Cultivo de bacterias

- **Medio Luria Broth (LB)**

| | |
|---------------------------|------|
| Triptona | 1% |
| Extracto de levadura | 0.5% |
| Cloruro sódico | 1% |

Cuando se hizo medio sólido se añadió agar al 2%. El medio se esterilizó en el autoclave con un ciclo de 20 min a 121°C. Cuando fue necesario el medio se suplementó con los siguientes antibióticos: Ampicilina (50µg/ml) y Kanamicina (50µg/ml).

1.2.2. Cultivo de levaduras

- **Medio YPD**

| | |
|---------------------------|----|
| Extracto de levadura | 1% |
| Peptona | 2% |
| Glucosa | 2% |

Cuando se empleó medio sólido se añadió agar al 2%. El medio se esterilizó en el autoclave con un ciclo de 20 min a 121°C. Cuando fue necesario el medio se suplementó con los siguientes antibióticos: Geneticina (G418) (200µg/ml), Cycloheximida (1-2 µg/ml) para la cual se estableció la concentración mínima

inhibitoria de cada cepa y Tunicamicina (2-3 µg/ml) para la que se estableció la concentración mínima inhibitoria de cada cepa.

- **YPGal**

| | |
|----------------------|----------|
| Extracto de levadura | 1% |
| Peptona | 2% |
| Galactosa | 2% |

Cuando se empleó medio sólido se añadió agar al 2%. El medio sin galactosa se esterilizó en el autoclave con un ciclo de 20 min a 121°C. Posteriormente se añadió la galactosa previamente esterilizada por filtración.

- **Medio mínimo SD (sintético definido)**

| | |
|----------------------------------|-------------|
| YNB (yeast nitrogen base) sin aa | 0.67% |
| Glucosa | 2% |

Cuando se empleó medio sólido se añadió agar al 2%. El medio fue esterilizado en el autoclave con un ciclo de 20 min a 121°C. El medio fue suplementado con los aminoácidos requeridos en función de las necesidades de la cepa empleada.

- **Medio mínimo SC de inducción**

| | |
|---|-------------|
| YNB (yeast nitrogen base) sin aminoácidos | 0.67% |
| Galactosa | 20% |

El medio sin galactosa fue esterilizado con un ciclo de 20 min a 121°C, y posteriormente se le añadió la galactosa previamente esterilizada mediante filtración. El medio fue suplementado con los aminoácidos requeridos en función de las necesidades de la cepa empleada.

- **Medio SPO1**

| | |
|----------------------|------------|
| Acetato potásico | 1% |
| Extracto de levadura | 0.1% |

Glucosa 0.05%

Cuando se empleó medio sólido se añadió agar 2%. El medio fue esterilizado en el autoclave con un ciclo de 20 min a 121°C.

- **Medio SOC**

Bactotriptona 2 %

Extracto de levadura 0.5 %

NaCl 10 mM

KCl 2.5 mM

MgCl₂ 10 mM

MgSO₄ 10 mM

Glucosa 20 mM

- **Mosto sintético**

Glucosa 20 %

KH₂PO₄ 0.5 %

(NH₄)₂SO₄ 0.2 %

MgSO₄·7H₂O 0.04 %

Extracto de levadura 0.1 %

Se ajustó el pH a 3.8.

1.3. Oligonucleótidos

Los oligonucleótidos empleados para realizar este trabajo junto con su secuencia aparecen en la tabla 4.

Tabla 4: Oligonucleótidos

| Nombre | secuencia 5' → 3' |
|---------------------|--|
| awa11 | ATGTTCAATCGCTTTAATAAACTTCAAGCC |
| awa12 | TTAGTTAAAGAAAGCAAGAACGAAAATACC |
| awaiF | CCACAGAATCAGGCTCATCA |
| scairiF | CTGGTGCCTATGCTTATTATC |
| FPG _{fint} | ATGTTCAATCGCTTTAATAAACTTCAAGCCGCTTTGGCTTTGACCC TTAATATAACTTCGTATAATG |
| FPG _{rint} | TTAGTTAAAGAAAGCAAGAACGAAAATACCGACCAATGCCCTAA TAACTTCGTATAGCATAAC |
| uraF | CTGCACAGAACAAAAACCTGCAGGACCCTTAATATAACTTCGTA TAATG |
| uraR | CAAATATGCTTCCCAGCCTGC CCTAATAACTTCGTATAGCATAAC |
| HO1f | AAA ACTGCAGCG ACTATTCTGATGGCTAACGG |
| HO1r | ACG CGTCCGAC GTGCCATCTGCGCACATAACG |
| HO2f | CG CGGATCCTGCG ATATCTGCAAGTATGTACCAGAAGC |
| HO2r | CC GGAAATCC ACTCTGGTCCTTTAACTG |
| loxPF | CG CGGATCCGCGG AGG TCGACA ACCCTTAATATAAC |
| loxPR | CG CGGATCCGCGG ATAT CACCTA ATAACTTCGTATAGC |
| M13F | GTAAAACGACGGCCAG |
| M13R | CAGGAAACAGCTATGAC |

Las letras en negrita se corresponden con la parte de la secuencia homóloga al casete loxP-KanMx-loxP

Las letras en cursiva indican la posición de las dianas de restricción.

Todos los oligonucleótidos fueron diseñados empleando el programa informático Vector NTI Advance 10 (Invitrogen).

1. 4. Plásmidos

1.4.1. PCR Blunt II TOPO

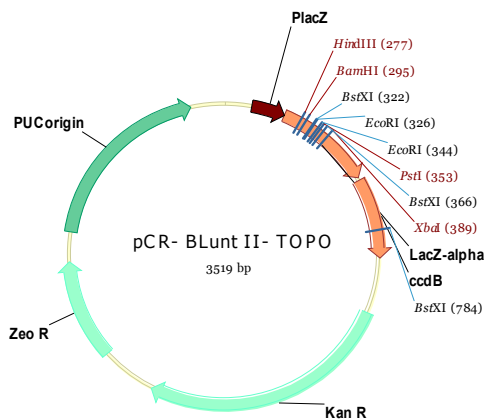


Figura 7. Dibujo esquemático del vector PCR Blunt II TOPO.

PCR BluntII TOPO (Invitrogen) (Figura 7) es vector lineal que permite la clonación directa de un inserto de ADN con extremos romos, que se unen al vector por efecto de

la DNA topoisomerasa I del virus *Vaccinia*, que une los fragmentos covalentemente en el extremo 3' de cada hebra de ADN. El inserto se une a una región que está flanqueada por dos dianas de restricción para la enzima EcoRI, lo que facilita la posterior liberación del inserto.

Este vector permite la selección directa de los recombinantes ya que el fragmento de ADN se inserta en medio del gen letal para *E. coli ccdB*, de manera que solo los recombinantes son capaces de sobrevivir. También presenta las secuencias de resistencia a la kanamicina y a la zeocina, que permiten a su vez la selección de los transformantes. Las secuencias M13, Sp6 y T7 permiten la secuenciación del inserto.

1.4.2. pUC19

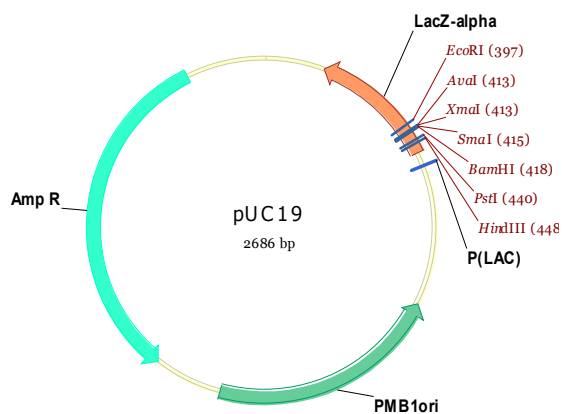


Figura 8. Dibujo esquemático del vector pUC19.

El vector pUC19 (Invitrogen) (Figura 8) contiene un gen de resistencia a la ampicilina que permite la selección de los transformantes. Los insertos clonados en el sitio de clonaje múltiple la región poli-ligadora pueden ser expresados bajo el control del promotor *lac*, inducible por IPTG. Además contiene el gen *lacZ*, que permite seleccionar por color las colonias recombinantes en medio de cultivo con X-Gal e IPTG (Yanisch-Perron *et al.*, 1985).

1.4.3. pYES2

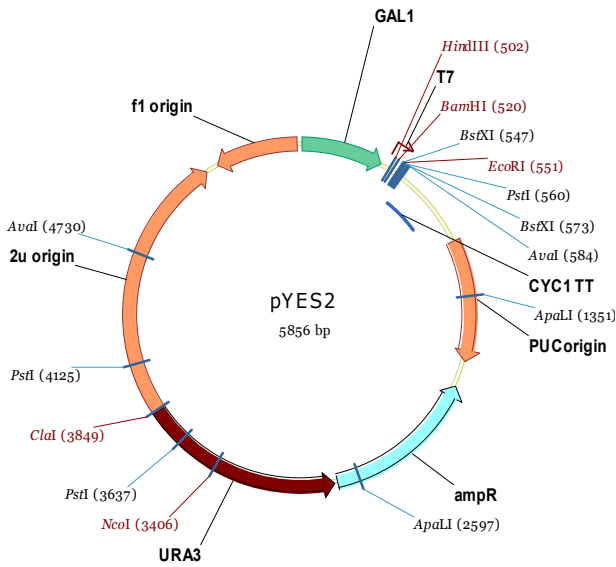


Figura 9. Dibujo esquemático del vector pYES2.

Este es un vector funcional en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, aunque ha sido diseñado para expresar proteínas en *S. cerevisiae* de manera inducible. Presenta el gen de resistencia a la ampicilina que permite la selección de transformantes de *E. coli*, y el gen URA3 que confiere la prototrofia para el uracilo, que permite seleccionar transformantes de *S. cerevisiae* que son auxótrofos ura3. Además presenta el promotor GAL1 que permite la expresión inducible por galactosa de las proteínas recombinantes, y la represión de éstas en presencia de glucosa. Tiene además un lugar de clonación múltiple y la secuencia T7 que permite secuenciar el inserto clonado. Contiene la secuencia de 2μ que permite la replicación del vector en las levaduras (Figura 9).

1.4.4. pUG6

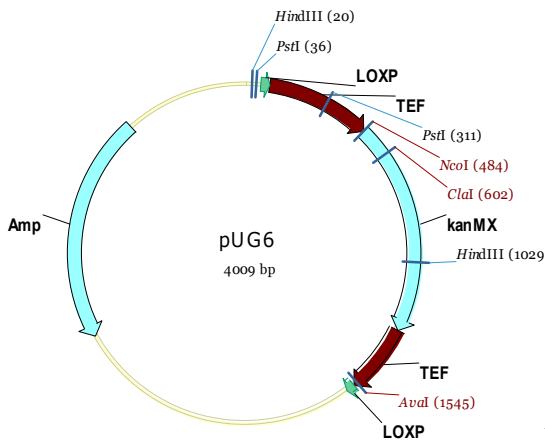


Figura 10. Dibujo esquemático del vector pUG6.

El vector pUG6 (Güldener *et al.*, 1996) (Figura 10) es funcional en *E. coli* y en *S. cerevisiae*. Contiene el casete loxP-KanMX-loxP a partir del cual por PCR se construyen casetes de interrupción de genes mediante la incorporación de secuencias homólogas al gen que se desea interrumpir flanqueando el casete loxP-KanMX-loxP. Este sistema permite la interrupción génica por recombinación homóloga sin pasos intermedios de clonación. Tiene el gen de la resistencia a la ampicilina que permite la selección de transformantes en *E. coli*. El vector contiene el gen KanMX, un heterólogo de la kanamicina, que confiere resistencia a la geneticina (G418), y que permite seleccionar las levaduras transformadas con el casete de interrupción. Contiene también las secuencias loxP que permiten la eliminación del casete loxP-KanMX-loxP empleando el sistema de la Cre recombinasa.

1.4.5. YEp351-cre-cyh

El vector YEp351-cre-cyh (Delneri *et al.*, 2000) funcional en *E. coli* y en *S. cerevisiae*, tiene el gen de la Cre recombinasa bajo el control del promotor GAL1, por lo que su expresión se induce en presencia de galactosa y se reprime en presencia de glucosa. Contiene también el gen de la resistencia a la cicloheximida que permite la selección de las levaduras transformantes en presencia del antibiótico, y el gen LEU2 que permite la selección de transformante auxótrofos para la leucina. El gen de resistencia a la ampicilina permite la selección de transformantes de *E. coli*. Además contiene a secuencia de 2 μ que permite la replicación del vector en las levaduras.

1.5. Vector de interrupción pDHO

Para la construcción de este vector se obtuvieron dos fragmentos del gen HO mediante PCR a partir del DNA genómico de *S. cerevisiae* (Figura 11). Con los oligonucleótidos HO1f y HO1r se obtuvo el fragmento HO1, de 80 pb, que se corresponde las bases 16 hasta la 96 pb del gen HO. En los extremos de dicho fragmento se incluyeron las dianas de restricción PstI(5') y Sall(3'); y con los oligonucleótidos HO2f y HO2r se obtuvo el fragmento HO2, de 137 pb, correspondientes con la secuencia comprendida entre las bases 1572 hasta la 1654 pb del gen HO, flanqueado por las dianas de restricción BamHI y EcoRV (5') y EcoRI (3').

A partir del plásmido pUG6 se obtuvo el casete de resistencia a la G418, loxP-KanMX-loxP, que fue amplificado por PCR empleando los oligonucleótidos loxP1 y loxP2 que tenían las dianas de restricción en BamHI y Sall y BamHI y EcoRV respectivamente.

Los fragmentos HO1 y HO2 fueron digeridos con las enzimas de restricción PstI en el primer caso y con EcoRI en el s, y se insertaron en los puntos correspondientes del vector pUC19 dando lugar a la construcción pHO12. Posteriormente pHO12 fue digerido con la enzima BamHI y EcoRV. El casete de interrupción loxP-KanMX-loxP también se digirió con BamHI y EcoRV y posteriormente se ligó al vector pHO12 en esta diana, entre los fragmentos HO1 y HO2, dando lugar al vector de interrupción pDHO.

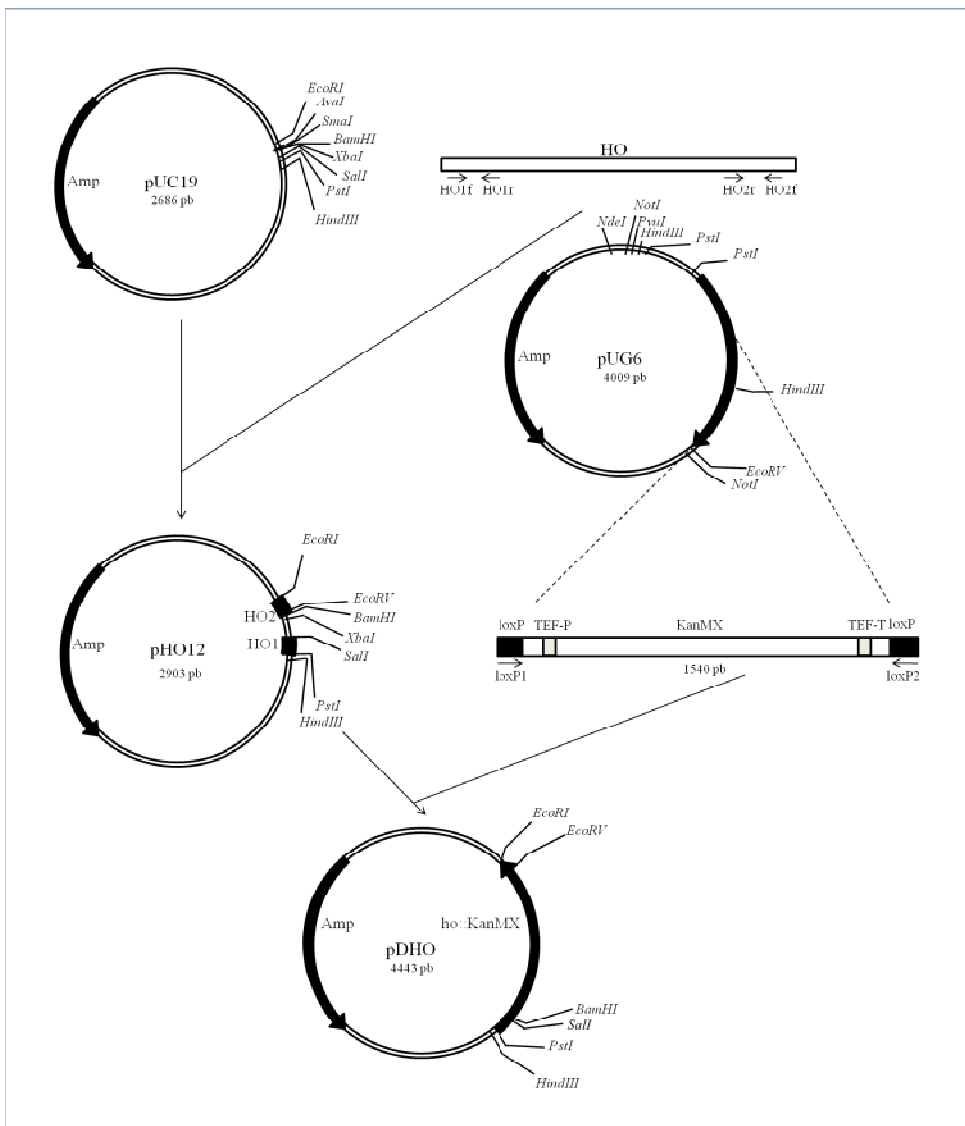


Figura 11. Esquema de la construcción del vector pDHO.

2. Técnicas de manipulación de DNA

2.1. Extracción de ADN

2.1.1. Extracción de ADN plásmidico de *E. coli*

Mini Prep

La obtención de ADN plasmídico a pequeña escala se realizó a partir de 1,5 ml de cultivo, mediante el método de Birnboim y Doly (1979) y con la resina Miniprep ExpressTM Matrix (MP Biomedicals), siguiendo las instrucciones del fabricante.

Midi Prep

La obtención de ADN plasmídico se realizó mediante el kit comercial Plasmid Midi Kit (Qiagen), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.1.2. Extracción de ADN genómico de levaduras

Para realizar la extracción de ADN genómico de la levadura se utilizó el kit Genomic Purification Kit (Promega) y se siguieron las instrucciones del fabricante.

2.2. Digestión enzimática del ADN

La digestión del ADN se realizó mediante el empleo de enzimas de restricción comerciales (Takara) siguiendo las recomendaciones del fabricante. Cuando se realizaron digestiones dobles y el tampón de los enzimas no era compatible, la digestión se realizaba primero con una, se purificaba empleando el kit comercial “Ilustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) y se realizaba la segunda digestión.

Las digestiones se realizaron empleando 1U de enzima, 1 µl de ADN, 2 µl del tampón 10X correspondiente a la enzima (en el caso de digestiones dobles se añadió un tampón compatible para ambas enzimas), y se añadió agua milliQ hasta alcanzar un volumen de 20 µl. La mezcla de digestión se incubó durante 1-2 h a 37°C.

Las enzimas de digestión se inactivaron en un baño a 65°C o a 80°C, en función de cada enzima, durante 15 min.

2.3. Defosforilación del ADN

Con la finalidad de evitar que los plásmidos linearizados con extremos romos, o bien linearizados con una única enzima que dejaba extremos cohesivos, se procedió a defosforilar los extremos de los mismos. Para ello se utilizaron 2U de la enzima “Shrimp Alkaline Phosphatase” (Takara) por cada μg de ADN, 1 μl de tampón 10X, completando el volumen con agua MilliQ hasta 10 μl .

2.4. Ligación de ADN

La ligación se realiza entre el plásmido linearizado y fragmentos de ADN obtenidos bien por digestión enzimática o bien por PCR. Para llevar a cabo la ligación los fragmentos de ADN y el plásmido se deben mezclar en una relación molar Vector/Inserto determinada. Así, a partir de 100 ng de plásmido, se añadió una cantidad determinada de inserto para tener una relación molar de 1:1, 1:2 y 1:3. Por cada reacción de ligación se empleó 1 μl de T4 DNA ligase (3U/ μl , Promega) y 1 μl de tampón de ligasa para obtener un volumen final de 10 μl .

Cuando los extremos a ligar eran romos la ligación se realizó manteniendo la mezcla de ligación a 16°C durante toda la noche, mientras que cuando los extremos eran cohesivos se realizó a 23°C durante 3 hs.

Finalmente la mezcla de ligación se empleó para transformar las células competentes.

Para realizar la ligación del inserto al vector PCR Blunt II TOPO, se realizó la mezcla siguiendo las instrucciones del kit “Zero Blunt TOPO PCR” (Invitrogen).

2.5. Amplificación del ADN

El ADN se amplificó mediante la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La mezcla de reacción de la PCR contenía los siguientes componentes: X μl de ADN, Taq Polimerasa 1.5 U, Tampón de PCR 10X, MgCl_2 2.5 mM, dNTPs 200 μM , oligonucleótidos 100 nM, H_2O hasta 50 μl .

Las polimerasas empleadas fueron:

- BIOTAQTM DNA polymerase (Bioline): Taq polimerasa con actividad exonucleasa 5'-3' que deja una “A” colgante.

- ACCUZYME™ DNA polymerase (Bioline): es una enzima con actividad polimerasa 5'-3' y actividad exonucleasa reparadora y alta fidelidad de copia, que además deja extremos romos.

Para realizar las reacciones de PCR se utilizó un Termociclador “MyCycler” (Biorad). El programa empleado fue el siguiente:

| | | |
|-------------------------------------|-------|-------------|
| Desnaturalización 95°C | 5 min | } 30 ciclos |
| Desnaturalización 95°C | 30 s | |
| Hibridación X°C | 1 min | |
| Extensión 72°C (Biotaq) 1Kb/30 s | | |
| 68°C (Accuzyme) 1Kb/min | | |
| Extensión final 72°C (Biotaq) 7 min | | |
| 68°C (Accuzyme) 7 min | | |

donde X es la temperatura de hibridación y que fue diferente para cada par de oligonucleótidos utilizado. Se estableció cuando los oligonucleótidos fueron diseñados utilizando el programa informático Vector NTI (Invitrogen) mediante el estudio de la composición nucleotídica de los mismos.

2.6. Electroforesis de ADN

2.6.1. Electroforesis en geles de agarosa

La separación, identificación y caracterización de los fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles de agarosa se prepararon a una concentración de agarosa que varió entre 0,6-1,5% (p/v) según el tamaño de los fragmentos de ADN que se deseaban separar.

La preparación de los geles y el desarrollo de la electroforesis se realizaron en tampón TAE 1M (Tris-acetato 0.04 M, EDTA 0.002 M). En los geles se incorporó Bromuro de Etidio a una concentración final de 1 mg/ml, lo que permitió visualizar el ADN en el GelDoc XR) (BioRad).

La estimación del tamaño de las bandas obtenidas tras la electroforesis se realizó mediante un marcador de pesos moleculares conocidos, “2-Log DNA Ladder” (GE Healthcare).

Las electroforesis se llevaron cabo en cubetas horizontales (BioRad) a 5V/cm, 400mA durante al menos 80 min.

2.6.2. Electroforesis en campo pulsante

Los cariotipos de las cepas de *S. cerevisiae* y de *S. pastorianus* se obtuvieron mediante la separación de los cromosomas por electroforesis en campo pulsante con un aparato CHEF-DRII (Biorad).

Los insertos conteniendo las células enteras se prepararon siguiendo el método descrito por McCluskey *et al.*, 1990.

Como marcador se emplearon los cromosomas de la cepa YNN295 (BioRad). La electroforesis se llevó a cabo en geles de agarosa al 1% en tampón TBE (89 mM Tris, 89 mM ácido Bórico, 2 mM EDTA pH 8), a una temperatura de 14°C a 200V durante 15h con un cambio de tiempo de 60 s y luego durante 8 h con un cambio de tiempo cada 90 s.

Cuando finalizó la electroforesis el gel se tiñó en tampón TBE con bromuro de etidio (1µg/ml) durante 30 min, procediendo a continuación a su visualización con luz ultravioleta en un transiluminador.

2.7. Purificación del ADN

2.7.1. Purificación a partir de geles de agarosa

El ADN correspondiente a una banda de un determinado tamaño fue recortada del gel empleando una cuchilla estéril e introducida en un vial estéril. El ADN se purificó desde los trozos de gel empleando el kit comercial “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare), siguiendo las instrucciones del fabricante.

2.7.2. Purificación desde una reacción enzimática

Para purificar el ADN desde la mezcla de PCR o desde la mezcla de digestión enzimática se utilizó el kit “Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit” (GE Healthcare) siguiendo las instrucciones proporcionadas por el fabricante.

2.8. Cuantificación del ADN

La concentración del ADN se estableció por métodos espectrofotométricos utilizando el espectrofotómetro “Nano Drop” (Thermo Scientific), a longitud de onda 260 nm.

También se estableció a partir de una imagen utilizando el programa informático GelDoc XR (Biorad).

2.9. Hibridación de ácidos nucleicos mediante Southern Blot

Se empleó el kit “DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II” (Roche Diagnostics).

2.9.1 Preparación de sondas de ADN marcadas con digoxigenina

Para obtener la sonda, 1 µg del ADN que se empleó como sonda se diluyó en 16 µl de agua destilada estéril y se desnaturalizó por calentamiento durante 10 min en un baño de agua hirviendo y rápidamente se enfrió en agua con hielo. A continuación, al ADN desnaturalizado se le añadieron 4 µl de una mezcla de nucleótidos, DIG-DUTP y enzima Klenow (DIG-High Prime). La mezcla final se incubó a 37°C durante 20 h. La reacción se paró añadiendo 2 µl de EDTA 0.2 M (pH 8.0) y manteniéndola a 65°C durante 10 min.

Para la detección de gen *FPGI* de *S. cerevisiae* se empleó un fragmento de 925 pb correspondiente a la zona comprendida entre las bases 1388 y 2313 del propio gen obtenido mediante PCR empleando los oligonucleótidos awa1F y awa12 (Tabla 3).

Para la detección del gen *CFG1* se empleó como sonda un fragmento de 1385 pb correspondientes a la zona comprendida entre las bases 2003 y 1408 del gen, que se obtuvo mediante PCR empleando los oligonucleótidos scariF y awa12.

2.9.2 Detección de las secuencias de ADN específicas

Los geles de electroforesis obtenidos por electroforesis en campo pulsante, fueron sumergidos en NaOH 0.5 M y NaCl 0.15 M durante 30 min con la finalidad de desnaturalizar el ADN. Posteriormente se neutralizaron mediante una incubación en Tris-HCl 1 M pH 7.5 y NaCl 1.5 M durante 30 min.

La transferencia del ADN a la membrana de nailon se realizó en el sistema de transferencia de vacío “VacuGene™ XL Vacuum Blot System” (Pharmacia)

Biotechnology). El gel permaneció sumergido en una solución de transferencia SSC x 20, durante 2 h a 45 mbar.

Una vez finalizado el proceso de transferencia el ADN retenido en la membrana se fijó con luz ultravioleta. Para ello la membrana se dispuso sobre papel Whatman 3MM (Whatman International Ltd), previamente humedecido con SSC x 10 y se introdujo en el aparato “UV Stratalinker 2400” (Stratagene).

La membrana se incubó en un horno Hybaid (National Labnet Company) a la temperatura de hibridación (T_{opt}). Dicha temperatura se calculó para el DNA diana en función del contenido en GC y del grado de homología con la sonda, mediante las fórmulas:

$$T_m = 49.82 + 0.41 (\% G + C) - (600/l) \text{ donde } l = \text{longitud del híbrido en pares de bases}$$

$$T_{opt} = T_m - 20 \text{ a } 25^\circ\text{C}$$

La membrana se prehibridó manteniéndola durante 30 min a la temperatura de hibridación óptima en la solución DIG Easy Hyb (10 ml/cm² de membrana) previamente precalentada a 37°C. La sonda de ADN marcada con digoxigenina se hirvió durante 5 min y rápidamente se enfrió en agua con hielo, una vez desnaturalizada se añadió a una solución de DIG Easy Hyb (3.5 ml/100 cm² de membrana) previamente precalentada. Por último se retiró la solución de prehibridación y se añadió la mezcla de solución de hibridación con la sonda a la membrana, que se incubó a la temperatura de hibridación adecuada durante toda la noche con agitación.

Una vez finalizada la hibridación, la solución de hibridación se retiró. La membrana se lavó dos veces durante 5 min con SSC x 2 y SDS 0.1% a 25°C en agitación. A continuación se hicieron dos lavados de 15 min en SSC x 0.5 y SDS 0.1% a 68°C en agitación constante.

Tras retirar la solución SSC x 0.5, la membrana se lavó en agitación durante 5 min en tampón de lavado. El tampón de lavado se retiró y se añadieron 100 ml de solución de bloqueo, donde se mantuvo durante 30 min para bloquear la hibridación inespecífica. Esta solución se descartó y la membrana se incubó con 20 ml de solución de anticuerpo durante 30 min. Finalmente se retiró esta solución y la membrana se lavó dos veces durante 15 min en 100 ml de tampón de lavado.

Para equilibrar la membrana, ésta se incubó 5 min en 20 ml de tampón de detección. A continuación se aplicó 1 ml de “CSPD ready to use” y se cubrió la membrana con la

bolsa de hibridación para extender esta solución por toda la superficie, así se mantuvo durante 5 min. Transcurrido este tiempo la bolsa se selló y se incubó durante 10 min a 37°C.

Para el revelado se utilizó una película Kodak BioMax MS. La película se colocó sobre la membrana en oscuridad durante un tiempo determinado de exposición. Tras la exposición, la película se mantuvo en la solución reveladora hasta que se hicieron visibles las bandas, y entonces se lavó durante 2-3 ss con agua para finalmente sumergirla en la solución fijadora.

Soluciones empleadas:

SSC 20X: 175 g/l de NaCl, 88.2 g/l de $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$. Ajustar a pH 7 con ácido cítrico.

SSC 2X: 17.5 g/l de NaCl, 8.82 g/l de $C_6H_5Na_3O_7 \cdot 2H_2O$. Ajustar a pH 7 con ácido cítrico.

Tampón de lavado: Tampón ácido Maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M. Ajustar a pH 7.5 y añadir Tween-20 0.3% (v/v).

Tampón ácido Maleico: ácido Maleico 0.1 M, NaCl 0.15 M. Ajustar a pH 7.5 con NaOH.

Tampón de detección: Tris-HCl 0.1 M, NaCl 0.1 M. Ajustar a pH 9.5.

3. Transformación de microorganismos

3.1. Transformación de *E. coli*

3.1.1. Preparación de células competentes

En primer lugar, se preparó un preinóculo de 5 ml de LB inoculando una colonia de la estirpe de *E.coli* que se iba a utilizar, y se incubó toda la noche en agitación a 37°C hasta que alcanzó la fase estacionaria. Posteriormente, se transfirieron 2 ml del preinóculo a un matraz con 100 ml de LB y se incubó de 2-3 h hasta que alcanzó una DO_{550nm} de 0,3-0,4. El cultivo se enfrió durante 5 min en hielo y se centrifugó a 5000 rpm a 4°C durante 8 min. Se descartó el sobrenadante y las células se resuspendieron en 15 ml de TfBI por cada 50 ml de cultivo empleados. Nuevamente se enfrió en hielo y se

centrifugó 8 min a 5000 rpm a 4°C. Se descartó el sobrenadante y se resuspendieron las células en 2 ml de TfbII por cada 50 ml de cultivo empleados. Finalmente se repartieron en alícuotas de 100 µl en viales fríos y se sumergieron en nitrógeno líquido. Las células competentes se conservaron para su uso a -80°C.

Solución TfbI (500 ml): 1.47 g de CH₃COOK, 4.95 g de MnCl₂, 6.05 de RbCl₂, 0.74 g de CaCl₂*6H₂O, 75 ml de glicerol; ajustar a pH 5.8 con ácido acético glacial 0.2M. Almacenar a 4°C.

Solución TfbII (500ml): 10 ml de un stock de MOPS 100 mM pH 7, 1.6 g de CaCl₂*6H₂O, 0.12 g de RbCl₂, 18 ml de glicerol. Filtrar a través de membranas de 0.22 µm y almacenar en oscuridad a 4°C.

Stock de MOPS (100mM, pH 7): 2.09 g de MOPS, 0.34 g de CH₃COONa, 0.18 g de EDTA. Ajustar a pH 7, enrasar hasta 100 ml con agua destilada y filtrar a través de membranas de 0.22 µm.

3.1.2. Transformación de células competentes

Las células competentes se descongelaron en hielo. Una vez descongeladas se añadió el ADN plasmídico o la mezcla de ligación (0,05-0,5 µg por cada 100 µl de células) y se mezcló con las células. El vial se mantuvo en hielo durante 30 min y transcurrido este tiempo se aplicó un choque térmico manteniendo las células sumergidas en un baño a 42°C durante 90 s. Rápidamente se pusieron en hielo durante 2 min y se añadió 1 ml de medio SOC. Esta mezcla se transfirió a un tubo de 10 ml donde se incubó en un agitador orbital a 200 rpm durante una h para permitir la expresión génica de la resistencia empleada como marcador. Finalmente las células se sembraron en placas de LB suplementado con el antibiótico apropiado.

Cuando se utilizó el vector PCR BluntII TOPO, se utilizó la cepa de *E. coli* TOP10 que fue transformada siguiendo el protocolo proporcionado por Invitrogen.

3.2. Transformación de *S. cerevisiae* y de *S. pastorianus*

Las levaduras se transformaron por el método (Gietz & Schiestl, 2007). El choque térmico varió entre 20 y 25 min en función de la cepa empleada. Una vez finalizado el choque térmico las células se sembraron en un medio selectivo, cuando la transformación se realizó empleando marcadores auxotróficos. Cuando el marcador era

una resistencia a un antibiótico, las células se incubaron en medio YPD sin el factor de selección entre 2 y 16 h dependiendo del plásmido o de la construcción empleada en la transformación, transcurrido este período los cultivos se recuperaron y se sembraron en placas de YPD con el antibiótico correspondiente. En todos los casos los cultivos se mantuvieron a 30°C, entre dos y cuatro días, hasta que aparecieron colonias de al menos 2 mm de diámetro.

4. Expresión de los genes *FPG1* y *CFG1* en *S. cerevisiae* y *S. pastorianus*

Las cepas recombinantes de *S. cerevisiae*, que contenían el vector pYES2 con el inserto correspondiente a los genes *FPG1* y *CFG1*, fueron cultivadas en 100 ml de medio SD con todos los aminoácidos excepto el uracilo. Como controles se emplearon, la cepa sin transformar cultivada en las mismas condiciones, pero suplementando el medio con todos los aminoácidos incluido el uracilo, y por otro lado, la cepa transformada con el vector sin inserto, que se cultivo en medio SD con todos los aminoácidos excepto el uracilo. En todos los casos el medio se suplementó con 2% de glucosa. Los cultivos se mantuvieron a 30°C en un agitador orbital a 200rpm.

Una vez alcanzada la fase estacionaria, las células se centrifugaron y se lavaron con agua hasta cuatro veces con la finalidad de eliminar los restos de glucosa del medio. Estos cultivos se inocularon en 50 ml de medio SD con todos los aminoácidos excepto el uracilo (las cepas control sin transformar se cultivaron de nuevo en presencia de uracilo) esta vez suplementado galactosa al 2%. Los cultivos se mantuvieron a 30°C y 200rpm durante 48h. Transcurridas 48 h los cultivos fueron recuperados, y las células y el sobrenadante se guardaron por separado, o fueron utilizadas directamente.

5. Generación de cepas con deleciones para los genes *FPG1*, *CFG1* y *URA3*

5.1. Interrupción génica mediada por PCR

Se empleó como marcador el casete de resistencia a la geneticina flanqueado por los sitios loxP, loxP-KanMX-loxP, presente en el vector pUG6 (Güldener *et al.*, 1996).

El casete FPG1-loxpKanMXloxP se utilizó para interrumpir los genes *FPG1* (Foam promoting gene) y *CFG1* (*Carlsbergensis* foaming gene), mientras que el casete URA-loxpKanMXloxP se utilizó para interrumpir el gen *URA3*.

El casete de interrupción FPG1-loxpKanMXloxP se obtuvo mediante PCR a partir del vector pUG6 con los oligonucleótidos FPGfint/FPGrint (Tabla 4). El oligonucleótido FPGfint contiene en su extremo 3' 25 pb que se corresponden con el extremo 5' del casete loxp-KanMX-loxP y en el extremo 5' tiene 42 pb que se corresponden con los pb 1-42 del gen *AWA1*. El primer FPGrint contiene en su extremo 3' 23 pb correspondientes al extremo 3' del casete loxp-KanMX-loxP y en su extremo 5' contiene 39 pares de bases que se corresponden con los pb 5104-5142 del gen *AWA1*.

El casete de interrupción URA-loxpKanMXloxP se obtuvo mediante PCR a partir del vector pUG6 con los oligonucleótidos uraF/uraR (Tabla 4). El oligonucleótido uraF contiene en su extremo 3' 25 pb que se corresponden con el extremo 5' del casete loxp-KanMX-loxP, y en su extremo 5' 24 pb que se corresponden con la posición -39 a la -15 del gen *URA3* de *S. cerevisiae*. El oligonucleótido uraR contiene en su extremo 3' 23 pb que se corresponden con el extremo 3' del casete loxp-KanMX-loxP y en su extremo 5' 21 pb que se corresponden con la posición 760 a la 780 del gen *URA3* de *S. cerevisiae*.

Una vez obtenido el casete de interrupción las células fueron transformadas directamente con esta construcción.

5.2. Eliminación del marcador de resistencia

Para ello se utilizó el vector YEp351-cre-cyh.

Las células transformadas con este plásmido se mantuvieron durante toda la noche en medio YPD. Posteriormente se sembraron en medio YPD suplementado con cycloheximida, de manera que solamente crecieron aquellas que contenían el plásmido.

La expresión de la Cre recombinasa se llevó a cabo manteniendo los cultivos en YPGal durante al menos 4 h. Posteriormente las células se recuperaron y se sembraron en placas de YPD. Una vez que crecieron las colonias se comprobó que habían perdido la resistencia a la G418 haciendo replica en placa en medio YPD suplementado con este antibiótico.

La eliminación del vector YEp351-cre-cyh, se realizó manteniendo las células en YPD durante varias generaciones.

6. Conjugación, Esporulación y Análisis de Tétradas

Para llevar a cabo la conjugación, las cepas haploides α y a tanto de *S. cerevisiae* como de *S. pastorianus*, se cultivaron por separado en medio YPD. Ambos cultivos se mezclaron en cantidades iguales y se incubaron varias h a 30°C en YPD para formar los diploides. Posteriormente, los diploides recién obtenidos se sembraron en medio SD suplementado con los aminoácidos cuya auxotrofia no es complementada al formarse los diploides, y se incubaron 48 h a 30°C.

Los diploides formados por conjugación, así como los diploides homotáticos, se sembraron en YPD, donde se mantuvieron durante 24h, transcurrido este tiempo se sembraron en medio de esporulación, donde se mantuvieron a 24°C entre 5 y 7 días, hasta que se obtuvo un número suficiente de ascas con cuatro esporas.

Para llevar a cabo la disección de las ascas, éstas fueron incubadas en Liticasa (Sigma) (0,5 μ g/ml) a 30°C durante 15 min, para debilitar la pared de la ascospora. Una alícuota de esta suspensión se extendió en una placa de YPD, donde se seleccionaron aquellas ascas que contenían cuatro ascosporas. Estas ascas fueron diseccionadas con un micromanipulador “Micromanipulator II” (Allen Benjamin Inc.) acoplado a un microscopio Nikon SE (Figura 12).



Figura 12. Micromanipulador “Micromanipulator II” (Allen Benjamin Inc.) acoplado a un microscopio Nikon SE (Figura 12).

7. Mapeo genético

7.1. Mapeo mitótico

El mapeo mitótico se realizó mediante la técnica de pérdida de cromosomas empleando Metil-benzimidazol-2-il-carbamato (MBC) se llevó a cabo siguiendo el protocolo descrito por Wood (1982).

El MBC se preparó en una solución stock 10mg/ml DMSO y se esterilizó filtrándolo a través de membranas de 0.22 μm (Millipore).

Se construyó un diploide heterocigoto con un marcador recesivo para cada uno de los cromosomas probados, e igualmente heterocigoto para el gen que se deseaba mapear. Un cultivo en fase exponencial (8×10^6 células/ml) de este diploide se cultivó a 23°C durante toda la noche en YPD suplementado con 100 $\mu\text{g/ml}$ de MBC. El cultivo se recuperó por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y se lavó dos veces con agua estéril. Posteriormente se sembró en YPD, y al cabo de 3 días, mediante la técnica de réplica en placa, se sembró en el medio adecuado para detectar distintas auxotrofías y el fenotipo del gen que se deseaba mapear.

La pérdida o adquisición del fenotipo correspondiente al gen que se desea mapear, se produce paralelamente a la adquisición por parte del diploide de una determinada auxotrofia (debido a la pérdida del cromosoma homólogo que lleva el alelo silvestre), permitiendo localizar el gen en un cromosoma concreto.

7.2. Mapeo meiótico

Para llevar a cabo la localización precisa de un gen en un cromosoma y el establecimiento de grupos de ligamiento, se siguieron las indicaciones de Sherman & Wakem (1991). La distancia genética se estableció aplicando la fórmula de Perkins (Perkins, 1949; Ma & Mortimer, 1983).

Los marcadores de ligamiento empleados fueron *cyh2* y *leu1* ambos ubicados en el cromosoma VII, y *ade2* en el cromosoma XV.

8. Técnicas de Manipulación de proteínas

8.1. Purificación de la pared celular de *S. cerevisiae* y de *S. pastorianus*

Las paredes celulares se purificaron a partir de cultivos preparados en medio YPD y medio YPD suplementado con tunicamicina, de distintas cepas de *S. cerevisiae* y de *S. pastorianus* en fase estacionaria. A continuación se recuperaron las células mediante centrifugación a 5000 rpm. Las células se lavaron tres veces con tampón de aislamiento a 0°C (Tris-HCl 10 mM, pH 7.8, PMSF 1 mM). A cada gramo de células se le añadieron 3 ml de tampón junto con 10 mg de perlas de vidrio de diámetro 0.45 mm. La mezcla se agitó en un agitador al 50% de su velocidad máxima durante 30 s.

El seguimiento de la rotura de la pared celular se hizo al microscopio óptico. El lisado se recuperó y se lavaron las perlas de vidrio con NaCl 1 M y PMSF 1 mM frío hasta clarificar los extractos.

Las paredes celulares se recuperaron centrifugando a 4000 rpm durante 8 min, y se lavaron tres veces con PMSF 1 mM.

8.2. Extracción de proteínas

8.2.1 Extracción desde pared celular mediante SDS

Las paredes celulares se suspendieron en tampón de extracción (Tris-HCl 50 mM a pH 7.8, SDS al 2%, EDTA 100 mM y β -mercaptoetanol 40 mM), y se hirvieron durante 5 min.

Las paredes se precipitaron por centrifugación a 10000 rpm durante 5 min, y el sobrenadante que contenía las proteínas se cargó directamente en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida.

8.2.2 Extracción de proteínas de la pared celular desde células viables con liticasa

Un cultivo de levaduras en fase estacionaria se recuperó mediante centrifugación a 5000 rpm, y se lavo tres veces en una solución salina fría (NaOH al 0.85%).

6×10^8 células/ml se suspendieron en 1 ml de tampón de digestión (Tris-HCl 0.1 M a pH 8.1 y liticasa 400 U/ml). Para evitar la lisis de los protoplastos se añadió $MgSO_4$ 0.5 M al tampón.

Las células se incubaron en tampón de digestión durante al menos 2 h a 30°C en agitación. Transcurrido el tiempo de incubación, la suspensión celular se centrifugó a 4°C y 1000 rpm durante 5 min.

Se recuperó el sobrenadante y se transfirió a un tubo donde se volvió a centrifugar a 4°C y 10000 rpm durante 10 min, recuperando finalmente el sobrenadante con las proteínas.

8.2.3. Extracción post-alkali de las proteínas de la pared celular.

Un cultivo en fase estacionaria se recuperó por centrifugación a 5000 rpm. 2.5 mg de peso húmedo de células se suspendieron en 100 µl de agua estilada y a esta suspensión se le añadieron 100 µl de NaOH 0.2 M. Las células se incubaron en esta suspensión durante 5 min a temperatura ambiente y transcurrido este tiempo se recuperaron por centrifugación. Posteriormente las células se suspendieron en 50 µl de tampón de muestra. La mezcla se hirvió durante 3 min. El sobrenadante se recuperó tras centrifugar la mezcla, y se cargó directamente en un gel de electroforesis de SDS-poliacrilamida.

Tampón de muestra: Tris-HCl 0.06 M, pH 6.8, glicerol 5%, SDS 2%, β-mercaptoetanol, azul de bromofenol 0.0025%

8.3. Concentración de proteínas

8.3.1. Ultrafiltración

La solución conteniendo las proteínas extraídas de la pared celular se filtro a través de una membrana de tamaño de poro de 30 Da en una célula Amicon.

Las muestras fueron concentradas 100 veces desde un volumen inicial de 100 ml hasta 1 ml.

Para volúmenes inferiores a 5 ml se emplearon Centricones (Millipore).

8.3.2 Precipitación con KDS y acetona

Las manoproteínas procedentes del sobrenadante de los cultivos de levaduras obtenidos de la fermentación del mosto sintético se precipitaron y concentraron por el método de KDS acetona descrito por Fusi (2010).

Tras 48 hs los cultivos se centrifugaron y al sobrenadante se le añadió SDS al 10% hasta alcanzar una concentración final del 0.2% (w/v). Las muestras se hirvieron durante 5 min y se les añadió KCl 2 M hasta alcanzar una concentración final de 400 mM.

Las muestras se mezclaron agitando vigorosamente durante 45 min a 4°C, y el precipitado de KDS-proteína se recuperó por centrifugación a 11000 rpm durante 35 min a 4°C.

La fracción de glicoproteínas se recuperó desde el sobrenadante de la precipitación con KDS mediante la precipitación con acetona. Al sobrenadante de la precipitación con KDS se le añadieron 4 volúmenes de acetona a 0°C. Después de 30 min las muestras se centrifugaron a 11000 rpm durante 35 min a 4°C. Los precipitados se secaron a 37°C.

8.4. Electroforesis de proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Se utilizó un sistema de electroforesis vertical siguiendo las instrucciones del fabricante (Biorad). El gel de electroforesis contenía la parte inferior que se corresponde con el gel separador y la parte superior que se corresponde con el gel concentrador. El gel separador se empleó a una concentración de 7.5% para proteínas entre 40 KDa y 280 KDa,.

Haces una tabla con las concentraciones y es suficiente.

| | |
|-----------------------|---------|
| Agua | 4.85 ml |
| Tris-HCl 1.5 M pH 8.8 | 2.5 ml |
| SDS 10% | 100 µl |
| Acrilamida/Bis | 2.5 ml |

Estos componentes se degasificaron a temperatura ambiente durante al menos 15 min. Posteriormente se añadieron:

| | |
|----------------------|-------|
| Persulfato de amonio | 50 µl |
| TEMED | 5 µl |

El persulfato de amonio se preparó en el momento. La polimerización del gel de poliacrilamida comenzó cuando se añadió el TEMED. Tras añadir el gel en el molde se

añadió una película de butanol para evitar que el gel entre en contacto con el aire y se esperó hasta que el gel separador estaba totalmente polimerizado, aproximadamente 40 min.

Una vez que el gel separador está totalmente polimerizado se añadió el gel concentrador al 4% que se preparó con la siguiente mezcla:

| | |
|-----------------------|---------|
| Agua | 6.1 ml |
| Tris-HCl 0.5 M pH 6.8 | 2.5 ml |
| SDS 10 % | 150 µl |
| Acilamida/Bis | 1.33 ml |
| Persulfato de amonio | 50 µl |
| TEMED | 10 µl |

El gel concentrador se preparó de la misma manera que el separador y se esperaron unos 45 min hasta que estuvo totalmente polimerizado.

Una vez formado el gel, se añaden las muestras junto al tampón de carga. Se añaden de 1 a 4 volúmenes de muestra por cada volumen de muestra. Antes de cargar el gel la muestra con el tampón de carga se hirvieron durante 4 min.

El gel se introduce en una cubeta con tampón de corrida y las muestras se cargan en los pocillos. La electroforesis se llevó a cabo a intensidad constante y a 80 V hasta que el frente llegó al gel separador, entonces se aumentó a 140 V hasta que el frente se salió por la parte inferior del gel.

8.5. Tinción de proteínas

8.5.1. Tinción con Azul de Commassie

Para diferenciar las proteínas presentes, el gel se tiñó con una solución de tinción durante 1 h. Una vez teñido se sumergió en la solución decolorante I durante 1 h, ésta elimina la solución de tinción del fondo permitiendo que se vean solamente las proteínas teñidas en forma de bandas. Finalmente se sumerge en la solución decolorante II de 12 a 16 h, eliminando los restos del colorante y aumenta el contraste de las bandas.

Solución de tinción: Azul de Commassie R-250 (Biorad) 1 g/l, Metanol 40% (v/v), Ácido Acético 10% (v/v).

Solución decolorante I: Metanol 40% (v/v), Ácido Acético 10% (v/v).

Solución decolorante II: Ácido Acético 10% (v/v).

8.5.2. Tinción con PAS-Schiff

Los geles se tiñeron con el reactivo de Schiff para detectar los carbohidratos como describió Carlsson (1993).

El gel se fijó en una solución fijadora durante al menos 1 h. Posteriormente el gel se incubó en una solución de ácido periódico fresca durante 1 h. En el momento se preparó una solución de metabisulfito en la que se sumergió el gel hasta que estuvo completamente amarillo (entre 5 y 10 min), entonces la solución se reemplazó por una solución fresca de metabisulfito hasta que desapareció el color amarillo (entre 5 y 10 min). Se descartó esta solución y el gel se incubó en el reactivo de Schiff hasta que aparecieron bandas de color rosa oscuro (nunca más de 2 h) El exceso de tinte se eliminó mediante lavados en solución fijadora.

Reactivo de Schiff: a 1 g de Fucsina Básica se le añadieron 200 ml de agua destilada hirviendo, se añadió 1 ml de HCl que quedará a una concentración final de 0.1 N. Cuando la mezcla enfrió se añadieron 2g de metabisulfito sódico. Finalmente se guardó a 4°C y oscuridad durante 48 h y se filtró.

Solución Fijadora: Etanol 20 % (v/v), Ácido Acético 7 % (v/v).

Solución de Ácido Periódico: Ácido Periódico 0.7 % (p/v), Ácido Acético 5 % (v/v).

Solución de Metabisulfito: Metabisulfito Potásico 0.2 % (p/v), Ácido Acético 5 % (v/v).

9. Análisis de las secuencias

Las secuencias de ADN y las secuencias proteicas se analizaron con distintos paquetes informáticos:

- Vector NTI Advance 10 (Invitrogen): fue empleado para analizar las secuencias de ADN obtenidas y traducirlas a aminoácidos. También se empleó este programa para diseñar los oligonucleótidos utilizados en este trabajo, así como para el diseño de las nuevas construcciones.
- BLAST del NCBI (Altschul *et al.*, 1997): Se utilizó para comparar las secuencias génicas y aminoacídicas con bases de datos existentes.
- BioEdit (Hall, 1999): Se utilizó para analizar la homología de las secuencias mediante alineamientos. También se empleó para realizar alineamientos con las secuencias y estudiar los niveles de homología entre ellas.
- EXPASY (European Informatic Institute): se utilizaron distintas herramientas de este servidor para el análisis de las secuencias aminoacídicas obtenidas.
- SPSS Inc 19 (IBM): Se utilizó para realizar los análisis estadísticos.

10. Fermentaciones en laboratorio

Los mostos empleados para llevar a cabo las distintas fermentaciones fueron los siguientes: mosto sintético, mosto de uva de la variedad Mencía (cosecha 2005, Ribeira Sacra), y mosto cervecero (Hijos de Rivera, S.A.). Las fermentaciones se llevaron a cabo en tubos de vidrio de 20 ml, a los cuales se les añadían 12.5 ml de mosto, con la finalidad de dejar espacio para la espuma que se producía durante la fermentación.

La fermentación del mosto de la uva se realizó a 23°C mientras que la del mosto cervecero se llevó a cabo a 15°C.

Como cultivo iniciador se emplearon distintas cepas de *S. cerevisiae* y de *S. carlsbergensis* de baja fermentación. Para obtener estos cultivos se inoculó un matraz de 100 ml de YPD con la cepa que se iba a utilizar como iniciadora de la fermentación y se cultivó durante toda la noche a 30°C y al día siguiente se cuantificaron por espectrofotometría a una DO_{600} , cuando alcanzaron una concentración de 10^7 células/ml, se centrifugaron a 5000 rpm durante 20 min a 4°C. Las células precipitadas se recuperaron y se resuspendieron en el mosto a una densidad de $1 \cdot 10^7$ células/ml.

Los tubos se pesaron para medir la pérdida de CO_2 hasta que finalizó la fermentación.

11. Selección de cepas espumantes

Las cepas empleadas fueron utilizadas como inóculo de en un ensayo de fermentación. La selección de la cepa espumante se hizo valorando la cantidad de espuma, la permanencia de la espuma y la presencia de células en la espuma, como se ha descrito previamente (Chiavari *et al.*, 2000).

12. Análisis organoléptico del vino y la cerveza

Se midió la velocidad de fermentación de cada cepa mediante el cambio de peso por pérdida de CO₂. Para considerar el descenso del peso debido a la evaporación durante el ensayo, se mantuvieron en condiciones similares dos tubos con mosto sin inocular.

Los valores de CO₂ se utilizaron para calcular la velocidad fermentativa (V_{f_m}), que es el promedio de la velocidad fermentativa inicial (V_{f_i}) y de la velocidad fermentativa total (V_{f_t}). La primera se refiere a los gramos de CO₂ producidos diariamente durante los 5 primeros días del ensayo, y la segunda indica los gramos de CO₂ producidos durante toda la fermentación. También se calculó el poder fermentativo (Pf) de la cepa que se refiere a los gramos de CO₂ producidos al término de la fermentación.

Una vez obtenidos el vino y la cerveza se analizaron la concentración de etanol, de ácido acético y de glicerol. Para ellos se emplearon los kits comerciales correspondientes (Boehringer-Mannheim) y se siguieron las instrucciones correspondientes en cada caso.

13. “Shaking method” para medida de estabilidad de la espuma de la cerveza

La medida de la estabilidad de la espuma se realizó por el procedimiento de la agitación descrito por Kapp & Bamforth (2002). Se tomaron 5 ml de cada muestra de cerveza que se vertieron en tubos de 15 ml y diámetro de 1.5 cm. Los tubos tapados se agitaron a mano 10 veces durante aproximadamente 3 s. Tras la agitación se retiró inmediatamente la tapa, y se midió la altura hasta la que llegaba la espuma, las medidas se realizaron a los 5 min y a los 30 min.

14. Pruebas fenotípicas

14.1. Sensibilidad a la liticasa

Las células fueron cultivadas a 30°C en un agitador orbital durante 12h y 48h. Se recuperaron por centrifugación a 5000 rpm durante 5 min y se lavaron dos veces con agua. Posteriormente se resuspendieron en tampón fosfato sódico 0,1 M (pH7.5) y se añadieron 200 U/ml de liticasa. Las suspensiones celulares se incubaron a 30°C y se tomaron medidas de la densidad celular de manera periódica a una densidad óptica de 600 nm en un espectrofotómetro Jenway (Genova).

14.2. Sensibilidad osmótica

Se prepararon placas con medio YPD sólido suplementado con sorbitol a concentraciones de 1M, 1.5M, 2M, 2.5M y 3M. A partir de cultivos con 1.10^6 cel/ml se realizaron diluciones seriadas de células 1:10 y se sembraron en spots de 5 μ l.

Se incubaron a 30°C durante 3 días.

14.3. Sensibilidad al SDS (Sodio Dodecil Sulfato)

Se prepararon placas de medio YPD suplementado con SDS 0.1%. Se hicieron soluciones seriadas 1:10 a partir de un cultivo 1.10^6 cel/ml y se sembraron spots de 5 μ l. Estas placas se incubaron a 30 °C durante al menos 4 días.

14.4. Sensibilidad al Calcoflúor White (CFW)

Spots de 5 μ l de diluciones seriadas 1:10 de un cultivo de 1.10^6 cel/ml se sembraron en placas de medio de cultivo YPD suplementado con 0.1% de Calcofluor White, y se incubaron durante 2 días a 30°C.

14.5. Tinción con Calcofluor White (CFW)

Las células fueron incubadas a 30°C. Se recuperó 1ml de cultivo por centrifugación a 5000rpm durante 5 min y se lavaron con agua dos veces y una con PBS. Posteriormente las células fueron teñidas con Calcoflúor White como se ha descrito previamente (Cabib, 2008). La fluorescencia de 100 μ l de una suspensión de 10^8 cel/ml las células se observó en un transiluminador (Molecular Imager® Gel Doc™ XR; Bio-rad).

14.6. Tolerancia al etanol

Se prepararon tubos con 5 ml de YPD líquido con etanol al 12% y al 15%. Estos tubos fueron inoculados con 1.10^6 cel/ml de las cepas que se quisieron analizar, y se incubaron durante 24 h a 30°C. Transcurrido este tiempo se midió la densidad celular de los cultivos en un espectrofotómetro Jenway (Genova) a una densidad óptica de 600 nm.

14.7. Sensibilidad a la temperatura

Se realizaron diluciones seriadas 1:10 de un cultivo inicial de 1.10^6 cel/ml que se sembraron en spots en placas de medio YPD. Estos cultivos incubaron a distintas temperaturas: 15°C, 23°C, 30°C, 37°C, durante 4 días o bien hasta que se observó crecimiento.

14.8. Hidrofobicidad de la superficie celular

Se inocularon 100 ml de YPD con un cultivo de células, y se incubó durante toda la noche a 30°C en agitación continua. El cultivo se lavó dos veces con agua estéril centrifugándolo a 5000 rpm. El cultivo recuperado se secó y se pesó. Posteriormente 0.5 mg/ml de peso seco de células se resuspendieron en 10^{-4} mol/l KNO_3 a pH4.5. A esta suspensión se le añadió 1 ml de n-hexano y se agitó vigorosamente durante 25 s. Posteriormente se dejó reposar aproximadamente 30 min hasta que se separaron la fase acuosa y la fase orgánica. La porción de células transferidas desde la fase acuosa a la fase orgánica con hexano se estableció midiendo absorbancia en la fase acuosa en un espectrofotómetro Jenway (Genova) a DO_{570nm} . La hidrofobicidad se expresa como el porcentaje total de células retiradas desde la fase acuosa a la fase orgánica y expresada como:

$$HSC (\%) = \frac{A_i570nm - A_f570nm}{A_i570nm}$$

Donde: HSC: Hidrofobicidad de la superficie celular.

A_i : Absorbancia inicial, medida a partir de la suspensión inicial antes de añadir el hexano.

A_f : Absorbancia final, medida a partir de la fase acuosa tras la mezcla con el hexano.

Capítulo 1

**Delección de los genes *HO* de *S. cerevisiae* y
Sc-HO de *S. pastorianus*.**

Objetivos

- Heterotalización de la cepa 145A211 de *Saccharomyces cerevisiae* y de la cepa Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces pastorianus*.
- Reducción del nivel de ploidía en las cepas 145A211 de *Saccharomyces cerevisiae* y Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces pastorianus*.
- Obtención de cepas competentes para la conjugación a partir de la cepa 145A211 de *Saccharomyces cerevisiae* y de la cepa Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces pastorianus*.

Resultados

1. Interrupción del gen *HO* en *S. cerevisiae*

El casete de interrupción HO-loxPkanMXloxP, obtenido a partir del vector pDHO, se empleó para transformar la cepa silvestre *S. cerevisiae* 145A211. Los transformantes se seleccionaron en medio con G418, obteniéndose así nuevos clones diploides heterocigotos para el gen *HO* (*HO/ho::loxPkanMXloxP*), ya que la recombinación homóloga ocurrió entre el casete de interrupción y el gen *HO* de uno de los cromosomas del par. A continuación, se indujo la esporulación de los transformantes. Se seleccionaron 20 de las tétradas obtenidas, que fueron diseccionadas y sembradas en medio YPD suplementado con G418. Así, de cada tétrada solamente se obtuvieron dos colonias que eran haploides *ho::loxPkanMXloxP*.

La integración del casete de interrupción se verificó mediante PCR en todos los casos. En el caso de los diploides heterocigotos *HO/ho::loxPkanMXloxP*, se observó que cuando la PCR se realizaba con los oligonucleótidos HO1F y HO2R se obtenían dos secuencias, una de 1761 pb que se correspondía con el gen silvestre *HO*, y otra secuencia de 1879 pb que se correspondía con el gen *HO* interrumpido con el casete HO-loxPkanMXloxP. En las PCRs que se realizaron con las combinaciones de oligonucleótidos HO1F/loxPR, loxPF/HO2R y loxPF/loxPR, se obtuvieron los tamaños de secuencia esperados, indicando que el casete se había integrado correctamente (Figura 13).

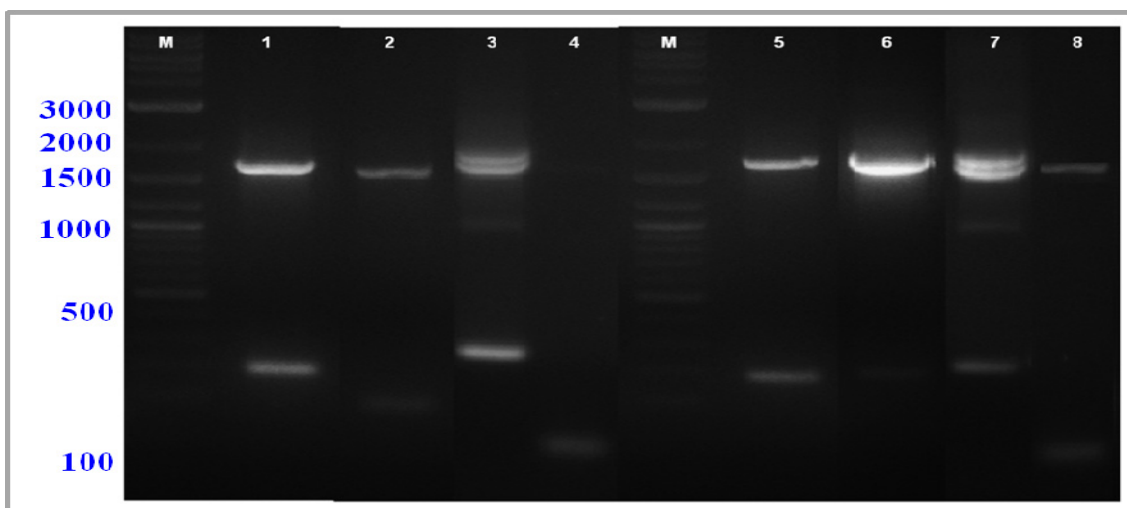


Figura 13. Verificación de la correcta integración del casete por PCR con distintas combinaciones de oligonucleótidos a partir del ADN genómico de dos clones de la cepa 145A211 de *S. cerevisiae*. Clon 1 (calles 1-4) y Clon 2 (calles 5-8). Oligonucleótidos empleados: HO1/loxpr (calles 1 y 5); loxpf/HO2 (calles 2 y 6); HO1/HO2 (calles 3 y 7); loxpf/lopr (calles 4 y 8). Los tamaños en pb del marcador (M) se muestran a la izquierda de la imagen.

Resultados

La conversión de las cepas homotáticas en heterotáticas se verificó induciendo la esporulación de 6 cepas haploides que portaban el gen *HO* interrumpido. Se comprobó que en ningún caso eran capaces de formar esporas lo que indicó que se había interrumpido el gen *HO* correctamente y que las cepas eran ahora heterotáticas.

Las cepas haploides con el gen *HO* interrumpido se transformaron con el vector YEp351-cre-cyh. Los transformantes fueron seleccionados en medio YPD suplementado con cicloheximida, para su posterior cultivo en medio YPGal para inducir la expresión de la Cre recombinasa y así, por recombinación de ésta con los sitios loxP, eliminar el casete loxP-KanMX-loxP. Tras 4 horas de cultivo, se comprobó la incapacidad de los transformantes seleccionados para crecer en presencia de G418, lo que indicó la eliminación del gen de resistencia a la geneticina (G418), KanMX. Así, se obtuvieron nuevas cepas haploides idénticas en todo a la cepa silvestre 145A211 de *S. cerevisiae* excepto que eran *ho* Δ . Este genotipo fue comprobado mediante PCR empleando las combinaciones de oligonucleótidos previamente descrito. Estos análisis confirmaron la delección del gen *HO* y la adquisición del carácter Δ ho.

La verificación de que estas cepas son *ho* Δ se realizó por PCR empleando las combinaciones de oligonucleótidos descritas anteriormente. Cuando se amplificó el gen con los oligonucleótidos HO1F/HO2R se obtuvo una secuencia 217 pb que se corresponde con la suma de los tamaños de los fragmentos HO1 y HO2, sin el casete loxP-KanMX-loxP. Cuando la verificación se realizó con los oligonucleótidos loxPF/loxPR no se amplificó ninguna secuencia, lo que confirmó la delección del casete de interrupción (Figura 14). Estos análisis confirmaron la delección del gen *HO*.

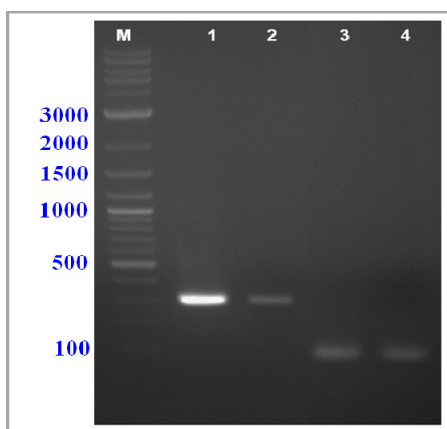


Figura 14. Verificación por PCR de la delección del gen *HO* en dos clones de la cepa 145A211 de *S. cerevisiae*. Clon 1 (calles 1 y 3) y Clon 2 (calles 2 y 4). Oligonucleótidos empleados: HO1/HO2 (calles 1 y 2); loxPF/loxPR (calles 3 y4). Los tamaños en pb del marcador (M) se muestran a la izquierda de la imagen.

2. Estudio de la capacidad conjugativa de las cepas *ho* Δ de *S. cerevisiae*

La capacidad conjugativa se comprobó mediante cruces entre 6 cepas *ho* Δ y dos cepas genéticas de *S. cerevisiae*, la cepa CSH84L (α) la cepa CSH89L (a). Como las cepas derivadas de la 145A211 no presentan auxotrofías, la formación de diploides se comprobó por su capacidad para producir zigotos y esporas. Cada una de las cepas seleccionadas se cruzó con ambas cepas genéticas (a y α), pero en todos los casos solamente se obtuvieron zigotos y ascas con una de ellas (a o α), lo que confirmó que las cepas eran ahora heterotálicas y haploides y que todas eran capaces de conjugarse (Figura 15). Además esto nos permitió establecer el tipo de *MAT* de cada una de las 6 cepas seleccionadas, de las que se seleccionó una para desarrollar el trabajo, esta cepa con *MAT* a se denominó SC22.

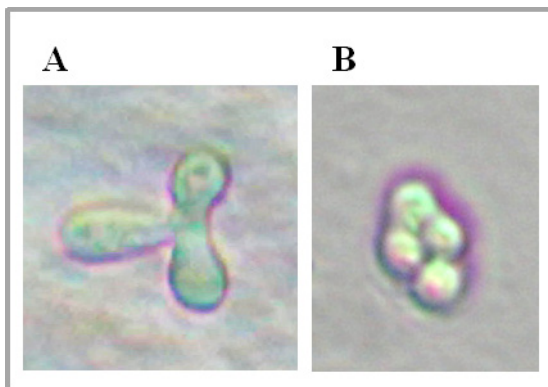


Figura 15. Análisis de la capacidad conjugativa. A) Zigoto formado a partir del cruce de la cepa SC22 y CSH89L. B) Tétrada obtenida al esporular el diploide SC22/CSH89L.

3. Interrupción del gen *Sc-HO* en *S. pastorianus*

La interrupción del gen *Sc-HO* de la cepa Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus* fue realizada siguiendo un esquema muy parecido al de *S. cerevisiae* previamente descrito. Se empleó el casete de interrupción HO-loxPKanMXloxP seleccionándose a los transformantes en medio YPD suplementado con G418. La correcta integración del casete en el gen *Sc-HO* se comprobó mediante PCR. Así, cuando se utilizó la combinación de oligonucleótidos HO1F/HO2R se observaron dos bandas, una de 1761 pb que se corresponde con el gen silvestre sin interrumpir y otra banda de 1879 que se corresponde con el gen *Sc-ho::HO-loxPKanMXloxP*, por lo que el casete se habría integrado solamente en uno de los cromosomas del tipo Sc. Cuando se realizaron las comprobaciones con las combinaciones de oligonucleótidos HO1F/loxPR, loxPF/HO2R y loxPF/loxPR se obtuvo una única banda en cada caso del tamaño esperado, con lo que se confirmó que el casete se había integrado correctamente (Figura 16).

Resultados

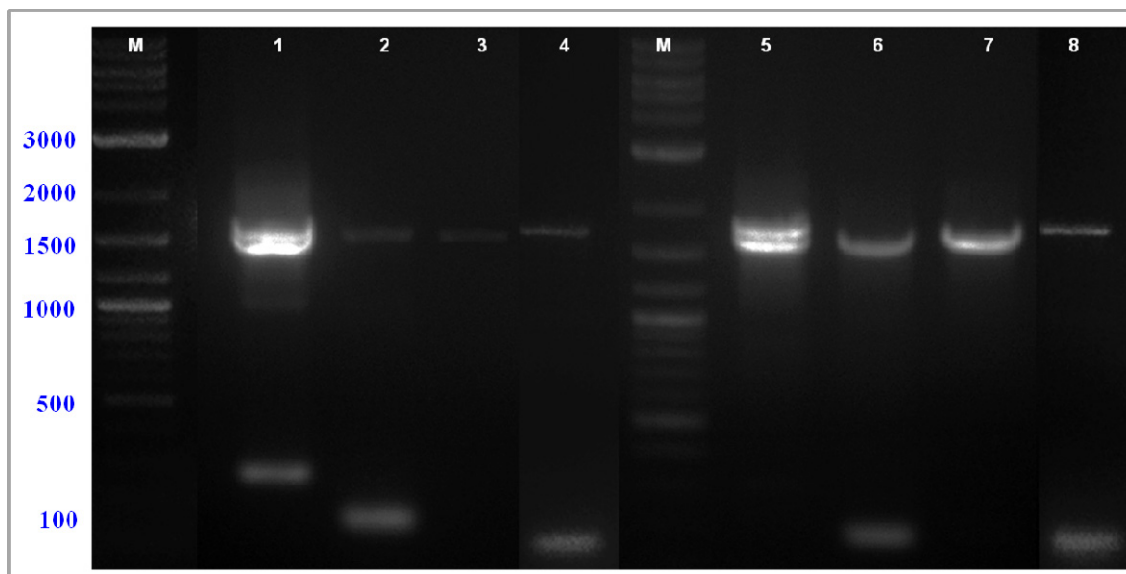


Figura 16. Verificación de la correcta integración del casete por PCR con distintas combinaciones de oligonucleótidos a partir del ADN genómico de dos clones de la cepa Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus*. Clon 1 (calles 1-4) y Clon 2 (calles 5-8). Oligonucleótidos **empleados**: HO1/HO2 (calles 1 y 5); HO1/loxpr (calles 2 y 6); loxpf/HO2 (calles 3 y 7); loxpf/lopr (calles 4 y 8). Los tamaños en pb del marcador (M) se muestran a la izquierda de la imagen.

Con el objetivo de obtener una cepa heterotática, un transformante *Sc-HO/Sc-ho::HO-loxPKanMXloxP* se cultivo en medio SPO1 y cuando se obtuvo un número suficiente de tétradas, 20 de ellas fueron diseccionadas y las esporas sembradas en placas de YPD suplementado con G418. De cada una de las tétradas, solamente fueron capaces de crecer en este medio dos esporas que eran las que portaban el gen de resistencia a la G418, KanMX, y por lo tanto eran *Sc-ho::HO-loxPKanMXloxP*. Así se comprobó también que la segregación del gen *Sc-HO* es 2:2.

El heterotalismo de las cepas se comprobó mediante esporulación, como se ha descrito previamente, sin que en ninguno de los casos analizados se obtuviesen esporas.

La eliminación del gen de resistencia se realizó mediante transformación de las cepas con el vector YEp351-cre-cyh, según lo descrito para *S. cerevisiae*. Se vio que las cepas eran ahora *Sc-hoΔ* (Figura 17). La verificación de la correcta eliminación del casete se realizó mediante PCR a partir del ADN genómico de las cepas *Sc-hoΔ*.

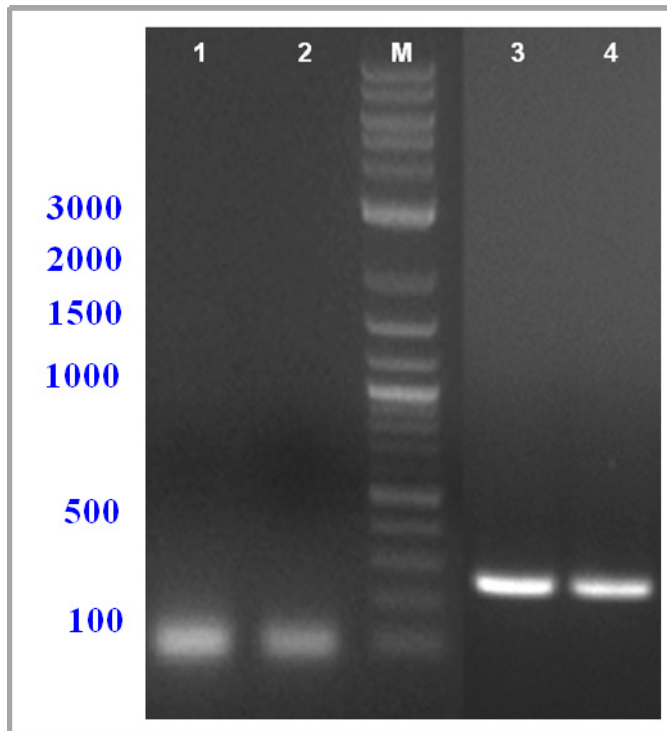


Figura 17: Verificación por PCR de la delección del gen *HO* en dos clones de la cepa Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus*. Clon 1 (calles 1 y 3) y Clon 2 (calles 2 y 4). Oligonucleótidos empleados: loxpf/loxpr (calles 1 y 2); HO1/HO2 (calles 3 y 4). Los tamaños en pb del marcador (M) se muestran a la izquierda de la imagen

Cuando se utilizaron los oligonucleótidos HO1F/HO2R se obtuvo una única banda de 217 pb se correspondía con los fragmentos HO1 y HO2 del casete. No se obtuvo ninguna banda cuando la amplificación se realizó con los oligonucleótidos loxPF/loxPR, verificando la correcta eliminación del casete loxP-KanMX-loxP.

4. Estudio de la capacidad para conjugar de las cepas *Sc-ho* Δ de *S. pastorianus*

La habilidad para conjugar de las cepas heterotáticas se comprobó realizando cruces entre 6 cepas heterotáticas *Sc-ho* Δ derivadas de la cepa Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus* y dos cepas genéticas de *S. cerevisiae* con *MAT* conocido, la cepa CSH84L (α) la cepa CSH89L (a). Como las cepas derivadas de la cepa Weihenstephan 34/70 no presentan auxotrofías, la conjugación entre ellas se comprobó por su capacidad para producir zigotos y esporas. Cada una de las cepas seleccionadas se cruzó con ambas cepas genéticas, pero en todos los casos solamente se obtuvieron zigotos y ascas con una de ellos (a o α), lo que confirmó que las cepas eran ahora heterotáticas y que todas eran capaces de conjugar. Además esto nos permitió establecer el tipo de *MAT* de cada una de las 6 cepas seleccionadas, de entre ellas se seleccionó una para realizar el resto del trabajo, esta fue la cepa con *MAT* a denominada SP5 (Figura 18).

Resultados

Capítulo 1: Delección de los genes *HO* de *S. cerevisiae* y *Sc-HO* de *S. pastorianus*

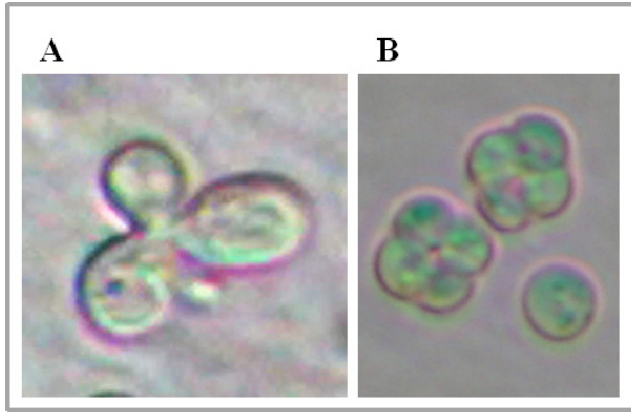


Figura 18. **A)** Zigoto formado a partir del cruce de la cepa SP5 y CSH89L. **B)** Tétrada obtenida al esporular el diploide SP5/CSH89L.

Discusión

En las fermentaciones las levaduras desempeñan un papel primordial por ser responsables de la producción de etanol. Además, también son responsables de muchas otras características organolépticas de las bebidas alcohólicas (Pretorius, 2000). Tradicionalmente la mejora de las levaduras se ha realizado mediante técnicas de hibridación por cruces entre cepas haploides, sin embargo existen otras técnicas para la mejora de levaduras como es la inducción de mutaciones, por fusión de protoplastos y la mejora genética de levaduras por técnicas del ADN recombinante. El problema de las técnicas de hibridación y de inducción de mutaciones es que se consigue mejorar un carácter pero no se controla la pérdida de otros o la adquisición de caracteres indeseables para el producto. Además estos caracteres muchas veces están determinados por más de un gen, lo que unido a que la mayoría de las cepas silvestres de *S. cerevisiae* son diploides, poliploides o aneuploides, que las de *S. pastorianus* son alotetraploides, y que en ambos casos son homotáticas con bajos niveles de esporulación y baja viabilidad de esporas, hace que la mejora de estas cepas por estos métodos sea dificultosa (Pretorius, 2000; Puig *et al.*, 2000; Blasco *et al.*, 2008; Saerens *et al.*, 2010).

La interrupción y eliminación del gen *HO* se ha empleado como una estrategia para reducir el nivel de ploidía y así el número de copia de los genes de manera que resulte más sencilla su manipulación. La conversión de cepas homotáticas en heterotáticas también posibilita la obtención de híbridos de cepas con las que hasta el momento no se podían obtener, modificando determinados caracteres que llevaran a la mejora de los productos aumentando su interés para la industria.

En este trabajo se realizó el estudio de los genes responsables del carácter espumante en la cepa vínica 145A211 *S. cerevisiae* y la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus*, ambas cepas homotáticas y con distintos niveles de ploidía, diploide en el caso de la cepa 145A211 y tetraploide en el caso de la cepa Weihenstephan 34/70. Estas características dificultaban el estudio de estos genes, haciéndose necesario reducir el nivel de ploidía de las mismas mediante la delección del gen responsable del homotalismo, el gen *HO* en el caso de *S. cerevisiae* y el gen *Sc-HO* en el caso de *S. pastorianus* (Harashima *et al.*, 1974; Tamai *et al.*, 2000).

En este trabajo se diseñó un vector, pDHO, que contenía un casete de interrupción del gen *HO*, basado en la secuencia del gen *HO* de *S. cerevisiae* que es al mismo tiempo homólogo al gen *Sc-HO* de *S. pastorianus* (Tamai *et al.*, 2000; Tamai *et al.*, 2001), que

permitió la delección de los genes *HO* y *Sc-HO*. La relación filogenética existente entre *S. cerevisiae* y *S. pastorianus* permitió la utilización del mismo casete para las dos especies ya que *S. pastorianus* es un híbrido de *S. cerevisiae* y *S. bayanus* que presenta tres tipos de cromosomas: un tipo *S. cerevisiae* donde se encuentra el gen *Sc-HO*, otro tipo *S. bayanus* donde se encuentra el gen *Lg-HO* (gen *HO* tipo Lager), y otros cromosomas derivados de la recombinación de los anteriores (Querol & Bond, 2009; Tamai *et al.*, 2000).

El hecho de que sólo 2 clones derivados de espora, de cada tétrada aislada tanto de la cepa 145A211 como de la cepa Weihenstephan 34/70, creciesen en medio de esporulación tras la interrupción génica nos indica que la segregación de los genes *HO* y *Sc-HO* es una segregación 2:2, de manera que en cada uno de los clones derivados de espora solamente habría un copia del gen que además estaría interrumpido.

Una vez eliminados los genes *HO* y *Sc-HO* se comprobó que todos los clones derivados de espora no eran capaces de esporular y que habían adquirido la capacidad de conjugarlo que permitió establecer el tipo de *MAT* que tenían, confirmándose que ambas cepas eran heterotálicas y que por tanto se redujo su nivel de ploidía. Esta reducción facilita la mejora de estas levaduras mediante técnicas de ADN recombinante, y su utilización en la industria, sobre todo en *S. pastorianus* en que hay cuatro copias para cada gen, como en el caso de la delección del gen *ILV2* para conseguir una maduración acelerada de la cerveza, resulta muy complicado y laborioso deleccionar todas las copias por lo que se buscan alternativas como aumentar la expresión de otros genes, como el *ILV5*, que desvía la producción de la α -acetolactato a la producción de valina de manera que no se produzca diacetilo (Gjermansen *et al.*, 1998; Polaina, 2002).

La adquisición de competencia para la conjugación permitirá, pues, la mejora de determinados caracteres mediante técnicas tradicionales de hibridación (Pretorius, 2000; Puig *et al.*, 2000; Blasco *et al.*, 2008; Saerens *et al.*, 2010).

La cepa de *S. cerevisiae* SC22 es haploide, ya que se redujo su ploidía a la mitad al ser heterotálica y entrar en meiosis. Sin embargo el caso de la cepa SP5 de *S. pastorianus* es diferente, ya que tiene su origen en un alotetraploide con dos copias para el gen *Sc-HO* y otras dos para el gen *Lg-HO*, de manera que aunque se ha reducido su nivel de ploidía a la mitad no es haploide, pero esta cepa se comporta como un heterotálico al eliminar el gen *Sc-HO*, aunque sigue manteniendo los genes *Lg-HO*, cuyo fenotipo no

se expresa probablemente debido a que el gen *Sc-HO* actúa como un iniciador de la conversión del tipo de *MAT* (Tamai *et al.*, 2000). Unos resultados parecidos se obtuvieron en un estudio realizado por Tamai *et al.* (2001) en el que se interrumpía el gen *Lg-HO* pero no el *Sc-HO*, y los clones obtenidos se convertían en heterotálicos.

La habilidad conjugante de la cepa SP5 es debida a que en este caso el locus *MAT* está presente cromosoma III en una única copia de manera que el tipo de *MAT* está bien definido. La existencia de una única copia en esta cepa, en la que se ha reducido el número de cromosoma a la mitad por meiosis, es debido a que el cromosoma III es uno de los ocho cromosomas quimera presentes en *S. pastorianus* que derivan de la recombinación de los cromosomas tipo *Sc* y *Sb*, y en concreto el locus *MAT* deriva de una translocación no recíproca que incluye una región homóloga de 604 pb (Bond *et al.*, 2004; Nakao *et al.*, 2009).

Capítulo 2

Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa vínica 145A211 de *Saccharomyces cerevisiae*

Objetivos

- Identificación y secuenciación de un gen implicado en la producción de espuma durante la fermentación en la cepa vínica 145A211 de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Localización cromosómica del gen implicado en la producción de espuma en la cepa vínica 145A211 de *S. cerevisiae*.
- Caracterización y localización de la proteína codificada por el gen responsable de la producción de espuma en la cepa vínica 145A211 de *Saccharomyces cerevisiae*.
- Establecimiento de la relación entre la proteína identificada y el fenotipo espumante de la cepa 145A211.

Resultados

1. Selección de cepas espumantes de *S. cerevisiae*

La cepa vínica silvestre 145 de *S. cerevisiae* se sometió a tres ciclos meióticos con la finalidad de eliminar mutaciones. Así se obtuvieron 36 cepas que fueron empleadas como inóculo en las microfermentaciones para seleccionar la mejor cepa productora de espuma (Tabla 5).

| Altura (cm) | Número de cepas |
|-------------|-----------------|
| 0-1 | 10 |
| 1-2 | 19 |
| 2-3 | 6 |
| 3-4 | 3 |
| 4+ | 1 |

Tabla 5. Altura de la espuma en las fermentaciones con las distintas cepas derivadas de la cepa 145 de *S. cerevisiae*

A la hora de seleccionar las mejores estirpes, además de la altura de la espuma, se tuvo también en cuenta la presencia de células de levadura en la espuma. Esto sólo se comprobó en aquellas que producían más de 1 cm de altura de espuma.

La cepa 145A211 se eligió entre todas para seguir con los análisis por ser la que produjo mayor cantidad de espuma y la que produjo espuma con una mayor estabilidad y presencia de células.

2. Identificación y secuenciación del gen *FPG1*

Se diseñaron oligonucleótidos basados en la secuencia del gen espumante *AWAI* (GenBank: AB071164) de la cepa fermentadora de sake K7 de *S. cerevisiae* para secuenciar y clonar un gen responsable de la producción de espuma en las cepas vínicas de *S. cerevisiae*. Fue posible amplificar una banda de aproximadamente 2300 pb a partir del DNA genómico de la cepa *S. cerevisiae* 145A211 utilizando los oligonucleótidos awa11 y awa12. Tras su clonación en el vector PCR BluntII TOPO y su secuenciación, se vio que este fragmento de 2313 pb correspondía a un ORF completo. Mediante la herramienta BLAST se pudo comprobar que la secuencia obtenida no había sido previamente descrita por otros autores, se le asignó el nombre de *FPG1* (Foam Promoting Gene), y fue incorporada a la base de datos GenBank donde se le asignó el código EU414028.1 (Figura 19).

Resultados

Capítulo 2: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa vinica 145A211 de *S. cerevisiae*

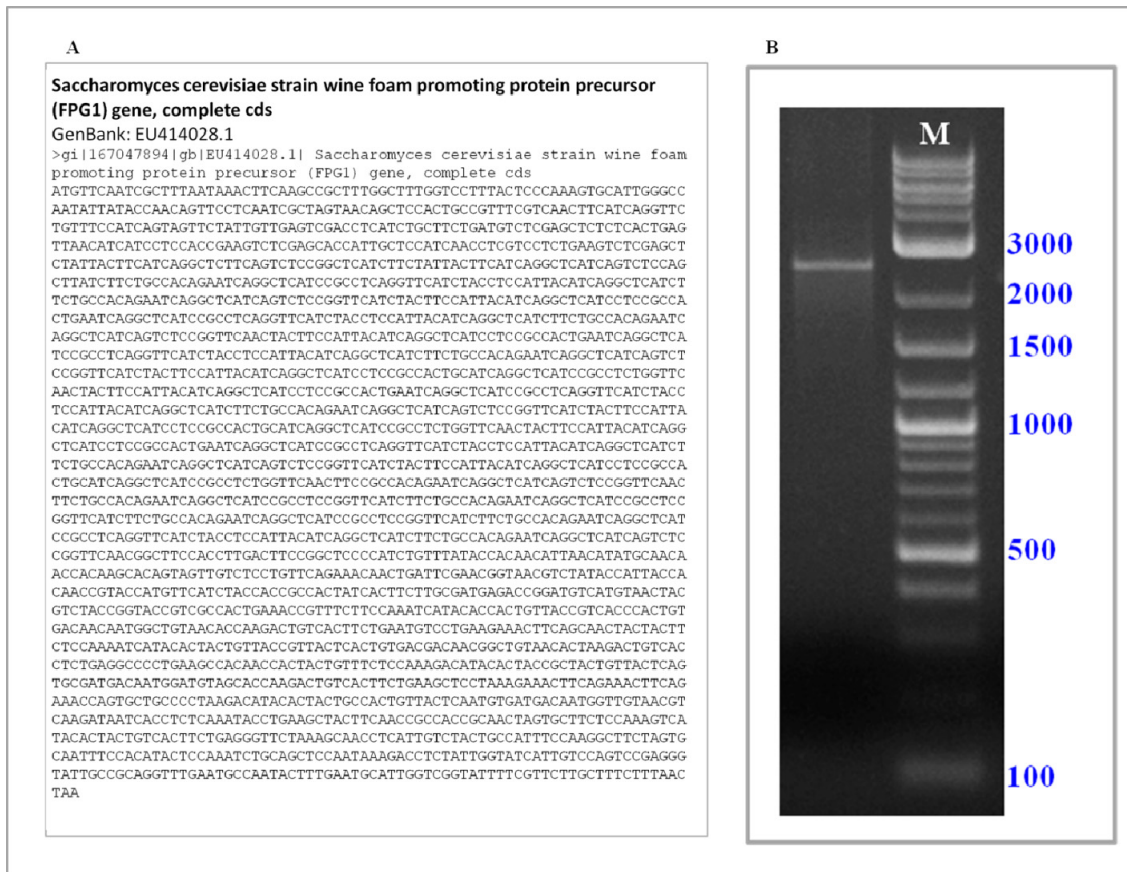


Figura 19. A) Secuencia del gen *FPG1* publicada en la base de datos GenBank. B) Banda correspondiente al gen *FPG1* en un gel de agarosa.

3. Análisis de la secuencia de la proteína Fpg1p

La ORF del gen codificaba para una proteína, Fpg1p, de 770 aminoácidos y un peso molecular de 72512.22 Da y pI de 4.23 (Figura 20).

Fue posible encontrar en la proteína Fpg1p los motivos típicos de los precursores de las manoproteínas de la pared celular de las levaduras:

- Región N-terminal y C-terminal hidrófobas.
- Péptido señal (aminoácidos 1-24).
- Una región rica en serina (S), que supone el 35.5% de los aminoácidos (aminoácidos 29-470).
- Una región rica en treonina (T), que supone el 18.2% de los aminoácidos (aminoácidos 470-716).
- Posible punto de anclaje al GPI (aminoácido 749).
- Numerosos puntos de O-glicosilación.

- 2 puntos de N-glicosilación (aminoácidos 28 y 35).

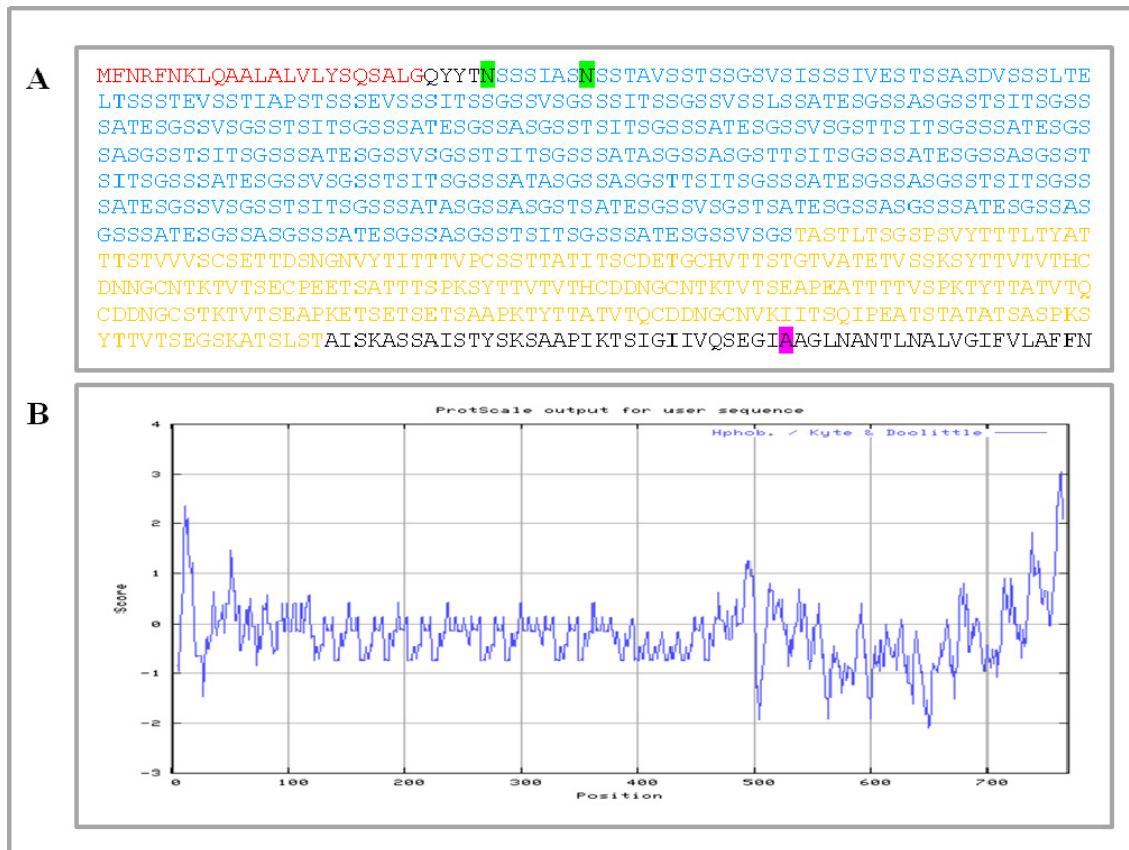


Figura 20. **A)** Secuencia aminoacídica de la proteína Fpg1p. Rojo: péptido señal; Azul: región rica en Serina; Naranja: región rica en Treonina; Subrayado verde: puntos de N-glicosilación; Subrayado rosa: punto de unión al GPI. **B)** Análisis de hidrofobicidad de la secuencia utilizando el test de Kyte & Doolittle (1982).

Una vez que Fpg1p sufre las modificaciones postraduccionales, correspondientes a la pérdida del péptido señal y de la región posterior al punto de anclaje al GPI, dará lugar a una proteína de 726 aa y un peso molecular de 67812.68. La secuencia de la proteína Fpg1p fue depositada en la base de datos GenBank donde se le asignó el código ABZ10813.1.

4. Estudio de homología

4.1. Homología del gen *FPG1*

La secuencia del gen *FPG1* se comparó con otras secuencias de nucleótidos empleando la herramienta BLAST. Los resultados obtenidos mostraron elevados niveles de homología entre este gen y otros genes codificantes para manoproteínas.

Resultados

La mayor homología se produjo con genes ubicados en el cromosoma XV de *S. cerevisiae*, en concreto con el gen espumante *AWAI* de la cepa k7 fermentadora de sake y con el gen *HPFI* (Haze Protective Factor) de la cepa de laboratorio SC288 (Figura 21) y con su homólogo en la cepa vínica EC1188, todos ellos codificantes para manoproteínas ubicadas en la pared celular de las levaduras. Todos estos genes presentaban, a su vez, grandes similitudes entre sí.

Aunque el gen *FPGI* era altamente homólogo a estos genes no era idéntico a ninguno de ellos.

4.2. Homología de la proteína Fpg1p

El análisis de homología de la secuencia proteica de la proteína Fpg1p, mostró que presentaba una alta homología con proteínas de la pared celular de *S. cerevisiae*, en la región N-terminal, desde el residuo 1 al 119, y en la región C-terminal, desde el residuo 463 hasta el 770. La región proteica comprendida entre el residuo 119 y 463 no presentó homología con ninguna proteína.

La proteína Fpg1p presentó los mayores niveles de homología total con la proteína de Hpf1p, que está implicada en la eliminación de turbidez de los vinos. También presentó un elevado nivel de homología con la proteína Awa1p implicada en la producción de espuma en sake, que a su vez es homóloga a Hpf1p y que tiene una región homóloga a dos partes de YJR151c, que es la región que se considera implicada en la formación de espuma. Sin embargo, no se encontró homología entre la proteína Fpg1p e YJR151c (Shimoi *et al.*, 2002) (Figura 22).

Se observó que aunque todas estas proteínas tienen un elevado nivel de O-glicosilación, el mayor número de lugares de glicosilación aparecían en Fpg1 y Awa1p, sobretodo en la región rica en serina (Figura 23).

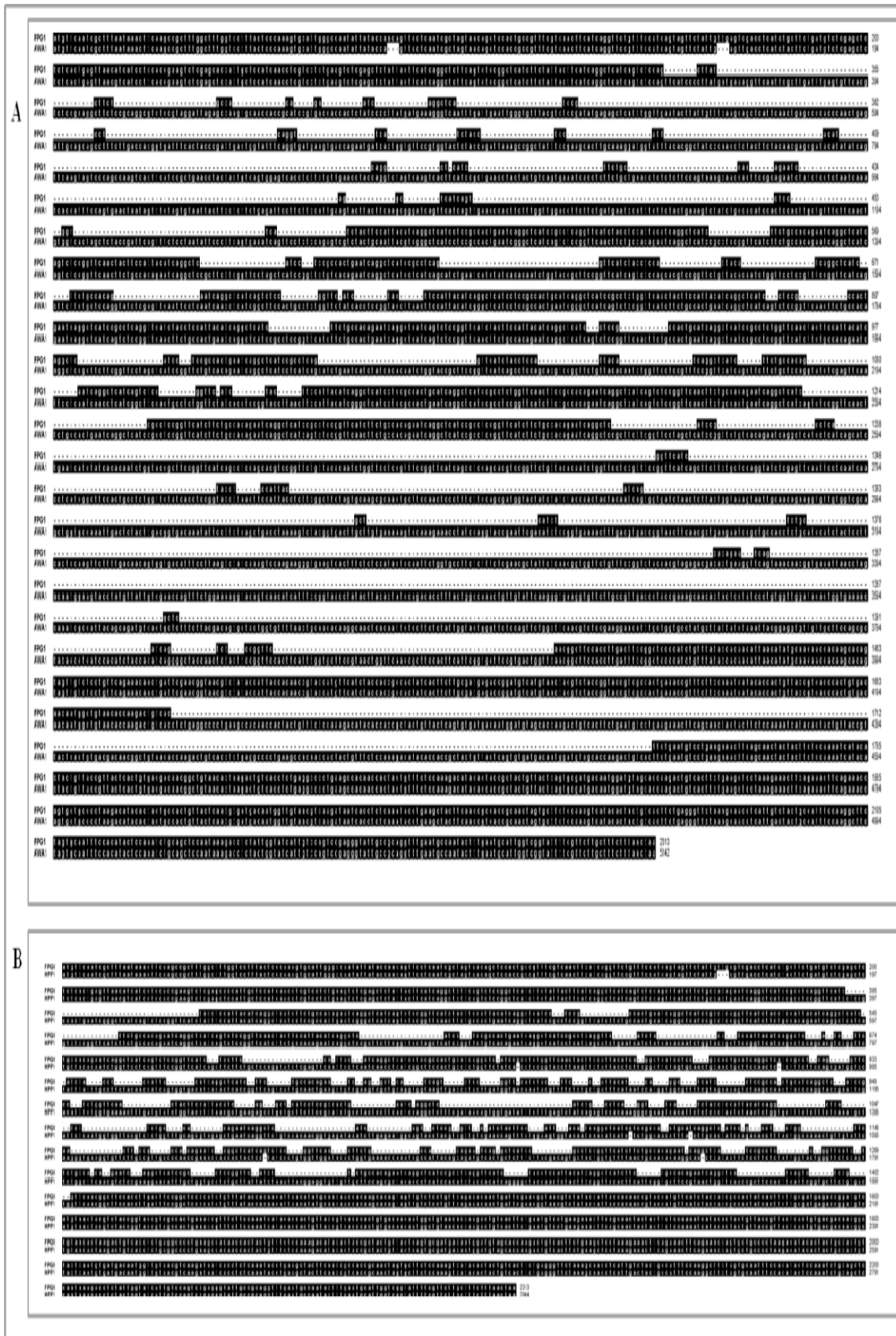


Figura 21. Análisis de homología del gen *FPGI*. A) Homología con *AWAI*. B) Homología con *HPFI*.

Resultados

Capítulo 2: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa vinica 145A211 de *S. cerevisiae*

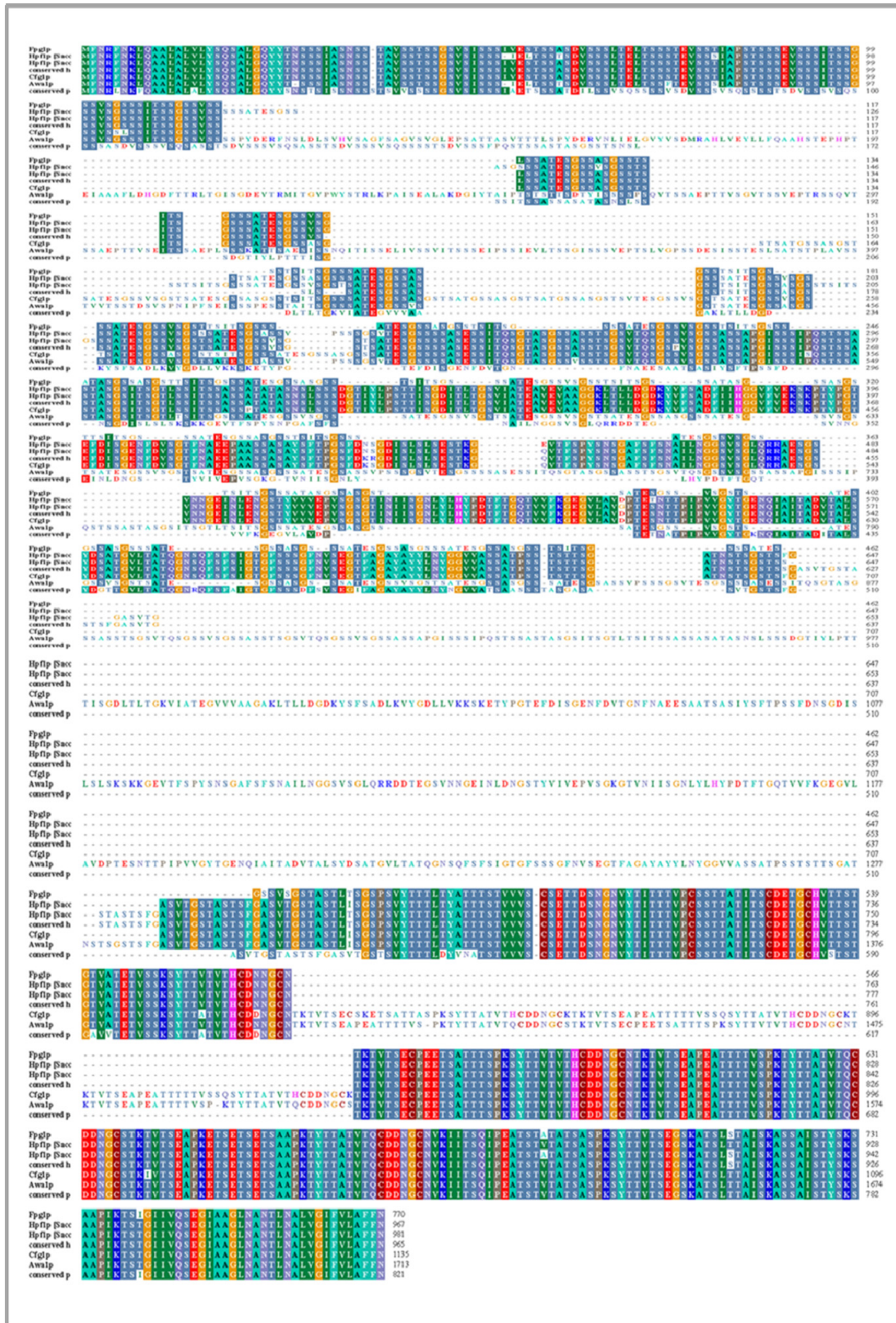


Figura 22. Homología de la proteína Fpg1p. Proteínas en orden descendente: Fpg1p; Hp1p (*S. cerevisiae* s288c); Hp1p (*S. cerevisiae* EC1118); Conserved hypothetical protein (*S. cerevisiae* RM11-1a); Cfg1p (*S. pastorianus*); Awa1p (*S. cerevisiae* k7); Conserved protein (*S. cerevisiae* YJM789).

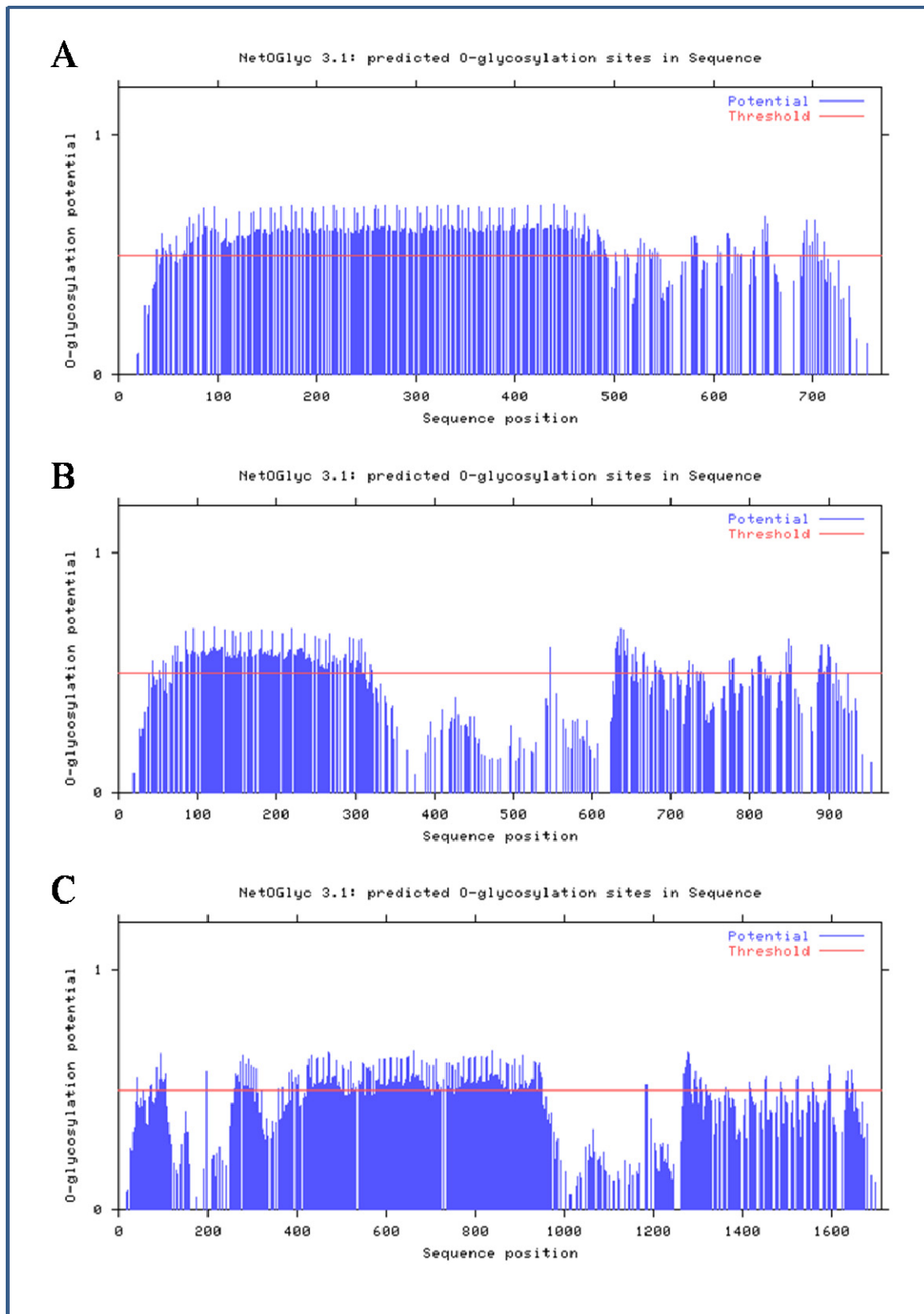


Figura 23. Patrón de O-glicosilación (NetOGlyc 3.1.). A) Fpg1p. B) Hpflp. C) Awa1p.

5. Localización cromosómica del gen *FPG1*

5.1. Southern Blot

Los cromosomas de la cepa 145A211 fueron separados en electroforesis en campo pulsante. Cuando se realizó la hibridación con la sonda para el gen *FPG1* se observó que aparecían dos bandas en la película de revelado, de estas dos bandas: una de las cuales se correspondía con el cromosoma VII o con el XV, ya que ambos están juntos en el patrón de bandas cromosómicas, y la otra, mucho menos intensa, se correspondía con el cromosoma X (Figura 24).

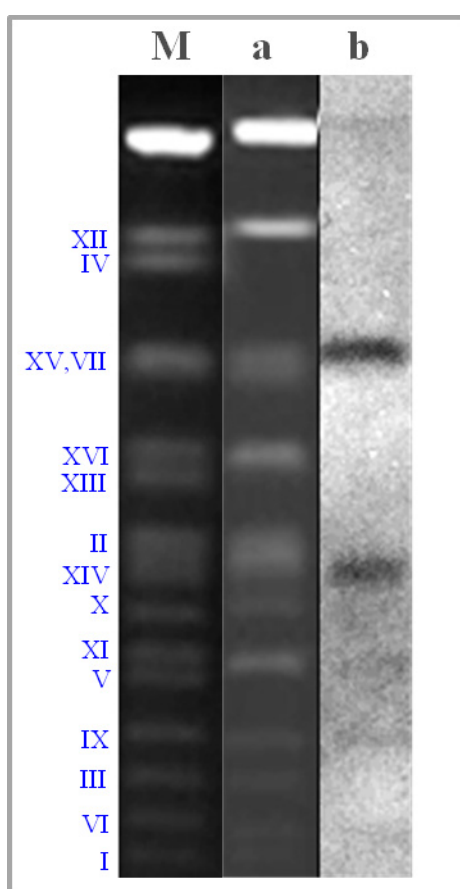


Figura 24. Localización cromosómica del gen *FPG1* mediante Southern Blot. Calle M, Marcador cromosómico de la cepa YNN295; Calle a, cromosomas de la cepa 145A211 teñidos con bromuro de etidio en gel de agarosa; Calle B, cromosomas hibridados con la sonda para el gen.

El hecho de que los genes homólogos a *FPG1*, como *HPF1* y *AWA1* se hubiesen localizado en el cromosoma XV y, también a que Thornton (1978) mediante mapeo genético localizase en el cromosoma VII los genes espumantes *FRO1* y *FRO2*, condujo a pensar que probablemente el gen *FPG1* estaría localizado en uno de ellos.

Debido a que con el Southern Blot no quedó clara la localización del gen *FPG1*, se procedió a determinar su localización mediante mapeo genético.

5.2. Mapeo genético del gen *FPG1*

El mapa genético se realizó empleando la cepa SC22 Δ ho derivada de la cepa 145A211 de *S. cerevisiae*. En esta cepa se marcó el gen *FPG1* con el gen de la resistencia a la G418 para evitar realizar microfermentaciones con cada colonia obtenida.

El gen *FPG1* se marcó con el gen de resistencia a la G418. Para ello la cepa haploide SC22 fue transformada con el casete de interrupción *FPG1-loxPKanMXloxP*, que se integró por recombinación homóloga en la posición del gen *FPG1*, así los transformantes son resistentes a G418 lo que luego permite hacer el seguimiento del gen. La correcta integración del casete se comprobó mediante PCR empleando los oligonucleótidos awa11/awa12, obteniéndose una única banda de 1635 pb, correspondiente al gen *fpg1::FPG1-loxPKanMXloxP*. De entre los transformantes se seleccionó uno, que se denominó SCH2 (Figura 25).

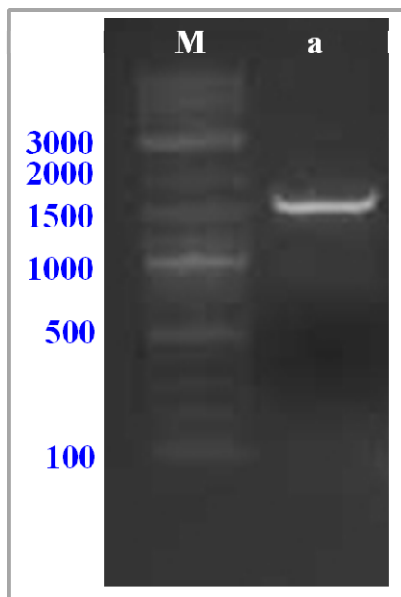


Figura 25. Verificación de la correcta integración del casete *FPG1-loxPKanMXloxP* en la cepa SCH2. a: banda de 1635 pb correspondiente al gen *FPG1* interrumpido. M: marcador de pesos moleculares, el tamaño de las bandas en pb se indica a la derecha de la imagen

5.2.1. Mapeo mitótico por pérdida de cromosomas

En primer lugar se obtuvieron diploides a partir del cruce de la cepa SCH2, que llevaba marcado el gen *FPG1*, con la cepa CSH84L que contenía las auxotrofías *cyh2* en el cromosoma VII y la auxotrofia *ade2* en el cromosoma XV, entre otras. Estos diploides se sometieron a un tratamiento con benomilo para eliminar cromosomas y finalmente se obtuvieron diploides resistentes a la cicloheximida y sensibles a G418. Lo que nos permitió localizar el gen *FPG1* en el cromosoma VII.

5.2.2. Mapeo meiótico

La cepa SCH2 se cruzó con la cepa CSH88L que tiene el marcador *leu1* en el centrómero del cromosoma VII, y con la cepa CSH84L que presenta el marcador *cyh2* en el cromosoma VII. A partir de cada uno de los cruces se diseccionaron 40 tétradas, a partir de las cuales se estudió la segregación de los marcadores y del gen *FPG1* marcado con el gen *KanMX* de resistencia a G418 (Tabla 6).

| Marcador | Numero de ascas | | | cM |
|--------------------|-----------------|-----|----|----|
| | PD | NPD | T | |
| KanMX- <i>cyh2</i> | 11 | 3 | 26 | 55 |
| KanMX- <i>leu1</i> | 2 | 10 | 24 | - |

Tabla 6. Mapeo meiótico del gen *FPG1*. PD: tipo parental; NPD: no tipo parental; T: tetratipo; cM: centimorgans.

La aplicación de la fórmula de Perkins mostró que el gen *FPG1* está situado a 55 cM del marcador *cyh2*, y que no existía ligamiento con el marcador *leu1*, por lo que finalmente se estableció que el gen *FPG1* estaba situado en el brazo izquierdo del cromosoma VII a -119 cM del centrómero.

6. Delección del gen *FPG1*

La cepa diploide 145A211 fue transformada con el casete de interrupción *FPG1-loxPKanMXloxP*. Los transformantes obtenidos se seleccionaron en medio sólido YPD suplementado con G418, ya que éstos debían ser resistentes a la G418 por expresar el gen *KanMX* presente en el casete de interrupción. La correcta integración del casete se comprobó mediante PCR, utilizando distintas combinaciones de oligonucleótidos. Cuando se utilizaron los oligonucleótidos *awa11/awa12* se amplificaron dos bandas, una de 2313 pb que se corresponde con el gen *FPG1* sin interrumpir, y otra banda de 1635 pb que se correspondía con el gen *FPG1* interrumpido, lo que nos indicó que el casete se había integrado únicamente en uno de los cromosomas. Cuando se realizaron las PCR empleando los oligonucleótidos *awa11/loxPR* y *loxPF/awa12* se obtuvieron los tamaños de bandas correctos de 1568 pb y 1573 pb respectivamente, y cuando se utilizaron los oligonucleótidos *loxPF/loxPR* solamente se obtuvo la banda correspondiente al casete *lox-PKanMX-loxP* de 1570 pb. Los transformantes eran heterocigotos *FPG1/fpg1::FPG1-loxPKanMXloxP*, por lo que con el fin de obtener células homocigotas para el gen interrumpido, se indujo la esporulación, seleccionando

aquellas esporas resistentes a G418. Cuando éstas se dividieron por mitosis dieron lugar a diploides homocigotos con el gen *FPG1* interrumpido con el casete. Nuevamente esto se verificó por PCR con los oligonucleótidos awa11/awa12, obteniéndose una única banda de 1635 pb (Figura 26A).

Se denominó DHA6C a uno de los transformantes *fpg1::FPG1-loxPKanMXloxP/fpg1::FPG1-loxPKanMXloxP*. DHA6C fue seleccionado y transformado con el vector YEp351-cre-cyh para eliminar el casete de resistencia loxP-KanMx-loxP, obteniéndose así el diploide DHA2-16 *fpg1Δ* que no presentaba ningún tipo de resistencia. La eliminación del casete se comprobó mediante PCR como se ha descrito previamente (Figura 26B). Así, cuando se utilizaron los oligonucleótidos awa11/awa12 la banda que se obtuvo era la correspondiente a la parte de los oligonucleótidos que se unía al gen *FPG1*, de 81 pb. Finalmente al utilizar los oligonucleótidos loxPF/loxPR no se obtuvo ninguna banda confirmando la correcta eliminación del casete.

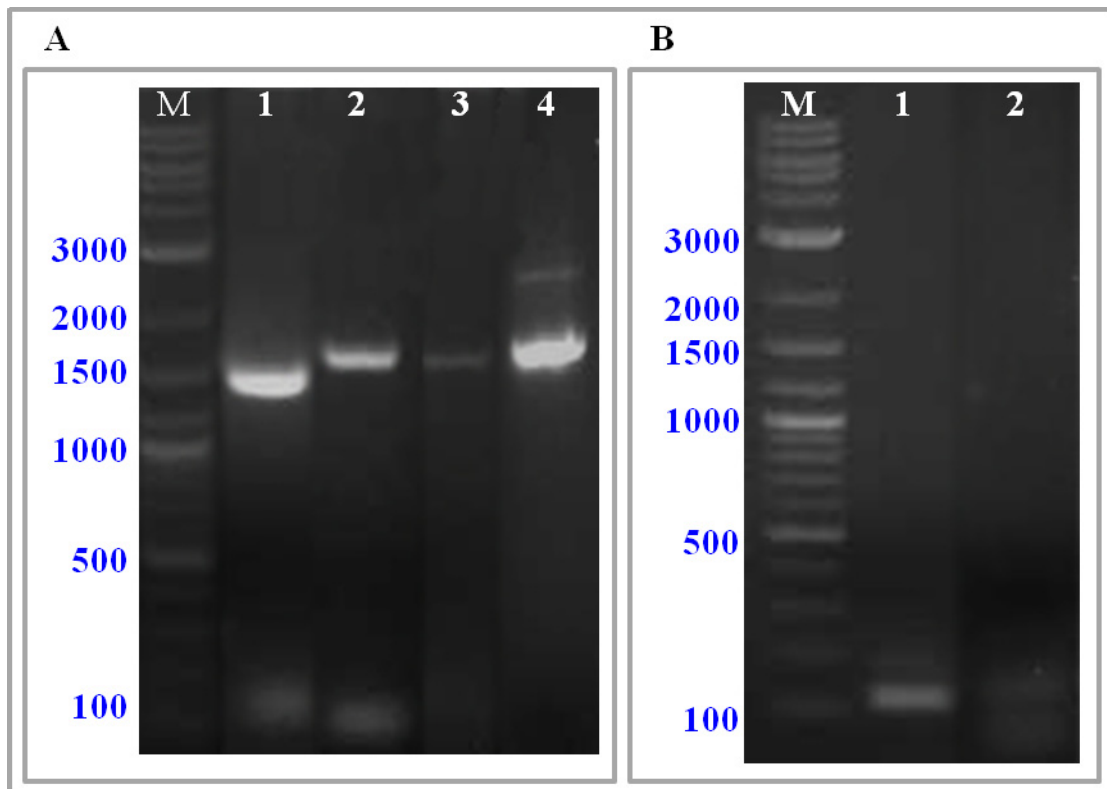


Figura 26. A) Verificación de la interrupción del gen *FPG1* mediante PCR. Oligonucleótidos empleados: loxF/loxR (calle 1); awa11/loxR (calle 2); loxF/awa12 (calle3); awa11/awa12 (calle 4). B) Verificación de la delección del gen *FPG1* mediante PCR. Oligonucleótidos empleados: awa11/awa12 (calle1); loxF7loxR (calle 2). El tamaño de las bandas (pb) del marcador de pesos moleculares (M) se indica a la izquierda de las imágenes.

7. Pruebas fenotípicas

En todos los casos las pruebas se realizaron por triplicado con la cepa vínica silvestre 145A211 y con la cepa DHA2-16 *fpg1Δ*, con la finalidad de observar los efectos fenotípicos de la proteína Fpg1p.

7.1 Sensibilidad a la temperatura

Las cepas 145A211 y DHA2-16 se cultivaron a 15°C, 23°C, 30°C y 37°C, y ambas fueron capaces de crecer por igual a todas las temperaturas. Se observó que el crecimiento era más lento a 15°C donde ambas cepas tardaron en empezar a crecer aproximadamente 48 h, mientras que en el resto de las temperaturas a las 24 h ya se observaba crecimiento. La cepa DHA2-16 mostró un retardo en el crecimiento a 15 y a 37 °C con respecto a la cepa 145A211 (Figura 27A).

7.2. Crecimiento en SDS al 1%

Se cultivaron en medio YPD sólido suplementado con SDS al 1% las cepas 145A211 y DHA2-16. En este caso ambas cepas fueron incapaces de crecer en presencia de SDS.

7.3. Tolerancia al etanol

Aunque la presencia de etanol afectó negativamente al crecimiento de ambas cepas, se observó que la cepa DHA2-16 presentaba mayor tolerancia al etanol cuando está a una concentración del 12%. Sin embargo, cuando se aumentó la concentración al 15 % ambas cepas se comportaban prácticamente igual.

7.4. Sensibilidad a la osmótica

Ambas cepas fueron capaces de crecer a todas las concentraciones de sorbitol ensayadas, y no se observó ninguna diferencia en el crecimiento entre ellas (Figura 27B).

7.5. Sensibilidad al Calcofluor White

El crecimiento de las cepas 145A211 y DHA2-16 se vio afectado por la presencia del Calcofluor White si bien no se observaron diferencias en el crecimiento entre ellas (Figura 27C).

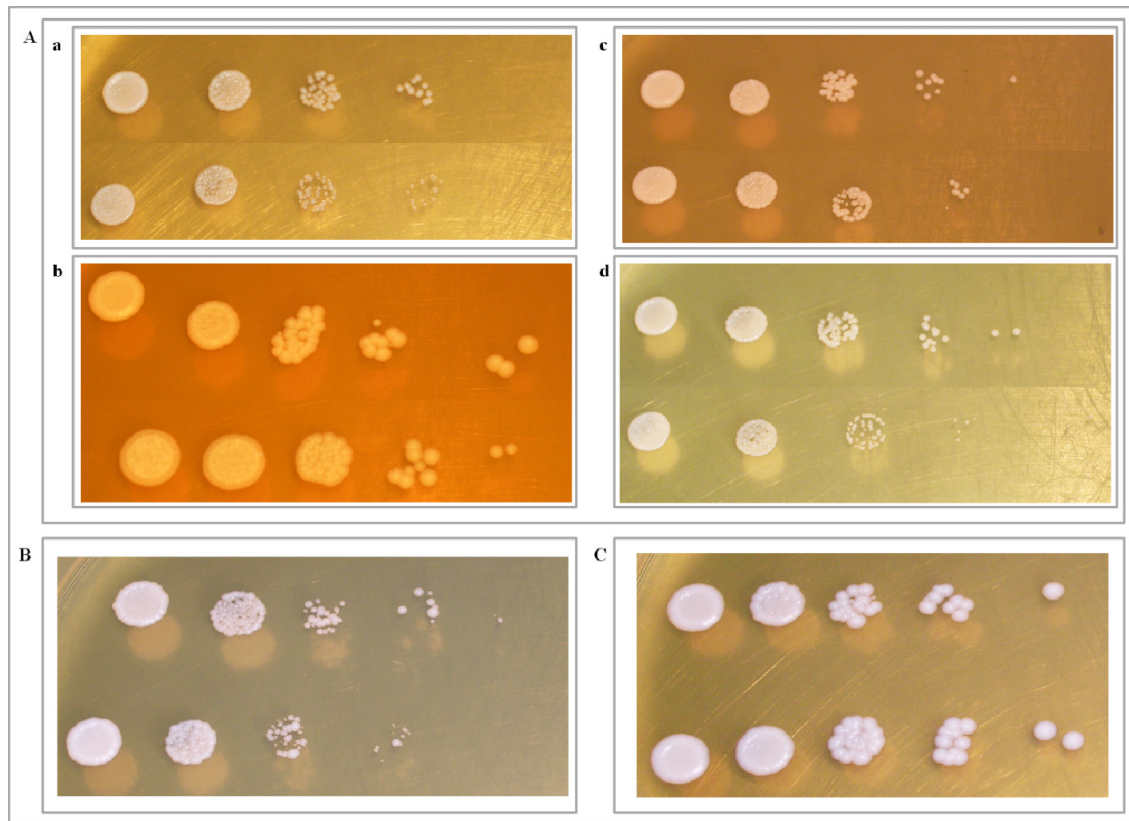


Figura 27 . Pruebas fenotípicas de las cepas de *S. cerevisiae* 145A211 y DHA2-16. A) Crecimiento a distintas temperaturas: 15°C (a); 23°C (b); 30°C (c); 37°C (d). **B)** Crecimiento en presencia de sorbitol. **C)** Crecimiento en presencia de Calcofluor White.

7.6. Sensibilidad a la liticasa

Se comprobó que tras 12h de cultivo, la D.O. de la cepa 145A211 disminuía en un 80%, mientras que la cepa DHA2-16, que no tiene la proteína Fpg1p, era menos sensible a la liticasa y la D.O. de ésta sólo disminuyó en un 48% como máximo.

En los cultivos que crecieron durante 48h, la pared celular se observó que la sensibilidad de la cepa 145A211 era casi la mitad que a las 12h y en el caso de la cepa DHA2-16 apenas era sensible a la liticasa. La diferencia en la sensibilidad entre ambas cepas, indicaba que la proteína estaba ubicada en la pared celular (Figura 28A, B).

7.7. Tinción con Calcofluor white

La tinción con Calcofluor White fue más brillante en los pocillos donde se localizaba la cepa DHA2-16 que la cepa 145A211 (Figura 28C).

Resultados

Capítulo 2: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa vinica 145A211 de *S. cerevisiae*

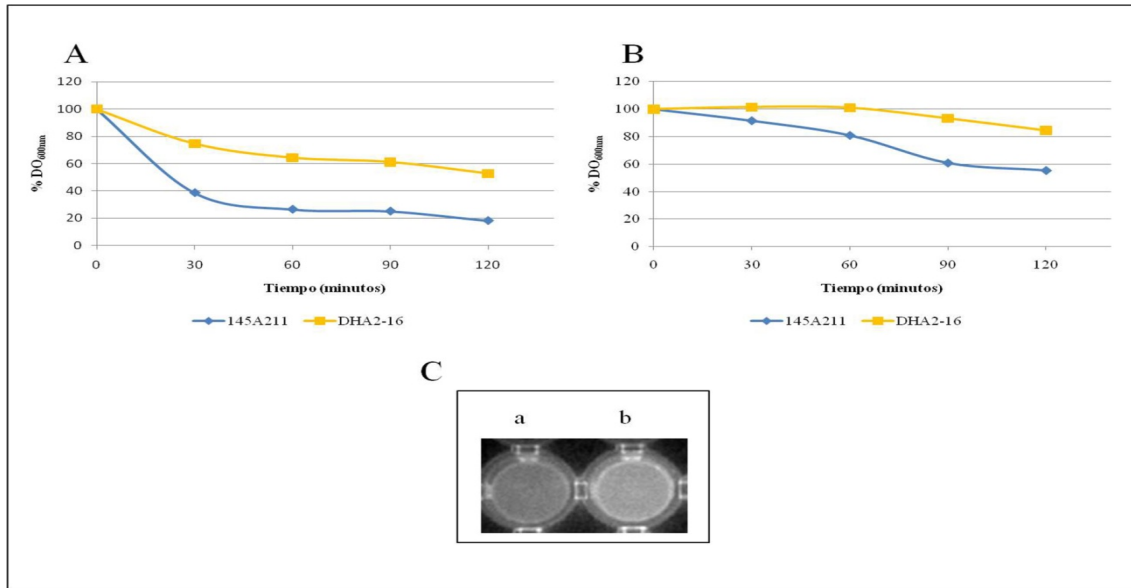


Figura 28. Sensibilidad a la litocasa a las 24 h (A) y a las 48 h (B). C) Tinción con Calcofluor White de las cepas 145A211 (a) y DHA2-16 (b).

7.8. Hidrofobicidad de la superficie celular

Cuando se realizaron las pruebas para comprobar la hidrofobicidad de la superficie celular de las cepas 145A211 y DHA2-16, se observó que en los cultivos de 24 h existían diferencias significativas, siendo mayor en la cepa silvestre 145A211. Sin embargo cuando se mantenían en cultivo durante 48 h, ambas cepas habían alcanzado el mismo nivel de hidrofobicidad (Figura 29).

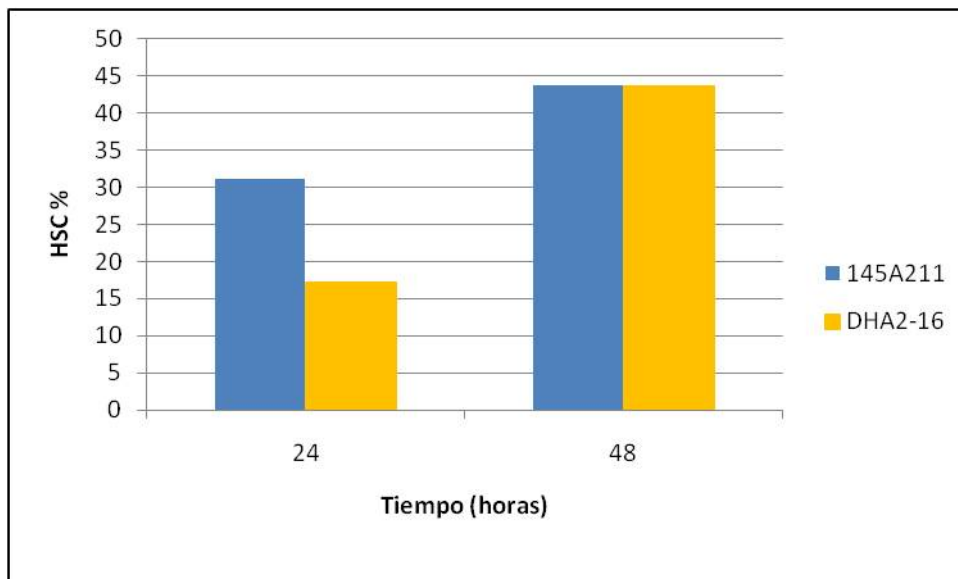


Figura 29. Hidrofobicidad de la superficie celular de las cepas 145A211 y DHA2-16 a las 24 h y 48 h.

8. Microfermentaciones

Utilizando como inóculo en mosto de uva las cepas de *S. cerevisiae* 145A211 y DHA2-16, se llevaron a cabo las fermentaciones por triplicado. Durante la fermentación se midió la velocidad de fermentación, y al finalizar las fermentaciones se analizaron distintos compuestos organolépticos.

8.1. Velocidad de fermentación

La velocidad y duración de la fermentación se establecieron pesando los tubos con el mosto fermentado y estableciendo así la pérdida de peso debida a la pérdida de CO₂ tal como se describe en Materiales y Métodos. Se consideró que la fermentación había finalizado cuando los tubos dejaron de perder peso. Se utilizó un control sin inóculo para establecer la pérdida de peso debida a la evaporación.

Las dos cepas tardaron 8 días en finalizar la fermentación. Sin embargo aunque la capacidad fermentativa fue prácticamente igual, la cepa DHA2-16 *fpg1*Δ presentó un inicio de fermentación más lento, tardando más de 24 h en iniciar la fase tumultuosa, que en el caso de la cepa 145A211 comenzó aproximadamente a las 24 h.

Los resultados mostraron que no había diferencias significativas ni entre la velocidad fermentativa ni entre el poder fermentativo de ambas cepas (Tabla 7) (Figura 30).

| Cepa | Vf _i | Vf _t | Vf _m | Pf |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| 145A211 | 0,042 | 0,012 | 0,027 | 1,19 |
| DHA2-16 | 0,05 | 0,013 | 0,032 | 1,37 |

Tabla 7. Velocidad de la fermentación con las cepas 145A211 y DHA2-16. Vf_i: gramos de CO₂ desarrollados durante los 5 primeros días de la fermentación; Vf_t: gramos de CO₂ desarrollados durante toda la fermentación; Vf_m: velocidad fermentativa media de las dos anteriores; Pf: poder fermentativo, máxima producción de CO₂ al final de la fermentación.

Resultados

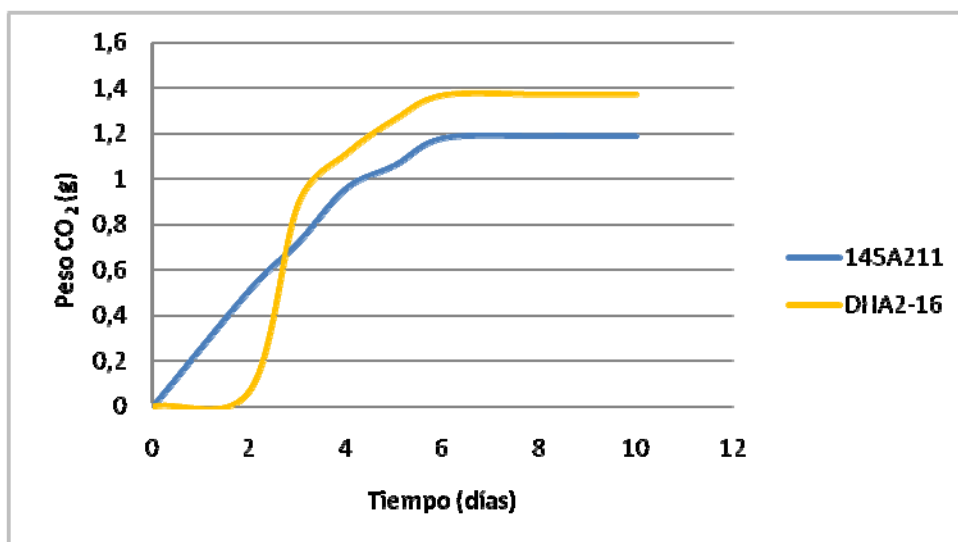


Figura 30. Desarrollo de la producción de CO₂ por parte de las cepas 145A211 y DHA2-16, a lo largo de la fermentación.

8.2. Producción de etanol

Tras finalizar la fermentación se midió la concentración de etanol en los tubos fermentados con ambas cepas. El análisis estadístico de comparación de medias por la T de Student mostro que no existían diferencias significativas entre la cantidad de etanol producida por ambas cepas (Figura 31A).

8.3. Producción de ácido acético

La medida del ácido acético da la acidez volátil del vino, que es un factor indeseable ya que es responsable del sabor a vinagre. En este caso los valores obtenidos entraban dentro del rango aceptado para los vinos (Figura 31B).

Al comparar las medias de los valores obtenidos para ambas cepas utilizando la T de Student se comprobó que no existían diferencias significativas entre ellas.

8.4. Producción de glicerol

Los resultados obtenidos con las dos cepas estaban en el rango adecuado para el vino, no se encontraron diferencias significativas al comparar mediante la T de Student los valores obtenidos con ambas cepas (Figura 31C).

8.5. pH

Los valores de pH obtenidos con ambas cepas entraban dentro de los valores aceptables, aunque el valor obtenido con la cepa DHA2-16 era ligeramente elevado. Sin embargo, no existían diferencias significativas entre ellos (Figura 31D).

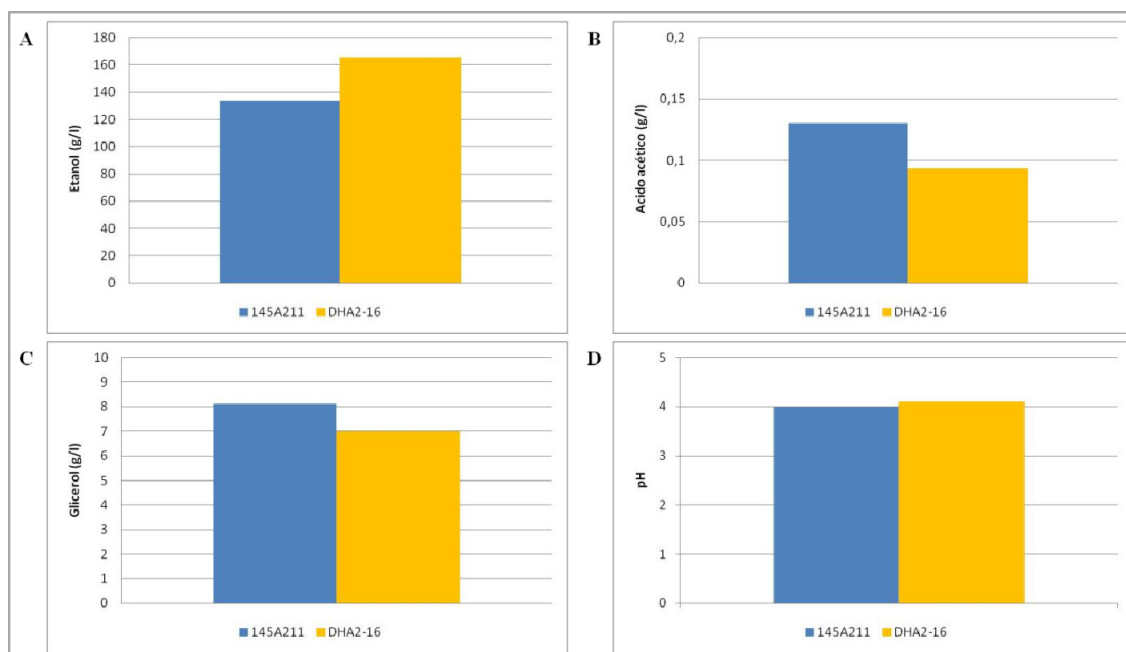


Figura 31. Características organolépticas de los vinos obtenidos con las cepas 145A211 y DHA2-16. A) Concentración de etanol (g/l). B) Concentración de Acido Acético (g/l). C) Concentración de glicerol (g/l). D) pH.

9. Clonación y expresión del gen *FPG1* en la cepa MI2B de *S. cerevisiae*

Con el objeto de determinar la capacidad de producir espuma del gen *FPG1* este se clonó en el vector de expresión de *S. cerevisiae*, pYES2, que se expresó en la cepa de *S. cerevisiae* MI2B ya que esta cepa no era capaz de producir espuma durante la fermentación.

9.1. Clonación del gen *FPG1* en el vector en el vector pYES2

El gen *FPG1* previamente clonado en el vector PCR BluntII TOPO se liberó utilizando la enzima de restricción BstXI y se obtuvo un producto de 2356 correspondiente al gen *FPG1* de 2313 pb más el fragmento de 43 pb del vector.

El inserto liberado se clonó en el vector de expresión de *S. cerevisiae*, pYES2. Para ello el vector pYES2 se cortó con la enzima de restricción BstXI. El fragmento de ADN

Resultados

Capítulo 2: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa vinica 145A211 de *S. cerevisiae*

correspondiente al gen *FPG1* flanqueado por dos sitios *BstXI* se ligó en el sitio correspondiente en el vector.

Con la mezcla de ligación se transformó la cepa TOP10 de *E. coli*. Los transformantes se seleccionaron en medio LB suplementado con ampicilina. Se comprobó la correcta orientación del inserto en el vector mediante digestión con los enzimas de restricción *PstI* y *NcoI* (Figura 32); al digerir la construcción con la enzima *PstI* que si estaba en la orientación correcta se obtenían dos bandas, una de 4465 pb y otra de 3566 pb, mientras que cuando era digerida con la enzima *NcoI* se obtuvo una única banda de 8169 pb.

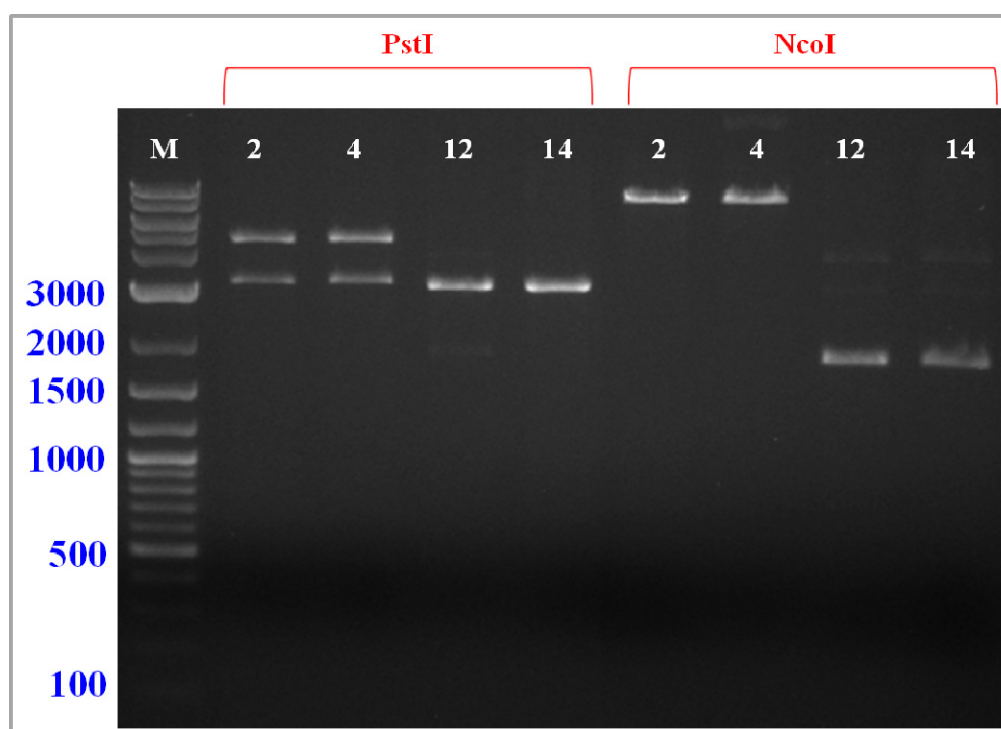


Figura 32. Verificación de la orientación de la construcción pYES2-FPG1. Los clones se digirieron con las enzimas *PstI* y *NcoI*. Los clones 2 y 4 están en la orientación correcta mientras que los clones 12 y 14 están en la orientación errónea. El tamaño de las bandas (pb) del marcador de pesos moleculares (M) se muestra a la izquierda de la imagen.

El vector pYES2-FPG1 se utilizó para transformar la cepa MI2B de *S. cerevisiae*. Los transformantes se seleccionaron en medio SD sin ningún aminoácido, de manera que solo fueron capaces de crecer aquellas cepas transformadas con el vector pYES2-FPG1, que contenía el gen *URA3*.

9.2. Expresión del gen *FPG1*

Tanto la cepa MI2B transformada con el vector pYES2-FPG1, denominada MI2B-FPG1, como la cepa MI2B transformada solo con pYES2, a la que se denominó MI2B-pYES2, y que se utilizó como control, se cultivaron inicialmente en medio YPD durante toda la noche hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial. En este momento se recuperaron por centrifugación y se lavaron para eliminar los restos de glucosa, ya que esta inhibía la expresión.

Los cultivos se recuperaron y se sembraron en medio YPGal, ya que la expresión del vector pYES2 era inducible por galactosa, y en este medio se mantuvieron durante 48 h. Posteriormente los cultivos se recuperaron por centrifugación y se utilizaron bien para inocular mosto o bien para extraer la proteína de la pared celular.

10. Extracción e identificación de la proteína Fpg1p

10.1. Extracción a partir de la pared celular

La proteína fue extraída por métodos enzimáticos, empleando SDS, o por extracción post-alkali, todos ellos métodos para la extracción de manoproteínas de la pared celular, ya que los resultados previos del análisis de la secuencia sugerían que la proteína Fpg1p era una manoproteína.

Utilizando estos métodos se obtuvo un extracto de manoproteínas procedentes de la pared celular de la cepa 145A211, MI2B-FPG1 y las cepas empleadas como control DHA2-16 y MI2B-pYES2.

Cuando se utilizó el método de extracción por SDS, aunque se extrajeron un gran número de proteínas, no se observaron diferencias entre las muestras y los controles, por lo que este método no es válido para la extracción de la proteína Fpg1p.

Cuando la extracción se realizó con liticasa o con un tratamiento post-alkali, se observaron diferencias entre las cepas 145A211 y la cepa DHA2-16, pero solo cuando habían sido cultivadas en presencia de tunicamicina. En el caso de las cepas MI2B y MI2B-FPG1, no se observaron diferencias entre ellas.

Al observar en el gel las proteínas extraídas tanto con liticasa como con el tratamiento post-alkali, se confirmó la presencia de una banda cercana a los 70 KDa en el carril

Resultados

Capítulo 2: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa vinica 145A211 de *S. cerevisiae*

correspondiente a la cepa 145A211 que no aparecía en el carril correspondiente a la cepa DHA2-16 (Figura 33A, B). El tamaño se correspondía además con el tamaño que tiene la proteína Fpg1p tras sufrir las modificaciones postraduccionales.

10.2. Presencia de la proteína Fpg1p en el sobrenadante

El contenido proteico del mosto sintético fermentado por las cepas 145A211 y DHA2-16, fue precipitado por el método del KDS. Una vez separadas las proteínas mediante electroforesis, los geles de acrilamida se tiñeron con colorante de Schiff, específico de manoproteínas. Como resultado se observó una diferencia en el patrón de proteínas entre las bandas correspondientes al sobrenadante fermentado por 145A211 y DHA2-16, de tal manera que en la calle correspondiente al primero aparecía una banda de aproximadamente 75 KDa que no aparecía en la calle correspondiente a las proteínas del mosto fermentado por la cepa DHA2-16, que se correspondería con la proteína Fpg1p N-glicosilada (Figura 33C).

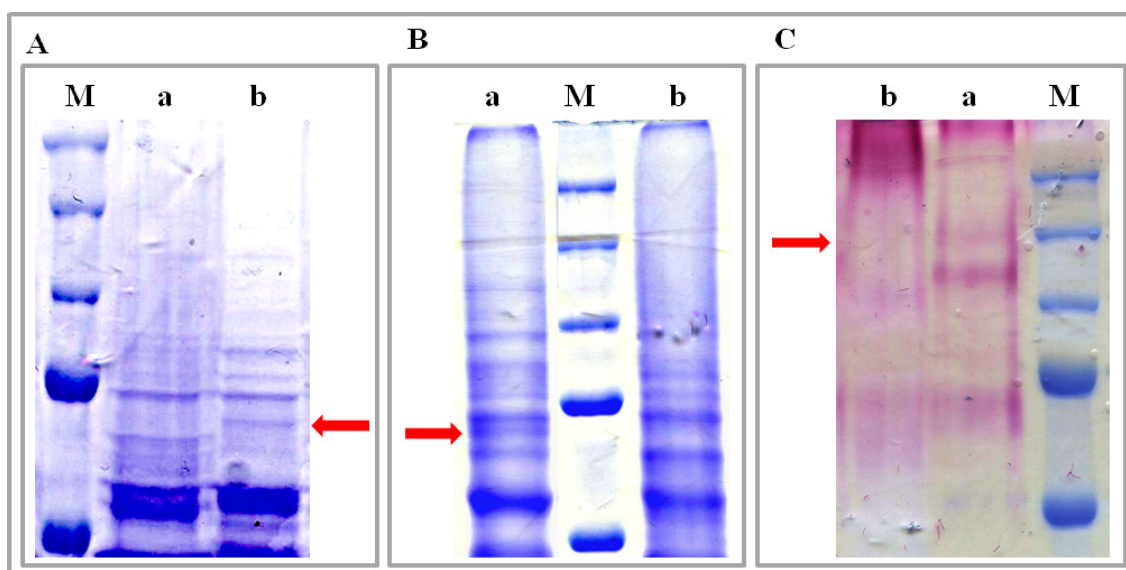


Figura 33. Proteína Fpg1p en PAGE. A) Proteína extraída con liticasa desde la pared celular (67 kDa). B) Proteína extraída por el método post-alkali (67KDa). C) Proteína glicosilada precipitada por el método de KDS-Acetona desde el sobrenadante de la fermentación (100 KDa). M: marcador de pesos moleculares (200 KDa;150 KDa; 100 KDa; 75 KDa; 50 KDa); a: cepa 145A211; b: cepa DHA2-16. La flech indica la posición de la proteína Fpg1p.

11. Estudio de la implicación de la proteína Fpg1p en el fenotipo espumante

Para comprobar la implicación de la proteína Fpg1p en la capacidad de producción de espuma se realizaron dos tipos de ensayo. Por una parte se comparó la habilidad espumante de la cepa silvestre 145A211 comparándola con la de la cepa DHA2-16 *fpg1Δ*, y por otra parte se realizaron ensayos de fermentación para comparar la capacidad para producir espuma de la cepa genética MI2B-pYES2 y la cepa MI2B-FPG1.

11.1. 145A211 vs DHA2-16

Los ensayos de microfermentación empleando como cultivo iniciador la cepa espumante 145A211 y la cepa DHA2-16 mostraron que tras 24h de fermentación la cantidad de espuma era mayor en los tubos correspondientes a las fermentaciones con la cepa 145A211 que en los tubos fermentados con la cepa DHA2-16. Aunque tras 48h la cepa DHA2-16 había producido algo más de espuma, ésta no se había mantenido, al contrario de lo que ocurría en la cepa 145A211 (Figura 34A). Así se confirmó que la proteína Fpg1p estaba implicada en la producción de espuma y en el mantenimiento de la estabilidad de la misma.

11.2. MI2B-FPG1 vs MI2B-pYES2

La cepa MI2B-FPG1 había sido transformada con el vector de expresión de *S. cerevisiae* pYES2-FPG1, de manera que para inducir la expresión del gen *FPG1* esta cepa se cultivo en medio de inducción YPGal durante 48 h. El mismo procedimiento se siguió con la cepa MI2B que había sido transformada con el vector pYES2 pero sin el gen *FPG1*, y que se utilizó como control. Transcurrido este tiempo los cultivos se recuperaron por centrifugación y se utilizaron para inocular de mosto de uva. En el mosto la expresión del gen en el vector se detiene porque el promotor GAL1 en presencia de glucosa está inhibido, pero la proteína Fpg1p producida durante la sobreexpresión permanecería en la pared permitiendo comprobar su implicación en la producción de espuma.. Las fermentaciones se mantuvieron durante dos días, y se observó una clara diferencia en la producción de espuma entre los tubos fermentados con cepa control MI2B-pYES2 y los tubos fermentados con la cepa MI2B-FPG1,

Resultados

Capítulo 2: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa vinica 145A211 de *S. cerevisiae*

siendo mayor la cantidad en el segundo caso (Figura 34B). Así se demuestra claramente que la proteína Fpg1p es responsable de la producción de espuma en los vinos.

11.3. Recuperación del fenotipo espumante

Con la finalidad de comprobar la implicación del gen *FPG1* en la producción de espuma la cepa DHA2-16 fue transformada con el vector pYES2-FPG1, sin embargo, previamente fue necesario transformar la cepa DHA2-16 en una cepa *ura⁻*. La delección del gen *URA* se realizó empleando el casete de interrupción URA-loxPKanMXloxP.

La cepa DHA2-16 fue transformada con este casete, obteniéndose numerosos transformantes resistentes a la G418 pero que no eran auxótrofos para el gen *URA*, debido a que eran heterocigotos *URA/ura::URA-loxPKanMXloxP*, de manera que eran capaces de crecer en medio de cultivo SD sin aminoácidos y en presencia de G418. Una cepa homocigota *ura::URA-loxPKanMXloxP/ura::URA-loxPKanMXloxP* se obtuvo como se ha descrito anteriormente, haciendo esporular la cepa heterocigota y seleccionando aquellas esporas resistentes a G418. Una de estas cepas se seleccionó y se transformó con el vector pYES2-FPG1, que complementaba la auxotrofia *ura*. De los transformantes se seleccionó uno aleatoriamente que se cultivó en medio YPGal para inducir la expresión del gen *FPG1*. Posteriormente se utilizó esta cepa inducida para llevar a cabo la fermentación del mosto, observándose que la cepa recuperaba la capacidad para producir espuma que había perdido al deleccionar el gen *FPG1*, de forma que a las 48 h de la fermentación el nivel de espuma producida por la cepa DHA2-16 *ura⁻* era el mismo que en el tubo correspondiente a la cepa 145A211, sin embargo la cantidad de espuma generada por la cepa DHA2-16 *ura⁻* fue mayor que la producida por la cepa 145A211, aunque se habría desestabilizado más que en la silvestre hasta alcanzar el mismo nivel (Figura 34C).

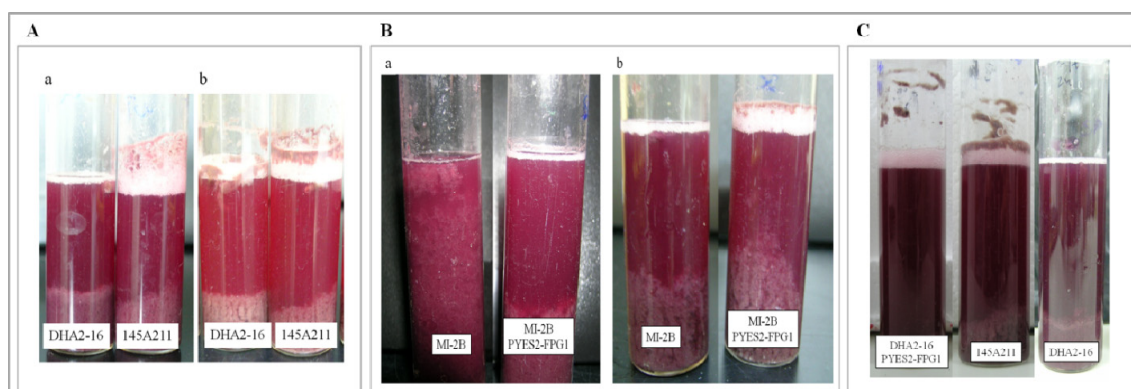


Figura 34. Producción de espuma. A) 145A211 vs DHA2-16. **B)** MI2B-pYES2 vs MI2B-pYES2FPG1. **C)** Recuperación del fenotipo espumante: DHA2-16 *ura⁻* pYES2-FPG1 vs 145A211, DHA2-16.

Discusión

Las cepas silvestres de *S. cerevisiae* se caracterizan por ser cepas prototróficas, homotáticas, heterocigotas, diploides o aneuploides y en algunos casos poliploides, que además tienen una mala capacidad de esporulación y una baja viabilidad de esporas (Pretorius, 2000; Puig *et al.*, 2000). Aunque estas características resultan ventajosas en la naturaleza, ya que por ejemplo la poliploidía supone una defensa frente a la expresión de los genes deletéreos pero por otra parte también genera inestabilidad, además para la elaboración de vinos, la dosis génica debida al nivel de ploidía y la heterocigosidad de los alelos puede resultar en la pérdida de homogeneidad en la calidad de los vinos elaborados con estas cepas (Marullo *et al.*, 2004; Storchová *et al.*, 2006; Blasco *et al.*, 2008).

Cuando se realizó la selección de una cepa que producía gran cantidad de espuma a partir de la cepa vínica silvestre 145 de *S. cerevisiae*, se puso de manifiesto la heterogeneidad de este carácter al obtenerse tras tres meiosis consecutivas niveles de espuma variables en función del clon derivado de espora que se hubiese empleado en la fermentación, probablemente debido a la presencia de alguna aneuploidía. Se observó también que las células espumantes aparecían en la espuma, debido a la presencia de una mayor cantidad de proteínas hidrófobas en la pared celular de estas células, que favorece la adherencia a las burbujas de CO₂ (Chiavari *et al.*, 2000; Shimoi *et al.*, 2002).

La búsqueda del gen responsable de la producción de espuma en la cepa espumante seleccionada 145A211 de *S. cerevisiae*, se realizó en base a la secuencia gen *AWA1* de *S. cerevisiae*, que era hasta el momento el único gen de *S. cerevisiae* descrito e identificado como responsable de la capacidad espumante de la cepa k7 fermentadora de sake (Shimoi *et al.*, 2002, Miyashita *et al.*, 2004). El secuencia génica resultante no era idéntica a ninguna conocida por lo que se estableció que este gen, al que se denominó al gen *FPG1* (Foam Promoting Gene), no había sido identificado hasta el momento y era exclusivo de la cepa vínica 145A211, resultado que se confirmó cuando se analizó la secuencia proteica obteniéndose idénticos resultados.

Así mismo se determinó que el gen *FPG1* codificaba para una manoproteína, Fpg1p, ya que la secuencia proteica presentaba las características típicas de este tipo de proteínas, como son una región rica en serina, otra en treonina, numerosos puntos de O-glicosilación unidos a la serina y a la treonina que actúan como un dominio espaciador entre la región N-terminal que se sitúa hacia el medio y la zona C-terminal que se sitúa

hacia la red de glucanos de la pared celular, 2 punto de N-glicosilación que limita la porosidad de la pared celular confiriéndole protección frente a la entrada de enzimas líticas, un péptido señal y un posible punto de unión al GPI necesario para la incorporación de la proteína en la pared celular (De Nobel *et al.*, 1990; De Groot *et al.*, 2005; Klis *et al.*, 2006; Lesage & Busey, 2006). Estas estructuras confieren una estructura fibrilar a la proteína característica de las proteínas de la pared unidas al GPI (Jentoft, 1990). También es típico de las proteínas de la pared celular unidas al GPI, la estructura presente en Fpg1p consistente en la presencia de un extremo N-terminal hidrofóbico conteniendo un péptido señal que permite la translocación de la proteína en la membrana del Retículo endoplasmático, además del extremo C-terminal hidrofóbico (De Groot *et al.*, 2005). Finalmente la ausencia de motivos dibásicos próximos a al punto de unión al GPI (ω) y la presencia de una isoleucina en la posición ω -1 confirman que Fpg1p es una proteína de la pared celular unida al GPI (Caro *et al.*, 1997; De Groot *et al.*, 2005). Estas proteínas que están presentes en la pared celular y pertenecen al grupo de las GPI-CWP (glicosil fosfatidil inositol cell wall proteins), que a su vez están subdivididas en dos grupos, un primer grupo de proteínas de bajo peso molecular cuya función aunque no se conoce totalmente parece ser estructural actuando como cimentador de la pared celular (Cwp1, Cwp2, Sed1p, Tip1p, Tir1p), y un segundo subgrupo de proteínas de elevado peso molecular, como es el caso de la proteína Fpg1p, que interactúan con materiales presentes en el medio o bien a otras células (Awa1p, Flo1) (Watari *et al.*, 1994; Van der Vaart *et al.*, 1995; Shimoi *et al.*, 1998; Shimoi *et al.*, 2002; De Groot *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005).

Los análisis de homología tanto de la secuencia de nucleótidos como de la secuencia de aminoácidos confirmaron que ésta es una manoproteína, ya que fundamentalmente solo presentaba homología con otras manoproteínas. Se observó, además, que al alinear la secuencia de Fpg1p frente a las proteínas con las que es homóloga, los mejores alineamientos se obtienen con las proteínas Hpflp y con otras proteínas homólogas también a Hpflp, en su mayoría pertenecientes a distintas cepas vínicas de *S. cerevisiae*. También se encontró homología con la proteína espumante Awa1p. Todas estas proteínas son manoproteínas presentes en la pared celular de *S. cerevisiae*, que presentan el mismo patrón estructural que Fpg1p.

De todas ellas solamente *Awa1p* está implicada en la producción de espuma, *Hpf1p* es una proteína que elimina la turbidez de los vinos, y en el resto de los casos la función es desconocida (Shimoi *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2007).

Tanto la región N-terminal como la C-terminal de *Fpg1p*, son homólogas a estas manoproteínas, sin embargo la región central no es homóloga a ninguna otra proteína, esta región es rica en Ser y está muy O-glicosilada, por lo que probablemente sea la región responsable del carácter espumante. En la proteína *Awa1p* existe también una región rica en Ser que fue la que se estableció como responsable de la producción de espuma, pero que tenía homología con *YJR151c*, en este caso también está muy O-glicosilado. *Hpf1p*, sin embargo, no está implicada en la producción de espuma, aunque es una proteína muy glicosilada está menos O-glicosilada que *Fpg1p* y *Awa1p*. La glicosilación de la proteína favorece la estabilización de la espuma, ya que los grupos glicano hidrofílicos, que se corresponden con la región osídica de la proteína, se sitúan en la región acuosa que existe entre las burbujas de gas de la espuma aumentando la viscosidad de esta región, y disminuyendo el drenaje del líquido. Al mismo tiempo estos carbohidratos protegen a las proteínas de la desnaturalización por efecto del etanol presente en las bebidas y aumenta su solubilidad (Senée *et al.*, 1999; Maujean, 2003).

Aquellos genes que presentaban mayor homología con *FPG1*, *AWA1* y *HPF1* junto con sus homólogos, están todos localizados en el cromosoma XV, lo que sugería que probablemente el gen *FPG1* estaría situado en el mismo cromosoma (Shimoi *et al.*, 2002; Lafuente & Gancedo, 1999). Sin embargo los primeros estudios sobre genes de levaduras implicados en la producción de espuma en fermentaciones vínicas, realizados por Thornton en 1978, localizaban dos genes identificados como *FRO1* y *FRO2*, en el cromosoma VII, ambos homólogos a otros dos genes productores de espuma de cepas de sake (Thornton, 1978a, Thornton, 1978b). Cuando se trató de localizar el gen *FPG1* mediante Southern blot no se obtuvo un resultado concluyente, ya que se observó hibridación tanto en el cromosoma XV como en el VII, debido a la gran homología existente entre las secuencias de las manoproteínas, como se observó cuando se realizaron los análisis de homología. Finalmente mediante mapeo genético se estableció que el gen espumante *HPF1* estaba ubicado en el cromosoma VII, al igual que los genes *FRO1* y *FRO2*. Es posible que el gen que hemos secuenciado en este estudio, sea uno de los dos genes anteriormente mapeados pero la distancia de éste al marcador *cyh2*, parece indicar que no es así, ya que tanto *FRO1* como *FRO2* se encuentran ubicados en

el brazo derecho (R) del cromosoma VII, mientras que el gen mapeado por nosotros se encuentra en el brazo izquierdo (L). Como el gen *FPGI* no había sido mapeado con anterioridad, suponemos que puede ser exclusivo de la cepa vínica espumante 145A211, y que haya surgido como consecuencia de la inestabilidad genética presente en las cepas vínicas silvestres de *S. cerevisiae*, que sin embargo no aparece en las cepas genéticas. Esta inestabilidad es debida a la adaptación de estas cepas al proceso de fermentación, y son en su mayoría procesos de duplicación génica, poliploidía, reestructuraciones cromosómicas, hibridación interespecífica e introgresiones (Barrio *et al.*, 2006; Novo *et al.*, 2009).

Para el estudio fenotípico de la proteína Fpg1p, en primer lugar se obtuvo un mutante *fpg1Δ* al que se llamó DHA2-16, que fue empleado como control negativo en las pruebas. Debido a que los análisis previos indicaban que Fpg1p era una manoproteína que estaría situada en la pared celular, los análisis que se realizaron estaban centrados fundamentalmente en ella.

Los análisis mostraron que apenas existían diferencias fenotípicas entre la cepa 145A211 y la cepa DHA2-16, únicamente se observaron claras diferencias cuando se realizó el ensayo de sensibilidad a la liticasa. Las manoproteínas unidas al GPI, están unidas al estar β -glucano de la pared celular por lo que son sensibles a enzimas como las β -glucanasa, de manera que aquellas células que tengan algún defecto en la pared celular deberían ser más sensibles a las glucanasas, como la liticasa, que las que tiene la pared celular intacta y que por tanto están protegidas por un mayor número de manoproteínas (Van der Vaart *et al.*, 1995). A pesar de que en estudios previos se había visto que cuando una proteína era eliminada de la pared celular, como en el caso de Cwp2p, las células se volvían más sensibles a la glucanasa con la que se hacía el ensayo, en otros casos en que las proteínas eliminadas eran Gas1p, Tos1p, o Scw4p, se observó que ocurría lo mismo que con Fpg1p, la cepa se volvía más resistente a la enzima (Yin *et al.*, 2005; Shimoï *et al.*, 1998; Kotaka *et al.*, 2010). Durante la fase estacionaria la pared celular se engrosa haciéndose más resistente a la digestión enzimática por glucanasas, en parte debido a cambios que se producen en la estructura de las manoproteínas en las que se altera el patrón de N-glicosilación y aumenta el número de puentes disulfuro, protegiendo la capa de polisacáridos de la acción de estas enzimas, es por ello que en ambas cepas la resistencia a la liticasa aumentó a las 48 h de cultivo (Werner-Washburne *et al.*, 1993). En condiciones de estrés la quitina que

normalmente se une a los extremos no reductores de las cadenas de β -1,3-glucano, aparece unida también a las cadenas de β -1,6-glucano, por ello, la disminución en la sensibilidad a la liticasa en la cepa sin el gen se puede considerar como una consecuencia del estrés producido por la presencia de la liticasa en ausencia de la proteína Fpg1p que supondría la unión de más cantidad de quitina a la pared celular (Klis *et al.*, 2006). El incremento de quitina en la pared celular se verificó tiñendo las cepas con Calcofluor White, fluorocromo con una alta afinidad por la quitina, de manera que la cepa DHA2-16 era a la se unía más Calcofluor White indicando que contiene mayor cantidad de quitina que la cepa silvestre 145A211 (Roncero & Durán, 1985).

Sin embargo, cuando se comprobó la sensibilidad de las cepas al Calcofluor White mediante el cultivo en placas de YPD suplementado con 0.1 % de Calcofluor White, aunque el crecimiento si se vio afectado por la presencia del tinte, no se apreciaron diferencias en el crecimiento entre ambas cepas. Aunque este resultado podría parecer contradictorio con respecto al anterior no lo es, ya que en el anterior se tiñeron directamente las células que ya habían crecido, sin embargo en este caso el crecimiento se inició en presencia de Calcofluor White que incrementa la síntesis de quitina en ambas cepas haciendo que las diferencias entre ellas no sean apreciables, además impide la división de la célula madre y la hija impidiendo la formación del septo (Roncero & Durán, 1995; Ram *et al.*, 2006).

El resultado para la sensibilidad a la liticasa junto con la tinción con calcofluor confirma la presencia de la proteína Fpg1p en la pared celular. El crecimiento de las cepas a 15°C y 37 °C confirma esto, ya que el crecimiento de la cepa DHA2-16 a estas temperaturas es más lento que en la cepa 145A211 es indicativo de un defecto en alguna proteína aunque también indica que el gen *FPG1* no es un gen vital para las células ya que en ese caso la delección debería ser letal (Hampsey, 1997).

Otros resultados, como el obtenido al analizar la tolerancia al etanol no indicaron ningún defecto en la cepa DHA2-16, de manera que la tolerancia al etanol de ambas cepas sería la misma aún a pesar de haber deleccionado el gen *FPG1* en la cepa DHA2-16. El SDS es un detergente tóxico para las células que rompe las interacciones hidrofóbicas que se establecen de forma no covalente entre las glicoproteínas y el 1,3- β -glucano y que supone que los mutantes para la pared celular son más sensibles a esta

sustancia (Mazañ *et al.*, 2008). En este caso tanto la cepa silvestre como la mutada eran completamente sensibles al SDS.

La hidrofobicidad de las células afecta enormemente a la adherencia de los microorganismos a distintos materiales, y en microorganismos como *Candida albicans* está implicada en la virulencia de estas levaduras ya que es responsable de la adhesión a las células epiteliales del organismo (Doyle & Rosenberg, 1990; Masnoka & Hazen, 1997). La hidrofobicidad de la superficie celular en el caso de las levaduras vínicas se analizó ya que está relacionada con la producción y la estabilización de la espuma en el vino. La hidrofobicidad de las células se atribuye a las manoproteínas de la pared celular, de manera que las células se sitúan alrededor de las burbujas de gas con la región hidrofílica de las manoproteínas, que se corresponde con la región O-glicosilada, orientada hacia la fase acuosa de la espuma y la región hidrofóbica, que se corresponde con los extremos N-terminal y C-terminal, orientados hacia la fase gaseosa de la burbuja, así se estabiliza la espuma y se retarda el drenaje del líquido (Marchal *et al.*, 1996; Hornsey, 1999; Senée *et al.*, 1999; Chiavari *et al.*, 2000; Maujean, 2003; Núñez *et al.*, 2006). Las diferencias observadas en el nivel de hidrofobicidad entre ambas cepas a las 24 h permiten establecer la relación de la proteína Fpg1p con la estabilización de la espuma como ya se había observado que ocurría con la proteína Awa1p, que confiere hidrofobicidad a las células y está directamente relacionada con la formación de espuma (Shimoi *et al.*, 2002). La quitina es un polisacárido hidrofílico, y un aumento en la cantidad de ésta en la superficie celular como se observó al analizar la sensibilidad a la liticasa y teñir las células con Calcofluor White, justificaría el incremento en la hidrofobicidad de la superficie celular de las células de la cepa DHA2-16 *fpg1Δ*.

Los análisis organolépticos no mostraron diferencias significativas en los resultados obtenidos para las concentraciones de etanol, glicerol, ácido acético ni pH, obtenidos tanto con la cepa silvestre 145A211 como con la cepa DHA2-16 *fpg1Δ*, lo que sugiere que la proteína Fpg1p no está implicada en el metabolismo de la fermentación.

Durante la fermentación e inmediatamente después de la inoculación del mosto se liberan polímeros de manosas procedentes de las manoproteínas de las levaduras que son liberadas al mosto, esto ocurre como una respuesta indirecta de adaptación al estrés osmótico (Dupin *et al.*, 2000). La falta de la proteína Fpg1p podría haber impedido una

rápida adaptación al estrés osmótico de la cepa DHA2-16 provocando así el retraso en el inicio de la fermentación cuando se empleó esta cepa como pie de cuba.

La posibilidad de extraer la proteína Fpg1p mediante la liticasa, endoglucanasa que rompe los enlaces β -1,3-glucano o por tratamientos post-alkali, se puso de manifiesto al aparecer la banda cercana a los 70 KDa en la calle correspondiente a la cepa 145A211, esto además confirmó que esta proteína es una proteína ubicada en la pared celular y unida a esta mediante el enlace al GPI. También se consiguió liberar la proteína mediante el empleo de NaOH obteniéndose nuevamente una banda cercana a los 70 KDa. La posibilidad de liberar una proteína de la pared celular por estos dos métodos ya se observó que ocurría en el caso de la proteína Cwp1p (cell wall protein 1) de función desconocida. Estos resultados confirmaron la presencia de la proteína Fpg1p en la pared celular de las levaduras y su unión covalente a la red de β -glucanos (Scott & Schekman, 1980; De Groot *et al.*, 2005)

La extracción de esta proteína desde la pared solamente fue posible cuando los cultivos se realizaron en presencia de tunicamicina, que es un inhibidor de la N-acetilglucosamina transferasa que impide la formación de los enlaces N-glicosídicos en la proteína (Elbein, 1981). El tamaño de la proteína procedente de un cultivo tratado con tunicamicina es menor que el de la proteína N-glicosilada lo que favoreció la entrada de la proteína en el gel de SDS-PAGE, mientras que en los casos en que no estaba tratada el nivel de glicosilación aumentaba su tamaño impidiendo su entrada en el gel.

Cuando las proteínas presentes en el sobrenadante de la fermentación del mosto sintético se tiñeron con PAS-Schiff, se observó la presencia de una banda de 75 KDa que no aparecía en la calle correspondiente a la fermentación realizada por la cepa DHA2-16, indicando que esta es la proteína Fpg1p, y que es por tanto una manoproteína ya que este colorante tiñe de rosa las manosas, y que habría sido liberada durante el proceso de fermentación como consecuencia de la acción de la enzima β -1,3 glucanasa cuando las levaduras están creciendo activamente, este proceso hidrolítico está controlado por la célula madre y permite la emergencia de la yema (Giovani & Rosi, 2007). El número de proteínas liberadas en el mosto durante la fermentación es mucho menor que el número de proteínas presentes en la pared celular, por ello la proteína glicosilada habría penetrado en el gel sin problemas.

La proteína Fpg1p estructuralmente presenta las características típicas de las proteínas implicadas en la producción de espuma, las manoproteínas, además también se ha relacionado en este trabajo con la hidrofobicidad a la superficie celular que es una característica muy importante para el mantenimiento de la espuma y finalmente se ha visto que presenta gran homología con la única manoproteína de *S. cerevisiae* implicada en la producción de espuma que se había descrito hasta el momento, la proteína Awa1p (Marchal *et al.*, 1996; Hornsey, 1999; Senée *et al.*, 1999; Chiavari *et al.*, 2000; Shimoï *et al.*, 2002; Maujean, 2003; Núñez *et al.*, 2006). La capacidad espumante de la proteína Fpg1p se puso de manifiesto en las fermentaciones cuando se comprobó que al clonar el gen *FPG1* en la cepa no productora de espuma MI2B esta adquiría la habilidad de generar espuma durante la fermentación. Además se comprobó que al eliminar el gen, la cepa DHA2-16 *fpg1*Δ perdía la capacidad de estabilizar la espuma, ya que aunque la espuma alcanzaba a las 48 h el mismo nivel que alcanzaba con la cepa silvestre, el drenaje de la misma era más rápido haciendo que desapareciese. En este caso nuevamente se observó el efecto de la hidrofobicidad de la quitina que hizo que la espuma aumentase a las 48 h, pero sin embargo la estabilidad conferida por las manoproteínas como la Fpg1p se perdió al eliminar esta proteína, de manera que se impedía que se mantuviese la tensión superficial entre las burbujas de gas y que el líquido drenase más rápidamente (Senée *et al.*, 1999).

La implicación de la proteína Fpg1p en la producción de espuma quedó finalmente demostrada cuando se realizaron los ensayos de recuperación del fenotipo, cuando se transformó la cepa DHA2-16 *ura*⁻ con el vector pYES2-FPG1. Además parece que este gen tiene un efecto acumulativo de manera que se producía más espuma en la cepa transformada con el vector que en la cepa silvestre, debido al mayor número de copias del gen, sin embargo este efecto no se observó en la estabilización de la espuma que fue igual para las dos cepas.

Capítulo 3

**Estudio y análisis del gen responsable del
carácter espumante en la cepa cervecera
Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces
pastorianus***

Objetivos

- Identificación y secuenciación del gen responsable de la producción de espuma en la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces pastorianus*.
- Localización cromosómica del gen responsable de la producción de espuma en la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus*.
- Identificación y análisis de la proteína codificada por el gen responsable de la producción de espuma en la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces pastorianus*.
- Relación entre la proteína y el fenotipo espumante de la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *Saccharomyces pastorianus*.

Resultados

1. Identificación y secuenciación del gen *CFG1*

A partir del ADN genómico de la cepa *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 se realizó una PCR empleando los oligonucleótidos awa11 y awa12. El ADN amplificado se analizó mediante electroforesis, obteniéndose así una única banda de 3408 pb.

El ADN amplificado se clonó en el vector PCR BluntII TOPO y se comprobó su correcta inserción mediante digestión enzimática. La construcción purificada se secuenció empleando los oligonucleótidos M13R y M13F, obteniéndose un ORF de 3408 pb. La secuencia obtenida fue analizada con la herramienta BLAST y se comprobó que no había sido descrita previamente, por lo que la denominó *CFG1* (*Carlsbergensis* Fomaing Gene), y fue incorporada a la base de datos GenBank donde se le asignó el código EU414029.1 (Figura 35).

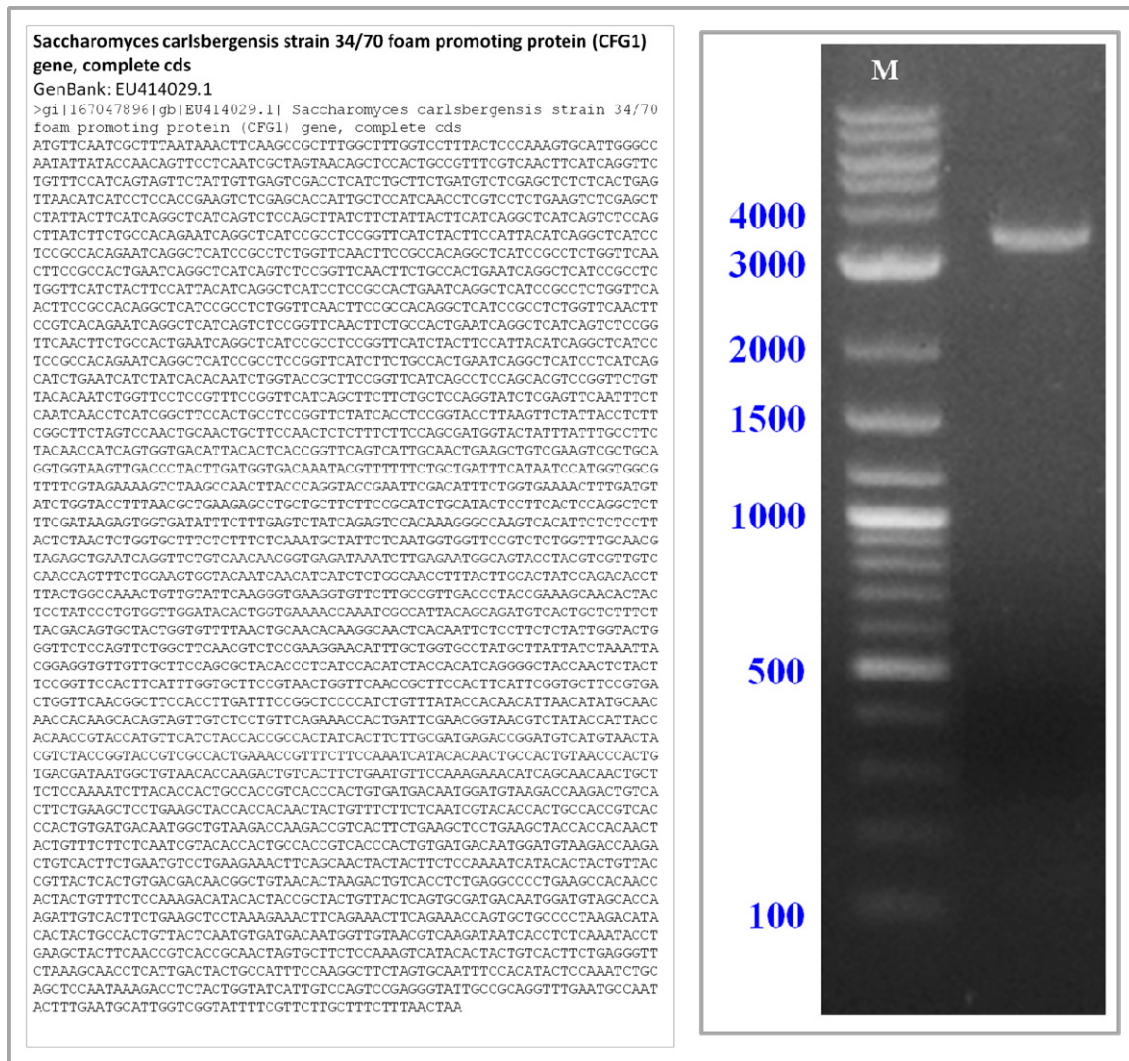


Figura 35. A) Secuencia del gen *CFG1*. B) Banda correspondiente al gen *CFG1* en un gel de agarosa.

2. Análisis de la secuencia de la proteína Cfg1p

El ORF *CFPGI* codificaba para una proteína de 1136 aa (GenBank ABZ10814.1) de pI 4.30 y MW 110976,75 Da, según la herramienta “Compute pI/MW” del ExPASy Proteomic Server. La secuencia aminoacídica de esta proteína denominada Cfg1p fue obtenida con la herramienta bioinformática “translation” del programa informático Vector NTI Advance 10 (Invitrogen).

Además, se comprobó que Cfg1p presentaba los motivos típicos de los precursores de las manoproteínas (Figura 36A), presentes de la pared celular de las levaduras:

- Región N-terminal y C-terminal hidrófobas.
- Péptido señal (aminoácidos 1-24).
- Una región rica en serina (S), que suponía el 25.90% de los aminoácidos (aminoácidos 29 al 389).
- Una región rica en treonina (T), que suponía el 17.80% de los aminoácidos (aminoácidos 686 al 1081).
- Posible punto de anclaje al GPI (aminoácido 1113).
- Numerosos puntos de O-glicosilación.
- 5 puntos de N-glicosilación (aminoácidos 28, 35, 553, 661, 698).

Las modificaciones postraduccionales, debidas a la pérdida del péptido señal y el punto de anclaje al GPI, originaban una proteína de 1089 aa, con un MW de 106086.95 Da y pI 4.26.

La hidrofobicidad de la proteína se analizó con la herramienta ProtScale (ExPASy) y se comprobó que además de los extremos N-terminal y C-terminal hidrófobos, la proteína presentaba una región central hidrófoba entre la región rica en serina y la región rica en treonina (Figura 36B).

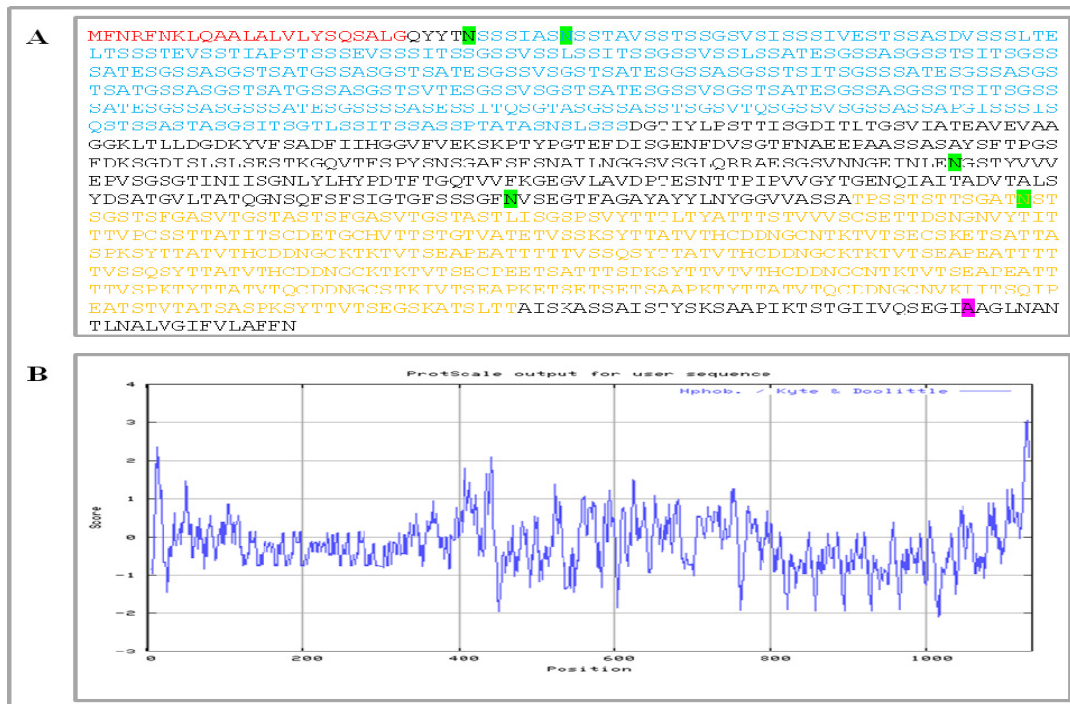


Figura 36. A) Secuencia aminoacídica de la proteína Fpg1p. Rojo: péptido señal; Azul: región rica en Serina; Naranja: región rica en Treonina; Subrayado verde: puntos de N-glicosilación; Subrayado rosa: punto de unión al GPI. B) Análisis de hidrofobicidad de la secuencia utilizando el test de Kyte & Doolittle (1982).

3. Estudio de homología

3.1. Homología del gen *CFG1*

El primer análisis de homología del gen *CFG1* se realizó utilizando la herramienta BLAST. Los mayores niveles de homología encontrados fueron con el gen *AWA1* de la cepa k7 fermentadora de sake, *HPF1* de la cepa SC288, *HPF1* de la cepa EC1118, y con el gen *FPG1* de la cepa vínica 145A211, todos ellos genes codificantes de manoproteínas en *S. cerevisiae*, y excepto el gen *FPG1*, todos ellos localizados en el cromosoma XV. También se encontró homología con otros genes codificantes de proteínas de la pared celular, pero localizados en otros cromosomas, sin embargo el nivel de homología era menor que en los casos descritos anteriormente (Figura 37). Tanto *AWA1* como *FPG1* habían sido descritos como genes espumantes (Shimoi *et al.*, 2002; Blasco *et al.*, 2011).

3.2. Homología de la proteína Cfg1p

El análisis de homología de la proteína se realizó empleando BLASTP. Los resultados obtenidos mostraron que la proteína Cfg1p era muy similar a la proteína espumante

Resultados

Capítulo 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera W 34/70 de *S. pastorianus*

Awa1p. Al mismo tiempo esta proteína presentó una gran homología con la proteína Hpf1p de distintas cepas de *S. cerevisiae* (S288c, FostersB, EC1118, Vin13, AWRI796, Lanvin AQ23, FostersO), todas ellas cepas industriales vínicas excepto la S288c, que es de laboratorio, y las cepas Foster que son cerveceras (Figura 38). Además, presentó también, gran homología con la proteína yil169cp de la cepa S288C, rica en Ser/Thr muy similar a la proteína Hpf1p. También se observó homología con la proteína espumante Fpg1p de la cepa vínica 145A211 de *S. cerevisiae*, aunque en menor medida que la presentada por las secuencias nucleotídicas.

A pesar de la gran homología con la proteína Hpf1p y con Awa1p, existían diferencias notables en el tamaño de estas proteínas y Cfg1p, de más de 100 aa en el primer caso y de 578 aa en el segundo.

La proteína Cfg1p presentaba un nivel de O-glicosilación muy elevado y similar al que presentan las proteínas Awa1p y Hpf1p (Figura 39).

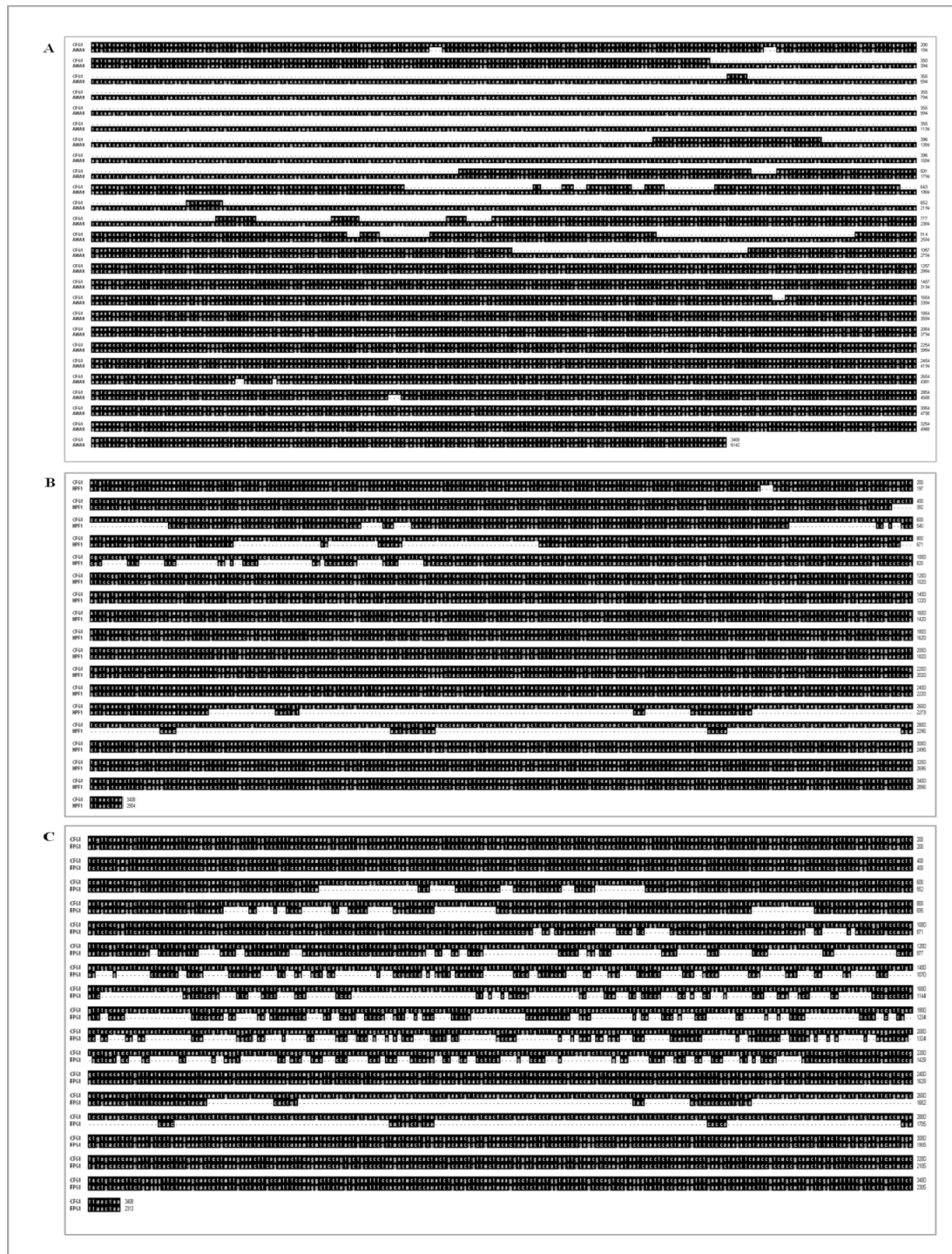


Figura 37. Análisis de homología del gen *CFGI*. A) Homología con *AWAI*. B) Homología con *HPFI*. C) Homología con *FPGI*.

Resultados

Capítulo 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera W 34/70 de *S. pastorianus*

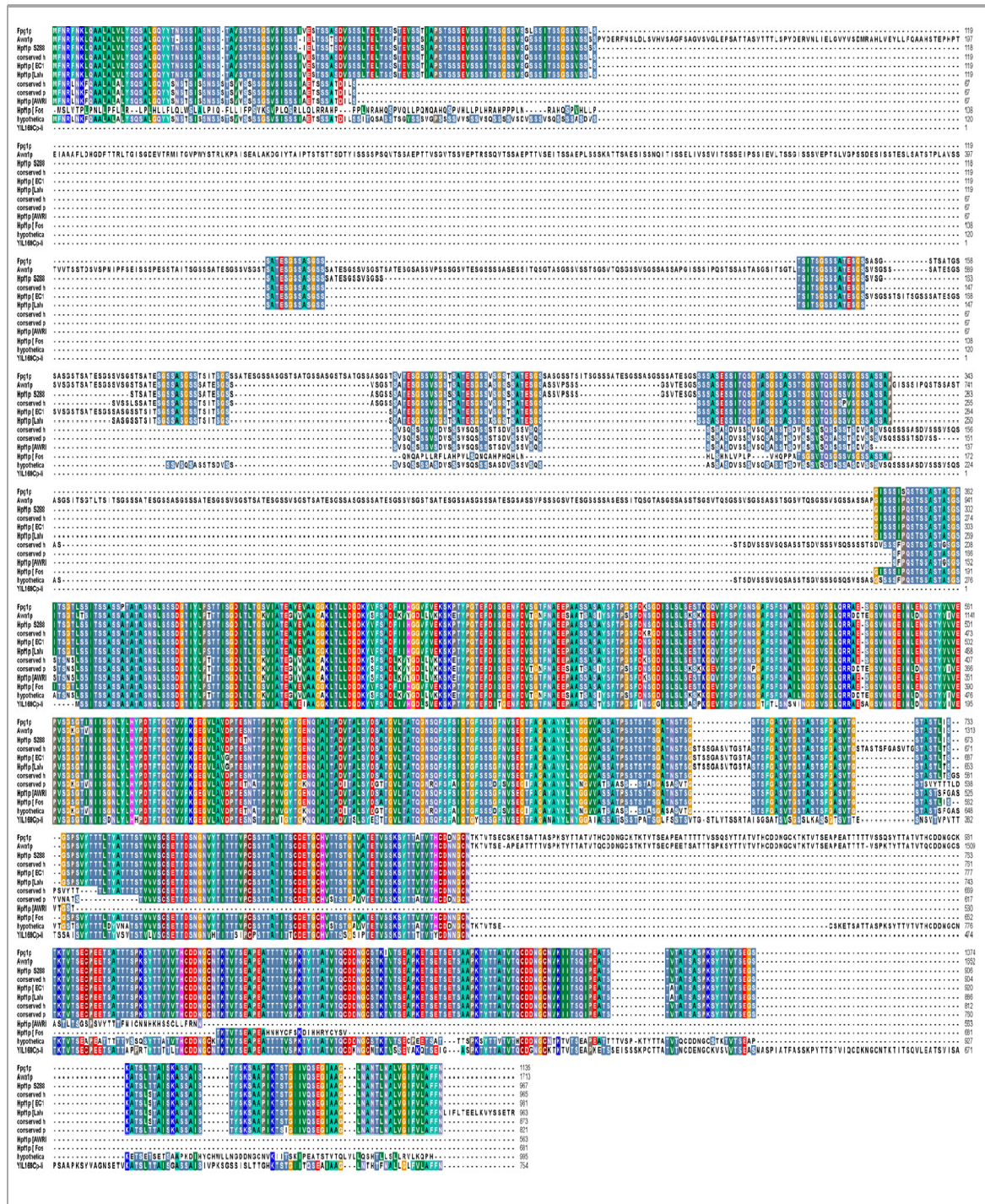


Figura 38. Alineamiento de la proteína Cfg1p. Proteínas en orden descendente: Fpg1p; Awa1p (*S. cerevisiae* k7); Hpf1p (*S. cerevisiae* s288c); Conserved hypothetical protein (*S. cerevisiae* YIL169C) Hpf1p (*S. cerevisiae* EC1118); Hpf1p (*S. cerevisiae* LalvinQA23); Conserved hypothetical protein (*S. cerevisiae* RM11-1a); Conserved protein (*S. cerevisiae* YJM789); Hpf1p (*S. cerevisiae* AWRI796); Hpf1p (*S. cerevisiae* FostersO); Hypothetical protein SCY2333 (*S. cerevisiae* YJM789); YIL169C like protein (*S. cerevisiae* Vin13).

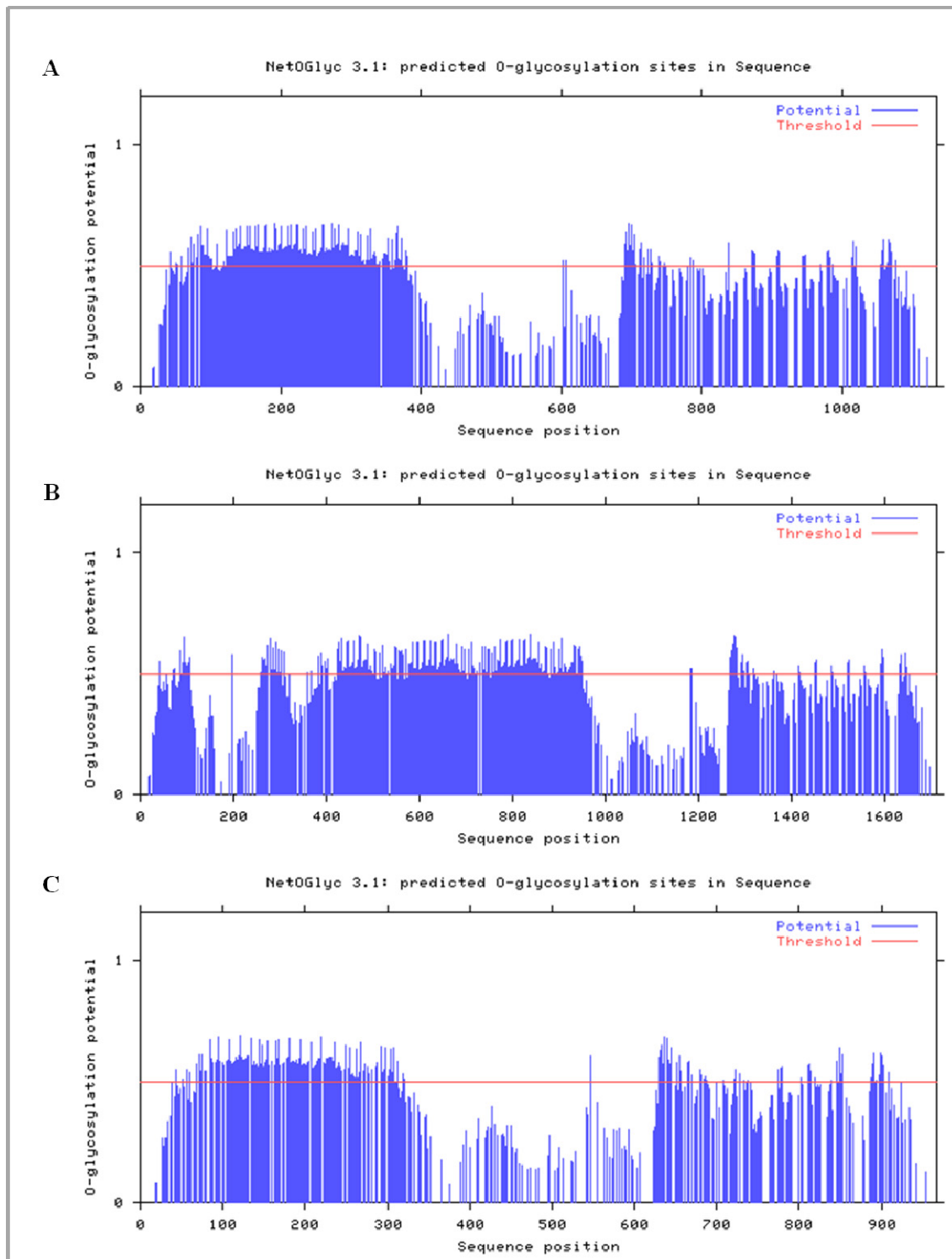


Figura 39. Patrón de O-glicosilación (NetOGlyc 3.1.). A) Cfg1p. B) Awa1p. C) Hpflp.

4. Localización cromosómica del gen *CFG1*

4.1. Southern Blot

Los cromosomas de la cepa Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus* fueron aislados mediante PFGE en un gel de agarosa. Se comprobó que el patrón obtenido se

Resultados

Capítulo 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera W 34/70 de *S. pastorianus*

correspondía con el de esta especie, y que presentaba un mayor número de cromosomas que *S. cerevisiae* ya que es un híbrido entre *S. cerevisiae* y *S. bayanus*.

Una vez separados los cromosomas en el gel, la sonda diseñada para el marcaje del gen *CFG1* se unió en distintas localizaciones, lo que nos indicaba que la sonda se había unido a varios cromosomas como consecuencia de la homología de este gen con distintos genes codificantes de manoproteínas, por lo que no se pudo establecer en cuál de ellos se localizaba el gen (Figura 40).

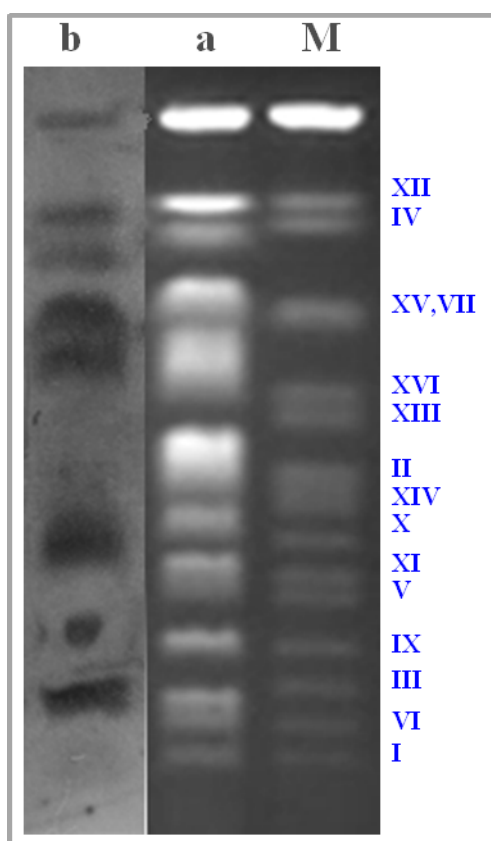


Figura 40. Localización cromosómica del gen *CFG1* mediante Southern Blot. Calle M, Marcador cromosómico de la cepa YNN295; Calle a, cromosomas de la cepa Weihenstephan 34/70 teñidos con bromuro de etidio en gel de agarosa; Calle B, cromosomas hibridados con la sonda para el gen *CFG1*.

4.2. Mapeo mitótico por pérdida de cromosomas

Debido a los resultados inconcluyentes obtenidos con la técnica de Southern Blot se procedió a determinar la ubicación cromosómica del gen *CFG1* mediante la técnica de mapeo por pérdida de cromosomas.

Para poder realizar esta técnica fue necesario, en primer lugar, marcar la cepa SP5 heterotática con el gen de resistencia a G418, de manera que se pueda seguir la segregación del gen sin necesidad de realizar microfermentaciones con cada colonia obtenida.

La cepa heterotalica SP5, obtenida a partir de la cepa Weihenstephan 34/70, fue transformada con el casete de interrupción FPG1-loxPKanMXloxP. Este casete pudo ser utilizada ya que la secuencia del gen *FPG1* y *CFG1* presentaban una secuencia con un alto índice de similitud. Los transformantes fueron seleccionados en medio de cultivo YPD suplementado con G418, y la correcta integración del casete se comprobó mediante PCR, tal como se ha descrito previamente (Capítulo 2, apartado 5.2.). Una colonia transformante fue seleccionada y denominada SPH5, y se utilizó para localizar el gen mediante la resistencia a la G418, sin necesidad de realizar estudios de la capacidad espumante de cada cepa obtenida.

Como los genes con los que presentaba homología *CFG1* estaban ubicados en el cromosoma XV, y este era uno de los cromosomas que aparecían hibridados en la película de revelado, los cruces se realizaron entre la cepa SPH5 y la cepa CSH84L, que presenta auxotrofías en todos los cromosomas y en concreto la auxotrofia *ade2* en el cromosoma XV.

Los diploides obtenidos tras cruzar las cepas SPH5 y CSH84L fueron tratados con benomilo con la finalidad de eliminar los cromosomas homólogos y reducir la carga cromosómica de la cepa. La aparición de colonias diploides resistentes a G418 con la auxotrofia *ade2* lo que permitió mapear el gen *CFG1* en el cromosoma XV del tipo sc.

Debido a la naturaleza poliploide de *S. pastorianus* no fue posible realizar el mapeo meiótico del gen, ya que no daba el patrón de segregación adecuado.

5. Delección del gen *CFG1*

La cepa silvestre de *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 fue transformada con el casete de interrupción FPG1-loxPKanMXloxP. Los transformantes obtenidos se seleccionaron en medio sólido YPD suplementado con G418, ya que éstos debían ser resistentes a la G418 por expresar el gen KanMX presente en el casete de interrupción. La correcta integración del casete se comprobó mediante PCR, utilizando diferentes combinaciones de oligonucleótidos. Cuando se utilizaron los oligonucleótidos *awa11/awa12* se amplificaron dos bandas, una de 3408 pb que se corresponde con el gen *CFG1*, y otra banda de 1635 pb que se correspondía con el gen *CFG1* interrumpido, en consecuencia se dedujo que el casete se había integrado únicamente en uno de los cromosomas. Cuando se realizaron las PCR empleando los oligonucleótidos *awa1/loxPR* y

Resultados

loxPF/awa2 se obtuvieron los tamaños de bandas correctos de 1568 pb y 1573 pb respectivamente, y cuando se utilizaron los oligonucleótidos loxPF/loxPR solamente se obtuvo la banda correspondiente al casete loxP-KanMX-loxP de 1570 pb (Figura 41).

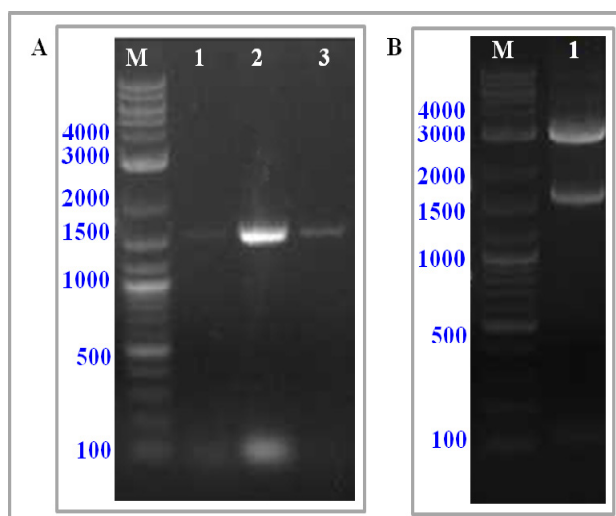


Figura 41. Verificación de la interrupción del gen *CFGI* mediante PCR. A) Oligonucleótidos empleados: loxpF/loxpR (calle 1); awa11/loxpR (calle 2); loxpF/awa12 (calle3). **B)** Verificación de la interrupción del gen *CFGI* en el heterocigoto *CFGI/cfg1::loxPKanMXloxP* Oligonucleótidos empleados: awa11/awa1(calle 1). El marcador de pesos moleculares (M) a la izquierda muestra el tamaño de las bandas en pb

Como los transformantes eran heterocigotos *CFGI/cfg1::FPG1loxPKanMXloxP*, con el fin de obtener células homocigotas para el gen interrumpido se indujo la esporulación seleccionando las esporas resistentes a G418, que al entrar en mitosis dieron lugar a diploides homocigotos con el gen *CFGI* interrumpido. De cada tétrada solamente dos clones derivados de esporas fueron capaces de crecer, lo que indicaba una segregación 2:2 del gen *CFGI*. Nuevamente esto se verificó por PCR con los oligonucleótidos awa11/awa12, obteniéndose una única banda de 1635 pb correspondiente al casete de interrupción (Figura 42).

De los transformantes *cfg1::FPG1-loxPKanMXloxP/cfg1::FPG1-loxPKanMXloxP*, uno de ellos al que se denominó SPHA1, fue seleccionado, y posteriormente transformado con el vector YEp351-cre-cyh, con el que se eliminó el casete loxP-KanMx-loxP, quedando así un diploide *cfg1Δ* sin ningún tipo de resistencia, denominado SPDHA1b.

La eliminación del casete de resistencia loxP-KanMX-loxP se verificó por PCR. Así, cuando se utilizaron los oligonucleótidos awa11/awa12 la banda que se obtuvo era la correspondiente a la parte de los oligonucleótidos que se unía al gen *CFGI*, de 81 pb. Finalmente al utilizar los oligonucleótidos loxPF/loxPR no se obtuvo ninguna banda, con los que se confirmó la correcta eliminación del casete (Figura 42).

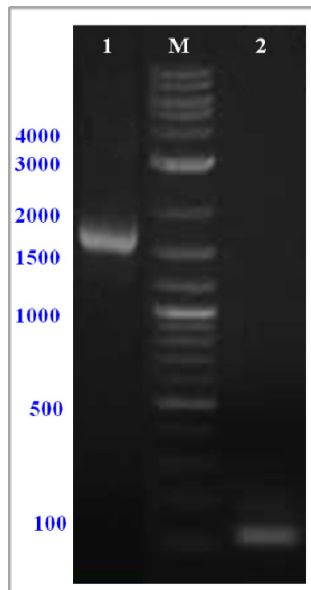


Figura 42. Verificación de la interrupción del gen *CFG1* en la cepa SPHA1 (calle 1) y de la delección del gen (calle 2) en la cepa SPDHA1b Δ *cfg1*. A la izquierda de la imagen se muestra el tamaño de las bandas del marcador de pesos moleculares (M).

6. Pruebas fenotípicas

Con la finalidad de determinar el fenotipo que confiería el gen *CFG1*, las pruebas fenotípicas se realizaron por triplicado empleando la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 y la cepa SPDHA1b *cfg1* Δ .

6.1. Sensibilidad a la temperatura

Las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b se cultivaron en medio YPD a 15°C, 23°C, 30°C y 37°C (Figura 43A). En todos los casos ambas fueron capaces de crecer por igual tras 96 h de cultivo. Se observó que el crecimiento era más lento a 15°C donde ambas cepas tardaron en empezar a crecer aproximadamente 48 h, mientras que en el resto a las 24 h ya se observaba crecimiento. Aunque ambas cepas fueron capaces de crecer a 37°C, se observó un retardo en el crecimiento de la cepa SPDHA1b.

6.2. Crecimiento en SDS al 1%

Las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b se cultivaron en medio YPD sólido suplementado con SDS al 1%. En este caso se observó que era posible observar colonias de la cepa Weihenstephan 34/70 tras 96 h de cultivo, mientras que en el caso de la cepa SPDHA1b apenas apareció crecimiento (Figura 43B).

6.3. Tolerancia al etanol

La presencia de etanol afectó negativamente al crecimiento de ambas cepas.

Resultados

Capítulo 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera W 34/70 de *S. pastorianus*

6.4. Sensibilidad osmótica

Ambas cepas fueron capaces de crecer a todas las concentraciones de etanol ensayadas, y no se observó ninguna diferencia en el crecimiento entre ellas (Figura 43D).

6.5. Sensibilidad al Calcofluor White

No se apreciaron diferencias en el crecimiento de las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b en presencia de Calcofluor white 0,1% (Figura 43C).

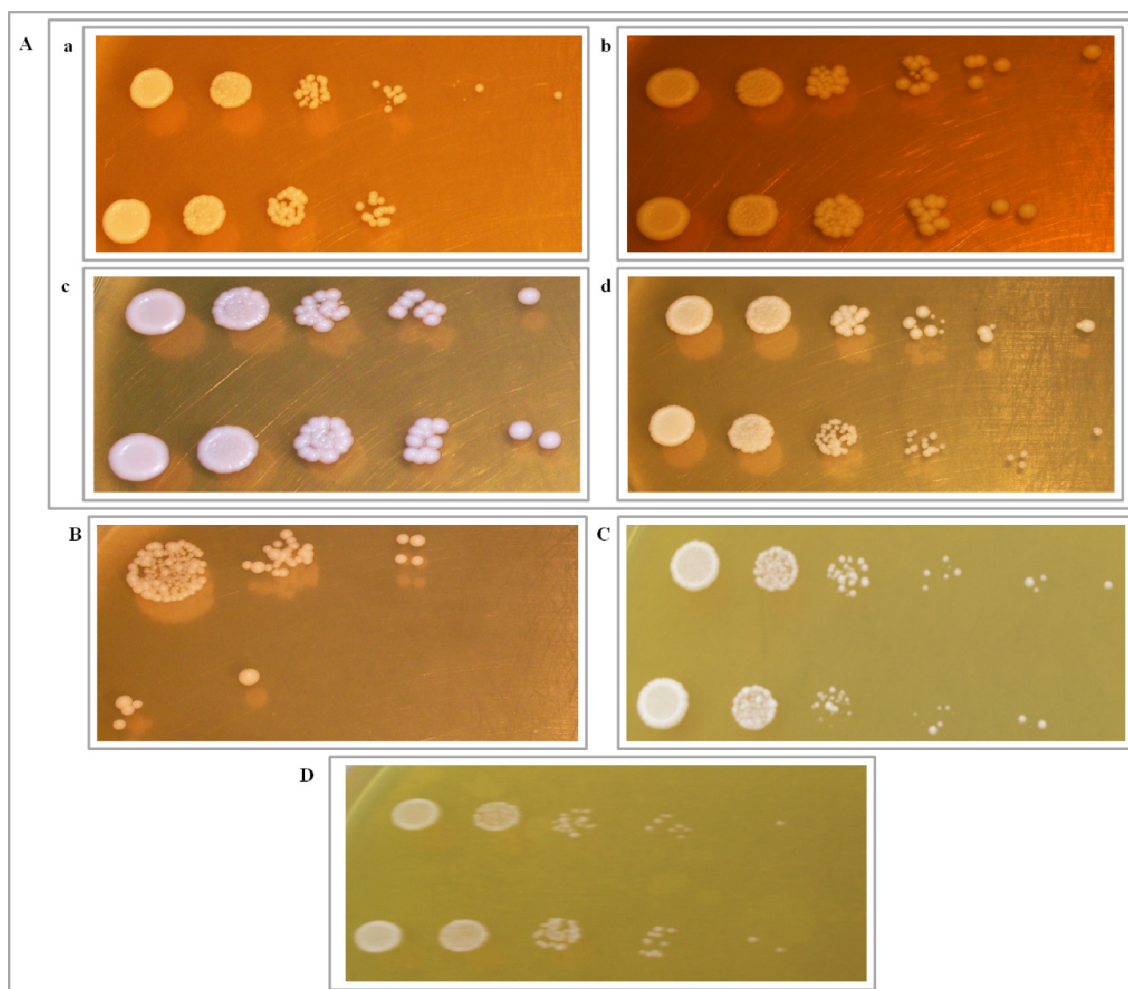


Figura 43. Pruebas fenotípicas de las cepas de *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70 y DHASP1b. A) Crecimiento a distintas temperaturas: 15°C (a), 23°C (b), 30°C (c), 37°C (d). **B)** Crecimiento en presencia de SDS. **C)** Crecimiento en presencia de Calcofluor White. **D)** Crecimiento en presencia de sorbitol.

6.6. Tinción con Calcofluor White

Las células de las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b fueron teñidas con Calcofluor White. 100 μ l de la suspensión de ambas fueron observados en un transiluminador, pero no se apreciaron diferencias entre el brillo de ambas cepas.

6.7. Sensibilidad a la liticasa

Para comprobar la sensibilidad a la liticasa de las cepas 145A211 y DHA2-16, se midió la absorbancia de los cultivos a D.O.₆₀₀ tras 12 h y 48 h de cultivo. Se comprobó que tras 12h de cultivo, la D.O. de la cepa Weihenstephan 34/70 disminuía en un 80% y aunque la cepa SPDHA1b disminuyó prácticamente igual, el descenso en la densidad óptica del cultivo fue más lento que en la cepa Weihenstephan 34/70. En los cultivos que crecieron durante 48h, la pared celular era más gruesa y contenía más β -glucano, se observó que la sensibilidad de la cepa Weihenstephan 34/70 había aumentado con respecto a la que presentaba a las 12h y en el caso de la cepa SPDHA1b apenas era sensible a la liticasa (Figura 44). La diferencia en la sensibilidad entre ambas cepas, indicaba que la proteína estaba ubicada en la pared celular.

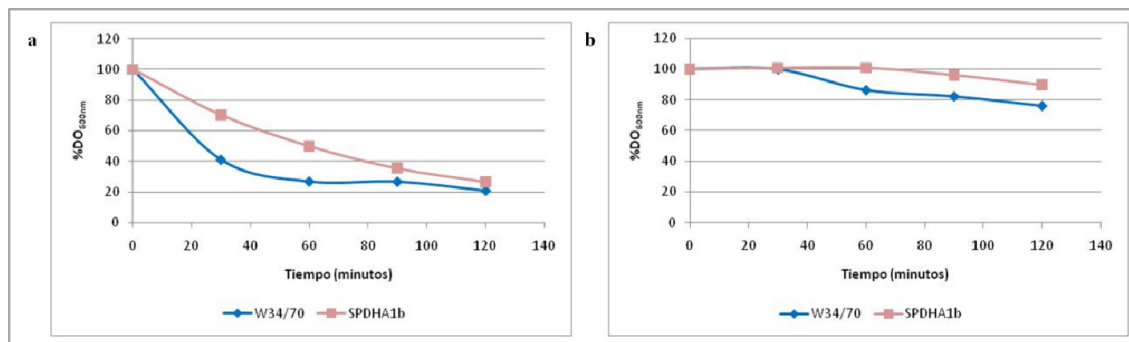


Figura 44. Sensibilidad a la liticasa a las 12 h (a) y a las 48 h (b).

6.8. Hidrofobicidad de la superficie celular

Los ensayos de hidrofobicidad de la superficie celular mostraron diferencias significativas entre la cepa silvestre Weihenstephan 34/70 y la cepa SPDHA1b (Figura 45). Así se comprobó que la pérdida del gen implicaba una pérdida en la hidrofobicidad de la superficie celular de casi un 40% a las 24 h, y que aunque en las dos cepas la hidrofobicidad aumentó a las 48 h, las diferencias entre ambas en este momento eran de más de un 50 %.

Resultados

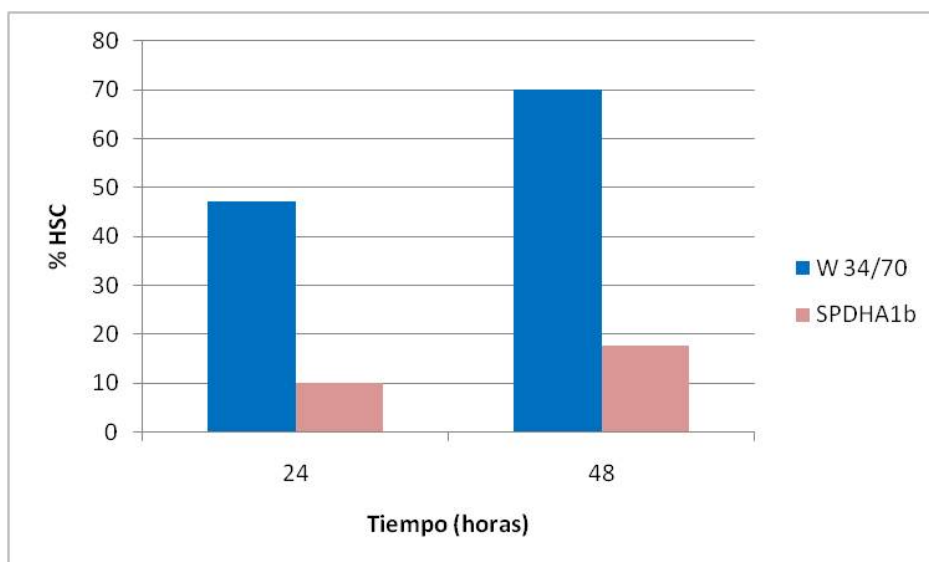


Figura 45. Hidrofobicidad celular de las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b.

7. Microfermentaciones

Las fermentaciones se llevaron a cabo en mosto cervecero utilizando como inóculo las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b. Se midió la cinética de la fermentación así como la concentración de distintos compuestos responsables de las características organolépticas de las cervezas.

7.1. Velocidad de fermentación

La progresión de la fermentación del mosto cervecero se estableció pesando los tubos con el mosto fermentado y estableciendo así la pérdida de peso debida a la pérdida de CO_2 . Se consideró que la fermentación había finalizado cuando los tubos dejaron de perder peso. Se utilizó un control sin inóculo que se utilizó para establecer la pérdida de peso debida a la evaporación.

La fermentación llevada a cabo por ambas cepas tuvo una duración final de 34 días. Aunque la producción de CO_2 fue ligeramente superior en el caso de la cepa SPDHA1b no se hubo diferencias significativas entre ellas en relación a la velocidad de fermentación ni al poder fermentativo (Tabla 8) (Figura 46).

| Cepa | Vf _i | Vf _t | Vf _m | Pf |
|----------------|-----------------|-----------------|-----------------|------|
| W34/70 | 0,01733 | 0,01218 | 0,01476 | 0,72 |
| SPDHA1b | 0,02467 | 0,01515 | 0,01991 | 0,83 |

Tabla 8. Velocidad de la fermentación con las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b. Vf_i: gramos de CO₂ desarrollados durante los 5 primeros días de la fermentación; Vf_t: gramos de CO₂ desarrollados durante toda la fermentación; Vf_m: velocidad fermentativa media de las dos anteriores; Pf: poder fermentativo, máxima producción de CO₂ al final de la fermentación.

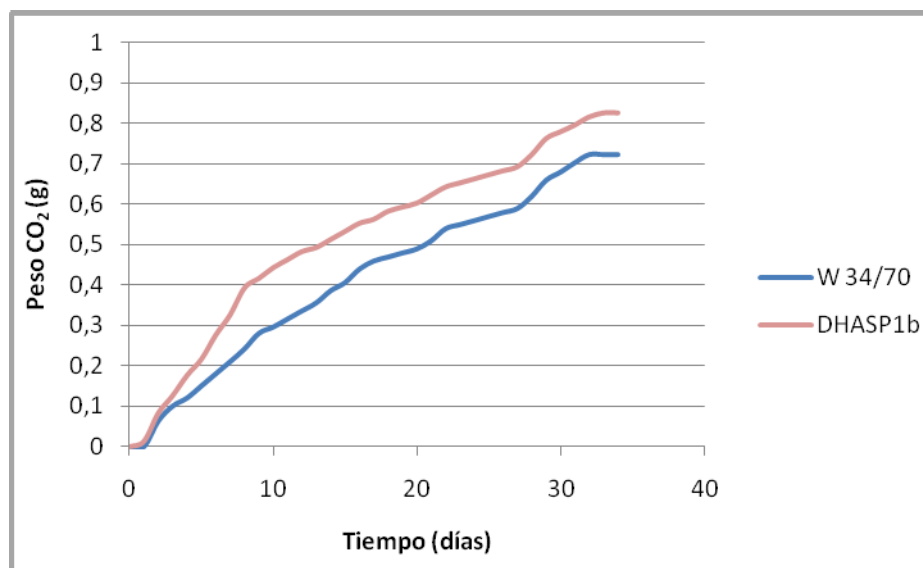


Figura 46. Desarrollo de la producción de CO₂ por parte de las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b.

7.2. Producción etanol

Los niveles de etanol obtenidos tras la fermentación del mosto cervecero con las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b estaban dentro del rango aceptado para las cervezas (Hughes & Baxter, 2001). No se observaron diferencias entre los valores obtenidos con ambas cepas (Figura 47A).

7.3. Producción de ácido acético

Los niveles de ácido acético obtenidos tras la fermentación del mosto cervecero con las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b también estaban dentro del rango aceptado para las cervezas (Hughes & Baxter, 2001). No se observaron diferencias entre los valores obtenidos con ambas cepas (Figura 47B).

Resultados

7.4. Producción de glicerol

Al igual que los niveles anteriores, el glicerol medido tras la fermentación llevada a cabo con las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b presentaba unos valores aceptados para las cervezas (Hughes & Baxter, 2001). No se observaron diferencias entre los valores obtenidos con ambas cepas (Figura 47C).

7.5. pH

Los niveles de pH obtenidos tras la fermentación del mosto cervecero con las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b estaban dentro de los valores aceptados para las cervezas (Hughes & Baxter, 2001). Sin embargo existían diferencias significativas entre el pH de ambas cervezas, siendo ligeramente superior el pH de la cerveza obtenida con la cepa SPDHA1b (Figura 47D).

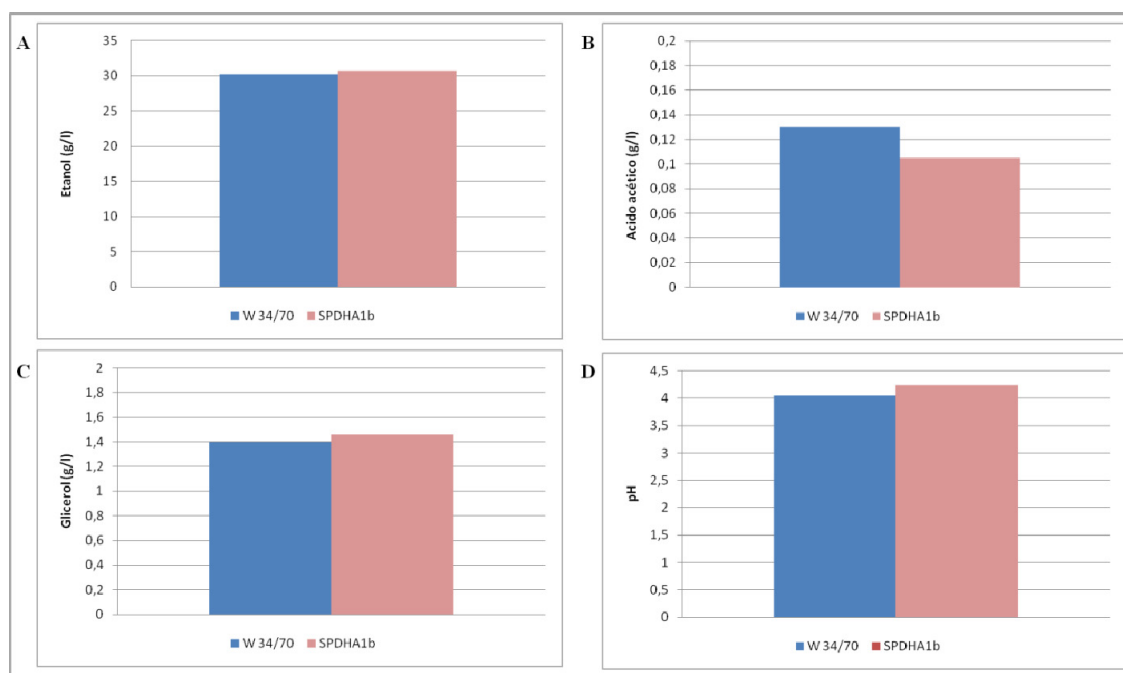


Figura 47. Características organolépticas de los vinos obtenidos con las cepas Weihenstephan 34/70 (W 34/70) y SPDHA1b. A) Concentración de etanol (g/l). B) Concentración de Acido Acético (g/l). C) Concentración de glicerol (g/l). D) pH.

8. Clonación y expresión del gen *CFG1* en la cepa MI2B de *S. cerevisiae*

Con el objeto de determinar la capacidad de producir espuma del gen *CFG1*, se llevó a cabo su clonación en el vector de expresión de *S. cerevisiae*, pYES2, que se expresó en la cepa de *S. cerevisiae* MI2B, previamente seleccionada por no producir espuma durante la fermentación.

8.1. Clonación del gen *CFG1* en el vector en el vector pYES2

El gen *CFG1* previamente clonado en el vector PCR BluntII TOPO se liberó utilizando la enzima de restricción BstXI. Para comprobar que se había liberado el inserto, el producto de digestión se analizó por electroforesis en un gel de agarosa al 0,6%, obteniéndose dos bandas, una de las bandas de 3478 pb que se correspondía con el vector sin el fragmento de 43 pb delimitado por BstXI, y otra banda de 3451 correspondiente al gen *CFG1* de 3408 pb más el fragmento de 43 pb del vector.

El inserto liberado se clonó en el vector de expresión de *S. cerevisiae*, pYES2. El fragmento de ADN correspondiente al gen *CFG1* flanqueado por dos sitios BstXI se ligó en el sitio correspondiente en el vector.

Con la mezcla de ligación se transformó la cepa TOP10 de *E. coli*. Los transformantes se seleccionaron en medio LB suplementado con ampicilina. A partir de varias colonias recombinantes se purificó el vector con el inserto y se digirió empleando la enzima de restricción PstI con la finalidad de determinar en cuales el inserto estaba en la orientación correcta. Se seleccionó una de las construcciones con la orientación adecuada a la que se llamó pYES2-CFG1 (Figura 48).

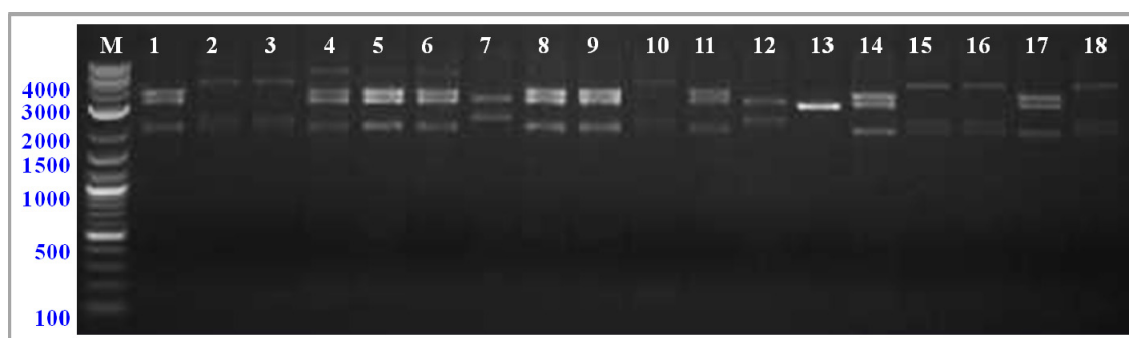


Figura 48. Verificación de la orientación correcta de la construcción pYES2-CFG1 mediante digestión con PstI en 18 clones de *E. coli* TOP10. Clones con la orientación correcta: 1, 4, 5, 6, 8, 9, 11, 14, 17. El tamaño de las bandas (pb) del marcador de pesos moleculares se muestra a la izquierda de la imagen.

El vector pYES2-CFG1 se utilizó para transformar la cepa MI2B de *S. cerevisiae*. Los transformantes se seleccionaron en medio SD sin ningún aminoácido, de manera que solo fueron capaces de crecer aquellas cepas transformadas con el vector pYES2-CFG1, que contenía el gen URA3. Al transformante seleccionado se le denominó MI2B-CFG1.

8.2. Expresión del gen *CFG1*

Tanto la cepa MI2B transformada con el vector pYES2-CFG1, como la cepa MI2B transformada con pYES2 (MI2B-pYES2), que se utilizó como control, se cultivaron inicialmente en medio YPD durante toda la noche hasta que los cultivos alcanzaron la fase exponencial. En este momento se recuperaron por centrifugación se lavaron para eliminar los restos de glucosa que inhibe la expresión del promotor GAL1.

Los cultivos se recuperaron y se sembraron en medio YPGal para inducir la expresión del gen, y en este medio se mantuvieron durante 48 h. Posteriormente los cultivos se recuperaron por centrifugación y se utilizaron bien para inocular mosto o bien para extraer la proteína de la pared celular.

9. Extracción e identificación de la proteína Cfg1p

9.1. Extracción desde la pared celular

La proteína se aisló e identificó a de la pared celular de las levaduras, que se realizó por métodos enzimáticos, empleando SDS, o bien por extracción post-alkali, todos ellos métodos para la extracción de manoproteínas de la pared celular, ya que los resultados previos del análisis de la secuencia sugerían que la proteína Cfg1p era una manoproteína.

Por estos métodos se obtuvo un extracto de manoproteínas procedentes de la pared celular de la cepa Weihenstephan 34/70, MI2B-CFG1 y las cepas empleadas como control SPDHA1b y MI2B-pYES2, respectivamente.

Cuando se utilizó el método de extracción de manoproteínas a partir de las paredes celulares purificadas mediante el uso de SDS no se consiguió ver ninguna diferencia entre la muestra y el control, por lo que se dedujo que este método no era válido para la extracción de la proteína Cfg1p ya que aunque se extrajeron un gran número de proteínas no se observaron diferencias entre las muestras y los controles. Cuando la extracción se realizó con liticasa tampoco se observaron diferencias. Sin embargo con el tratamiento post-alkali, se observaron diferencias entre las cepas Weihenstephan 34/70 y la cepa SPDHA1b, pero sólo cuando habían sido cultivadas en presencia de tunicamicina (Figura 49). En el caso de las cepas MI2B-pYES2 y MI2B-CFG1, no se observaron diferencias entre ellas.

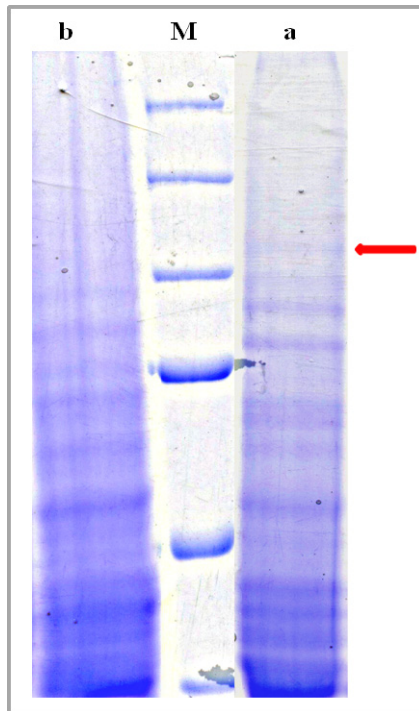


Figura 49. Proteína Cfg1p extraída por el método post-alkali en PAGE. Cepas: Weihenstephan 34/70 (calle a); SPDHA1b (calle b). M: marcador de peso molecular ((200 KDa;150 KDa; 100 KDa; 75 KDa; 50 KDa). La flecha indica la posición de la proteína Cfg1p (105 KDa).

Al observar en el gel las proteínas extraídas con el tratamiento post-alkali, se confirmó la presencia de una banda cercana a los 105 KDa en el carril correspondiente a la cepa Weihenstephan que no aparecía en el carril correspondiente a la cepa SPDHA1b. El tamaño se correspondía además con el tamaño que tiene la proteína Cfg1p tras sufrir las modificaciones postraduccionales.

9.2. Contenido proteico en el sobrenadante

Las proteínas liberadas al mosto durante la fermentación fueron precipitadas por el método del KDS acetona a partir del mosto fermentado por las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b. Cuando las proteínas se separaron en un gel de SDS-PAGE y se tiñeron por el método del PAS-Schiff no se observaron diferencias entre los patrones obtenidos para ambas cepas.

10. Estudio de la implicación de la proteína Cfg1p en el fenotipo espumante

Para comprobar la implicación de la proteína Cfg1p en la capacidad de producción de espuma por parte de las levaduras se realizaron dos tipos de ensayo. Por una parte se comparó la habilidad espumante de la cepa silvestre Weihenstephan 34/70 con la de la cepa SPDHA1b *cfg1Δ*, y por otra parte se realizaron ensayos de fermentación para

Resultados

Capítulo 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera W 34/70 de *S. pastorianus*

comparar la capacidad para producir espuma de las cepas genéticas MI2B-pYES2 y MI2B-CFG1.

10.1. Weihenstephan 34/70 vs SPDHA1b

Las fermentaciones se llevaron a cabo tanto en mosto cervecero como en mosto de uva.

Tras 24 h de fermentación en mosto de uva se observó que en los niveles de espuma eran los mismos en los tubos fermentados con cada una de las cepas. Transcurridas 48 h, sin embargo, la espuma producida por la cepa SPDHA1b había colapsado mientras que el nivel de espuma producido por la cepa Weihenstephan 34/70 se mantenía igual que a las 24 h (Figura 50).

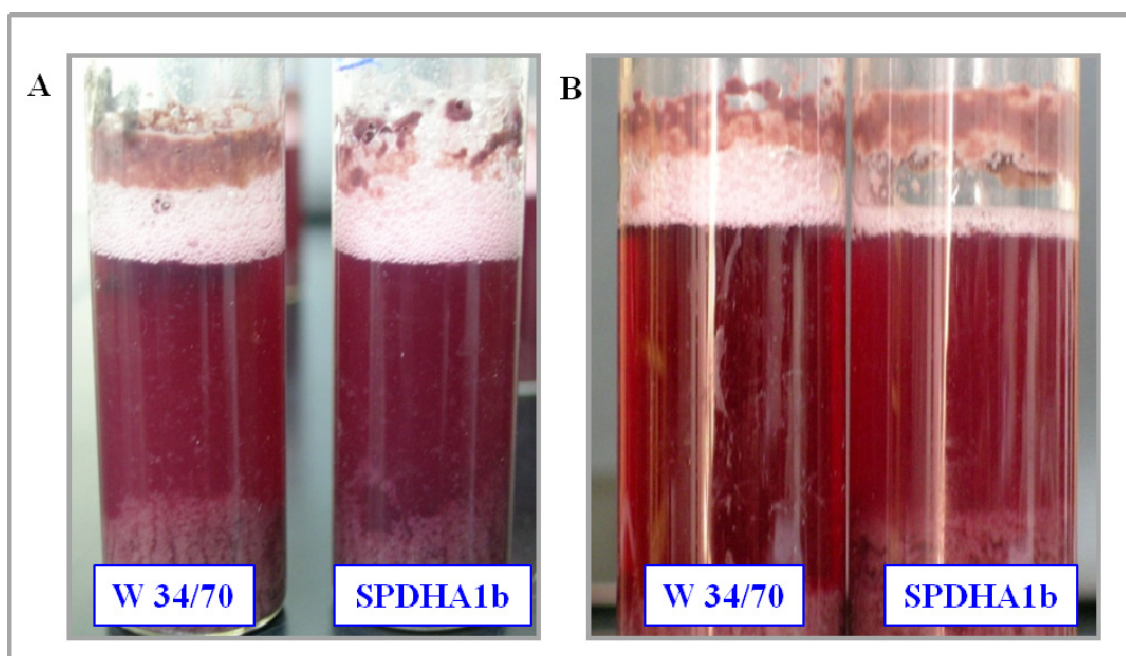


Figura 50. Producción de espuma por parte de las cepas Weihenstephan 34/70 (W34/70) y SPDHA1b. A) 24 h de fermentación. B) 48 h de fermentación.

En el mosto cervecero, sin embargo, el comportamiento de la espuma fue similar para ambas cepas tras 24 h y 48 h de fermentación se observó en mosto.

La medida de la espuma se realizó también una vez finalizada la fermentación, en la cerveza por el método de agitación, comprobándose que la cerveza producida con la cepa Weihenstephan 34/70 da lugar a una espuma más estable que la cepa SPDHA1b que no contiene el gen *CFG1* (Figura 51).

Se realizó un seguimiento de la evolución de la espuma durante el tiempo observando que la espuma producida en la cerveza elaborada con la cepa SPDHA1b se colapsaba más rápido que la producida en la cerveza elaborada con la cepa Weihenstephan 34/70. Además se vio que el tamaño de las burbujas en la espuma producida por la cepa SPDHA1b era mayor que en el caso de la generada por la cepa Weihenstephan 34/70 (Figura 52).

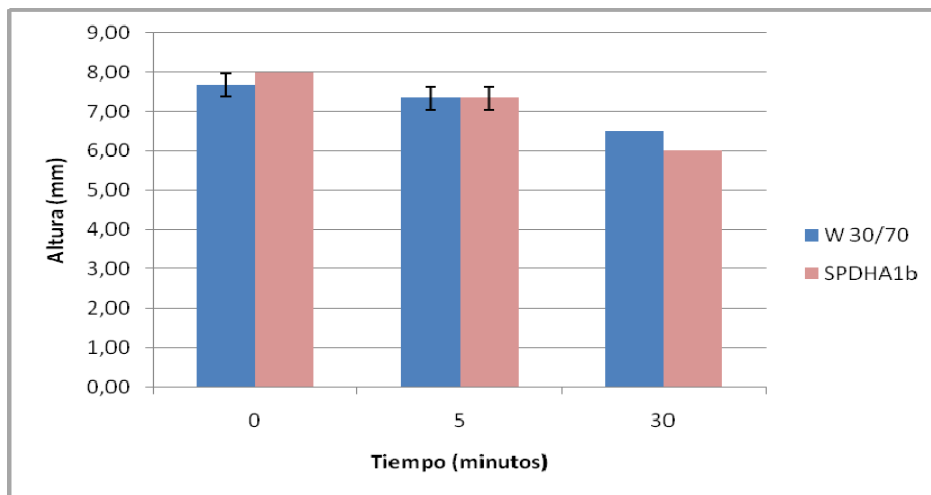


Figura 51. Estabilidad de la espuma. Medida de la altura de la espuma producida en la cerveza fermentada por las cepas Weihenstephan 34/70 (W 34/70) y SPDHA1b tras 5 min y 30 min de haberla generado.

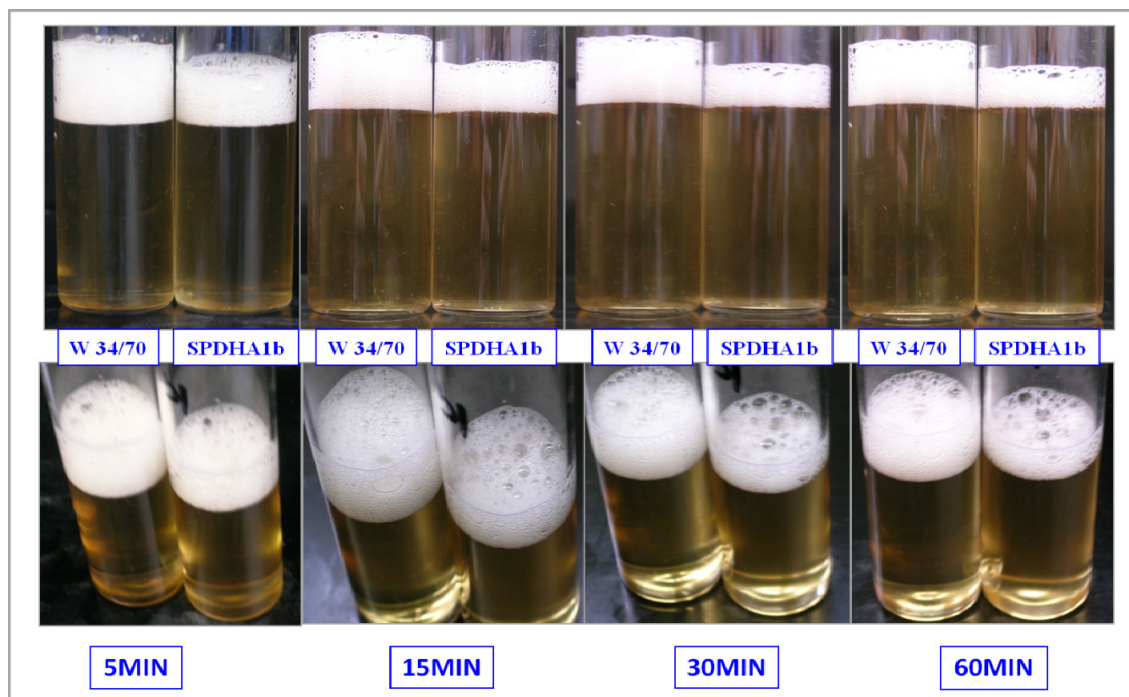


Figura 52. Evolución de la estabilidad de la espuma en la cerveza. La fila superior muestra una visión frontal de la espuma generada por las cepas Weihenstephan 34/70 (W 34/70) y SPDHA1b; La fila inferior muestra una visión superior de la espuma donde se aprecia el tamaño de las burbujas.

Resultados

Capítulo 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera W 34/70 de *S. pastorianus*

10.2. MI2B-CFG1 vs MI2B-pYES2

Para inducir la expresión del gen *CFG1* en la cepa MI2B-CFG1 se cultivó en medio de inducción YPGal durante 48 h. El mismo procedimiento se siguió con la cepa MI2B-PYES2, utilizada como control. Transcurrido el tiempo de inducción, los cultivos se recuperaron por centrifugación y se utilizaron para inocular mosto de uva. Aunque el promotor GAL1 en presencia de glucosa estaba inhibido, la expresión de la proteína Cfg1p debería detenerse en el mosto pero la producida anteriormente debería permanecer en la pared.

Debido a la incapacidad de la cepa MI2B para fermentar mosto cervecero, las fermentaciones se realizaron con mosto de uva. A las 24 h de fermentación apenas se observaron diferencias en los niveles de espuma producidos por las cepas MI2B-pYES2-CFG1 y MI2B-pYES2, sin embargo tras 48 h de fermentación se vió que el nivel de espuma era mucho mayor en los tubos fermentados por la cepa MI2B-CFG1 que en aquellos fermentados con la cepa MI2B-pYES2 (Figura 53).

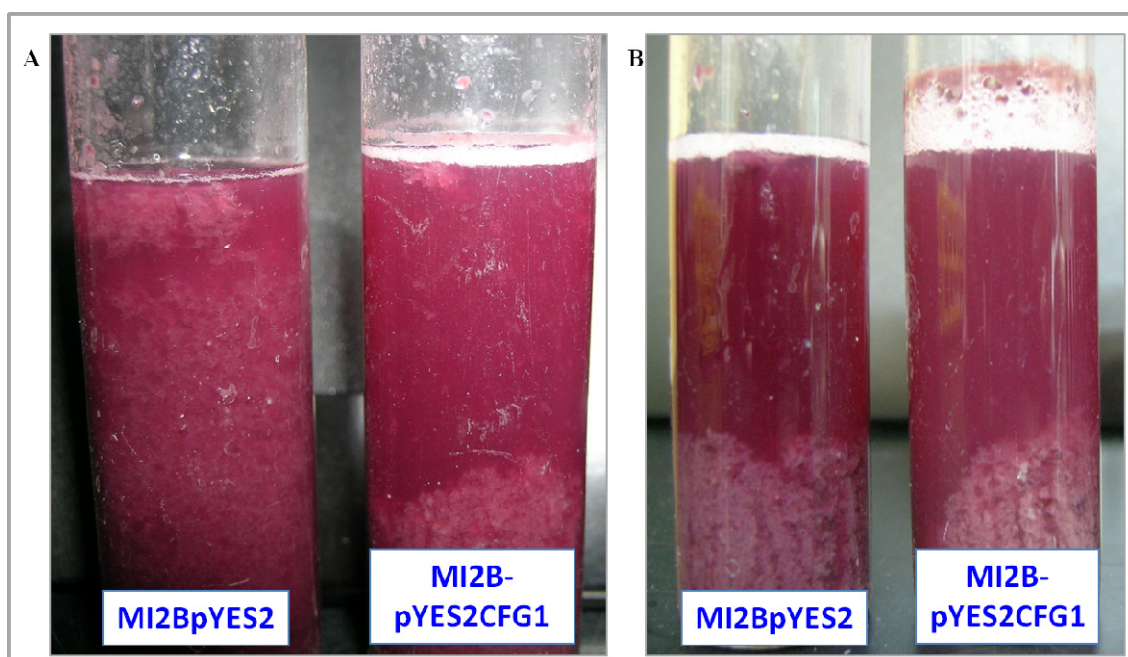


Figura 53. Producción de espuma por parte de las cepas MIB-pYES2 y MI2B-pYES-CFG1. A) 24 h de fermentación. B) 48 h de fermentación.

10.3. Recuperación del fenotipo espumante

La cepa SPDHA1b *cfg1*Δ de *S. pastorianus* fue transformada con el vector pYES2-CFG1 con la finalidad de comprobar si recuperaba el fenotipo espumante. Debido a que esta cepa era protótrofa y que la selección de los transformantes se realizaba por

adquisición del fenotipo URA presente en el vector, fue necesario deleccionar el gen *URA3* mediante la interrupción de este gen con el casete URA-loxPKanMXloxP y posterior eliminación mediante la transformación con el vector YEp351-cre-cyh. Se seleccionó un transformante incapaz de crecer en ausencia de uracilo y se transformó con el vector pYES2-CFG1. Los transformantes obtenidos fueron capaces de crecer en medio sin uracilo lo que confirmó la transformación con el vector. Estos procedimientos se desarrollaron igual que en el caso de la recuperación del fenotipo del gen *FPG1* (Capítulo 2, apartado 11.3.).

Un transformante al que se denominó SPDHA1b *ura⁻* se utilizó como cultivo iniciador en la fermentación del mosto cervecero. Esta misma cepa sin sufrir el proceso de inducción de la expresión del gen *CFG1* fue utilizada como control. El nivel de espuma alcanzado tras 24 h de fermentación con ambas cepas era el mismo, sin embargo a las 48 h en el tubo fermentado con la cepa en la que se había inducido la expresión del gen *CFG1*, el nivel de espuma había disminuido y era menor que en el control (Figura 54).

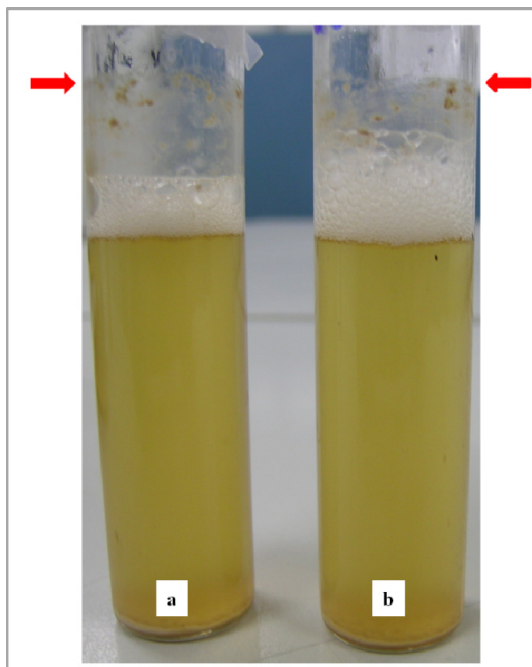


Figura 54. Ensayo de recuperación del fenotipo espumante. Nivel de espuma tras 48 h de fermentación por parte de las cepas SPDHA1b *ura*-pYES2-CFG1 inducido (a) y el control Weihenstephan 34/70 (b). Las flechas indican el máximo nivel de espuma alcanzado en ambos casos.

Discusión

Las levaduras fermentadoras de cerveza pueden pertenecer a la especie *S. cerevisiae* cuando se trata de elaborar cerveza ale, de fermentación alta, o a la especie *S. pastorianus* para elaborar cerveza lager, de baja fermentación. En este estudio utilizó la cepa *S. pastorianus* Weihenstephan 34/70, ampliamente utilizada por la industria cervecera para la elaboración de cerveza lager, y que tiene la capacidad de fermentar el mosto cervecero a temperaturas bajas entre 9°C y 15°C.

Aunque existen numerosos estudios sobre la implicación de las proteínas de la cebada en la producción y estabilización de la espuma, son muy pocos los que han tratado de establecer una relación positiva entre las proteínas de las levaduras cerveceras y la espuma de la cerveza, y hasta el momento no se había identificado ninguna proteína de la levadura que se relacione con la producción o estabilización de la espuma en esta bebida (Dixon & Kirsop, 1969; Hejgaard & Sørensen, 1975; Mohan *et al.*, 1992; Kordialik-Bogacka & Campbell, 2000; Kordialik-Bogacka & Ambroziac, 2004; Douglas *et al.*, 2006).

El gen *CFG1* (*Carlsbergensis* foaming gene) fue identificado tal como se ha descrito a lo largo de este trabajo, con el fin de identificar un gen responsable de la producción y/o el mantenimiento de la espuma en la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus*.

El análisis de la secuencia de la proteína Cfg1p, obtenida a partir de la secuencia génica, mostró que ésta se correspondía con una manoproteína, con la estructura fibrilar característica de las proteínas de la pared celular unidas al GPI, ya que presenta un punto de unión al GPI en el extremo C-terminal orientado hacia los glucanos de la pared y que es el responsable del anclaje de la proteína a la pared celular. La región N-terminal hidrofóbica que está expuesta al medio, mientras que la región central rica en Serina y Treonina presenta múltiples enlaces O-glicosídicos con numerosas cadenas laterales de oligosacáridos, actuando como una región espaciadora entre la región N-terminal donde se encuentra el péptido señal que permite su translocación al retículo endoplasmático, y la región C-terminal (Jentoft, 1990). Esta proteína está altamente N-glicosilada por lo que la proteína presentará una porosidad limitada para impedir la entrada de las enzimas líticas que puedan degradar la pared. Además, el elevado nivel de glicosilación que presenta la proteína Cfg1p la protege de la desnaturalización por parte del etanol presente en la cerveza y aumenta la afinidad de las proteínas por las

Discusión

Capítulo 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera W 34/70 de *S. pastorianus*

burbujas de CO₂ generadas durante la fermentación favoreciendo la estabilidad de la espuma que se genera en la cerveza (De Nobel *et al.*, 1990; Senée *et al.*, 1999; Maujean, 2003; De Groot *et al.*, 2005; Klis *et al.*, 2006; Lesage & Busey, 2006).

Esta estructura es típica de las proteínas que están presentes en la pared celular pertenecientes al grupo de las GPI-CWP (glicosil fosfatidil inositol cell wall proteins), que a su vez están subdivididas en dos grupos, un primer grupo de proteínas de bajo peso molecular cuya función aunque no se conoce totalmente parece ser estructural actuando como cimentador de la pared celular (Cwp1, Cwp2, Sed1p, Tip1p, Tir1p), y un subgrupo de proteínas de elevado peso molecular, como es el caso de la proteína Fpg1p, que interaccionan con materiales presentes en el medio o bien a otras células (Awa1p, Flo1) (Watari *et al.*, 1994; Van der Vaart *et al.*, 1995; Shimoi *et al.*, 1998; Shimoi *et al.*, 2002; De Groot *et al.*, 2005 ; Yin *et al.*, 2005).

El análisis de homología de la secuencia génica mostró una elevada homología con genes codificantes para distintas manoproteínas de la pared celular de *S. cerevisiae*, sobre todo el gen *AWA1* responsable de la producción de espuma por parte de la cepa k7 de *S. cerevisiae* (Shimoi *et al.*, 2002); también presentaba homología con el gen *FPG1*, identificado en este trabajo como responsable de la producción y estabilización de la espuma en la cepa vínica 145A211 de *S. cerevisiae* (Blasco *et al.*, 2011).

El análisis de homología de las proteínas mostró un resultado similar al de las secuencias génicas. Se comprobó que los mayores niveles de homología eran con la proteína Awa1p, manoproteína hidrofóbica que favorece la producción de espuma durante la fermentación del sake, en segundo lugar presentaba homología con la proteína Hpf1p implicada en la eliminación de turbidez de los vinos (Shimoi *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2007). En menor medida presentó homología con la manoproteína Fpg1p identificada en este trabajo y relacionada con la producción y estabilización de la espuma (Blasco *et al.*, 2011).

Los resultados de homología indican la presencia de regiones muy conservadas entre la mayoría de ellas que se corresponderían con el extremo N-terminal y con la región rica en treonina, sin embargo existe una región entre el aminoácido 822 y el 932 de la proteína Cfg1p que solo tiene homología con la proteína Awa1p. Además la proteína Cfg1p y sus homólogas presentan patrones de O-glicosilación muy parecidos.

Los primeros trabajos de búsqueda de genes implicados en la producción de espuma en *S. cerevisiae* realizados por Thornton (1978a,b), identificaron dos genes, *FRO1* y *FRO2*, que aunque no fueron secuenciados, fueron localizados en el brazo derecho cromosoma VII en la posición 143 cM *FRO1* y 127 cM *FRO2*. Otro gen implicado en la producción de espuma en la cepa vínica de *S. cerevisiae*, el gen *FPG1* (Blasco *et al.*, 2011), fue localizado en el brazo izquierdo del cromosoma VII en la posición -119 cM. Sin embargo el resto de los genes que presentan los mayores niveles de homología con el gen *CGFI* están localizados en el cromosoma XV de *S. cerevisiae*.

Cuando se trató de establecer la localización cromosómica del gen *CFG1* mediante Southern Blot, los resultados fueron inconcluyentes debido a la alta similitud de esta secuencia con otras manoproteínas presentes en distintos cromosomas, además la naturaleza híbrida de *S. pastorianus*, con origen en *S. cerevisiae* y *S. bayanus*, hace que presente tres tipos de cromosomas, tipo *S. cerevisiae*, tipo *S. bayanus* y finalmente el tipo híbrido que deriva de la recombinación de los otros dos tipos de cromosomas, de manera que la sonda preparada para el gen *CFG1* podría haber hibridado con genes codificantes para manoproteínas en cualquiera de los tres tipos de cromosomas (Querol & Bond, 2009; Tamai *et al.*, 2000).

La técnica del mapeo genético permitió la localización del gen a nivel cromosomal. El gen *CFG1* se encuentra ubicado en el cromosoma XV, al igual que sucede con el gen *AWA1* y otros genes codificantes para manoproteínas. Además gracias a los análisis de segregación se determinó que este gen estaba en el cromosoma de tipo Sc ya que el casete de interrupción estaba diseñado para el gen *FPG1* de *S. cerevisiae*.

Debido a los resultados obtenidos en el análisis de la secuencia y la homología de la proteína, los análisis fenotípicos de la proteína Cfg1p se centraron fundamentalmente en pruebas para comprobar el efecto de esta proteína sobre la pared celular, ya que parecía la localización celular más probable de la proteína Cfg1p.

La proteína Cfg1p no desempeña ningún papel vital en la célula ya que las levaduras que no la expresaban eran capaces de crecer, con menor o mayor dificultad, a las distintas temperaturas. Además se vio que la ausencia de Cfg1p no afecta a la estabilidad de la pared celular, como se comprobó mediante pruebas de estrés osmótico, crecimiento en etanol o Calcofluor White.

Discusión

Capítulo 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera W 34/70 de *S. pastorianus*

Por el contrario, los resultados obtenidos cuando las cepas se cultivaron en presencia de SDS al 1% indicaron que la proteína Cfg1p debía estar presente en la pared celular ya se observó una mayor sensibilidad por parte de la cepa SPDHA1b al SDS que por parte de la cepa Weihenstephan 34/70. El SDS es un detergente tóxico para las células que rompe las interacciones hidrofóbicas que se establecen de forma no covalente entre las glicoproteínas y el 1,3- β -glucano y que supone que los mutantes para la pared celular son más sensibles a esta sustancia, como es el caso de la cepa SPDHA1b donde la pared celular estaría debilitada por la ausencia de la proteína Cfg1p facilitando así la entrada del SDS que lo que conlleva su lisis (Mazañ *et al.*, 2008).

Los resultados de sensibilidad a la liticasa sugieren que la proteína Cfg1p debe tener un papel en la pared celular, ya que aunque durante el crecimiento en fase exponencial la cepa SPDHA1b es ligeramente más resistente a la liticasa que la cepa Weihenstephan 34/70, la pared de la primera tarda más tiempo en verse afectada por la enzima. El engrosamiento de la pared celular en la fase estacionaria explica el aumento en la resistencia a la liticasa por parte de ambas cepas, sin embargo, en este caso la diferencia entre ambas se hace más notoria. Aunque generalmente una alteración en la pared celular como es la eliminación de una proteína supone una mayor sensibilidad a las glucanasas, se ha visto que hay casos como el de las proteínas Fpg1p, Gas1p, Tos1p, o Scw4p, en que ocurre lo contrario (Yin *et al.*, 2005; Shimoi *et al.*, 1998; Kotaka *et al.*, 2010). Los resultados obtenidos para la resistencia a la liticasa junto con la falta de sensibilidad al Calcofluor White indican que no ha aumentado la cantidad de quitina para cubrir el espacio dejado por Cfg1p, sin embargo, en este caso hay un peor acceso por parte de la β -glucanasa a los β -glucanos, por lo que habrían aumentado las ramificaciones del resto de las glicoproteínas o el número de éstas ocupando el espacio de Cfg1p, como se observaron Yin *et al.* (2005) para Tos1p.

Como se observó al realizar los ensayos para medir la hidrofobicidad celular, la proteína Cfg1p está implicada en este proceso, lo que indica que ésta es una manoproteína de la pared celular, que al igual que la proteína Awa1p, también confiere hidrofobicidad a las células, por lo que es una proteína potencialmente estabilizadora de la espuma (Shimoi *et al.*, 2002).

Los resultados obtenidos cuando se analizaron las características organolépticas de las cervezas elaboradas con la cepa silvestre Weihenstephan 34/70 y la cepa SPDHA1b

cfg1Δ indican que la proteína Cfg1p no está relacionada con la producción de estas características y no tiene un papel metabólico en la fermentación ya que no se apreciaron diferencias entre los valores de etanol, ácido acético y glicerol, además todos ellos se encontraban dentro de los valores aceptados para la cerveza lo que indica que ambas cepas son adecuadas para la producción de la cerveza (Hughes & Baxter, 2001).

La carga eléctrica de las manoproteínas es modificada por el pH del vino o de la cerveza de manera que tienen carga negativa (Vernhet *et al.*, 1996). Además en el género *Saccharomyces* la parte glicosídica de las manoproteínas no solo está compuesta por oligosacáridos neutros como las manosas, sino que contiene oligosacáridos ácidos que contienen manosilfosfatos cuyas cantidades varían de cepa a cepa, estas proteínas al ser liberadas al medio pueden alterar el pH del mismo al tener carga eléctrica negativa (Jigami & Odani, 1999). En el caso de la cerveza producida con las cepas Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b se observó que existían diferencias entre los valores de pH, siendo ligeramente más ácido el pH de la cerveza obtenida con la cepa Weihenstephan 34/70 debido a que en esta está presente la manoproteína Cfg1p que al liberarse al medio por efecto de las β -glucanasas durante la fermentación acidificarían el medio, mientras que en el caso de la cepa SPDHA1b esta proteína no está presente.

La extracción de las manoproteínas puso de manifiesto la ubicación en la pared celular de la proteína Cfg1p, que al únicamente poder ser extraída por el método post-alcali demuestra su unión al GPI. Cuando se precipitaron las manoproteínas presentes en el sobrenadante no se apreciaron diferencias entre la cepa Weihenspehan 34/70 y la SPDHA1b, probablemente debido al gran tamaño que esta proteína debe alcanzar cuando está glicosilada, ya que posee 5 posibles puntos N-glicosilación.

Las características estudiadas para la proteína Cfg1p indican que ésta es una manoproteína que está presente en la pared celular de la cepa Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus*, que además presenta las propiedades estructurales típicas de las manoproteínas implicadas en la producción y estabilización de la espuma, como la hidrofobicidad de la superficie celular, que también se había observado en la proteína Awa1p y en la otra proteína espumante estudiada en este trabajo, Fpg1p (Shimoi *et al.*, 2002; Blasco *et al.*, 2011). Gracias a la hidrofobicidad las células se unen a las burbujas de gas carbónico, producido durante la fermentación, quedando la región hidrofílica

Discusión

Capítulo 3: Estudio y análisis del gen responsable del carácter espumante en la cepa cervecera W 34/70 de *S. pastorianus*

hacia la capa acuosa y la región hidrofóbica de la proteína hacia el gas de la burbuja, esto además ralentiza el drenaje del líquido donde se encuentran.

En el caso de la proteína Cfg1p se comprobó que también estaba implicada en la producción y estabilización de la espuma. Cuando esta proteína fue sobreexpresada en la cepa MI2B de *S. cerevisiae*, esta cepa que no producía espuma, adquirió esta capacidad, demostrándose así que la proteína Cfg1p está implicada en este proceso. Las fermentaciones en mosto cervecero realizadas con la cepa Weihenstephan 34/70 y SPDHA1b demostraron que la proteína Cfg1p está implicada en la estabilización de la espuma, ya que aunque durante la fermentación el nivel de espuma alcanzado fue el mismo en ambos casos, una vez producida la cerveza el drenaje y la desaparición de la espuma era más rápido cuando se utilizaba la cepa sin el gen *CFG1* que cuando se utilizaba como cultivo iniciador la cepa Weihenstephan 34/70. Estas cepas también se emplearon para fermentar mosto de uva de manera que aunque en ambos casos se alcanzaba el mismo nivel de espuma, la espuma del mosto fermentado con la cepa SPDHA1b se colapsaba totalmente a las 48 h de fermentación mientras que en el mosto fermentado con la cepa Weihenstephan 34/70 se mantenía, confirmando nuevamente la interacción de la proteína Cfg1p con las burbujas de gas y por lo tanto su papel en la estabilización de la espuma.

Sin embargo, a pesar de los resultados previos, cuando se realizaron los ensayos de recuperación del fenotipo espumante se comprobó que al sobreexpresar el gen *CFG1* no se recuperaba este fenotipo, al contrario, la espuma se colapsaba más rápidamente que en el control silvestre. Es posible que este resultado sea debido a que la expresión del gen en *S. pastorianus* no sea correcta ya que se utilizó un vector con un promotor para *S. cerevisiae*.

Conclusiones

- Se han heterotalizado la cepa vínica 145A211 de *S. cerevisiae* y la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus*.
- Se ha conseguido cepas competentes para la conjugación a partir de la cepa vínica 145A211 de *S. cerevisiae* y de la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus*.
- El gen *FPGI* (Foam promoting gene) de la cepa vínica 145A211 de *S. cerevisiae* es un gen de 2313 pb que se encuentra localizado en el cromosoma VII de dicha cepa.
- El gen *FPGI* de la cepa vínica 145A211 de *S. cerevisiae*, codifica para una proteína de 771 aa y 72512.22 Da, denominada Fpg1p.
- En la cepa Weihenstephan 34/70 se ha identificado un gen, *CFG1* (*Carlsbergensis* foaming gene), de 3408 pb que se encuentra ubicado en el cromosoma sc XV de dicha cepa.
- El gen *CFG1* codifica para una proteína, Cfg1p, de 1136 aa y 110976,75 Da.
- Tanto la proteína Fpg1p como la proteína Cfg1p son manoproteínas presentes en la pared celular de las levaduras.
- Ni la proteína Fpg1p de la cepa vínica 145A211 de *S. cerevisiae* ni la proteína Cfg1p de la cepa cervecera Weihenstephan 34/70, intervienen en el metabolismo fermentativo de la célula.
- El gen *FGPI* de la cepa vínica 145A211 de *S. cerevisiae* y el gen *CFG1* de la cepa cervecera Weihenstephan 34/70 de *S. pastorianus* son responsables del carácter espumante en cada caso.
- Tanto la proteína Fpg1p como la proteína Cfg1p confieren estabilidad a la espuma.

Bibliografía

-
- Altschul SF, Madden TL, Schäffer AA, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research* **25**: 3389-3402.
- Andrés-Lacueva C, López-Tamames E, Lamuela-Raventós RM, Buxaderas S, de la Torre-Boronat MC (1996a) Characteristics of sparkling base wines affecting foam behaviour. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**: 989-995.
- Andrés-Lacueva C, Gallart M, López-Tamames E, Lamuela-Raventós RM (1996b) Influence of variety and aging on foaming properties of sparkling wine (cava). *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **44**:3826-3829.
- Asano K, Shinagawa K, Hasimoto N (1982) Characterization of haze-forming proteins of beer and their roles in chill haze formation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **40**: 147–154.
- Bamforth CW (2004) The relative significance of physics and chemistry for beer foam excellence: theory and practice. *Journal of the Institute of Brewing* **110**: 259-266.
- Barnett JA (1998) A history of research on yeast. Work by chemists and biologists, 1789-1850. *Yeast* **14**: 1439-1451.
- Barrio E, González SS, Arias A, Belloch C, Querol A (2006) Yeast in Food and beverages. En: *The Yeast Handbook*, vol 2, Querol A & Fleet GH (Eds). Springer, Berlin. pp. 153-174.
- Bech LM, Vaag P, Heinemann B, Breddam K (1995) Throughout the brewing process barley lipid transfer protein protein 1 (LTP1) is transformed into a more foam-promoting form. *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Brussels* **25**: 561-568.
- Birnboim HC & Doly J (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research* **7**: 1513–1516.
- Blasco L, Feijoo-Siota L, Veiga-Crespo P, Villa TG (2008) Genetic stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* oenological strains by using benomyl. *International Microbiology* **11**: 127-132.

Bibliografía

Blasco L, Veiga-Crespo P, Villa TG (2011) FPG1, a gene involved in foam formation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **28**: 437-451.

Bond U, Neal C, Donnelly D, Tharappel CJ (2004) Aneuploidy and copy number breakpoints in the genome of lager yeasts mapped by microarray hybridization. *Current Genetics* **45**: 360-370.

Brand AH, Breeden L, Abraham J, Sternglanz R, Nasmyth K (1985) Characterization of “silencer” in yeast: a DNA sequence with properties opposite to those of transcriptional enhancer. *Cell* **41**: 41-48.

Braunstein m, Sobel RE, Allis CD, Turner BM, Broach JR (1996) Efficient transcriptional silencing *Saccharomyces cerevisiae* requires a heterochromatin histone acetylation pattern. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 4349-4356.

Brissonet F & Maujean A (1991) Identification of some foam-active compounds in champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **44**: 97-102.

Brissonnet F & Maujean A (1993) Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **44**: 297-301.

Brown S, Stockdale VJ, Pettolino F, Pocock KF, de Barros Lopes M, Williams PJ, Burberg F & Zarnkow M (2009) Special production methods. En: *Handbook of Brewing*, Eßlinger HM (ed), Wiley-VCH, Germany. pp. 235-256

Butler G, Kenny C, Fagan A, Kurischko C, Gaillardin C, Wolfe KH (2004) Evolution of the *MAT* locus and its Ho endonuclease in yeast species. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**: 1632-1637.

Calderón M & Blanco L (2005) Análisis multivariado aplicado al mercado mundial de vinos. *Actas de AAEP, XL REUNION ANUAL-UNLP*.

Caridi A (2006) Enological function of parietal yeast mannoproteins. *Antonie van Leeuwenhoek* **89**: 417-422.

Carlsson S (1993) Isolation and characterization of glycoproteins. *Glycobiology. A practical approach*. Fukuda M & Kobata A (eds). Oxford University Press, New York. pp. 1-26.

- Caro LHP, Tettelin H, Vossen JH, Ram AFJ, Van Den Ende H & KlisFM (1997) *In silico* identification of glycosyl-phosphatidylinositol-anchored plasma-membrane and cell wall proteins of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1477-1489.
- Cebollero E, Gonzalez-Ramos D, Tabera L, Gonzalez R (2007) Transgenic wine yeast technology comes of age: is it time for transgenic wine? *Biotechnology Letters* **29**: 191-200.
- Chant J (1996) Generation of cell polarity in yeast. *Current Opinion in Cell Biology* **8**: 557-565.
- Charpentier C & Freyssinet M (1989) The mechanism of yeast autolysis in wine. *Yeast* **5**: 181-186.
- Chiavari C, Zambonelli C, Benevelli M, Caggia C & Tini V (2000) Structure of foam and film forming cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Annals of Microbiology* **50**: 167-176.
- Cilindre C, Liger-Belair G, Villaume S, Jeandet P & Marchal R (2010) Foaming properties of various champagne wines depending on several parameters: grape variety, aging, protein and CO₂ content. *Analytica Chimica Acta* **660**: 164-170.
- Colen L & Swinnen JFM (2010) Beer drinking nations. The determinants of global beer consumption. *LICOS Centre for Institutions and Economic Performance*.
- Coronado JE, Epstein SL, Qiu WG & Lipke PN (2007) Discovery of recurrent sequence motifs in *Saccharomyces cerevisiae* cell wall proteins. *Match (Mulh)* **58**: 281-299.
- Cosma MP (2004) Daughter-specific repression of *Saccharomyces cerevisiae* *HO*: Ash1 is the commander. *EMBO Reports* **5**: 953-957.
- Dambrouck T, Marchal-Delahaut L, Parmentier M, Maujena A, Jeandet P (2003) Immunodetection of proteins from grapes and yeast in white wine. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **51**:2727-2732.
- Dambrouck T, Marchal R, Cilindre C, Parmentier M & Jeandet P (2005) Determination of the grape invertase content (using PTA-ELISA) following various fining treatments versus changes in the total protein content of wine. Relationships with wine foamability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **53**, 8782-8789.

Bibliografia

Davenport RR (1976) Distribution of yeast and yeast-like organisms from aerial surfaces of developing apples and grapes. En: *Microbiology of aerial plant surfaces*, Dickinson CH & Preece TF (eds). *Academic Press*, New York. pp. 325-359.

De Groot PW, Ram AF & Klis FM (2005) Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genetics Biology*, 42,657-675.

De Nobel JG, Klis FM, Priem J, Munnik T & Van den Ende H (1990) The glucanase-soluble mannoproteins limit cell wall porosity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 6: 491-499.

Delneri D, Tomlin GC, Wixon JL, Huter A, Sefton M, Louis EJ, Oliver SG (2000) Exploring redundancy in yeast genome: An improving strategy for use of the cre-loxP system. *Gene* 252: 127-135.

Depraetere SA, Delvaux F, Coghe S, Delvaux FR (2004) Wheat variety and barley malt properties, influence on haze intensity and foam stability of wheat beer. *Journal of the Institute of Brewing* 110: 200-206.

Dixon IJ & Kirsop BH (1969) Factors influencing the formation of a yeast head by brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing* 75: 200-204.

Douglas P, Meneses FJ & Jiranek V (2006) Filtration, haze and foam characteristics of fermented wort mediated by yeast strain. *Journal of Applied Microbiology* 100: 58-64.

Douma AC, Mocking-Bode HHCM, Kooijman M, Stolzenbach E, Orsel R, Bekkers ACAPA & Angelino SAGF (1997) Identification of foam-stabilizing proteins under conditions of normal beer dispense and their biochemical and physicochemical properties. *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Maastricht* 26: 671-679.

Doyle RJ & Rosenberg M (1990) Microbial cell surface hydrophobicity. *American society for Microbiology*, Washington DC.

Dupin IVS, McKinnon BM, Ryan C, Boulay M, Markides AJ, Jones GP, Williams PJ & Waters EJ (2000) *Saccharomyces cerevisiae* mannoprotein that protect wine from protein haze, their release during fermentation and lees contact and a proposal for their mechanism of action. *Journal of Agriculture and Food Chemistry* 48: 3098-3105.

Edwards M, Eschenbruch R & Molan PC (1982) Foaming in wine making. I. A technique for the measurement of foaming in winemaking. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **16**:105-109.

Elbein AD (1981) The tunicamycins-useful tools for studies on glycoproteins. *Trends in Biochemical Sciences* **6**: 219-221.

Evans DE & Hejgaard J (1999) The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part I. The effect of germination and kilning on the level of protein Z4, protein Z7 and LTP1. *Journal of the Institute of Brewing* **105**: 159-169.

Evans DE, Sheehan MC & Stewart DC (1999) The impact of malt derived proteins on beer foam quality. Part II, The influence of malt foam-positive proteins and non-starch polysaccharides on beer foam quality. *Journal of the Institute of Brewing*, *105*(2), 171-177.

Evans E & Bamforth CW (2009) Beer foam, achieving a suitable head. En: *Beer: a quality perspective*, Bamforth CW (ed). Academic Press. Burlington, USA. pp.7-66

Ferreira RB, Piçarra-Pereira MA, Monteiro S, Loureiro V, Teixeira AR (2002) The wine proteins. *Trends in Food Science & Technology* **12**: 230-239.

Feuillat (2003) Yeast macromolecules: origin, composition and enological interest. *American Journal of Enology and Viticulture* **54**: 211-213.

Flanzy C (2003) Enología: Fundamentos científicos y tecnológicos. AMV Ediciones, Mundiprensa, Madrid, Spain.

Fleet GH (1993) The microorganisms of wineaking: isolation , enumeration and identification. En: *Wine Microbiology and Biotechnology*, Fleet GH(ed). Hardwood Academic: Reading. pp. 1-25.

Fleet GH (1998) The microbiology of alcoholic beverages. En: *Microbiology of Fermented Foods*, vol1, Wood BJB (ed). Blackie Academic and Professional: Glasgow. pp. 217-262.

Fleet GH (2008) Wine yeasts for the future. *FEMS Yeast Research* **8**: 979-995.

Bibliografía

Fusi, M, Mainente F, Rizzi C, Zoccatelli G & Simonato B (2010) Wine hazing: a predictive assay based on protein and glycoprotein independent recovery and quantification. *Food Control* **21**: 830-834.

García Garibay M & López-Munguía Canales A. Bebidas alcohólicas no destiladas. *Bioteología alimentaria*. Limusa S.A. Mexico D.F., Méjico.

Gietz RD & Schiestl RH (2007) High-efficiency yeast transformation using the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Nature Protocols* **2**: 31-34.

Giovani G & Rosi I (2007) Release of cell wall polysaccharides from *Saccharomyces cerevisiae* thermosensitive autolytic mutants during alcoholic fermentation. *International Journal of Food Microbiology* **116**: 19-24.

Giudici P, Solieri L, Pulvirenti AM & Cassanelli S (2005) Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. *Applied Microbiology and Biotechnology* **66**: 622-628.

Gjermansen C, Nilsson-Tillgren S, Petersen JGL, Kielland-Brandt MC, Sigsgaard P & Holmberg S (1998) Towards diacetyl-less brewer's yeast. Influence of *ilv2* and *ilv5* mutations. *Journal of Basic Microbiology* **28**: 175-183.

Gonçalves F, Heyraud A, de Pinho MN & Rinaudo M (2002) Characterization of white wine mannoproteins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **50**: 6097-6101.

Goutte C & Johnson AD (1988) a1 protein alters the DNA binding specificity of $\alpha 2$ repressor. *Cell* **52**: 875-882.

Güldener U, Heck S, Fiedler T, Beinhauer J & Hegemann JH (1996) A new efficient disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Research* **24**: 2519-2524.

Haber JE (1992) Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Trends in Genetics* **8**: 446-452.

Haber JE (1998) Mating-type gene switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics* **32**: 561-599.

- Hall TA (1999) BioEdit: an user-friendly biological sequences alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series* **41**: 95-98.
- Hampsey M (1997) A review of phenotypes on *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **13**: 1099-1133.
- Harashima S, Nogi Y & Oshima Y (1974) The genetic system controlling homothallism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* **77**: 639-650.
- Harashima S & Oshima Y (1976) Mapping of the homothallic genes, HML α and HMA α , in *Saccharomyces* yeasts. *Genetics* **84**: 437-451.
- Hejgaard J & Sørensen SB (1975) Characterization of a protein-rich beer fraction by two-dimensional immunoelectrophoretic techniques. *Comptes Rendus des Travaux du Laboratoire Carlsberg* **40**: 187.
- Hejgaard J (1977) Origin of a dominant beer protein, immunochemical identity with a β -amylase-associated protein from barley. *Journal of the Institute of Brewing* **83**: 94-96.
- Herschbach BM, Arnaud MB & Johnson AD (1994) Transcriptional repression directed by the yeast $\alpha 2$ protein in vitro. *Nature* **370**: 309-311.
- Herskowitz I & Oshima Y (1981) Control of cell type in *Saccharomyces cerevisiae*: mating type and mating-type interconversion. En: *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces. Life cycle and inheritance*, Strathern JN, Jones EW & Broach JR (eds). Cold Spring Harbor Laboratory, New York. pp. 181-209
- Herskowitz I (1988) Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* **52**: 536-553.
- Herskowitz I & Jensen JE (1991). Putting the HO gene to work: practical uses for mating-type switching. *Methods in enzymology* **194**: 132-146
- Hicks JB & Herskowitz I (1977) Interconversion of yeast mating types. II. Restoration of mating ability to sterile mutants in homothallic and heterothallic strains. *Genetics* **85**: 373-393.

Bibliografía

Hicks JB, Strathern JN & Herskowitz I (1977) Interconversion of yeast mating types. III. Action of the homothallism (*HO*) gene in cells homozygous for the mating type locus. *Genetics* **85**: 395-405.

Hicks JB, Strathern JN & Klar AJ (1979) Transposable mating type genes in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature* **282**: 478-483.

Hornsey IS (1999) *Elaboración de cerveza. Microbiología, bioquímica y tecnología*. Acribia, Zaragoza, España.

Hough JS, Briggs DE, Stevens R & Young TW (1982) *Malting and Brewing Science*. Chapman & Hall, London, UK.

Hughes PS & Baxter ED (2001) Beer: quality, safety and nutritional aspects. The Royal Society of Chemistry, Manchester, UK.

Iimure T, Nankaku N, Hirota N, Tiansu Z, Hoki T, Kihara M, Hayashi K, Ito K & Sato K (2010) Construction of a novel beer proteome map and its use in beer quality control. *Food Chemistry* **118**: 566-574.

Jaafar L & Zueco J (2004) Characterization of a glycosilphosphatidylinositol-bound cell-wall protein (GPI-CWP) in *Yarrowia lipolytica*. *Microbiology* **150**: 53-60.

Jégou S, Conreux A, Villaume S, Hovasse A, Schaeffer C, Cilindre C, Van Dorsselaer A & Jeandet P (2009) One step purification of the grape vacuolar invertase. *Analytica Chimica Acta* **638**: 75-78.

Jensen R, Sprague GF & Herskowitz I (1983) Regulation of the yeast mating-type interconversion: feedback control of *HO* gene expression by the yeast mating type locus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* **80**: 3035-3039.

Jentoft N (1990) Why are proteins O-glycosylated?. *Trends Biochemical Science* **15**: 291-294.

Jigami Y & Osani T (1999) Mannosylphosphate transfer to yeast mannan. *Biochimica et Biophysica Acta* **1426**: 335-345.

Kaersgaard P & Haejgaard J (1979) Antigenic beer macromolecules, an experimental survey of purification methods. *Journal of the Institute of Brewing* **85**: 103-111.

- Kapp RG & Bamforth (2002) The foaming properties of proteins isolated from barley. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **82**: 1276-1281.
- Kapteyn JC, Van Den Ende H & Klis FM (1999) The contribution of cell wall proteins to the organisation of the yeast cell wall. *Biochimica and Biophysica Acta*, **1426**: 373-383.
- Kasahara H, Ouchi K, Kurata K, Ishido T & Nunokawa Y (1974) Genetic characters of non-foaming mutants of sake-yeast. *Journal of Fermentation Technology* **52**: 348-351.
- Keleher CA, Passmore S & Johnson AD (1989) Yeast repressor alpha 2 binds to its operator cooperatively with yeast protein Mcm1. *Molecular and Cellular Biology* **9**: 5228-5230.
- Klar AJS, Hicks JB & Strathern JN (1982) Directionality of yeast mating-type interconversion. *Cell* **28**: 551-561.
- Klis MF, Mol P, Hellingwerf K & Brul S (2002) Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, **26**, 239-256.
- Klis MF, Boorsma A & De Groot PWJ (2006) Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, **23**, 185-202.
- Kollár R, Reinhold BB, Petrakova E, Yeh HJ, Ashwell G, Drgonova J, Kapteyn JC, Klis FM & Cabib E (1997) Architecture of yeast cell wall. Beta (1→6)-glucan interconnects mannoprotein, beta (1→3)-glucan and chitin. *Journal of Biological Chemistry* **272**: 17762-17775.
- Kordialik-Bogacka E & Campbell I (2000) The development of a non-foaming mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Food Biotechnology*, Bielecki S, Tramper J & Polak J (eds). Elsevier, Amsterdam, Netherlands. pp. 81-86
- Kordialik-Bogacka E & Ambroziak W (2004) Investigation of foam-active polypeptides during beer fermentation. *Journal of the Science of Food and Agriculture* **84**: 1960-1968.
- Kostriken R, Strathern JN, Klar AJS, Hicks J & Heffron F (1983) A site-specific endonuclease essential for mating-type switching in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell* **35**: 167-175.

Bibliografía

Kostriken R & Heffron H (1984) The product of the *HO* gene is nuclease: purification and characterization of the enzyme. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* **49**: 89-96.

Kotaka A, Sahara H, Kuroda K, Kondo A, Ueda M & Hata Y (2010) Enhancement of β -glucosidase activity on the cell-surface of sake yeast by disruption of *SEDI*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **109**: 442-446.

Kurtzman CP & Fell JW (1998) Definition, classification and nomenclature of the yeasts. En: *The Yeasts, A Taxonomic study*, 4th edn, Kurtzman CP & Fell JW (eds). Elsevier Science: Amsterdam. pp. 3-5.

Kyte J & Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *Journal of Molecular Biology* **157**: 105-132.

Lafuente MJ & Gancedo C (1999) Disruption and basic functional analysis of six novel ORFs of chromosome XV from *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **15**: 935-943.

Lao C, López-Tamames E, Buxaderas S & de la Torre-Boronat MC (1996) Grape pectic enzyme treatment effect on white musts and wine composition. *Journal of Food Science* **61**: 553-556.

Lao C, Santamaria A, López-Tamames E, Bujan J, Buxaderas S & de la Torre-Boronat MC (1999) Effect of grape pectic enzyme treatment on foaming properties of white musts and wines. *Food Chemistry* **65**: 169-173.

Leiper KA, Stewart GG & McKeown IP (2003a) Beer polypeptides and silica gel. Part I. Polypeptides involved in haze formation. *Journal of the Institute of Brewing* **109**: 52-72.

Leiper KA, Stewart GG & McKeown IP (2003b) Beer polypeptides and silica gel. Part II. Polypeptides involved in foam formation. *Journal of the Institute of Brewing* **109**: 73-79.

Lesage G & Bussey H (2006) Cell Wall Assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **70**(2), 317-343.

Leisegang R & Stahl U (2005) Degradation of a foam-promoting barley protein by a proteinase from brewing yeast. *Journal of the Institute of Brewing* **111**: 112-117.

- Lewis MJ & Bamforth CW (2006) *Essays in Brewing Science*. Springer, New York.
- Lipke PN & Ovalle R (1998) Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *Journal of Bacteriology* **180**: 3735-3740.
- Loo S & Rine J (1994) Silencers and domains of generalized repression. *Science* **264**: 768-771.
- López-Barajas M, Viu-Marco A, López-Tamames E, Buxaderas S & Torre-Boronat MC (1997) Foaming in grape juices of white varieties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **45**: 2526-2529.
- Lubbers S, Charpentier C, Feuillat M & Voilley A (1994) Influence of yeast walls on the behavior of aroma compounds in a model base wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **45**: 29-33.
- Lusk LT, Goldstein H & Ryder D (1995) Independent role of beer proteins, melanoidins and polysaccharides in foam formation. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **53**: 93-103.
- Ma C & Mortimer RK (1983) Empirical equation that can be used to determine genetic map distances from tetrad data. *Molecular and Cellular Biology* **3**: 1886-1887.
- Maeda K, Yokoi S, Kamada K & Kamimura M (1991) Foam stability and physiochemical properties of beer. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **49**: 14-18.
- Marchal R, Bouquelet S & Maujean A (1996) Purification and partial biochemical characterization of glycoproteins in champenois Chardonnay wine. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, *44*, 1716-1722.
- Martínez-Rodríguez AJ & Pueyo E (2009) Sparkling wines and yeast autolysis. En: *Wine Chemistry and Biochemistry*, Moreno-Arribas MV & Polo MC (eds) Springer Science + Business Media, LLC, New York, USA. pp. 61-80.
- Martini A (1993) Origin and domestication of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Wine Research* **4**: 165-176.

Bibliografía

- Martini A, Ciani M, Scorzetti G (1996) Direct enumeration and isolation of wine yeasts from grape surfaces. *American Journal of Enology and Viticulture* **47**: 435-440.
- Marullo P, Bely M, Masneuf-Pomarede I, Aigle M & Dubourdieu D (2004) Inheritable nature of oenological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Research* **4**: 711-719.
- Masnoka J & Hazen KC (1997) Cell wall mannosylation determines *Candida albicans* cell surface hydrophobicity. *Microbiology* **143**: 3015-3021.
- Maujean A (2003) *Enologia: Fundamentos científicos y tecnológicos*. Flanzky (ed). AMV, Mundiprensa, Madrid.
- Mazaň M, Mazaňová K, Farkaš V (2008) Phenotype analysis of *Saccharomyces cerevisiae* mutants with deletions in Pir cell wall proteins. *Antonie van Leeuwenhoek* **94**: 335-342.
- Mc Cluskey K, Russell BW & Mills D (1990) Electrophoretic karyotyping without the need for generating protoplasts. *Current Genetics* **18**: 385-386.
- Metzenberg RL & Glass NL (1990) Mating type and mating strategies in *Neurospora* *BioEssays* **12**: 53-59.
- Miyashita K, Sakamoto K, Kitagaki H, Iwashita K, Ito K & Shimoi H (2004) Cloning and analysis of the *AWAI* gene of a nonfoaming mutant of a sake yeast. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **97**: 14-18.
- Mohan SB, Smith L, Kemp W & Lyddiatt A (1992) An immunochemical analysis of beer foam. *Journal of the Institute of Brewing* **98**: 187-192.
- Moine-Ledoux V, Perrin A, Paladin I & Dubourdieu D (1997) First results of tartaric stabilization by adding mannoproteins (Manostab). *Journal International des Sciences de la Vigne e du Vin* **31**: 23-31.
- Molina M, Gil C, Pla J, Arroyo J & Nombela C (2000) Protein localization approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microscopy Research and Technique*, **51**, 601-612.

Moreno-Arribas M & Polo MC (2005) Winemaking biochemistry and Microbiology: current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition* **45**: 265-286.

Mundy J & Rogers JC (1986) Selective expression of a provable amylase/proteinase inhibitor in barley aleurone cell: comparison to the barley amylase/subtilisin inhibitor. *Planta* **169**: 51-63.

Murphy JM, Spayd SE & Powers JR (1989) Effect of grape maturation on soluble protein characteristics of Gewürztraminer and White Riesling juice and wine. *American Journal of Enology and Viticulture* **40**: 199-207.

Murray BS & Ettelaie R (2004) Foam stability: proteins and nanoparticles. *Current Opinion in Colloid & Interface Science* **9**: 314-320.

Nakao Y, Kanamori T, Itoh T, Kodama Y, Rainieri S, Nakamura N, Shimonaga T, Hattori M & Ashikari T (2009) Genome sequence of the lager brewing yeast, an interspecies hybrid. *DNA Research* **16**: 115-129.

Nasmyth KA (1982) The regulation of yeast mating-type chromatin structure by SIR: an action at a distance affecting both transcription and transposition. *Cell* **30**: 567-578.

Naumov GI & Tolstorukov II (1973) Comparative genetics of yeast. X. Reidentification of mutators of mating type in *Saccharomyces*. *Genetika* **9**: 81-91.

Novo M, Bigey F, Beyne E, Galeote V, Gavory F, Mallet S, Cambon B, Legras JL, Wincker P, Casaregola S & Dequin S (2009) Eukaryote-to eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**: 16333-16338.

Núñez YP, Carrascosa AV, González R, Polo MC & Martínez-Rodríguez AJ (2005) Effect of accelerated autolysis of yeast on the composition and foaming properties of sparkling wines elaborated by champenoise method. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **53**: 7232-7237.

Núñez YP, Carrascosa AV, González R, Polo MC & Martínez-Rodríguez A (2006) Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction

Bibliografia

potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **54**: 7898-7903.

Omura F, Nakao Y, Teranishi T & Fujita A (2009) High expression levels of cell wall protein Cwp2p decrease the turbidity of fresh lager beer by reducing the size of haze particles. *Journal of the American Society of Brewing Chemists* **67**: 135-140.

Ormrod IHL, Lalor EF & Sharpe FR (1991) Release of yeast proteolytic enzymes into beer. *Journal of the Institute of Brewing* **97**: 441-443.

Palmisano G, Antonacci D & Larsen MR (2010) Glycoproteomic profile in wine: a “sweet” molecular renaissance. *Journal of Proteome Research* **9**: 6148-6159

Patterson HO & Simpson RT (1994) Nucleosomal location of the *STE6* TATA box and Mat alpha 2p-mediated repression. *Molecular and Cellular Biology* **14**: 4002-4010.

Péron N, Cagna A, Valade M, Marchal R, Maujean A, Robillard B, Aguié-Béghin V & Douillard R (2000) Characterization by drop tensiometry and by ellipsometry of the adsorption layer formed at the air/champagne wine interface. *Advances in Colloid and Interface Science* **88**: 19-36.

Perkins D (1949) Biochemical mutants of the smut fungus *Ustilago maydis*. *Genetics* **34**: 607-626.

Polaina J (2002) Brewer's yeast: genetics and biotechnology. En: *Agriculture and Food Production. Volume 2: Applied Mycology and Biotechnology*, Khachatourianus GG & Arora DK (eds.). Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands.

Popolo L & Vai M (1999) The Gas1 glycoprotein, a wall polymer crosslinker. *Biochimica and Biophysica Acta* **1426**: 385-400.

Pretorius IS, Van der Westhizen TJ & Augustin OPH (1999) Yeast biodiversity in vineyards and wineries and its importance to the South African industry. *South African Journal of Enology and Viticulture* **20**: 61-74.

Pretorius IS (2000) Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient art of wine making. *Yeast* **16**: 675-729.

- Pueyo E, Martín-Álvarez PJ & Polo MC (1995) Relationship between foam characteristics and chemical composition in wines and cava (sparkling wines). *American Journal of Enology and Viticulture* **46**: 518-524.
- Puff N, Marchal R, Aguié-Béghin & Douillard R (2001) Is grape invertase a major component of the adsorption layer formed at the air/champagne wine interface?. *Langmuir* **17**: 2206-2212.
- Puig S, Querol A, Barrio E & Pérez-Ortín JE (2000) Mitotic recombination and genetic changes in *Saccharomyces cerevisiae* during wine fermentation. *Applied and Environmental Microbiology* **66**: 2057-2061.
- Puig-Deu M, López-Tamames E, Buxaderas S & Torre-Boronat MC (1999) Quality of base and sparkling wines as influenced by the type of fining agent added pre-fermentation. *Food Chemistry* **66**: 35-42.
- Querol A & Bond U (2009) The complex and dynamic genomes of industrial yeasts. *FEMS Microbiology Letters* **293**: 1-10.
- Rainieri S & Pretorius IS (2000) Selection and improvement of wine yeasts. *Annals of Microbiology* **50**: 15-31.
- Rainieri S & Zambonelli C, Kaneko Y (2003) *Saccharomyces sensu stricto*: systematic, genetic diversity and evolution. *Journal of Bioscience and Bioengineering* **96**: 1-9.
- Ram AF & Klis FM (2006) Identification of fungal cell wall mutants using susceptibility assays based on Calcofluor white and Congo red. *Nature Protocols* **1**: 2253-2256.
- Reboredo NM, Sieiro C, Blanco P & Villa TG (1996) Isolation and characterization of a mutant of *Saccharomyces cerevisiae* affected in the FLO1 locus. *FEMS Microbiology Letters*, *137*(1), 57-61.
- Riese JC & Eßlinger HM (2009) World Beer Market. En: *Handbook of Brewing*, Eßlinger HM (ed). Wiley-VCH, Germany. pp. 497-514.
- Robinson J (1994) *The Oxford Companion to Wine*. Oxford University Press.

Bibliografía

Roncero C & Duran A (1985) Effect of Calcofluor White and Congo Red on fungal cell wall morphogenesis: in vivo activation of chitin polymerization. *Journal of Bacteriology* **163**: 1180-1185.

Saerens SMG, Duong CT & Nevoight E (2010) Genetic improvement of brewer's yeast: current state, perspectives and limits. *Applied Microbiology and Biotechnology* **86**: 1195-1212.

Santa Maria J & Vidal D (1970) Segregación anormal del "mating type" en *Saccharomyces*. *Instituto Nacional de Investigaciones Agrónomas Confederadas* **30**: 1-8.

Schmitt C (2011) Marketing aspects of the brewing process. In Grin Verlag, Norderstedt Germany.

Scott JH & Schekman R (1980) Lyticase: endoglucanase and protease activities that act together in yeast cell lysis. *Journal of Bacteriology* **142**: 414-423.

Senée J, Robillard B & Vignes-Alder M (1999) Films and foams of Champagne wines. *Food hydrocolloids* **13**: 15-26.

Sheehan MC & Skerritt JH (1997) Identification and characterization of beer polypeptides derived from barley hordeins. *Journal of the Institute of Brewing* **103**: 297-306.

Sherman F, Wakem P (1991) Mapping yeast genes. In *Methods in enzymology. Guide to yeast genetics and molecular biology*, vol 194, Guthrie C, Fink GR. (eds). Academic Press, Inc., San Diego, California. pp. 38-56.

Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H & Imura Y & Ito K (1998) Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *Journal of Bacteriology* **180**: 3381- 3387.

Shimoi I, Sakamoto K, Okuda M, Atthi R, Iwashita K & Ito K (2002) The *AWA1* gene is required for the foam-forming phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast. *Applied and Environmental Microbiology* **68**: 2018-2025.

Sieiro C, Reboredo NM & Villa TG (1995) Flocculation of industrial and laboratory strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Industrial Microbiology* **14**: 461-466.

- Sieiro C, Reboredo NM, Blanco P & Villa TG (1997) Cloning of a new FLO gene from the flocculating *Saccharomyces cerevisiae* IM1-8b strain. *FEMS Microbiology Letters* **146**: 109-115.
- Skiver K, Leah R, Muller-Uri, Olsen FJ & Mundy J (1992) Structure and expression of the barley lipid transfer protein gene Ltp1. *Plant Molecular Biology* **18**: 585-589.
- Soll DR, Pujol C & Thyagarajan Y (2009) Sex. Deviant mating in yeast. *Current Biology* **19**: 9-11.
- Sørensen SB & Ottesen M (1978) Fractionation and characterization of beer proteins. *Carlsberg Research Communications* **43**: 133-144.
- Sørensen SB, Bech LM, Muldbjerg M, Beenfeldt T & Breddam K (1993) Barley lipid transfer protein 1 is involved in beer foam formation. *Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas* **30(4)**: 136-145.
- Stewart GG, Mader A, Chlup P & Miedl M (2006) The influence of process parameters on beer foam stability. *Technical Quarterly of the Master Brewers Association of the Americas* **43**: 47-51.
- Stone EM & Pillus L (1998) Silent chromatin in yeast: an orchestrated medley featuring Sir3p. *BioEssays* **20**: 30-40.
- Storchová Z, Breneman A, Cande J, Dunn J, Burbank K, O'Toole E & Pellman D (2006) Genome-wide genetics analysis of polyploidy in yeasts. *Nature* **443**: 541-547.
- Stratford M (1994) Another brick in the wall? Recent developments concerning the yeast cell wall. *Yeast* **10**: 1741-1752.
- Strathern JN & Herskowitz I (1979) Asymmetry and directionality in production of new cell types during clonal growth: the switching pattern of homothallic yeast. *Cell* **17**: 371-381.
- Strathern JN, Klar AJS, Hicks JB, Abraham JA, Ivy JM, Nasmyth KA & McGill C (1982) Homothallic switching of yeast mating type cassettes is initiated by a double-stranded cu in the *MAT* locus. *Cell* **31**: 183-192.

Bibliografía

Straver MH, Smit G & Kijne JW (1994) Purification and partial characterization of a flocculin from brewer's yeast. *Applied and Environmental Microbiology* **60**: 2754-2758.

Suarez-Lepe JA & Iñigo-Leal B (2003) Microbiología enológica: fundamentos de vinificación. 3ª edn. Mundi-Prensa. España.

Szeto L, Fafalios MK, Zhong H, Vershon AK & Broach JR (1997) Alpha2p controls donors preference during mating type interconversion in yeast by inactivating a recombinational enhancer of chromosome III. *Genes & Development* **11**: 1899-1911.

Szostak JW, Orr-Weaver T, Rothstein RJ & Sthal FW (1983) The double strand-break repair model for recombination. *Cell* **33**: 25-35.

Tamai Y, Momma T, Yoshimoto H & Kaneko Y (1998) Coexistence of two types of chromosome in the bottom fermenting yeast, *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* **14**: 923-933.

Tamai Y, Tanaka K, Umemoto N, Tomizuka K & Kaneko Y (2000) Diversity of the *HO* gene encoding an endonuclease for mating-type conversion in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Yeast* **16**: 1335-1343.

Tamai Y, Tanaka K, Kaneko Y & Harashima S (2001) *HO* gene polymorphism in *Saccharomyces* industrial yeasts and application of novel *HO* genes to convert homothallism to heterothallism in combination with the mating-type detection cassette. *Applied Microbiology and Biotechnology* **55**: 333-340.

Terashima H, Fukuchi S, Nakai K, Arisawa M, Hamada K, Yabuki N & Kitada K (2002) Sequence-based approach for identification of cell wall proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current Genetics* **40**: 311-316.

Thornton RJ (1978a) Investigations on the genetics of foaming in wine yeast. *European Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* **5**: 103-108.

Thornton RJ (1978b) The mapping of two dominant genes for foaming in wine yeast. *FEMS Microbiology Letters* **4**: 207-209.

Vaag P, Bech M L, Cameron-Mills V & Svendsen I (1999) Characterization of a beer protein originating from barley. *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Cannes* **27**: 157-166.

- Van der Vaart JM, Caro LHP, Chapman JW, Klis FM & Verrips CT (1995) Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology* **177**: 3104-3110.
- Van Nierop SNE, Evans DE, Axcell BC, Cantrell IC & Rautenbach M (2004) The impact of different wort boiling temperatures on the beer foam stabilizing properties of lipid transfer protein 1. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* **52**: 3120-3129.
- Van Zyl WH, Lodolo EJ & Gericke M (1993) Conversion of homothallic yeast to heterothallism through *HO* gene disruption. *Current Genetics* **23**: 290-294.
- Vaughan-Martini A & Martini A (1987) Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie Van Leeuwenhoek* **53**: 77-84.
- Vernhet A, Pellerin P, Prieur C, Osmianski J & Moutounet M (1996) Charge properties of some grape and wine polysaccharides and polyphenolic fractions. *American Journal of Enology and Viticulture* **47**: 25-29.
- Watari J, Takata Y, Ogawa M, Sahara H, Koshino S, Onnela ML, Airaksinen U, Jaatinen R, Penttila M & Keranen S. 1994. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast* **10**: 211-225.
- Waters EJ, Wallace W & Williams PJ (1992) Identification of heat unstable wine proteins and their resistance to peptidases. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, **40**: 1514-1519.
- Waters EJ, Pellerin P & Brillouet JM (1994) A *Saccharomyces* mannoprotein that protects wine from protein haze. *Carbohydrates Polymers* **23**: 185-191.
- Weiss K & Simpson RT (1998) High resolution structural analysis of chromatin at specific loci: *Saccharomyces cerevisiae* silent mating-type locus *HML α* . *Molecular and Cellular Biology* **18**: 5392-5403.
- Werner-Washburne M, Braun E, Johnston GC & Singer RA (1993) Stationary phase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiological Reviews* **57**: 383-401.
- Wilde PJ & Clark DC (1996) Foam formation and stability. En: *Methods of Testing protein functionality*, Hall (ed.). Blackie Academic & Professional, London, UK. pp. 110-148.

Bibliografia

Wood JS (1982) Mitotic chromosome loss induced by methyl benzimidazol-2-yl-carbamate as a rapid mapping method in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **2**: 1080-1087.

Wu X, Moore JK & Haber JE (1996) Mechanism of *MAT α* donor preference during mating-type switching of *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular and Cellular Biology* **16**: 657-668.

Wu X, Wu C & Haber JE (1997) Rules of donor preference in *Saccharomyces* mating-type gene switching revealed by a competition assay involving two types of recombination. *Genetics* **147**: 399-407.

Yanisch-Perron C, Vieira J & Messing J (1985) Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13amp18 and pUC19 vectors. *Gene* **33**: 103-119.

Yin QY, De Groot PW, Dekker HL, De Jong L, Klis FM & Koster CG (2005) Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls, identification of proteins covalently attached via GPI remnants or mild-alkali sensitive linkages. *Journal of Biological Chemistry*, 280(21), 20894-20901.

Yokoi S, Maeda K, Xiao R, Kamada K & Kaminura M (1989) Characterization of beer proteins responsible for the foam of beer. *Proceedings of the European Brewing Convention Congress, Zurich* **22**: 593-600.

Zambonelli C (1998) *Microbiologia e biotecnologia dei vini*. Edagricole, Bologna.

Zayas JF (1997) *Functionality of proteins in food*. Springer-Verlag, New York, USA.

Research Article

FPGI, a gene involved in foam formation in *Saccharomyces cerevisiae*

Lucía Blasco¹, Patricia Veiga-Crespo^{1,2} and Tomás G. Villa^{1,2*}

¹Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Spain

²School of Biotechnology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Spain

*Correspondence to:

Tomás G. Villa, Department of Microbiology, Faculty of Pharmacy, University of Santiago de Compostela, Campus Vida, 15782 Santiago de Compostela, Spain.
E-mail: tomas.gonzalez@usc.es

Abstract

Foam formation in fermentations conducted by *Saccharomyces cerevisiae*, either at the beginning of the fermentation process or at the end in the case of sparkling wines, is due, to a large extent, to cell wall mannoproteins, which provide hydrophobicity to the yeast cells and favour their floating index as well as stabilization of the foam. The foam may be an undesirable by-product if it accumulates on top of the fermentation tanks, but its formation is a good property in either beer or sparkling wines. It is therefore important to know the yeast genes involved in foam formation, in order to suppress or potentiate their expression according to the end product to be obtained. The present study identified and characterized, for the first time in an oenological *S. cerevisiae* strain, a gene involved in foam formation, named *FPGI* (foam-promoting gene). The protein encoded by *FPGI* is a mannoprotein precursor present in the cell wall and somewhat homologous to *Awa1p*, a foaming protein described in a sake *S. cerevisiae* strain. A foamless strain was prepared by *FPGI* deletion, and a foam hyper-producing strain was also constructed, thus allowing the conclusion that *Fpg1p* is a mannoprotein involved in yeast frothing. Copyright © 2011 John Wiley & Sons, Ltd.

Keywords: frothing; foam; yeast; *Saccharomyces cerevisiae*; mannoproteins; wine

Received: 14 July 2010
Accepted: 8 February 2011

Introduction

Alcoholic beverages have been elaborated by man for about 9000 years, originally in an uncontrolled way but today mostly carried out by selected *Saccharomyces cerevisiae* oenological strains that, when added to the must as starter cultures, contribute to standardizing the quality of wines (Pretorius, 2000; Martini, 2003; Swiegers *et al.*, 2005; Blasco *et al.*, 2008).

Traditionally, the preparation of better fermented products (particularly in the case of wines) has been approached by the manipulation of two quite different aspects, grapes and yeast strains. Manipulation of oenological yeast strains has been always a difficult task because they are homothallic diploids, so selection through mating proceeds with rather

uncertain results. Besides, many characteristics are polygenic, thus also contributing to difficulties in the manipulation of genetic traits (Marullo *et al.*, 2004; Giudicci *et al.*, 2005; Swiegers *et al.*, 2005; Blasco *et al.* 2008).

The foam in wines is determined by the grape variety, the harvest and the *S. cerevisiae* strain (Andrés-Lacueva *et al.*, 1996) and, accordingly, the timing of foam appearance may be considered as a positive or a negative aspect. It is negative when frothing takes place at the beginning of fermentation, because over-foaming can reduce the efficiency of the process (Pretorius, 2002). On the other hand, foaming is positive when it occurs at the end of the process, particularly in the case of sparkling wines, since when served, it is perceived by consumers as one of the most important

organoleptic properties. A foam of quality is one that causes a slow release of CO₂ in small bubbles and this contributes to the formation of a crown in the surface of the wine, which must collapse leaving just a hint of foam, as a ring, in the glass (Senée *et al.*, 1999; Martínez-Rodríguez and Pueyo, 2009).

Alcoholic beverages are multifactorial systems, where foam formation depends on a plethora of components, including yeast cell wall mannoproteins (Senée *et al.*, 1999; Moreno-Arribas *et al.*, 2000; Douglas *et al.*, 2005). These are *N*- and *O*-glycosylated proteins linked to the 1,6- β -D-glucan through glycerol phosphate inositol (GPI) or to the 1,3- β -D-glucan through alkali-sensitive linkages. Thus, the inner face of the yeast cell wall is a net of 1,3- β -D-glucan fibrils bound to each other by hydrogen bonds, to which chitin and 1,6- β -D-glucan are attached (Kollár *et al.*, 1997; Lipke and Ovalle, 1998; Molina *et al.*, 2000; Klis *et al.*, 2002; Lesage and Bussey, 2006; Ying *et al.*, 2005).

The mannoproteins are released in part into the fermentation media (wine or beer) giving stability to the foam because of their hydrophobic nature. In fact, when bubble gas is formed, the hydrophobic part of the mannoproteins is orientated towards the inner face, while the hydrophilic portion (glycosylated moiety) is facing towards the outside. The hydrophobic region increases the superficial strength of the bubbles, while the hydrophilic portion increases the viscosity, and both properties also contribute to the foam stability and retard the liquid drainage (Marchal *et al.*, 1996; Hornsey, 1999; Senée *et al.*, 1999; Maujean, 2003; Núñez *et al.*, 2006). The size of the glycoproteins varies in the range 5–200 kDa, but those involved in foam formation are mostly in the range 10–60 kDa, with isoelectric points of 3.5–7.5 (mainly 3.5–4.5) (Asano and Hashimoto, 1980; Mohan *et al.*, 1992; Brissonnet and Maujean, 1993; Kordialik-Bogacka and Ambroziac, 2004; Núñez *et al.*, 2006).

Despite the number of reports on foam formation by yeasts in beverages, little is known concerning the genes involved in frothing in *S. cerevisiae*. In fact only one gene, *AWA1*, has been well characterized. The *AWA1* gene product is a mannoprotein with the typical putative GPI anchoring site that confers hydrophobicity to the cell surface, favouring the adherence of the cells to the gas bubble. Its foaming ability was demonstrated by obtaining a deleted strain which produces far less foam than

the wild-type (Shimoi *et al.*, 2002; Miyashita *et al.*, 2004).

Besides the *AWA1* gene, Kasahara *et al.* (1974) identified genes promoting foaming in sake *S. cerevisiae* strains, suggesting that at least two genes were involved, and Thornton (1978) also defined two genes, *FRO1* and *FRO2*, located on the right arm of chromosome VII, separated by 21 cM. He demonstrated their dominance and the lack of additive effects, so that in a given strain the amount of foam was always the same, independently of the number of genes present. Moreover, he pointed out that these two genes were allelic to that in the sake strain (Kasahara *et al.*, 1974; Thornton, 1978a, 1978b).

In this paper we describe, in an oenological *S. cerevisiae* strain, a new gene for which we propose the name foam-promoting gene (*FPG1*), that codes for a mannoprotein, Fpg1p, involved in foam formation and hence in yeast frothing.

Materials and methods

Strains and media

All strains of *S. cerevisiae* used in the present study are included in Table 1. *Escherichia coli* TOP10, from Invitrogen, was grown in Luria–Bertani (LB) medium at 37 °C. *S. cerevisiae* was grown in YPD. Yeast strains harbouring auxotrophies were grown in SD medium supplemented with the required amino acid(s). When the carbon source had to be changed to incorporate galactose (the same amount), the YPD and SD were substituted by YPGal and SGal, respectively. All yeast cultures were maintained at 30 °C. In sporulation medium (SPOI) the strains were maintained at 23 °C for 5 days. In all cases, when required, solid media were prepared by the addition of 2% agar. The media were sterilized by autoclaving at 120 °C for 20 min. When necessary, the media were supplemented with G418 (200 µg/ml; Sigma-Aldrich), cycloheximide (2 µg/ml; Sigma-Aldrich) or tunicamycin (1.5 µg/ml, Sigma-Aldrich).

Primers and vectors

Primers and vectors are summarized in Tables 2 and 3, respectively.

Table 1. *Saccharomyces cerevisiae* strains employed in this study and their foaming ability

| Strain | Genotype | Foam | Origin |
|---------|--|------|-----------------|
| I45 | Wine strain, wild-type | + | This laboratory |
| I45A211 | Wine strain, <i>MATa/MATα,HO/HO,</i> <i>FPGI</i> | + | This study |
| SC22 | <i>MATa, hoΔ</i> | + | This study |
| SCH2 | <i>MATa, hoΔ,</i> <i>fpgI::KanMX</i> | – | This study |
| DHA6C | <i>MATa/MATα, HO/HO,</i> <i>fpgI::KanMX</i> | – | This study |
| DHA2-16 | <i>MATa/MATα, HO/HO,</i> <i>fpgI Δ</i> | – | This study |
| MI-2B | <i>MATα, ura3-52, trp1</i> | – | Benítez T |
| CSH84L | <i>MATα, spo11, ura3,</i> <i>can1, cyh2, ade2, his7,</i> <i>hom3</i> | – | Benítez T |
| CSH88L | <i>MATα, spo11, ura3,</i> <i>his2, leu1, lys1, met4,</i> <i>pet18</i> | – | Benítez T |
| CSH89L | <i>MATa, spo11, ura3,</i> <i>ade1, his1, leu2, lys7,</i> <i>met3, trp5</i> | – | Benítez T |

Table 2. Primers employed in this study

| Name | Sequence 5' → 3' |
|---------|--|
| awa11 | ATGTTCAATCGCTTTAATAAACTTCAAGCC |
| awa12 | TTAGTTAAAGAAAGCAAGAACGAAAATACC |
| FPGfint | ATGTTCAATCGCTTTAATAAACTTCAAGCCGC TTTGGCTTTG ACCCTTAATATAACTTCGTA TAATG |
| FPGrint | TTAGTTAAAGAAAGCAAGAACGAAAATACCG ACCAATGCCCTAATAACTTCGTATAG CATAC |
| HO1f | AAAACGACGACTATTCTGATGGCTAACGG |
| HO1r | ACGCGTGCAGCTGCCATCTGCGCACATAACG |
| HO2f | CGCGGATCCTGCGATATCTGCAAGTATGTACCA GAAGC |
| HO2r | CCGGAATCCACTCTGGTCCTTAACTG |
| loxP1 | CGCGGATCCGCGGAGTTCGACAACCCCTTAAT ATAAC |
| loxP2 | CGCGGATCCGCGGATACCTAATAACTTCG TATAGC |
| M13F | GTAAAACGACGGCCAG |
| M13R | CAGGAAACAGCTATGAC |

Bold letters indicate loxP–KanMx–loxP common sequence.
Italic letters indicate the restriction sites.

Fermentations

Microfermentations were performed in stopped tubes containing *Mencía* must (harvested 2005), previously sterilized by tyndalization. Starter

Table 3. Vectors employed in this study

| Vector | Description | Source |
|--|---|----------------------------------|
| PCR [®] BluntII/TOPO [®] | Kan ^R | Invitrogen |
| TOPO-FPGI | Kan ^R , <i>FPGI</i> | This study |
| pYES2 | Amp ^R , URA3, GAL promotor | Invitrogen |
| pUG6 | Amp ^R , KanMX | Güldener <i>et al.</i> (1996) |
| YEp351-Cre-Cyh | Amp ^R , CYH ^R , LEU2, GAL promotor, Cre recombinase | Delneri <i>et al.</i> (2000) |
| pUC19 | Amp ^R , lacZ | Invitrogen |
| pHO12 | Amp ^R , lacZa, HO1-HO2 | This study |
| pDHO | Amp ^R , lacZa, ho::KanMX | This study |

cultures were prepared by inoculating 100 ml YPD medium and grown overnight at 30 °C. The cells were then recovered by centrifugation at 3000 × *g* for 20 min at 4 °C and resuspended in must at a final cell density of 10⁶ cells/ml. Fermentations were carried out in triplicate at 22 °C.

Detection of foaming strains

The strains with good ability to originate foam both in amount and stability were selected as previously described (Chiavari *et al.*, 2000).

Lyticase sensitivity assay

Yeast cells were cultured overnight in YPD at 30 °C for 48 h, recovered by centrifugation at 3000 × *g* for 5 min, and washed twice with water. The cells were resuspended in 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.5, mixed with lyticase (200 µg/ml; Sigma-Aldrich), and incubated at 30 °C for 2 h, periodically measuring cellular density at optical density (OD) 600 nm, in a Jenway (Geneva, Switzerland) spectrophotometer.

Calcofluor stain

Cells from an active culture were collected by centrifugation at 3000 × *g* for 5 min, washed first with sterile water and then with PBS, and stained with calcofluor, as recommended by Cabib (2008). The fluorescence of 100 µl samples (10⁸ cells/ml) was observed in a transilluminator (Molecular Imager[®] Gel Doc[™] XR; Bio-Rad).

Tetrad analysis

Tetrads were obtained from either homothallic diploid strains or from heterothallic diploids generated by mating the appropriate strains. The diploids were maintained in SPOI medium until a good number of asci containing four ascospores were available. Manipulation and spore separation was accomplished by using a Micromanipulator II (Allen Benjamin Inc.) coupled to a Nikon SE microscope.

Isolation and cloning of the *FPG1* gene

Genomic DNA from *S. cerevisiae* was prepared using a Genomic Purification Kit (Promega). From genomic DNA, the *FPG1* gene was PCR-amplified using the primers *awa11* and *awa12* that correspond to 1–30 bp and 5113–5142 bp of the *AWA1* gene. The PCR product was cloned into vector pCR[®] BluntII TOPO[®] (Invitrogen) and transformed into *E. coli* TOP10. The resulting recombinant plasmid, TOPO–*FPG1*, was purified using Miniprep Express[™] Matrix (MP Biomedicals) and sequenced using the primers M13F and M13R.

Construction of an inducible *FPG1* expression vector

Plasmid TOPO–*FPG1* was digested with *Bst*XI to release the entire *FPG1* insert, which was subsequently cloned into pYES2 (Invitrogen), a plasmid vector that contains the GAL promoter, thus generating a galactose-inducible expression construct.

PCR-mediated *FPG1* disruption

FPG1 disruption was accomplished using an *FPG1*–KanMX construct that was obtained by PCR, using as template the vector pUG6 (Güldener *et al.*, 1996), which incorporates the loxP–KanMX–loxP disruption cassette, thus conferring resistance to G418. The primers were *FPGfint* and *FPGrint*. The former bears on its 3' end 25 bp corresponding to the 5' end of the disruption cassette, and on its 5' end 42 bp corresponding to nucleotides 1–42 of the *AWA1* gene. The primer *FPGrint* has a 3' end of 32 bp, corresponding to the 5' end of the aforementioned cassette and a 5' end with 39 bp reflecting the nucleotides 5104–5142 of

the *AWA1* gene. The new disruption cassette was named *FPG1*–KanMX.

Construction of disruption plasmid pDHO

Plasmid pDHO was designed to direct the loxP–KanMX–loxP cassette integration into the *HO* gene by homologous recombination. Two fragments of the *HO* gene were obtained by PCR from genomic DNA. Primers HO1f and HO1r yielded an 80 bp fragment (HO1) corresponding to nucleotides 16–96 of the *HO* gene, flanked by *Pst*I (5') and *Sal*I (3') restriction sites, which were provided by the primers. Primers HO2f and HO2r amplified a 137 bp fragment (HO2) corresponding to nucleotides 1572–1654 of the *HO* gene, flanked by *Bam*HI and *Eco*RV (5') and *Eco*RI (3') restriction sites. The G418 resistance cassette loxP–KanMX–loxP was PCR amplified from plasmid pUG6, using the loxP1 and loxP2 primers, which provided *Bam*HI and *Sal*I, and *Bam*HI and *Eco*RV, respectively. The HO1 and HO2 fragments were digested with *Pst*I and *Eco*RI respectively, and inserted into the appropriate sites of pUC19, thus generating the pHO12 plasmid, which was digested with *Bam*HI and *Eco*RV. The loxP–KanMX–loxP disruption cassette was also digested with the same enzymes, and ligated between HO1 and HO2, thus generating the plasmid pDHO.

Yeast transformation

Yeast transformations were performed with lithium acetate (Gietz and Schiestl, 2007), using either 2 µg plasmid DNA or 3–5 µg PCR product. Selection was in YPD supplemented with the appropriate antibiotic or in SD media lacking the corresponding amino acid.

Resistance marker elimination

This was done with vector YEp351–Cre–Cyh (Delneri *et al.*, 2000), which contains a galactose-inducible cre–loxP system.

Detection of the integration and elimination of disruption cassettes

Cassette integration and elimination was detected by PCR using different primer combinations. In the case of the *FPG1* gene, the primer pair

awa11/awa12, awa11/loxP2 and awa12/loxP1 were employed. For the *HO* gene the combinations were HO1f/HO2r, HO1f/loxP2 and HO2r/loxP1. In both cases the loxP1 and loxP2 primers were also used.

Southern blot

Chromosomes of strain 145A211 were separated by pulsed-field electrophoresis in a CHEF-DR11 apparatus (Bio-Rad), using strain YNN295 (Bio-Rad) as the chromosome marker. Electrophoresis was performed at 14 °C and 200 V for 15 h, with a change of time every 60 s, and then 8 h with time changing every 90 s. Chromosomes were labelled by Southern blot, using a commercial DIG High Prime DNA labelling and detection starter kit II (Roche), as recommended by the manufacturer. The probe was the *FPG1* gene fragment encompassed between nucleotides 1388 and 2313, which was labelled with digoxigenin.

Chromosome loss mitotic mapping

Chromosome loss was induced by methyl-benzimidazol-2-yl-carbamate (MBC) following Wood's (1982) procedure.

Meiotic mapping

Meiotic *FPG1* mapping as well linkage to the *cyh* and *leu1* markers was performed according to Sherman and Wakem (1991). Genetic distances were established in centimorgans (cM), as indicated by the Perkins formula (Perkins, 1949; Ma and Mortimer, 1983).

Isolation of yeast cell walls and mannoprotein extraction

Cells were grown in YPD medium or in tunicamycin-supplemented YPD medium for 48 h. After centrifugation at $3000 \times g$ for 5 min, cells were disrupted in a Braun MSK homogenizer and cell walls obtained by an additional centrifugation as before. The mannoprotein extraction from cell walls was carried out using SDS and 400 µg/ml lyticase (Schreuder *et al.*, 1993). Proteins were resolved by electrophoresis in a 7.5% SDS-PAGE gel (Laemmli, 1970).

Analysis of DNA and protein sequences

Sequence analysis of DNA was performed using the Vector NTI.9 program (Invitrogen) and BLAST, and the tools provided by de ExPASy proteomic server were used for the analysis of protein sequence data.

Results

Identification of foaming strains

The oenological strain *S. cerevisiae* 145 was subjected to three consecutive meiosis and 36 derived homothallic strain spores were selected and tested for their foaming ability. Strain 145A211 exhibited the highest activity as foam former as well as the greater foam stability. The presence of cells in the foam was observed with this strain, a typical property of these strains due to the presence of hydrophobic proteins from the cell wall that favour cell adherence to the gas bubbles (Chiavari *et al.*, 2000).

Identification and analysis of *FPG1* gene

In order to clone the gene responsible for foaming in a *S. cerevisiae* oenological strain, primers were designed according to the published sequence of the *AWA1* gene (AB071164) of the sake *S. cerevisiae* K7 strain (Shimoi *et al.*, 2002). PCR of genomic DNA from *S. cerevisiae* 145A211 with primers awa11 and awa12 yielded a single amplified fragment, which was cloned into the PCR[®] BluntII TOPO[®] vector, and a sequence of 2313 bp containing a complete ORF was obtained. The gene was named foam-promoting gene (*FPG1*) and its sequence deposited into the GenBank database (Accession No. EU414028.1). Homology searches showed that *FPG1* had homology with other *S. cerevisiae* genes coding for cell wall proteins and, as expected, with *AWA1* and *HPF1*, but *FPG1* is not identical to any of them (Figure 1). Despite the homology with these genes, differences in size were observed, since *AWA1* is 5142 bp and *HPF1* 2904 bp. Also, the highest homologous regions between all the three genes, which corresponded to the initial and terminal regions, may be the conserved ones, since homology between *AWA1* and *HPF1* was found as well. Thus, all these data

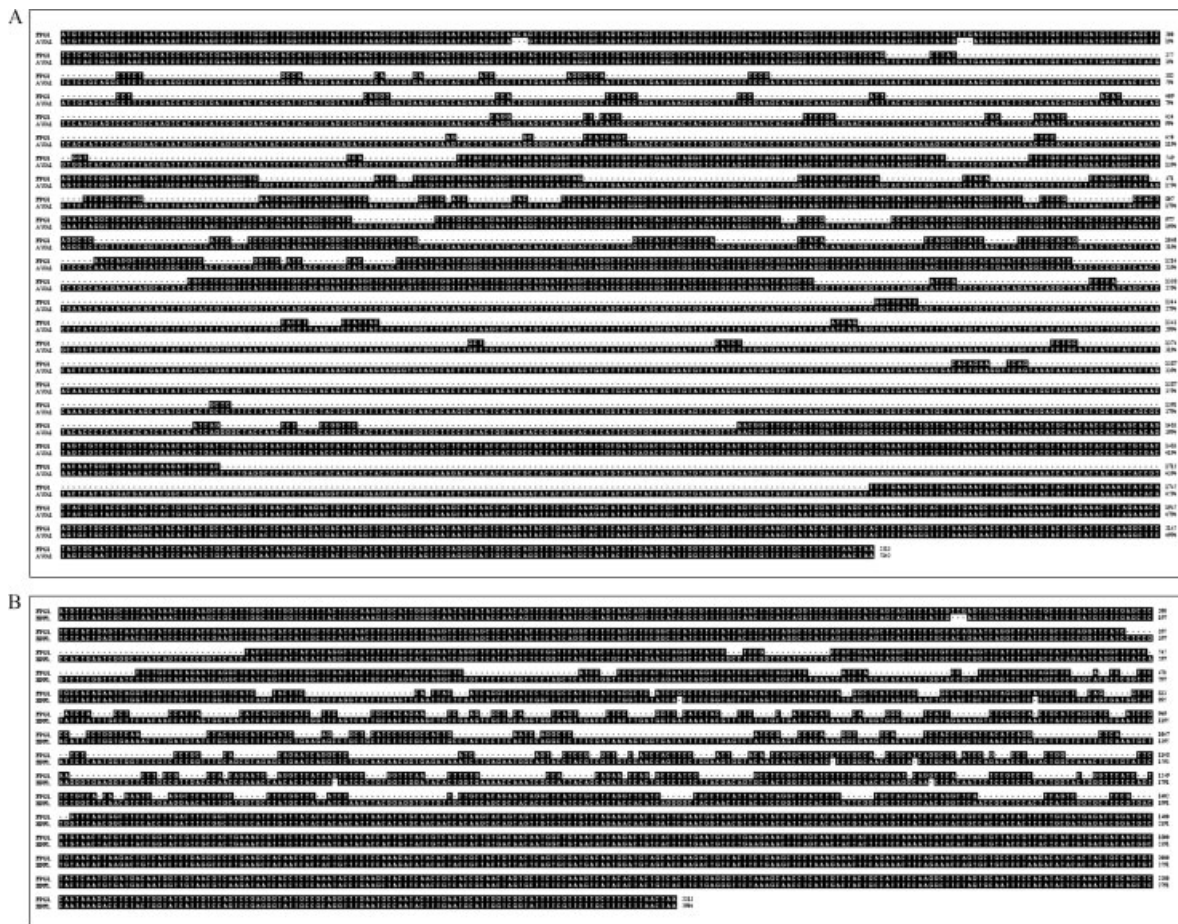


Figure 1. *FPGI* gene homology analysis with *AWA1* gene (A) and with *HPF1* gene (B)

suggest that the *FPGI* gene is exclusive of this oenological strain.

A protein of 770 amino acids with molecular mass of 72 112 Da was inferred from the DNA sequence. The *FPGI* protein product had typical properties and motifs of a yeast cell wall mannoprotein precursor (Figure 2). Both the amino and carboxyl ends are hydrophobic, with a signal peptide (residues 1–24) and a putative GPI anchor (residue 749). Residues 29–480 define a serine-rich region (serine accounts for 35.5% of the amino acids) and residues 470–716 delimit a threonine-rich region (threonine accounts for 18.2% of the amino acids). Accordingly, there are numerous *O*-glycosylated sites as well as two *N*-glycosylated sites (residues 28–35). Once the precursor is postranslationally processed, the final Fpg1p protein has a molecular mass of 67 812 and 726 amino acids.

The study of protein homology with the precursor Fpg1p revealed high homology with *S. cerevisiae* cell wall proteins in the region defined by residues 1–113 (amino end) and in the carboxyl end in the region of residues 463–770. The region comprised between amino acids 113 and 463 did not show any homology with other reported proteins. Protein Fpg1p showed homology with Hpf1p, which is involved in wine clarification, and also to different cell wall proteins with homology to Hpf1, most of them corresponding to wine *S. cerevisiae* strains (Figure 3). Fpg1p has homology with Awa1p that, as indicated before, is involved in foam formation in sake. Awa1p, in turn, is homologous to Hpf1p and in a small region to YJR151c; however, no homology between Fpg1p and YJR151c was found (Shimoi *et al.* 2002). Although all these proteins are highly *O*-glycosylated, both Fpg1p and Awa1p

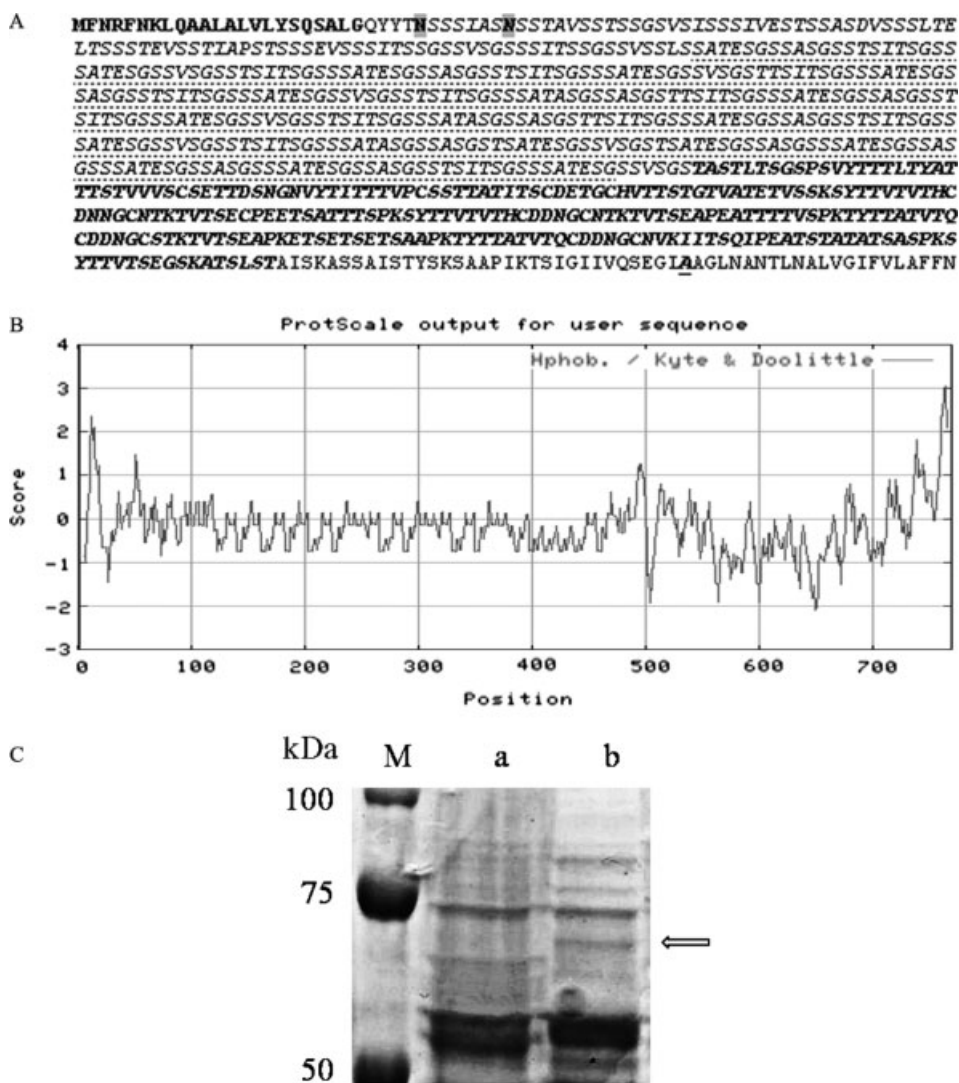


Figure 2. Fpg1p analysis. (A) Fpg1p protein sequence. Letters in bold regular font indicate the signal peptide; the underlined letter in bold italic font indicates the putative position of the GPI anchor; the serine-rich region is indicated as a point-underlined region; the threonine-rich region is indicated as letters in bold italic font; and the two *N*-glycosylation sites are shown as shaded letters. (B) Hydropathy plot performed by the method of Kyte and Doolittle (1982). (C) SDS-PAGE of cell wall proteins: lane M, protein marker; lane a, strain DHA2-16; lane b, strain I45A211. The putative Fpg1p is indicated by an arrow

are, by far, more heavily modified than the rest (Figure 4).

Chromosomal *FPG1* gene location

A probe of 1 kbp was prepared from the *FPG1* gene. Gene location was performed by Southern blot hybridization on chromosomes separated by pulsed-field electrophoresis. As shown

in Figure 5, a strong signal corresponding to chromosomes VII/XV and a weaker one corresponding to chromosome X were detected. Because the *FPG1* homologous genes, *HPF1* and *AWA1*, had been previously mapped to chromosome XV, and because Thornton 1978 had meiotically located *FRO1* and *FRO2* in chromosome VII, it was thought that one of these two chromosomes could be the locus for the *FPG1* gene. As the Southern

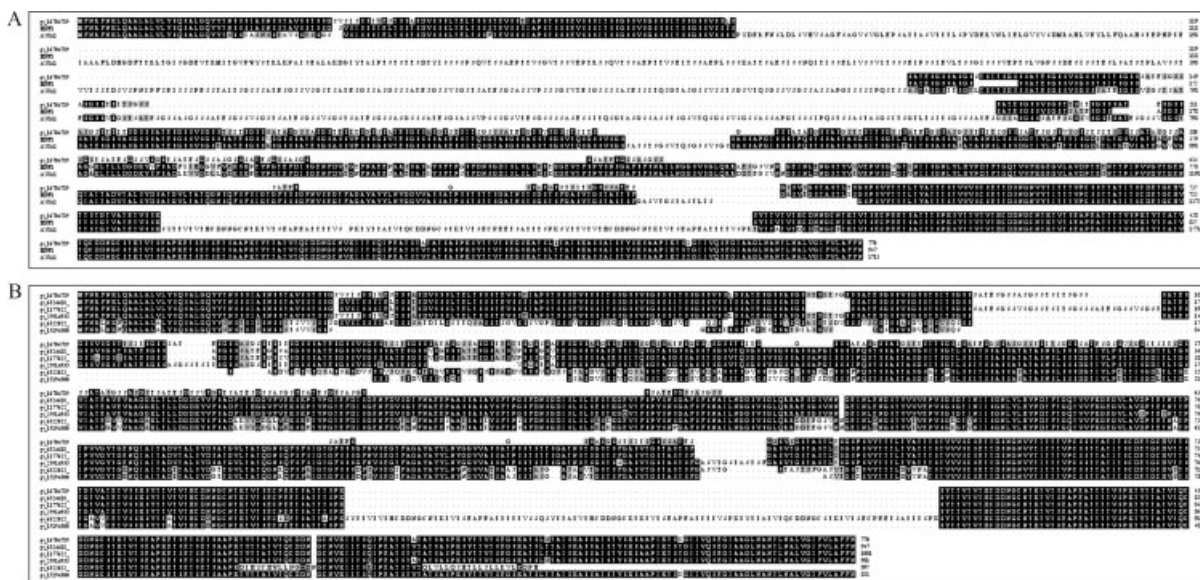


Figure 3. FpgI protein homology analysis. (A) Homology between proteins FpgI, HpfI and AwaI. (B) Homology between FpgI (first line) and cell wall proteins from wine strains of *S. cerevisiae*

blot yielded ambiguous results, mitotic and meiotic mapping were carried out. Firstly, the homothallic diploid 145A211 had to be converted into a haploid strain by removing the *HO* gene, responsible for the homothallism. This was accomplished by transformation with the disrupting cassette *ho::KanMX* released from the pDHO vector by enzyme digestion, which replaced the *HO* gene in the host DNA by homologous recombination. The G418-resistant transformants were heterozygous diploids *HO/ho::KanMX*, indicating that only one *HO* gene copy was disrupted. These transformants were sporulated to obtain the *HO*-disrupted haploids, and after meiosis the G418-resistant spores were picked. When their inability to sporulate was ascertained, the new haploids were characterized for sex by mating with the appropriate *S. cerevisiae* genetic strains: CSH84L(α) and CSH89L(α). As the strains derived from 145A211 did not show auxotrophies, the diploids were checked for their ability to originate zygotes and to sporulate. The strain selected for *FPG1* mapping was transformed with the YEp351–Cre–Cyh vector, thus eliminating the disrupting cassette and obtaining a strain named SC22 with the *HO* gene deleted. The deletion of *HO* gene and the integration of *ho::KanMX* cassette were checked by PCR.

In order to proceed with the mapping without the necessity of evaluating the foaming ability

of all the meiotic products, the *FPG1* gene was labelled with resistance to G418. This was accomplished by transformation of the SC22 strain with the *FPG1*–*KanMX* disruption cassette that was integrated by homologous recombination into the *FPG1* locus, thus originating a G418-resistant, which was termed SCH2. One approach to establish the chromosomal locus for *FPG1* was to induce chromosome loss by treatment with MBC. To do this, a diploid was first obtained by crossing SCH2 with CSH84L (containing a *cyh2* marker in chromosome VII and an *ade2* in chromosome XV, among others). The diploid was subjected to treatment with MBC and finally diploids resistant to cycloheximide and sensitive to G418 were obtained. This approach allowed us to assign *FPG1* to chromosome VII. Starting from diploids SCH2/CSH84L, meiotic mapping of *FPG1* was achieved by analysing 40 complete tetrads. At the same time strain SCH2 was crossed with the strain CSH88L, which contains *leu1* marker at the centromere of the chromosome VII. The application of the Perkins formula gave that *FPG1* was located on the left arm of chromosome VII at 55 cM from the *cyh2* marker (Table 4). No linkage was shown with the *leu1* marker, thus indicating that *FPG1* is located towards the telomere of the left chromosome at position -119 cM from the centromere.

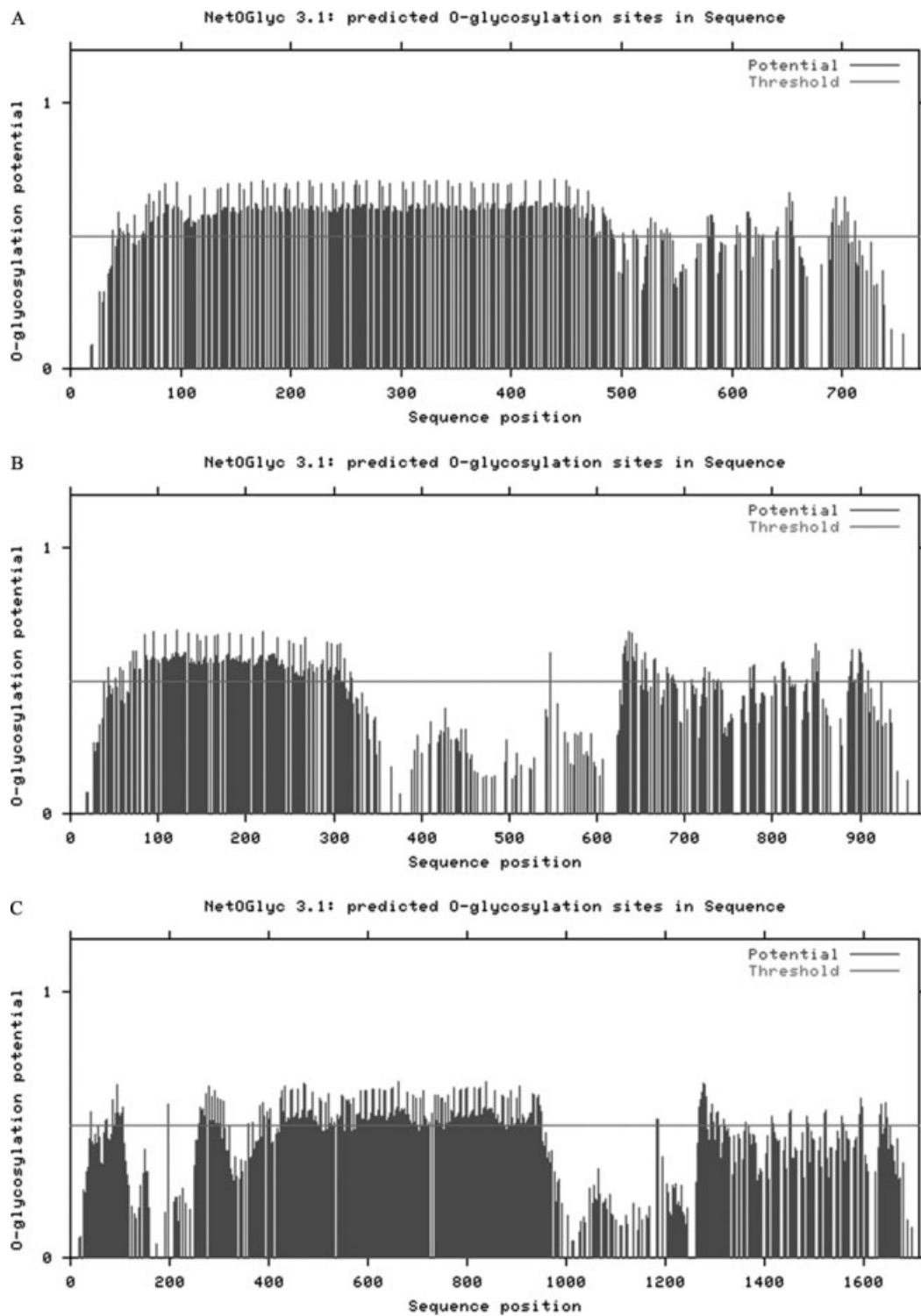


Figure 4. O-Glycosylation pattern comparison of (A) FpgI p, (B) HpfI p and (C) AwaI p (NetOglyc 3.1)

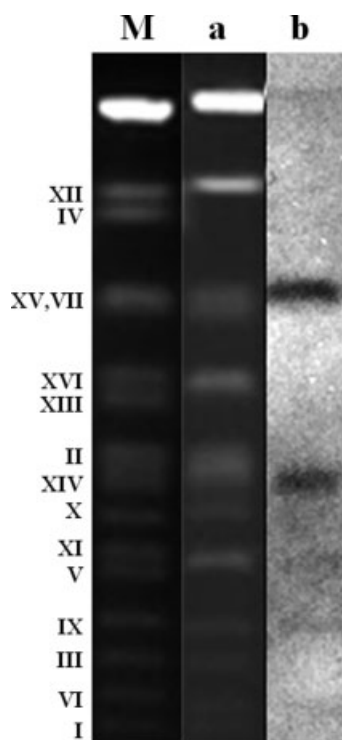


Figure 5. *FPG1* chromosomal location by Southern blot. Lane M, chromosome marker strain YNN295; lane a, ethidium bromide stained chromosomes in agarose gel; lane b, probe chromosome hybridization

Table 4. Meiotic mapping of the *FPG1* gene

| Gene marker | Ascus number | | | cM |
|-------------|--------------|-----|----|----|
| | PD | NPD | T | |
| KanMX-cyh2 | 11 | 3 | 26 | 55 |
| KanMX-leu1 | 2 | 10 | 24 | — |

PD, parental ditype; NPD, non-parental ditype; T, tetatype; cM, centimorgans.

The mapping in the haploid strain confirms the location of the *FPG1* gene in chromosome VII, which was one of the possibilities identified by Southern blot.

FPG1 deletion effect in cell wall

The cellular location of Fpg1p was inferred from a strain in which *FPG1* gene had been deleted. The diploid strain 145A211 was transformed with the *FPG1*–KanMX disruption cassette so that the cassette became integrated in one of

the chromosome VII pair. The G418-resistant transformants were heterozygous *FPG1/fpg1*::KanMX. Homozygous strains for the interrupted gene were obtained by subjecting these transformants to sporulation, and selecting the G418-resistant spores; when they entered mitosis and because they were homothallic, they originated diploid cultures homozygous for the disrupted *FPG1* gene. One of these diploids (named DHA6C) was picked and transformed with the Yep351–Cre–Cyh vector to eliminate the loxp–KanMX–loxP cassette, which yielded the diploid *fpg1*-deleted strain, with no resistance, which was named DHA2-16.

The previously predicted structure for protein Fpg1p, as well as its homology with yeast cell wall proteins, suggested that it would be located at the cell wall and, as reported several times for this type of proteins, probably linked through 1,6- β -D-glucan (Klis *et al.*, 2006; Lesage and Bussey, 2006). In order to further explore this possibility, a lyticase sensitivity test was performed (Figure 6) with strains 145A211 and DHA2-16. Results showed that the DHA2-16 strain lacking protein Fpg1p was far less sensitive (about 50%) to lyticase. Because after 48 h of growth the cell wall increased in thickness in both strains and the sensitivity to lyticase was reduced, it was thought that other polysaccharides, such as chitin, were possibly replacing the Fpg1p protein, thereby making the strain more resistant to lyticase. Indeed, results from pilot experiments showed that the deleted DHA2-16 strain showed a higher response to calcofluor white than the *FPG1*-harbouring 145A211 strain (Figure 6), suggesting the presence of different amounts of calcofluor white-reacting polysaccharides in the two strains.

The higher response to calcofluor, together with the decrease in sensitivity to lyticase in strain DHA2-16, indicates that the Fpg1p is probably replaced by chitin.

Extraction of protein Fpg1p

Strains 145A211 and DHA2-16 were grown in the presence or absence of tunicamycin, which blocks the synthesis of *N*-linked glycans. Proteins were extracted with either SDS or lyticase. When SDS-extraction was done, no differences were observed in the SDS–PAGE patterns in both strains and no influence was observed

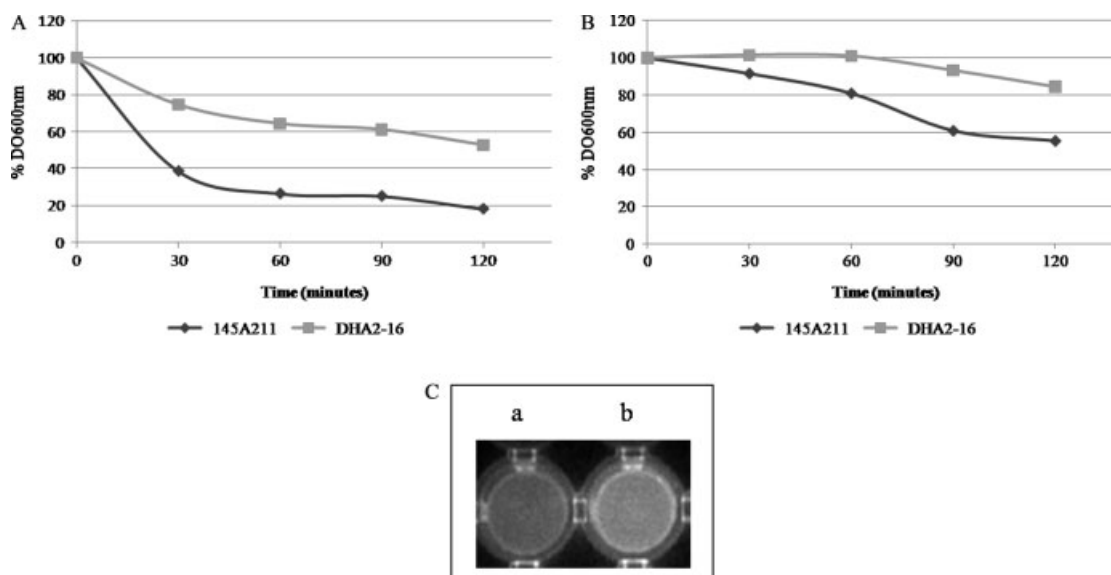


Figure 6. Lyticase sensitivity assay after overnight growth (A) and 48 h growth (B). (C) Calcofluor white-stained cells from strains 145A211 (a) and DHA2-16 (b)

with the antibiotic. When lyticase extraction was performed, again no differences were observed between the strains in the absence of tunicamycin. However, in the presence of the antibiotic, a band (about 70 kDa) was detectable in strain 145A211, but was missing in the DHA2-16 strain (Figure 2). The molecular mass is consistent with that expected for an under-glycosylated protein after going through postranslational modifications.

Involvement of Fpg1p in the foaming phenotype

In order to establish the involvement of Fpg1p in yeast frothing, several micro-fermentation experiments were conducted with strains 145A211 and DHA2-16 (Figure 7A). It was observed that after 24 h of fermentation, the amount of foam was higher in strain 145A211 and after 48 h the foam had collapsed in fermentations carried out with strain DHA2-16, suggesting that the Fpg1p protein is indeed involved in foam formation and stabilization. The involvement of this protein was further investigated by inserting the *FPG1* gene into strain MI2B, a foamless *S. cerevisiae* strain (Figure 7B). The gene was cloned into pYES2 and transformed into MI2B. Expression of the gene was accomplished by induction with galactose for 48 h. After this time had elapsed, the cells were recovered

and used in micro-fermentation analysis. Although must glucose represses the GAL promoter, the rationale was that the Fpg1 protein produced in the presence of galactose, should be enough to see differences in foam formation between the strain expressing the *FPG1* gene and the control MI2B strain. As shown in Figure 7C, the amount of foam was higher in the strain transformed with pYES2-FPG1, suggesting again the involvement of the FPG1p protein in foam formation and stabilization during oenological fermentations. This complementation assay was also repeated in strain DHA2-16, which was transformed with the vector pYES2-FPG1. After 48 h of fermentation it was found that the highest amount of foam was obtained with the transformed strain, while the foaming levels obtained with the wild-type 145A211 and the deleted strain DHA2-16 were the same as in previous assays (Figure 7).

Discussion

Foam formation in sparkling wines has been analysed in numerous studies and the involvement of yeast cell wall mannoproteins in the process has been demonstrated (Andrés-Lacueva *et al.*, 1996, 1996; Moreno-Arribas *et al.*, 2000; Nuñez *et al.*, 2006). However, up to now only one protein,

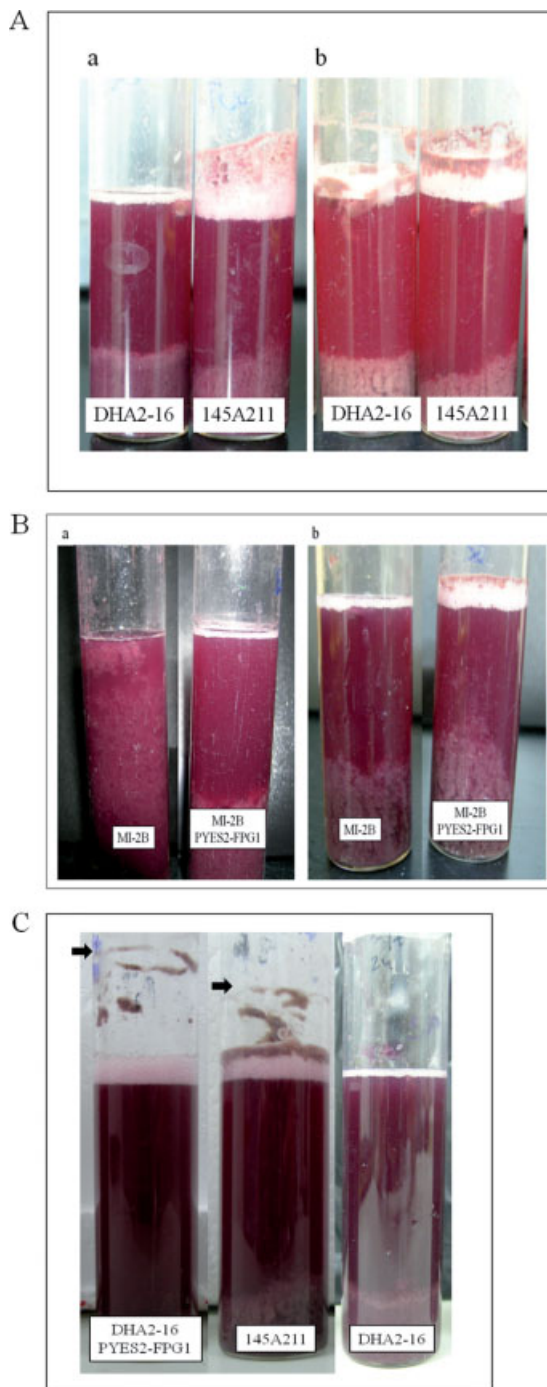


Figure 7. Foam assays production in fermentation. (A) Foam production with 145A211 and DHA 2–16 strains after 24 h (a) and 48 h (b) of fermentation. (B) Effect of *FPGI* over-expression in MI-2B pYES-FPGI after fermentations of 24 h (a) and 48 h (b). (C) Foaming phenotype recovery in DHA2-16 pYES2-FPGI (high foam level is shown by an arrow)

Awa1p, has been described in sake *S. cerevisiae* strains (Shimoi *et al.*, 2002). In this study, from an oenological *S. cerevisiae* strain and using as the template a sequence from the *AWA1* gene, it has been possible to isolate a new gene, *FPGI*, which codes for a cell wall derived protein involved in foam formation.

Initial data involving yeast genes in the frothing phenotype in either oenological or sake strains, suggested that chromosome VII was the most probable locus for these genes. The *FRO1* and *FRO2* genes described by Thornton (1978) in oenological strains were probably homologous to other genes reported for sake strains. The gene reported here also maps in chromosome VII, although in its left arm, whilst Thornton's mapped in the right arm. As the *FPGI* gene has not been reported previously, it is likely that it could be a gene characteristic of strain 145A211, an oenological *S. cerevisiae* strain, and that it may have arisen as a consequence of the genetic instability known to happen in wild-type strains and absent in 'genetic' strains. Such instability comes from adaptation of these strains to the fermentation process and often from gene duplications, polyploidy, chromosome rearrangements and interspecific hybridizations and introgressions (Barrio *et al.*, 2006; Novo *et al.*, 2009).

FPGI exhibits homology with *AWA1* and *HPF1*, both in chromosome XV, so their relatedness would imply chromosome translocation and deletion, because its size is significantly different (Borneman *et al.*, 2008).

Structural analyses of the Fpg1p protein showed that it has characteristics typical of yeast cell wall mannoproteins, such as containing a signal peptide and a putative anchor site to GPI, and being highly glycosylated and all these characteristics are typical for yeast cell wall mannoproteins (Klis *et al.*, 2006; Lesage *et al.*, 2006). Proteins docked through GPI are normally linked to the cell wall β -glucan, so they are amenable to extraction with glucanases. In this particular case it was found that when strains 145A211 and DHA2-16 were treated with lyticase, they behaved differently, the second being the more resistant. Previous findings revealed that when a protein was eliminated from the cell wall, the cells became more sensitive to glucanase, but others showed that some proteins, such as Gas1p, Tos1p or Scw4p, originate phenotypes similar to that caused by deletion of the *FPGI* gene, thus

rendering the strains more resistant to lyticase (Yin *et al.*, 2005; Shimoi *et al.*, 1998; Kotaka *et al.*, 2010). This may probably be due to the synthesis of new cell wall components, instead of the deleted protein, and in fact the cell walls studied here increased in thickness and their response to calcofluor white was also different.

The extraction of Fpg1p could be accomplished only with lyticase and was unsuccessful with SDS, suggesting again its strong binding to cell wall β -glucans. Moreover, the protein is strongly glycosylated and can be visualized in gels if it is synthesized in the presence of tunicamycin, which induces an underglycosylated form of smaller size. Fpg1p is homologous to Hpf1p and Awa1p, both typical cell wall mannoproteins, although only the latter is involved in yeast foaming, whereas the former eliminates wine turbidity. Other cell wall mannoproteins resembling Fpg1p are of unknown function (Shimoi *et al.*, 2002; Brown *et al.*, 2007). Both the N-terminal and C-terminal regions of Fpg1p are homologous to known cell wall mannoproteins, but the internal serine-rich region, which is unique and highly *O*-glycosylated, is probably responsible for the foaming phenotype. Awa1p (with homology to YJR151c) also has a serine-rich region that was established as the domain responsible for the foaming activity. In terms of foam stability, the high number of hydroxyl groups, such as those present in the glycosidic portion of the protein, would be located in the aqueous interface between the gas bubbles of the foam, thus increasing its viscosity and lowering the liquid drainage. At the same time, the carbohydrate moiety would protect the protein from being denatured by ethanol (Senée *et al.*, 1999; Maujean, 2003).

Micro-fermentation experiments made it possible to establish a clear relationship between the presence and expression of the *FPGI* gene and foam formation and stabilization, since the foam stability was lost when the gene was deleted, and the foaming ability recovered after complementation assays were done. The Fpg1p protein must be docked in the cell wall through the carboxyl end, while the amino hydrophobic end is exposed to the medium and the central region rich in serine/threonine would confer a fibrous structure to the protein (Jentoft, 1990). All cell wall proteins belonging to the GPI-CWP (glycerol phosphatidyl inositol cell wall protein) group exhibit a similar pattern

and may be further subdivided into two subgroups: a low molecular weight group that play structural roles (Cwp1, Cwp2, Sed1p, Tip1p, Tir1p), and a high molecular weight group (including Fpg1p) that interact with the environment or with other cells (Awa1p, Flo1) (Watari *et al.*, 1994; Van der Vaart *et al.*, 1995; Shimoi *et al.*, 1998; Shimoi *et al.*, 2002; De Groot *et al.*, 2005; Yin *et al.*, 2005). Proteins involved in foam formation, such as Fpg1p, must contain a hydrophobic region favouring cell adhesion to the CO₂ bubbles and accordingly increasing the flotation index, as occurred in 145A211; they must also contain a hydrophilic region (mostly composed by mannoses) exposed to the aqueous surface and thus increasing viscosity (Chiavari *et al.*, 2000).

In the present study, the *FPGI* gene, involved in foam formation, has been identified for the first time in an oenological *S. cerevisiae* strain. The knowledge and proper manipulation of this gene could help to eliminate unwanted foam during the fermentation process or to increase its stability and hence the quality of sparkling wines or beers.

Acknowledgements

The authors wish to express their appreciation to Professor Tahía Benítez from the Department of Genetics, University of Sevilla, for the pulsed-field electrophoresis experiments. They also wish to thank the University of Santiago de Compostela and the Fundación Ramón Areces from Madrid for partially furnishing the laboratory where this work was done.

References

- Andrés-Lacueva C, Gallart M, López-Tamames E, *et al.* 1996. Influence of variety and aging on foaming properties of sparkling wine (cava). *J Agric Food Chem* **44**: 3826–3829.
- Andrés-Lacueva C, López-Tamames E, Lamuaela-Raventós RM, *et al.* 1996. Characteristics of sparkling base wines affecting foam behaviour. *J Agric Food Chem* **44**: 989–995.
- Asano K, Hashimoto N. 1980. Isolation and characterization of foaming proteins of beer. *J Am Soc Brew Chem* **38**: 129.
- Barrio E, González SS, Arias A, *et al.* 2006. Yeast in food and beverages. In *The Yeast Handbook*, vol 2, Querol A, Fleet GH (eds). Springer: Berlin; 153–174.
- Blasco L, Feijoo-Siota L, Veiga-Crespo P, Villa TG. 2008. Genetic stabilization of *Saccharomyces cerevisiae* oenological strains by using benomyl. *Int Microbiol* **11**: 127–132.
- Borneman AR, Forgan AH, Pretrius IS, Chambers PJ. 2008. Comparative genome analysis of a *Saccharomyces cerevisiae* wine strain. *FEMS Yeast Res* **8**: 1185–1195.

- Brissonnet F, Maujean A. 1993. Characterization of foaming proteins in a Champagne base wine. *Am J Enol Viticult* **44**: 297–301.
- Cabib E, Farkas V, Kosik O, et al. 2008. Assembly of the yeast cell wall. Crh1p and Crh2p act as transglycosylases *in vivo* and *in vitro*. *J Biol Chem* **283**: 29859–29872.
- Chiavari C, Zambonelli C, Benevelli M, et al. 2000. Structure of foam and film forming cells of *Saccharomyces cerevisiae*. *Ann Microbiol* **55**: 167–176.
- De Groot PWJ, Ram AF, Klis FM. 2005. Features and functions of covalently linked proteins in fungal cell walls. *Fungal Genet Biol* **42**: 657–675.
- Delneri D, Tomlin GC, Wixon JL, et al. 2000. Exploring redundancy in yeast genome: an improving strategy for use of the cre-loxP system. *Gene* **252**: 127–135.
- Douglas P, Meneses FJ, Jiranek V. 2006. Filtration, haze and foam characteristics of fermented wort mediated by yeast strain. *J Appl Microbiol* **100**: 58–64.
- Gietz RD, Schiestl RH. 2007. High-efficiency yeast transformation using the LiAc/ss carrier DNA/PEG method. *Nat Prot* **2**: 31–34.
- Giudicci P, Solieri L, Pulvirenti AM, Cassanelli S. 2005. Strategies and perspectives for genetic improvement of wine yeasts. *Appl Microbiol Biot* **66**: 622–628.
- Guldener U, Heck S, Fiedler T, et al. 1996. A new efficient disruption cassette for repeated use in budding yeast. *Nucleic Acids Res* **24**: 2519–2524.
- Hornsey HS. 1999. *Brewing*. RSC Paperbacks: Cambridge.
- Jentoft N. 1990. Why are proteins O-glycosylated? *Trends Biochem Sci* **15**: 291–294.
- Kasahara H, Ouchi K, Kurata K, et al. 1974. Genetic characters of non-foaming mutants of sake-yeast. *J Ferment Technol* **52**: 348–351.
- Klis MF, Mol P, Hellingwerf K, Brul S. 2002. Dynamics of cell wall structure in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Rev* **26**: 239–256.
- Klis FM, Boorsma A, De Groot PWJ. 2006. Cell wall construction in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **23**: 185–202.
- Kollár R, Reinhold BB, Petrakova EY, et al. 1997. Architecture of yeast cell wall. $\beta(1 \rightarrow 6)$ -glucan interconnects mannoprotein, $\beta(1 \rightarrow 3)$ -glucan and chitin. *J Biol Chem* **272**: 17762–17775.
- Kordialik-Bogacka E, Ambroziak W. 2004. Investigation of foam-active polypeptides during beer fermentation. *J Sci Food Agric* **84**: 1960–1968.
- Kotaka A, Sahara H, Kuroda K, et al. 2010. Enhancement of β -glucosidase activity on the cell-surface of sake yeast by disruption of *SEDI*. *J Biosci Bioeng* **109**: 442–446.
- Kyte J, Doolittle RF. 1982. A simple method for displaying the hydrophobic character of a protein. *J Mol Biol* **157**: 105–132.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680–685.
- Lesage G, Bussey H. 2006. Cell wall assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* **70**: 317–343.
- Lipke PN, Ovalle R. 1998. Cell wall architecture in yeast: new structure and new challenges. *J Bacteriol* **180**: 3735–3740.
- Ma C, Mortimer RK. 1983. Empirical equation that can be used to determine genetic map distances from tetrad data. *Mol Cell Biol* **3**: 1886–1887.
- Martínez-Rodríguez AJ, Pueyo E. 2009. Sparkling wines and yeast autolysis. In *Wine Chemistry and Biochemistry*, Moreno-Arribas MV, Polo MC (eds). Springer Science and Business Media: New York; 61–80.
- Martini A. 2003. Biotechnology of natural and winery-associated strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Int Microbiol* **6**: 207–209.
- Marullo P, Bely L, Masneuf-Pomaredé I, et al. 2004. Inheritable nature of oenological quantitative traits is demonstrated by meiotic segregation of industrial wine yeast strains. *FEMS Yeast Res* **4**: 711–719.
- Maujean A. 2003. *Enología: Fundamentos Científicos y Tecnológicos*, Flanzky AMV (ed.). Mundiprensa: Madrid.
- Miyashita K, Sakamoto K, Kitagaki H, et al. 2004. Cloning and analysis of the *AWAI* gene of a nonfoaming mutant of a sake yeast. *J Biosci Bioeng* **97**: 14–18.
- Mohan SB, Smith L, Kemp W, Lyddiatt A. 1992. An immunological analysis of beer foam. *J Inst Brew* **98**: 187–192.
- Molina M, Gil C, Pla J, et al. 2000. Protein localization approaches for understanding yeast cell wall biogenesis. *Microsc Res Techn* **51**: 601–612.
- Moreno-Arribas V, Pueyo E, Nieto FJ, et al. 2000. Influence of the polysaccharides and nitrogen compounds on foaming properties of sparkling wines. *Food Chem* **70**: 309–317.
- Novo M, Bigey F, Beyne E, et al. 2009. Eukaryote-to-eukaryote gene transfer events revealed by the genome sequence of the wine yeast *Saccharomyces cerevisiae* EC1118. *Proc Natl Acad Sci USA* **106**: 16333–16338.
- Núñez YP, Carrascosa AV, González R, et al. 2006. Isolation and characterization of a thermally extracted yeast cell wall fraction potentially useful for improving the foaming properties of sparkling wines. *J Agric Food Chem* **54**: 7898–7903.
- Perkins D. 1949. Biochemical mutants of the smut fungus *Ustilago maydis*. *Genetics* **34**: 607–626.
- Pretorius IS. 2000. Tailoring wine yeast for the new millennium: novel approaches to the ancient wine making. *Yeast* **16**: 675–729.
- Swiegers JH, Bartowsky EJ, Henschke PA, Pretorius IS. 2005. Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavor. *Aust J Grape Wine Res* **11**: 139–173.
- Shimoi H, Kitagaki H, Ohmori H, et al. 1998. Sed1p is a major cell wall protein of *Saccharomyces cerevisiae* in the stationary phase and is involved in lytic enzyme resistance. *J Bacteriol* **180**: 3381–3387.
- Shimoi I, Sakamoto K, Okuda M, et al. 2002. The *AWAI* gene is required for the foam-forming phenotype and cell surface hydrophobicity of sake yeast. *Appl Environ Microbiol* **68**: 2018–2025.
- Schreuder MP, Brekelmans S, Van Den Ende H, Klis FM. 1993. Targeting of a heterologous protein to the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* **9**: 399–409.
- Senée J, Robillard B, Vignes-Alder M. 1999. Films and foams of Champagne wines. *Food Hydrocolloid* **13**: 15–26.
- Sherman F, Wakem P. 1991. Mapping yeast genes. In *Methods in Enzymology. A Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology*, vol 194, Guthrie C, Fink GR (eds). Academic Press: San Diego, CA; 38–56.
- Thornton RJ. 1978. Investigation on the genetics of foaming in wine yeasts. *Eur J Appl Microbiol Biotechnol* **5**: 103–107.
- Thornton RJ. 1978. The mapping of two dominant genes for a foaming in wine yeasts. *FEMS Microbiol Lett* **4**: 207–209.

- Van der Vaart JM, Caro HP, Chapman JW, *et al.* 1995. Identification of three mannoproteins in the cell wall of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* **177**: 3104–3110.
- Watari J, Takata Y, Ogawa M, *et al.* 1994. Molecular cloning and analysis of the yeast flocculation gene *FLO1*. *Yeast* **10**: 211–225.
- Wood JS. 1982. Mitotic chromosome loss induced by methyl benzimidazol-2-yl-carbamate as a rapid mapping method in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* **2**: 1080–1087.
- Yin QY, De Groot PW, Dekker HL, *et al.* 2005. Comprehensive proteomic analysis of *Saccharomyces cerevisiae* cell walls: identification of proteins covalently attached via GPI remnants or mild alkali-sensitive linkages. *J Biol Chem* **280**: 20894–20901.