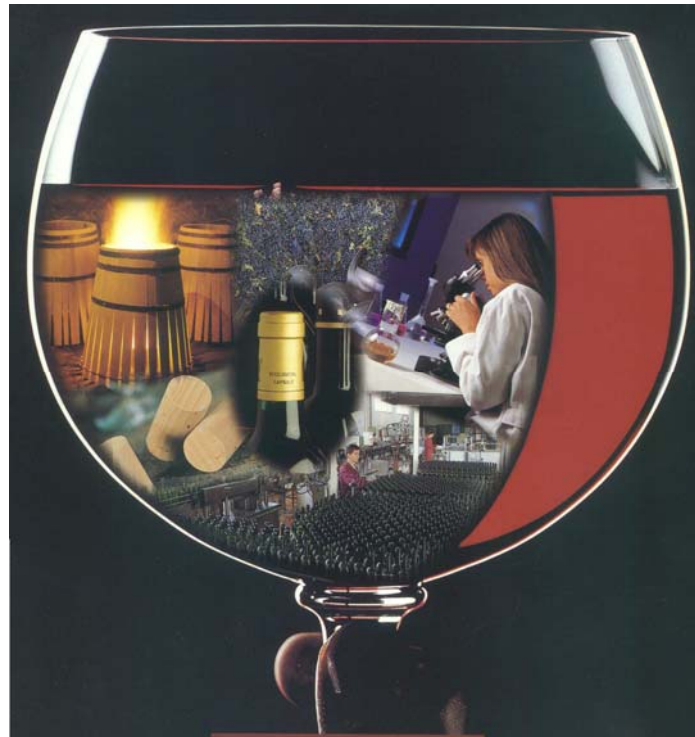


MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS

Amparo Querol
IATA-CSIC, Valencia (España)



NUEVAS TENDENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA VÍNICA

- **Selección de levaduras**
- Desarrollo de técnicas moleculares de identificación y caracterización de levaduras
- Mejora genética de levaduras vínicas



VENTAJAS DE LAS LEVADURAS SECAS ACTIVAS

- 1. INICIO RÁPIDO DE LA FERMENTACIÓN**
- 2. REGULARIDAD EN EL CURSO DE LA FERMENTACIÓN**
- 3. SEGURIDAD DE UNA BUENA FERMENTACIÓN**

Condiciones climatológicas favorables



Condiciones climatológicas desfavorables

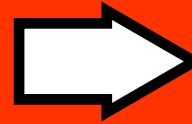


SELECCIÓN DE LEVADURAS

Fenotipo killer



Microvinificación



Catas



NUEVAS TENDENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA VÍNICA

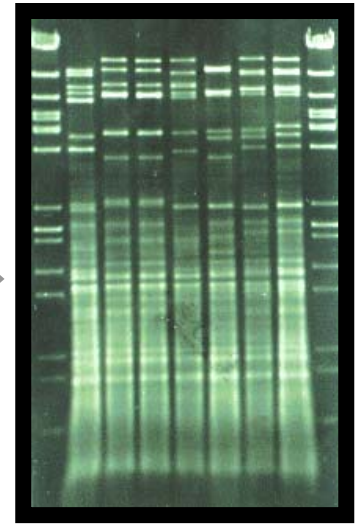
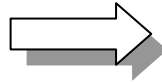
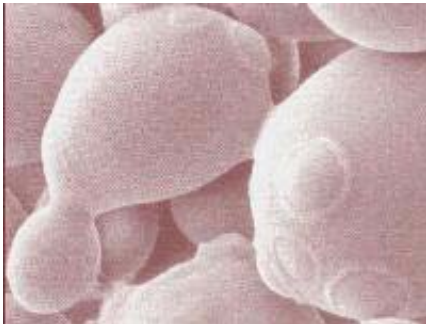
- Selección de levaduras
- Desarrollo de técnicas moleculares de identificación y caracterización de levaduras
- Mejora genética de levaduras vínicas



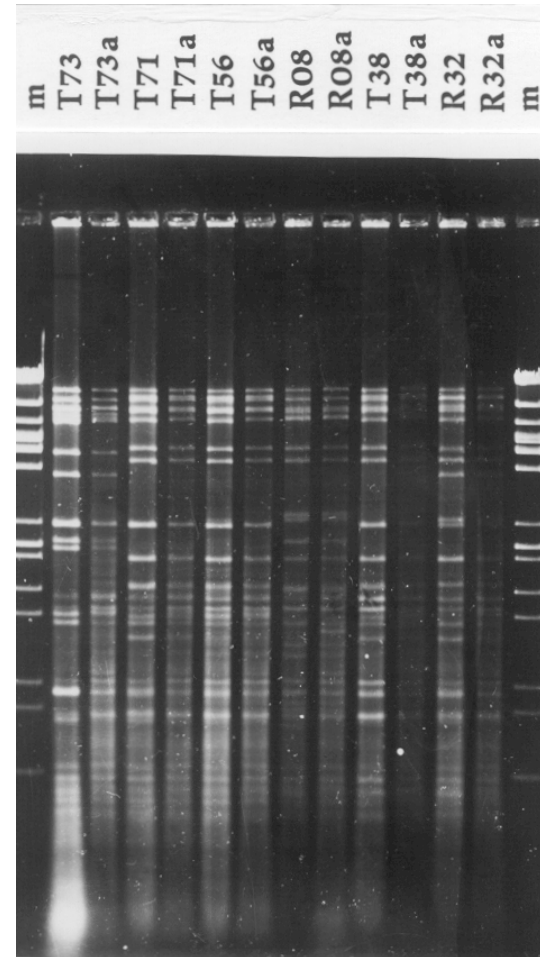
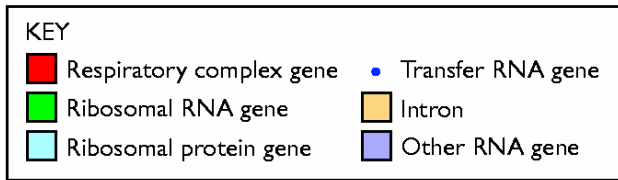
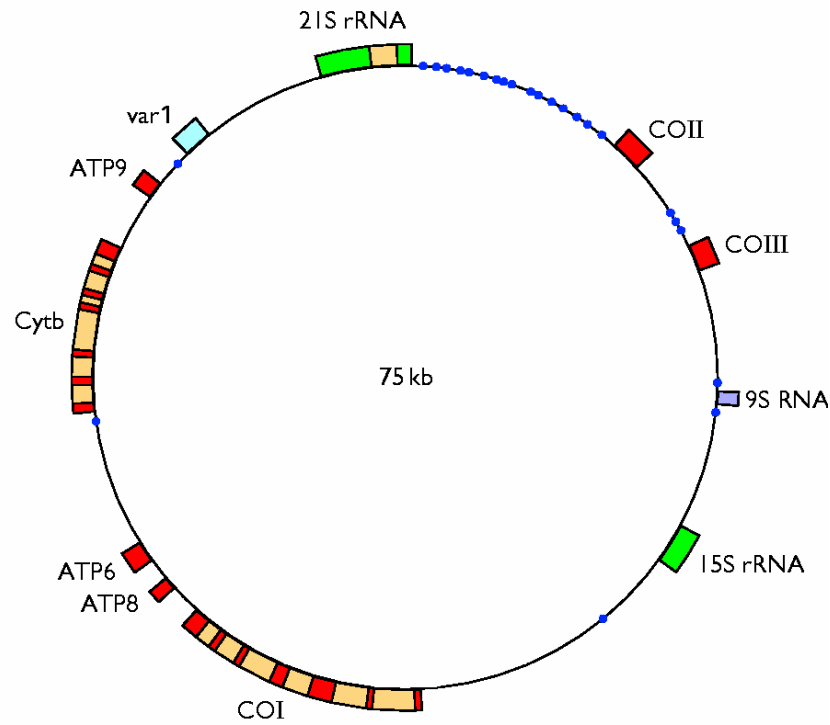
TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN MOLECULAR

- **Análisis de restricción del mtDNA**
- **Cariotipos nucleares**
- **Elementos delta**
- **RAPD-PCR**

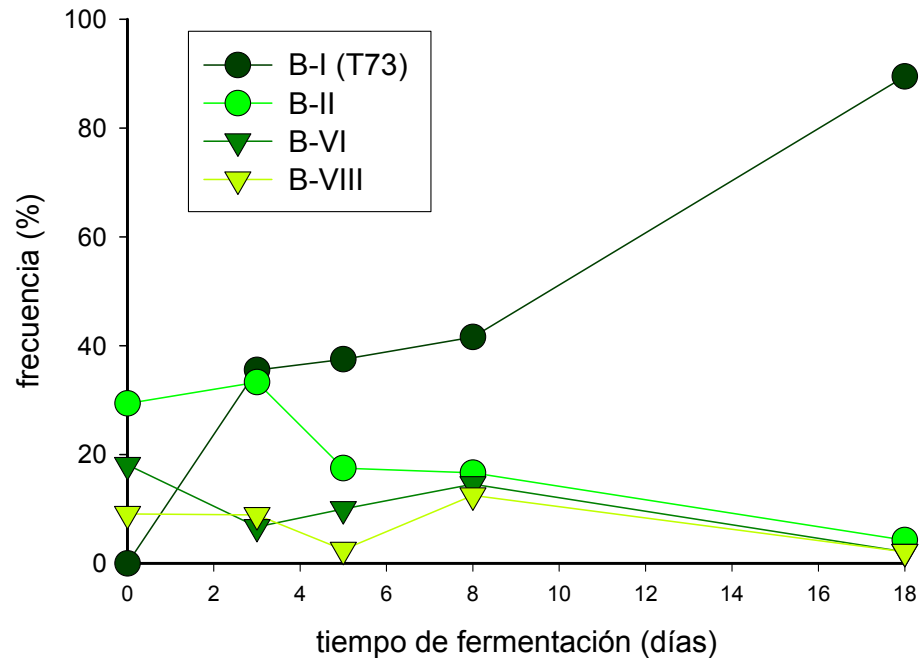
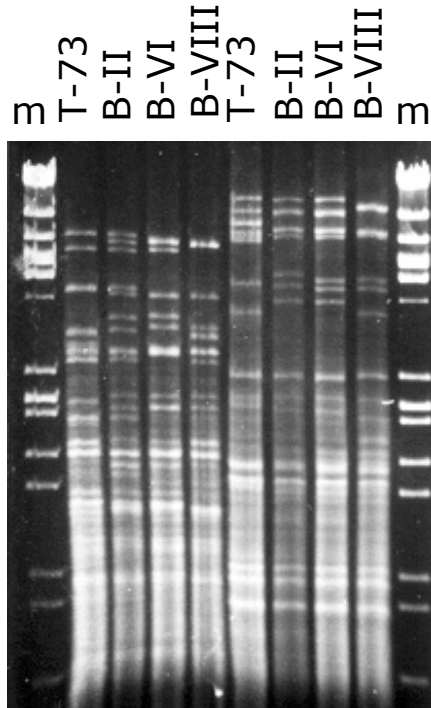
La selección de levaduras para uso industrial requiere de una caracterización para su inequívoca identificación y diferenciación



(B) *Saccharomyces cerevisiae*



¿Se impone la levadura inoculada durante la fermentación?



NUEVAS TENDENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA VÍNICA

- Selección de levaduras
- Desarrollo de técnicas moleculares de identificación y caracterización de levaduras
- **Mejora genética de levaduras vnicas**

MEJORA GENÉTICA DE “STARTERS”

- Selección de variantes
- Mutagénesis y selección de variantes
- Hibridación entre células haploides
- Fusión de protoplastos
- Modificación genética: clonación de genes y transformación

MEJORA DEL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

- Inicio rápido de fermentación
- Elevada velocidad de la fermentación
- Alta resistencia a temperatura elevada
- Alta resistencia a etanol
- Alta tolerancia al CO₂
- Capacidad de floculación

MEJORA DE LA CALIDAD Y LA PRODUCCIÓN DEL VINO

- Baja producción de metabolitos no deseados (ácidos volátiles, HS_2 , derivados de SO_2)
- No formación de espuma
- Control de la acidez
- Aumento de aromas afrutados
- Estabilidad del color

MEJORA DEL PROCESO DE PRODUCCIÓN INDUSTRIAL DE LEVADURA COMERCIAL SECA

- Aumento de la viabilidad**
- Estabilidad de la capacidad fermentativa**

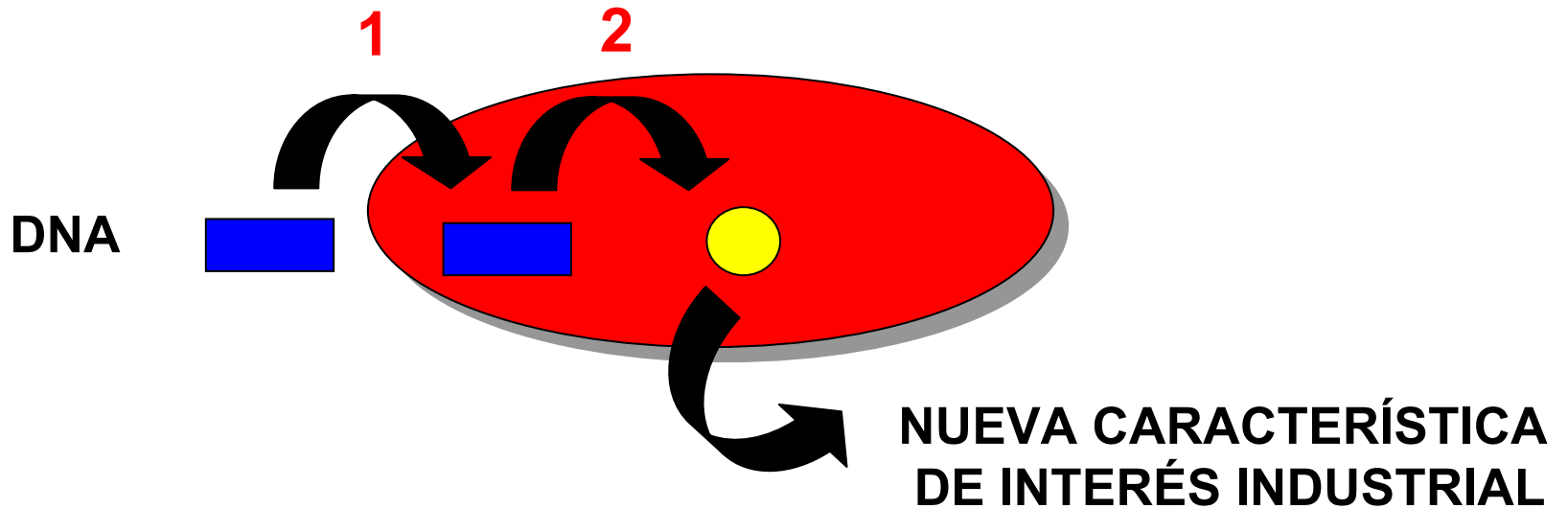
POSIBILIDAD DE MEJORA GENÉTICA

- 1. Del proceso de fermentación alcohólica**
- 2. De la calidad de las propiedades del vino**
- 3. Del proceso de producción de la levadura comercial**

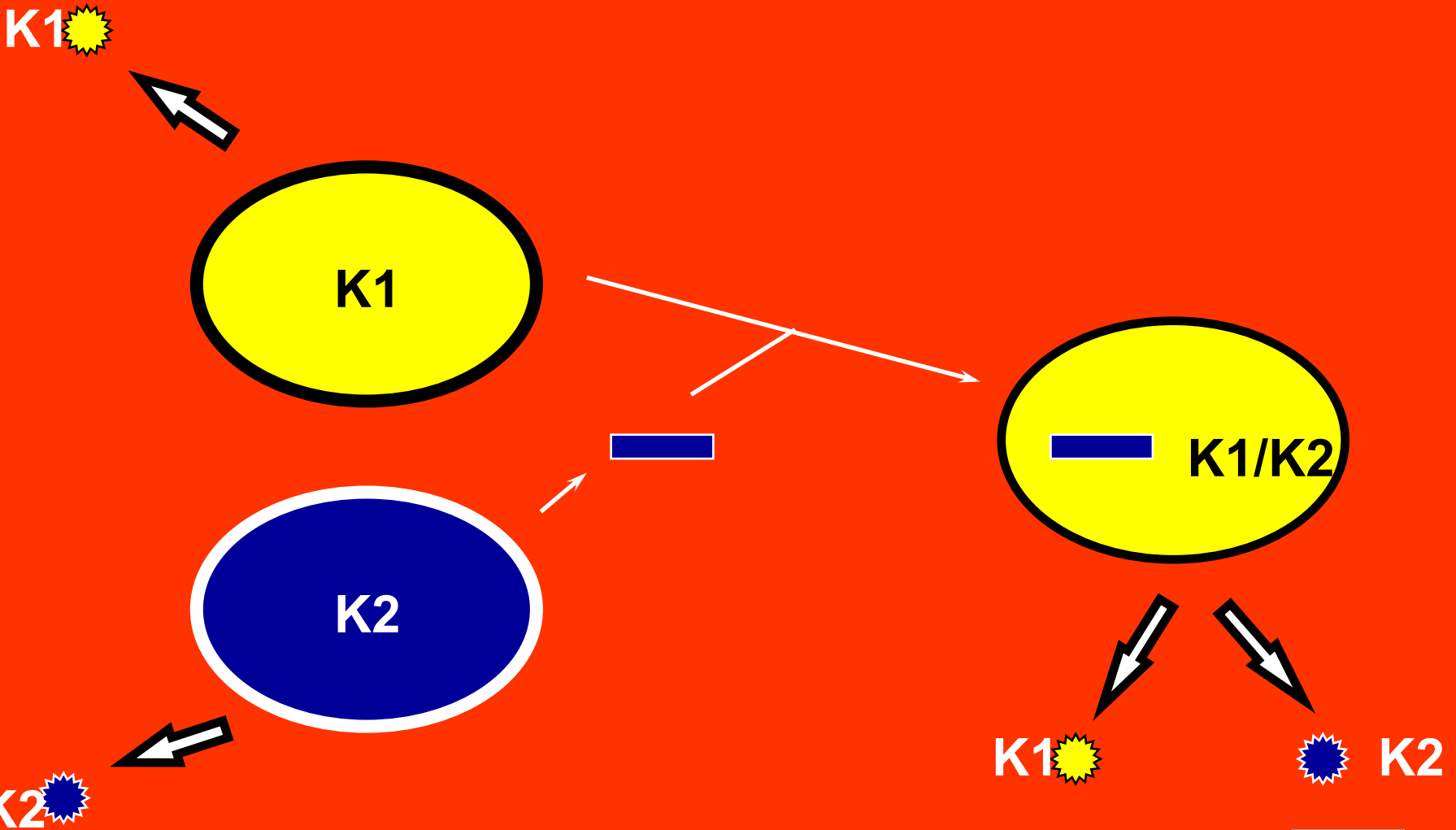
MEJORA GENÉTICA DE “STARTERS”

- Selección de variantes
- Mutagénesis y selección de variantes
- Hibridación entre células haploides
- Fusión de protoplastos
- **Modificación genética: clonación de genes y transformación**

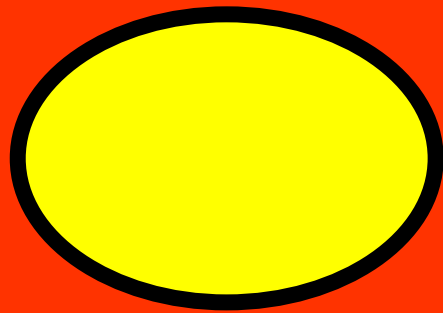
MODIFICACIÓN GENÉTICA DE “STARTERS”



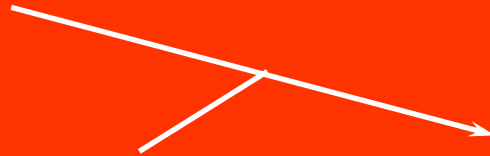
AMPLIACIÓN DEL GENOTIPO KILLER



FERMENTACIÓN MIXTA

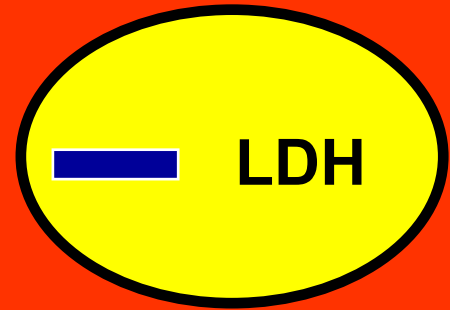


S. cerevisiae



LDH

Lactobacillus casei



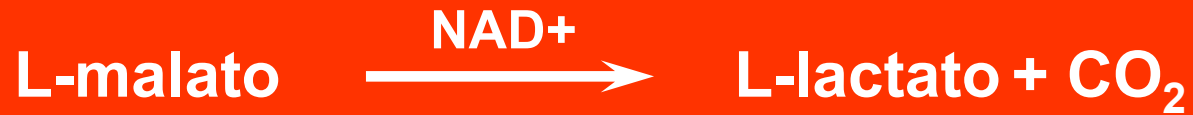
LDH



GLUCOSA

ETANOL + ÁCIDO LÁCTICO

FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA



mle

Lactobacillus delbrueckii

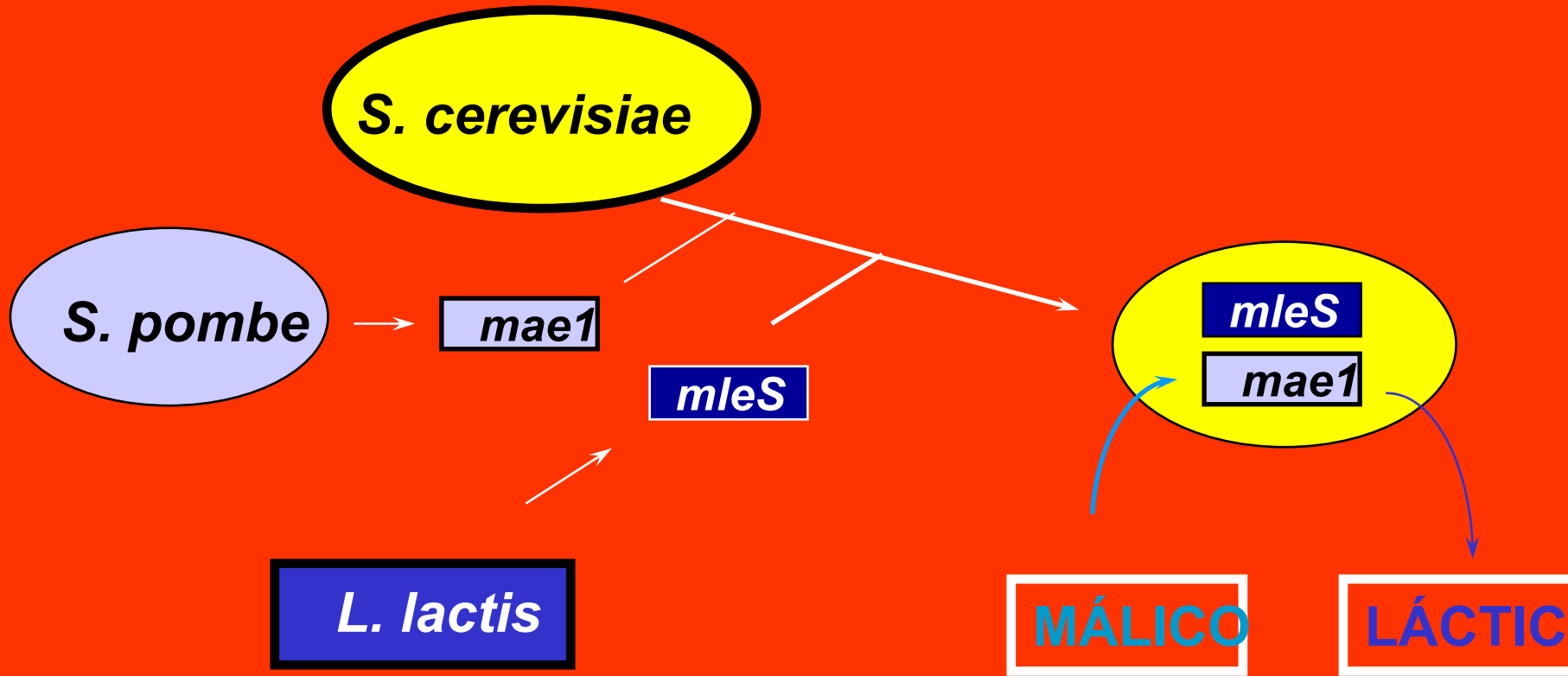
mleS

Lactococcus lactis

mleA

Leuconostoc oenos

FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA



MODIFICACIÓN GENÉTICA DE “STARTERS”

Levaduras vínicas modificadas genéticamente mediante técnicas del DNA recombinante (Querol y Ramón, 1996 y Pretorius 2000).

Gen expresado	Efecto en la levadura vínica o en el vino
Toxina “killer” K1	Ventaja ecológica de la cepa al inocular
Pectato liasa	Problemas de filtración e incremento del aroma afrutado
Poligalacturonasas	ND
β -(1,4)-endoglucanas	Incremento del aroma afrutado
β -(1,4)-endoglucanas	Incremento del aroma afrutado
Arabinofuranosidasa	Incremento del aroma afrutado
β -glucosidasa	Incremento del aroma afrutado e incremento de resveratrol
Xilanasa	Incremento del aroma afrutado
L(+)-lactato deshidrogenasa	Aumenta la acidez del vino
Malato permeasa y enzima málico	Disminución de la acidez del vino
Disminución de la acidez del vino	Incremento de los aromas secundarios: ésteres
Sobreexpresión de glicerol-3-fosfato dehidrogenasa	Incremento en la producción de glicerol
Expresión de bacteriocinas de <i>Pediococcus acidilactici</i> y <i>Leuconostoc carnosum</i>	Inhibición del crecimiento de bacterias alterantes del vino

Enzimas comerciales

- Pectinasas

- Mejorar rendimiento
- Mejorar procesos de filtración y clarificación
- Extracción de Fenoles (Antocianos, Taninos, otros)
- Extracción de precursores del aroma
- Estabilidad del vino

- Glucanasas

- Glucosidasas

- Liberación de aromas primarios

MEZCLAS COMERCIALES

- **Falta de especificidad**
- **Numerosas actividades contaminantes**
- **Poca repetitividad de resultados de lote a lote**
- **Poco activas en condiciones de vinificación**

POSIBILIDADES

- **Adición directa: producción usando hongos filamentosos**
- **Sobreexpresión en levadura vínica**

INCREMENTO DE AROMA

PRIMARIOS



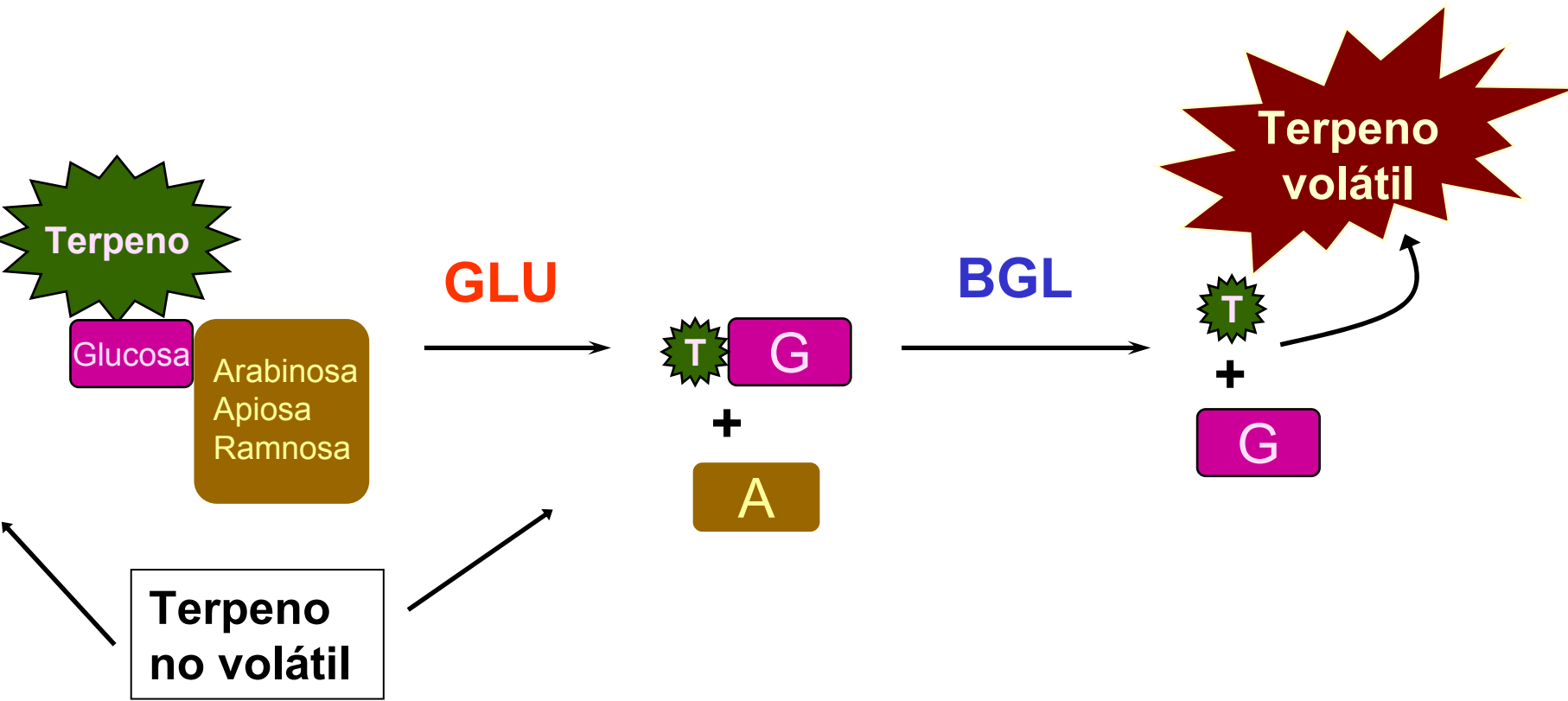
SECUNDARIOS



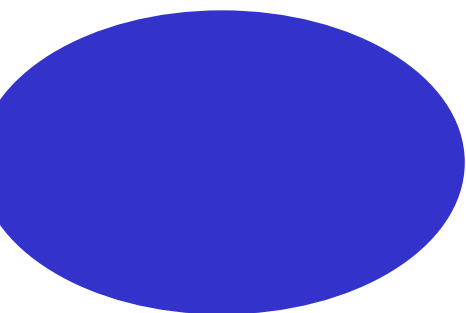
TERCIARIOS



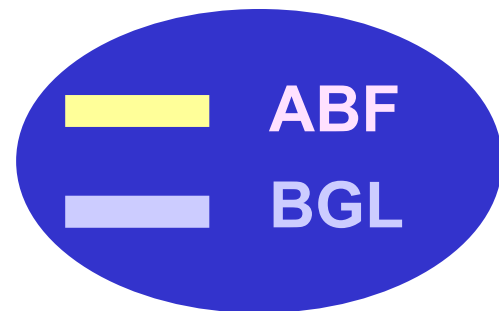
AROMA PRIMARIO



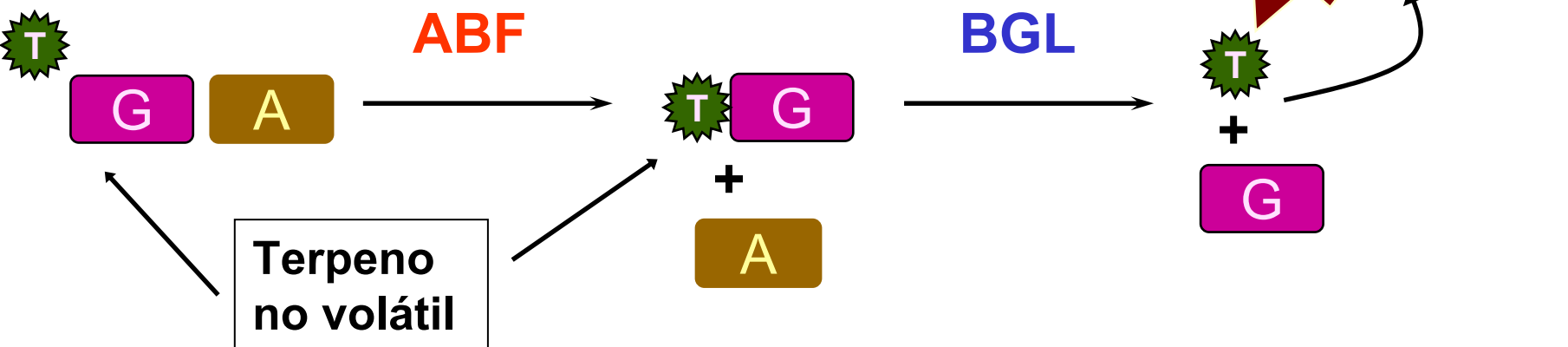
LEVADURAS VÍNICAS HIDROLÍTICAS



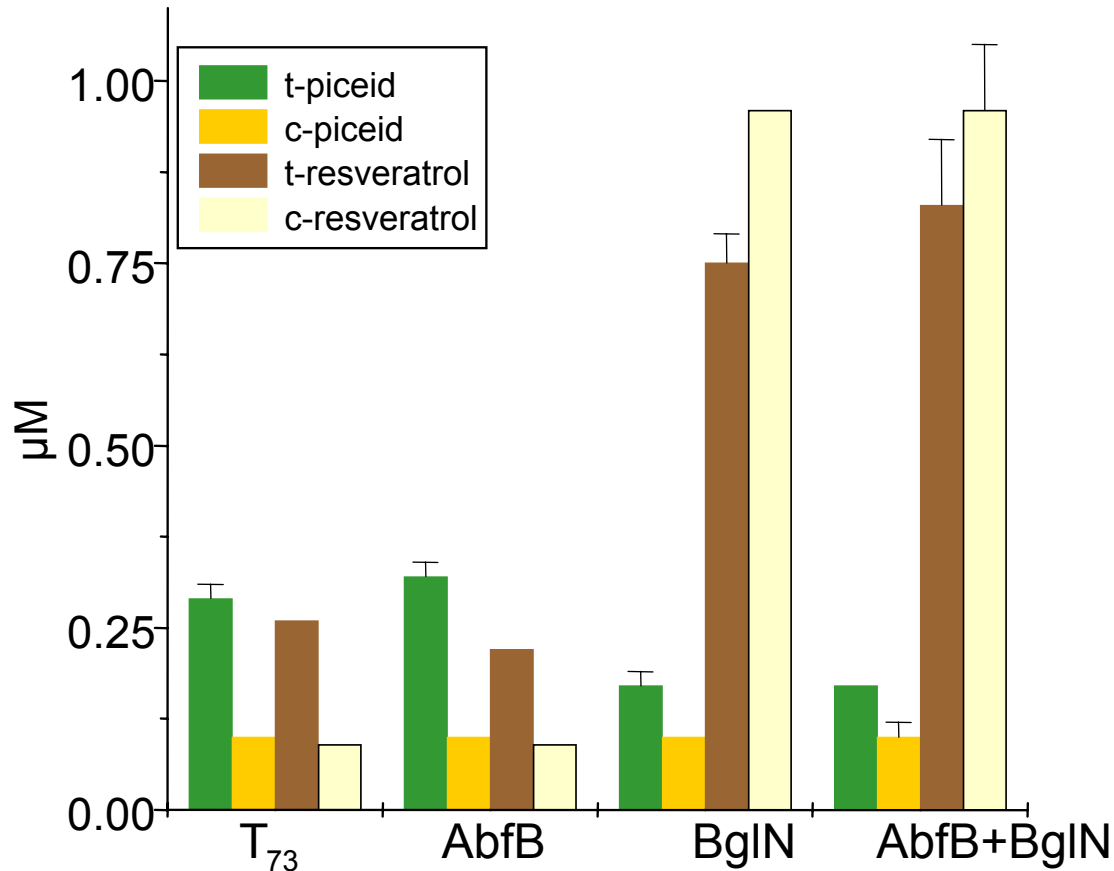
Aspergillus niger ABF
Candida molischiana BGL



S. cerevisiae



INCREMENTO DEL RESVERATROL

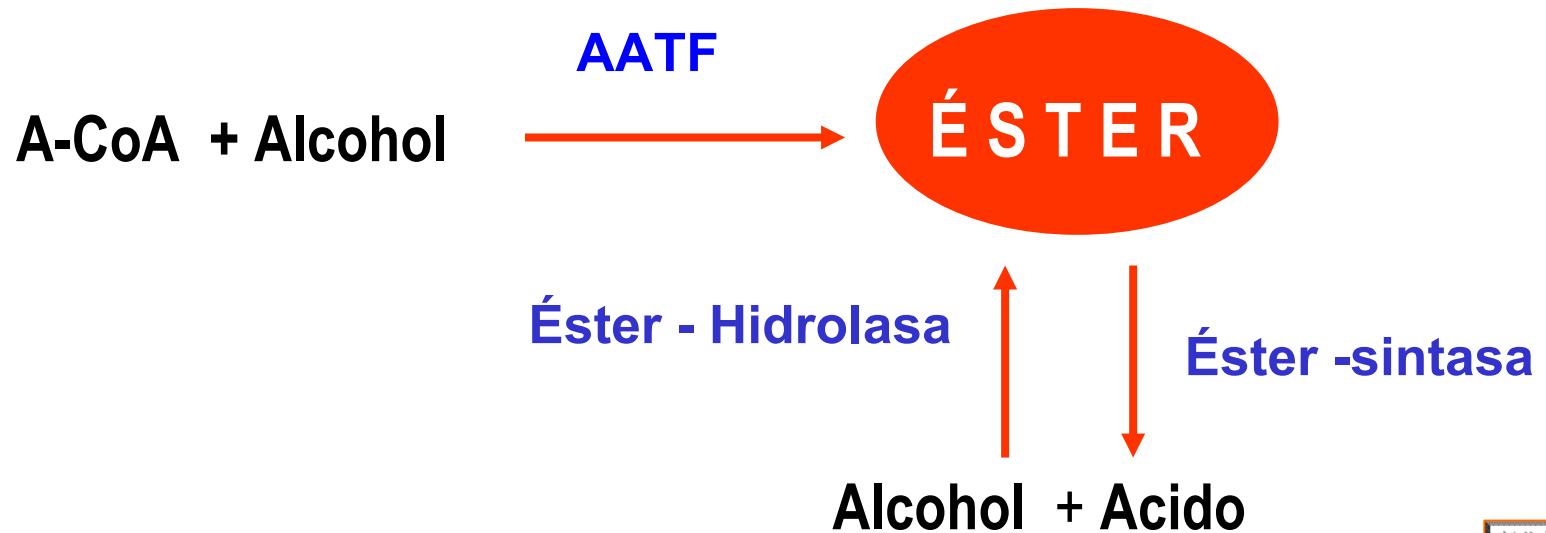


AROMAS SECUNDARIOS

ÉSTER - SINTASA

ÉSTER - HIDROLASA

ALCOHOL ACETIL TRANSFERASA



COMERCIALIZACIÓN DE LOS “VINOS” RECOMBINANTES

Composición nutricional

→ EQUIVALENCIA SUBSTANCIAL

**Sistemas simulados de
fluidos digestivos**

→ FALTA DE ALERGENICIDAD

**Administración oral de
proteína pura a animales de
laboratorio**

→ FALTA DE TOXICIDAD



MODIFICACIÓN GENÉTICA DE “STARTERS”

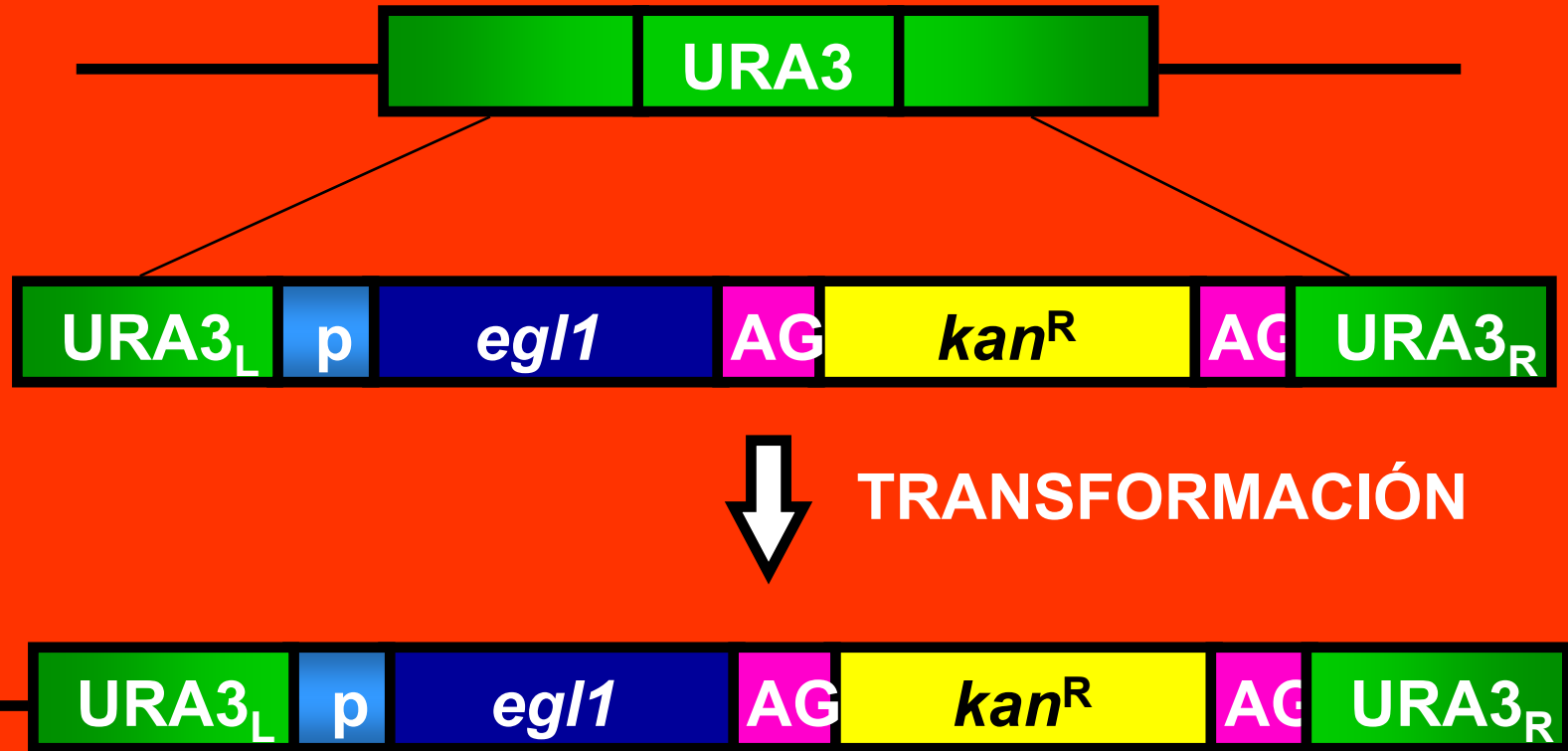
- 1. Sistemas de integración en el genoma de la levadura: levaduras GRAS**
- 2. Regulación de la expresión génica**
- 3. Mejora de respuesta al estrés de levaduras vínicas industriales**

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS



Cassette de integración

LEVADURAS VÍNICAS GRAS



Cepa transformada (Δ URA3, *kan^R*, *egl1*)

LEVADURAS VÍNICAS GRAS



Cepa transformada (Δ URA3, kan^R, egl1)

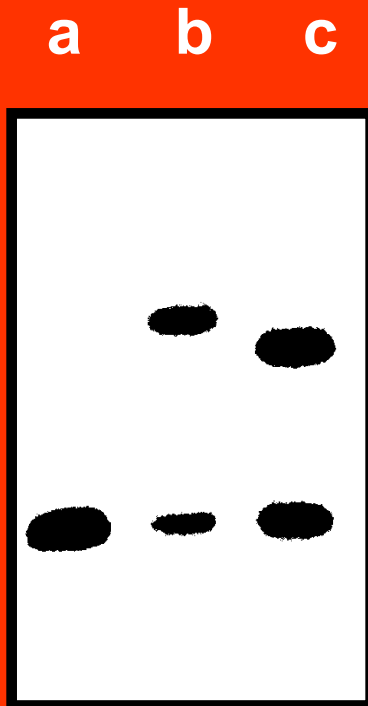


- KANAMICINA



Cepa transformada GRAS (Δ URA3, egl1)

LEVADURAS VÍNICAS GRAS



a) URA3 (2n)

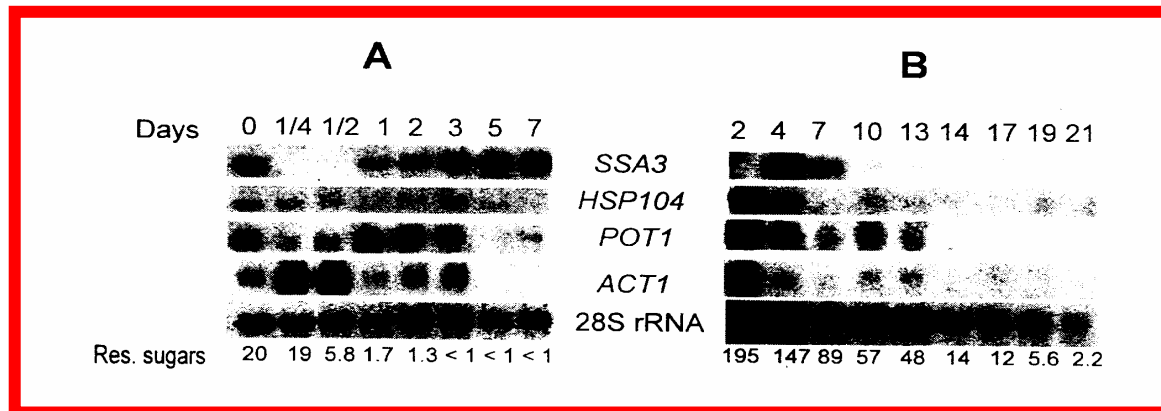
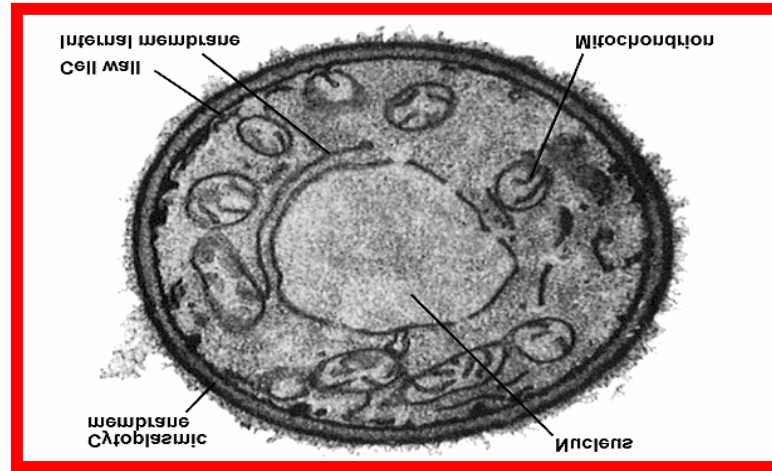
b) Δ URA3, *kan*^R, *egl1*

c) Δ URA3, *egl1*

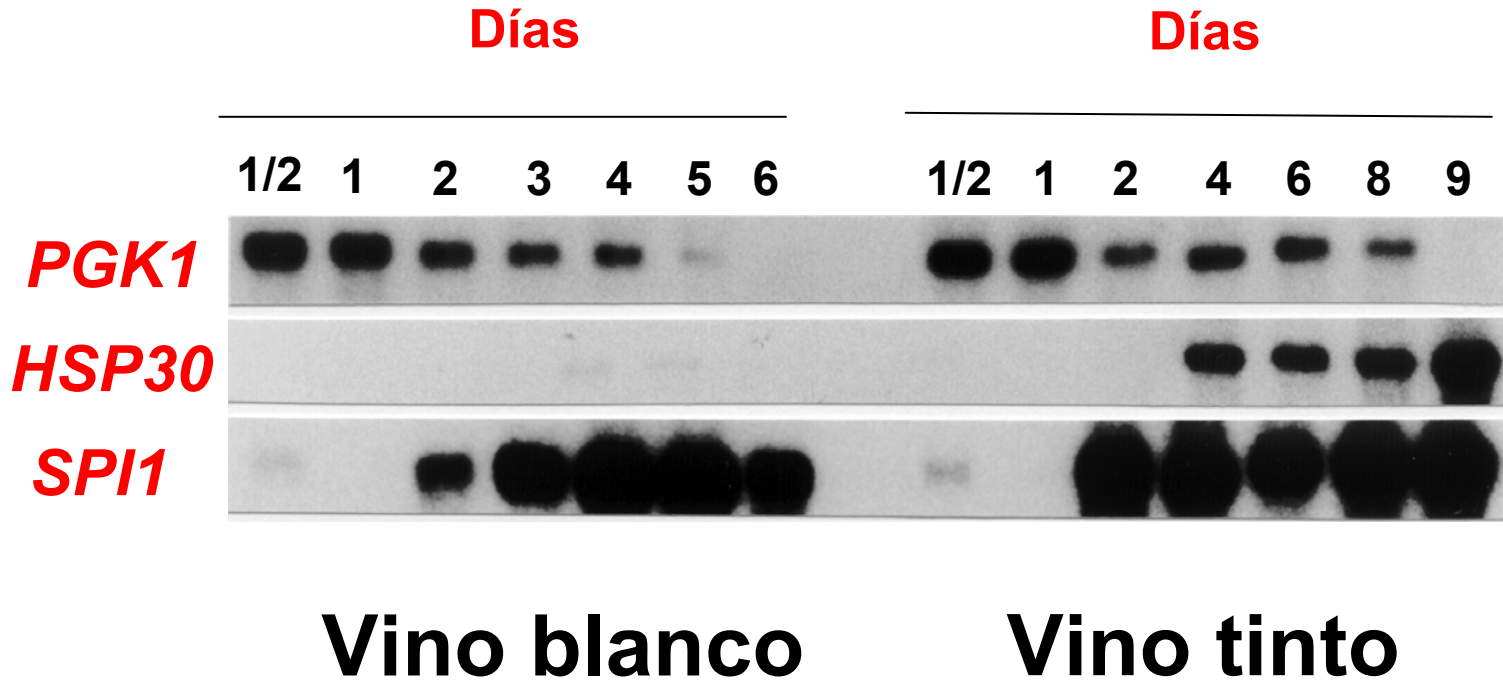
MODIFICACIÓN GENÉTICA DE “STARTERS”

- 1. Sistemas de integración en el genoma de la levadura: levaduras GRAS**
- 2. Regulación de la expresión génica**
- 3. Mejora de respuesta al estrés de levaduras vínicas industriales**

EXPRESIÓN GÉNICA EN LEVADURAS



REGULACIÓN GÉNICA (Diferencias entre vinos)



MODIFICACIÓN GENÉTICA DE “STARTERS”

- 1. Sistemas de integración en el genoma de la levadura: levaduras GRAS**
- 2. Regulación de la expresión génica**
- 3. Mejora de respuesta al estrés de levaduras vínicas industriales**

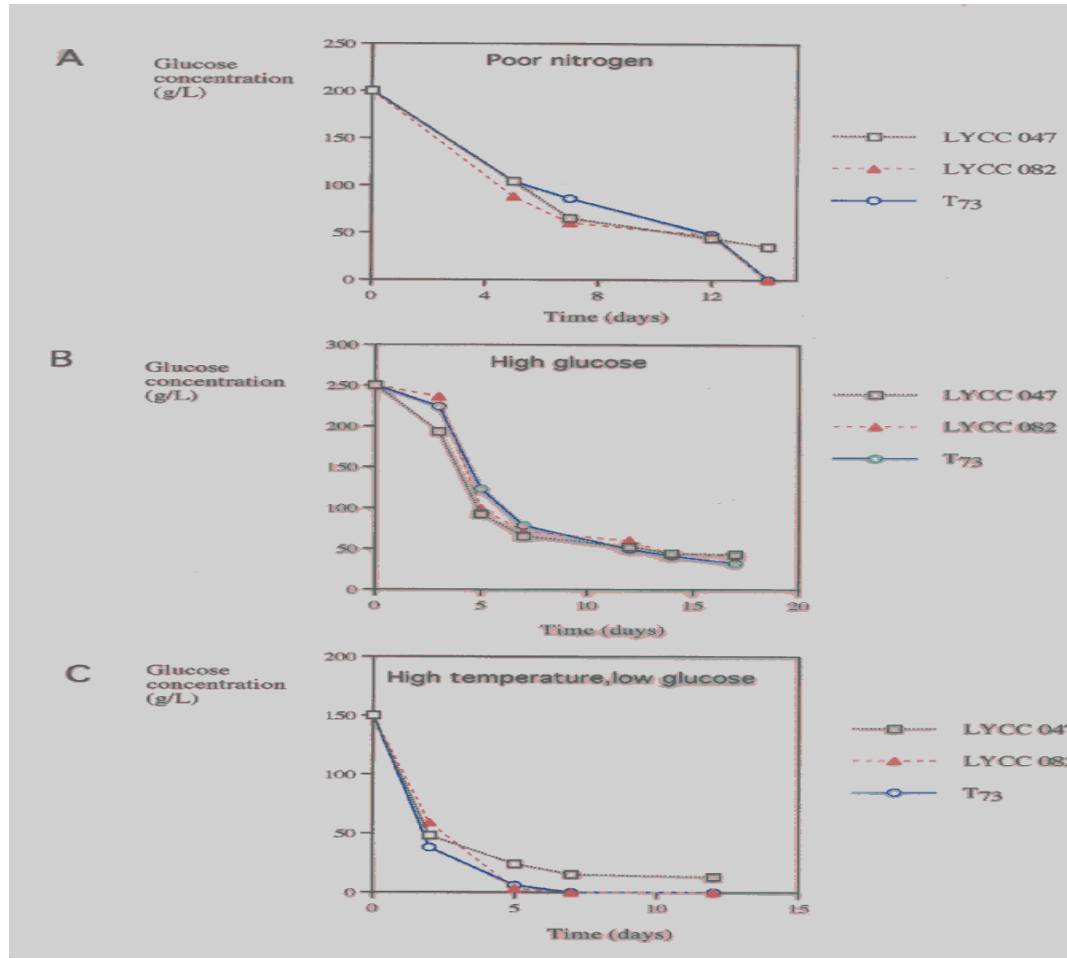
MEJORA DE RESPUESTA AL ESTRÉS DE LEVADURAS VÍNICAS INDUSTRIALES

- 1. Aspectos fisiológicos y moleculares de la adaptación a las condiciones adversas de los procesos industriales**
- 2. Identificación de nuevos genes implicados en la resistencia a estrés de cepas vínicas**
- 3. Mejora genética: aumento de la resistencia a estrés de cepas vínicas.**

RESISTENCIA A ESTRÉS, EXPRESIÓN GÉNICA Y COMPORTAMIENTO FERMENTATIVO

- 1. Viabilidad frente a varias condiciones de estrés**
- 2. Expresión de genes marcadores de estrés**
- 3. Comportamiento en condiciones de microvinificación**

Expresión de genes marcadores de estrés



Expresión de genes marcadores de estrés

