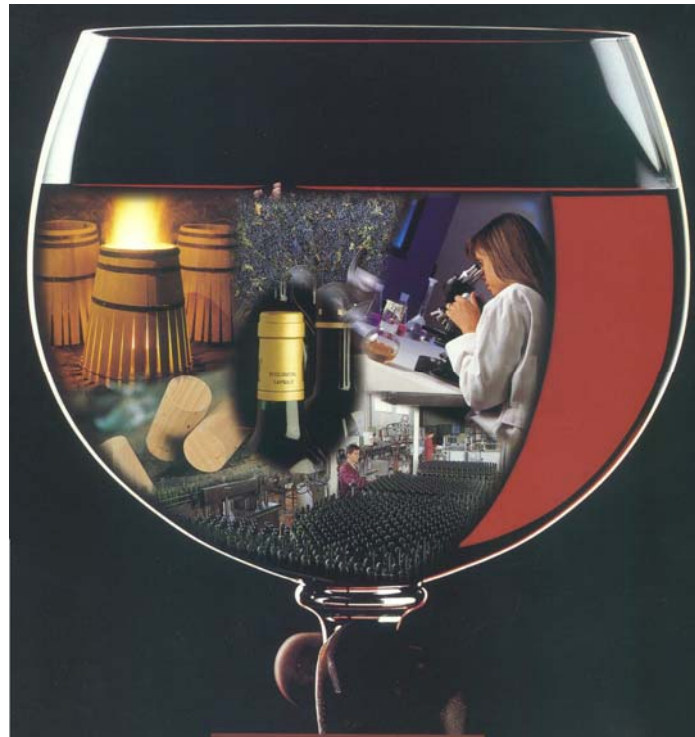


MODIFICACIÓN GENÉTICA DE LEVADURAS VÍNICAS

Amparo Querol
IATA-CSIC, Valencia (España)



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**

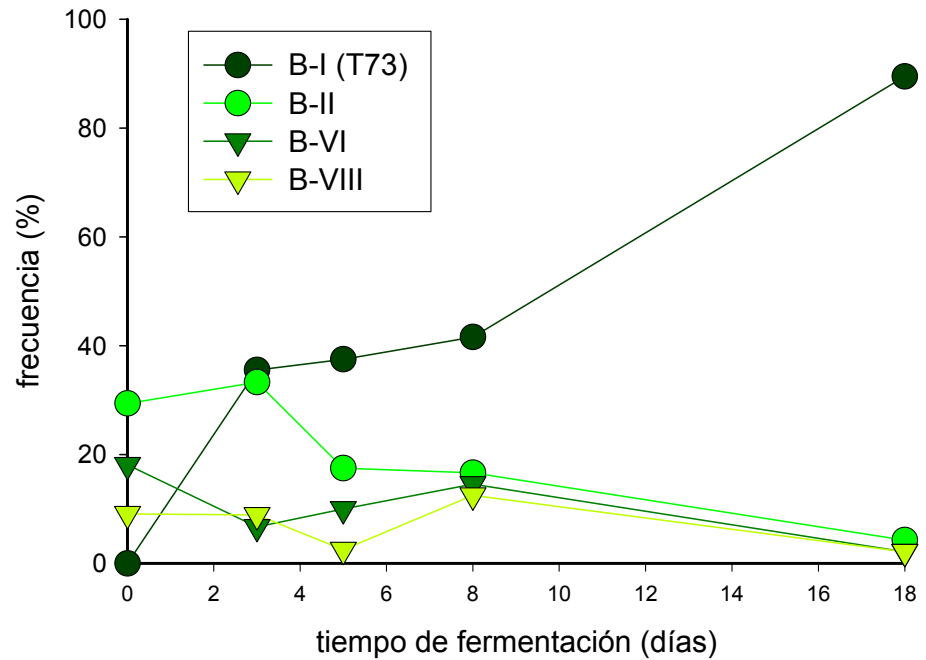
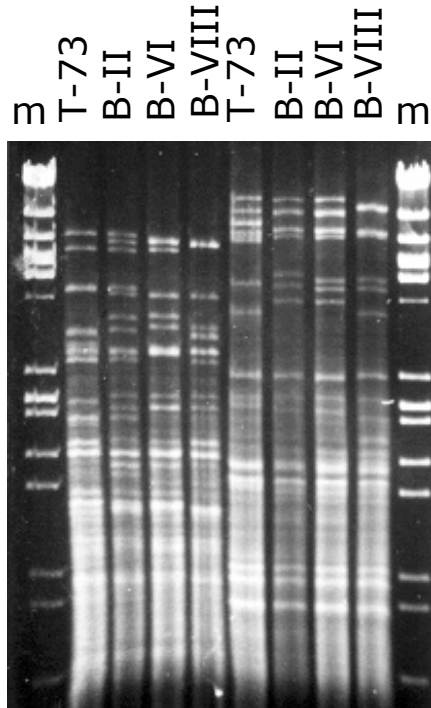
Condiciones climatológicas favorables



Condiciones climatológicas desfavorables



¿Se impone la levadura inoculada durante la fermentación?



POSIBILIDAD DE MEJORA GENÉTICA

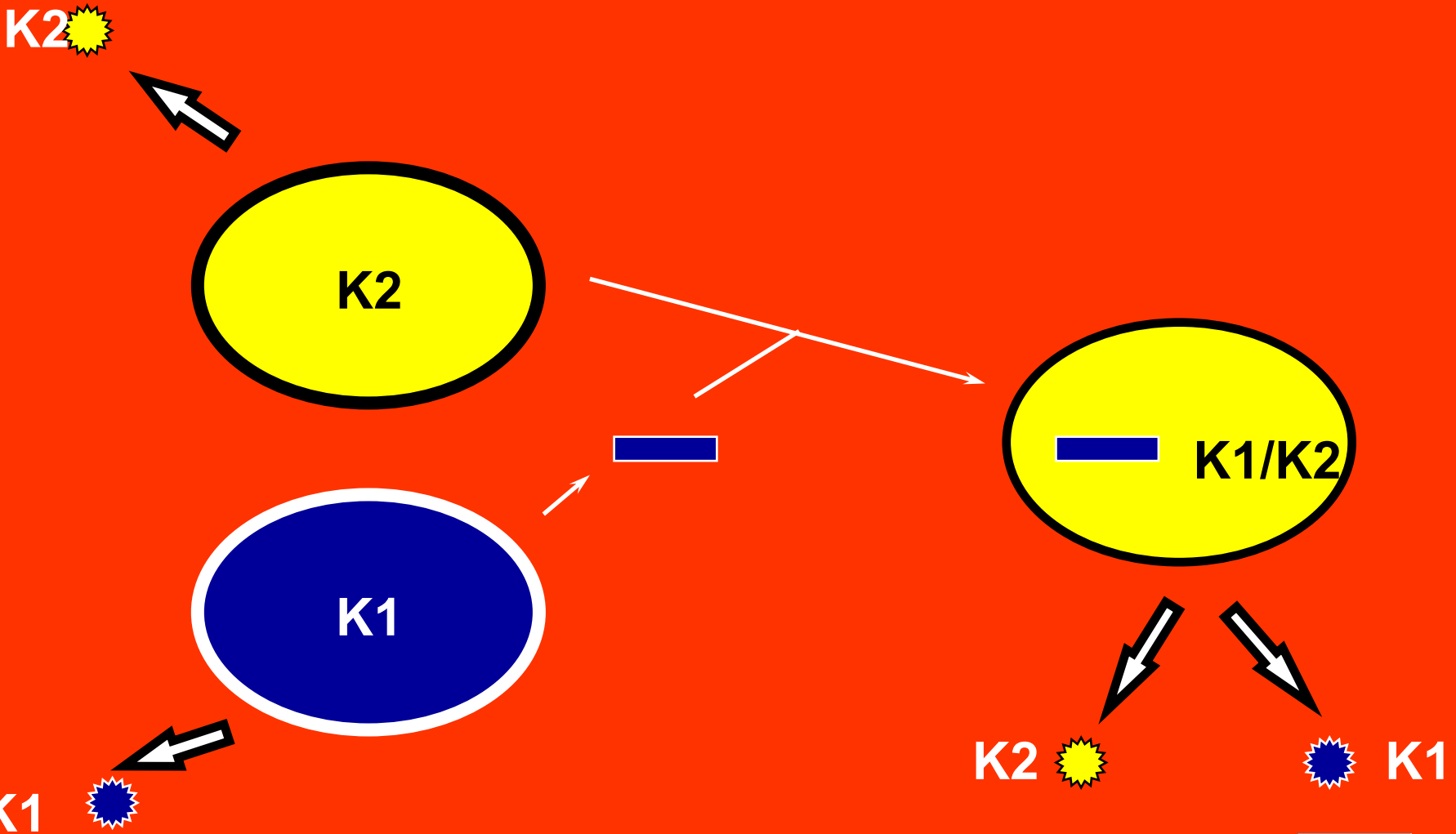
- 1. Del proceso de fermentación alcohólica**
- 2. De la calidad de las propiedades del vino**
- 3. Del proceso de producción de la levadura comercial**

MODIFICACIÓN GENÉTICA DE “STARTERS”

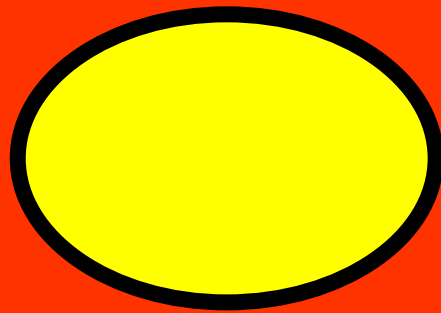
Levaduras vínicas modificadas genéticamente mediante técnicas del DNA recombinante (Querol y Ramón, 1996 y Pretorius 2000).

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

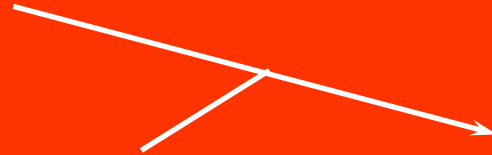
AMPLIACIÓN DEL GENOTIPO KILLER



FERMENTACIÓN MIXTA

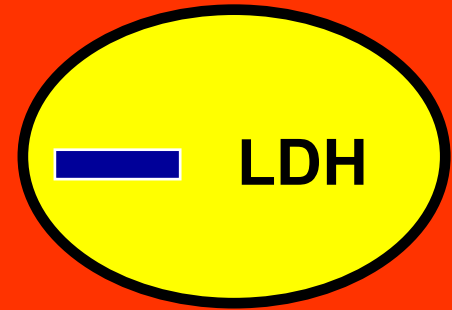


S. cerevisiae



LDH

Lactobacillus casei



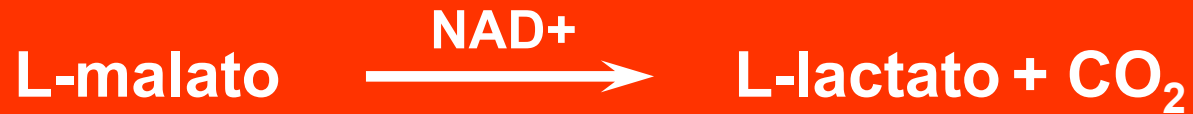
LDH



GLUCOSA

ETANOL + ÁCIDO LÁCTICO

FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA



mle

Lactobacillus delbrueckii

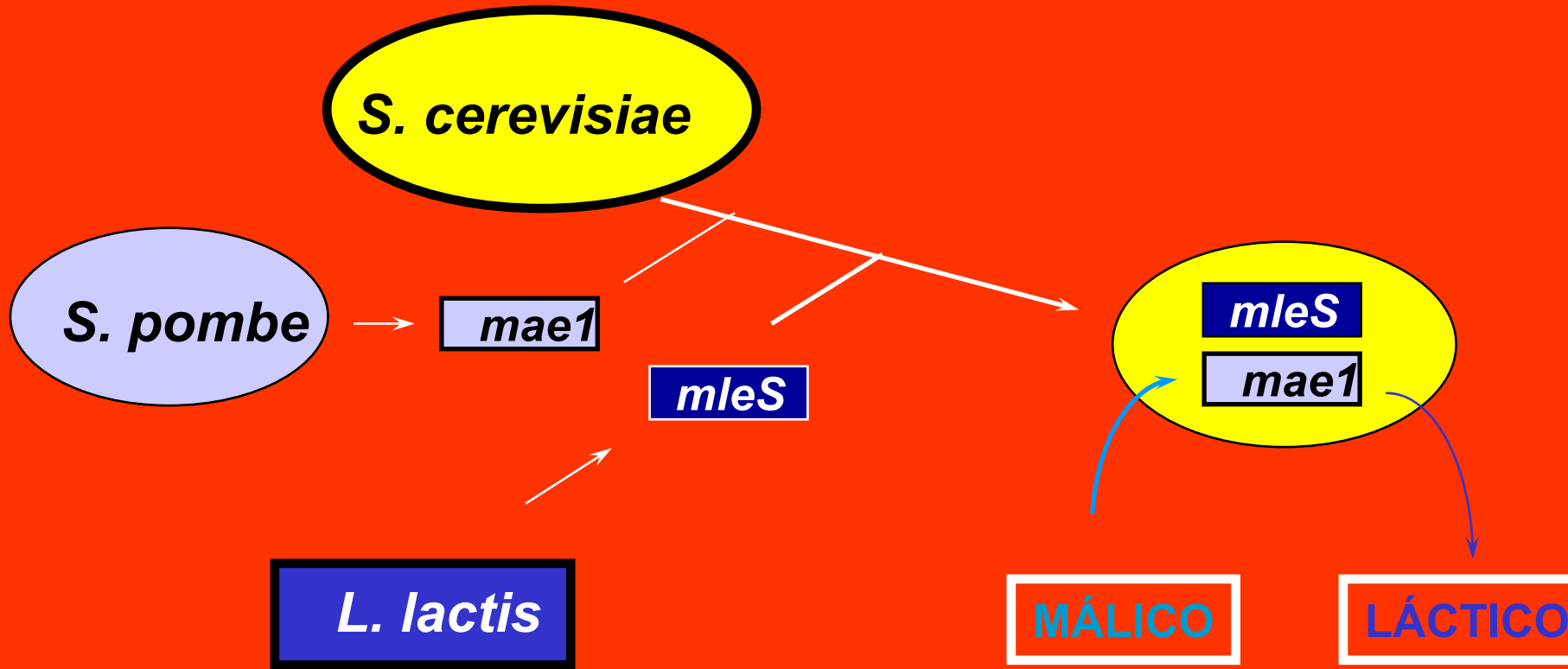
mleS

Lactococcus lactis

mleA

Leuconostoc oenos

FERMENTACIÓN MALOLÁCTICA



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

POSIBILIDADES

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

INCREMENTO DE AROMA

PRIMARIOS



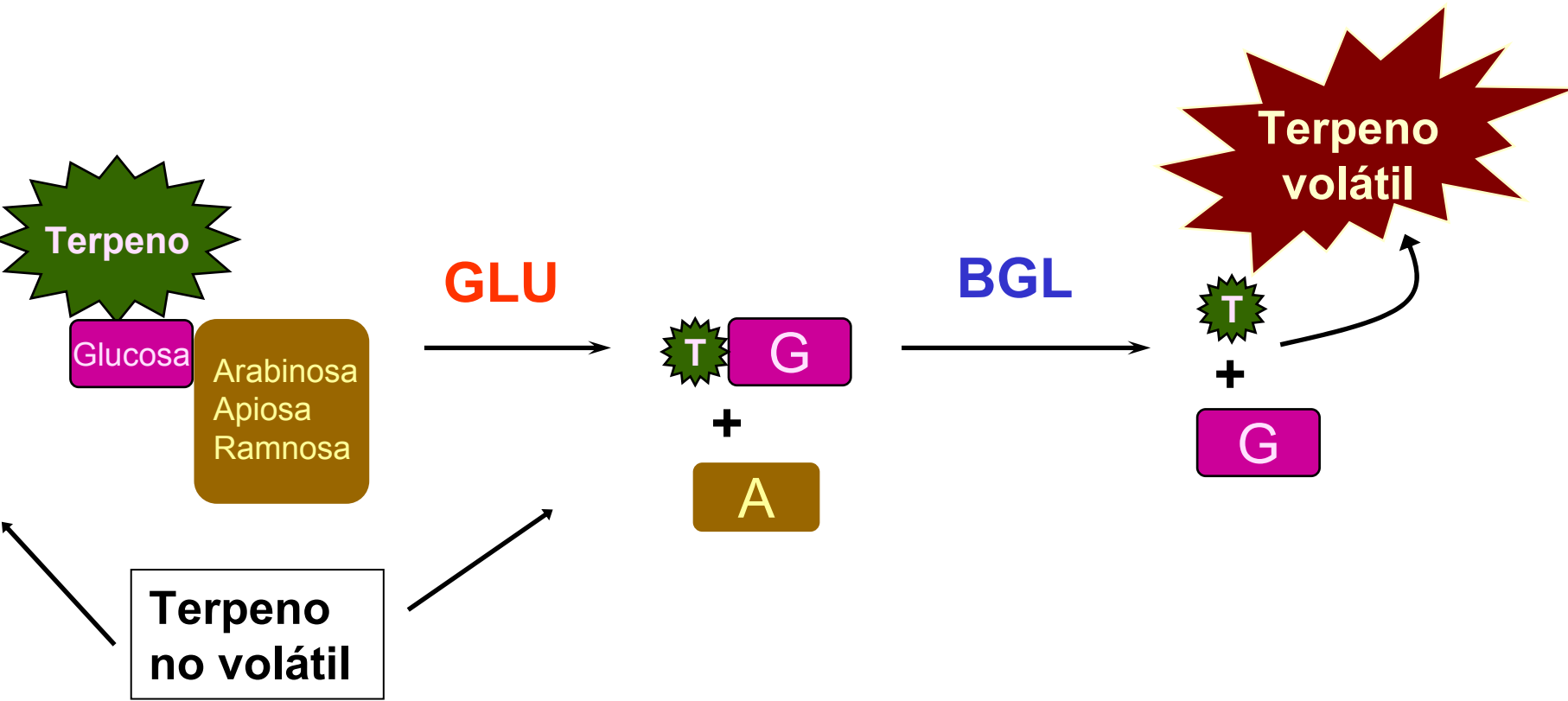
SECUNDARIOS



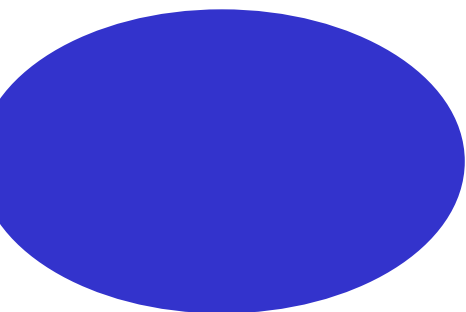
TERCIARIOS



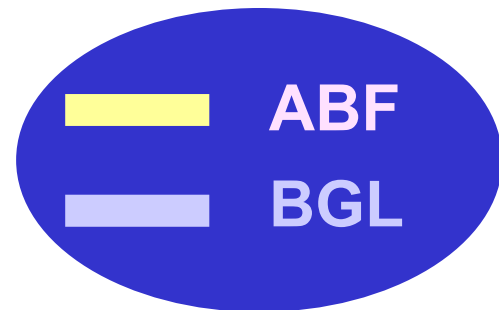
AROMA PRIMARIO



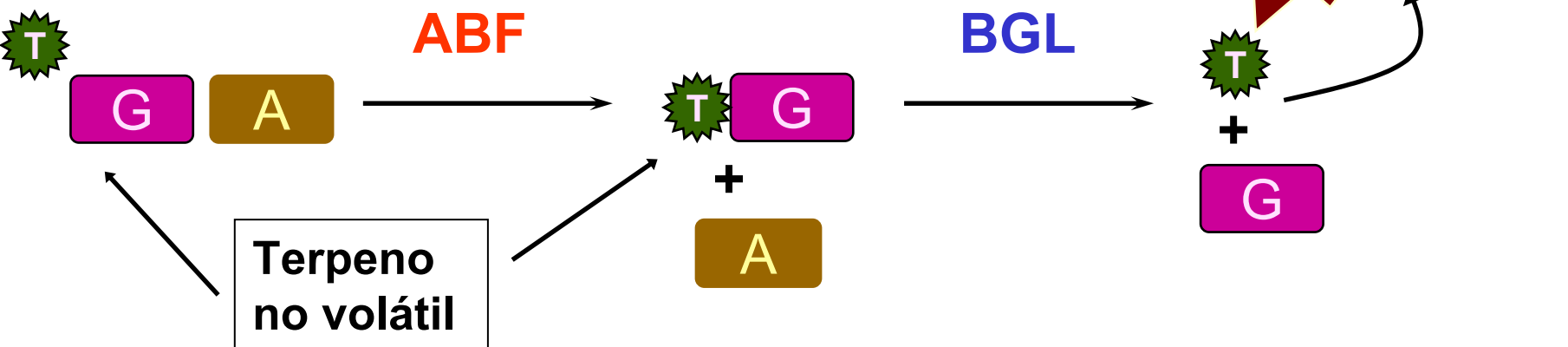
LEVADURAS VÍNICAS HIDROLÍTICAS



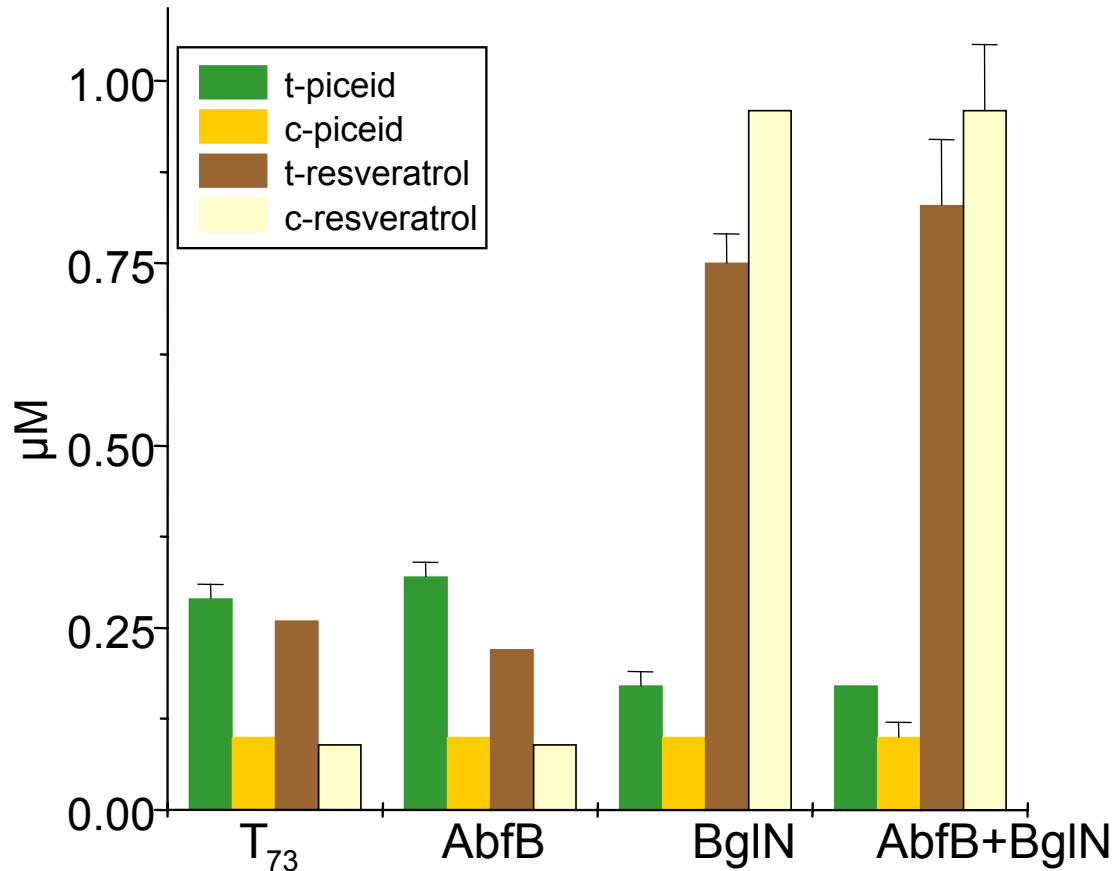
Aspergillus niger ABF
Candida molischiana BGL



S. cerevisiae



INCREMENTO DEL RESVERATROL

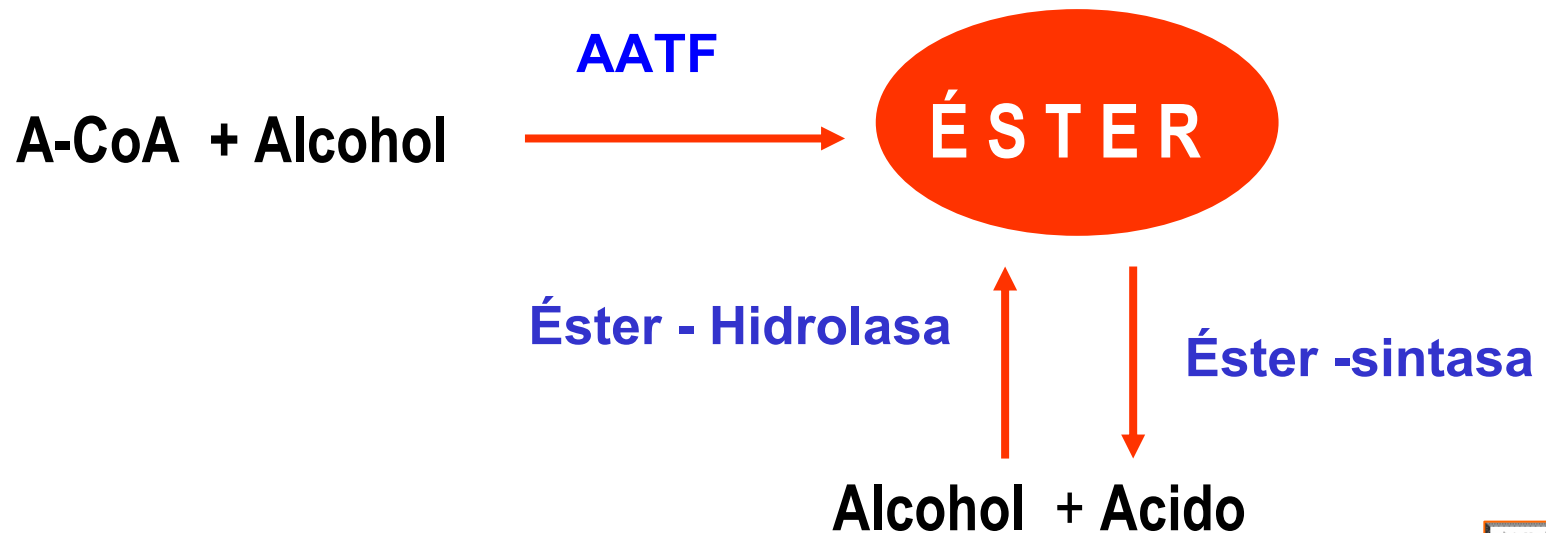


AROMAS SECUNDARIOS

ÉSTER - SINTASA

ÉSTER - HIDROLASA

ALCOHOL ACETIL TRANSFERASA

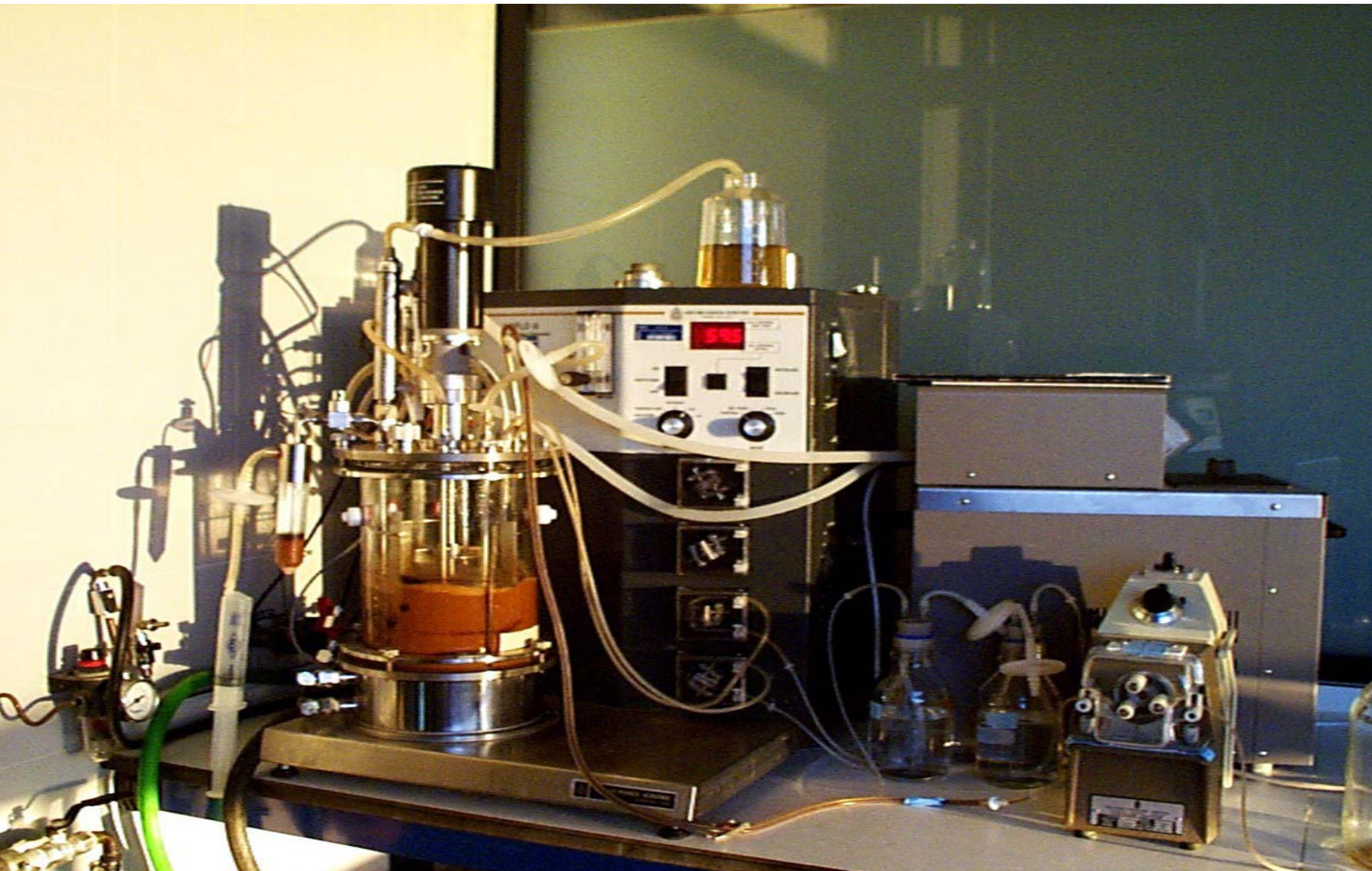


Mejora del proceso de producción industrial de levaduras vínicas

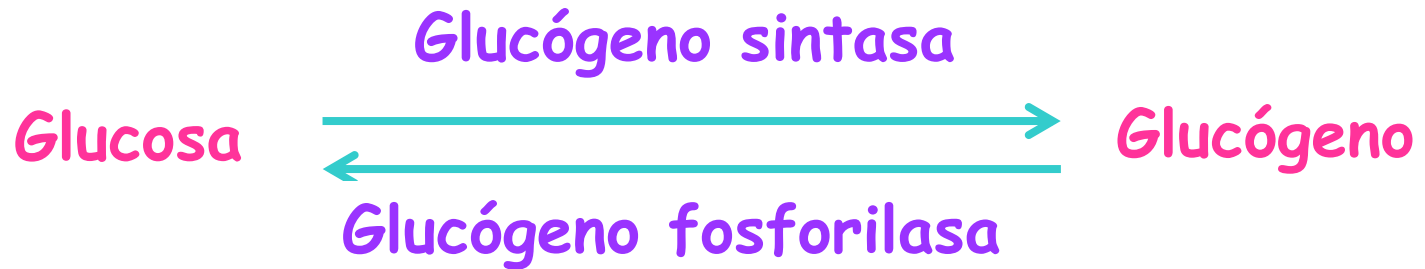
Sobreacumulación de glucógeno y de trehalosa



Producción de levaduras vínicas a escala de laboratorio



Sobreacumulación de glucógeno

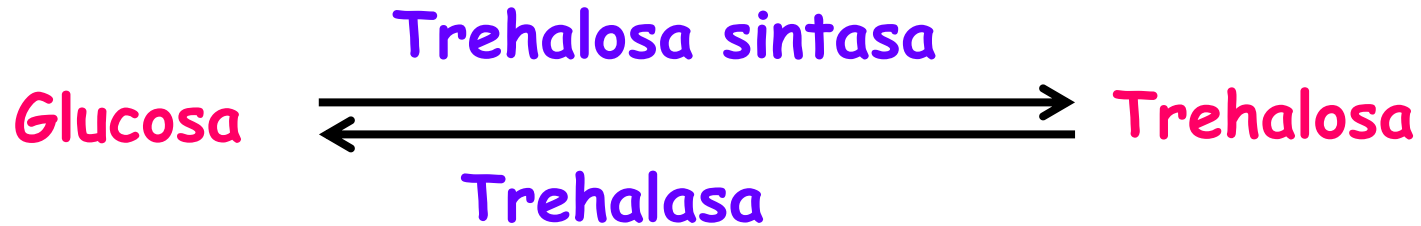


Glucógeno sintasa: gen *GSY2*

Glucógeno fosforilasa: gen *GPH1*

1. Sobreexpresión del gen *GSY2*
2. Deleción del gen *GPH1*

Sobreacumulación de trehalosa



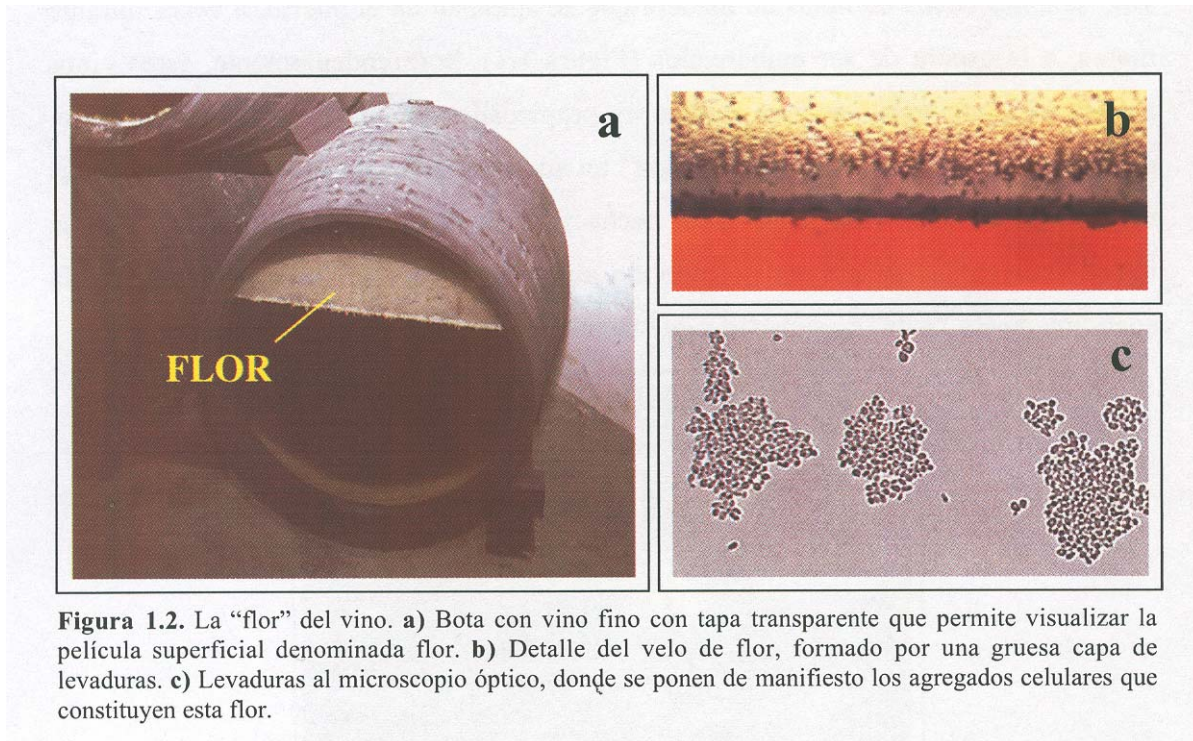
Trehalosa sintasa: genes *TPS1* y *TPS2*

Trehalasa: gen *NTH1* y gen *ATH1*

1. Sobreexpresión de los genes *TPS1* y *TPS2*
2. Deleción del gen *NTH1* y/o del gen *ATH1*

Elaboración de vino de Jerez

Etanol \longrightarrow **Acetaldehído**



Elaboración de vino de Jerez

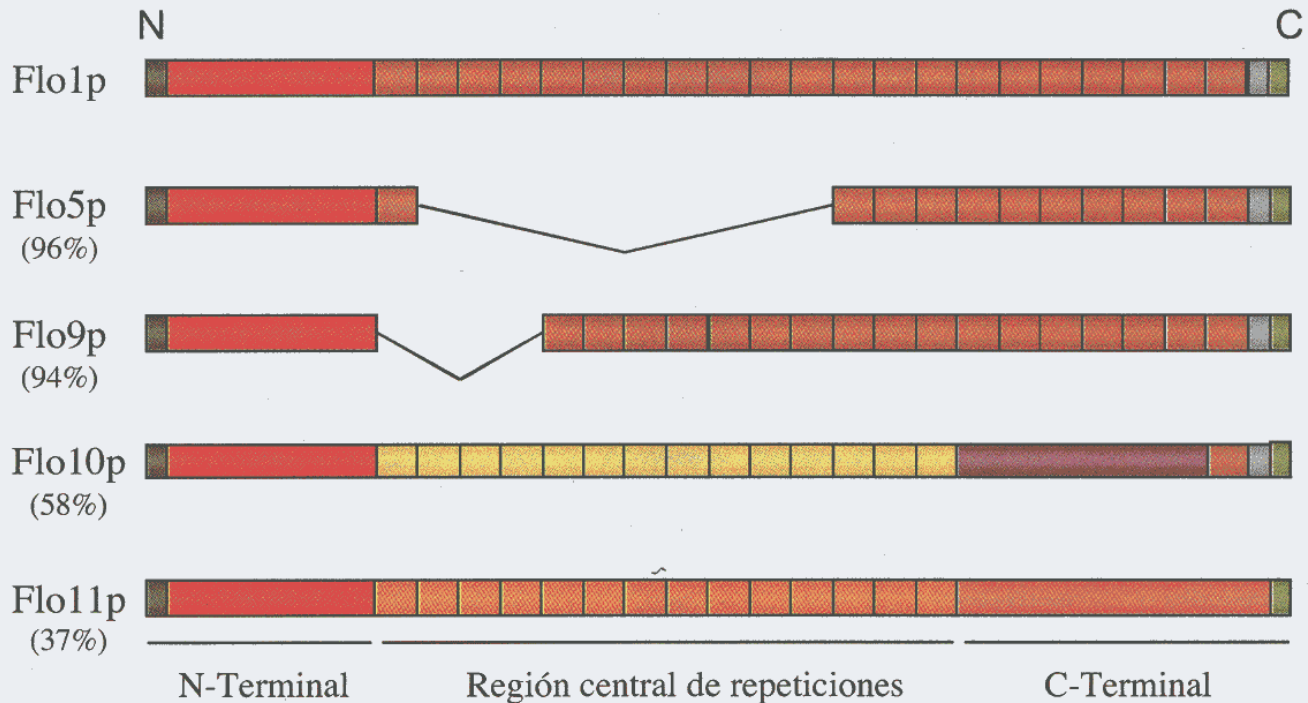


Figura 1.5. Comparación de proteínas Flo. El dominio N-Terminal posee un péptido señal, y el C-Terminal una secuencia GPI de anclaje a membrana, ambas en verde. La diferencia de color entre cada dominio representa diferencias significativas en secuencia de aminoácidos. Entre paréntesis se indica el porcentaje de similitud con respecto a Flo1p. (Datos obtenidos de Teunissen and Steensma, 1995b; Lo and Dranginis, 1996).

Estructura y localización de Flo1p

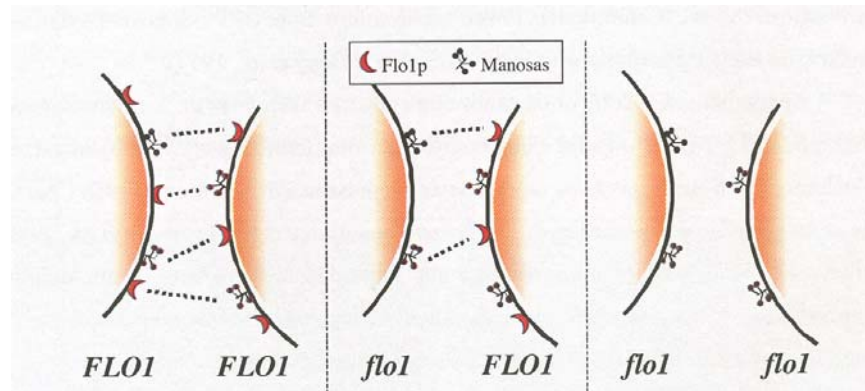


Figura 1.6. Modelo de floculación propuesto para Flo1p. La proteína Flo1p, localizada en la pared celular, se une a manosas de células vecinas, produciéndose la agregación celular conocida como floculación (izda). Nótese que células que no expresan esta proteína no son capaces de flocular (dcha), pero sí lo hacen si se encuentran próximas a otras que si expresan Flo1p (centro). (Modelo según Miki *et al.*, 1982).

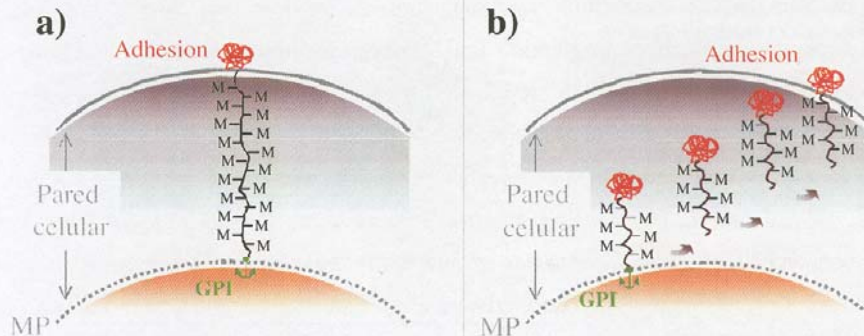
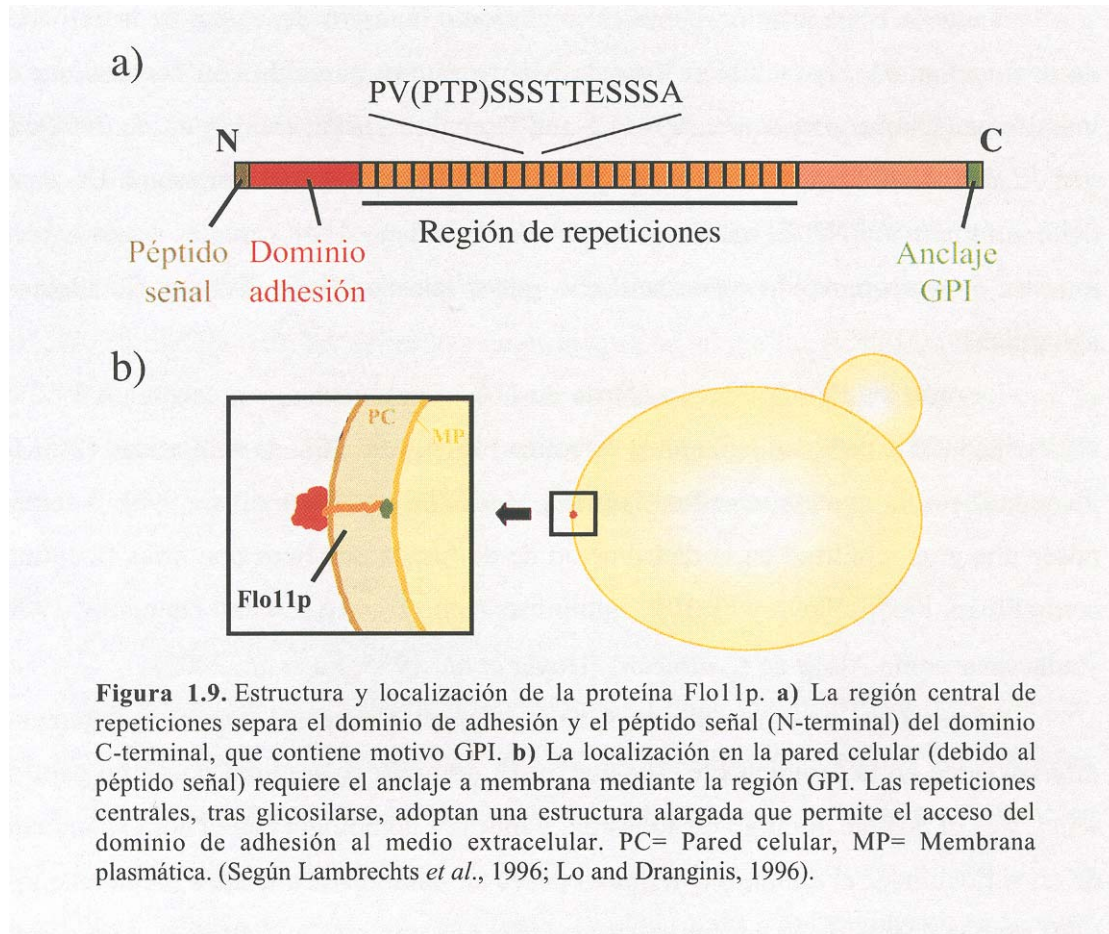


Figura 1.7. Modelos de localización de Flo1p en la pared celular. **a)** La proteína se ancla a la membrana plasmática (MP) mediante el dominio GPI, y el dominio central de repeticiones O-glicosilado (-M) adquiere una estructura alargada que atraviesa la pared celular. Esto permite que el dominio de adhesión se sitúe en el medio extracelular. (Según Teunissen and Steensma, 1995b). **b)** La unión de Flo1p a la membrana por el dominio GPI es transitoria, y permite que la proteína se localice posteriormente en la cara más externa de la pared celular, donde el dominio de adhesión puede ejercer su función. (Según Bony *et al.*, 1997).

Estructura y localización de Flo11p



Delección del gen *FLO1*

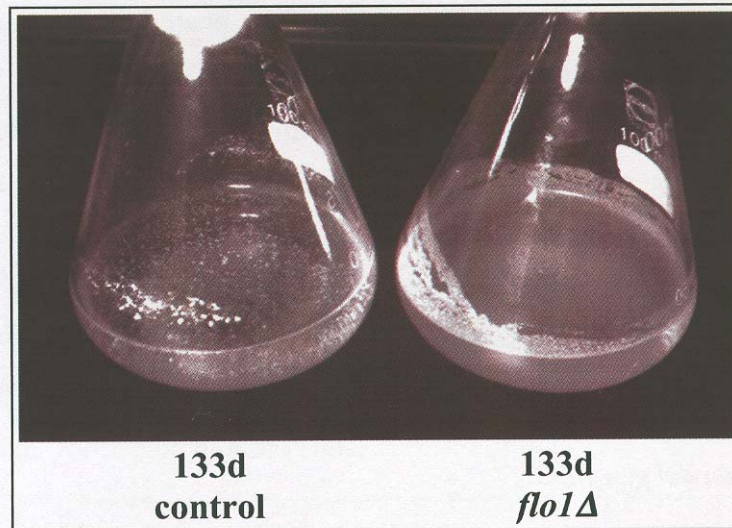


Figura 2.3. Delección del gen *FLO1* en la levadura de flor 133d. Se fotografiaron los velos producidos tras 7 días de incubación de las levaduras 133d y 133d *flo1*Δ en vino 12 % alcohol + uracilo a 20°C, para poner de manifiesto las diferencias observadas en el tiempo de formación de flor entre ambas cepas.

Caracterización del gen *FLO11*

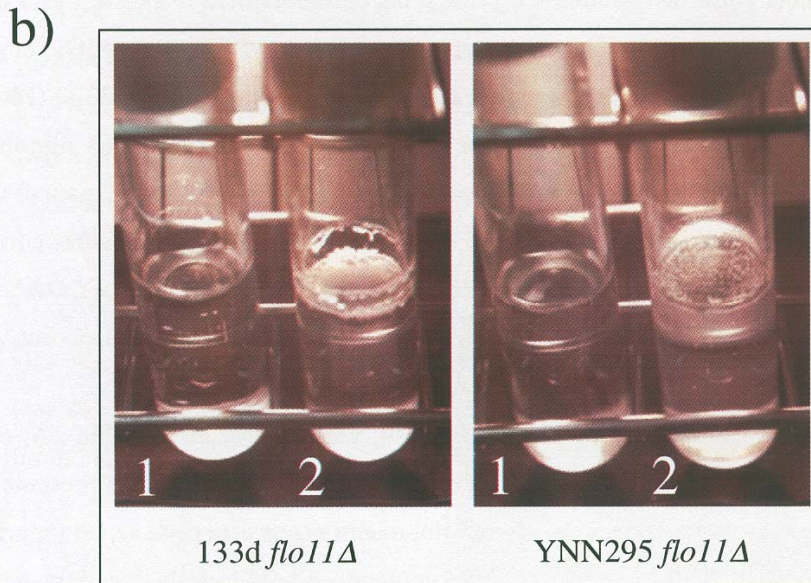
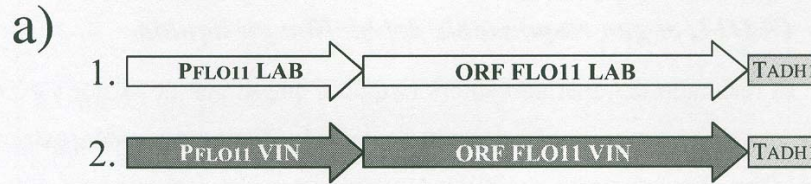


Figura 2.10. Complementación de la formación de flor por alelos de *FLO11*. a) Se subclonó cada alelo (promotor+ORF) de las cepas de flor (VIN) y de laboratorio (LAB) en el plásmido centromérico pRS316, utilizando el terminador de la transcripción del gen *ADHI* (*TADHI*). b) Tras la incubación en medio YN6%Et, únicamente el alelo de *FLO11* de la levadura de flor (2) fue capaz de conferir el fenotipo de formación de velo, tanto a la cepa 133d *flo11Δ*, como a YNN295 *flo11Δ*. 1=Alelo *FLO11* de 133d (Flor⁺), 2= Alelo *FLO11* de YNN295 (Flor). El control de plásmido vacío no formó flor.

Estirpe	Construcción	FLOR
133d <i>flo11Δ</i>	1.	-
	2.	++++
YNN295 <i>flo11Δ</i>	1.	-
	2.	++

Tabla 2.5. Efecto del fondo genético utilizado en el ensayo de complementación. La flor producida por el alelo *FLO11* de 133d (2) es significativamente menor en el fondo YNN295 *flo11Δ* que en 133d *flo11Δ*.

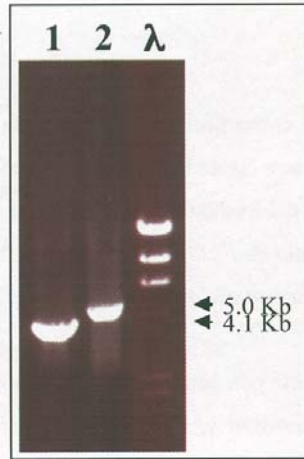


Figura 2.11. Amplificación por PCR del marco abierto de lectura de los alelos de *FLO11* de la cepa de laboratorio YNN295 (calle 1) y de la cepa de flor 133d (calle 2). Se utilizaron los oligonucleótidos FLO11-1 y FLO11-2 y DNA genómico de ambas cepas (Material y Método). λ: DNA del fago Lambda digerido con HindIII.

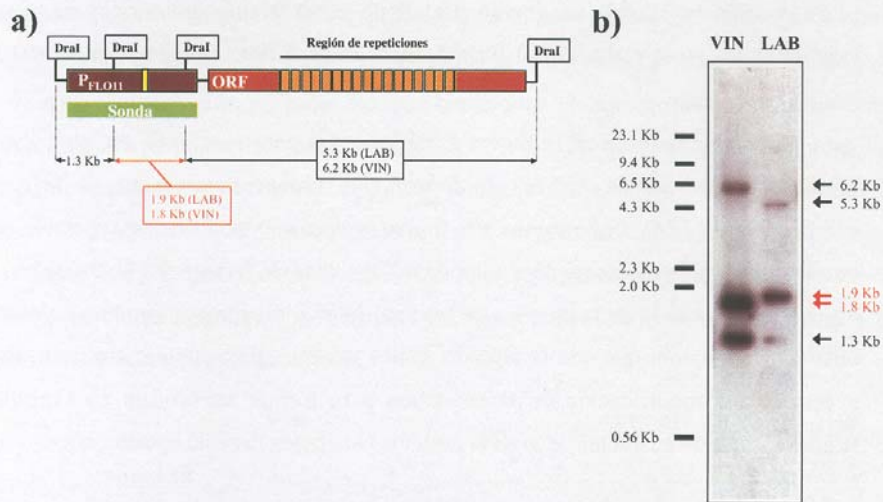
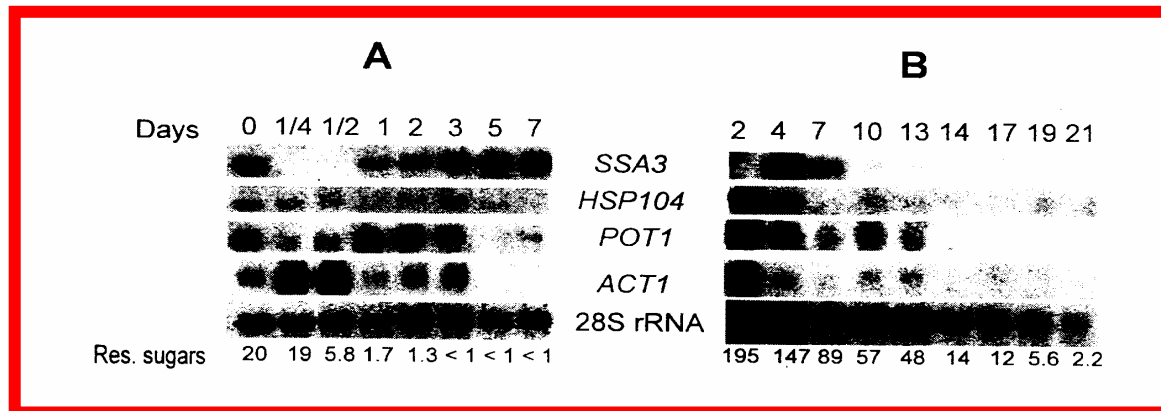
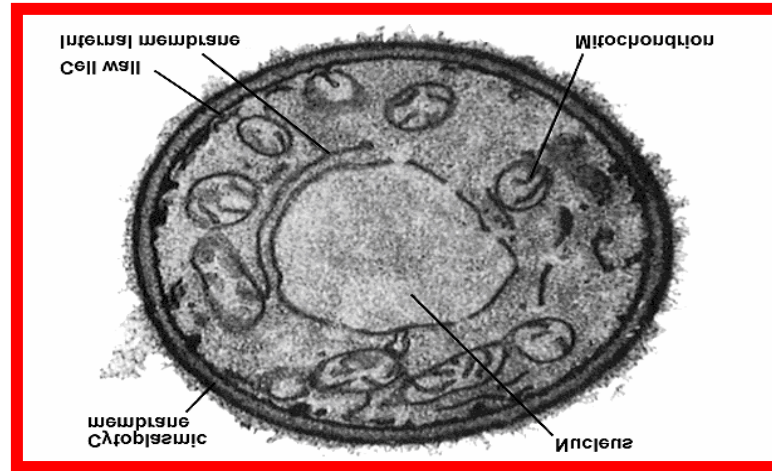


Figura 2.12. Análisis de restricción por Southern Blot de los alelos de *FLO11* de flor y de laboratorio. **a)** Se digirió DNA genómico procedente de las levaduras YNN295 (LAB) y 133d (VIN) con la enzima *DraI*. **b)** Utilizando una sonda del promotor completo, se realizó un Southern Blot, poniéndose de manifiesto diferencias entre los promotores (en rojo), y entre los marcos abiertos de lectura de *FLO11* de laboratorio y de flor (se observan bandas de 5.3 y 6.2 Kb, respectivamente). Marcador= DNA de fago Lambda digerido con HindIII.

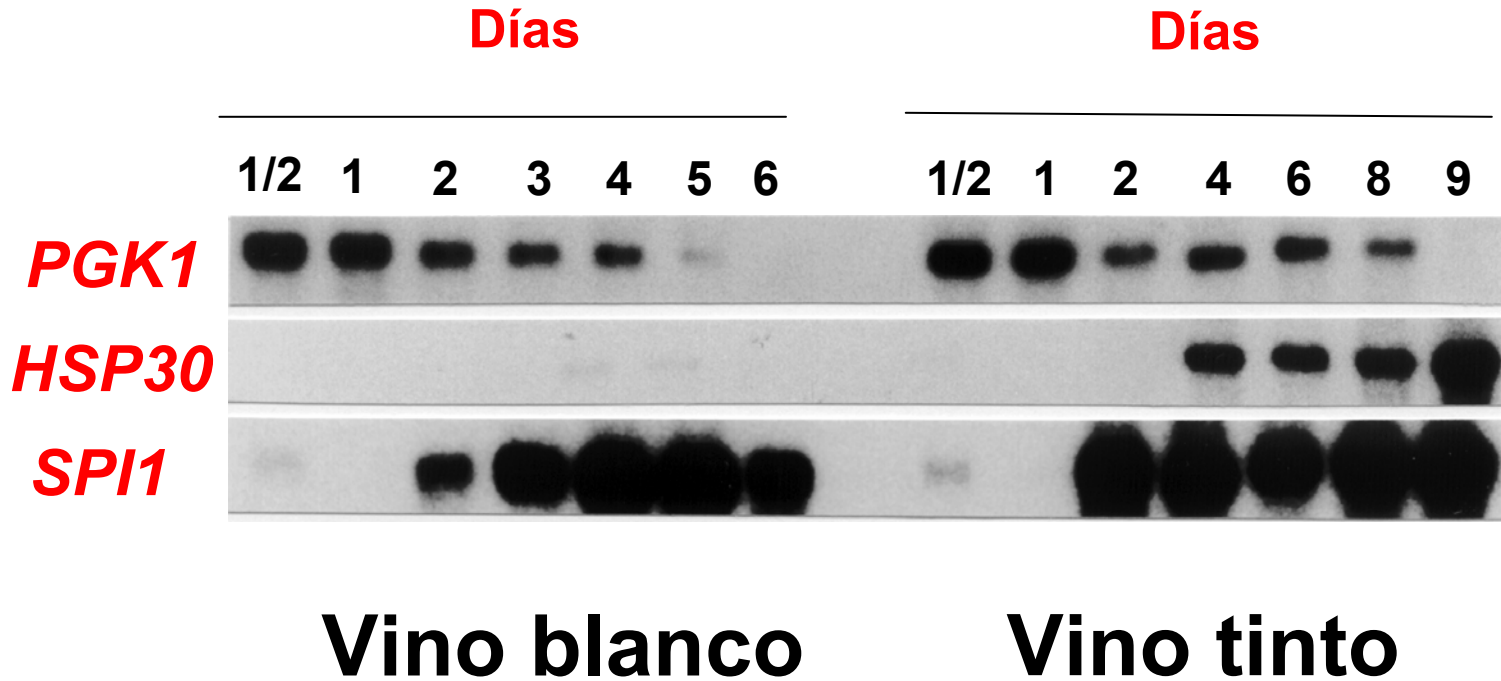
MODIFICACIÓN GENÉTICA DE “STARTERS”

1. Regulación de la expresión génica
2. 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**

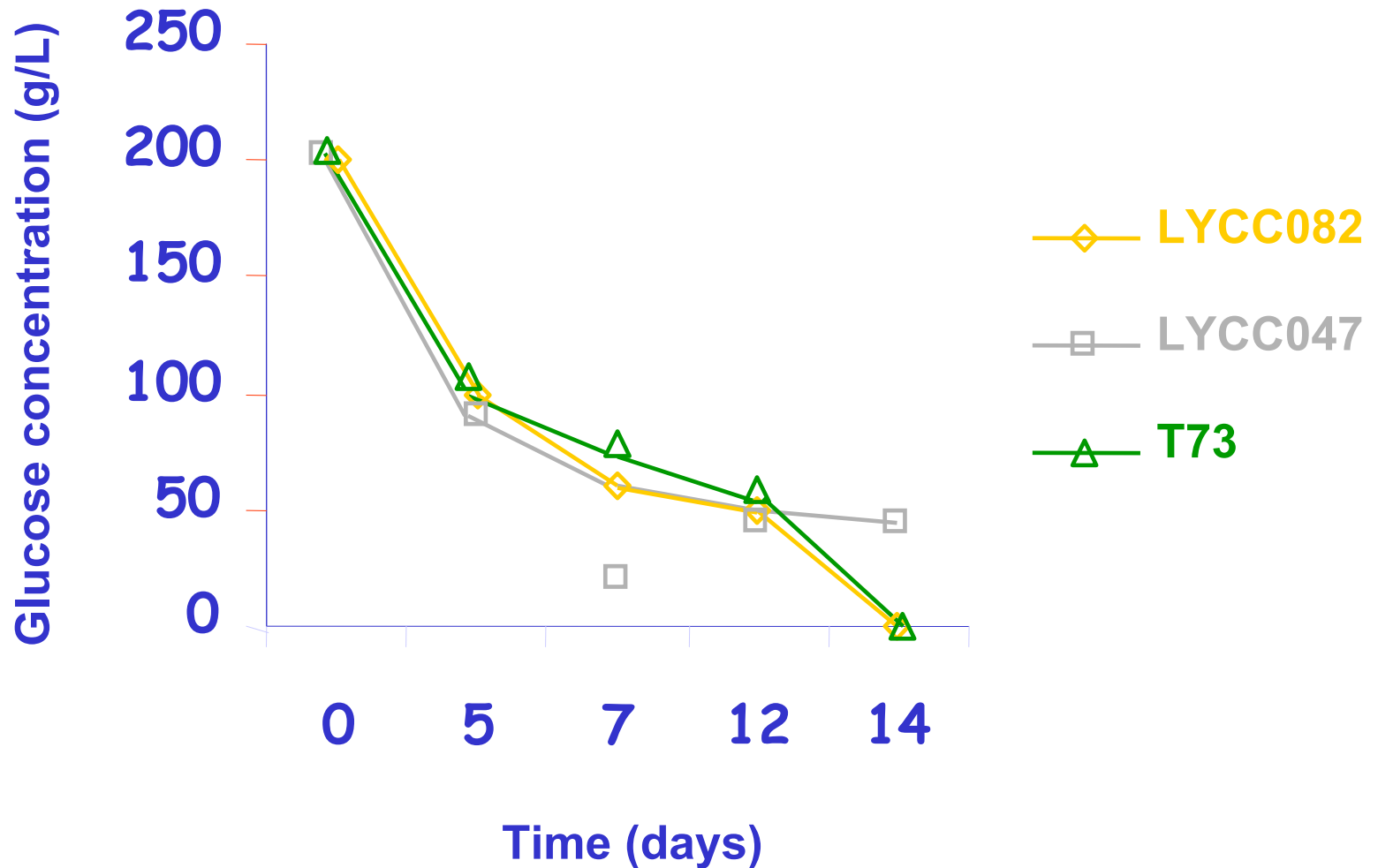


Stress adaptation

Characterisation regarding stress response of three commercial wine strains, one of them having problems of fermentative arrest: T73, LYCC047 y LYCC082

- Behaviour under microvinification conditions
- Viability under several stress conditions
- Expression of stress marker genes such as *HSP12*, *HSP82*, *HSP26* or *HSP104* (chaperones)

Microvinifications in synthetic must with low nitrogen concentration



Resistance to several stress conditions

STRESS \ STRAIN	LYCC047	LYCC082	T73	W303 dipl.
Heat shock¹	0.45%	2.7%	3.1%	0.8%
Ethanol²	7%	19%	15%	15%
Osmotic³	0.0014%	0.0041%	0.0022%	0.0035%
Glucose starvation⁴	42.5%	88%	75%	78%
Oxidative⁵	3.9 cm	3.2 cm	3.3 cm	5.3 cm

¹ number of viable cells after 2 hours at 45°C

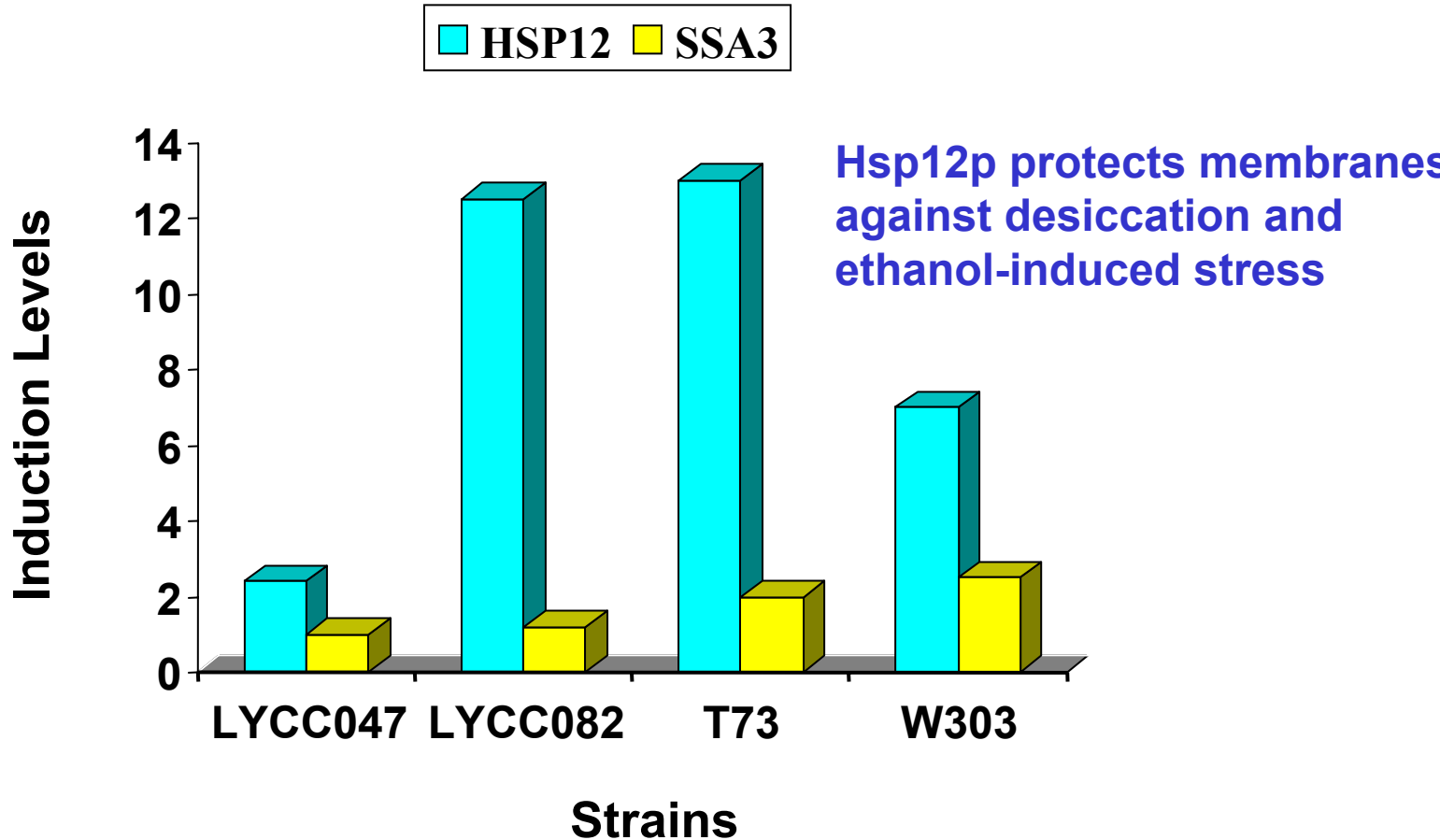
² number of viable cells after 5 hours in presence of 8% (v/v) ethanol

³ number of viable cells after 16 hours in presence of 3M KCl

⁴ number of viable cells 48 hours after glucose depletion

⁵ diameter of the region of growth inhibition under H₂O₂

Response to ethanol stress (8% v/v, 1 h)



Stress adaptation

- 1. The commercial *S. cerevisiae* strains are more resistant to different stresses.**
 - 2. In general, we observed an over-expression of the genes coding heat shock proteins Hsp12 and Hsp104 in commercial *S. cerevisiae* strains.**
 - 3. *S. cerevisiae* sherry strains (flor yeasts) are less resistant to osmotic stresses and more resistant to alcohol and acetaldehyde than the strains isolated during the alcohol fermentation.**
-