



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE
HIDALGO

Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

“Expresión del gen *ATF1* en *Saccharomyces cerevisiae*
BY4741 y evaluación de su efecto en el contenido de
ésteres producidos en la fermentación alcohólica”

Tesis

Para obtener el Título de:

Maestra en Ciencias en Biología Experimental

Presenta

Ingeniera Bioquímica Lorena Farías Rosales

Asesor

Doctor en Ciencias en Biotecnología Jesús Campos García

Morelia, Michoacán, Junio 2014.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO BIOLÓGICAS

ESTE TRABAJO SE LLEVÓ A CABO EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA MICROBIANA, DEL INSTITUTO DE INVESTIGACIONES QUÍMICO-BIOLÓGICAS, DE LA UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLAS DE HIDALGO, BAJO LA ASESORÍA DEL D.C. JESÚS CAMPOS GARCÍA.

EN LA REALIZACIÓN DEL PRESENTE TRABAJO SE CONTÓ CON EL APOYO ECONÓMICO DEL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas

Agradezco al Instituto de Investigaciones Químico-Biológicas, de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, ya que me abrigó en su programa de “Maestría en Ciencias en Biología Experimental”, durante la duración de la misma.

A CONACyT

De igual forma, agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca otorgada para la realización de este trabajo, así como a la Coordinación de la Investigación Científica (CIC), por la beca otorgada durante los últimos seis meses de la investigación.

Al D.C. Jesús Campos García

Expreso mi más amplio agradecimiento al D.C. Jesús Campos García por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por su valiosa asesoría y apoyo para culminar mi trabajo de maestría. Agradezco porque en usted encontré un ejemplo de compromiso, dedicación, disciplina y excelencia.

A mis sinodales

Asimismo, manifiesto mi reconocimiento a los integrantes de mi comité tutorial, D.C. Lourdes I. Macías Rodríguez, D.C. Mauro M. Martínez Pacheco, D.C. Víctor Meza Carmen y D.C. Carlos Sosa Aguirre, por las invaluable aportaciones que hicieron para mejor este trabajo de investigación.

A la M.C. Alma Laura Díaz Pérez

Gracias por el excepcional apoyo técnico y académico, los cuales fueron determinantes para concluir de manera exitosa este trabajo. Me alegro de agradecer también la amistad que me brindaste.

A mis compañeros de laboratorio

Luis (Wicho), Mauricio (Mau), Enrique (Quique), Erick, Viry, Gaby, Perla, Lupita, Lolita, Yari, Margarita y Nancy, gracias por las hermosas y divertidas experiencias que vivimos en el laboratorio, sin duda, el trabajo fue mejor a su lado.

A mis compañeros de generación

Claudia, Mili, Eri, Edith, Sandy, Sofia, Cristina, Melina, Ricardo, Aarón, Omar, Edgar, Raúl, Marco, Mario y Andrés, porque en todos ustedes encontré ejemplos de superación, fortaleza y alegría. Gracias por su amistad y por los momentos que vivimos, y que siempre se quedarán en mi memoria.

ÍNDICE

Contenido

RESUMEN.....	i
ABSTRACT	ii
I. INTRODUCCIÓN.....	1
1. GENERALIDADES DE <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	1
1.1. Genoma de <i>S. cerevisiae</i>	1
1.2. Ciclo de vida	2
2. METABOLISMO FERMENTATIVO Y RESPIRATORIO	2
2.1. Regulación de la expresión de genes por glucosa	4
2.2. Habilidades metabólicas de <i>S. cerevisiae</i>	5
2.2.1. Crecimiento anaeróbico.....	5
2.2.2. Estrés durante la fermentación alcohólica	6
3. COMPUESTOS AROMÁTICOS PRODUCIDOS DURANTE LA FERMENTACIÓN 7	
3.1. Sabor, aroma y bouquet de los productos fermentados	7
3.2. Metabolismo de los compuestos del “bouquet” de la fermentación.....	9
3.2.1. Compuestos carbonilo	9
3.2.2. Alcoholes superiores	10
3.2.3. Ésteres	11
3.2.3.1. Clasificación de los ésteres.....	13
4. GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE ÉSTERES EN <i>Saccharomyces sp.</i>.....	14
4.1. Síntesis de ésteres.....	15
4.1.1. Síntesis de ésteres de acetato.....	16
4.1.1.1. Substratos para la formación de ésteres de acetato.....	17
4.1.2. Síntesis de etil-ésteres de ácidos grasos de cadena media (MCFA)	17
4.2. Hidrólisis de ésteres	18

5.	REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN <i>ATF1</i> EN <i>S. cerevisiae</i>	18
5.1.	Inducción por glucosa por la vía AMPc/PKA	19
5.2.	Regulación de la expresión por oxígeno y ácidos grasos insaturados	19
5.3.	Elemento de respuesta a bajo oxígeno (LORE)	20
II.	ANTECEDENTES	23
III.	JUSTIFICACIÓN	24
IV.	HIPÓTESIS	25
V.	OBJETIVOS	26
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS	27
1.	MATERIALES	27
1.1.	Plásmidos y cepas	27
1.2.	Medios de cultivo	28
1.3.	Antibióticos	30
2.	MÉTODOS	30
2.1.	Diseño de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes de interés	30
2.2.	Extracción de ADN total de levaduras	31
2.3.	Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias	32
2.4.	Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa	33
2.5.	Aislamiento de ADN de geles de agarosa	33
2.6.	Preparación de células de <i>E. coli</i> electrocompetentes	34
2.7.	Transformación de <i>E. coli</i> por electroporación	34
2.8.	Tratamientos enzimáticos del ADN	35
2.8.1.	Restricción con endonucleasas	35
2.8.2.	Ligaciones del ADN	35
2.8.2.1.	Clonación de los productos de PCR en vectores	35
2.8.2.2.	Subclonación para la construcción de casetes para la transformación de <i>S. cerevisiae</i> BY4741	36

2.8.3.	Amplificación por PCR.....	36
2.8.3.1.	Amplificación de los genes <i>ATF1</i> y 18S	36
2.8.3.2.	Verificación de las construcciones	37
2.8.3.3.	Verificación del genotipo de las transformantes de BY4741.....	38
2.9.	Cinética de crecimiento <i>S. cerevisiae</i> BY4741	38
2.10.	Determinación de la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión del azul de tripano	39
2.11.	Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	40
2.11.1.	Preparación de células competentes.....	40
2.11.2.	Transformación	40
2.12.	Determinación de ésteres totales.....	40
2.13.	Fermentación.....	42
2.13.1.	Fermentación con la fuente de carbono inductora.....	42
2.13.2.	Determinación de los parámetros fermentativos y la producción de compuestos organolépticos	42
2.13.2.1.	Análisis mediante HPLC.....	44
2.13.2.1.1.	Condiciones de operación para el análisis de muestras mediante HPLC.	44
2.13.2.1.2.	Curva de calibración de glucosa y etanol.....	45
2.13.2.2.	Análisis de compuestos organolépticos producidos durante la fermentación mediante cromatografía de gases (CG-FID).....	46
2.13.2.2.1.	Extracción líquido-líquido.....	46
2.13.2.2.2.	Identificación y cuantificación de compuestos mediante cromatografía de gases	46
2.14.	Pruebas estadísticas para el análisis de los resultados experimentales.....	47
VII.	RESULTADOS	48
1.	DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS.....	48
1.1.	Región 5' UTR	48

1.2.	Región 3' UTR	49
2.	CONSTRUCCIÓN DE LOS CASETES <i>ATF1</i> -18S Y TÁNDEM LORE.....	51
2.1.	Fusión <i>ATF1</i> -18S ADNr	51
2.1.1.	Amplificación por PCR.....	51
2.1.2.	Clonación de los productos de PCR	52
2.1.3.	Construcción del casete fusión <i>ATF1</i> -18S	56
2.1.4.	Inserción del marcador de selección a zeocina en el casete <i>ATF1</i> -18S.....	58
2.2.	Duplicación del elemento de respuesta a bajos niveles de oxígeno (LORE) ..	60
2.2.1.	Amplificación por PCR del gen <i>ATF1</i>	60
2.2.2.	Clonación de los productos de PCR	61
2.2.3.	Construcción del casete de duplicación del elemento LORE	64
2.2.4.	Construcción del casete duplicación elemento LORE zeocina.....	67
3.	TRANSFORMACIÓN DE <i>S. cerevisiae</i> BY4741.....	69
3.1.	Cinética de crecimiento de <i>S. cerevisiae</i>	69
3.2.	Transformación de <i>S. cerevisiae</i>	70
3.2.1.	ADN empleado en la transformación	71
3.2.2.	Características del ADN para transformación integrativa.....	71
3.2.3.	Eficiencia de la transformación	71
3.3.	Selección de las cepas recombinantes	72
3.3.1.	Curva de calibración de ésteres con el método del hidroxamato férrico.....	73
3.3.2.	Cinética de producción de ésteres por las clonas transformadas con los plásmidos pYES2	74
3.3.3.	Selección de las transformantes integrativas sobre-productoras de ésteres	76
3.4.	Genotipo de las cepas recombinantes	78
3.4.1.	Identificación de la integración <i>ATF1</i> -18S-Zeo	78
3.4.2.	Identificación de la duplicación del elemento LORE-Zeo	80
4.	DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FERMENTATIVOS DE LAS CEPAS RECOMBINANTES DE <i>S. cerevisiae</i> BY4741	82

4.1. Consumo de glucosa y producción de etanol durante la fermentación de las cepas recombinantes.....	82
4.2. Parámetros fermentativos de las cepas recombinantes de <i>S. cerevisiae</i>	84
4.2.1. Eficiencia de producción de etanol	84
4.2.2. Velocidad máxima de consumo de glucosa y producción máxima de etanol	85
4.2.3. Velocidad específica de crecimiento.....	85
5. PRODUCCIÓN DE ÉSTERES Y COMPUESTOS MAYORITARIOS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA	86
5.1. Ésteres totales en el medio fermentado determinados por el método del hidroxamato férrico	87
5.2. Análisis de los productos mayoritarios de la fermentación alcohólica.....	88
VIII. DISCUSIÓN	91
IX. CONCLUSIÓN	98
X. PERSPECTIVAS	99
XI. BIBLIOGRAFÍA	100

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Bouquet de la fermentación alcohólica.....	9
Figura 2. Vía de Ehrlich para la formación de alcoholes superiores	11
Figura 3. Ésteres de acetato y etil ésteres de ácidos grasos de cadena media.....	14
Figura 4. Vía biosintética responsable de la síntesis de ésteres.	16
Figura 5. Elementos de respuesta y proteínas involucradas en el control transcripcional del gen <i>ATF1</i> en <i>S. cerevisiae</i>	19
Figura 6. Expresión de la actividad del gen reportero <i>lacZ</i> en los vectores heterólogos que contienen a LORE	21
Figura 7. Reacción colorimétrica para la identificación de ésteres totales.....	41
Figura 8. Cromatografía líquida para la determinación de glucosa y etanol	45
Figura 9. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la unidad de transcripción del gen <i>ATF1</i> de <i>S. cerevisiae</i>	50
Figura 10. Esquema del gen ADNr 18S de <i>S. cerevisiae</i> y los oligonucleótidos usados para su amplificación	50
Figura 11. Amplificación del gen ADNr 18S de <i>S. cerevisiae</i> UMARN3	52
Figura 12. Diagrama y caracterización del plásmido pJ18S.....	53
Figura 13. Diagrama y caracterización del plásmido pGO1F-O2R.....	55
Figura 14. Diagrama y caracterización del plásmido pJATF1-18S	57
Figura 15. Diagrama y caracterización del plásmido pJATF1-18S Zeo	59
Figura 16. Amplificación de la unidad de transcripción del gen <i>ATF1</i> de <i>S. cerevisiae</i> UMARN3	61
Figura 17. Diagrama y caracterización del plásmido pJO1F-O1R.....	62
Figura 18. Diagrama y caracterización del plásmido pGO2F-O2R.....	63
Figura 19. Diagrama y caracterización del plásmido pJTándem LORE.....	66
Figura 20. Diagrama y caracterización del plásmido pJTándem LORE Zeo.....	68
Figura 21. Cinética de crecimiento <i>S. cerevisiae</i> BY4741	70
Figura 22. Curva de calibración de acetato de etilo.	73
Figura 23. Cinética de producción de ésteres en condiciones fermentativas de las clonas transformadas con los plásmidos basados en 2- μ	75
Figura 24. Cinética de producción de ésteres en condiciones fermentativas por las clonas recombinantes transformadas por recombinación homóloga.	77
Figura 25. PCR para la determinación del genotipo de las transformantes BY4741 <i>ATF1</i> -18S-Zeo.....	79

Figura 26. PCR para la comprobación del genotipo Tándem LORE Zeo.	81
Figura 27. Determinación del consumo de glucosa y la producción de etanol durante la fermentación por lotes.	83
Figura 28. Cinética de crecimiento y concentración de ésteres totales en el medio de fermentación.	88

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Alcoholes superiores, ácidos carboxílicos y ésteres producidos a partir de los aminoácidos de cadena ramificada.....	11
Tabla 2. Valores umbral para los ésteres y su concentración en la cerveza lager.....	12
Tabla 3. Valores umbral para los ésteres y su concentración en el vino	13
Tabla 4. Genes involucrados en la síntesis e hidrólisis de ésteres en <i>Saccharomyces sp.</i>	15
Tabla 5. Genes con un elemento LORE en la región promotora	22
Tabla 6. Plásmidos utilizados en este trabajo.	27
Tabla 7. Cepas empleadas en el presente trabajo.	28
Tabla 8. Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de <i>ATF1</i> y 18S ADNr.	31
Tabla 9. Condiciones de amplificación ADN polimerasa <i>Pfx</i> Platinum.	37
Tabla 10. Mezcla de reacción ADN polimerasa <i>Pfx</i> Platinum.....	37
Tabla 11. Condiciones de amplificación ADN <i>Taq</i> polimerasa.	38
Tabla 12. Mezcla de reacción ADN <i>Taq</i> polimerasa.....	38
Tabla 13. Eficiencia de transformación de <i>S. cerevisiae</i> BY4741.....	72
Tabla 14. Proporción de transformantes sobre-productoras de ésteres.	76
Tabla 15. Parámetros fermentativos de las transformantes seleccionadas.	86
Tabla 16. Compuestos mayoritarios producidos durante la fermentación.	90

RESUMEN

Saccharomyces cerevisiae produce durante el proceso fermentativo, una amplia gama de compuestos aromáticos y saborizantes, entre los cuales, los ésteres son los responsables de carácter frutal en las bebidas fermentadas. Las alcohol acetil-transferasas codificadas por los genes *ATF1* y *ATF2*, catalizan la síntesis de ésteres de acetato.

El objetivo de este trabajo consistió en incrementar la producción de ésteres de acetato mediante la modificación de la expresión del gen *ATF1* en la cepa de *S. cerevisiae* BY4741. El incremento en la expresión se consiguió aumentando el número de copias del gen *ATF1* en el genoma de la levadura e insertando una copia adicional en tándem del elemento *cis* de activación transcripcional (LORE) en el promotor del gen *ATF1*.

Con las cepas recombinantes se realizaron fermentaciones y se determinó que la concentración de los ésteres en los medios de fermentación fue significativamente mayor en comparación con su fondo genético.

De la misma forma, los parámetros fermentativos evaluados fueron: rendimiento en la producción de etanol, velocidad específica de crecimiento y velocidad máxima de consumo de glucosa.

Por último, mediante cromatografía de gases, se determinó la variación en la concentración de los compuestos producidos en la fermentación alcohólica, utilizando las clonas recombinantes obtenidas, encontrando diferencias significativas en la concentración de 2-butanol, isobutanol y los analitos con un tiempo de retención de 15.1 y 15.7 min.

Se concluye que la duplicación del elemento LORE en el promotor del gen *ATF1* y la fusión génica *ATF1*-18S provocaron una modificación metabólica que aumentó el contenido de ésteres y compuestos mayoritarios producidos en la fermentación alcohólica.

Palabras clave: alcohol acetil-transferasas, ésteres de acetato, elemento *cis* de activación transcripcional (LORE), fermentación alcohólica.

ABSTRACT

During fermentation the yeast *Saccharomyces cerevisiae* produces a broad range of aroma-active substances, among which, esters are responsible for the desired fruity aroma character of fermented beverages. The alcohol acetyl transferases I and II, encoded by the genes *ATF1* and *ATF2*, catalyse the synthesis of acetate esters.

The aim of this work was to increase the acetate esters production by manipulating the *ATF1* gene expression in the *S. cerevisiae* BY4741 yeast strain. The *ATF1* expression level was enhanced by increasing the number of copies of the *ATF1* gene in the genomic DNA and inserting an extra copy of the so-called low-oxygen response element (LORE) in tandem position at *ATF1* promoter.

Through alcoholic fermentation, yeast strains overexpressing *ATF1* produced more esters than wild-type cells.

In the same way, fermentative capability was tested including ethanol production yield, specific growth rate and maximum glucose consumption rate.

Finally, content of major group of compounds that contribute with organoleptic quality of beverages was measured by GC-FID. In the fermentation medium obtained from transformed strains, the alcohol (2-butanol and isobutyl alcohol) content and other compounds with 15.1 and 15.7 min retention times was superior compared to medium obtained from parental strain.

In conclusion, this study demonstrated that the tandem repeat of the LORE in the (+)-orientation at *ATF1* promoter and the integration of the *ATF1* gene into the rDNA locus of *S. cerevisiae*, increased the production of esters and major compounds during alcoholic fermentation.

Key words: alcohol acetyltransferases, acetate esters, *cis* transactivation element (LORE), alcoholic fermentation.

I. INTRODUCCIÓN

1. GENERALIDADES DE *Saccharomyces cerevisiae*

El género *Saccharomyces* contiene algunas de las especies más importantes para la industria de los alimentos. Las especies representativas son *S. cerevisiae* comúnmente usada en las fermentaciones del vino, pan y cerveza, *S. bayanus* en la fermentación del vino y la sidra y *S. pastorianus* (*S. carlsbergensis*), la cual es utilizada en la fermentación de cerveza tipo lager (Vaughan-Martini y Martini, 1998; Rainieri *et al.*, 2006).

S. cerevisiae destaca por su importancia en la investigación aplicada, debido a su excepcional capacidad de producir etanol y dióxido de carbono a partir de azúcares, con elevada productividad y rendimiento (Nevoigt, 2008).

Además, en la investigación científica y tecnológica, *S. cerevisiae* se considera un organismo modelo porque puede crecer rápidamente en un medio definido, es un organismo no patogénico, tiene un ciclo de vida adecuado para realizar análisis genéticos clásicos y a diferencia de otros eucariontes, presenta una excelente frecuencia de transformación con ADN exógeno, mediante recombinación homóloga con el ADN genómico (Goffeau *et al.*, 1996; Amberg *et al.*, 2005).

Por lo tanto, en *S. cerevisiae*, la transformación integrativa en secuencias específicas en el genoma, se lleva a cabo mediante recombinación homóloga (Mell y Burgess, 2002).

Además, el proceso de recombinación homóloga es utilizado por las células mitóticas para la reparación de cortes en la doble cadena del ADN y así evitar la pérdida de material genético, alteraciones genómicas o la muerte celular (Aylon y Kupiec, 2004). Asimismo, para cambiar el tipo de apareamiento y para segregar los cromosomas homólogos en la meiosis (Mell y Burgess, 2002).

1.1. Genoma de *S. cerevisiae*

Las levaduras son organismos unicelulares eucarióticos (Mell y Burgess, 2002). El contenido genético se localiza en el núcleo, el cual, en el caso de las células haploides de *S. cerevisiae*, contiene en su ADN 14 mega pares de bases nucleotídicas, distribuidas en 16 cromosomas lineales (con tamaños que van desde 250 hasta 2000 kb) y con aproximadamente 6000 genes (Carle y Olson, 1985; Mell y Burgess, 2002; Philippsen *et al.*, 2004). Adicionalmente, muchas cepas cuentan con 50 a 100 copias del plásmido 2- μ

(6.3 kb) (Broach *et al.*, 1981). Por último, las células tienen de 75 a 80 kb de ADN mitocondrial, dependiendo de las condiciones de crecimiento (Philippsen *et al.*, 2004).

Además, el genoma de *S. cerevisiae* se caracteriza porque únicamente el 4% de los genes que codifican para proteínas tienen intrones, a diferencia de la levadura de fisión *Schizosaccharomyces pombe*, en donde un 40% de los genes están interrumpidos de una manera similar, así como porque las regiones intergénicas son cortas (Goffeau *et al.*, 1996; Dujon, 1996; Mell y Burgess, 2002).

1.2. Ciclo de vida

Las levaduras crecen por gemación tanto en su estadio sexual (diploide) como en el asexual (haploide). El proceso consiste en la formación de una pequeña gema (la célula hija) en la célula madre; posteriormente, la célula parental duplica y segrega su ADN, se divide el núcleo y éste migra hacia la célula hija y se inicia el evento de división celular (Mell y Burgess, 2002; Engel *et al.*, 2013).

En la reproducción de manera sexual, el apareamiento ocurre entre los dos tipos celulares especializados (**a** y **α**) y consiste fundamentalmente en una fusión nuclear y celular (Herskowitz, 1988; Mell y Burgess, 2002). El tipo de talo (**a** ó **α**) es el resultado del tipo de información que se expresa en el *locus MAT* en medio del cromosoma III, e indica cuál de los *loci* transcripcionalmente silenciosos (*HML* o *HMR*), se empleó como sustrato para dirigir la recombinación homóloga durante la fase G1 (Mell y Burgess, 2002).

2. METABOLISMO FERMENTATIVO Y RESPIRATORIO

Saccharomyces cerevisiae es un microorganismo fermentativo facultativo, por lo tanto, puede realizar la fosforilación oxidativa o la fosforilación a nivel sustrato para la síntesis de ATP (van Dijken *et al.*, 1986).

Ambas rutas metabólicas comparten la vía de la glicólisis. El primer paso de esta ruta catabólica consiste en el transporte de hexosas (glucosa y fructosa) a través de la membrana plasmática, mediante difusión facilitada (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006). *S. cerevisiae* tiene un sistema de transportadores (HXT) compuesto por 32 integrantes, los cuales difieren en su regulación transcripcional y post-transcripcional, especificidad por el sustrato y afinidad por glucosa (Kruckeberg, 1996; Boles y Hollenberg, 1997).

Posteriormente, la vía glicolítica Embden-Meyerhof convierte una molécula de glucosa en dos moléculas de piruvato, con la generación de dos moléculas de ATP (Mathews *et al.*, 2002).

El cetoácido (piruvato) producido durante la glucólisis, puede ser reducido en la fermentación alcohólica u oxidado en el metabolismo oxidativo (respiratorio), debido a que *S. cerevisiae* es un microorganismo anaerobio facultativo (Mathews *et al.*, 2002; Feldmann, 2011).

En la respiración (en donde además de oxígeno hay ausencia de represión por glucosa) (Rolland *et al.*, 2002), el piruvato entra en la matriz mitocondrial y es descarboxilado de manera oxidativa para la producción de acetil-CoA por el complejo multienzimático piruvato deshidrogenasa. Esta reacción conecta la glicólisis con el ciclo del ácido cítrico, en donde el acetil-CoA es completamente oxidado para generar dos moléculas de dióxido de carbono y equivalentes reductores en la forma de NADH y FADH₂ (Feldmann, 2011).

A continuación, el NADH producido se oxida mediante la transferencia de sus electrones a la proteína de la cadena respiratoria Ndi1 (NADH-Q oxidoreductasa), ubicada en la matriz mitocondrial (Yagi *et al.*, 2001). Posteriormente, el oxígeno molecular se reduce a agua y se genera un gradiente de protones a lo largo de la membrana mitocondrial (fuerza protón-motriz), el cual se emplea para dirigir la ATP-sintasa (Mitchell, 1966).

A diferencia de la respiración oxidativa, en la fermentación alcohólica el piruvato es convertido a acetaldehído por las piruvato descarboxilasas, codificadas por los genes *PDC1*, *PDC2* y *PDC3*. A continuación, esta molécula es convertida en etanol por medio de la alcohol deshidrogenasa, codificada por el gen *ADH1* (Pronk *et al.*, 1996); esta reacción es crucial para mantener el balance redox en la célula debido a que re-oxida el NADH a NAD⁺, el cual se requiere para la glicólisis (Swiegers y Pretorius, 2005). Como consecuencia, únicamente dos moléculas de ATP se forman a partir de una molécula de glucosa (Ishtar Snoek y Yde Steensma, 2007).

Cabe resaltar que aunque en la fermentación alcohólica, el rendimiento de ATP por mol de glucosa es menor (comparado con la respiración), es una vía rápida que permite a las levaduras competir de manera efectiva para sobrevivir, especialmente porque el etanol producido inhibe el crecimiento de microorganismos competidores (Rolland *et al.*, 2002).

Por lo tanto, *S. cerevisiae* puede cambiar a un metabolismo respiro-fermentativo tan pronto como la concentración de glucosa excede los 0.8 mM (0.144 g/L) (Verduyn *et al.*, 1984), básicamente mediante la regulación de la expresión de genes (Johnston, 1999; Otterstedt *et al.*, 2004).

2.1. Regulación de la expresión de genes por glucosa

Los genes cuya expresión se induce en respuesta a elevadas concentraciones de glucosa, codifican para enzimas de la glicólisis y tipos particulares de transportadores de hexosas, en un proceso conocido como “*inducción por glucosa*”, con los objetivos de conseguir una mayor capacidad glicolítica y compensar la menor generación de ATP durante la fermentación alcohólica (Müller *et al.*, 1995; Özcan y Johnston, 1995; Johnston, 1999).

En el caso de los transportadores de hexosas, cuando la glucosa en el medio es abundante, se inicia la síntesis de las proteínas transportadoras de baja afinidad (Hxt1p; posee una constante de afinidad K_m ~50-100 mM), a diferencia de los transportadores de elevada afinidad (Hxt2p, Hxt4p, Hxt6p y Hxt7p; K_m ~ 1-10 mM) cuya síntesis inicia cuando la glucosa es escasa (Özcan y Johnston, 1995; Özcan y Johnston, 1996; Reifemberger *et al.*, 1997).

Concomitantemente, el metabolismo respiratorio se reprime a través de la represión catabólica por carbono (CCR) (Gancedo, 1998; Carlson, 1999), el cual regula de manera negativa a los genes involucrados en la respiración y otras funciones mitocondriales (por ejemplo, los citocromos), así como genes requeridos para la utilización de fuentes de carbono alternativas (Johnston, 1999).

La represión de la transcripción dependiente de glucosa en el proceso CCR está a cargo de la proteína Mig1p y del complejo represor general Tup1p y Ssn6p (Ostling *et al.*, 1996), en donde la hexosa regula la localización nuclear de Mig1p (De Vit *et al.*, 1997).

Los fenómenos de inducción de genes de la glicólisis y de represión del metabolismo respiratorio, son los responsables de promover la rápida utilización de la glucosa y la acumulación de alcohol, lo cual constituye una ventaja selectiva frente a otros microorganismos en hábitats ricos en glucosa (Bauer y Pretorius, 2000).

2.2. Habilidades metabólicas de *S. cerevisiae*

Además de la elevada eficiencia de las vías fermentativa y glicolítica (Walker, 1998), el metabolismo fermentativo de *S. cerevisiae* tiene varias características que le otorgan una ventaja competitiva frente a otras levaduras:

- Capacidad para resistir el estrés osmótico asociado con el crecimiento en elevadas concentraciones de azúcar y las perturbaciones a las estructuras celulares, como a las membranas, inducidas por etanol (Alexandre *et al.*, 1994; Bauer y Pretorius, 2000; Sales *et al.*, 2000). A diferencia de las especies pertenecientes a los géneros *Brettanomyces*, *Candida*, *Cryptococcus*, *Debaromyces*, *Hanseniaspora*, *Kloeckera*, *Kluyveromyces*, *Pichia*, que mueren conforme progresa la fermentación debido a su menor tolerancia al etanol (Moreno-Arribas y Polo, 2005).
- Facultad de fermentar otros carbohidratos además de la glucosa; por ejemplo, la fructosa, la cual es internalizada por los miembros de la familia HXT y fosforilada por una hexocinasa a fructosa 6-fosfato, para metabolizarse a través de la glucólisis (Reifenberger *et al.*, 1997; van Maris *et al.*, 2006).
- Capacidad de crecer en presencia y en ausencia de oxígeno (Hernández, 2003), a diferencia de *K. lactis*, la cual es capaz de fermentar pero no puede crecer en condiciones anaeróbicas. Esta facultad ha promovido el uso de *S. cerevisiae* en la industria, debido en parte, a los gradientes de oxígeno (resultado de oxigenaciones incompletas) en los fermentadores a gran escala (Visser *et al.*, 1990; Breunig y Steensma, 2003; Ishtar Snoek y Yde Steensma, 2007).

2.2.1. Crecimiento anaeróbico

La habilidad de *S. cerevisiae* para crecer en ausencia de oxígeno constituye una adaptación evolutiva, originada de la duplicación de todo el genoma hace aproximadamente 100,000,000 años (Wolfe y Shields, 1997; Piskur y Langkjaer, 2004).

La adaptación fue necesaria porque el oxígeno molecular se requiere para la biosíntesis de moléculas esenciales, como grupos hemo, esteroides, ácidos grasos insaturados, pirimidinas y desoxiribonucleótidos y por lo tanto, *S. cerevisiae* desarrolló diversos mecanismos para crecer en esta condición (Andreasen y Stier, 1953; Nagy *et al.*, 1992; Chabes *et al.*, 2000).

Por ejemplo, debido a la incapacidad de sintetizar los grupos hemo en ausencia de oxígeno, se ha sugerido que *S. cerevisiae* recicla en el citoplasma el hemo liberado por la degradación de los citocromos (Clarkson *et al.*, 1991; Kwast *et al.*, 2002).

En cuanto a las pirimidinas, su síntesis está a cargo de la dihidroorotato deshidrogenasa (DHDODasa), la cual es una proteína mitocondrial dependiente de la funcionalidad de la cadena respiratoria. Sin embargo, *S. cerevisiae* tiene una DHDODasa citosólica (*URA1*) que no es dependiente del metabolismo respiratorio (Gojkovic *et al.*, 2004).

Por último, la incapacidad para sintetizar ácidos grasos insaturados (por el sistema microsómico acil-CoA desaturasa (Mathews *et al.*, 2002)), esteroides y escualeno, en condiciones anaeróbicas (Nurminen *et al.*, 1975), promueve que la célula cambie su pared y su membrana celular para permitir la incorporación de estas bio-moléculas (Ishtar Snoek y Yde Steensma, 2007) y así regular la composición y la fluidez de la membrana plasmática (Mathews *et al.*, 2002; Wilcox *et al.*, 2002).

2.2.2. Estrés durante la fermentación alcohólica

Durante la fermentación, la levadura se enfrenta a varios tipos de estrés, ocasionados principalmente por la presión osmótica (choque hiper e hipo-osmótico) y por la presencia de grandes concentraciones de compuestos tóxicos tales como el etanol (Mager y Hohmann, 1997).

El etanol afecta la velocidad de crecimiento celular y por lo tanto, la eficiencia de la fermentación, debido a que incrementa la permeabilidad y la fluidez de la membrana plasmática (Alexandre *et al.*, 1994; Sales *et al.*, 2000).

La consecuencia del incremento en la fluidez es la disipación de la fuerza protón-motriz, necesaria para el transporte de compuestos a través del simporte con protones, mientras que el incremento en la permeabilidad al H^+ , ocasiona la acidificación intracelular (Boulton *et al.*, 1996).

Además, el etanol causa la desnaturalización y disfunción de las proteínas de la glicólisis: piruvato cinasa y hexocinasa (Millar *et al.*, 1982; Pascual *et al.*, 1988).

En respuesta al estrés por etanol, la membrana celular cambia su composición de ácidos grasos insaturados (UFAs), fosfolípidos y ergosterol (Alexandre *et al.*, 1994; Chi y Arneborg, 1999; You *et al.*, 2003; Aguilera *et al.*, 2006). También se induce la producción

de proteínas de tipo choque térmico (Hsp) (Hu *et al.*, 2007), que actúan como un agente re-modelador de proteínas desnaturalizadas (Hsp104p) (Glover y Lindquist, 1998) o como protección de la integridad de las membranas en contra de la deshidratación causada por el etanol (Hsp12p) (Sales *et al.*, 2000).

Por su parte, el choque hiper-osmótico causado por el elevado contenido de azúcares, ocasiona el eflujo de agua de la célula, la disminución de la presión de turgencia y finalmente, la rápida contracción celular. Para contrarrestar estos efectos y recuperar la turgencia, *S. cerevisiae* cierra el canal de glicerol Fps1p, debido a que el glicerol es el principal soluto compatible con la célula y secuestrante de agua (Hohmann, 1997; Mager y Siderius, 2002).

3. COMPUESTOS AROMÁTICOS PRODUCIDOS DURANTE LA FERMENTACIÓN

En la fermentación alcohólica, además del etanol y del dióxido de carbono, las levaduras producen a partir del piruvato una baja concentración de compuestos volátiles, que se conocen en conjunto como “*bouquet de la fermentación*” (Lambrechts y Pretorius, 2000).

Los principales metabolitos que definen el bouquet aromático de los productos fermentados (Styger *et al.*, 2011) son los alcoholes superiores (Herraiz *et al.*, 1990; Zoecklein *et al.*, 1999), los ácidos grasos (Valero *et al.*, 1998; Guitart *et al.*, 1999), los aldehídos y los ésteres (Herraiz y Ough, 1992; Zea *et al.*, 1994; Ferreira *et al.*, 1995; Lema *et al.*, 1996; Vianna y Ebeler, 2001). En la Figura 1 se representan las diferentes vías bio-sintéticas involucradas en su formación.

Debido a que estas moléculas tienen bajos umbrales de detección, sólo se requieren cantidades pequeñas para influenciar el sabor y olor de una bebida (Lambrechts y Pretorius, 2000). Cabe señalar que el umbral de percepción del olor (o umbral de detección) se define como la concentración más baja de un compuesto que el olfato humano puede detectar (Moore, 2005).

3.1. Sabor, aroma y bouquet de los productos fermentados

Las palabras aroma, sabor y bouquet se usan para describir las cualidades organolépticas de los productos fermentados, sin embargo, tienen diferentes significados según el autor que las utilice.

Por ejemplo, Jackson, 2008 dividió la fragancia del vino en dos categorías, el aroma y el bouquet. El primero describe a los olores que son derivados de la uva; mientras que el bouquet se refiere a los compuestos aromáticos que se forman durante la fermentación, procesamiento y añejamiento.

Para Chambers, 2008, el aroma se refiere al olor o el sabor frutal de un vino joven. Por su parte, el bouquet describe la compleja interacción de aromas y sabores que se desarrollan durante el añejamiento, por ejemplo, la fragancia característica a vainilla proveniente de la barrica de roble francés.

En cambio, Styger *et al.*, 2011, definió el bouquet aromático de un vino como la paleta aromática y saborizante final que resulta de la interacción compleja entre numerosos compuestos químicos volátiles.

Asimismo, es difícil clasificar la fragancia de los productos fermentados en aroma, sabor y/o bouquet, debido a que existen aromas (similares o idénticos), que pueden derivarse de la uva, del metabolismo de las levaduras o bacterias y/o de las reacciones químicas (Jackson, 2008).

Por lo tanto, algunos autores, como Swiegers y Pretorius, 2005, sugieren utilizar las palabras sabor, aroma y bouquet como sinónimos, una tradición que se seguirá durante este trabajo.

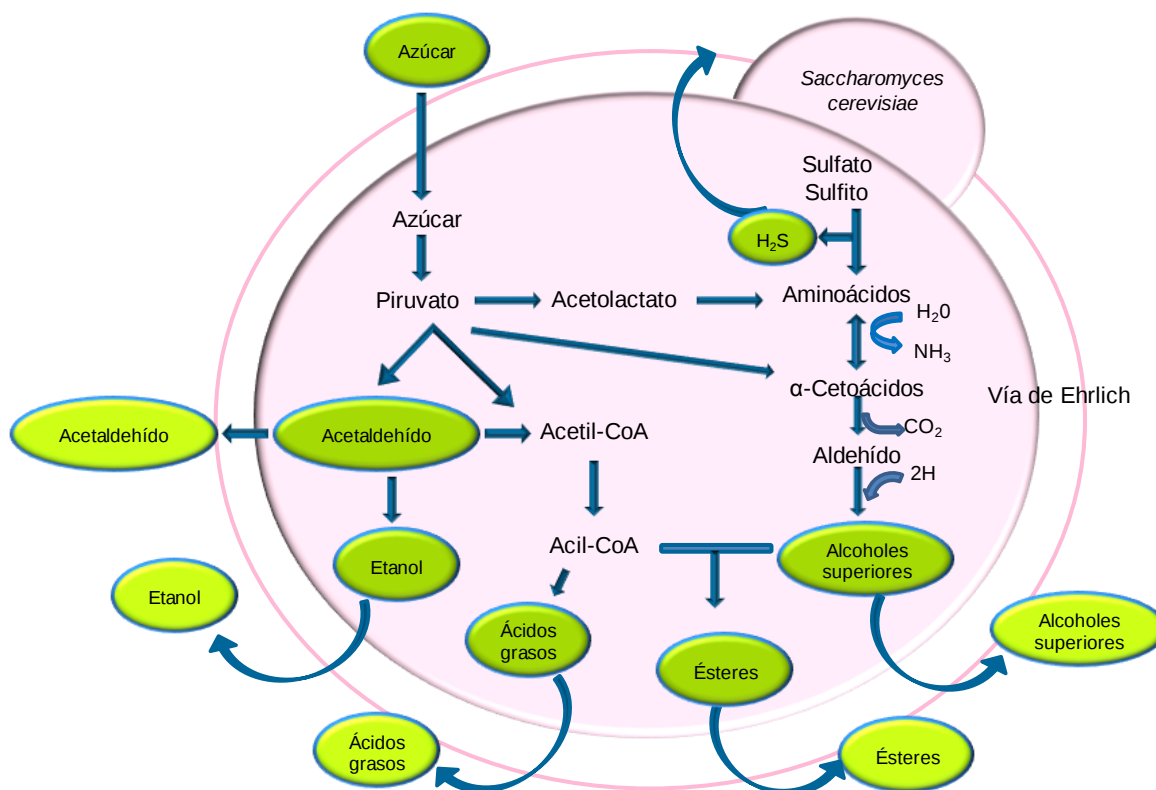


Figura 1. **Bouquet de la fermentación alcohólica.** Representación esquemática de la formación de los compuestos aromáticos por las levaduras. Modificado de (Ehrlich, 1904; Swiegers y Pretorius, 2005).

3.2. Metabolismo de los compuestos del “bouquet” de la fermentación

A continuación se describen las vías bio-sintéticas responsables de la formación de los compuestos asociados al bouquet.

3.2.1. Compuestos carbonilo

Los principales representantes de este grupo son el acetaldehído y algunos ácidos orgánicos. El acetaldehído es uno de los intermediarios metabólicos principales en la fermentación debido a que es el último precursor antes de la formación del etanol (Pronk *et al.*, 1996), y por lo tanto, la mayor acumulación ocurre cuando la tasa de degradación del carbono está en su máximo nivel (Swiegers y Pretorius, 2005).

A bajos niveles, el acetaldehído imparte un aroma frutal agradable en las bebidas, pero a mayores concentraciones, el olor se convierte en irritante-picante, similar a pasto verde o

manzanas. El acetaldehído también reacciona y se une con facilidad a las proteínas o aminoácidos para generar una amplia gama de sabores y olores (Styger *et al.*, 2011).

El acetaldehído a su vez, puede ser el sustrato para la formación de acetato, mediante una reacción de oxidación catalizada por las acetaldehído deshidrogenasas citosólicas, codificadas por los genes *ALD6*, *ALD2* y *ALD3* (Pronk *et al.*, 1996; Navarro-Avino *et al.*, 1999).

Por su parte, el metabolismo de los ácidos grasos es responsable de la síntesis de los ácidos orgánicos como el ácido acético, el ácido propiónico y el ácido hexanóico (Lambrechts y Pretorius, 2000).

3.2.2. Alcoholes superiores

Los alcoholes superiores son los alcoholes con más de dos átomos de carbono. De manera cuantitativa, los más importantes son el 1-propanol, 2-metil-1-propanol (isobutanol), 2-metil-1-butanol, 3-metil-1-butanol (alcohol isoamílico) y el 2-fenil-etanol (Jackson, 2008).

Los alcoholes superiores (a bajas concentraciones) y los ésteres producidos a partir de ellos, hacen una contribución crucial al sabor y aroma del vino, porque contribuyen con su olor frutal (Tabla 1) (Nykänen *et al.*, 1977; Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers y Pretorius, 2005). Así mismo, son responsables del carácter aromático distintivo de las bebidas destiladas: brandi y el whisky (Jackson, 2008).

Los alcoholes superiores se forman predominantemente por la vía de Ehrlich (Ehrlich, 1904), a partir de los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, valina, isoleucina), los aromáticos (fenil alanina, tirosina, triptófano) y el aminoácido con azufre (metionina) (Hazelwood *et al.*, 2008), en donde los primeros aminoácidos son los precursores de los ácidos carboxílicos, alcoholes superiores y ésteres más representativos (Styger *et al.*, 2011) (Tabla 1).

El catabolismo de los aminoácidos inicia con una reacción de transaminación para formar el respectivo α -cetoácido (Dickinson y Norte, 1993; Dickinson *et al.*, 1997), catalizada por aminotransferasas de aminoácidos de cadena ramificada mitocondrial y citosólica (Eden *et al.*, 1996; Kispal *et al.*, 1996; Eden *et al.*, 2001) (Figura 2).

Posteriormente, la piruvato descarboxilasa convierte el α -cetoácido en un aldehído de cadena ramificada con un átomo de carbono menos, y la alcohol deshidrogenasa cataliza la reducción, dependiente de NADH, del aldehído a su alcohol superior correspondiente (Derrick y Large, 1993). Asimismo, el aldehído puede ser oxidado para la formación de un ácido (Figura 2).

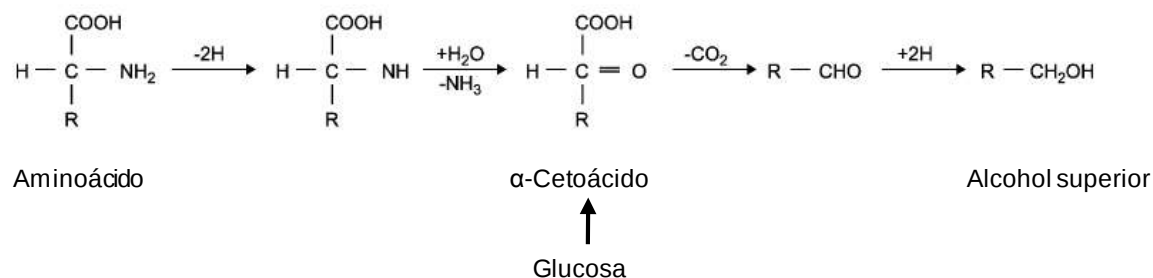


Figura 2. **Vía de Ehrlich para la formación de alcoholes superiores.** El catabolismo de los aminoácidos de cadena ramificada (leucina, valina e isoleucina), aminoácidos aromáticos (fenil-alanina, tirosina y triptófano) y el aminoácido con azufre (metionina), conduce a la formación de alcoholes superiores. Modificado de (Swiegers y Pretorius, 2005; Ehrlich, 1904).

Tabla 1. **Alcoholes superiores, ácidos carboxílicos y ésteres producidos a partir de los aminoácidos de cadena ramificada.** Modificado de (Styger *et al.*, 2011).

Compuesto	Aminoácido	Concentración en vino (mg/L)	Olor
Ácido isobutírico	Valina	Trazas	Dulce, manzana
Alcohol isoamílico	Leucina	45-490	Alcohol
Isobutanol	Valina	40-140	Frutal, solvente
Alcohol amílico (activo)	Isoleucina	15-150	Almendra
Isoamil-acetato	Leucina	0.03-8.1	Plátano, pera
2-fenil-acetato	Fenilalanina	0.01-4.5	Rosas, miel, floral
Etil-isovalerato	Leucina	0-0.7	Manzana, frutal
Isobutil-acetato	Valina	0.01-0.8	Plátano

3.2.3. Ésteres

Los ésteres son únicamente compuestos traza en las bebidas fermentadas como la cerveza y el vino, pero son importantes para el perfil organoléptico (Drawert y Tressl, 1972; Engan, 1972; Engan, 1974; Meilgaard, 1975b; Suomalainen, 1981; Suomalainen y Nykänen, 1983; Nykänen, 1986; Kruger, 1998a; Kruger, 1998b; Debourg, 1999;

Lambrechts y Pretorius, 2000; Cristiani y Monnet, 2001; Pisarnitskii, 2001), debido a que su presencia determina el aroma frutal de estas bebidas (Suomalainen y Nykänen, 1983; Mason y Dufour, 2000).

Por ejemplo, los olores frutales característicos del vino, brandi y otras bebidas alcohólicas derivadas de la uva son debidos en gran parte a la mezcla de etil-acetato (aroma a solvente, frutal), isoamil-acetato (aroma similar plátano), hexil-acetato (olor frutal), 2 feniletil-acetato (sabor frutal, floral con una nota a miel), etil-caproato (aroma tipo manzana) y etil-caprilato (aroma a manzana) (Tabla 3) (Fujii *et al.*, 1994; Lambrechts y Pretorius, 2000; Swiegers y Pretorius, 2005; Swiegers *et al.*, 2005).

Además, debido a que la concentración de la mayoría de los ésteres formados durante la fermentación está en el umbral de percepción odorífica tanto en la cerveza como en el vino y que a su vez, tienen bajos umbrales de percepción (Tabla 2 y Tabla 3), incluso pequeños cambios en su concentración pueden influenciar las características odoríficas de las bebidas fermentadas (Saerens *et al.*, 2010).

Tabla 2. **Valores umbral para los ésteres y su concentración en la cerveza lager** (Meilgaard, 1975a; Saerens *et al.*, 2010).

Compuesto	Nivel umbral (mg/L)	Concentración (mg/L)	Descripción del sabor
Etil-acetato	30	8-32	Solvente, frutal
Isoamil-acetato	1.2	0.3-3.8	Plátano, pera
Feniletil-acetato	3.8	0.10-0.73	Rosas, miel
Etil-hexanoato	0.23	0.05-0.21	Manzana, frutal, dulce
Etil-octanoato	0.9	0.04-0.53	Manzana, anís

Tabla 3. **Valores umbral para los ésteres y su concentración en el vino.** Modificado de (Swiegers y Pretorius, 2005).

Compuesto	Nivel umbral (mg/L)	Concentración (mg/L)	Descripción del sabor
Etil-acetato	7.5 ^a	22.5-63.5	Solvente, frutal
Isoamil-acetato	0.03 ^a	0.1-3.4	Plátano, pera
Isobutil-acetato	1.6 ^b	0.01-1.6	Plátano, frutal
Feniletal-acetato	0.25 ^a	0-18.5	Rosas, floral
Hexil-acetato	0.7 ^c	0-4.8	Dulce, perfume
Etil-butanoato	0.02 ^a	0.01-1.8	Floral, frutal
Etil-hexanoato	0.05 ^a	0.03-3.4	Manzana verde
Etil-octanoato	0.02 ^a	0.05-3.8	Jabón dulce, manzana
Etil-decanoato	0.2 ^d	0-2.1	Floral, jabón

^a10% etanol, ^bCerveza, ^cVino, ^dVino sintético.

3.2.3.1. Clasificación de los ésteres

En base a los grupos funcionales que forman a los ésteres saborizantes que confieren olor y sabor a las bebidas fermentadas existen dos grupos. El primer grupo es en el que se encuentran los ésteres de acetato, en donde la función alcohol es el etanol o un alcohol superior derivado del metabolismo de los aminoácidos y la función ácido es el acetilo; los más representativos son el etil-acetato, isoamil-acetato, isobutil-acetato y fenil-etil-acetato (Saerens *et al.*, 2010) (Figura 3). También forman parte de este grupo el propil-acetato, pentil-acetato, hexil-acetato, heptil-acetato y octil-acetato, aunque en menores concentraciones (Verstrepen *et al.*, 2003d).

Dentro de este grupo, el isoamil-acetato es el éster de acetato con mayor influencia en la mayoría de las cervezas y vinos (blancos), debido a su sabor distintivo a plátano (Saerens *et al.*, 2010).

El segundo grupo reúne a los etil-esteres de ácidos grasos de cadena media (la función alcohol lo constituye el etanol y la función ácido un ácido graso de cadena media) e incluye al etil-hexanoato (aroma a anís o manzana), etil-octanoato (aroma a manzana ácida), etil-decanoato, etil-dodecanoato (Saerens *et al.*, 2010) (Figura 3).

De estos dos grupos, los ésteres de acetato son producidos en gran concentración (Saerens *et al.*, 2010). Además, al ser solubles en lípidos, difunden a través de la membrana plasmática hacia el medio de fermentación. A diferencia del grupo de los etil-ésteres, cuya difusión depende de la composición y/o de la longitud de la cadena del

ácido graso incorporado (100% para etil-hexanoato, 54-68% para etil-octanoato y 8-17% para etil-decanoato) (Nykänen y Nykänen, 1977).

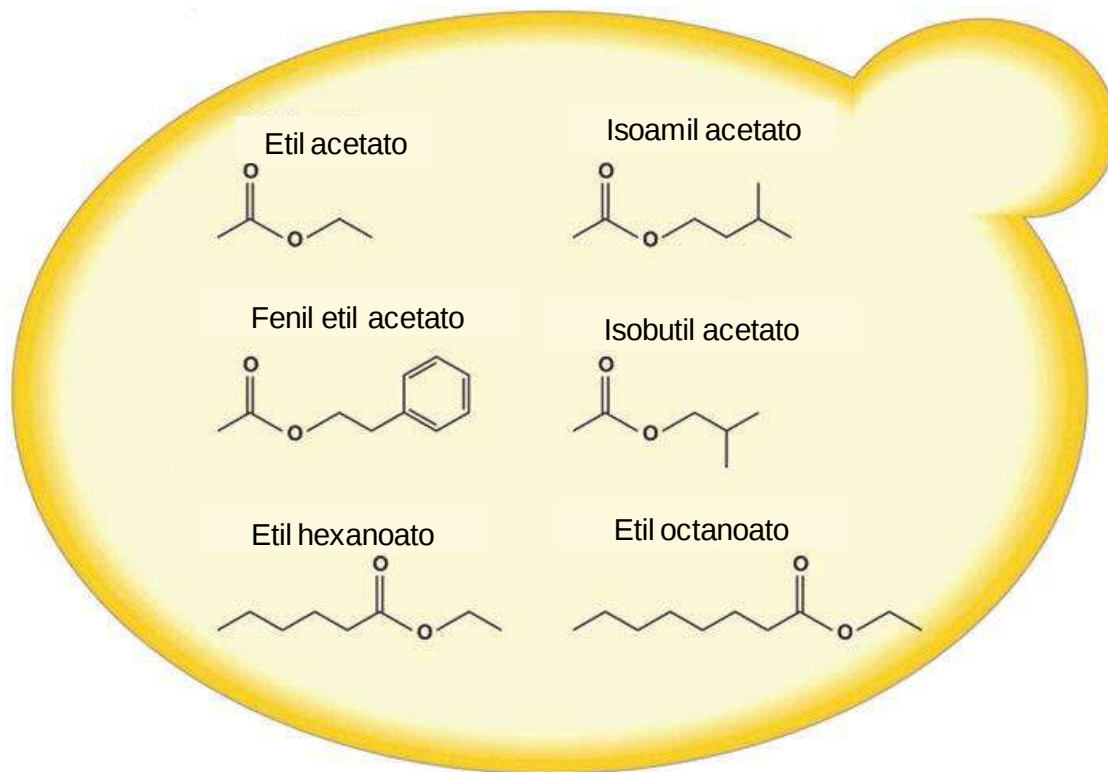


Figura 3. **Ésteres de acetato y etil ésteres de ácidos grasos de cadena media.** Ésteres saborizantes producidos por *Saccharomyces cerevisiae*, presentes en bebidas obtenidas en fermentaciones alcohólicas. Modificado de (Verstrepen *et al.*, 2003b; Saerens *et al.*, 2010).

4. GENES INVOLUCRADOS EN LA SÍNTESIS E HIDRÓLISIS DE ÉSTERES EN *Saccharomyces sp.*

Durante la fermentación alcohólica, la tasa de producción de ésteres depende principalmente de tres factores: 1) la concentración de los co-substratos (acil-CoA y alcohol), 2) la actividad de las enzimas involucradas en la síntesis y 3) la actividad de las enzimas esterasas; por lo tanto, todos los parámetros que influyan sobre estos factores afectarán la producción de ésteres (Saerens *et al.*, 2010).

Sin embargo, es importante resaltar que la concentración final y las proporciones particulares de cada éster son cepa-dependiente y su formación además está influenciada por factores externos como la temperatura de fermentación, la disponibilidad de nutrientes, el pH, los niveles de ácidos grasos insaturados/esteroides y el nivel de oxígeno (Peddie, 1990; Yoshimoto *et al.*, 2002; Quilter *et al.*, 2003; Rojas *et al.*, 2003; Lee *et al.*, 2004).

En cuanto a las enzimas relacionadas con el metabolismo de los ésteres, a la fecha, se han caracterizado en *S. cerevisiae* cinco distintos genes codificantes de proteínas con capacidad de síntesis o de hidrólisis de ésteres, los cuales son *ATF1*, *ATF2*, *EHT1*, *EEB1* e *IAH1* (Tabla 4).

Tabla 4. **Genes involucrados en la síntesis e hidrólisis de ésteres en *Saccharomyces sp.***

Gen	Vía metabólica	Fuente	Referencias
<i>ATF1</i>	Síntesis de ésteres de acetato	<i>S. cerevisiae</i>	(Fujii <i>et al.</i> , 1994; Verstrepen <i>et al.</i> , 2004)
<i>Lg-ATF1</i>	Síntesis de ésteres de acetato	<i>S. uvarum</i> y <i>S. pastorianus</i>	(Fujii <i>et al.</i> , 1994; Yoshimoto <i>et al.</i> , 1998)
<i>ATF2</i>	Síntesis de ésteres de acetato	<i>S. cerevisiae</i>	(Nagasawa <i>et al.</i> , 1998; Cauet <i>et al.</i> , 1999)
<i>EHT1</i>	Síntesis de etil ésteres de ácidos grasos de cadena media e hidrólisis	<i>S. cerevisiae</i>	(Saerens <i>et al.</i> , 2006)
<i>EEB1</i>	Síntesis de etil ésteres de ácidos grasos de cadena media e hidrólisis	<i>S. cerevisiae</i>	(Saerens <i>et al.</i> , 2006)
<i>IAH1</i>	Hidrólisis de ésteres de acetato	<i>S. cerevisiae</i>	(Fukuda <i>et al.</i> , 2000)

4.1. Síntesis de ésteres

Aunque estos compuestos pueden ser formados mediante una reacción química, la mayoría de los ésteres encontrados en los productos fermentados son el resultado de actividades enzimáticas de tipo acil-transferasa o éster-sintasa (Mason y Dufour, 2000). Estas enzimas catalizan una reacción de condensación, entre los co-sustratos: alcohol superior y una molécula de acil-CoA, en donde el enlace tioéster de esta última aporta la energía para la reacción (Figura 4) (Nordström, 1962; Nordström, 1963; Nordström, 1964).

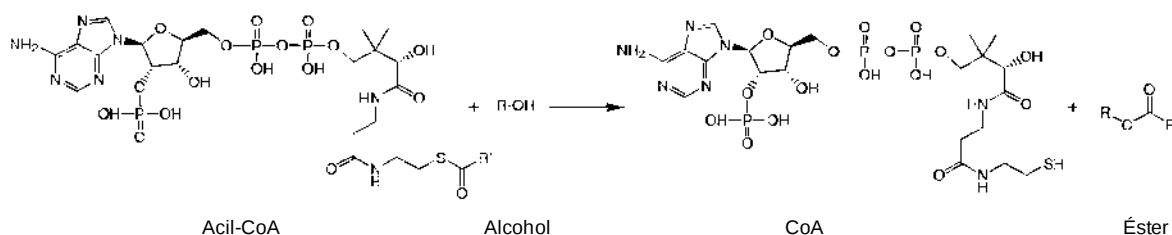


Figura 4. **Vía biosintética responsable de la síntesis de ésteres.** Las enzimas acil-transferasa catalizan la formación de ésteres a partir de dos substratos: un alcohol y una molécula de acil-CoA. Modificado de (Sumby *et al.*, 2010).

4.1.1. Síntesis de ésteres de acetato

Las alcohol acetil-transferasas (AATasa) I y II, codificadas por los genes *ATF1* y *ATF2*, catalizan la síntesis de ésteres de acetato (Yoshioka y Hashimoto, 1981; Malcorps y Dufour, 1992; Fujii *et al.*, 1994; Fujii *et al.*, 1996a; Fujii *et al.*, 1996b; Nagasawa *et al.*, 1998; Yoshimoto *et al.*, 1998). Además, se conoce una tercer enzima involucrada en la producción de etil-acetato e isoamil-acetato, es una AATasa que se encuentra únicamente en las levaduras lager (*Lg-Atf1p*) y es homóloga a *Atf1p* (Yoshimoto *et al.*, 1998).

Los genes *ATF1* y *ATF2* están presentes en las cepas *S. cerevisiae* y en *S. bayanus*, mientras que el gen *Lg-ATF1*, únicamente se encuentra en *S. uvarum* y *S. pastorianus* (Yoshimoto *et al.*, 1998; Dufour *et al.*, 2002).

Atf1p y *Atf2p* catalizan la formación de ésteres de acetato a partir de un alcohol y el acetil-CoA (Saerens *et al.*, 2010). Entre ellas, la AATasa I, codificada por el gen *ATF1* es la mejor estudiada y la que tiene mayor actividad de síntesis de ésteres en *S. cerevisiae* (Schreier y Jennings, 1979; Thurston *et al.*, 1981; Fujii *et al.*, 1996b; Fujii *et al.*, 1997; Cauet *et al.*, 1999).

Esta conclusión se obtuvo después de que las investigaciones elucidaran la función de las enzimas *At1p* y *Atf2p* en la producción de ésteres volátiles en *S. cerevisiae*, en donde los análisis indicaron que *Atf2p* tiene una contribución menor en la síntesis de ésteres de acetato en comparación con *Atf1p* (Verstrepen *et al.*, 2003d). Por ejemplo, en la producción del vino de mesa Colombard con la levadura VIN13, se observó un incremento en las concentraciones de etil-acetato e isoamil-acetato de 12 y 10 veces, cuando se sobre-expresó al gen *ATF1*, y únicamente de 1.3 y 1.4 veces cuando se incrementó la expresión de *ATF2* (Lilly *et al.*, 2006).

4.1.1.1. Substratos para la formación de ésteres de acetato

Con anterioridad se indicó que la concentración de los sustratos es un parámetro con influencia en la producción de ésteres de acetato (Peddie, 1990), de ahí la importancia de conocer las rutas metabólicas involucradas en su biosíntesis.

En el caso del acetil-CoA, inicialmente se creía que provenía de la descarboxilación del piruvato (mediante el complejo piruvato deshidrogenasa) (Mason y Dufour, 2000), sin embargo, el complejo multi-enzimático se reprime por glucosa y está casi completamente inactivo durante la fermentación (Roy y Dawes, 1987).

La evidencia sugiere que el acetil-CoA proviene del acetaldehído producido a partir del piruvato (involucrando a la piruvato descarboxilasa), con el acetato como intermediario (sintetizado a través de la acetaldehído deshidrogenasa), seguido por la activación directa del acetato con ATP (acetil-CoA sintasa) (Pronk *et al.*, 1996; Boulton y Quain, 2001).

En cuanto a los alcoholes de cadena ramificada, estos son sintetizados a partir de los intermediarios α -cetoácidos correspondientes, los cuales pueden formarse en la vía catabólica de Ehrlich (Rainbow, 1970) y/o en la vía de síntesis *de novo* de aminoácidos de cadena ramificada a partir de la glucosa (Yoshimoto *et al.*, 2002) (Figura 2).

4.1.2. Síntesis de etil-ésteres de ácidos grasos de cadena media (MCFA)

Los etil-ésteres de cadena media (MCFA) se forman en una reacción de condensación entre el etanol y un acil-CoA generado en el metabolismo de los ácidos grasos (Dufour *et al.*, 2003; Saerens *et al.*, 2006).

En las levaduras, la formación de la mayoría de los etil-ésteres MCFA es catalizada por dos enzimas acil-CoA:etanol O-aciltransferasas (AEATasas), denominadas como Eeb1p y Eht1p (Saerens *et al.*, 2006).

La enzima Eeb1p está involucrada en la síntesis de etil-butanoato, etil-hexanoato, etil-octanoato y etil-decanoato. Mientras que el gen *EHT1* codifica para una etanol hexanoil-transferasa, la cual genera etil-hexanoato a partir de etanol y hexanoil-CoA (Saerens *et al.*, 2006).

Además de la actividad sintética descrita para los genes *EHT1* y *EEB1* en la producción de etil-ésteres de ácidos grasos de cadena media (C₆-C₁₀), también se observó actividad

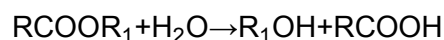
hidrolítica (actividad esterasa), debido a que las enzimas fueron capaces de hidrolizar a los *p*-nitrofenil ésteres (Saerens *et al.*, 2006).

La actividad esterasa de los genes *EHT1* y *EEB1* también fue observada *in vivo* mediante ensayos de sobre-expresión, en donde al medir la producción de etil-ésteres en fermentaciones tipo batch, no se observó un incremento significativo en su concentración (Saerens *et al.*, 2006).

Por lo tanto, la presencia de actividad sintasa y esterasa en ambas proteínas, sugiere que la concentración de los etil-ésteres durante la fermentación está regulada (Saerens *et al.*, 2006).

4.2. Hidrólisis de ésteres

Al igual que las enzimas involucradas en la síntesis de ésteres, las esterases son importantes en la acumulación final de estas biomoléculas. Las esterases son un grupo de hidrolasas que catalizan la siguiente reacción de escisión de ésteres (Peddie, 1990):



En el genoma de *S. cerevisiae* se encuentra el gen *IAH1*, el cual codifica para una esterasa involucrada en la hidrólisis de ésteres de acetato. La sobre-expresión del gen en *S. cerevisiae*, ocasionó un decremento significativo en la concentración de etil-acetato, isoamil-acetato, hexil-acetato y 2-fenil-etil-acetato (Lilly *et al.*, 2006).

En conclusión, debido a que en *S. cerevisiae* están presentes las actividades sintasa y esterasa, el balance de la actividad enzimática de cada una de ellas podría determinar la concentración de ésteres en un proceso fermentativo (Yoshimoto *et al.*, 1998; Mason y Dufour, 2000).

5. REGULACIÓN TRANSCRIPCIONAL DEL GEN *ATF1* EN *S. cerevisiae*

El conocimiento de que la sobre-expresión del gen *ATF1* durante la fermentación resultó en un incremento significativo en la producción de ésteres de acetato (entre 10 a 200 veces) (Lilly *et al.*, 2000; Verstrepen *et al.*, 2003d; Lilly *et al.*, 2006), sugiere que el parámetro limitante está ligado a los mecanismos de control de la expresión genética a nivel transcripcional del gen *ATF1*.

A continuación se describen los mecanismos de control transcripcional reportados para el gen *ATF1*, los cuales se esquematizan en la Figura 5.

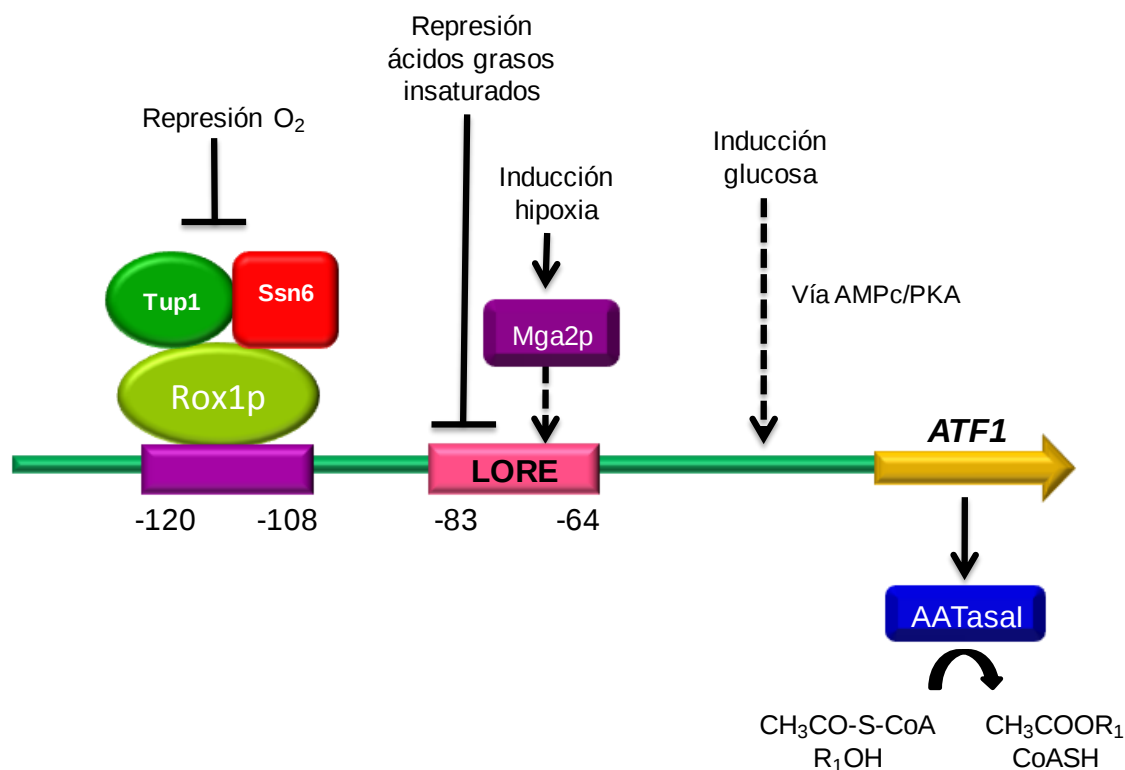


Figura 5. Elementos de respuesta y proteínas involucradas en el control transcripcional del gen *ATF1* en *S. cerevisiae*. Se representan las vías regulatorias dependientes de ácidos grasos insaturados, oxígeno y glucosa, responsables del control de la expresión del gen *ATF1* (Fujiwara *et al.*, 1999; Mason y Dufour, 2000; Jiang *et al.*, 2001; Vasconcelles *et al.*, 2001; Verstrepen *et al.*, 2003a).

5.1. Inducción por glucosa por la vía AMPc/PKA

La vía de señalización de AMPc/PKA está involucrada en la inducción de la expresión de *ATF1* por glucosa (Figura 5), debido a que la transcripción de *ATF1* se indujo después de la adición de glucosa a células crecidas en anaeróbiosis y privadas de una fuente de carbono. La inducción se abolió en la cepa con deleciones en las subunidades catalíticas de la proteína cinasa PKA, mientras que la cepa con deleciones en las subunidades regulatorias mostró una mayor expresión del gen *ATF1* (Verstrepen *et al.*, 2003a).

5.2. Regulación de la expresión por oxígeno y ácidos grasos insaturados

El oxígeno y los ácidos grasos insaturados regulan negativamente la expresión del gen *ATF1*, ejerciendo su efecto a nivel de síntesis de ARNm y por lo tanto, sobre la actividad

AATasa (Fujii *et al.*, 1997). Así mismo, se demostró que la transcripción de *ATF1* y del gen *OLE1* (codifica para una desaturasa de acil-CoA) están co-reguladas en respuesta a ambos factores (Stukey *et al.*, 1989; Fujiwara *et al.*, 1998).

Conjuntamente, cuando se remplazó el promotor natural de *ATF1* por un promotor constitutivo (como el contenido en la GAPDH), no se observó la disminución en el nivel de ARNm ni en la actividad enzimática en presencia de oxígeno o con la adición de ácidos grasos insaturados (Fujii *et al.*, 1997), por lo tanto, en la región promotora del gen *ATF1* se ubican las secuencias que dirigen su expresión.

Entre las bases -200 a -50 (río arriba del marco de lectura abierto) del promotor del gen *ATF1*, se encuentran los elementos en *cis* responsables de la regulación por ácidos grasos y por oxígeno (Figura 5). Esta región reguladora se identificó mediante la comparación de secuencias con el gen *Lg-ATF1*, el cual también se reprime por ácidos grasos insaturados y por aireación (Fujii *et al.*, 1996a), en donde se encontró una región homóloga con una identidad del 77%. Cuando este fragmento se insertó río arriba de un gen reportero, se observó que la actividad del plásmido híbrido *ATF1-CYC1-lacZ* fue inducida por privación de oxígeno. Asimismo, la actividad fue reprimida bajo condiciones aeróbicas y en presencia de ácidos grasos insaturados. Por lo tanto, la secuencia de 150 pb río arriba del gen es importante en la regulación de *ATF1* (Fujii *et al.*, 1997).

La represión de la expresión de *ATF1* por oxígeno (condiciones normóxicas) está a cargo del complejo represor general Rox1-Tup1-Ssn6, los cuales reconocen a su elemento de respuesta ubicado entre las bases 120 a 108 río arriba del codón de iniciación (Fujiwara *et al.*, 1999; Mason y Dufour, 2000). Mientras que, el elemento de respuesta a bajo oxígeno (LORE) es el responsable de la regulación por ácidos grasos insaturados e hipoxia (Vasconcelles *et al.*, 2001) (Figura 5).

5.3. Elemento de respuesta a bajo oxígeno (LORE)

El elemento LORE (de las siglas en inglés: Low Oxygen Response Element) se identificó inicialmente en el promotor de *OLE1*, mediante ensayos con genes reporteros y de cambio de movilidad electroforética de proteínas/ADN, definiéndose como un elemento en *cis* de activación transcripcional necesario para la inducción de la expresión genética por hipoxia (Vasconcelles *et al.*, 2001). El elemento de respuesta, además de activarse en

condiciones hipóxicas, se reprime de manera selectiva por la presencia de ácidos grasos insaturados en el medio de cultivo (Chellappa *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2001).

La inducción de la expresión en condiciones limitadas de oxígeno se observó cuando el elemento LORE se insertó en un promotor heterólogo fusionado a un gen reportero. Cuando dos copias de LORE en tándem se fusionaron con el promotor basal *CYC1* unido al gen reportero *lacZ*, la activación transcripcional incrementó 44 veces en condiciones hipóxicas, en comparación con la expresión de la actividad del vector heterólogo (pAM6) en condiciones normóxicas (Vasconcelles *et al.*, 2001) (Figura 6).

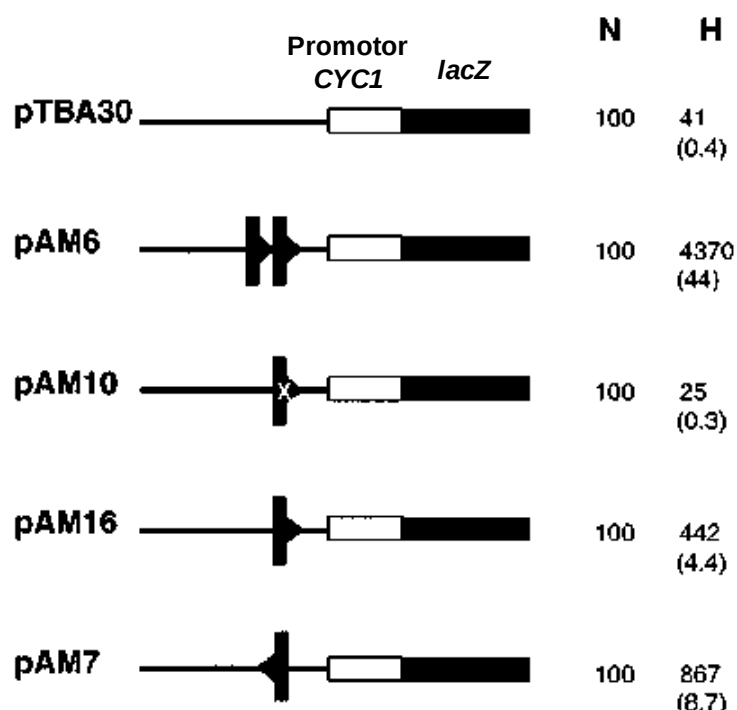


Figura 6. **Expresión de la actividad del gen reportero *lacZ* en los vectores heterólogos que contienen a LORE.** En el diagrama de la izquierda se muestra el elemento LORE (barra vertical sólida) insertado en la construcción heteróloga, empleando a los plásmidos con la fusión génica *CYC1::lacZ*, en donde la punta de flecha en la barra vertical indica la orientación del elemento LORE insertado y las barras horizontales representan la fusión *CYC1::lacZ*. El diagrama de la derecha indica la actividad normalizada de la β -galactosidasa en condiciones normóxicas (N) e hipóxicas (H). El número entre paréntesis indica las veces de inducción relativa a N (Vasconcelles *et al.*, 2001).

Posteriormente, mediante una búsqueda en el genoma de *S. cerevisiae*, se identificó un grupo de genes con un elemento *cis* en su región promotora similar al de *OLE1*, como *SUT1* y *ATF1* (Vasconcelles *et al.*, 2001) (Tabla 5).

Tabla 5. **Genes con un elemento LORE en la región promotora** (Vasconcelles *et al.*, 2001).

Gen	Distancia de ATG	Secuencia LORE			Distancia de ATG
		Núcleo			
<i>OLE1</i>	-347	GAAC	ACTCAACAA	ACCTTAT	-328
<i>ATF1</i>	-83	GCCA	ACcCAACAA	AAATTCTG	-64
<i>TIR1</i>	-344	AGGA	ACcCAACAA	TACAATA	-325
<i>SUT1</i>	-377	GGTT	ttTCAACAA	TACGTTT	-358
<i>TRX2</i>	-838	TGGC	ACTCAACAA	GATTGAC	-819
<i>FKH1</i>	-391	AACT	ACTCAACAA	TAGAAGG	-372
<i>FTR1</i>	-524	ACGT	tCTCAACAA	TTTTTCG	-505
<i>RPL35A</i>	-353	TGTT	ACTCAACAA	ATAATCT	-334
<i>MET22</i>	-231	AACA	ACTCAACAA	TAGCATA	-212

En particular, el LORE potencial del gen *ATF1*, tiene un nucleótido diferente en la región del núcleo (indicado con letra minúscula en la Tabla 5), pero aún así fue capaz de formar un complejo activo, lo que sugiere que ciertas posiciones de la secuencia del núcleo pueden variar y todavía funcionar como elemento de respuesta (Vasconcelles *et al.*, 2001).

El control de expresión hipóxica de los genes dependientes de LORE en *S. cerevisiae* está a cargo del factor de transcripción Mga2p; a esta conclusión se llegó mediante estudios con el gen reportero *lacZ* fusionado al promotor de *OLE1* y con técnicas de hibridación de tipo Northern blot, empleando a una cepa con el gen *MGA2* deletado ($\Delta mga2$). Así mismo, mediante ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA), se corroboró que Mga2p es un componente del complejo de unión a LORE (Jiang *et al.*, 2001).

El factor de transcripción Mga2p se regula mediante una vía de procesamiento dependiente de ubiquitina/proteosoma, mediada por *RPS5*, para garantizar una respuesta celular rápida (Hoppe *et al.*, 2000).

II. ANTECEDENTES

Existe poco conocimiento acerca del efecto de la expresión del gen *ATF1* y su impacto fenotípico sobre un medio de cultivo posterior al proceso de fermentación alcohólica; en un estudio previo realizado por nuestro grupo de investigación, se evaluó el efecto de la expresión del gen *ATF1* clonado en un vector de expresión génica, utilizando como cepas receptoras a un aislado de *S. cerevisiae* UMARN3 y de *K. marxianus* UMPe-1, y se determinó su efecto sobre la producción de ésteres de acetato durante procesos fermentativos. Los resultados obtenidos indicaron que la producción de ésteres fue significativamente mayor en las cepas transformantes en comparación con las silvestres (Miranda-Mendoza, 2010). Resultados similares fueron obtenidos al ser sobre-expresado al gen *ATF1* en la cepa industrial del vino VIN13, concluyendo que la sobre-expresión del gen incrementó de manera significativa las concentraciones de los diversos ésteres como etil-acetato, isoamil-acetato, 2-feniletil-acetato y etil-caproato (Lilly *et al.*, 2006).

III. JUSTIFICACIÓN

Las bebidas obtenidas mediante la fermentación alcohólica son una mezcla compleja de compuestos, muchos de los cuales contribuyen y/o determinan el color, el sabor y las propiedades aromáticas de las bebidas. En los últimos años, se han identificado los compuestos responsables de las notas sensoriales específicas y dentro de este grupo, los ésteres destacan en importancia debido a que son los responsables del carácter frutal altamente deseado en las bebidas fermentadas.

Sin embargo, estas moléculas se encuentran frecuentemente en cantidades traza, en el umbral aromático, por consiguiente, el incremento en la concentración de estos metabolitos, podría tener efectos importantes en el bouquet de las bebidas fermentadas y así mejorar su calidad.

Por otro lado, se describió que el producto del gen *ATF1* es el principal responsable en la síntesis de ésteres de acetato y que su nivel de expresión correlaciona con la producción de estos metabolitos, por lo tanto, el desarrollo de estrategias que incrementen la expresión del gen *ATF1* y la síntesis de ésteres de acetato durante la fermentación alcohólica, podría mejorar a los productos de la fermentación.

IV. HIPÓTESIS

En *Saccharomyces cerevisiae* BY4741 el contenido de ésteres de acetato se incrementa en la fermentación alcohólica con la manipulación de la expresión del gen *ATF1* mediante modificaciones en su región promotora y/o el aumento en el número de genes.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Incrementar la producción de ésteres de acetato en un proceso de fermentación alcohólica mediante la manipulación de la expresión del gen *ATF1*, usando como modelo la cepa de *Saccharomyces cerevisiae* BY4741.

Objetivos particulares

1. Incrementar la expresión del gen *ATF1* en *S. cerevisiae* mediante la inserción de un elemento promotor de la transcripción y/o duplicación génica.
2. Evaluar de los parámetros fermentativos de las clonas recombinantes de *S. cerevisiae* obtenidas.
3. Determinar la producción de ésteres y compuestos mayoritarios en el proceso de fermentación alcohólica de las clonas recombinantes.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIALES

1.1. Plásmidos y cepas

En este trabajo se emplearon los plásmidos y las cepas descritos en las Tablas 6 y 7, respectivamente.

Tabla 6. **Plásmidos utilizados en este trabajo.**

Plásmido	Características	Referencia
pJET1.2/blunt	Vector linearizado para la clonación de fragmentos de ADN. Se basa en una selección positiva de las células recombinantes (ya que contiene el gen letal <i>eco47IR</i>) y el gen <i>bla</i> que confiere resistencia a ampicilina (Ap^R).	Fermentas
pJO1F-O1R	Vector que tiene clonado el promotor de <i>ATF1</i> (hasta el elemento LORE).	Este trabajo
pJ18S	pJET1.2/blunt con un fragmento de 1716 pb correspondiente al gen ADNr 18S.	Este trabajo
pGEM-T Easy	Vector para la clonación de fragmentos de ADN con extremos adenilados por selección positiva de resistencia a ampicilina (Ap^R).	Promega
pGO1-O2R	pGEM-T Easy con la unidad de transcripción del gen <i>ATF1</i> clonada.	Este trabajo
pGO2-O2R	pGEM-T Easy conteniendo un fragmento de 2615 pb que corresponde al fragmento LORE, la unidad codificante y la región terminadora.	Este trabajo
pYES2	Vector para la expresión inducible de proteínas recombinantes en <i>S. cerevisiae</i> ; tiene el promotor <i>GAL1</i> que se induce por galactosa y se reprime por glucosa.	Invitrogen
pYES2 Zeo	pYES2 en el cual se deletó el gen <i>URA3</i> y se insertó un casete de resistencia a zeocina (Zeo^R).	Bernardino-Gómez, 2011
pYES2 <i>ATF1</i> Zeo	pYES2 con el gen <i>ATF1</i> clonado en el cual se cambió el gen <i>URA3</i> por un casete de resistencia a zeocina (Zeo^R).	Miranda-Mendoza, 2010
pBS38ZeoB	pBSL141 en el cual se cambió el gen de resistencia a gentamicina por un casete de resistencia a zeocina proveniente de pPICZB (Ap^R , Zeo^R).	Bernardino-Gómez, 2011

Tabla 7. Cepas empleadas en el presente trabajo.

Cepa	Características	Referencias
<i>S. cerevisiae</i> UMARN3	Levadura aislada de residuos fermentados	López-Alvarez, 2007
<i>S. cerevisiae</i> BY4741	MATa; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0	Applied Biosystems
<i>E. coli</i> JM101	Cepa receptora para la transformación [<i>supE</i> , <i>thi-1</i> Δ (<i>lac-proAB</i>) (<i>F'</i> , <i>traD36</i> , <i>proAB</i> , <i>laqI</i> ^q Z Δ M15)]	Yanisch-Perron <i>et al.</i> , 1985
BY4741 pYES2-ATF1-Zeo	<i>S. cerevisiae</i> transformada con el plásmido pYES2 ATF1 Zeo.	Este trabajo
BY4741 Tándem-LORE-Zeo	<i>S. cerevisiae</i> con el elemento LORE duplicado en la región promotora de ATF1 (Zeo ^R).	Este trabajo
BY4741 ATF1-18S-Zeo (17)	<i>S. cerevisiae</i> recombinante, en donde el gen ATF1 está fusionado con el gen ADNr 18S (Zeo ^R).	Este trabajo
BY4741 ATF1-18S-Zeo (75)	<i>S. cerevisiae</i> recombinante con la fusión ATF1-18S (Zeo ^R).	Este trabajo

1.2. Medios de cultivo

Los medios de cultivo y/o sus componentes se adquirieron de los laboratorios Dibco y Golden Bell (Dextrosa) y se describen a continuación.

1.2.1. Medio Luria Bertani (LB)

Medio LB	
Peptona de caseína	10 g
NaCl	5 g
Extracto de levadura	5 g
Agar bacteriológico	15 g

La concentración de los compontes es para 1 litro de agua destilada. Es posible preparar caldo y agar, y la diferencia entre ellos es la adición de agar bacteriológico a la solución.

1.2.2. Medio YPD

1.2.2.1. Medio YPD 2%

Medio YPD 2%	
Extracto de levadura	10 g
Peptona de caseína	20 g
Agar bacteriológico	20 g
Glucosa	20 g

Para la preparación de 1 litro de medio YPD con glucosa al 2%, se pesaron los componentes (el agar bacteriológico únicamente cuando se deseó preparar medio sólido) y se disolvieron en 900 mL de agua destilada. La solución se esterilizó durante 15 minutos, 15 libras de presión y 121°C.

Se preparó y esterilizó por separado una solución de glucosa al 20% (% p/v). Posteriormente, se adicionaron 100 mL de glucosa al medio YPD para una concentración final de 2 g/L.

1.2.2.2. Medio YPD 20% adicionado con sulfato de amonio

Para la preparación del medio para la fermentación, se utilizó la misma concentración de los componentes que para el medio YPD 2%, pero estos se disolvieron en 600 mL de agua destilada y se adicionó 1 g/L de sulfato de amonio.

A la par, se preparó una solución de glucosa al 50% (% p/v). Una vez estériles, se adicionaron 400 mL de glucosa al YPD para una concentración final de 20%.

1.2.3. Medio YP Fructosa 8%-Galactosa 2% (YPF8%-G2%)

El medio para la inducción de la expresión del gen *ATF1* bajo el control del promotor *GAL1* se preparó igual que el medio YPD 2%, pero a diferencia de este último, los compuestos se disolvieron en 500 mL de agua destilada.

Se prepararon por separado soluciones de fructosa y galactosa al 20%, y se adicionaron 400 y 100 mL de los azúcares, a la solución inicial, para una concentración final de 8% de fructosa y 2% de galactosa.

1.3. Antibióticos

Para la selección de las cepas de *E. coli* JM101 transformadas se utilizó ampicilina a una concentración final de 100 µg/mL. En la transformación con plásmidos Ap^R, Zeo^R, se utilizó la mezcla ampicilina-zeocina, a concentraciones finales de 100 µg/mL y 25 µg/mL, respectivamente.

Para la selección de las transformantes de *S. cerevisiae* se utilizó zeocina a una concentración de 200 µg/mL.

Almacenamiento de cepas

Para la preparación de los viales para el almacenamiento de las cepas de *E. coli* JM101 y *S. cerevisiae* BY4741 se utilizó glicerol y los respectivos medios de cultivo. La preparación consistió en recuperar las células de cultivos crecidos toda la noche, para después re-suspenderlas en el medio de cultivo correspondiente (800 µL) más 200 µL de glicerol. Los micro-tubos se almacenaron en el ultra-congelador a - 80°C.

2. MÉTODOS

2.1. Diseño de los oligonucleótidos para la amplificación por PCR de los genes de interés

Se realizó la búsqueda de la secuencia de los genes *ATF1* y 18S ADNr en la base de datos del genoma de *Saccharomyces* (*Saccharomyces* Genome Database SGD; www.yeastgenome.org) para diseñar los oligonucleótidos que se utilizaron para la amplificación de los genes *ATF1* y 18S ADNr. Como molde para el diseño se utilizó la secuencia de la cepa de referencia S288C.

Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Integrated DNA Technologies.

La longitud de estos fue de 25 nucleótidos. También el contenido de GC se consideró (aproximadamente 50%). Así mismo, la temperatura de alineamiento entre los parejas de oligos no difirió significativamente ($\pm 5^{\circ}\text{C}$). Para estimar estos parámetros se empleó la herramienta “OligoAnalyzer” de la página de Integrated DNA Technologies (IDT).

Por último, los sitios de restricción *SaI* se incluyeron para facilitar el proceso de sub-clonación. En la Tabla 8, se describen los oligonucleótidos y sus características.

Tabla 8. **Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de *ATF1* y 18S ADNr.**

Oligo ^a	Secuencia (5'-3') ^b	T _m (°C)	% GC	Enzima	Región
O1 F	AGATCACGTGCAAACCGAAGAAATG	58.0	44	-	414 pb río arriba – LORE
O1 R	TTTC <u>GTCGAC</u> CGAATTTTGTGGGTTGGC	53.3	45	<i>SalI</i>	
O2 F	TCTT <u>GTCGAC</u> GCCAACCCAACAAAAATTCG	53.3	45	<i>SalI</i>	LORE a región terminadora de <i>ATF1</i>
O2 R	CGAGGATATGCACACAAGGTTCCAA	59.1	48	-	
O3 F	CTGCCAGTAGTCATATGCTTGTCTC	57.1	48	-	Marco de lectura abierto 18S ADNr
O3 R	GTCCAAATTCTCCGCTCTGAGATGG	59.3	52	-	

^a Se indica el nombre del oligonucleótido y la orientación: directo (F), reverso (R).
^b Se indica subrayado el sitio de restricción para utilizarse en la subclonación.

2.2. Extracción de ADN total de levaduras

El aislamiento de ADN de levaduras se modificó del método reportado por (Philippson *et al.*, 2004) y consistió en lo siguiente:

- 1) Un tubo con 3 mL de medio YPD 2% se inoculó con la cepa de la levadura y se incubó toda la noche a 30°C con agitación constante.
- 2) El cultivo se cosechó en tubos eppendorf de 1.5 mL, centrifugando a 13,200 rpm por 1 min y descartando el sobrenadante.
- 3) Las células se resuspendieron en 200 µl de buffer de lisis (tritón 2%; SDS 1%; NaCl 100mM; Tris-HCl pH 8.0, 10 mM; EDTA pH 8.0, 1mM) recién preparado.
- 4) 0.3 g de perlas de vidrio estériles (aproximadamente 8 perlas) y 200 µL de la mezcla fenol:cloroformo 1:1 se adicionaron a la suspensión. La solución se mezcló en vórtex a alta velocidad durante 1 min.
- 5) La mezcla se centrifugó a 13,200 rpm por 5 min y se transfirió la fase acuosa a un nuevo microtubo. Nuevamente, 200 µL de la mezcla fenol:cloroformo 1:1 se adicionaron, se mezcló, y se centrifugó y posteriormente, la fase acuosa se llevó a un tubo eppendorf nuevo.
- 6) 500 µL de la mezcla etanol-isopropanol 60/40 (v/v) se adicionaron, se mezcló muy bien por inmersión y se incubó en hielo por al menos 15 min.
- 7) Se centrifugó a 13,200 rpm durante 5 min, se decantó el sobrenadante y la pastilla se lavó en tres ocasiones con 500 µL de etanol al 70% (v/v).

- 8) Posteriormente, la mezcla se centrifugó a 13,200 rpm durante 3 min, se descartó el sobrenadante y la pastilla se secó a 37°C durante 8 min. El ADN se re-suspendió en 50 µL de agua destilada estéril.
- 9) Por último, se adicionaron 3 µL de RNasa (Promega) y se incubó el ADN a 37°C durante 30 min.

2.3. Aislamiento de ADN plasmídico de bacterias

El aislamiento de ADN plasmídico presente en la cepa estándar JM101 se realizó empleando el método de lisis alcalina que a continuación se describe (Birnboim y Doly, 1979).

- 1) La bacteria se creció en 3 mL de CLB durante 12 a 18 h a 30°C con agitación constante.
- 2) El cultivo se cosechó en tubos eppendorf de 1.5 mL, mediante centrifugación a 13,500 rpm, durante 1 min a temperatura ambiente. El sobrenadante se decantó y se obtuvo el sedimento. Este proceso se repitió hasta centrifugar los 3 mL de cultivo.
- 3) La pastilla se resuspendió en 150 µL de solución STE (Sacarosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 10 mM pH 8.0); 10 µL de lisozima (40 mg/mL) se adicionaron y se mezcló suavemente. La muestra se incubó por 10 min a 37°C.
- 4) Posteriormente, 250 µL de una solución de lisis recién preparada (NaOH 0.2 N, SDS al 1%) se adicionaron y la mezcla se mezcló por inversión; se incubó por 15 min a 4°C.
- 5) 150 µL de acetato de sodio 3 M pH 4.8 (acetato de sodio y ácido acético glacial) se añadieron, se mezcló suavemente invirtiendo el tubo varias veces y se incubó 10 min a 4°C.
- 6) A continuación, la muestra se centrifugó a 13,200 rpm por 2 min.
- 7) Se adicionaron 150 µL de la mezcla fenol:cloroformo 1:1, se mezcló por un 1 min en vórtex y se centrifugó por 7 min a 13,200 rpm.
- 8) El sobrenadante se recuperó en un nuevo tubo con la ayuda de una micropipeta y se adicionaron 700 µL de la mezcla etanol absoluto/isopropanol 60/40 (v/v); la mezcla se mantuvo por 15 a 20 minutos a 4°C y se centrifugó por 1 min a 13,200 rpm.

- 9) El sobrenadante se decantó y la pastilla fue sometida a 2 lavados con 500 μ L de etanol al 70% (v/v), centrifugando a 13,200 rpm por 5 min en cada lavado. A continuación se dio un pulso en la centrifuga y el sobrenadante se retiró empleando una micropipeta.
- 10) La pastilla se secó a 37°C durante 7 min o hasta que no se percibiera el olor a etanol y se re-suspendió en agua destilada estéril (50 μ L).
- 11) El plásmido se incubó con 3 μ L de RNasa (100 μ g/ μ L), durante 30 min a 37°C.
- 12) Las muestras fueron almacenadas a 20°C previo corrimiento electroforético.

2.4. Electroforesis de ácidos nucleicos en geles de agarosa

Las diferentes muestras de ADN aislado se sometieron a un corrimiento electroforético. Para ello se prepararon geles de agarosa (USB) al 1 y 1.5% (p/v) en amortiguador TAE 1X [Tris-acetato 0.04 M y EDTA (ácido etilen-diamino-tetra-acético) 0.001 M, pH 8.0]. El gel se depositó en una cámara de electroforesis horizontal con el mismo amortiguador. La muestra de ADN se mezcló con 2 μ L de amortiguador de carga (azul de bromofenol al 0.05%, EDTA 0.1 M pH 8.0, SDS 0.5%, sacarosa 40%) o (azul de bromofenol 0.25% y xilencianol FF 0.25% en solución de glicerol al 30%) y se descargó en los orificios del gel. La cámara se conectó a una fuente de poder (BioRad) y se sometió a un voltaje constante de 110 a 130 voltios durante 30 a 60 min. Como marcador de tamaño molecular se utilizó el ADN del fago lambda digerido con las endonucleasas de restricción *HindIII* y *HindIII/EcoRI*. El gel se tiñó con una solución de bromuro de etidio al 0.2% durante 10 min. El ADN con el bromuro intercalado se observó en un transiluminador de luz UV de onda corta (fotodocumentador Vilbert Loumart).

2.5. Aislamiento de ADN de geles de agarosa

Para la obtención, concentración y/o purificación (remoción de agarosa, nucleótidos, proteínas como ADN polimerasa, enzimas de restricción, cinasas o sales) de los fragmentos empleados en las reacciones de ligación se empleó el kit comercial “Wizard SV Gel and PCR Clean-Up System” de Promega, de acuerdo a las instrucciones del proveedor.

2.6. Preparación de células de *E. coli* electrocompetentes

En la preparación de células electrocompetentes de *E. coli* JM101, primeramente se creció un pre-inóculo toda la noche (12 a 18 h) en 3 mL de caldo LB (CLB), a 37°C con agitación constante. Posteriormente, con las células se inocularon 250 mL de CLB contenidos en un matraz de 1 L y se crecieron a 37°C, con agitación constante, durante 4 h aproximadamente, hasta una D.O.₆₀₀ de 1 a 1.2.

A continuación, se detuvo el crecimiento celular por medio del enfriamiento del cultivo en hielo por 15 min. Cabe resaltar que en todos los pasos posteriores, las células se mantuvieron en una cadena de frío a 4°C.

El cultivo se distribuyó, en condiciones estériles, en tubos falcon de 50 mL y se cosechó a 4°C, por 10 min a 5500 rpm. El sobrenadante se decantó y desechó. Las células se re-suspendieron en 40 mL de agua destilada estéril fría con ayuda de un vórtex y se centrifugaron a 4°C, por 10 min a 5500 rpm. Este procedimiento recibe el nombre de lavado y se realizó para concentrar las células y reducir la conductividad del cultivo. Posteriormente se llevó a cabo un segundo lavado con 20 mL de agua destilada estéril.

Se realizó un tercer lavado con 20 mL de glicerol 10% (v/v) estéril y previamente enfriado. Se añadió 1 mL de glicerol frío al 20% (distribuido entre los tubos); las células se re-suspendieron y se prepararon alícuotas de 100 µL en tubos de microcentrífuga de 1.5 mL. Las alícuotas se utilizaron directamente para la transformación o fueron almacenadas a -80°C.

2.7. Transformación de *E. coli* por electroporación

El procedimiento fue el siguiente: una alícuota de células competentes de *E. coli* JM101 se combinó con la mezcla de ligación de ADN. Posteriormente, la mezcla se transfirió a una celda de electroporación (0.1cm, BioRad) previamente enfriada en hielo y después se colocó entre los electrodos de la cámara del electroporador (Micro pulser BioRad). Se dio un pulso eléctrico de 1.8 kV durante 4-5 ms y se transfirieron las células a 1 mL de LB; las bacterias se dejaron recuperar por 1 h a 30°C en agitación constante. Al final, las células se distribuyeron (100 a 500 µL) en placas de LB con el antibiótico de selección.

2.8. Tratamientos enzimáticos del ADN

2.8.1. Restricción con endonucleasas

El ADN plasmídico se digirió empleando una unidad de enzima de restricción (Promega o Invitrogen) por μg de ADN en la solución amortiguadora correspondiente. La mezcla se incubó a 37°C por un mínimo de 4 h o toda la noche. A continuación, se realizaron los corrimientos electroforéticos correspondientes para determinar el tamaño de los fragmentos obtenidos.

Este procedimiento se realizó para el análisis de la presencia y orientación del inserto de ADN en el vector, así como para la obtención de los fragmentos de interés para la subclonación y la transformación.

2.8.2. Ligaciones del ADN

2.8.2.1. Clonación de los productos de PCR en vectores

Los productos se ligaron en los vectores pGEM-T Easy y pJET1.2/blunt, empleando a la enzima ADN ligasa del fago T4 (Promega y Fermentas).

Los amplificones O1F-O1R y 18S ADNr se clonaron en pJET1.2/blunt, empleando el protocolo para clonación de extremos romos recomendado por el proveedor, con 25 ng del vector de clonación. Para obtener la mayor cantidad de transformantes posibles, el tiempo de incubación se extendió hasta 30 min. La mezcla de ligación se empleó directamente para la transformación de bacterias competentes.

Por su parte, los productos de PCR O2F-O2R y O1F-O2R se clonaron en pGEM-T Easy; previo a la clonación, los amplicones se adenilaron siguiendo la metodología recomendada (Promega); la reacción se incubó a 70°C en un termociclador MultiGene (Labnet International). La mezcla de ligación se incubó durante tres días a 4°C y se transformó a células competentes JM101. La selección de las transformantes se realizó en cajas de LB Ap/X-Gal/IPTG (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$, respectivamente). El gen *lacZ α* del vector permitió la identificación de las cepas recombinantes por medio de la selección azul/blanca en la cepa JM101.

Los genes clonados en ambos vectores fueron secuenciados, por el Langebio, del Cinvestav Irapuato, Guanajuato.

2.8.2.2. Subclonación para la construcción de casetes para la transformación de *S. cerevisiae* BY4741

Para las reacciones de subclonación, se liberó y purificó el inserto del vector parental, se ligó el inserto en el vector receptor en una proporción aproximada de 5:1 y se transformaron células competentes de bacterias con esta reacción de ligación.

Cuando los plásmidos receptor y parental se digirieron con la misma endonucleasa, el vector se desfosforiló para reducir la posibilidad de auto-ligación debida a los extremos compatibles (la remoción de los fosfatos 5' puede prevenir que la ADN Ligasa T4 recirculice el vector). La metodología fue la siguiente:

1. Se preparó la siguiente mezcla de reacción

Componente	Concentración
Plásmido receptor linearizado	~ 1µg
Fosfatasa Alcalina de Camarón (SAP) 1un/µL usb	1 unidad
Buffer de reacción 10X Fosfatasa Alcalina de Camarón usb	1X
Agua destilada estéril	N.A. (c.b.p. 10 µL)
N.A. no aplica	

2. La reacción se incubó por 30 min a 37°C. Posteriormente, la fosfatasa se inactivó a 65°C por 15 min.
3. El plásmido receptor se purificó y se llevó a cabo la ligación con el fragmento liberado del vector parental.

2.8.3. Amplificación por PCR

La amplificación se realizó con diversos propósitos: para amplificar los genes de interés, para analizar las construcciones y para verificar el genotipo de las transformantes. A continuación se detalla cada uno de ellos.

2.8.3.1. Amplificación de los genes *ATF1* y 18S

La amplificación por PCR de las diferentes regiones del gen *ATF1* así como del gen 18S ADN_r, se hizo utilizando el ADN genómico de *S. cerevisiae* UMARN3 como molde y a la enzima ADN polimerasa *Pfx* Platinum (Invitrogen). La polimerasa posee actividad correctora exonucleasa 3'-5', por lo que no adenila los amplificones.

Los parámetros de la amplificación se describen en las Tablas 9 y 10. Una vez completados los ciclos, las reacciones fueron sometidas a una electroforesis para verificar la correcta amplificación del gen.

Tabla 9. **Condiciones de amplificación ADN polimerasa *Pfx* Platinum.**

Desnaturalización inicial	94°C	5 minutos	
Desnaturalización	94°C	40 segundos	
Hibridación (alineamiento)	42°C	35 segundos	} 30 ciclos
Extensión	68°C	1 minuto por kb	
Extensión final	68°C	5 minutos	
	4°C	∞	

Tabla 10. **Mezcla de reacción ADN polimerasa *Pfx* Platinum.**

Componente	Volumen (μL)	Concentración final
10X <i>Pfx</i> Buffer de Amplificación (Invitrogen)	2.5	1X
Mezcla de dNTPs 10 mM (Promega)	0.1875	0.3 mM cada uno
MgSO ₄ 50 mM (Invitrogen)	0.5	1 mM
Enhancer 10X (Invitrogen)	1.25	0.5X
Oligonucleótido directo (10 pm/μL)	4.5	45 pm
Oligonucleótido reverso (10 pm/μL)	4.5	45 pm
ADN molde	N.A.	~ 100 ng
Agua destilada estéril	c.b.p. 25 μL	N.A.
ADN Polimerasa <i>Pfx</i> Platinum	0.2	0.5 unidades
N.A. no aplica		

2.8.3.2. Verificación de las construcciones

Los casetes construidos se verificaron mediante PCR, empleando el ADN plasmídico como molde para la amplificación y a la enzima *Taq* polimerasa (Promega). La amplificación se llevó a cabo en un termociclador Mastercycler personal Eppendorf. En las Tablas 11 y 12 se describen las condiciones y la mezcla de reacción empleadas para la amplificación.

Tabla 11. Condiciones de amplificación ADN *Taq* polimerasa.

Desnaturalización inicial	95°C	2 minutos	} 30 ciclos
Desnaturalización	94°C	40 segundos	
Hibridación (alineamiento)	42°C	35 segundos	
Extensión	72°C	1 minuto por kb	
Extensión final	72°C	5 minutos	
	4°C	∞	

Tabla 12. Mezcla de reacción ADN *Taq* polimerasa.

Componente	Volumen (μL)	Concentración final
10X PCR Buffer de Reacción –MgCl ₂ (Invitrogen)	2.5	1X
Mezcla de dNTPs 10 mM (Promega)	0.5	0.2 mM cada uno
Solución MgCl ₂ 50 mM (Invitrogen)	0.5	1 Mm
Oligonucleótido directo (10 pm/μL)	4.5	45 pm
Oligonucleótido reverso (10 pm/μL)	4.5	45 pm
ADN molde	1-2 μL	~ 100 ng
Agua destilada estéril	c.b.p. 25 μL	N.A.
ADN Polimerasa <i>Taq</i>	0.1 μL	0.5 unidades
N.A. no aplica		

2.8.3.3. Verificación del genotipo de las transformantes de BY4741

La amplificación también se realizó como evidencia de la modificación del genoma de *S. cerevisiae* BY4741, presumiblemente por recombinación homóloga. La reacción utilizó el ADN total de las levaduras transformantes (Zeo^R) como molde y parejas de oligonucleótidos indicadas en el texto. Las condiciones de amplificación y la mezcla de reacción se indican en las Tablas 9 y 10.

Para la verificación de la duplicación del elemento LORE se utilizó una temperatura de alineamiento de 50°C y un tiempo de extensión de 4.5 min a 68°C. En las transformantes de *S. cerevisiae* *ATF1*-18S se utilizó un tiempo de extensión de 5 min.

2.9. Cinética de crecimiento *S. cerevisiae* BY4741

La metodología seguida para realizar la curva de crecimiento de las levaduras fue la siguiente.

1. A partir de un vial de células de *S. cerevisiae* BY4741 almacenadas en el ultracongelador (preservadas en glicerol 20% v/v) se tomaron 15 μ L para inocular 3 mL de YPD 2% contenidos en un tubo de vidrio. Las levaduras se incubaron a 30°C en agitación constante durante 15 horas.
2. Posteriormente, se tomaron 800 μ L del cultivo anterior para inocular 40 mL de YPD 2% (proporción 1:50) contenidos en un matraz bafleado de 500 mL.
3. El cultivo se creció a 30°C en agitación constante (150 rpm).
4. Se tomó muestra cada 2 horas para medir la D.O._{600nm} y para determinar el número de células/mL (hemocitómetro) y el porcentaje de células viables (prueba de exclusión de azul de tripano).

2.10. Determinación de la viabilidad celular mediante la prueba de exclusión del azul de tripano

El azul de tripano se empleó para determinar el número de células viables presentes en una suspensión celular mediante la diferencia en la coloración del citoplasma (el citoplasma corresponde a células no viables) (Colligan *et al.*, 1991).

El procedimiento empleado fue el siguiente: el cultivo se mezcló perfectamente y se realizó una dilución 1:10 con solución salina al 0.9%. Posteriormente, 90 μ L de la solución se mezclaron con 10 μ L de azul de tripano y se llevó a cabo el conteo en un hemocitómetro. El número de células/mL se determinó empleando la siguiente fórmula:

$$\frac{\# \text{ células}}{\text{mL}} = \frac{\# \text{ células contadas}}{5(4 \times 10^{-6}) \text{ mL}}$$

Mientras que el porcentaje de células viables se calculó

$$\% \text{ de células viables} = \frac{\frac{\# \text{ células viables}}{\text{mL}}}{\frac{\# \text{ total de células}}{\text{mL}}}$$

2.11. Transformación de *S. cerevisiae*

2.11.1. Preparación de células competentes

Para iniciar el crecimiento de las levaduras, se siguieron los pasos 1 y 2 de la cinética de crecimiento (apartado 2.9). Posteriormente, se crecieron las células a 30°C, 150 rpm, durante 5:45 h a 6 h hasta alcanzar una D.O._{600 nm} ~0.67 a 0.730.

A continuación, 1 mL de células se cosechó a temperatura ambiente, a 13,200 rpm por 2 min y se eliminó el sobrenadante. A continuación, 1 mL de solución EZ 1 se adicionó (precalentada a 30°C) para lavar la pastilla, se cosecharon las células y se desechó el sobrenadante. Por último, 100 µL de solución EZ 2 (precalentada a 30°C) se agregaron para re-suspender la pastilla y se prepararon las alícuotas de células competentes.

Cabe resaltar que el protocolo se puede escalar manteniendo la proporción de las soluciones sin pérdida de eficiencia.

2.11.2. Transformación

Para la transformación, 50 µL de células competentes (recién preparadas) se mezclaron con 0.1-5 µg de ADN (en un volumen menor de 5 µL), 500 µL de la solución EZ 3 (precalentada a 30°C) se adicionaron y la reacción se mezcló a fondo.

Posteriormente, la reacción se incubó a 30°C durante 90 min. Durante este período se realizaron homogenizaciones en lapsos de 30 min.

Por último, 200 µL de las células se distribuyeron en cajas de YPD 2% (pH 7) con el antibiótico de selección (zeocina 200 µg/mL) y se incubaron a 30°C durante 3 días para permitir el crecimiento de las transformantes.

En la transformación con los plásmido 2-µ (pYES2-Zeo y pYES2-ATF1-Zeo), se utilizaron concentraciones de ADN entre 400 y 600 ng. Para transformación integrativa se utilizaron concentraciones desde 100 ng hasta 5 µg.

2.12. Determinación de ésteres totales

Los ésteres reaccionan cuantitativamente con la hidroxilamina, en un medio alcalino, para formar ácido hidroxámico, que después de la acidificación forma un complejo coloreado con los iones de hierro. La concentración de ésteres es proporcional a la absorbencia

medida a 525 nm (Molina-Ubeda, 2000). La prueba es positiva cuando se observa una coloración borgoña intenso, magenta o marrón-rojizo (Pavia *et al.*, 2012) (Figura 7).

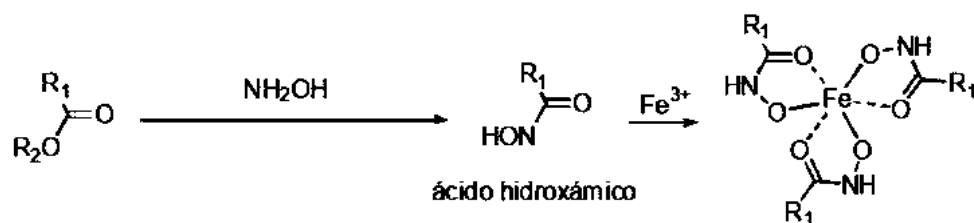


Figura 7. **Reacción colorimétrica para la identificación de ésteres totales** (Molina-Ubeda, 2000).

Las soluciones empleadas fueron las siguientes

- Ácido clorhídrico (HCl) 4 M se diluyeron 33.3 mL de HCl (J.T. Baker) a 100 mL con agua destilada en un matraz aforado.
- Disolución de cloruro férrico 0.37 M, se disolvieron 10 g de cloruro férrico hexahidratado ($\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$) (Meyer) en 80 mL de agua destilada estéril, contenido en un matraz aforado de 100 mL. Se añadieron 2.5 mL de HCl 4 M y se aforó el volumen con agua destilada.
- Disolución de clorhidrato de hidroxilamina 2 M ($\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$), en un matraz aforado de 100 mL de colocaron 13.92 g de $\text{NH}_2\text{OH} \cdot \text{HCl}$ (Sigma-Aldrich), se disolvieron y se completo el volumen con agua destilada estéril. Se conservo en refrigeración.
- Disolución de hidróxido de sodio 3.5 M (NaOH), se disolvieron 14 gr de NaOH (Merck) en 80 mL de agua destilada colocada en un matraz aforado de 100 mL. Cuando la solución se enfrió, se completo el volumen con agua.

Procedimiento

1. Se crecieron las levaduras en condiciones fermentativas.
2. Se tomó una muestra de 800 μL de los cultivos de las transformantes y se colocó en un microtubo estéril. Se centrifugó a 13,200 rpm por 3 minutos y se tomaron 500 μL del sobrenadante para continuar con el análisis.
3. En un tubo de ensaye se colocó la muestra, se añadieron 334 μL de la solución de clorhidrato de hidroxilamina y 334 μL de hidróxido de sodio. Se tapó muy bien el tubo y se mezcló vigorosamente en el vórtex.

4. La disolución se dejó reposar durante 10 minutos.
5. Se añadieron 334 μL de ácido clorhídrico y 334 μL de la solución de cloruro férrico.
6. Se agitó nuevamente y se leyó la absorbencia a la longitud de onda de 525 nm, empleando como blanco agua destilada estéril sometida al mismo procedimiento que las muestras.
7. Para determinar la relación entre $\text{D.O.}_{525\text{nm}}$ y concentración de ésteres, se preparó una solución patrón de acetato de etilo (reactivo de análisis) a la concentración de 2 g/L. De la solución anterior, se prepararon diluciones para una concentración final de 25, 50, 100, 200, 400, 800, 1000 y 1200 mg/L.
8. Se operó como se ha indicado para las muestras de las células y se expresó la concentración de ésteres de la muestra en miligramos de acetato de etilo por litro.

2.13. Fermentación

2.13.1. Fermentación con la fuente de carbono inductora

La metodología seguida fue la siguiente:

1. Las cepas se sembraron en cajas de YPD 2% con y sin el antibiótico de selección, dependiendo del fondo genético.
2. Se inocularon 3 mL de YPD 2% con las levaduras y se incubaron a 30°C, por aproximadamente 10 horas, en agitación constante.
3. Se midió la $\text{D.O.}_{600\text{nm}}$ del cultivo y se hicieron los cálculos para inocular 14 mL de medio de fermentación (YPF8%-G2%), contenidos en tubos de vidrio, empleando la siguiente fórmula:

$$\text{Volumen del inóculo} = \frac{1.4}{\text{D.O.}_{600\text{nm}} \text{inóculo}}$$

4. Se crecieron las células a 30°C en agitación constante y se midió el crecimiento mediante espectrofotometría ($\text{D.O.}_{600\text{nm}}$) y los ésteres totales con la reacción colorimétrica determinada en el apartado 2.12.

2.13.2. Determinación de los parámetros fermentativos y la producción de compuestos organolépticos

Una fermentación se realizó y a partir de ella se hicieron los análisis mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) y cromatografía de gases (CG-FID). A partir

de los datos generados mediante las separaciones cromatográficas, se determinaron los parámetros fermentativos: a) eficiencia teórica de producción de etanol, b) velocidad máxima de consumo de glucosa, c) producción máxima de etanol, e) velocidad específica de crecimiento y f) determinación de compuestos mayoritarios producidos en la fermentación alcohólica.

A continuación se describe el procedimiento.

1. Con las cepas recién sembradas en caja con el antibiótico de selección (cuando se requiera), se inocularon 50 mL de YPD 2% contenidos en un matraz de 250 mL. Las células se incubaron a 30°C, 150 rpm, durante 10-12 horas.
2. Cumplido el tiempo, se determinó el crecimiento de los inóculos y se calculó el volumen necesario para inocular 100 mL de medio (relación $C_1V_1=C_2V_2$, D.O._{600nm} inicial teórica de 0.1). Las células se cosecharon y se re-suspendieron en 5 mL de YPD 20% (enriquecido con sulfato de amonio a una concentración final de 1 g/L), con los cuales se inocularon frascos de vidrio (dimensiones aproximadas altura 14.85 cm, base posterior 5 cm, abertura superior 3.4 cm, cubiertos con una torunda de gasa-algodón), los cuales contenían 95 mL de YPD 20% enriquecido con sulfato de amonio.
3. Las células se incubaron a 30°C sin agitación, únicamente se realizó una homogenización manual cada 4 horas.
4. A intervalos específicos de tiempo se midió el crecimiento celular (D.O._{600nm}), la concentración de ésteres totales (reacción colorimétrica a una D.O._{525nm}), consumo de glucosa-producción de etanol mediante cromatografía líquida (HPLC) y la identificación y cuantificación de los compuestos mayoritarios mediante cromatografía de gases (CG-FID).

Se enriqueció el medio de fermentación con sulfato de amonio debido a que se ha reportado que la deficiencia de nitrógeno limita el crecimiento de las levaduras y por lo tanto disminuye la velocidad de fermentación (Agenbach, 1977; Ingledew y Kunkee, 1985; Monteiro y Bisson, 1992; Fleet y Heard, 1993; Henschke y Jiranek, 1993; Jiranek *et al.*, 1995; Spayd *et al.*, 1995); además de que las sales de amonio (NH_4^+), son una fuente de nitrógeno metabólicamente disponible para las levaduras (Fugelsang y Edwards, 2007). La concentración se estimó en base a lo reportado para la fermentación del mosto de Agave (*A. tequilana* Weber) (Arrizon y Gschaedler, 2002).

2.13.2.1. Análisis mediante HPLC

La producción de etanol y el consumo de azúcares de las cepas se determinaron mediante cromatografía líquida (HPLC; Varian), empleando un detector de índice de refracción (Perkin-Elmer). Las muestras de la fermentación se separaron con una columna Aminex HPX-87Ca (Bio-Rad). Las condiciones de operación fueron las siguientes: temperatura de la columna, 80°C y agua desionizada (filtrada con un filtro MILLIPORE 0.22 µm y desgasificada al vacío) como fase móvil.

La cuantificación se realizó a partir de los datos generados en la curva de calibración de glucosa-etanol.

2.13.2.1.1. Condiciones de operación para el análisis de muestras mediante HPLC

Las condiciones para el acondicionamiento de la columna y análisis de la muestra fueron las siguientes:

1. Se precalentó la columna a la temperatura de corrida (80°C).
2. Se inició la corrida con el programa de inicio (0.2 mL/min 2 minutos, 0.3 mL/min 5 min, 0.4 mL/min 10 minutos, 0.5 mL/min 15 minutos, 0.6 mL/min 20 minutos, 0.7 mL/min 25 minutos, 0.7 mL/min 120 minutos; estabilizar al menos 15 minutos a 0.7 mL/min).
3. Para la separación del etanol y la glucosa se utilizó una elución isocrática (un solo disolvente de composición constante) con agua desionizada, filtrada (0.2 µm) y desgasificada al vacío. El análisis de cada muestra se realizó con el método de corrida (0.7 mL/min 20 minutos).
4. Para finalizar sin parar la bomba, se apagó el horno y se corrió el programa de terminación (0.7 mL/min inicial, 0.6 mL/min 2 min, 0.4 mL/min 5 minutos, 0.3 mL/min 10 minutos, 0.2 mL/min 15 minutos, 0.15 mL/min 20 minutos, 0.10 mL/min 25 minutos, 0.00 mL/min 60 minutos).

Procesamiento de la muestra para HPLC

1. A partir de las muestras de la fermentación, se realizó una dilución 1:10 del extracto libre de células en la fase móvil y se filtró la muestra (filtro de 0.2 µm).

2.13.2.1.2. Curva de calibración de glucosa y etanol

Para la cuantificación de la glucosa y el etanol, se realizaron curvas de calibración, las cuales permitieron correlacionar el área bajo la curva de las muestras problema con la concentración de los metabolitos.

Para la elaboración de la curva, se prepararon soluciones con concentraciones crecientes de glucosa-etanol (Golden Bell y J.T. Baker, respectivamente): 0.125%, 0.25%, 0.5%, 1% y 2% (todos % p/v) (López-Alvarez *et al.*, 2012) y se cuantificaron mediante HPLC, con el método descrito anteriormente. En la regresión lineal, se obtuvo un coeficiente de correlación lineal (R^2) de 0.99.

En la Figura 8, se observa el empalme de los cromatogramas obtenidos mediante HPLC de las soluciones de glucosa y etanol de la curva de calibración. Se aprecia que el incremento en el área fue proporcional al aumento en la concentración, por lo tanto, entre los límites de concentración empleados, la respuesta del detector fue lineal para ambos analitos.

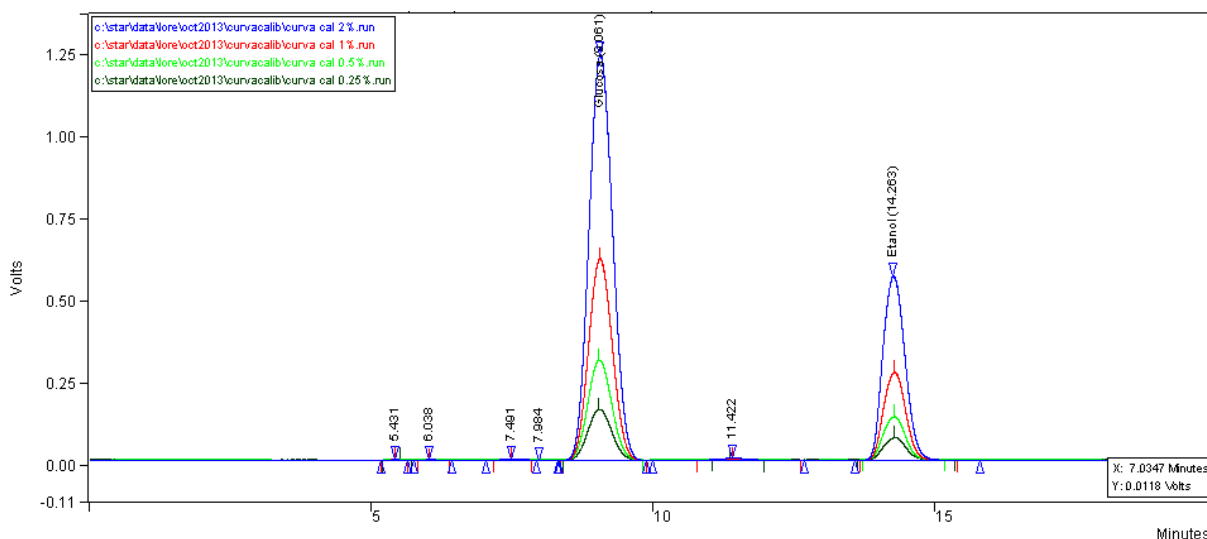


Figura 8. **Cromatografía líquida para la determinación de glucosa y etanol.** Se prepararon una serie de diluciones patrón de glucosa-etanol con las concentraciones esperadas durante la fermentación. La separación y cuantificación se realizó mediante cromatografía líquida (HPLC), con un detector de índice de refracción y una columna Aminex HPX-87Ca, empleando el método descrito en materiales y métodos.

2.13.2.2. Análisis de compuestos organolépticos producidos durante la fermentación mediante cromatografía de gases (CG-FID)

Para determinar la producción de ésteres y compuestos mayoritarios durante la fermentación, se siguió el procedimiento descrito a continuación.

2.13.2.2.1. Extracción líquido-líquido

El procedimiento para la extracción que se empleó se describe a continuación. Primeramente, 10 mL del medio de fermentación se cosecharon por 10 min, 7900 rpm, 4°C. Posteriormente, 5 mL del extracto libre de células se colocaron en un tubo falcon de 50 mL y los compuestos se extrajeron dos veces con 6 mL de diclorometano (Sigma-Aldrich). En la primera extracción se adicionaron 100 µL de 2-pentanol (100 mg/mL de Sigma-Aldrich, en etanol absoluto, de J.T.Baker) para una concentración final de 2 mg/mL.

La mezcla se agitó de manera manual durante 1 min; posteriormente, la solución se vació en un embudo de separación (Aldrich, 50 mL) y se dejó reposar durante 5 minutos para permitir la separación de las fases acuosa y orgánica. A continuación, se recuperó la fase orgánica en un tubo falcon.

Posteriormente, en un baño de agua a 40°C, la solución se evaporó a sequedad. Los compuestos extraídos se recuperaron mediante un lavado de las paredes del tubo con un 1 mL de etanol absoluto-1-pentanol (2 mg/mL de Sigma-Aldrich, modificado de (De León-Rodriguez *et al.*, 2006)). La mezcla se dejó reposar durante toda la noche para maximizar la recuperación de los compuestos.

Las muestras se colocaron en microtubos de 1.5 mL y estos se centrifugaron por 2 minutos a 13,200 rpm. Por último, los compuestos presentes en las muestras se identificaron y cuantificaron mediante GC-FID.

2.13.2.2.2. Identificación y cuantificación de compuestos mediante cromatografía de gases

Las muestras se analizaron inyectando 1 µL en un cromatógrafo de gases 7890A (Agilent technologies), empleando un auto-muestreador y un detector de ionización en llama (FID). Se utilizó helio como gas acarreador y las temperaturas establecidas para el inyector y el detector de ionización en llama fueron 220°C y 230°C, respectivamente. Las condiciones

cromatográficas para la detección de los compuestos mayoritarios fueron: relación de división 10:1 y el programa de temperatura fue 50°C por 5 min, aumentado a 10°C/min hasta 120°C, incremento a 45°C/min hasta 280°C y mantenimiento de esta temperatura para un tiempo final de 22.956 min.

Una columna capilar de polaridad intermedia con selectividad para compuestos polares se utilizó. La columna SUPELCO SPB-20 (Sigma-Aldrich) tiene la habilidad de separar compuestos que forman parte del control de calidad de las bebidas fermentadas (etil acetato, n-propanol, alcohol isobutílico, alcohol isoamílico, metanol, etanol, entre otros) (Sigma-Aldrich).

2.14. Pruebas estadísticas para el análisis de los resultados experimentales

Los datos obtenidos se expresan como la media $\pm$ la desviación estándar. Se realizaron análisis de varianza de una vía y de dos vías, con las pruebas de comparación de medias Dunnett y Bonferroni, respectivamente.

Se realizó el análisis de variancia unilateral cuando se investigó el efecto de los cambios en el genoma (como fuente de variación), sobre la eficacia de producción de ésteres al final de la fermentación.

En cambio, se realizó un ANOVA de dos vías para el análisis de las cinéticas de producción de ésteres y las curvas de crecimiento en condiciones fermentativas. En ambos casos, se evaluó el efecto del tiempo de la fermentación y el tipo de clona recombinante, sobre la respuesta.

Por último, se utilizó la prueba *t* de *Student* para comparar los compuestos mayoritarios producidos durante la fermentación, entre cada una de las clonas integrativas y su fondo genético.

Para realizar los análisis se utilizó el paquete estadístico GraphPad Prism 5.

VII. RESULTADOS

Son diversos los factores que tienen influencia en la formación de ésteres durante la fermentación alcohólica, algunos de los cuales son: la concentración de los substratos, como metil butanol (Calderbank y Hammond, 1994; Younis y Stewart, 2000); el contenido de azúcares totales en medio, expresados como gravedad específica (Palmer y Rennie, 1974); la adición de factores de crecimiento, como zinc o pantotenato; la temperatura, entre otros (Verstrepen *et al.*, 2003b). Sin embargo, con las levaduras de cerveza sobre-expresantes del gen *ATF1*, se demostró que el nivel de expresión del gen es uno de los factores con mayor influencia en la producción de ésteres de acetato durante la fermentación alcohólica (Verstrepen *et al.*, 2003c).

Por lo tanto, para incrementar la expresión del gen *ATF1* y la síntesis de ésteres, se propuso aumentar el número de copias del gen *ATF1* en la cepa haploide de *S. cerevisiae* BY4741, así como modificar el promotor del gen mediante la inserción de una segunda copia del elemento de respuesta a hipoxia LORE en posición tándem.

1. DISEÑO DE OLIGONUCLEÓTIDOS

Para el gen *ATF1*, el diseño consistió en incluir la unidad de transcripción completa, compuesta por las regiones codificante, reguladora, promotora y terminadora, dado que las secuencias localizadas a ambos lados de la región codificadora son importantes para el control de la transcripción y la posterior traducción (Lewin *et al.*, 2008).

1.1. Región 5' UTR

En el gen *ATF1* se identificaron un dominio esencial y un dominio potenciador: residuos -85 a -68 y -244 a -150, respectivamente, involucrados en la activación transcripcional. Debido a que la delección de las secuencias -85 a -68 abolió la expresión del gen reportero (*PHO5*) en condiciones anaerobias y la represión por ácidos grasos insaturados, dicha región se consideró importante para la activación transcripcional del gen *ATF1* (Fujiwara *et al.*, 1999).

Para incluir la región 5' UTR en su totalidad, el oligonucleótido O1F es homólogo a la secuencia de nucleótidos localizada a 414 pares de bases (pb) río arriba del codón de inicio de la traducción del gen *ATF1* (Figura 9).

1.2. Región 3' UTR

En el extremo 3' de una unidad de transcripción se encuentran las señales que dirigen la formación del extremo 3' del ARNm, las cuales son responsables de conducir las actividades acopladas de escisión y poliadenilación (Guo y Sherman, 1996; Proudfoot, 2004). Particularmente en las levaduras, estos elementos son:

- 1) Elemento de eficiencia (EF) rico en UA, cuya función es activar el elemento de posicionamiento (Zhao *et al.*, 1999);
- 2) Elemento de posicionamiento (EP), rico en A, el cual dirige la posición del sitio de escisión y normalmente reside entre el elemento de eficiencia y el sitio poli(A) (Zhao *et al.*, 1999);
- 3) Sitio de poliadenilación (SPA) PyAn (donde Py=pirimidina) (Guo y Sherman, 1996).

En el procesamiento del extremo 3', el dominio carboxilo terminal (CTD) de la subunidad mayor de la ARN polimerasa II (Pol II), tiene una labor fundamental, ya que se encarga de reclutar los factores de escisión y poliadenilación (Proudfoot, 2004; Buratowski, 2005).

Sin embargo, cabe destacar que las señales de poliadenilación de las levaduras son menos conservadas que las señales poli(A) en eucariontes superiores (Guo y Sherman, 1996). Por ejemplo, muchos genes de levadura emplean un grupo de sitios poli(A) río abajo de los EF y EP, en contraste con los genes de animales, en el cual un único sitio poli(A) se encuentra río debajo del EP. Asimismo, los EF y EP son degenerados y redundantes (Zhao *et al.*, 1999). La redundancia de las secuencias podría ser la razón de por qué delecciones o mutaciones en estos motivos, en varios genes de levaduras, únicamente tiene un ligero efecto o no tiene efecto (Egli *et al.*, 1995).

Por otro lado, la pérdida de señales poli(A), podría resultar en la regulación negativa de genes adyacentes a través de una interferencia transcripcional (Greger *et al.*, 2000). Además, la disponibilidad de complejos activos de Pol II podría ser limitada debido a una liberación insuficiente de los extremos de los genes previamente transcritos. Finalmente los transcritos muy largos, generados por la falta de la terminación, podrían ser perjudiciales para la célula (Rondon *et al.*, 2008).

Por lo tanto, debido a que las señales en las levaduras son complejas y a la importancia del adecuado procesamiento del extremo 3' del ARNm, además de que no está reportada

la región terminadora del gen *ATF1*, se realizó una búsqueda manual y se decidió incluir varios elementos “probables” de cada tipo de señal en la región 3' UTR, para evitar los efectos negativos de una terminación inadecuada. En total, se tomaron 944 nt río abajo del marco de lectura abierto (oligonucleótido O2R, Figura 9).

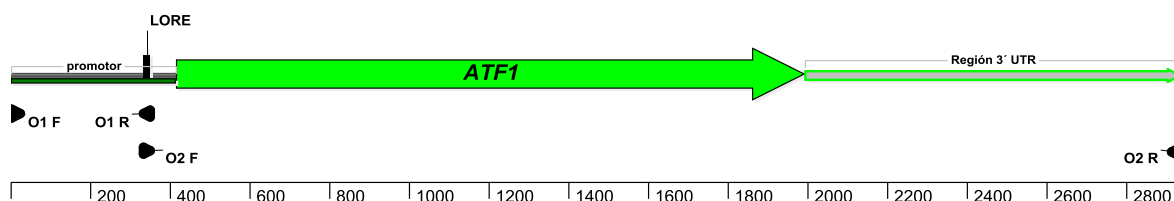


Figura 9. **Oligonucleótidos diseñados para la amplificación de la unidad de transcripción del gen *ATF1* de *S. cerevisiae*.** Se especifican los diversos elementos del gen *ATF1* (promotor, elemento LORE, región codificante y región 3' UTR) y los sitios de hibridación de las parejas de oligonucleótidos (O1F-O1R y O2F-O2R); así mismo, en la línea inferior se muestra el tamaño en nucleótidos (nt) de los elementos de la unidad de transcripción.

En resumen, la pareja O1F-O1R se diseñó para la amplificación de la región promotora del gen hasta el elemento LORE y los oligonucleótidos O2F-O2R para la amplificación de la secuencia comprendida entre el elemento LORE, la región codificante y la región terminadora (Figura 9).

Por otro lado, los oligonucleótidos O3F y O3R, fueron diseñados para la amplificación del gen ribosomal 18S. En la Figura 10, se observa con punta de flecha el sitio de hibridación y la orientación de cada uno de ellos.

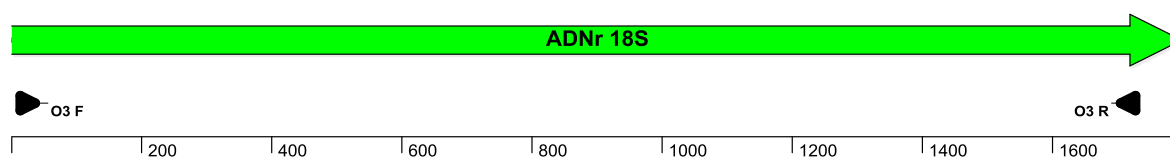


Figura 10. **Esquema del gen ADNr 18S de *S. cerevisiae* y los oligonucleótidos usados para su amplificación.** Se muestran los sitios de hibridación de los oligonucleótidos O3F y O3R y la línea inferior corresponde a la escala en nt.

2. CONSTRUCCIÓN DE LOS CASETES *ATF1*-18S Y TÁNDEM LORE

2.1. Fusión *ATF1*-18S ADNr

La primera estrategia propuesta para incrementar la expresión de *ATF1* fue aumentar el número de copias del gen *ATF1* en el genoma de *S. cerevisiae* BY4741.

La metodología consistió en interrumpir *in vitro* al gen 18S ADNr con el gen *ATF1*, para posteriormente emplear al gen ribosomal (flanqueando al gen *ATF1*) como secuencia homóloga para dirigir la transformación mediante recombinación homóloga, mecanismo que sucede de manera frecuente en *S. cerevisiae* (Wang *et al.*, 2012).

Es importante resaltar que se interrumpió al gen 18S con la unidad de transcripción completa del gen *ATF1*, en donde además de la región codificante, se incluyeron las secuencias reguladoras responsables de la interacción con los factores de transcripción y de terminación de la transcripción.

A continuación se describe la metodología seguida para la construcción del casete.

2.1.1. Amplificación por PCR

Para fusionar al gen ADNr 18S con la unidad de transcripción del gen *ATF1*, ambos genes se amplificaron por PCR, empleando la mezcla de reacción y las condiciones de amplificación descritas en las Tablas 9 y 10. Como ADN molde para la amplificación se utilizó al ADN de *S. cerevisiae* UMARN3.

En la fotografía del gel de agarosa de la Figura 11, se muestra el producto de PCR correspondiente al gen 18S, mientras que el amplifcón de la unidad de transcripción del gen *ATF1* se muestra en el carril 2, panel A, de la Figura 16.

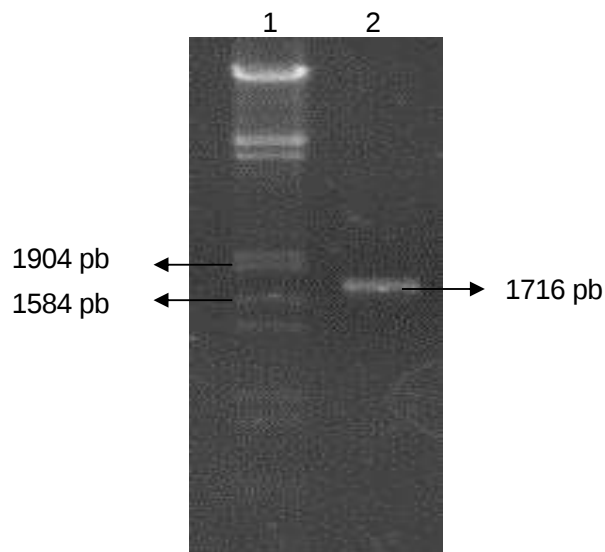


Figura 11. **Amplificación del gen ADNr 18S de *S. cerevisiae* UMARN3.** Fotografía de un gel de agarosa teñido con bromuro de etidio y observado bajo luz UV, en donde se corrió el producto de amplificación del gen ADNr 18S. 1) Marcador de tamaño molecular λ HindIII/EcoRI, 2) producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos O3F y O3R. A la izquierda se indican las bandas del marcador utilizadas como referencia y a la derecha la posición del fragmento amplificado.

2.1.2. Clonación de los productos de PCR

Los productos generados por PCR se ligaron en vectores apropiados (pJET1.2/blunt y pGEM-T Easy) y la reacción se utilizó para electroporar a células competentes de *E. coli*. En todos los casos, la cepa de *E. coli* JM101 se empleó como receptora para la transformación. A partir de las clonas crecidas en agar LB adicionado con ampicilina y zeocina (éste último sólo en el caso de la transformación con los plásmidos Ap^R, Zeo^R), se realizó aislamiento de plásmidos, análisis de restricción y PCR para el escrutinio de las transformantes.

En el panel A de la Figura 12, se observa el esquema del plásmido pJ18S (pJET1.2/Blunt que tiene ligado el gen ADNr 18S indicado con flecha roja); se muestran algunos elementos del plásmido como el gen que confiere resistencia a ampicilina (β -lactamasa, *bla*) y el gen letal *eco47IR*, que permite la selección positiva de los plásmidos recombinantes (Fermentas). En el panel B se observa la fotografía de un gel de agarosa en donde se corrieron las restricciones para caracterizar al plásmido, las cuales tienen el tamaño similar al tamaño teórico esperado.

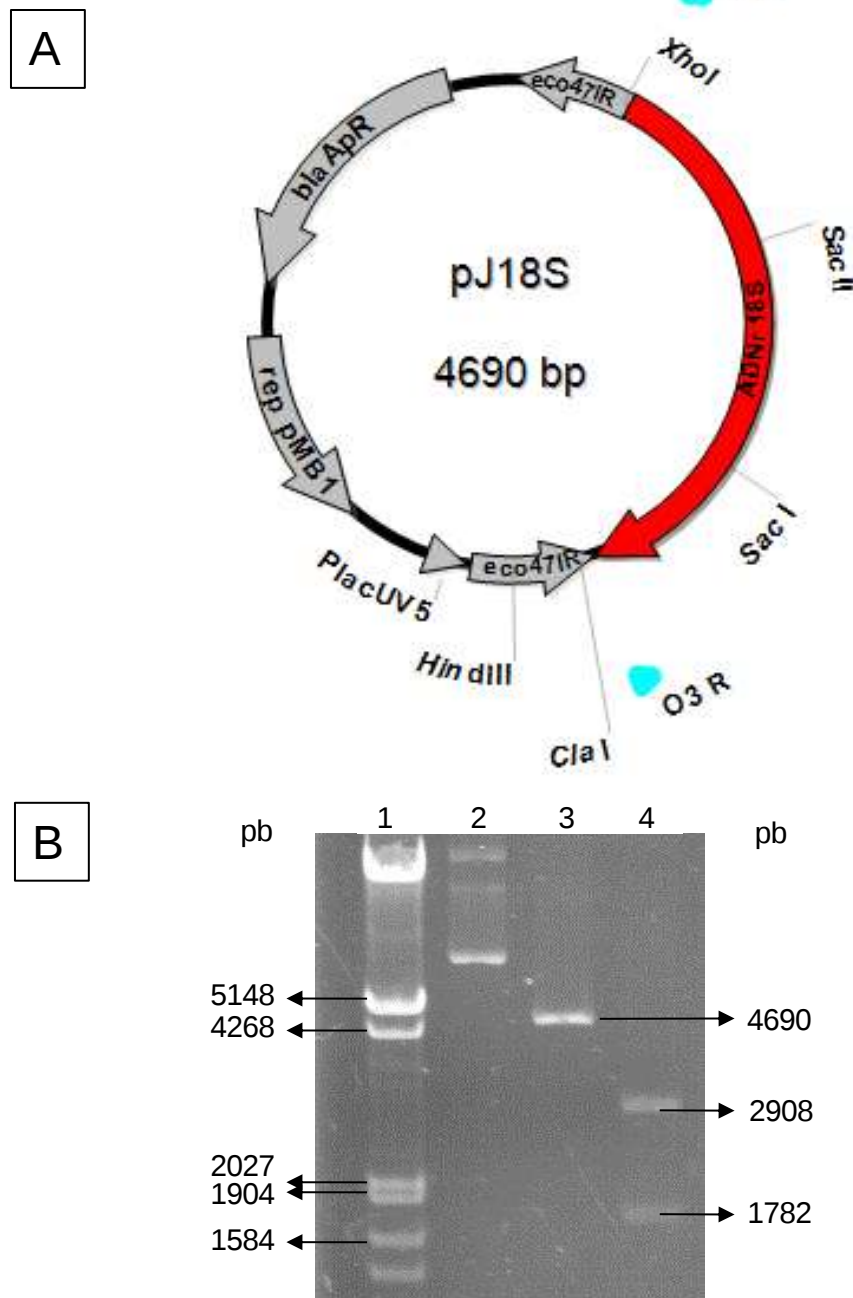


Figura 12. **Diagrama y caracterización del plásmido pJ18S.** A) Esquema del plásmido pJ18S. B) Fotografía de un gel de agarosa donde se corrieron los productos de restricción del plásmido pJ18S. 1) Marcador de tamaño molecular λ HindIII/EcoRI, 2) ADN plasmídico pJ18S, 3) pJ18S linearizado con HindIII, 4) Restricción con XhoI y ClaI.

Por su parte, la unidad de transcripción completa del gen *ATF1* se clonó en el plásmido pGEM-T Easy (pGO1F-O2R). El plásmido se analizó con las endonucleasas *Bam*HI, *Sac*I, *Sac*II y *Pst*I. La primera tiene un sitio único de reconocimiento dentro del plásmido, en la región codificante de *ATF1*, por lo que un fragmento linearizado después de la restricción es indicio de que se tiene clonado el gen. La restricción con *Pst*I se realizó para identificar el sentido del inserto dentro del vector (panel A y B, Figura 13).

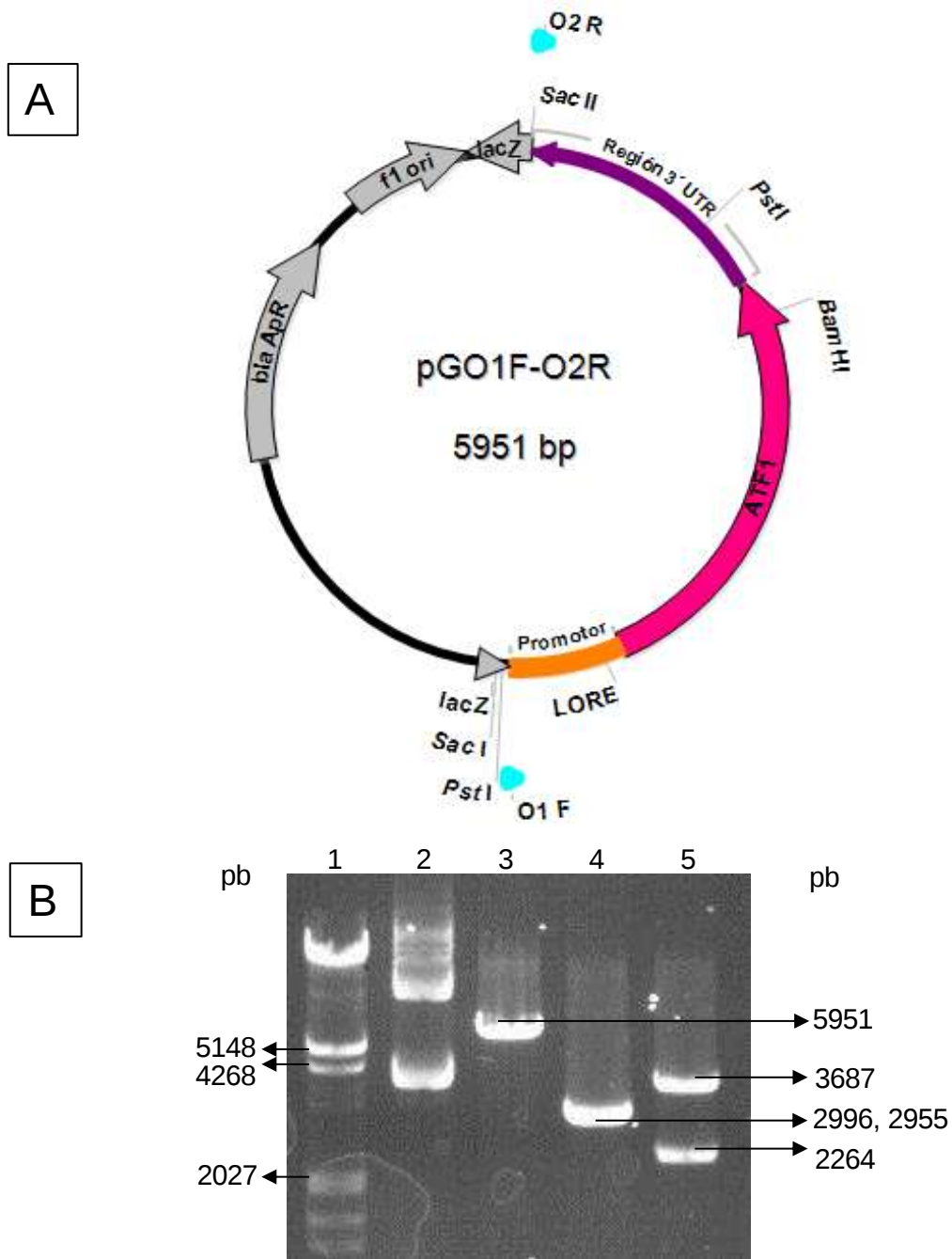


Figura 13. **Diagrama y caracterización del plásmido pGO1F-O2R.** A) Esquema del plásmido pGO1F-O2R. B) Fotografía de un gel de agarosa donde se corrieron los productos de restricción del plásmido pGO1F-O2R. 1) Marcador de tamaño molecular λ HindIII/EcoRI, 2) ADN plasmídico pGO1F-O2R, 3) pGO1F-O2R linearizado con *Bam*HI, 4) Restricción con *Sac*I y *Sac*II, 5) Restricción con *Pst*I.

2.1.3. Construcción del casete fusión *ATF1*-18S

Para fusionar a los genes *ATF1* y 18S mediante sub-clonación, el fragmento *SacI*-*SacII* de pGO1F-O2R se insertó en los sitios *SacI*-*SacII* de pJ18S para generar el plásmido pJ*ATF1*-18S.

En el panel A de la Figura 14, se observa la representación del vector pJ*ATF1*-18S, el cual tiene un tamaño aproximado de 7000 pb. En el panel B de la misma figura se presenta la fotografía del gel de agarosa donde se corrieron los productos de amplificación y las restricciones para determinar el sentido del inserto dentro del plásmido.

Cuando se realizó la amplificación de la fusión, con los oligonucleótidos O1F y O3F (punta de flecha azul), se observó una banda de aproximadamente 3900 pb (carril 3, panel B, Figura 14) que corresponde con el tamaño de la unidad de transcripción completa más el gen ribosomal; el gen *ATF1* tiene un tamaño de aproximado de 2900 pb (carril 4, panel B) y se observa claramente el decremento en el tamaño comparado con el amplificación del carril 3. El patrón de digestión con la enzima *ClaI* permitió deducir la orientación de *ATF1* respecto al ADNr 18S.

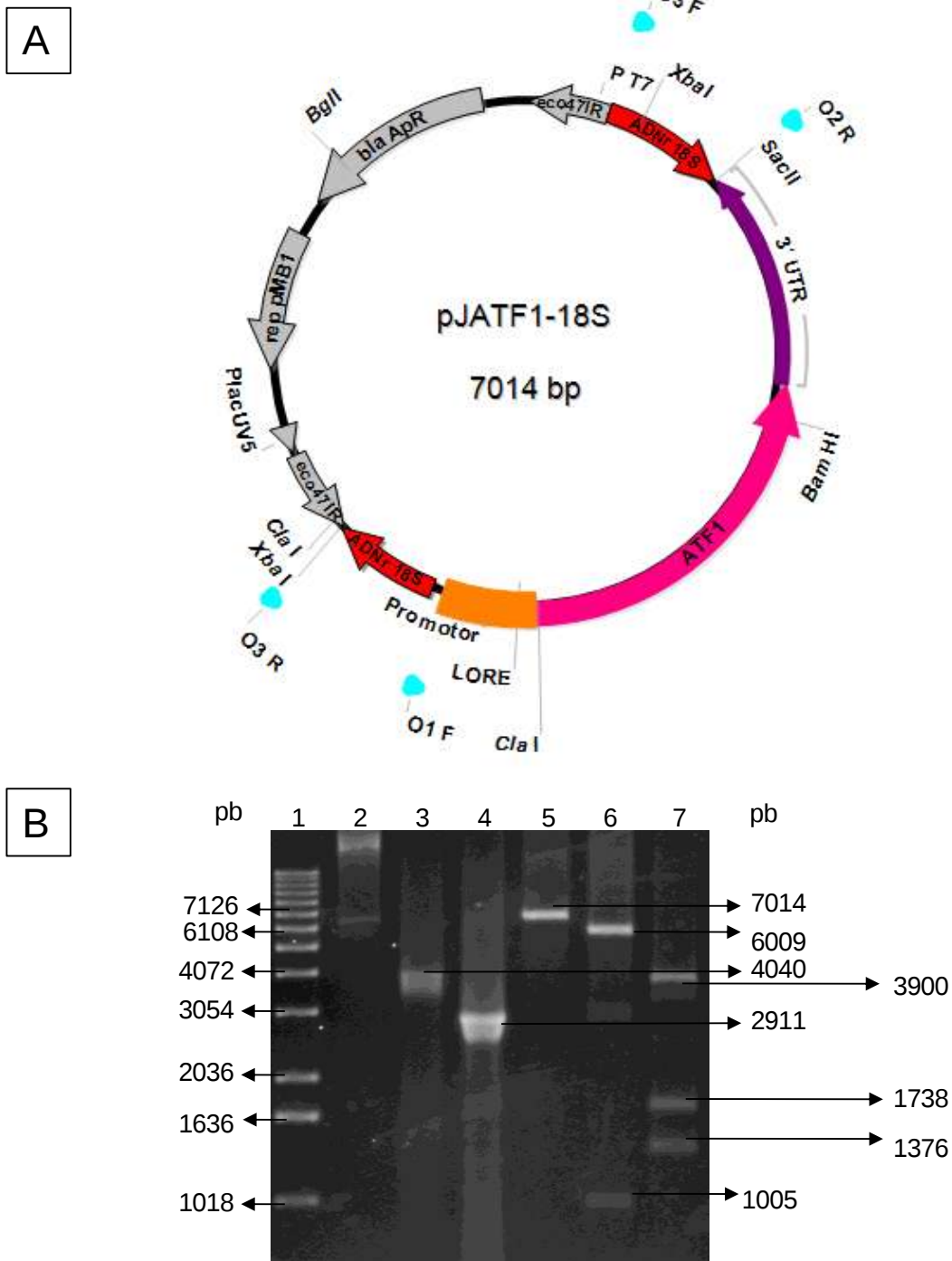


Figura 14. **Diagrama y caracterización del plásmido pJATF1-18S.** A) Esquema del plásmido pJATF1-18S. B) Fotografía de un gel de agarosa donde se corrieron las amplificaciones por PCR y los productos de restricción del plásmido pJATF1-18S. 1) Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA (Invitrogen), 2) ADN plasmídico pJATF1-18S, 3) Producto de PCR con los oligonucleótidos O3F-O3R, 4) Producto de PCR con los oligonucleótidos O1F-O2R, 5) pJATF1-18S linearizado con *Bam*HI, 6) Restricción con *Cla*I, 7) Restricción con *Xba*I y *Bgl*II.

2.1.4. Inserción del marcador de selección a zeocina en el casete *ATF1*-18S

Por último, se ligó el marcador de selección (*Sh ble*, Zeo^R) en el plásmido pJATF1-18S, el cual permitió la selección de las células de *S. cerevisiae* recombinantes (Figura 15). El gen que confiere resistencia a zeocina se obtuvo del plásmido pBS38ZeoB, construido previamente en el grupo de trabajo, donde el gen *Sh ble* está flanqueado por los promotores P_{TEF1} y P_{EM7}, los cuales permiten la expresión del casete en levaduras y en *E. coli*, respectivamente, así como el terminador transcripcional *CYC1* (Bernardino-Gómez, 2011).

Para la construcción, el marcador de selección (fragmento *SacII*-*SacII* de pBS38ZeoB) se insertó en el sitio *SacII* del vector receptor (pJATF1-18S). El sitio de reconocimiento de la endonucleasa se localiza río abajo de la región 3' UTR de *ATF1*, ubicación que teóricamente elude la interferencia transcripcional.

Previamente, pJATF1-18S se trató con la enzima fosfatasa y después de la inactivación, ambos fragmentos se ligaron (T4 ADN Ligasa). En la selección de las transformantes, se empleó el medio de cultivo LB adicionado con los antibióticos Ap100 Zeo25 (μg/mL) como medio de selección.

En el panel A (Figura 15) se muestra el bosquejo del vector y el panel B, se muestra la caracterización del plásmido mediante restricción del ADN plasmídico. El tamaño de los productos de PCR y los fragmentos generados por escisión del plásmido con enzimas de restricción, corresponde con el tamaño teórico esperado después de la incorporación del gen *Sh ble* a la fusión. En los carriles 4 y 5, es evidente el aumento en el tamaño del producto de PCR, debido probablemente al marcador de selección insertado.

Otro indicador de la presencia del gen *Sh ble* es la restricción con *MluI*. En el carril número 8 se observa una única banda de un tamaño aproximado de 8400 pb, que corresponde a pJATF1-18S Zeo linearizado; esta misma restricción se realizó empleando como sustrato el ADN plasmídico pJATF1-18S (carril 11) y a diferencia del anterior, se observan las 3 isoformas del plásmido, debido a que el sitio de reconocimiento de la endonucleasa se encuentra en el casete Zeo^R.

Los fragmentos de los carriles 9 y 10, corresponden al plásmido pJATF1-18S linearizado con *BamHI* y *EcoRV*, respectivamente, con un tamaño aproximado de 7000 pb y a

diferencia de la digestión mostrada en los carriles 6 y 7, se observa una única banda puesto que el plásmido no tiene clonado al casete Zeo^R.

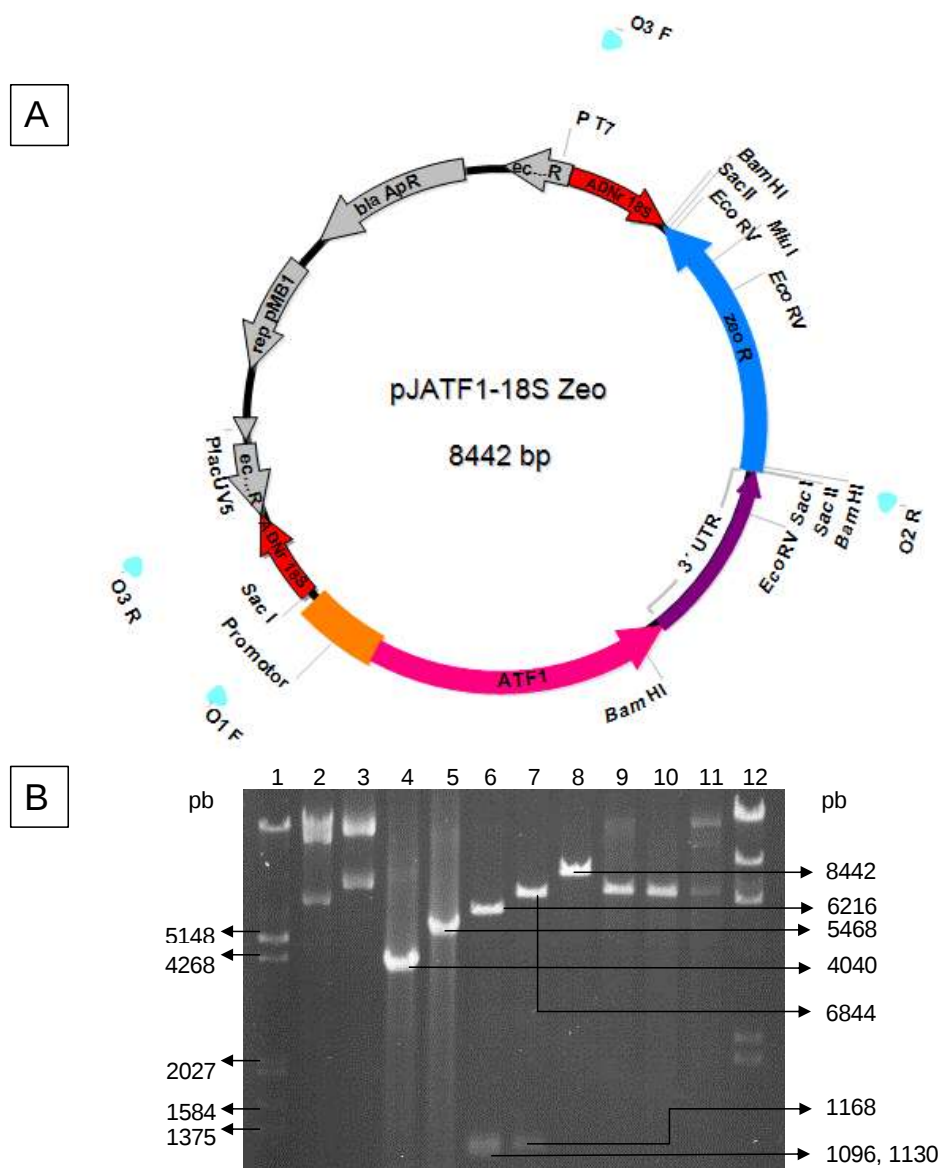


Figura 15. **Diagrama y caracterización del plásmido pJATF1-18S Zeo.** A) Esquema del plásmido pJATF1-18S Zeo. B) Fotografía de un gel de agarosa donde se corrieron los productos de PCR y las restricciones del plásmido pJATF1-18S Zeo. 1) Marcador de tamaño molecular λ HindIII/EcoRI, 2) ADN plasmídico pJATF1-18S, 3) ADN plasmídico pJATF1-18S Zeo, 4) Producto de PCR de pJATF1-18S con los oligonucleótidos O3F-O3R, 5) Producto de PCR de pJATF1-18S Zeo con los oligonucleótidos O3F-O3R, 6) pJATF1-18S Zeo digerido con *Bam*HI, 7) Restricción de pJATF1-18S Zeo con la enzima *Eco*RV, 8) Restricción de pJATF1-18S Zeo con la enzima *Mlu*I, 9) pJATF1-18S digerido con *Bam*HI, 10) Restricción del plásmido pJATF1-18S con la enzima *Eco*RV, 11) Restricción del plásmido pJATF1-18S con la enzima *Mlu*I, 12) Marcador de tamaño molecular λ HindIII.

2.2. Duplicación del elemento de respuesta a bajos niveles de oxígeno (LORE)

La segunda propuesta para estimular la producción de ésteres de acetato por la levadura *S. cerevisiae* BY4741, fue adicionar una segunda copia del elemento potenciador “LORE”, en posición contigua respecto a la copia silvestre, en la región promotora del gen *ATF1*.

La estrategia se planteó debido a la estimulación en la expresión del gen reportero en el plásmido pAM6 en condiciones hipóxicas observada por (Vasconcelles *et al.*, 2001).

Para generar la construcción, en los oligonucleótidos O1R y O2F se incluyó el sitio de restricción *Sa*I en su extremo 5' para fusionar las secuencias y duplicar a LORE; una vez clonadas las dos regiones del gen *ATF1* en pGEMT-Easy y pJET1.2, se realizó la subclonación en pJET1.2 y se insertó el marcador de selección.

La construcción se diseñó de tal manera que las regiones 5' UTR y 3' UTR silvestres del gen *ATF1* se usaran para favorecer la recombinación genética durante la transformación de *S. cerevisiae*; por lo tanto, la inserción de una copia adicional LORE sería la única modificación al gen *ATF1* silvestre, esto reflejado en un fragmento de ADN adicional de 30 pb.

2.2.1. Amplificación por PCR del gen *ATF1*

El gen *ATF1* se amplificó en dos fragmentos, desde la región promotora hasta LORE (O1F-O1R) y del elemento de respuesta a la región 3' UTR (O2F-O2R). En la amplificación obtuvieron fragmentos con un tamaño similar al teórico esperado (Figura 16, panel A y B).

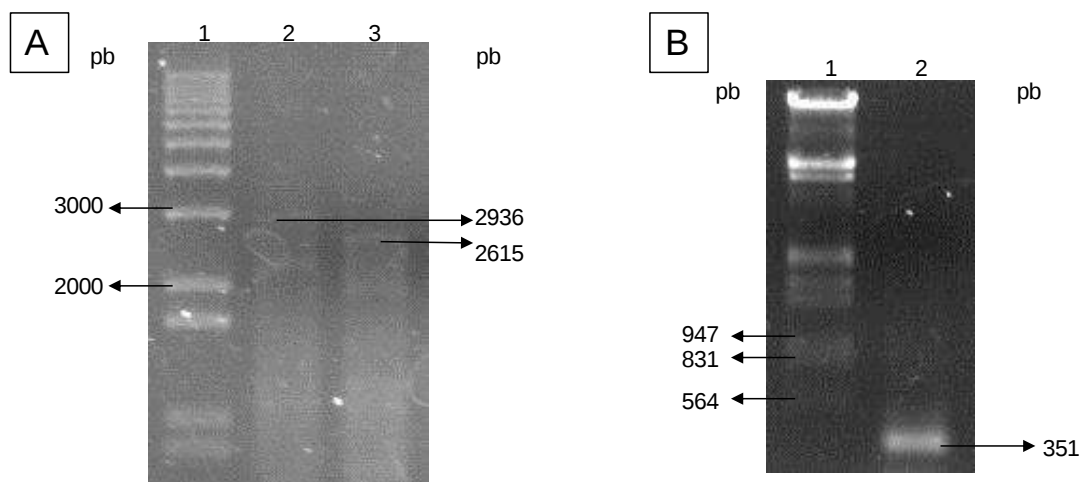


Figura 16. **Amplificación de la unidad de transcripción del gen *ATF1* de *S. cerevisiae* UMARN3.** Fotografías de geles de agarosa teñidos con bromuro de etidio y observados bajo luz UV en donde se corrieron los productos de amplificación del gen *ATF1*. A) Fragmentos mayores de la unidad de transcripción; 1) Marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA, 2) Unidad de transcripción completa amplificada con los oligonucleótidos O1F y O2R, 3) Elemento LORE, secuencia codificante y región terminadora del gen *ATF1* amplificada con los oligonucleótidos O2F y O2R. B) Región reguladora de *ATF1*; 1) Marcador de tamaño molecular λ *Hind*III/*Eco*RI, 2) Producto de PCR obtenido con los oligonucleótidos O1F y O1R, correspondiente a la secuencia comprendida entre el promotor y el elemento LORE del gen *ATF1*.

2.2.2. Clonación de los productos de PCR

El fragmento amplificado por PCR con los oligonucleótidos O1F y O1R, se ligó en el plásmido de clonación pJET1.2, en una proporción 1:1 ng/ μ l, para generar el plásmido pJO1F-O1R, el cual se muestra en el panel A de la Figura 17. En el panel B de la misma figura, se muestran las reacciones de digestión que permitieron comprobar la presencia del inserto.

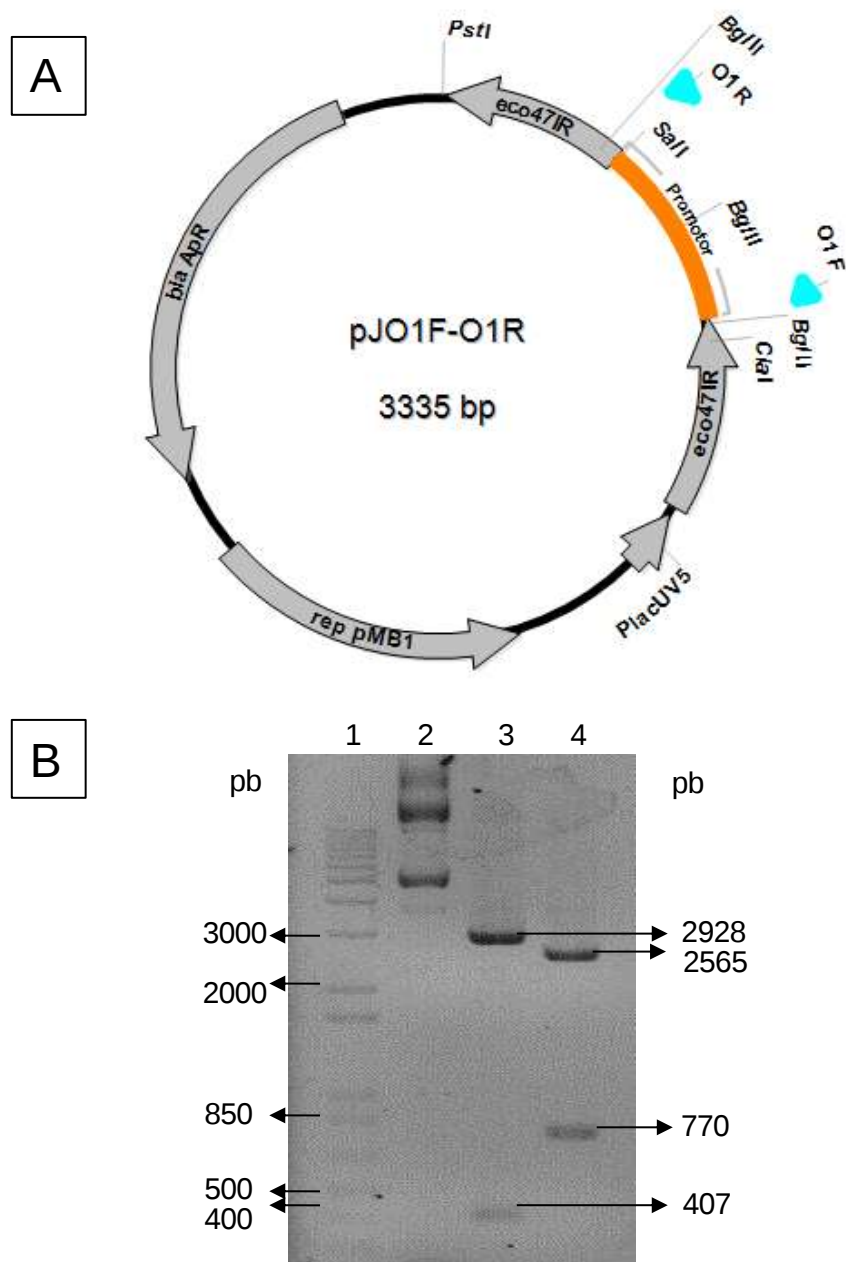


Figura 17. **Diagrama y caracterización del plásmido pJO1F-O1R.** A) Esquema del plásmido pJO1F-O1R. B) Fotografía de un gel de agarosa donde se corrieron los productos de restricción del plásmido pJO1F-O1R. 1) Marcador de tamaño molecular 1 kb Plus DNA (Invitrogen), 2) ADN plasmídico pJO1F-O1R, 3) pJO1F-O1R digerido con *Bgl*II, 4) Restricción con *Pst*I y *Cla*I.

El fragmento de PCR amplificado desde LORE hasta el extremo 3' de la unidad de transcripción se clonó en pGEM-T Easy y se generó el vector pGO2F-O2R (Figura 18).

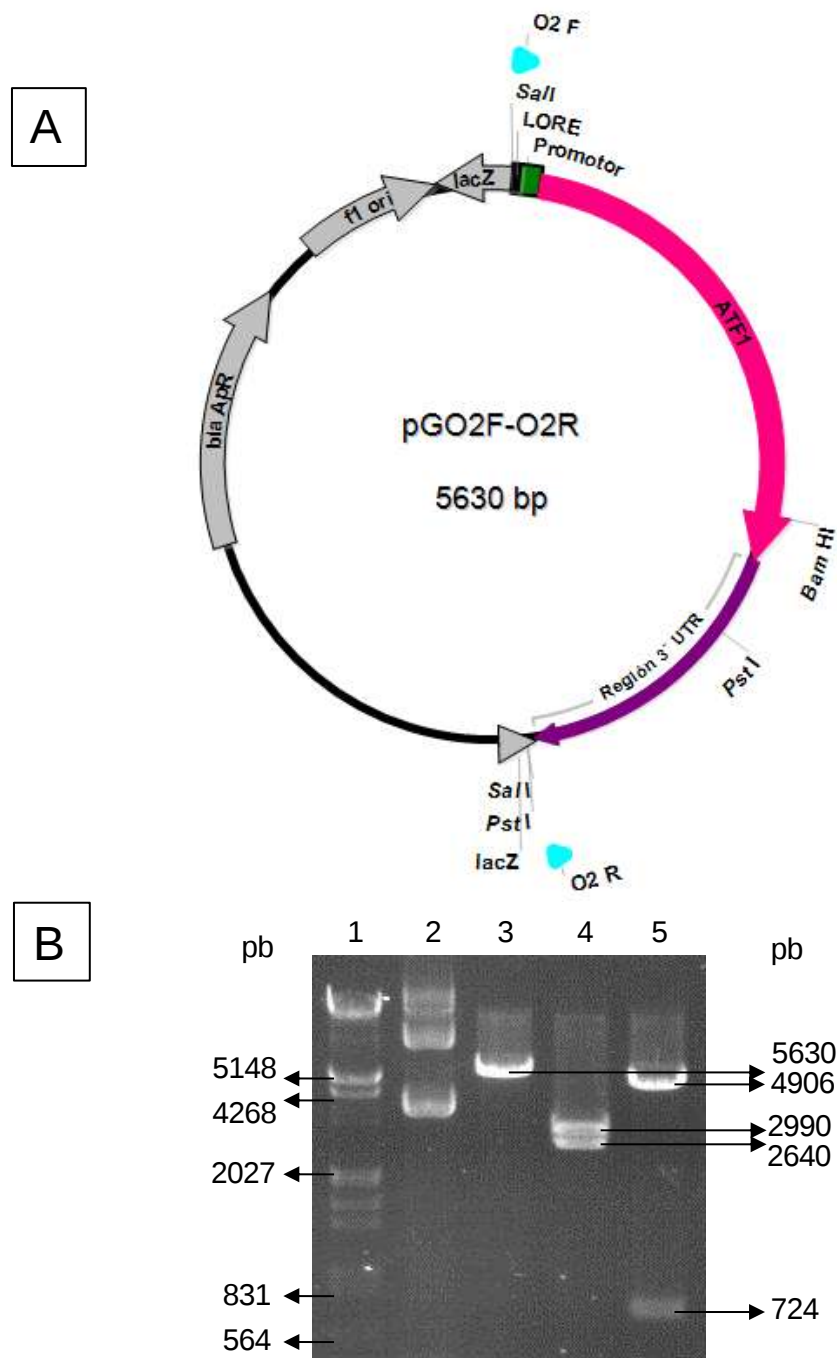


Figura 18. **Diagrama y caracterización del plásmido pGO2F-O2R.** A) Esquema del plásmido pGO2F-O2R. B) Fotografía de un gel de agarosa donde se corrieron los productos de restricción del plásmido pGO2F-O2R. 1) Marcador de tamaño molecular λ HindIII/EcoRI, 2) ADN plasmídico pGO2F-O2R, 3) pGO2F-O2R linearizado con BamHI, 4) Restricción con SalI, 5) Restricción con PstI.

2.2.3. Construcción del casete de duplicación del elemento LORE

Para duplicar al elemento LORE, el fragmento *SaII-SaII* de 2640 pb obtenido mediante la digestión del plásmido pGO2F-O2R con las endonucleasas *SaII* y *ScaI*, se purificó y se insertó en el plásmido linearizado en *SaII* (desfosforilado) pJO1F-O1R. Debido a la posibilidad de que el fragmento se insertara en cualquier orientación en el plásmido receptor, se realizó un tamizado de cepas y se eligió a la transformante con las dos copias de LORE en posición contigua (mediante la restricción con *ClaI*).

En la Figura 19, panel A, se muestra la representación del vector recombinante pJTándemLORE. Con punta de flecha azul se indican los sitios de unión de los oligonucleótidos empleados para la amplificación de los fragmentos clonados; se muestran los sitios de reconocimiento de las endonucleasas utilizadas para identificar a la clona y conocer el arreglo de los fragmentos dentro del vector. También se observa la región promotora (Fujiwara *et al.*, 1999) (naranja), la región terminadora (región 3' UTR, flecha morada) y dos copias de LORE en posición tándem.

Respecto a pJET1.2, la construcción se encuentra en sentido contrario al promotor T7 y en sentido con el promotor P_{lacUV5} (punta de flecha gris).

En el carril 3, panel B de la Figura 19, se observa una banda de aproximadamente 2966 pb, la cual sugiere la presencia de dos copias contiguas de elemento LORE. Teóricamente, la condición para observar un amplificación en la reacción de PCR con los oligonucleótidos O1F y O2R, es que sus secuencias blanco se encuentren en el ADN molde; los plásmidos receptor y parental *per se* no tienen ambos sitios de unión para los oligonucleótidos, por lo tanto, fue necesario que ambos fragmentos (región promotora a LORE y LORE a región terminadora) se encontraran contiguos para obtener el producto del tamaño esperado.

Otra evidencia de la duplicación, es que cuando se amplificó con los oligonucleótidos O2F-O2R, se observó una banda de menor tamaño (carril 4, panel B, Figura 19).

Por otro lado, la reacción de linealización con *BamHI* de pJTándemLORE generó un fragmento de aproximadamente 5975 pb. La endonucleasa no corta en el vector y tiene un sitio único de reconocimiento dentro del marco de lectura de *ATF1*, lo que permite concluir que el gen está clonado en pJET1.2/blunt.

Debido a que no se empleó una estrategia de subclonación dirigida y que el inserto podía ligarse en cualquier orientación dentro del vector receptor, fue necesario seleccionar aquellas clonas cuyo plásmido además de linealizarse con *Bam*HI, tuvieran a la secuencia LORE en tándem, mediante la digestión con *Cla*I (carril 6, panel B, Figura 19). El resultado de la digestión mostró que la duplicación del elemento LORE fue clonado en el mismo sentido que la silvestre.

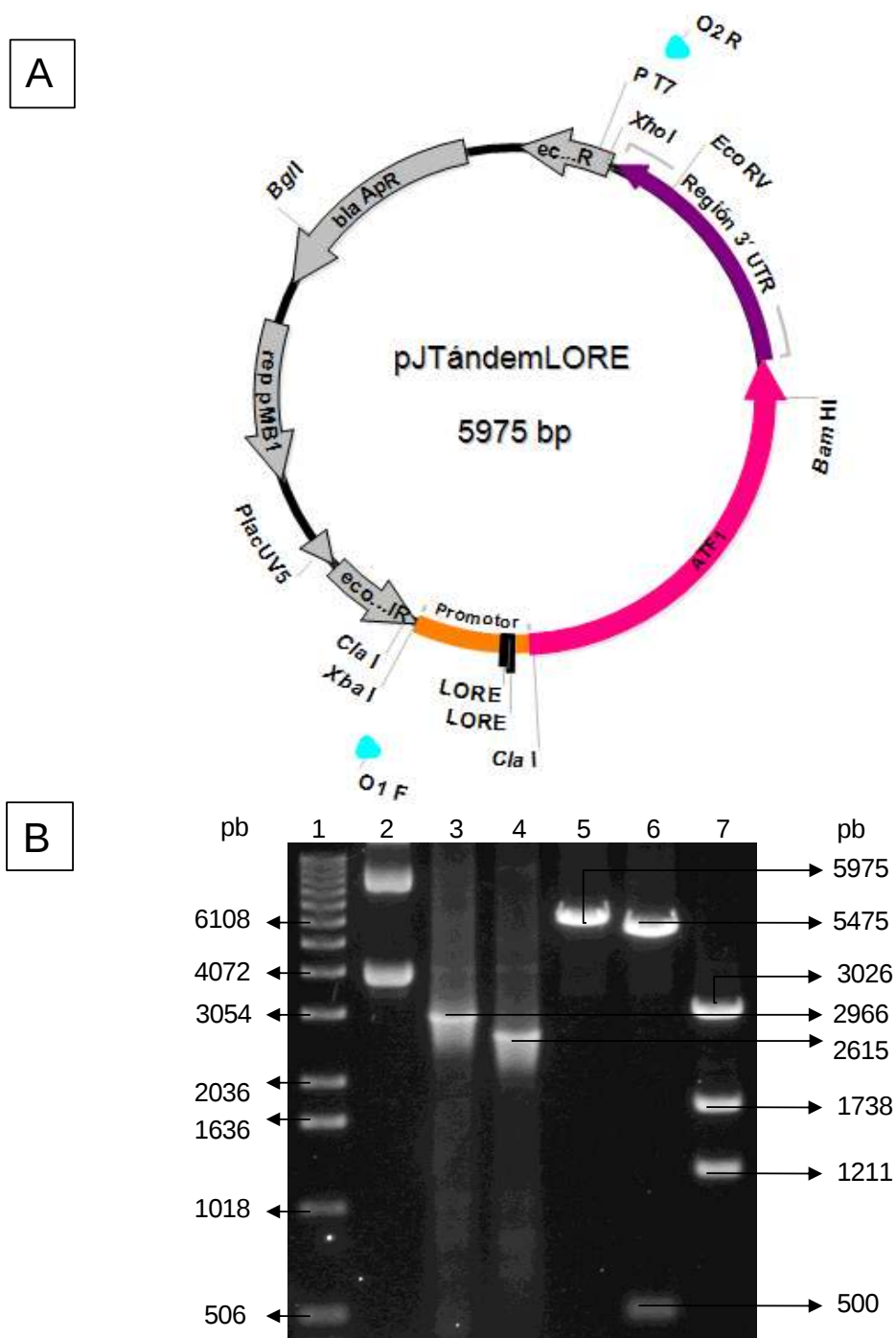


Figura 19. **Diagrama y caracterización del plásmido pJTándem LORE.** A) Esquema del plásmido pJTándem LORE. B) Fotografía de un gel de agarosa donde se corrieron las amplificaciones por PCR y los productos de restricción del plásmido pJTándem LORE. 1) Marcador de tamaño molecular 1 kb DNA (Invitrogen), 2) ADN plasmídico pJTándem LORE, 3) Producto de PCR de pJTándem LORE con los oligonucleótidos O1F-O2R, 4) Producto de PCR de pJTándem LORE con los oligonucleótidos O2F-O2R, 5) pJTándem LORE digerido con *Bam*HI, 6) pJTándem LORE digerido con *Cla*I, 7) pJTándem LORE digerido con *Xba*I, *Xho*I y *Bgl*II.

2.2.4. Construcción del casete duplicación elemento LORE zeocina

Para que las células fueran capaces de expresar el gen de resistencia a zeocina, éste fue insertado dentro de la construcción, con sus elementos promotor y terminador.

Previamente, el casete Zeo^R se obtuvo de pBS38ZeoB mediante restricciones parciales con *Sma*I. El vector receptor (pJTándemLORE) se linealizó con *Eco*RV y se desfosforiló con la fosfatasa alcalina de camarón (SAP), respectivamente. Ambos fragmentos se ligaron en una proporción 2:1 (inserto:plásmido) y con la reacción se transformaron, mediante electroporación, a células competentes de *E. coli*. La selección de las células se realizó en medio de cultivo LB Ap100, Zeo25 (µg/mL).

En la Figura 20, panel A, se observa la representación gráfica del plásmido pJTándemLORE después de la ligación del marcador de selección (pJTándemLORE Zeo).

El panel B de la Figura 20, es una fotografía de un gel de agarosa en donde se presenta el corrimiento electroforético de los plásmidos, las reacciones de PCR y las digestiones a las que fue sometido. Los carriles 2 y 4 muestran los plásmidos antes y después de la clonación del gen *Sh ble*, donde es evidente que el plásmido tiene un patrón de corrimiento electroforético más retardado probablemente debido al incremento en su tamaño. De manera similar, los carriles 3 y 5 presentan los productos de PCR antes y después de la inserción del gen. Por último, la restricción con *Xho*I permitió verificar el arreglo de los genes.

En el casete TándemLORE Zeo, debido la orientación de dos las unidades de transcripción (*ATF1* y *Sh ble*) los terminadores se traslapan, sin embargo, ambos genes cuentan con las señales suficientes para dirigir la formación del extremo 3' de los mensajeros (escisión endonucleolítica co-transcripcional seguida de la poliadenilación) y por lo tanto, no debería observarse interferencia alguna.

De hecho, en el genoma de *S. cerevisiae*, este arreglo genómico no es extraño, debido a que a menudo, la distancia entre las unidades de transcripción es de sólo unos pocos cientos de nucleótidos y por consiguiente, dependiendo de la orientación de los genes, los promotores y terminadores están adyacentes o incluso se superponen. Este acomodo génico demanda una rigurosa eficiencia de transcripción, para evitar la oclusión de promotores río abajo (si los genes están en la misma orientación) o la formación de ARN

antisentido y/o el choque de las polimerasas (genes en orientación opuesta). Ambos podrían resultar en una expresión génica aberrante (Shearwin *et al.*, 2005).

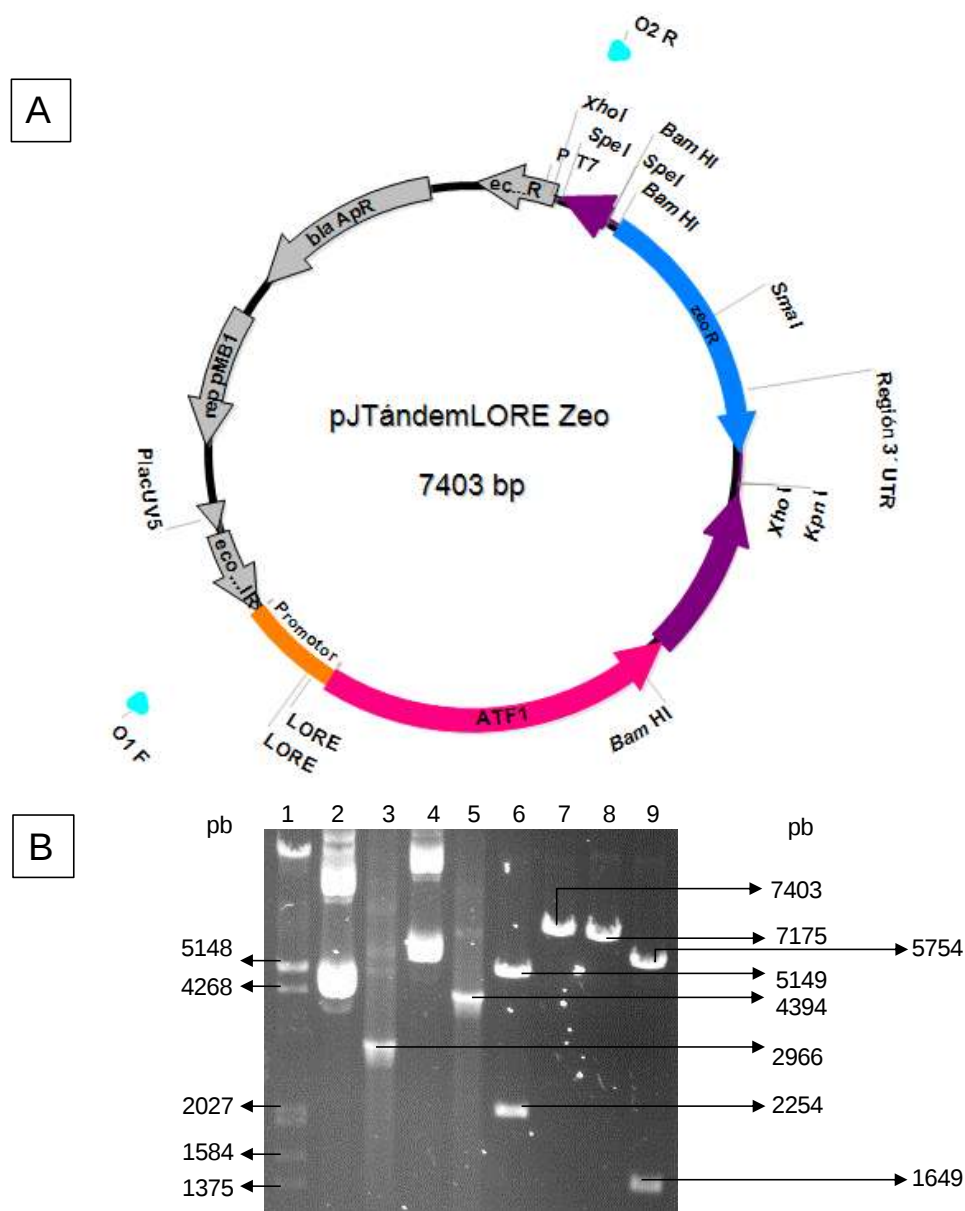


Figura 20. **Diagrama y caracterización del plásmido pJTándem LORE Zeo.** A) Esquema del plásmido pJTándem LORE Zeo. B) Fotografía de un gel de agarosa donde se corrieron las amplificaciones por PCR y los productos de restricción del plásmido pJTándem LORE Zeo. 1) Marcador de tamaño molecular λ *HindIII/EcoRI*, 2) ADN plasmídico pJTándem LORE, 3) Producto de PCR de pJTándem LORE con los oligonucleótidos O1F-O2R, 4) ADN plasmídico pJTándem LORE Zeo, 5) Producto de PCR de pJTándem LORE Zeo con los oligonucleótidos O1F-O2R, 6) pJTándem LORE Zeo digerido con *Bam*HI, 7) pJTándem LORE Zeo digerido con *Kpn*I, 8) pJTándem LORE Zeo digerido con *Spe*I, 6) pJTándem LORE Zeo digerido con *Xho*I.

3. TRANSFORMACIÓN DE *S. cerevisiae* BY4741

Con el objetivo de incrementar la expresión de *ATF1*, mediante la inserción de un segundo elemento promotor y/o la duplicación génica, y una vez generadas las construcciones, se transformó a la cepa de *S. cerevisiae* BY4741.

3.1. Cinética de crecimiento de *S. cerevisiae*

Existen varios factores que pueden afectar la eficiencia de transformación, como la fase de crecimiento de las células, la densidad celular, las condiciones de crecimiento, entre otras. Por ejemplo, en la preparación de células electrocompetentes de levaduras, se determinó que la fase de crecimiento de las células es importante, debido a que se probaron cultivos paralelos con un rango de variación en la densidad óptica de 5 veces (0.254 a 1.3) y se observó un incremento de 60 veces en la eficiencia de transformación cuando la preparación se realizó en la densidad celular apropiada (Becker y Guarente, 1991).

Por lo tanto, previo a la preparación de las células competentes, se realizó una cinética de crecimiento para determinar el tiempo de crecimiento en que el cultivo se encontraba en la fase exponencial media. El crecimiento se determinó mediante turbidimetría ($D.O_{600nm}$), la densidad celular (número de células/mL) por recuento directo en un hemocitómetro y la viabilidad celular con azul de tripano.

Las células se crecieron en YPD (2%), a 30°C y 150 rpm, tal y como se indica en materiales y métodos.

En la Figura 21, se muestra la curva de crecimiento de *S. cerevisiae* BY4741. En base a la cinética, se cosechó el cultivo a las 6 horas de crecimiento, tiempo en el cual la densidad celular mostró un valor de 2.0×10^7 células/mL, valor que es recomendado para una óptima eficiencia.

Durante el tiempo de crecimiento, la viabilidad fue del 100% (determinada con azul de tripano).

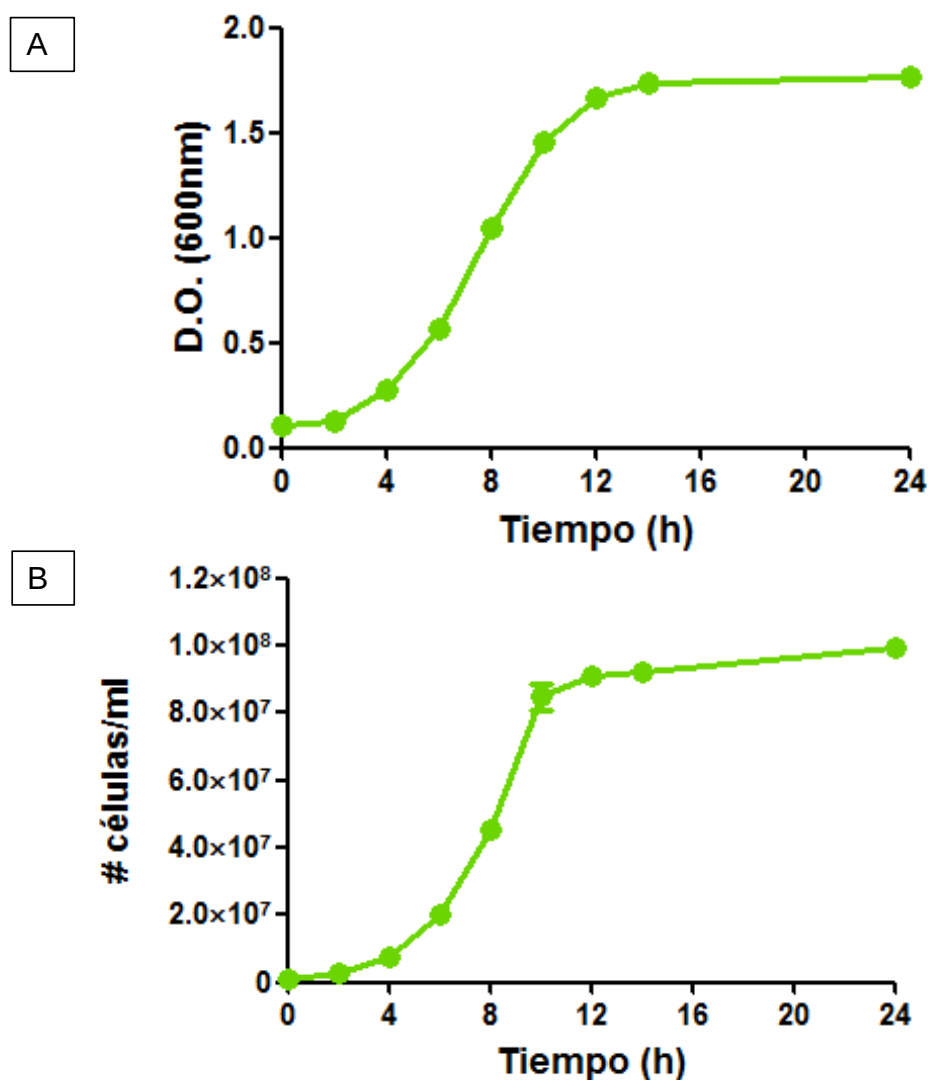


Figura 21. **Cinética de crecimiento *S. cerevisiae* BY4741.** Los cultivos se crecieron en medio YPD 2%, por 24 h, a 30°C y agitación constante (150 rpm). A) Crecimiento determinado mediante espectrofotometría. B) Curva de crecimiento determinada mediante cuenta en un hemocitómetro. Las barras muestran la desviación estándar de la media (n=3).

3.2. Transformación de *S. cerevisiae*

La preparación de las células competentes y la transformación se realizó con el kit Frozen-EZ Yeast Transformation II, de la casa comercial Zymo Research y la selección de las transformantes se hizo en medio YPD 2% con zeocina 200 $\mu\text{g/mL}$. Varias modificaciones al protocolo de transformación estándar se hicieron y se observó un incremento en la eficiencia de transformación (especificadas en materiales y métodos).

3.2.1. ADN empleado en la transformación

Para la transformación se emplearon dos tipos de ADN, plásmidos de replicación autónoma (como control positivo de la transformación) y fragmentos de ADN sin origen de replicación de levaduras.

Se ha reportado que en ausencia de secuencias de replicación autónoma (secuencias ARS u origen 2- μ), la modificación únicamente puede ocurrir mediante la integración de la información en el cromosoma de las levaduras por recombinación homóloga (Hinnen *et al.*, 1978; Ilgen *et al.*, 1979; Szostak y Wu, 1979). Por lo tanto, las secuencias modificadas *in vitro* pueden ser usadas para reemplazar de manera precisa la copia cromosomal de cualquier gen (Scherer y Davis, 1979; Amberg *et al.*, 2005).

Los plásmidos de replicación autónoma utilizados fueron pYES2-Zeo y pYES2-ATF1-Zeo, los cuales fueron construidos previamente en el grupo de trabajo.

3.2.2. Características del ADN para transformación integrativa

Los casetes construidos *in vitro*, descritos con anterioridad, se emplearon para reemplazar la copia cromosomal del gen *ATF1* y del *locus RDN1* mediante recombinación homóloga. Se emplearon tres variantes de estos casetes en la transformación:

- ADN plasmídico circular
- ADN con un extremo homólogo al genoma (plásmido linearizado mediante la escisión con enzimas de restricción).
- ADN con dos extremos homólogos *18sadnrΔ::ATF1* Zeo y Tándem LORE Zeo (fragmentos amplificados por PCR).

3.2.3. Eficiencia de la transformación

Los resultados de la transformación se resumen en la Tabla 13, en donde se indica la eficiencia de transformación (ET). Esta última se definió como el promedio de la relación entre el número de transformantes obtenidas en al menos tres transformaciones independientes y la concentración de ADN empleada.

En la transformación por integración, se observó que la eficiencia incrementó cuando se empleó ADN flanqueado por dos extremos homólogos, en comparación cuando únicamente se encontraba presente un extremo homólogo libre o con el ADN circular. Por

ejemplo, el valor de la ET con el casete Tándem LORE fue de 3 cuando se transformó con el fragmento obtenido mediante PCR (2 extremos homólogos), de 0.2 con el plásmido linearizado (1 extremo homólogo) y de 1 con plásmido circular.

La transformación con el plásmido circular pJTándemLORE-Zeo probablemente fue por integración debido a que en ausencia de secuencias ARS, el ADN transformado en las células de levadura se integra en el genoma exclusivamente por recombinación homóloga (Scherer y Davis, 1979).

Además, al comparar las eficiencias de transformación, se aprecia que el empleo de las secuencias del gen ADNr 18S mejoró la eficiencia de transformación (ET de 185, utilizando fragmentos de ADN con dos extremos homólogos), mientras que para el casete Tándem-LORE (fragmento amplificado mediante PCR), la ET fue de 3. Por su parte, la ET para los plásmidos con un origen de replicación en levaduras fue de 112 y 35 para pYES2-*ATF1*-Zeo y pYES2-Zeo, respectivamente.

Tabla 13. Eficiencia de transformación de *S. cerevisiae* BY4741.

Modificación en el genoma	Características	ET*
<i>ATF1</i> -18S	2 extremos homólogos (PCR)	185
	1 extremo homólogo (pJ <i>ATF1</i> -18S-Zeo linearizado con <i>Bsu</i> 36I)	0.44
	Plásmido (pJ <i>ATF1</i> -18S-Zeo)	0
Tándem LORE	2 extremos homólogos (PCR)	3
	1 extremo homólogo (pJTándemLORE-Zeo linearizado <i>Spe</i> I)	0.2
	Plásmido (pJTándemLORE-Zeo)	1
pYES2- <i>ATF1</i> -Zeo	Plásmido	112.5
pYES2-Zeo	Plásmido	35
* ET = Promedio de la eficiencia de transformación (número de transformantes/ μ g ADN)		

3.3. Selección de las cepas recombinantes

Para concluir con el objetivo 1, el cual fue incrementar la expresión de *ATF1* en *S. cerevisiae* mediante la inserción de un elemento promotor de la transcripción y/o duplicación génica, se llevó a cabo la selección de las clonas recombinantes (transformantes por integración) con el fenotipo de sobre-expresión. Para la cuantificación de los ésteres producidos, se utilizó la técnica del hidroxamato férrico (Molina-Ubeda, 2000).

3.3.1. Curva de calibración de ésteres con el método del hidroxamato férrico

Primeramente, se realizó una curva de calibración para determinar si el método colorimétrico era lo suficientemente sensible como para detectar los incrementos en la concentración del éster. En la Figura 22, se observa la gráfica de regresión lineal (R^2 de 0.99), en donde se representa la absorbancia (D.O._{525nm}) en función de concentraciones crecientes del éster acetato de etilo. Se concluye que la curva de calibración, en el intervalo de concentraciones mostrado, fue lineal y tuvo una ordenada en el origen igual a cero, por lo que el método era efectivo para el escrutinio de las clonas sobre-productoras de ésteres.

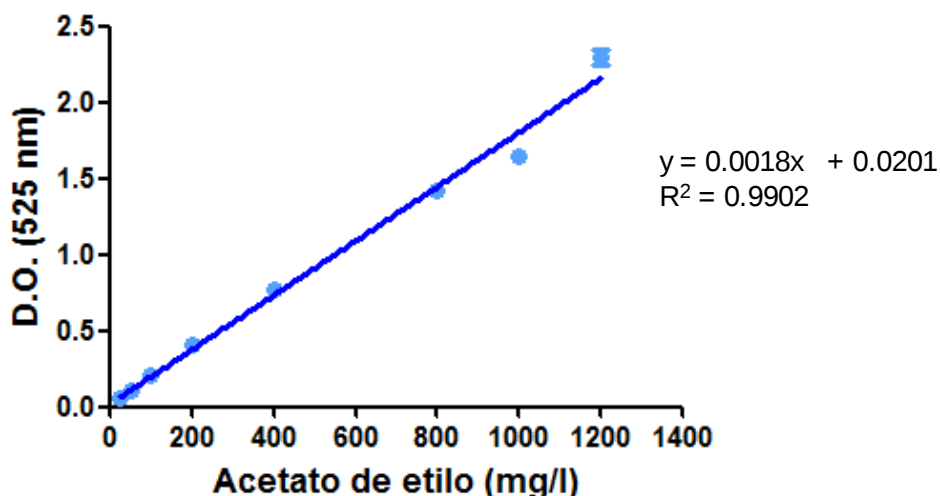


Figura 22. **Curva de calibración de acetato de etilo.** Disoluciones con concentraciones crecientes del éster acetato de etilo se prepararon y la densidad óptica se midió a 525 nm, posterior a la reacción con el método del hidroxamato férrico. A continuación, un análisis de regresión lineal se realizó y el modelo matemático ajustado se especifica en el gráfico. Las barras muestran la desviación estándar de la media ($n=3$).

Anteriormente, el método permitió cuantificar las diferencias en la producción de ésteres entre las cepas silvestres de *S. cerevisiae* UMARN3 y *K. marxianus* y las transformadas con el plásmido basado en 2- μ que tiene clonado al gen *ATF1* (Miranda-Mendoza, 2010).

Sin embargo, se sabe que un factor importante que afecta a la producción de ésteres es la cepa de la levadura. No sólo el promedio en la producción de ésteres, sino también las proporciones relativas de cada éster, difiere de manera importante de cepa a cepa (Verstrepen *et al.*, 2003b).

Por lo tanto, se decidió evaluar la capacidad del método (hidroxamato férrico) con el respectivo modelo de estudio (*S. cerevisiae* BY4741). Para lo cual, se establecieron las condiciones de fermentación para observar el incremento en la producción de ésteres en los medios de cultivo, con las clonas resultantes de la transformación con los plásmidos 2- μ : pYES2-*ATF1*-Zeo y pYES2-Zeo.

En la fermentación, diferentes fuentes de carbono se probaron con el objetivo de observar la expresión diferencial del gen en términos de producción de ésteres.

Debido a que el plásmido pYES2 es vector de expresión inducible por galactosa y sujeto a represión por glucosa (West *et al.*, 1984; Giniger *et al.*, 1985), las levaduras se crecieron en un medio para inducir la transcripción de *ATF1* bajo el control de *GAL1* (YPF8%-G2%). Adicionalmente, un medio de cultivo con fructosa (YPF 10%) se usó como fuente de carbono y con glucosa (YPD 10%) para reprimir al promotor *GAL1*.

3.3.2. Cinética de producción de ésteres por las clonas transformadas con los plásmidos pYES2

En la Figura 23, se presentan los resultados de la fermentación en el medio inductor (medio fructosa 8% y galactosa 2%) de las clonas recombinantes pYES2-Zeo y pYES2-*ATF1*-Zeo. En el panel A, se muestra la cinética de crecimiento, determinada por espectrofotometría, en donde se observa que la transformación no afectó el crecimiento de las levaduras.

La cinética de producción de ésteres se indica en el panel B de la misma figura; la concentración de ésteres totales en las transformantes fue normalizada con los valores de la silvestre. En el gráfico, se observa que durante las 24 h iniciales de la fermentación no hubo diferencias entre las cepas, en cambio, a partir de las 48 h y hasta el final de la fermentación, la clona transformada con el plásmido pYES2-*ATF1*-Zeo mostró una concentración significativamente mayor de ésteres, comparada con la transformante con el plásmido vacío (control) y con la cepa silvestre.

Por lo tanto, se concluye que en las condiciones de fermentación establecidas, hubo un incremento en la producción de ésteres, debido a la transformación con el plásmido pYES2-*ATF1*-Zeo.

La normalización de los datos y las curvas de crecimiento fueron necesarias debido a que se observó que las hexosas pueden interferir con la determinación, al generar falsos positivos a la prueba, pero ya que el crecimiento de las diferentes cepas fue similar, se sugiere que las diferencias se deben a la cantidad de metabolitos producidos por la sobre-expresión de *ATF1* y no a azúcares residuales no consumidos (panel A y panel B, Figura 23).

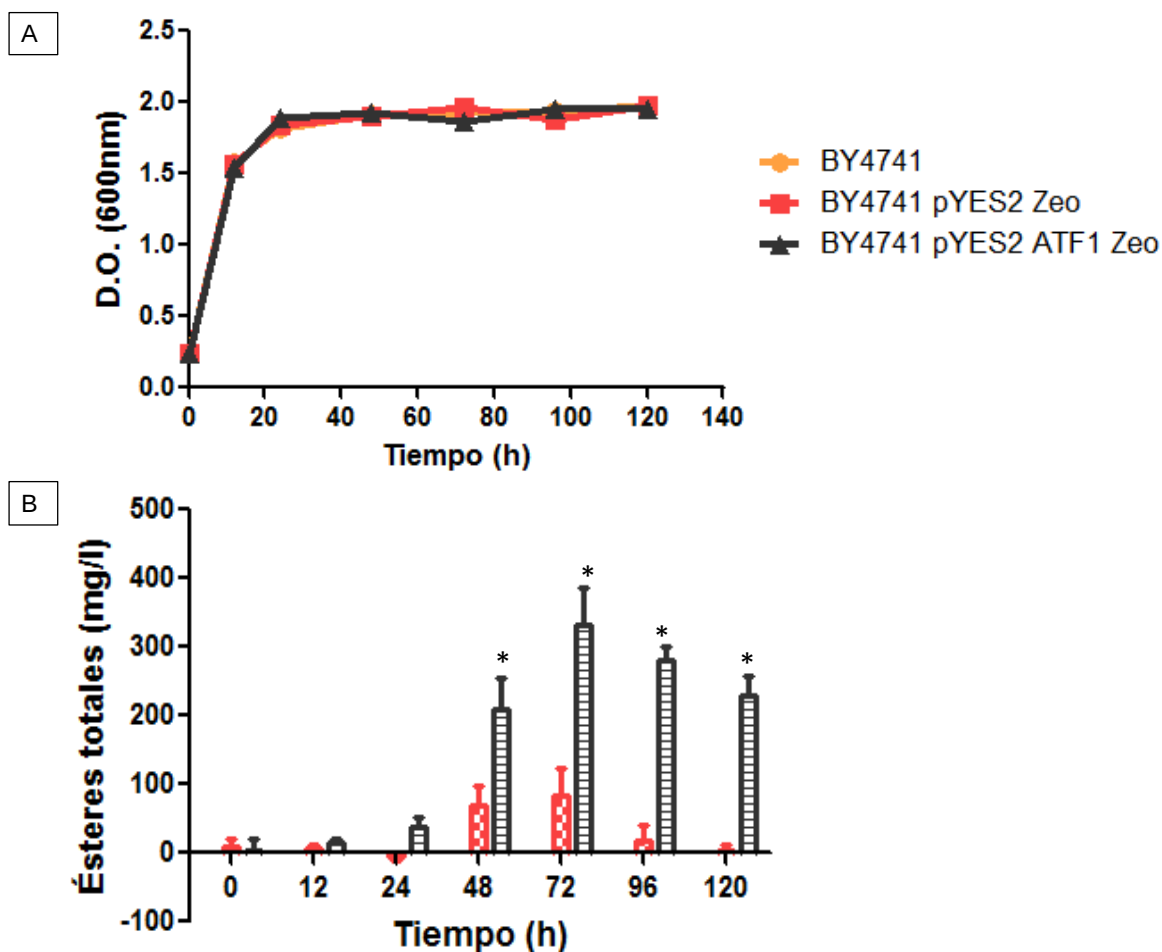


Figura 23. **Cinética de producción de ésteres en condiciones fermentativas de las clonas transformadas con los plásmidos basados en 2-μ.** Los cultivos se crecieron en medio YPF8%-G2%, a 30°C, en agitación constante durante 120 h. A) Medición del crecimiento a intervalos mediante espectrofotometría (D.O._{600nm}). B) Determinación de ésteres totales en el extracto libre de células durante la fermentación alcohólica, mediante la técnica del hidroxamato férrico. Los valores fueron normalizados con los datos de la cepa silvestre BY4741. Un análisis ANOVA de 2 vías se realizó, prueba post-hoc Bonferroni, en donde las barras muestran la desviación estándar de la media (n=3). *p<0.05.

3.3.3. Selección de las transformantes integrativas sobre-productoras de ésteres

Una vez establecidas las condiciones de fermentación y verificada la idoneidad del método del hidroxamato férrico para la cuantificación de los ésteres producidos, se realizaron fermentaciones con las clonas recombinantes por integración y se verificaron los cambios en su genoma.

Se analizó un lote de 130 clonas de un total de 1200, en donde más de un 90% correspondieron a la transformación con el casete *ATF1-18S*. Del universo evaluado, únicamente el 14% de las transformantes presentó el fenotipo de incremento de la concentración de ésteres en el medio de fermentación (Tabla 14).

Tabla 14. **Proporción de transformantes sobre-productoras de ésteres.**

Construcción	# Transformantes analizadas	# Transformantes sobre-productoras	Porcentaje
Tándem LORE	10	1	10%
<i>ATF1-18S</i>	120	5	4.2%

En el panel A de la Figura 24, se muestra la cinética de crecimiento en condiciones fermentativas determinada mediante espectrofotometría; no se observaron diferencias entre las clonas transformantes y la silvestre, por lo tanto, los cambios en el genoma no tuvieron efecto aparente sobre el crecimiento de las clonas.

En el panel B se representa la cinética de producción de ésteres, en donde los valores fueron normalizados con los datos generados a partir de la cepa silvestre. Se aprecia que a tiempos tempranos de la fermentación y hasta las 24 horas, no hubo diferencias entre las cepas. Las clonas recombinantes seleccionadas no presentaron un perfil de producción de ésteres homogéneo, pero en todos los casos, la tendencia mostró diferencias significativas a las 48 y 72 horas de crecimiento.

A partir de las 96 h y hasta el final de la fermentación, la concentración de los ésteres totales en el medio de crecimiento de las clonas recombinantes disminuyó, sin diferencias significativas con la cepa silvestre (Figura 24).

Por lo anterior, se concluye que las dos modificaciones realizadas al genoma de la levadura (fusión *ATF1*-18S y duplicación del elemento LORE) condujeron a un incremento en la síntesis de ésteres de acetato en condiciones fermentativas.

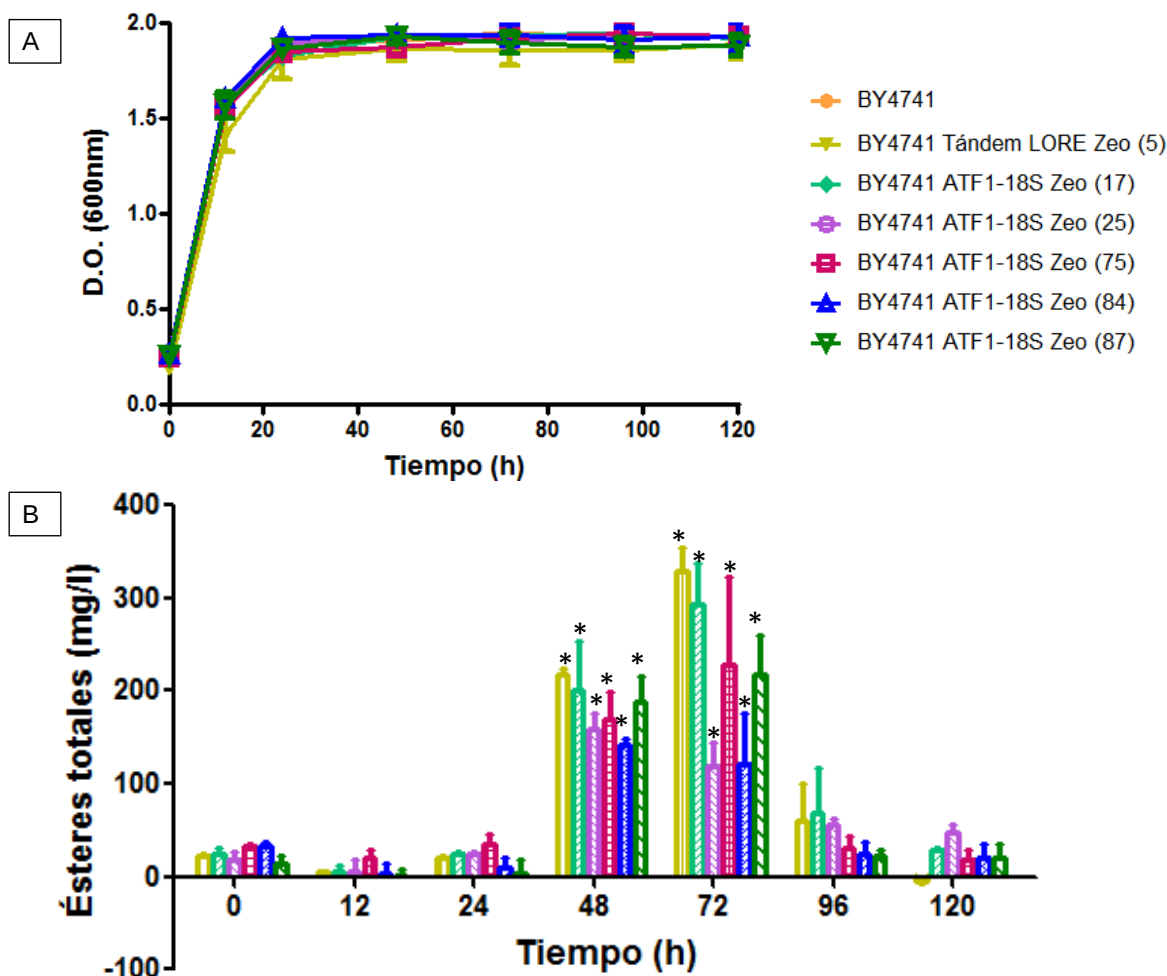


Figura 24. Cinética de producción de ésteres en condiciones fermentativas por las clonas recombinantes transformadas por recombinación homóloga. Los cultivos se crecieron en medio YPF8%-G2%, a 30°C, en agitación constante durante 120 h. A) Medición del crecimiento mediante espectrofotometría (D.O._{600nm}). B) Determinación de ésteres totales en el extracto libre de células, durante la fermentación alcohólica, mediante la técnica del hidroxamato férrico. Los valores fueron normalizados con los datos de la cepa silvestre BY4741. Un análisis ANOVA de 2 vías se realizó, prueba post-hoc Bonferroni, en donde las barras muestran la desviación estándar de la media (n=3). *p<0.05.

3.4. Genotipo de las cepas recombinantes

Una vez identificadas las cepas sobre-productoras de ésteres, mediante ensayos por PCR se verificó si el fenotipo de sobre-expresión se asociaba a los cambios específicos realizados en el genoma.

3.4.1. Identificación de la integración *ATF1*-18S-Zeo

Como estrategia para verificar la inserción de al menos una copia del gen *ATF1* en el *locus RDN1*, se hizo una amplificación por PCR empleando la pareja de oligonucleótidos O1F y O3F.

En la cepa silvestre de *S. cerevisiae* BY4741, los genes blanco con los que hibridan los oligonucleótidos O1F y O3F, se localizan en distintos cromosomas (XII y XV, respectivamente) (Figura 25, panel A), por lo tanto, para la amplificación de un único producto de PCR, los genes *ATF1* y 18S deben estar fusionados en un arreglo similar al que se muestra en el panel B.

En el panel C, se presenta la fotografía del gel de agarosa en donde se muestra el corrimiento electroforético de los productos de PCR.

En la fotografía se observa que cuando el ADN de la cepa silvestre se utilizó como molde, no hubo amplificación (carril 2); en cambio, en las clonas recombinantes 25, 84 y 87 (carriles 5, 6 y 7), se observa una banda de aproximadamente 4900 pb, que corresponde con el tamaño de las secuencias de *ATF1* más los fragmentos de ADNr 18S y *Sh ble*. Como se esperaba, tampoco se observó amplificación cuando se empleó el ADN total de las transformantes pYES2-*ATF1*-Zeo y pYES2-Zeo (Figura 25, panel B y C).

En el carril 2 del panel D de la Figura 25, se muestra la amplificación del gen *ATF1* de la cepa silvestre; en el carril 3, se observa un fragmento de 2900 pb que corresponde a la copia endógena de *ATF1* en el genoma de la transformante 25 más la banda adicional amplificada con los oligonucleótidos O1F y O3F. Estos resultados sugieren la presencia de al menos una copia adicional del gen *ATF1* en el genoma de las levaduras transformadas con el casete *ATF1*-18S.

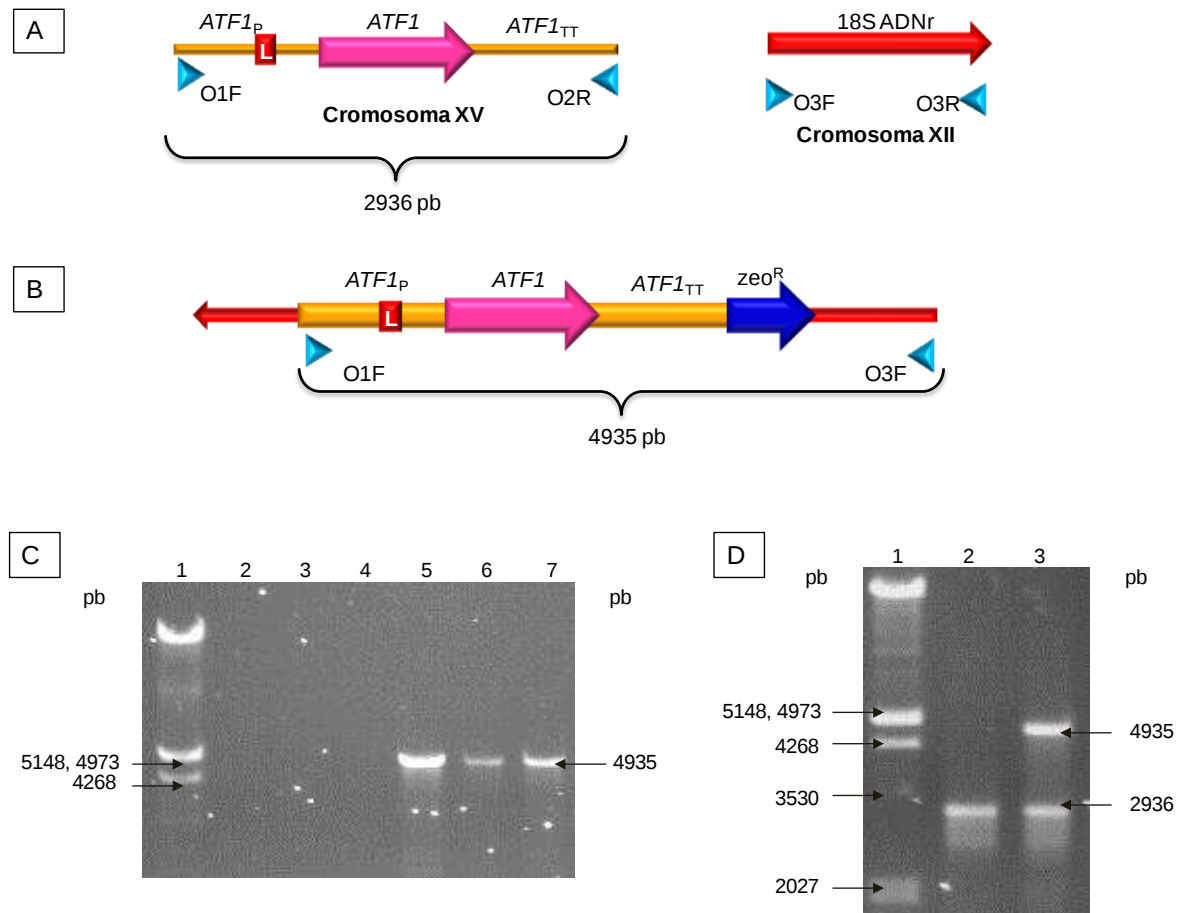


Figura 25. **PCR para la determinación del genotipo de las transformantes BY4741 ATF1-18S-Zeo.**

A) Ubicación en el genoma de los genes *ATF1* y 18S ADNr; con punta de flecha se indica el sitio de reconocimiento de los oligonucleótidos. B) Fusión de los genes *ATF1* y 18S ADNr y los sitios de hibridación de los oligonucleótidos O1F y O3F. C) Fotografía de un gel de agarosa en donde se corrieron los productos de amplificación por PCR con los oligonucleótidos O1F y O3F; 1) Marcador de tamaño molecular λ *HindIII/EcoRI*, 2) PCR con ADN molde de la cepa BY4741, 3) PCR con ADN molde de la clona BY4741 pYES2-Zeo, 4) PCR con ADN molde de la clona BY4741 pYES2-*ATF1*-Zeo, 5) PCR con ADN molde de la clona BY4741 *ATF1*-18S (25), PCR con ADN molde de la clona BY4741 *ATF1*-18S (84), PCR con ADN molde de la clona BY4741 *ATF1*-18S (87). D) Fotografía de un gel de agarosa para verificar la presencia de copia(s) adicional(es) del gen *ATF1*; 1) Marcador de tamaño molecular λ *HindIII/EcoRI*, 2) Producto de PCR con los oligonucleótidos O1F-O2R de la cepa BY4741, 3) Producto de PCR con las parejas de oligonucleótidos O1F-O2R y O1F-O3F de la clona recombinante BY4741 *ATF1*-18S (25).

3.4.2. Identificación de la duplicación del elemento LORE-Zeo

Para la verificación del genotipo de la transformante Tándem LORE, en la reacción de amplificación se utilizaron los oligonucleótidos O1F y O2R (panel A y panel B, Figura 26).

En la fotografía del gel de agarosa (panel C), se observa una banda de aproximadamente 2900 pb, la cual corresponde a la copia silvestre del gen *ATF1* (carril 2), en cambio, con el ADN de la clona recombinante se observa una banda de alrededor de 4200 pb (carril 3), por lo tanto, el incremento puede deberse a la inserción de una segunda copia del elemento LORE y del marcador de selección Zeo en el *locus*.

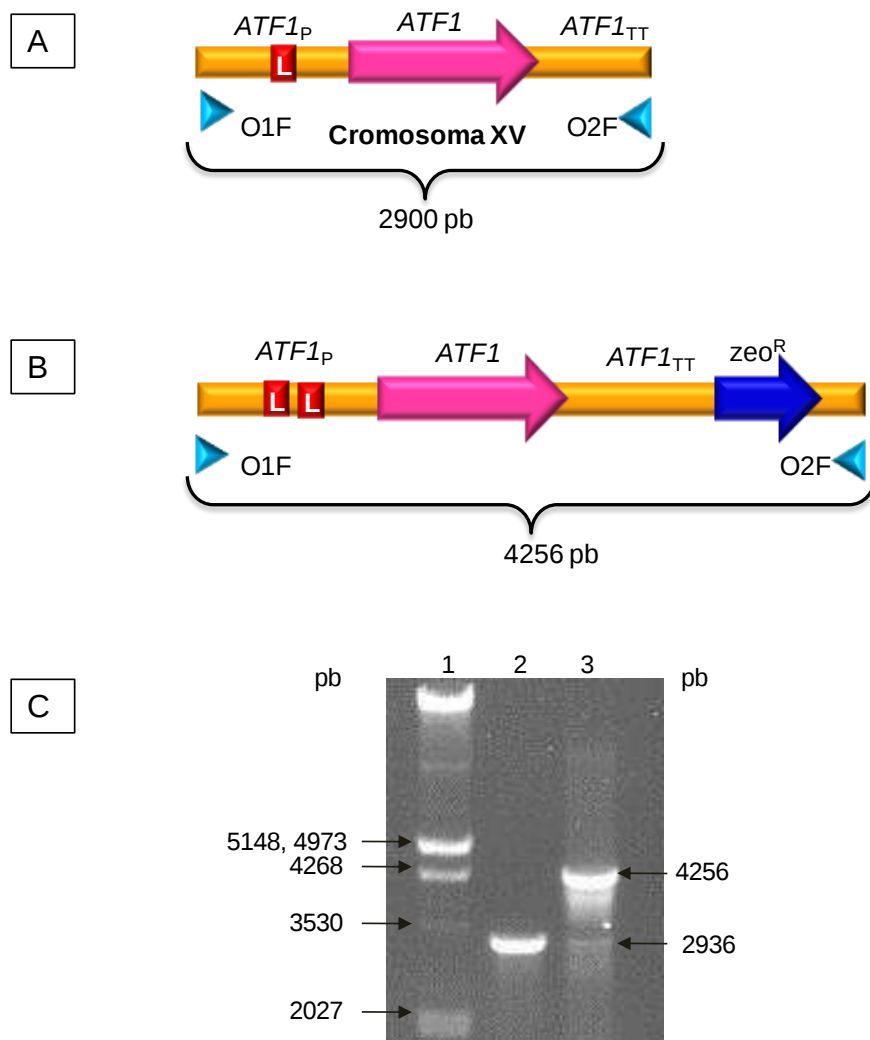


Figura 26. **PCR para la comprobación del genotipo Tándem LORE Zeo.** A) *Locus* del gen *ATF1* silvestre. B) Inserción de la segunda copia del elemento LORE y del marcador de selección (*Zeo^R*) en el gen *ATF1*, con punta de flecha se especifican los sitios de reconocimiento de los oligonucleótidos O1F y O2F. C) Fotografía de un gel de agarosa en donde se corrieron los productos de la amplificación por PCR del gen *ATF1*; 1) Marcador de tamaño molecular λ *HindIII/EcoRI*, 2) Producto de PCR con los oligonucleótidos O1F y O2R con el ADN de la cepa BY4741 como molde, 3) Producto de PCR con los oligonucleótidos O1F y O2R con el ADN de la clona BY4741 Tándem-LORE-Zeo como molde.

Con los resultados mostrados con anterioridad, se cumplió el primer objetivo del presente trabajo, el cual consistió en incrementar la expresión de *ATF1* en *S. cerevisiae* BY4741 mediante la inserción de un elemento promotor de la transcripción y/o por duplicación génica.

4. DETERMINACIÓN DE LOS PARÁMETROS FERMENTATIVOS DE LAS CEPAS RECOMBINANTES DE *S. cerevisiae* BY4741

Para la determinación de los parámetros fermentativos, se realizó una fermentación por lotes en medio YPD con glucosa al 20%, adicionado con sulfato de amonio, a 30°C y sin agitación mecánica.

Durante el transcurso de la fermentación, se monitoreó el crecimiento mediante densidad óptica ($D.O_{600nm}$) y el consumo de glucosa y la producción de etanol mediante cromatografía líquida de alta eficacia.

4.1. Consumo de glucosa y producción de etanol durante la fermentación de las cepas recombinantes

En el panel A, de la Figura 27, se observa que no hubo diferencias en el crecimiento entre las cepas en un medio de fermentación con la fuente de carbono glucosa.

En el panel B (Figura 27), se aprecia que en la fermentación, la mayor velocidad de consumo de azúcares y de producción de etanol se observó durante las primeras 48 h. Las cepas consumieron aproximadamente un 63% de la glucosa durante este tiempo; la única excepción fue la transformante Tándem-LORE, cuyo consumo fue un 10% menor.

Durante las siguientes 96 h, el cambio en la concentración de la glucosa fue menos pronunciado. La cepa silvestre, la transformada con el plásmido 2- μ y las clonas recombinantes Tándem LORE y *ATF1*-18S (clona 75), consumieron la glucosa residual casi en su totalidad (menos de 1% de glucosa residual) (panel B, Figura 27).

La clona transformante *ATF1*-18S (17) mostró una disminución en la velocidad de consumo de glucosa a partir de las 48 h y concluido el tiempo de la fermentación, la concentración en el medio fue de 2.5% (panel B, Figura 27).

Además, se observó una clara correlación entre el consumo de glucosa y la producción de etanol. La cepa silvestre, la clona transformada con el plásmido pYES2-*ATF1*-Zeo y las recombinantes *ATF1*-18S (clona 17) y *ATF1*-18S (clona 75), produjeron más del 70% del etanol total durante las primeras 48 horas de la fermentación, sin diferencias estadísticamente significativas entre ellas; no siendo así para la clona Tándem LORE, cuya producción fue significativamente menor en comparación con la silvestre (panel B, Figura 27).

Al final de la fermentación, las cepas produjeron alrededor de 10 g/L de etanol; la única excepción fue la transformante *ATF1*-18S (17), que produjo menos de 9 g/L de etanol, lo cual podría ser el resultado del menor consumo de glucosa (panel B, Figura 27). Los resultados indican que la cepa silvestre y las transformantes pYES2-*ATF1*-Zeo, Tándem LORE y *ATF1*-18S (clona 75) tuvieron una mejor capacidad de consumo de glucosa y de producción de etanol al final de la fermentación.

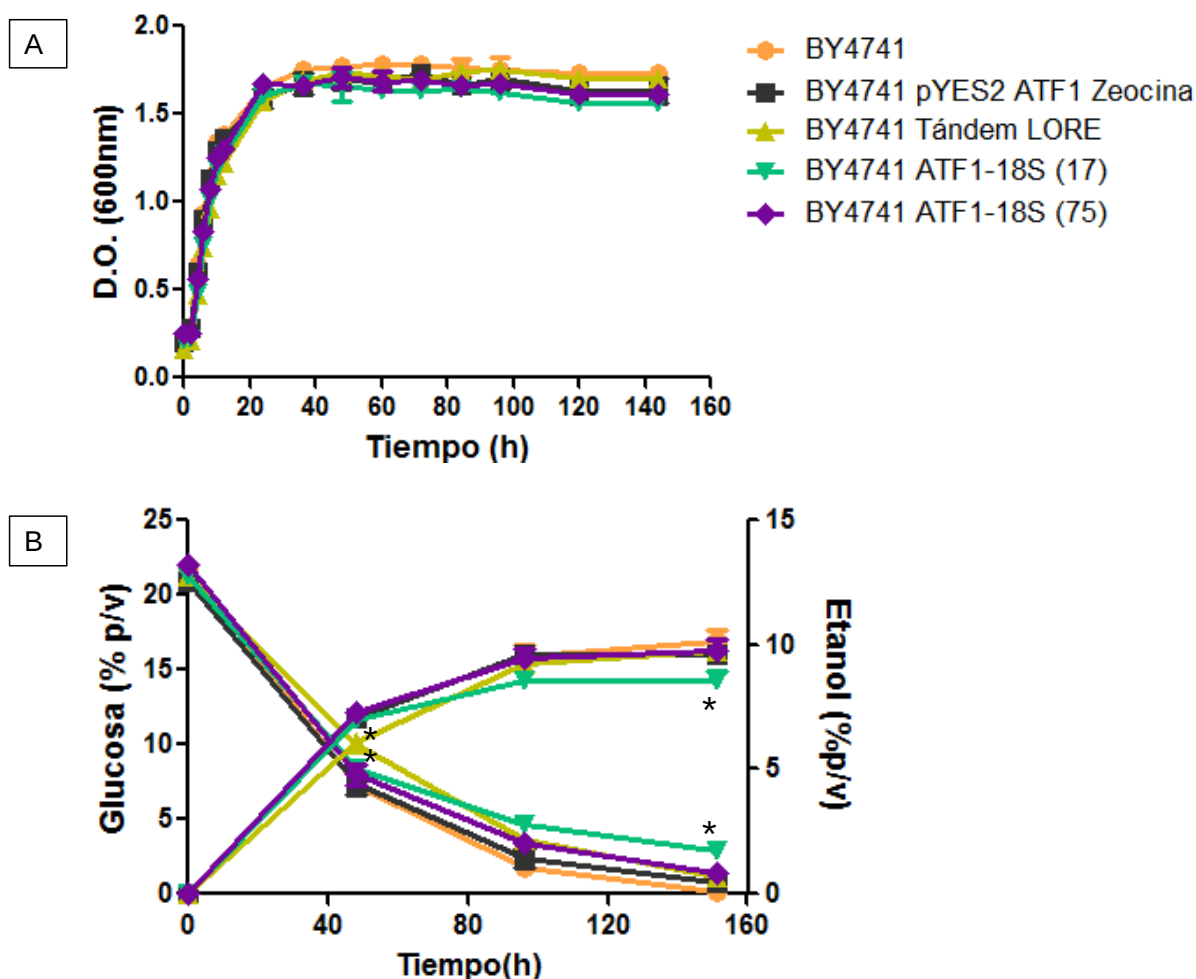


Figura 27. **Determinación del consumo de glucosa y la producción de etanol durante la fermentación por lotes.** Los cultivos de la cepa BY4741 y de las clonas especificadas se crecieron en medio YPD 20% enriquecido con sulfato de amonio, a 30°C y con agitación manual a intervalos específicos de tiempo. A) Cinética de crecimiento construida a partir de la medición de la densidad óptica a 600nm. B) Cinética de consumo de glucosa y producción de etanol generada mediante análisis por HPLC, siguiendo la metodología descrita en materiales y métodos. Se realizó un análisis de varianza ANOVA de 2 vías, prueba post-hoc Bonferroni; las barras muestran la desviación estándar de la media (n=3). *p<0.05.

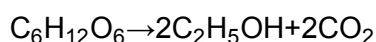
4.2. Parámetros fermentativos de las cepas recombinantes de *S. cerevisiae*

Con los datos de consumo de glucosa y producción de etanol obtenidos mediante cromatografía de líquidos se estimaron los siguientes parámetros fermentativos:

- Eficiencia teórica de producción de etanol
- Velocidad máxima de consumo de glucosa
- Producción máxima de etanol
- Velocidad específica de crecimiento

4.2.1. Eficiencia de producción de etanol

La eficiencia se calculó según lo reportado por Nicol, 2003, considerando únicamente el rendimiento de Gay Lussac:



$$180 \text{ gr} \rightarrow 92 \text{ gr} + 88 \text{ gr}$$

En donde teóricamente y de acuerdo con la ecuación anterior, el peso del alcohol producido debería ser el 51.1% del peso del azúcar consumida (180 g de glucosa o fructosa tienen un rendimiento de 92 g de alcohol etílico y 88 g de dióxido de carbono). En la realidad, el rendimiento de conversión glucosa-etanol es menor, porque una parte del azúcar es convertida en otros productos y asimilada por las levaduras durante el crecimiento en condiciones fermentativas (Niehaus, 1937; Amerine y Joslyn, 1970).

Aunque en la práctica, el rendimiento del alcohol por peso de azúcar se considera del 95% (48.5% respecto al azúcar inicial (Hewitt, 1928)), este porcentaje necesita calcularse para cada cepa. Por lo tanto, debido a la ausencia de dicha estimación, únicamente se reportó la eficiencia teórica.

En la Tabla 15, se aprecia que la eficiencia teórica de producción de etanol de las cepas de BY4741, pYES2-ATF1, Tándem LORE y ATF1-18S (clona 75) fue muy similar, con eficiencias superiores al 86%, y en conjunto son mejores productoras de etanol que la transformante ATF1-18S (clona 17), cuya estimación fue del 78%.

4.2.2. Velocidad máxima de consumo de glucosa y producción máxima de etanol

La velocidad máxima de consumo de glucosa (g/Lh) y la producción máxima de etanol (g/Lh) se calcularon en base a las concentraciones obtenidas durante las 48 h iniciales de la fermentación, período durante el cual se observó la mayor velocidad de consumo de glucosa (panel B, Figura 27).

Los valores de velocidad máxima de consumo de glucosa para la cepa silvestre y las clonas pYES2-*ATF1*-Zeo, Tándem-LORE, *ATF1*-18S-17 y *ATF1*-18S-75, fueron de 3.03, 2.79, 2.33, 2.67 y 2.91 (g)(Lh)⁻¹, respectivamente, mientras que la producción máxima de etanol, en (g)(Lh)⁻¹, fue de 1.49, 1.47, 1.27, 1.45 y 1.52, respectivamente. Por lo tanto, se deduce que la transformante Tándem LORE fue la que tuvo una menor velocidad de consumo de glucosa y de producción de etanol, debido a que estos parámetros fueron determinados con los valores obtenidos al inicio de la fermentación, sin embargo, como se describió con anterioridad, este comportamiento no afectó la eficiencia teórica de producción de etanol al final de la fermentación (Tabla 15).

4.2.3. Velocidad específica de crecimiento

Este parámetro se calculó con el programa estadístico GraphPad Prism 5 y la ecuación describe el crecimiento con un tiempo de duplicación constante. Los valores de h^{-1} , fueron superiores a 0.15, sin diferencias estadísticamente significativas entre la cepa silvestre y las clonas recombinantes seleccionadas (Tabla 15).

Tabla 15. **Parámetros fermentativos de las transformantes seleccionadas.**

Cepa	Eficiencia teórica de producción de etanol ^a (%)	Velocidad máxima de consumo de glucosa ^a (g)(Lh) ⁻¹	Producción máxima de etanol ^a (g)(Lh) ⁻¹	Velocidad específica de crecimiento μ^b (h ⁻¹)
BY4741	91.062	3.0377	1.4998	0.1577
BY4741 pYES2-ATF1-Zeo	90.143	2.7983	1.4738	0.1531
BY4741 Tándem-LORE-Zeo	90.231	2.3386 (*)	1.2700 (*)	0.1741
BY4741 ATF1-18S-Zeo-17	78.88 (*)	2.6742	1.4522	0.1652
BY4741 ATF1-18S-Zeo-75	86.585	2.9121	1.5234	0.1575

^a Cálculo a partir de la cinética de consumo de glucosa y producción de etanol (Figura 27, panel B), generada mediante cromatografía líquida (HPLC)

^b Cálculo a partir de la cinética de crecimiento en condiciones fermentativas (Figura 27, panel A) y el programa GraphPad Prism 5.

Se realizó un análisis de varianza ANOVA de una vía, prueba post-hoc Dunnett, para la comparación de los parámetros de la cepa silvestre con cada una de las clonas recombinantes (n=3). * p<0.05.

A partir de los resultados de los parámetros fermentativos, se concluye que la cepa silvestre y las clonas recombinantes BY4741 (pYES2-ATF1-Zeo), BY4741 (Tándem-LORE) y BY4741 (ATF1-18S-75) poseen una mayor capacidad fermentativa, puesto que consumen la glucosa casi en su totalidad y tienen mayor eficiencia de producción de etanol (alrededor de 90% de eficiencia).

Por otro lado, debido a su menor eficiencia teórica de producción de etanol, se descartó a la clona BY4741 (ATF1-18S-17) para los experimentos posteriores.

5. PRODUCCIÓN DE ÉSTERES Y COMPUESTOS MAYORITARIOS EN EL PROCESO DE FERMENTACIÓN ALCOHÓLICA

La determinación de los ésteres totales (método del hidroxamato férrico) en el medio de fermentación YPD 20%, se realizó al final del proceso fermentativo, tiempo en el cual, el sustrato fermentable se agotó totalmente (144 h).

Así mismo, se analizaron los compuestos mayoritarios producidos durante la fermentación alcohólica mediante cromatografía de gases (GC-FID).

5.1. Ésteres totales en el medio fermentado determinados por el método del hidroxamato férrico

Cuando se determinaron los ésteres totales por la reacción colorimétrica, la concentración de estos metabolitos en el medio de fermentación de la clona recombinante BY4741 (Tándem-LORE) fue aproximadamente 37% más elevada en comparación con la silvestre; por el contrario, no se observaron diferencias significativas entre la cepa silvestre y las clonas BY4741 (pYES2-*ATF1*-Zeo) y BY4741 (*ATF1*-18S-Zeo) (panel B, Figura 28).

Los resultados indican que la inserción de una segunda copia del elemento LORE en la región promotora del gen *ATF1* condujo a un incremento en la producción de ésteres totales, en donde el aumento observado puede deberse a la sobre-expresión del gen que codifica para la enzima acetil-transferasa (Atf1p).

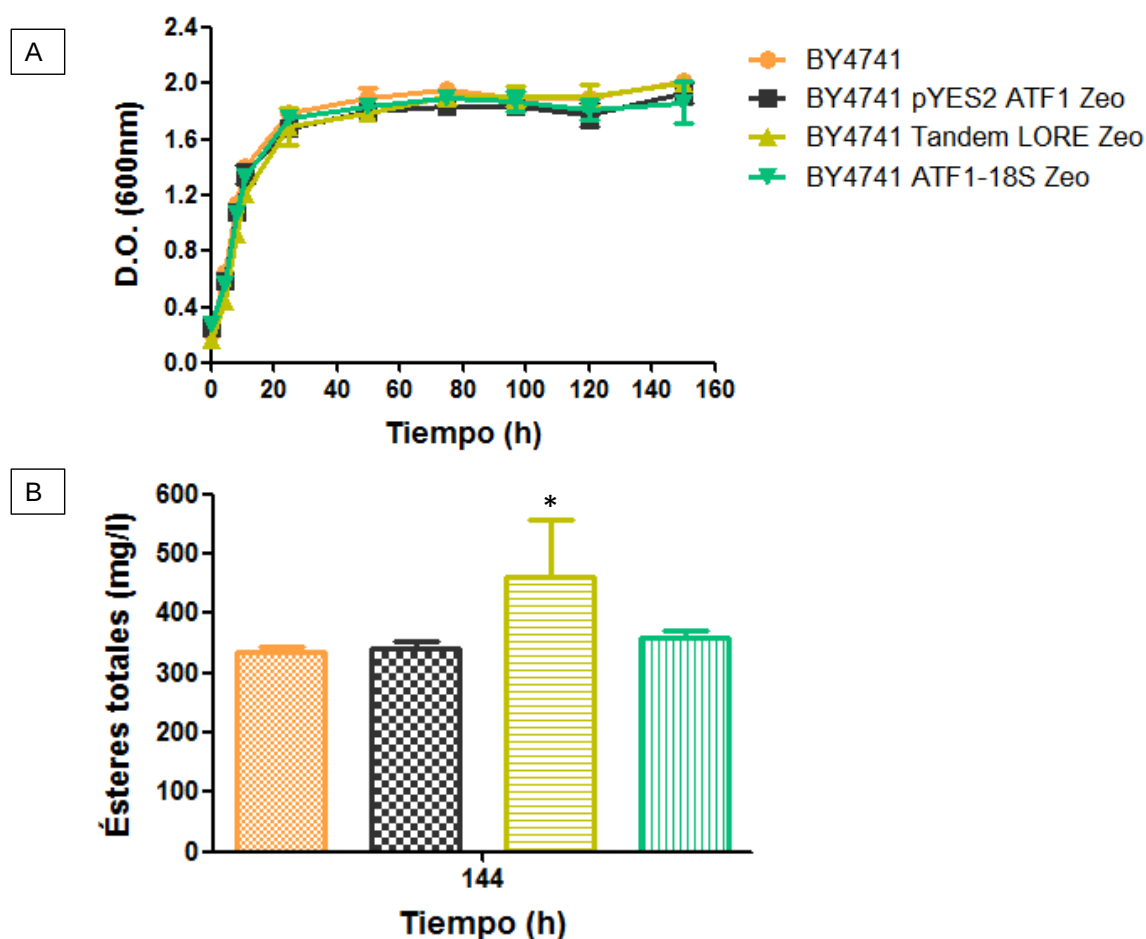


Figura 28. **Cinética de crecimiento y concentración de ésteres totales en el medio de fermentación.** Los cultivos de BY4741 se crecieron y las clonas recombinantes seleccionadas en medio YPD 20% adicionado con sulfato de amonio y la fermentación se realizó a 30°C. A) Curva de crecimiento determinada a partir de los cambios en la densidad óptica a 600nm. B) Determinación de ésteres totales con el método del hidroxamato férrico al final de la fermentación alcohólica. Se realizó un análisis ANOVA de 2 vías, con la prueba post-hoc Bonferroni (para la comparación de las curvas de crecimiento) y un análisis ANOVA de 1 vía, prueba post-hoc Dunnett (para el análisis de los ésteres totales); las barras muestran la desviación estándar de la media (n=6). Las diferencias significativas se muestran como * ($p < 0.05$).

5.2. Análisis de los productos mayoritarios de la fermentación alcohólica

Una vez encontrado que la concentración de ésteres totales se incrementó en la clona recombinante Tándem-LORE, se procedió a la determinación de los compuestos mayoritarios producidos en la fermentación alcohólica, mediante cromatografía de gases (CG-FID).

Previamente, a los medios de fermentación libres de células, se les realizó una extracción líquido-líquido con diclorometano, utilizando como patrón de extracción 2-pentanol y como patrón interno 1-pentanol (modificado de (De León-Rodríguez *et al.*, 2006)).

Los compuestos se identificaron mediante la comparación con los tiempos de retención de los estándares y se cuantificaron a partir de la curva de calibración, como se describe en materiales y métodos.

En la Tabla 16 se enlistan los compuestos identificados y su concentración en los medios de fermentación de las distintas clonas.

En todos los casos, como era de esperarse, el etanol fue el componente más abundante en el medio de fermentación como resultado de la bio-transformación del azúcar por las levaduras (el analito no fue cuantificado).

Se observa que los alcoholes: metanol, 1-propanol y alcohol isoamílico, mostraron una proporción similar en las distintas clonas de levadura, independientemente de la modificación genética realizada. Tampoco se encontraron diferencias significativas en la concentración del éster: acetato de etilo.

Las concentraciones del isobutanol y 2-butanol se modificaron en respuesta a la transformación genética. Las concentraciones de los alcoholes superiores fueron significativamente menores para las cepas recombinantes en comparación con la silvestre, excepto para el isobutanol en la cepa BY4741 (Tándem-LORE).

Adicionalmente, se identificaron dos analitos cuya concentración (área) se modificó debido a los cambios realizados en el genoma, los cuales tienen tiempos de retención de 15.19 min y 15.77 min.

El área del analito con el tiempo de retención de 15.19 min para la clona recombinante BY4741 (Tándem-LORE) fue 2.2 veces incrementada con respecto a la cepa silvestre (Tabla 18). Además, fue el único compuesto con un área significativamente mayor, en comparación con la cepa parental; por lo tanto, se sugiere que este compuesto podría ser el principal responsable de las diferencias observadas con el método de determinación de ésteres del hidroxamato férrico (Figura 28).

Por último, se identificó un compuesto con un tiempo de retención de 15.77 min, cuya área fue significativamente menor en la clona recombinante BY4741 (*ATF1*-18S-Zeo), en comparación con la cepa silvestre (Tabla 16).

Tabla 16. **Compuestos mayoritarios producidos durante la fermentación.**

Compuesto	T.R. (min)	Concentración (mg/100 mL)			
		BY4741	BY4741 (pYES2- <i>ATF1</i> -Zeo)	BY4741 (Tándem- <i>LORE</i> -Zeo)	BY4741 (<i>ATF1</i> -18S-Zeo)
Metanol	2.9292	2.83 (0.59)	2.65 (0.31)	2.48 (0.91)	3.01 (1.12)
1-Propanol	4.7433	5469.28 (841.51)	4806.21 (839.89)	4806.21 (1460.14)	5063.5 (1357.27)
2-Butanol	5.3534	0.56 (0.04)	0.29 (0.02)*	0.00 (0.00)*	0.25 (0.06)*
Acetato de etilo	6.7448	0.23 (0.01)	0.18 (0.02)	0.19 (0.06)	0.21 (0.07)
Isobutanol	7.0168	0.34 (0.04)	0.19 (0.02)*	0.39 (0.06)	0.18 (0.02)*
Alcohol isoamílico	9.9477	4.33 (0.38)	3.94 (0.63)	4.91 (0.65)	4.14 (0.29)
Alcohol amílico	10.054	1.58 (0.12)	1.38 (0.15)	1.66 (0.16)	1.40 (0.20)
2-Pentanol	8.9203	478.85 (0.00)	478.85 (0.00)	478.85 (0.00)	478.85 (0.00)
Área bajo la curva (unidades arbitrarias)					
NI	15.195	$2.83 \times 10^5 (9.8 \times 10^4)$	$1.1 \times 10^5 (4.4 \times 10^4)$	$6.3 \times 10^5 (3.5 \times 10^4)^*$	$1.5 \times 10^5 (6.3 \times 10^4)$
NI	15.779	$5.22 \times 10^6 (1.2 \times 10^6)$	$4.09 \times 10^6 (5.2 \times 10^5)$	$3.27 \times 10^6 (1.8 \times 10^5)$	$3.1 \times 10^6 (9.5 \times 10^4)^*$
1-pentanol	10.846	$1.72 \times 10^8 (3.2 \times 10^6)$	$1.71 \times 10^8 (2.5 \times 10^6)$	$1.70 \times 10^8 (4.6 \times 10^6)$	$1.72 \times 10^8 (2.6 \times 10^6)$

T. R. Tiempo de retención.

NI. No identificado

Los datos se normalizaron con el área del estándar de extracción para disminuir el error asociado al proceso de extracción.

Para la comparación de los datos de la cepa silvestre de *S. cerevisiae* BY4741 con cada una de las clonas recombinantes se utilizó la distribución t de student, en donde la desviación estándar de la media se indica entre paréntesis. Las diferencias significativas se muestran como *(p<0.05).

VIII. DISCUSIÓN

En la presente investigación, se logró incrementar la producción de ésteres de acetato durante la fermentación alcohólica, mediante el aumento de la expresión del gen *ATF1*, al modificar el genoma de *S. cerevisiae* BY4741 con las secuencias construidas *in vitro*: Tándem-LORE y *ATF1*-18S.

Ambos casetes se diseñaron para integrarse en los respectivos *loci*, mediante recombinación homóloga, con los objetivos de aumentar el número de copias del gen *ATF1* (mediante la fusión con el gen ribosomal 18S) y de insertar una segunda copia del elemento de respuesta LORE, en posición tándem respecto a la copia silvestre, en el promotor del gen *ATF1*.

Durante la fase de la transformación, además de los casetes Tándem-LORE y *ATF1*-18S, también se transformó a *S. cerevisiae* BY4741 con el plásmido de expresión pYES2-*ATF1*-Zeo, pero a diferencia de éste, las modificaciones mediante recombinación homóloga tuvieron varias ventajas: durante la fermentación, no se requirió un substrato específico para inducir la expresión; además la expresión no fue constitutiva sino regulada por el elemento de respuesta LORE y los demás elementos de control transcripcional; y por último, no se requirió selección continua para el mantenimiento de las construcciones, probablemente porque la expresión no fue deletérea para la célula.

En la transformación de *S. cerevisiae* VIN13 con plásmidos linearizados, tampoco se requirió un medio selectivo, debido a que los plásmidos se integraron en la copia genómica del gen *ILV2* (Lilly *et al.*, 2006).

Por lo tanto, se sugiere que las transformantes integrativas podrían ser mitóticamente estables, debido a que la integración por recombinación homóloga en los cromosomas de la levadura es la manera más estable de mantener a los genes (Orr-Weaver *et al.*, 1981). De hecho, se reportó que en la cepa de levadura TY3, el empleo de las secuencias de ADNr 18S, permitió la expresión estable del gen que codifica para la dextranasa *LSD1* (Wang *et al.*, 2012).

Durante el proceso de transformación integrativa con los casetes *ATF1*-18S y Tándem-LORE, la mayor eficiencia de transformación se observó cuando se empleó a la fusión *ATF1*-18S, la cual incluso fue más alta que cuando se transformó con los plásmidos basados en 2- μ .

Se proponen algunos mecanismos que podrían explicar las diferencias observadas en la eficiencia de transformación entre las dos modificaciones propuestas (*ATF1*-18S y Tándem LORE):

- La variabilidad natural de las diferentes regiones genéticas para la recombinación afecta la frecuencia de integración; por ejemplo, la región *LEU2* exhibe una frecuencia de integración aproximadamente 100 veces menor comparada con la región *HIS3* (Rothstein, 1991). Por lo tanto, se espera que el gen 18S ADNr esté más conservado en comparación con las secuencias 5' UTR y 3' UTR del gen *ATF1* (recuérdese que los *loci* empleados para las construcciones fueron amplificados del ADN genómico de *S. cerevisiae* UMARN3 y por lo tanto, podría haber variaciones en la secuencia con el genoma de *S. cerevisiae* BY4741).
- El número de sitios homólogos en el genoma de la cepa receptora. Para la integración de la construcción *ATF1*-18S, existen entre 100 a 200 copias de la repetición de 9.1 kb, en el *locus RDN1* (Venema y Tollervey, 1999), en cambio, para el casete Tándem LORE, únicamente existe un sitio para la recombinación en la cepa haploide BY4741.

En la transformación por recombinación homóloga, también se observó la estimulación de la frecuencia de transformación debido a la presencia de 2 extremos homólogos libres en las secuencias de ADN, en comparación con la eficiencia de transformación con ADN plasmídico circular y con la presencia de un único extremo homólogo. Lo anterior podría deberse a que los extremos libres en el ADN son más susceptibles a los procesos de recombinación que las moléculas circulares y a que los dos extremos podrían actuar de manera cooperativa durante la integración (Orr-Weaver *et al.*, 1981).

Los dos casetes construidos (Tándem LORE y *ATF1*-18S), además de tener un efecto diferencial en la eficiencia de transformación, también influenciaron la producción de ésteres durante la fermentación alcohólica.

Para caracterizar el perfil de producción de ésteres de las clonas recombinantes, se realizaron fermentaciones en diferentes fuentes de carbono (fructosa-galactosa y glucosa) y se determinó la producción de ésteres mediante la reacción colorimétrica con la hidroxilamina.

A tiempos tempranos (< 24 h) de la cinética de producción de ésteres en fructosa-galactosa (YPF8%-G2%), no se observaron diferencias en la concentración de ésteres en los medios de fermentación de las clonas integrativas y la silvestre, así como tampoco entre las levaduras transformadas con los plásmidos 2- μ y su fondo genético.

Las diferencias en la concentración de ésteres entre las clonas recombinantes y su fondo genético, se observaron entre las 48 y 72 h de la fermentación alcohólica; sin embargo, al final de la fermentación, las diferencias ya no fueron significativas.

Probablemente, durante las primeras 24 h de la cinética de producción de ésteres con las clonas recombinantes, en YPF8%-G2%, no se observó la sobre-producción de ésteres, debido a que en este tiempo, la demanda metabólica de acetil-CoA para la producción de ácidos grasos insaturados y esteroides, necesarios para el crecimiento celular, es elevada, resultando en una deficiencia de acetil-CoA para la síntesis de ésteres (Yoshioka y Hashimoto, 1983; Swiegers y Pretorius, 2005; Dufour *et al.*, 2003). La inducción en la producción de ésteres (entre las 48 y 72 h de la fermentación) podría corresponder al tiempo en el que se establece un equilibrio entre el consumo de acetil-CoA para la síntesis de ácidos grasos y esteroides y para la producción de ésteres ó cuando la síntesis de los primeros se detiene, y por lo tanto, hay un incremento en los niveles celulares de acetil-CoA (Swiegers y Pretorius, 2005). Así mismo, el estímulo en la síntesis de ésteres podría estar relacionado con la disponibilidad del otro sustrato: un alcohol superior.

Al final de la fermentación, la esterasa codificada por el gen *IAH1* podría hidrolizar los ésteres, lo cual explicaría la similitud en la concentración de ésteres totales en el medio de fermentación de las clonas transformantes (integrativas) y su fondo genético. Se reportó que la enzima *lah1p* actúa principalmente sobre el etil-acetato, hexil-acetato, isoamil-acetato y 2 fenil-etil-acetato, probablemente debido a que tiene mayor afinidad por estos sustratos, los cuales a su vez, son los productos de la alcohol acetil-transferasa codificada por el gen *ATF1* (Lilly *et al.*, 2006).

De manera interesante, en las distintas clonas recombinantes *ATF1*-18S, la producción de ésteres durante la fermentación en YPF8%-G2% no fue homogénea, probablemente debido a diferencias en el número copias del gen *ATF1* integradas en el *locus RDN1* o a discrepancias en la eficiencia transcripcional por la presencia del promotor Pol I (el promotor reconocido por la ARN Polimerasa I) río arriba del gen *ATF1*, el cual tiene un promotor Pol II (transcripción a cargo de la ARN Polimerasa II), entre las distintas clonas.

Sin embargo, aún con las diferencias en el perfil de producción de ésteres observadas durante la fermentación entre las distintas clonas recombinantes *ATF1*-18S, se sugiere que la(s) copia(s) adicional(es) del gen *ATF1* en el *locus* ADNr 18S condujeron al incremento en la acumulación de ésteres en el medio de fermentación, por lo tanto, las clonas se clasificaron como sobre-productoras de ésteres.

A diferencia de la fermentación en YPF8%-G2%, en la fermentación en glucosa (YPD 20%), solamente se determinó la concentración de ésteres totales al final de la fermentación (144 h). Bajo estas condiciones, únicamente se observaron diferencias significativas en la concentración de ésteres en el medio de fermentación de la clona Tándem-LORE, en comparación con su fondo genético.

Por lo tanto, la inserción de una segunda copia del elemento LORE en posición contigua respecto al elemento *cis* silvestre, en el promotor del gen *ATF1*, fue efectiva para incrementar la producción de ésteres, sin la necesidad de realizar modificaciones drásticas en el genoma de la levadura. En donde la adición de 30 nucleótidos (longitud del elemento LORE) incrementó la expresión del gen *ATF1* en las dos condiciones de fermentación evaluadas.

El fenotipo obtenido con la modificación génica Tándem-LORE podría sugerir la naturaleza modular del promotor de *ATF1*, en donde el incremento de los sitios de unión de activadores transcripcionales, podría facilitar el ensamblaje del complejo de la transcripción, ya que se ha reportado que de manera general, los activadores hacen contacto con los factores de transcripción generales o con co-activadores (Hampsey, 1998). De hecho, en los genes relacionados con el metabolismo de la galactosa, el número de sitios UAS^{GAL} (UAS, secuencia de activación río arriba) determina el grado de activación por el regulador Gal4p, un factor de transcripción bidominio que actúa reclutando los complejos SAGA, mediador y otros componentes de la maquinaria transcripcional (Feldmann, 2011).

Además, se sugiere que la concentración y/o el tipo de azúcares influenciaron la producción máxima de ésteres totales, debido a que en la fermentación con fructosa 8%-galactosa 2%, con la clona Tándem-LORE, la mayor concentración de ésteres se observó a las 72 h, con un valor promedio de 328 mg/L y en glucosa al 20% fue de 461 mg/L a las 144 h.

Lo anterior concuerda con lo reportado por Younis y Stewart, 1998, en donde se observó que en las cepas de *S. cerevisiae* evaluadas, las concentraciones de etil-acetato, isoamil-acetato y etil-butarato incrementaron cuando se duplicó la concentración del azúcar (2 a 4%). Así mismo, las mayores concentraciones se obtuvieron cuando se fermentó fructosa 4% (Younis y Stewart, 1998).

Conjuntamente con la cuantificación de los ésteres totales con el método de la hidroxilamina, en la fermentación en glucosa al 20%, se evaluó la producción de los siguientes compuestos mayoritarios por las clonas recombinantes mediante CG-FID: metanol, 1-propanol, 2-butanol, acetato de etilo, isobutanol, alcohol isoamílico, alcohol amílico y las moléculas con tiempos de retención de 15.1 y 15.7 min.

Dentro de este grupo de analitos, no hubo diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones de los alcoholes metanol, 1-propanol, alcohol isoamílico y alcohol amílico, entre el medio de fermentación de cada una de las clonas recombinantes y el de la cepa parental.

Tampoco se encontraron diferencias significativas en la concentración del éster acetato de etilo, aunque es uno de los productos principales de la enzima Atf1p, y según lo reportado en la literatura, es el uno de los ésteres que más incrementa durante la sobre-expresión del gen *ATF1*. Por ejemplo, en la cepa VIN13, la expresión constitutiva de *ATF1* condujo a un incremento de 12 veces en la concentración de etil-acetato y de 10 veces en la isoamil-acetato en el vino de mesa Colombard, sin embargo, aún y cuando la proporción fue similar, la concentración final de etil-acetato (mg/L) fue 10 veces mayor (Lilly *et al.*, 2006). Análogamente, en la cepa comercial ale CMB212, la sobre-expresión de *ATF1* incrementó 24 veces la concentración de etil-acetato y más de 180 veces la de isoamil-acetato, pero la concentración final de etil-acetato fue 4 veces mayor (Verstrepen *et al.*, 2003d).

Probablemente, no se observaron diferencias en la producción de etil-acetato porque la cepa de *S. cerevisiae* BY4741 tiene un perfil de producción de ésteres diferente al de las cepas empleadas por Verstrepen *et al.*, 2003d y/o Lilly *et al.*, 2006, y/o a diferencias en las condiciones de fermentación.

En el presente trabajo se empleó como cepa hospedera para el estudio de sobre-expresión, a la cepa de laboratorio (BY4741), mientras que Verstrepen *et al.*, 2003d y Lilly

et al., 2006, emplearon a cepas industriales de *S. cerevisiae*. Se reportó que uno de los factores con mayor influencia en la producción de ésteres es la cepa de la levadura, en donde el promedio y la proporción relativa de los ésteres individuales difieren de cepa a cepa (Peddie, 1990). Se sugiere que en las diferentes cepas, la enzima Atf1p podría tener diferentes propiedades debido a mutaciones en el gen *ATF1* (Verstrepen *et al.*, 2003d). Así mismo, la influencia que tienen los parámetros de la fermentación depende del fondo genético (Verstrepen *et al.*, 2003b).

En base a los trabajos de Verstrepen *et al.*, 2003d y Lilly *et al.*, 2006, también se esperaba observar un incremento en la producción de isoamil-acetato, pero no fue posible su identificación debido a que no se contaba con el estándar para determinar el tiempo de retención del analito.

A diferencia de los analitos antes señalados, en la identificación de compuestos mayoritarios mediante CG-FID, se observaron diferencias significativas en la concentración de 2-butanol, isobutanol y los compuestos con tiempos de retención de 15.1 y 15.7 min.

La concentración de los alcoholes superiores (2-butanol e isobutanol) en el medio de la fermentación fue significativamente menor en las clonas recombinantes en comparación con la silvestre, excepto para el isobutanol en la cepa BY4741 (Tándem-LORE).

La disminución en la concentración de ciertos alcoholes superiores, en el medio de fermentación de las clonas sobre-expresantes del gen *ATF1*, concuerda con lo observado por Lilly *et al.*, 2000, en donde se incrementó la expresión del gen *ATF1* y posteriormente se cuantificó la producción de compuestos mediante cromatografía de gases.

Cuando Lilly *et al.*, 2000 produjeron vino blanco y vino base, observaron que la concentración de los alcoholes superiores disminuyó (propanol, hexanol, alcohol isoamílico y 2 fenil etanol), cuando la fermentación se realizó con las cepas sobre-expresantes del gen *ATF1*, en comparación con los vinos obtenidos con las cepas silvestres VIN7, VIN13 y WE228. Así mismo, el decremento en la concentración de los alcoholes correspondió con el incremento en la concentración de los ésteres (Lilly *et al.*, 2000).

De manera similar, Fukuda *et al.*, 1998, construyeron cepas de levadura con diferente número de copias del gen *ATF1* y las utilizaron para la producción de sake. En la bebida

fermentada producida con las clonas sobre-expresantes (YPHT/YEp24-*ATF1* y YPT1/YEp24-*ATF1*), también se observó la reducción en la concentración del alcohol isoamílico. Los autores atribuyeron la disminución al consumo del alcohol superior por la AATasa, debido a que el alcohol isoamílico es uno de los sustratos empleados por la enzima Atf1p para la producción de isoamil acetato (Fukuda *et al.*, 1998).

En comparación con lo reportado por Lilly *et al.*, 2000 y Fukuda *et al.*, 1998, en el presente trabajo de investigación, los alcoholes cuya concentración fue significativamente menor fueron el 2-butanol y el isobutanol. El 2-butanol disminuyó en todas las transformantes, mientras que el isobutanol, únicamente fue menor para las clonas BY4741 (pYES2-Zeo) y BY4741 (*ATF1*-18S-Zeo). Por lo que el decremento en la concentración de los alcoholes superiores (2-butanol e isobutanol), podría ser debido a la mayor producción de ésteres por parte de las clonas recombinantes, sin embargo, a excepción de la cepa BY4741 (Tándem-LORE-Zeo), para las clonas transformadas con el plásmido 2- μ y con la fusión *ATF1*-18S no se identificó este incremento en las condiciones de fermentación evaluadas (YPD 20%).

Dentro de la pareja de los compuestos no identificados (moléculas con tiempos de retención de 15.1 min y 15.7 min), el analito con un tiempo de retención de 15.1 min tuvo un área bajo la curva significativamente mayor únicamente en la clona BY4741 Tándem-LORE, respecto al área de la cepa silvestre.

La molécula con el tiempo de retención de 15.1 min podría corresponder al isoamil-acetato, debido a que en un estudio previo en donde se sobre-expresó el gen *ATF1* en una cepa de levadura industrial tipo lager, fue el éster con un mayor incremento (27 veces), seguido del etil-acetato (9 veces) (Fujii *et al.*, 1994). Por lo tanto, el éster es uno de los productos principales de la enzima Atf1p.

IX. CONCLUSIÓN

La duplicación del elemento LORE en posición tándem en la región promotora del gen *ATF1* y la fusión génica *ATF1*-18S incrementaron la síntesis de ésteres.

X. PERSPECTIVAS

- Evaluar la expresión del gen *ATF1* a nivel transcripcional y traduccional en las clonas recombinantes de *S. cerevisiae*.
- Analizar los compuestos volátiles mayoritarios y minoritarios producidos durante la fermentación alcohólica después de someter a destilación los mostos obtenidos.

XI. BIBLIOGRAFÍA

Agenbach, W.A. (1977). A study of must nitrogen content in relation to incomplete fermentations, yeast production and fermentation activity. Proceedings of the South African Society of Enology and Viticulture, 66-68.

Aguilera, F., Peinado, R.A., Millan, C., Ortega, J.M., Mauricio, J.C. (2006). Relationship between ethanol tolerance, H⁺ -ATPase activity and the lipid composition of the plasma membrane in different wine yeast strains. International Journal of Food Microbiology, 110, 34-42.

Alexandre, H., Rousseaux, I., Charpentier, C. (1994). Ethanol adaptation mechanisms in *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnology and Applied Biochemistry, 20, 173-183.

Amberg, D.C., Burke, D.I., Strathern, J.N. (2005). Methods in yeast genetics. A cold spring harbor laboratory course manual. Nueva York, USA. Cold Spring Harbor Laboratory Press. Experiment V, 43-51.

Amerine, M.A., Joslyn, M.A. (1970). Table wines: the technology of their production. California, USA. University of California Press. Chapter 9, 348-350.

Andreasen, A.A., Stier, T.J.B. (1953). Anaerobic nutrition of *Saccharomyces cerevisiae*. I. Ergosterol requirement for growth in a defined medium. Journal of Cellular and Comparative Physiology, 41, 23-36.

Arrizon, J., Gschaedler, A. (2002). Increasing fermentation efficiency at high sugar concentrations by supplementing an additional source of nitrogen during the exponential phase of the tequila fermentation process. Canadian Journal of Microbiology, 48, 965-970.

Aylon, A., Kupiec, M. (2004). New insights into the mechanism of homologous recombination in yeast. Mutation Research/Reviews in Mutation Research, 566, 231-248.

Bauer, F.F., Pretorius, I.S. (2000). Yeast stress response and fermentation efficiency: how to survive the making of wine-a review. South African Journal for Enology and Viticulture, 21, 27-51.

Becker, D.M., Guarente, L. (1991). High-efficiency transformation of yeast by electroporation. *Methods in Enzymology*, 194, 182-187.

Bernardino-Gómez, S. (2011). Obtención and evaluación del fenotipo de una mutante en el gen *SSC1* de *Kluyveromyces marxianus*. Laboratorio de Biotecnología Microbiana, IIQB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de licenciatura. Morelia, Michoacán.

Birnboim, H.C., Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Research*, 7, 1513-1523.

Boles, E., Hollenberg, C.P. (1997). The molecular genetics of hexose transport in yeasts. *FEMS Microbiology Reviews*, 21, 85-111.

Boulton, C.A., Quain, D. (2001). *Brewing yeast and fermentation*. Oxford, Inglaterra. Blackwell Science. Chapter 3, 69-142.

Boulton, R.B., Singleton, V.L., Bisson, L.F., Kunkee, R.E. (1996). Yeast and biochemistry of ethanol fermentation, En: *Principles and Practices of Winemaking*. Nueva York, USA. Springer-Science. Chapter 4, 102-192.

Breunig, K., Steensma, H.Y. (2003). *Kluyveromyces lactis*: genetics, physiology, and application. En: *Functional Genetics of Industrial Yeasts*. Berlin, Alemania. Springer Verlag. Chapter 6, 171-206.

Broach, J.R., Strathern, J.N., Jones, E.W. (1981). The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*. Nueva York, USA. Cold Spring Harbor Laboratory. Chapter 13, 445-470.

Buratowski, S. (2005). Connections between mRNA 3' end processing and transcription termination. *Current Opinion in Cell Biology*, 17, 257-261.

Calderbank, J., Hammond, J.R.M. (1994). Influence of higher alcohol availability on ester formation by yeast. *Journal of the American Society of Brewing Chemists (USA)*, 52, 84-90.

Carle, G. F., Olson, M.V. (1985). An electrophoretic karyotype for yeast. Proceedings of the National Academy of Sciences, 82, 3756-3760.

Carlson, M. (1999). Glucose repression in yeast. Current Opinion in Microbiology, 2, 202-207.

Cauet, G., Degryse, E., Ledoux, C., Spagnoli, R., Achstetter, T. (1999). Pregnenolone esterification in *Saccharomyces cerevisiae*. A potential detoxification mechanism. European Journal of Biochemistry, 261, 317-324.

Chabes, A., Domkin, V., Larsson, G., Liu, A., Graslund, A., Wijmenga, S., Thelander, L. (2000). Yeast ribonucleotide reductase has a heterodimeric iron-radical-containing subunit. Proceedings of the National Academy of Science, 97, 2474-2479.

Chambers, M. (2008). Frommer's Niagara region. Canadá. John Wiley & Sons. Appendix B, 202-208.

Chellappa, R., Kandasamy, P., Oh, C.S., Jiang, A., Vemula, M., Martin, C.E. (2001). The membrane proteins, Spt23p and Mga2p, play distinct roles in the activation of *Saccharomyces cerevisiae* *OLE1* gene expression. Fatty acid-mediated regulation of Mga2p activity is independent of its proteolytic processing into a soluble transcription activator. The Journal of Biological Chemistry, 276, 43548-43556.

Chi, Z., Arneborg, N. (1999). Relationship between lipid composition, frequency of ethanol-induced respiratory deficient mutants, and ethanol tolerance in *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of Applied Microbiology, 86, 1047-1052.

Clarkson, S.P., Large, P.J., Boulton, C.A., Bamforth, C.W. (1991). Synthesis of superoxide dismutase, catalase and other enzymes and oxygen and superoxide toxicity during changes in oxygen concentration in cultures of brewing yeast. Yeast, 7, 91-103.

Colligan, J.E., Kruisbeek, A.M., Margulies, D.H., Shevach, E.M. (1991). Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability. En: Current Protocols in Immunology. Nueva York, USA. John Wiley. A3.3-A3.4.

Cristiani, G., Monnet, V. (2001). Food micro-organisms and aromatic ester synthesis. *Sciences des aliments*, 21, 211-230.

De León-Rodriguez, A., González-Hernández, L., Barba de la Rosa, A.P., Escalante-Minakata, P., López, M.G. (2006). Characterization of volatile compounds of Mezcal, an ethnic alcoholic beverage obtained from *Agave salmiana*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54, 1337-1341.

De Vit, M.J., Waddle, J., Johnston, M. (1997). Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Molecular Biology of the Cell*, 8, 1603-1618.

Debourg, A. (1999). Yeast flavour metabolites. *European Brewery Convention Monograph*, 28, 60-73.

Derrick, S., Large, P.J. (1993). Activities of the enzymes of the Ehrlich pathway and formation of branched-chain alcohols in *Saccharomyces cerevisiae* and *Candida utilis* grown in continuous culture on valine or ammonium as sole nitrogen source. *Journal of General Microbiology*, 139, 2783-2792.

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

Dickinson, J.R., Norte, V. (1993). A study of branched-chain amino acid aminotransferase and isolation of mutations affecting the catabolism of branched-chain amino acids in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Letters*, 326, 29-32.

Drawert, F., Tressl, L. (1972). Beer aromatics and their origin. *Master Brewers Association of Americas Technical Quarterly* 9, 72-76.

Dufour, J.P., Malcorps, P., Silcock, P. (2003). Control of ester synthesis during brewery fermentation. En: *Brewing Yeast Fermentation Performance*, 2 edition. Malden, Massachusetts, USA. Blackwell Science. Chapter 21, 213-228.

Dufour, J.P., Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G. (2002). Brewing yeast. En: Yeast in food. Hamburgo, Alemania. Behr's Verlag Gmbh & Co. Chapter 13, 347-383.

Dujon, B. (1996). The yeast genome project: what did we learn? Trends in Genetics, 12, 263-270.

Eden, A., Simchen, G., Benvenisty, N. (1996). Two yeast homologs of *ECA39*, a target for c-Myc regulation, code for cytosolic and mitochondrial branched-chain amino acid aminotransferases. The Journal of Biological Chemistry, 271, 20242-20245.

Eden, A., Van Nedervelde, L., Drukker, M., Benvenisty, N., Debours, A. (2001). Involvement of branched-chain amino acid aminotransferases in the production of fusel alcohols during fermentation in yeast. Applied Microbiology and Biotechnology, 55, 296-300.

Egli, C.M., Springer, C., Braus, G.H. (1995). A complex unidirectional signal element mediates *GCN4* mRNA 3' end formation in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cell Biology, 15, 2466-2473.

Ehrlich, F. (1904). Über das Natürliche Isomere des Leucins. Berichte der Deutschen Chemischen Gesellschaft, 37, 1809-1840.

Engan, S. (1972). Organoleptic threshold values of some alcohols and esters in beer. Journal of the Institute of Brewing, 78, 33-36.

Engan, S. (1974). Esters in beer. Brewers Digest, 49, 40-48.

Engel, S.R., Dietrich, F.S., Fisk, D.G., Binkley, G., Balakrishnan, R., Costanzo, M.C., Dwight, S.S., Hitz, B.C., Karra, K., Nash, R.S. (2013). The Reference Genome Sequence of *Saccharomyces cerevisiae*: Then and Now. G3: Genes| Genomes| Genetics, 4, 1-42.

Feldmann, H. (2011). Yeast: molecular and cell biology. Weinheim, Alemania. Wiley-Blackwell. Chapter 6, 85-106, Chapter 7, 109-143.

Ferreira, V., Fernández, P., Peña, C., Escudero, A., Cacho, J.F. (1995). Investigation on the role played by fermentation esters in the aroma of young Spanish wines by multivariate analysis. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 67, 381-392.

Fleet, G.H., Heard, G.M. (1993). Yeast-growth during fermentation. En: *Wine microbiology and biotechnology*. Chur, Suiza. Harwood Academic Publishers. Chapter 2, 27-54.

Fugelsang, K.C., Edwards, C.G. (2007). *Wine microbiology practical applications and procedures*, 2 edition. Nueva York, USA. Springer. Chapter 1, 3-28.

Fujii, T., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Furukawa, S., Tamai, A. (1997). Effect of aeration and unsaturated fatty acids on expression of the *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 63, 910-915.

Fujii, T., Nagasawa, N., Iwamatsu, A., Bogaki, T., Tamai, A., Hamachi, M. (1994). Molecular cloning, sequence analysis, and expression of the yeast alcohol acetyltransferase gene. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 2786-2792.

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

Fujii, T., Yoshimoto, H., Tamai, Y. (1996b). Acetate ester production by *Saccharomyces cerevisiae* lacking the *ATF1* gene encoding the alcohol acetyltransferase. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 81, 538-542.

Fujiwara, D., Kobayashi, O., Yoshimoto, H., Harashima, S., Tamai, A. (1999). Molecular mechanism of the multiple regulation of the *Saccharomyces cerevisiae* *ATF1* gene encoding alcohol acetyltransferase. *Yeast*, 15, 1183-1197.

Fujiwara, D., Yoshimoto, H., Sone, H., Harashima, S., Tamai, A. (1998). Transcriptional co-regulation of *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyltransferase gene, *ATF1* and delta-9 fatty acid desaturase gene, *OLE1* by unsaturated fatty acids. *Yeast*, 14, 711-721.

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

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

Gancedo, J.M. (1998). Yeast carbon catabolite repression. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 62, 334-361.

Giniger, E., Varnum, S.M., Ptashne, M. (1985). Specific DNA binding of *GAL4*, a positive regulatory protein of yeast. *Cell*, 40, 767-774.

Glover, J.R., Lindquist, S. (1998). Hsp104, Hsp70, and Hsp40: a novel chaperone system that rescues previously aggregated proteins. *Cell*, 94, 73-82.

Goffeau, A., Barrell, B.G., Bussey, H., Davis, R.W., Dujon, B., Feldmann, H., Galibert, F., Hoheisel, J.D., Jacq, C., Johnston, M. (1996). Life with 6000 genes. *Science*, 274, 546-567.

Gojkovic, Z., Knecht, W., Zameitat, E., Warneboldt, J., Coutelis, J.B., Pynyaha, A., Neuveglise, C., Moller, K., Löffler, M., Piskur, J. (2004). Horizontal gene transfer promoted evolution of the ability to propagate under anaerobic conditions in yeasts. *Molecular Genetics and Genomics*, 271, 387-393.

Greger, I.H., Aranda, A., Proudfoot, N. (2000). Balancing transcriptional interference and initiation on the *GAL7* promoter of *Saccharomyces cerevisiae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97, 8415-8420.

Guitart, A., Orte, P.H., Ferreira, V., Peña, C., Cacho, J. (1999). Some observations about the correlation between the amino acid content of musts and wines of the Chardonnay

variety and their fermentation aromas. American Journal of Enology and Viticulture, 50, 253-258.

Guo, Z., Sherman, F. (1996). 3'-end-forming signals of yeast mRNA. Trends in Biochemical Sciences, 21, 477-481.

Hampsey, M. (1998). Molecular genetics of the RNA polymerase II general transcriptional machinery. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 62, 465-503.

Hazelwood, L.A., Daran, J.M., Van Maris, A.J., Pronk, J.T., Dickinson, J.R. (2008). The Ehrlich pathway for fusel alcohol production: a century of research on *Saccharomyces cerevisiae* metabolism. Applied and Environmental Microbiology, 74, 2259-2266.

Henschke, P.A., Jiranek, V. (1993). Yeast-metabolism of nitrogen compounds. En: Wine microbiology and biotechnology. Chur, Suiza. Harwood Academic Publishers. Chapter 4, 77-164.

Hernández, A. (2003). Microbiología industrial. San José, Costa Rica. Editorial Universidad Estatal a Distancia. Capítulo 3, 36-61.

Herraiz, T., Martín-Álvarez, P.J., Reglero, G., Herraiz, M., Cabezudo, M.D. (1990). Effects of the presence of skins during alcoholic fermentation on the composition of wine volatile Vitis, 29, 239-249.

Herraiz, T., Ough, C.S. (1992). Identification and determination of amino acid ethyl esters in wines by capillary gas chromatography-mass spectrometry. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 40, 1015-1021.

Herskowitz, I. (1988). Life cycle of the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Microbiological reviews, 52, 536-553.

Hewitt, J.T. (1928). The chemistry of wine making, A report on oenological research. Londres, Inglaterra. Great Britain Empire Marketing Board. Stationery Office.

Hinnen, A., Hicks, J.B., Fink, G.R. (1978). Transformation of yeast. Proceedings of the National Academy of Science, 75, 1929-1933.

Hohmann, S. (1997). Shaping up: the responses of yeast to osmotic stress. En: Yeast Stress Responses. Austin, Texas, USA. Landes Company. 101-146.

Hoppe, T., Matuschewski, K., Rape, M., Schlenker, S., Ulrich, H.D., Jentsch, S. (2000). Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. Cell, 102, 577-586.

Hu, X.H., Wang, M.H., Tan, T., Li, J.R., Yang, H., Leach, L., Zhang, R.M., Luo, Z.W. (2007). Genetic dissection of ethanol tolerance in the budding yeast *Saccharomyces cerevisiae*. Genetics, 175, 1479-1487.

Ilgen, C., Farabaugh, P.J., Hinnen, A., Walsh, J.M., Fink, G.R. (1979). Transformation of yeast. En: Genetic Engineering, Volumen 1. Nueva York, USA. Plenum Press. 117-132.

Ingledeu, W.M., Kunkee, R.E. (1985). Factors influencing sluggish fermentations of grape juice. American Journal of Enology and Viticulture, 36, 65-76.

Ishtar Snoek, I.S., Yde Steensma, H. (2007). Factors involved in anaerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. Yeast, 24, 1-10.

Jackson, R.S. (2008). Wine science principles and applications. San Diego, California. Elsevier. Chapter 6, 270-323, Chapter 11, 641-679.

Jiang, A., Vasconcelles, M.J., Wretzel, S., Light, A., Martin, C.E., Goldberg, M.A. (2001). *MGA2* is involved in the low-oxygen response element-dependent hypoxic induction of genes in *Saccharomyces cerevisiae*. Molecular and Cell Biology, 21, 6161-6169.

Jiranek, V., Langridge, P., Henschke, P.A. (1995). Amino acid and ammonium utilization by *Saccharomyces cerevisiae* wine yeasts from a chemically defined medium. American Journal of Enology and Viticulture, 46, 75-83.

Johnston, M. (1999). Feasting, fasting and fermenting. Glucose sensing in yeast and other cells. *Trends in Genetics*, 15, 29-33.

Kispal, G., Steiner, H., Court, D.A., Rolinski, B., Lill, R. (1996). Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the myc oncogene-regulated Eca39 protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 271, 24458-24464.

Kruckeberg, A.L. (1996). The hexose transporter family of *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of Microbiology*, 166, 283-292.

Kruger, L. (1998a). Yeast metabolism and its effect in flavour: part 1. *Brewers' Guardian*, 127, 24-29.

Kruger, L. (1998b). Yeast metabolism and its effect on flavour: part 2. *Brewers' Guardian*, 127, 27-30.

Kwast, K.E., Lai, L.C., Menda, N., James, D.T. 3rd, Aref, S., Burke, P.V. (2002). Genomic analyses of anaerobically induced genes in *Saccharomyces cerevisiae*: functional roles of Rox1 and other factors in mediating the anoxic response. *Journal of Bacteriology*, 184, 250-265.

Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000). Yeast and its importance to wine aroma: a review. *South African Journal of Enology and Viticulture*, 21, 97-129.

Lee, S.J., Rathbone, D., Asimont, S., Adden, R., Ebeler, S.E. (2004). Dynamic changes in ester formation during chardonnay juice fermentations with different yeast inoculation and initial Brix conditions. *American Journal of Enology and Viticulture*, 55, 346-354.

Lema, C., Garcia-Jares, C., Orriols, I., Angulo, L. (1996). Contribution of *Saccharomyces* and non-*Saccharomyces* populations to the production of some components of Albarino wine aroma. *American Journal of Enology and Viticulture*, 47, 206-216.

Lewin, B., Zevallos, H.B.V., Roig, F.G. (2008). Genes IX. México, México. McGraw Hill. Capítulo 7, 127-147, Capítulo 8, 151-183.

Lilly, M., Bauer, F.F., Lambrechts, M.G., Swiegers, J.H., Cozzolino, D., Pretorius, I.S. (2006). The effect of increased yeast alcohol acetyltransferase and esterase activity on the flavour profiles of wine and distillates. *Yeast*, 23, 641-659.

Lilly, M., Lambrechts, M.G., Pretorius, I.S. (2000). Effect of increased yeast alcohol acetyltransferase activity on flavor profiles of wine and distillates. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 744-753.

López-Alvarez, A., Díaz-Pérez, A.L., Sosa-Aguirre, C., Macías-Rodríguez, L., Campos-García, J. (2012). Ethanol yield and volatile compound content in fermentation of agave must by *Kluyveromyces marxianus* UMPe-1 comparing with *Saccharomyces cerevisiae* baker's yeast used in tequila production. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 113, 614-618.

López-Alvarez, J.A. (2007). Selección and manipulación genética de una levadura tolerante and sobreproductora de etanol. Laboratorio de Biotecnología Microbiana, IIQB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de maestría en ciencias. Morelia, Michoacán.

Mager, W.H., Hohmann, S. (1997). Stress response mechanisms in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. En: *Yeast stress responses*. Austin, USA. R.G. Landes Company.

Mager, W.H., Siderius, M. (2002). Novel insights into the osmotic stress response of yeast. *FEMS Yeast Research*, 2, 251-257.

Malcorps, P., Dufour, J.P. (1992). Short-chain and medium-chain aliphatic-ester synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry*, 210, 1015-1022.

Mason, A.B., Dufour, J.P. (2000). Alcohol acetyltransferases and the significance of ester synthesis in yeast. *Yeast*, 16, 1287-1298.

Mathews, C.K., Van Holde, K.E., Ahern, K.G. (2002). *Bioquímica*. Madrid, España. Pearson Education. Capítulo 13, 501-536, Capítulo 18, 701-744.

Meilgaard, M.C. (1975a). Flavor chemistry of beer: Part II: Flavor and threshold of 239 aroma volatiles. Master Brewers Association of Americas Technical Quarterly, 12, 151-168.

Meilgaard, M.C. (1975b). Flavour chemistry of beer. I. Flavour interaction between principal volatiles. Master Brewers Association of Americas Technical Quarterly, 12, 107-117.

Mell, J.C., Burgess, S.M. (2002). Yeast as a model genetic organism. En: Encyclopedia of life sciences. Macmillan Publishers Ltd. 1-8.

Millar, D.G., Griffiths-Smith, K., Algar, E., Scopes, R.K. (1982). Activity and stability of glycolytic enzymes in the presence of ethanol. Biotechnology Letters, 4, 601-606.

Miranda-Mendoza, A.L. (2010). Evaluación de los parámetros fermentativos de una levadura de *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces marxianus* modificada genéticamente. Laboratorio de Biotecnología Microbiana, IIQB, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. Tesis de residencias profesionales. Morelia, Michoacán.

Mitchell, P. (1966). Chemiosmotic coupling in oxidative and photosynthetic phosphorylation. Biological Reviews 41, 445-501.

Molina-Ubeda, R. (2000). Teoría de la clarificación de mostos y vinos y sus aplicaciones prácticas. Madrid, España. Mundi-Prensa Libros. Anexo I.

Monteiro, F.F., Bisson, L.F. (1992). Nitrogen supplementation of grape juice. I. Effect on amino acid utilization during fermentation. American Journal of Enology and Viticulture, 43, 1-10.

Moore, D.S. (2005). Estadística aplicada básica. Barcelona, España. Antoni Bosch. Capítulo 6, 393-477.

Moreno-Arribas, M.V., Polo, M.C. (2005). Winemaking biochemistry and microbiology: current knowledge and future trends. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 265-286.

Müller, S., Boles, E., May, M., Zimmermann, F.K. (1995). Different internal metabolites trigger the induction of glycolytic gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Bacteriology*, 177, 4517-4519.

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

Nagy, M., Lacroute, F., Thomas, D. (1992). Divergent evolution of pyrimidine biosynthesis between anaerobic and aerobic yeasts. *Proceedings of the National Academy of Science*, 89, 8966-8970.

Navarro-Avino, J.P., Prasad, R., Miralles, V.J., Benito, R.M., Serrano, R. (1999). A proposal for nomenclature of aldehyde dehydrogenases in *Saccharomyces cerevisiae* and characterization of the stress-inducible *ALD2* and *ALD3* genes. *Yeast*, 15, 829-842.

Nevoigt, E. (2008). Progress in metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 72, 379-412.

Nicol, D.A. (2003). *Ron. En: Fermented beverage production*, 2 edition. Nueva York, USA. Springer US. 263-287.

Niehaus, C.J.G. (1937). Sugar-alcohol ratios in South African musts and wines. South Africa, Department of Agriculture, Science Bulletin, 161, 1-11.

Nordström, K. (1962). Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast. III. Participation of coenzyme A. *Journal of the Institute of Brewing*, 68, 398-407.

Nordström, K. (1963). Formation of ethyl acetate in fermentation with brewer's yeast IV: Metabolism of acetyl coenzyme A. *Journal of the Institute of Brewing*, 69, 142-153.

Nordström, K. (1964). Formation of esters from alcohols by brewer's yeast. *Journal of the Institute of Brewing*, 70, 328-336.

Nurminen, T., Kontinen, K., Suomalainen, H. (1975). Neutral lipids in the cells and cell envelope fractions of aerobic baker's yeast and anaerobic brewer's yeast. *Chemistry and Physics of Lipids*, 14, 15-32.

Nykänen, L. (1986). Formation and occurrence of flavor compounds in wine and distilled alcoholic beverages. *American Journal of Enology and Viticulture*, 37, 84-96.

Nykänen, L., Nykänen, I. (1977). Production of esters by different yeast strains in sugar fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 83, 30-31.

Nykänen, L., Nykänen, I., Suomalainen, H. (1977). Distribution of esters produced during sugar fermentation between the yeast cell and the medium. *Journal of the Institute of Brewing*, 83, 32-34.

Orr-Weaver, T.L., Szostak, J.W., Rothstein, R.J. (1981). Yeast transformation: a model system for the study of recombination. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 78, 6354-6358.

Ostling, J., Carlberg, M., Ronne, H. (1996). Functional domains in the Mig1 repressor. *Molecular and Cell Biology*, 16, 753-761.

Otterstedt, K., Larsson, C., Bill, R.M., Stahlberg, A., Boles, E., Hohmann, S., Gustafsson, L. (2004). Switching the mode of metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Reports*, 5, 532-537.

Özcan, S., Johnston, M. (1995). Three different regulatory mechanisms enable yeast hexose transporter (*HXT*) genes to be induced by different levels of glucose. *Molecular and Cell Biology*, 15, 1564-1572.

Özcan, S., Johnston, M. (1996). Two different repressors collaborate to restrict expression of the yeast glucose transporter genes *HXT2* and *HXT4* to low levels of glucose. *Molecular and Cell Biology*, 16, 5536-5545.

Palmer, A.K., Rennie, H. (1974). Ester control in high gravity brewing. *Journal of the Institute of Brewing*, 80, 447-454.

Pascual, C., Alonso, A., Garcia, I., Romay, C., Kotyk, A. (1988). Effect of ethanol on glucose transport, key glycolytic enzymes, and proton extrusion in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnology and Bioengineering*, 32, 374-378.

Pavia, D.L., Lampman, G.M., Kriz, G.S., Engel, R.G. (2012). A microscale approach to organic laboratory techniques. Belmont, California, USA. Cengage Learning. Experiment 52I, 496-499.

Peddie, H.A.B. (1990). Ester formation in brewery fermentations. *Journal of the Institute of Brewing*, 96, 327-331.

Philippsen, P., Stotz, A., Scherf, C. (2004). DNA of *Saccharomyces cerevisiae*. En: Guide to Yeast Genetics and Molecular and Cell Biology, Part A. San Diego, California, USA. Elsevier. 169-182.

Pisarnitskii, A.F. (2001). Formation of wine aroma: tones and imperfections caused by minor components (review). *Applied Biochemistry and Microbiology*, 37, 552-560.

Piskur, J., Langkjaer, R.B. (2004). Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. *Molecular Microbiology*, 53, 381-389.

Pronk, J.T., Yde Steensma, H., Van Dijken, J.P. (1996). Pyruvate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 12, 1607-1633.

Proudfoot, N. (2004). New perspectives on connecting messenger RNA 3' end formation to transcription. *Current Opinion in Cell Biology*, 16, 272-278.

Quilter, M.G., Hurley, J.C., Lynch, F.J., Murphy, M.G. (2003). The production of isoamyl acetate from amyl alcohol by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the Institute of Brewing, 109, 34-40.

Rainbow, C. (1970). Brewer's yeasts. En: The yeasts, Volume 3. Nueva York, USA. Academic Press. 146-224.

Rainieri, S., Kodama, A., Kaneko, A., Mikata, K., Nakao, A., Ashikari, T. (2006). Pure and mixed genetic lines of *Saccharomyces bayanus* and *Saccharomyces pastorianus* and their contribution to the lager brewing strain genome. Applied and Environmental Microbiology, 72, 3968-3974.

Reifenberger, E., Boles, E., Ciriacy, M. (1997). Kinetic characterization of individual hexose transporters of *Saccharomyces cerevisiae* and their relation to the triggering mechanisms of glucose repression. European Journal of Biochemistry, 245, 324-333.

Ribéreau-Gayon, P., Dubourdieu, D., Donéche, B., Lonvaud, A. (2006). Handbook of Enology, The microbiology of wine and vinifications, Volume 1, Edition 2. Chichester, Inglaterra. John Wiley & Sons. Chapter 2, 53-77.

Rojas, V., Gil, J.V., Pinaga, F., Manzanares, P. (2003). Acetate ester formation in wine by mixed cultures in laboratory fermentations. International Journal of Food Microbiology, 86, 181-188.

Rolland, F., Winderickx, J., Thevelein, J.M. (2002). Glucose-sensing and -signalling mechanisms in yeast. FEMS Yeast Research, 2, 183-201.

Rondon, A.G., Mischo, H.E., Proudfoot, N.J. (2008). Terminating transcription in yeast: whether to be a 'nerd' or a 'rat'. Nature Structural & Molecular Biology, 15, 775-776.

Rothstein, R. (1991). Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast. Methods in Enzymology, 194, 281-301.

Roy, D.J., Dawes, I.W. (1987). Cloning and characterization of the gene encoding lipoamide dehydrogenase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of General Microbiology*, 133, 925-933.

Saerens, S.M., Delvaux, F.R., Verstrepen, K.J., Thevelein, J.M. (2010). Production and biological function of volatile esters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbial Biotechnology*, 3, 165-177.

Saerens, S.M., Verstrepen, K.J., Van Laere, S.D., Voet, A.R., Van Dijck, P., Delvaux, F.R., Thevelein, J.M. (2006). The *Saccharomyces cerevisiae* *EHT1* and *EEB1* genes encode novel enzymes with medium-chain fatty acid ethyl ester synthesis and hydrolysis capacity. *The Journal of Biological Chemistry*, 281, 4446-4456.

Sales, K., Brandt, W., Rumbak, E., Lindsey, G. (2000). The LEA-like protein *HSP12* in *Saccharomyces cerevisiae* has a plasma membrane location and protects membranes against desiccation and ethanol-induced stress. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1463, 267-278.

Scherer, S., Davis, R.W. (1979). Replacement of chromosome segments with altered DNA sequences constructed in vitro. *Proceedings of the National Academy of Science*, 76, 4951-4955.

Schreier, P., Jennings, W.G. (1979). Flavor composition of wines: a review. *Critical Reviews in Food Science & Nutrition*, 12, 59-111.

Shearwin, K.E., Callen, B.P., Egan, J.B. (2005). Transcriptional interference - a crash course. *Trends in Genetics*, 21, 339-345.

Spayd, S.E., Nagel, C.W., Edwards, C.G. (1995). Yeast growth in Riesling juice as affected by vineyard nitrogen fertilization. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46, 49-55.

Stukey, J.E., Mcdonough, V.M., Martin, C.E. (1989). Isolation and characterization of *OLE1*, a gene affecting fatty acid desaturation from *Saccharomyces cerevisiae*. The Journal of Biological Chemistry, 264, 16537-16544.

Styger, G., Prior, B., Bauer, F.F. (2011). Wine flavor and aroma. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 38, 1145-1159.

Sumby, K.M., Grbin, P.R., Jiranek, V. (2010). Microbial modulation of aromatic esters in wine: current knowledge and future prospects. Food Chemistry, 121, 1-16.

Suomalainen, H. (1981). Yeast esterases and aroma esters in alcoholic beverages. Journal of the Institute of Brewing, 87, 296-300.

Suomalainen, H., Nykänen, L. (1983). Aroma of beer, wine and distilled alcoholic beverages. Massachusetts, USA. Kluwer Academic Publishers. Chapter 11, 131-174.

Swiegers, J.H., Bartowsky, E.J., Henschke, P.A., Pretorius, I.S. (2005). Yeast and bacterial modulation of wine aroma and flavour. Australian Journal of Grape and Wine Research, 11, 139-173.

Swiegers, J.H., Pretorius, I.S. (2005). Yeast modulation of wine flavor. Advances in Applied Microbiology, 57, 131-175.

Szostak, J.W., Wu, R. (1979). Insertion of a genetic marker into the ribosomal DNA of yeast. Plasmid, 2, 536-554.

Thurston, P.A., Taylor, R., Ahvenainen, J. (1981). Effects of linoleic acid supplements on the synthesis by yeast of lipids and acetate esters. Journal of the Institute of Brewing, 87, 92-95.

Valero, E., Millan, M.C., Mauricio, J.C., Ortega, J.M. (1998). Effect of grape skin maceration on sterol, phospholipid, and fatty acid contents of *Saccharomyces cerevisiae* during alcoholic fermentation. American Journal of Enology and Viticulture, 49, 119-124.

Van Dijken, J.P., Van Den Bosch, E., Hermans, J.J., De Miranda, L.R., Scheffers, W.A. (1986). Alcoholic fermentation by 'non-fermentative' yeasts. *Yeast*, 2, 123-127.

Van Maris, A.J., Abbott, D.A., Bellissimi, E., Van Den Brink, J., Kuyper, M., Luttik, M.A., Wisselink, H.W., Scheffers, W.A., Van Dijken, J.P., Pronk, J.T. (2006). Alcoholic fermentation of carbon sources in biomass hydrolysates by *Saccharomyces cerevisiae*: current status. *Antonie Van Leeuwenhoek*, 90, 391-418.

Vasconcelles, M.J., Jiang, A., Mcdaid, K., Gilooly, L., Wretzel, S., Porter, D.L., Martin, C. E., Goldberg, M.A. (2001). Identification and characterization of a low oxygen response element involved in the hypoxic induction of a family of *Saccharomyces cerevisiae* genes. Implications for the conservation of oxygen sensing in eukaryotes. *The Journal of Biological Chemistry*, 276, 14374-14384.

Vaughan-Martini, A., Martini, A. (1998). *Saccharomyces* Meyen ex Reess. En: The yeasts, a taxonomic study, 4 edition. Ámsterdam, Países Bajos. Elsevier. Chapter 44, 358-370.

Venema, J., Tollervey, D. (1999). Ribosome synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annual Review of Genetics*, 33, 261-311.

Verduyn, C., Zomerdijk, T.P.L., Van Dijken, J.P., Scheffers, W.A. (1984). Continuous measurement of ethanol production by aerobic yeast suspensions with an enzyme electrode. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 19, 181-185.

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Pretorius, I.S., Thevelein, J.M., Delvaux, F.R. (2003a). The *Saccharomyces cerevisiae* alcohol acetyl transferase gene *ATF1* is a target of the cAMP/PKA and FGM nutrient-signalling pathways. *FEMS Yeast Research*, 4, 285-296.

Verstrepen, K.J., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R. (2003b). Flavor-active esters: adding fruitiness to beer. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 96, 110-118.

Verstrepen, K.J., Moonjai, N., Derdelinckx, G., Dufour, J.P., Winderickx, J., Thevelein, J.M., Pretorius, I.S., Delvaux, F.R. (2003c). Genetic regulation of ester synthesis in brewer's yeast: new facts, insights and implications for the brewer. En: *Brewing yeast fermentation performance*, 2 edition. Oxford, Inglaterra. Blackwell Science. 234-246.

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

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

Vianna, E., Ebeler, S.E. (2001). Monitoring ester formation in grape juice fermentations using solid phase microextraction coupled with gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49, 589-595.

Visser, W., Scheffers, W.A., Batenburg-Van Der Vegte, W.H., Van Dijken, J.P. (1990). Oxygen requirements of yeasts. *Applied and Environmental Microbiology*, 56, 3785-3792.

Walker, G.M. (1998). *Yeast physiology and biotechnology*. Sussex Occidental, Inglaterra. John Wiley & Sons Ltd. Chapter 6, 266-313.

Wang, J.J., Wang, Z.A., He, X.P. & Zhang, B.R. (2012). Integrated expression of the alpha-amylase, dextranase and glutathione gene in an industrial brewer's yeast strain. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 28, 223-231.

West, R.W. Jr., Yocum, R.R., Ptashne, M. (1984). *Saccharomyces cerevisiae* *GAL1-GAL10* divergent promoter region: location and function of the upstream activating sequence UAS_G. *Molecular and Cell Biology*, 4, 2467-2478.

Wilcox, L.J., Balderes, D.A., Wharton, B., Tinkelenberg, A.H., Rao, G., Sturley, S.L. (2002). Transcriptional profiling identifies two members of the ATP-binding cassette transporter superfamily required for sterol uptake in yeast. *The Journal of Biological Chemistry*, 277, 32466-32472.

Wolfe, K.H., Shields, D.C. (1997). Molecular evidence for an ancient duplication of the entire yeast genome. *Nature*, 387, 708-713.

Yagi, T., Seo, B.B., Di Bernardo, S., Nakamaru-Ogiso, E., Kao, M.C., Matsuno-Yagi, A. (2001). NADH dehydrogenases: from basic science to biomedicine. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes*, 33, 233-242.

Yanisch-Perron, C., Vieira, J., Messing, J. (1985). Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene*, 33, 103-119.

Yoshimoto, H., Fujiwara, D., Momma, T., Ito, C., Sone, H., Kaneko, Y., Tamai, Y. (1998). Characterization of the *ATF1* and *Lg-ATF1* genes encoding alcohol acetyltransferases in the bottom fermenting yeast *Saccharomyces pastorianus*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 86, 15-20.

Yoshimoto, H., Fukushige, T., Yonezawa, T., Sone, H. (2002). Genetic and physiological analysis of branched-chain alcohols and isoamyl acetate production in *Saccharomyces cerevisiae*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 59, 501-508.

Yoshioka, K., Hashimoto, N. (1981). Ester formation by alcohol acetyltransferase from brewers yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*, 45, 2183-2190.

Yoshioka, K., Hashimoto, N. (1983). Cellular fatty acid and ester formation by brewers' yeast. *Agricultural and Biological Chemistry*, 47, 2287-2294.

You, K.M., Rosenfield, C.L., Knipple, D.C. (2003). Ethanol tolerance in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* is dependent on cellular oleic acid content. *Applied and Environmental Microbiology*, 69, 1499-1503.

Younis, O.S., Stewart, G.G. (1998). Sugar uptake and subsequent ester and higher alcohol production by *Saccharomyces cerevisiae*. Journal of the Institute of Brewing, 104, 255-264.

Younis, O.S., Stewart, G.G. (2000). The effect of wort maltose content on volatile production and fermentation performance in brewing yeast. En: Brewing yeast fermentation performance, 1 edition. Oxford, Inglaterra. Blackwell Science. 170-176.

Zea, L., Moreno, J., Medina, M., Ortega, J.M. (1994). Evolution of C6, C8 and C10 acids and their ethyl esters in cells and musts during fermentation with three *Saccharomyces cerevisiae* races. Journal of Industrial Microbiology, 13, 269-272.

Zhao, J., Hyman, L., Moore, C. (1999). Formation of mRNA 3' ends in eukaryotes: mechanism, regulation, and interrelationships with other steps in mRNA synthesis. Microbiology and Molecular Biology Reviews, 63, 405-445.

Zoecklein, B.W., Hackney, C.H., Duncan, S.E., Marcy, J.E. (1999). Effect of fermentation, aging and thermal storage on total glycosides, phenol-free glycosides and volatile compounds of White Riesling (*Vitis vinifera* L.) wines. Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology, 22, 100-107.