

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA



Evaluación y análisis de la expresión genética de *Saccharomyces cerevisiae* bajo condiciones de fermentación que afectan la floculación.

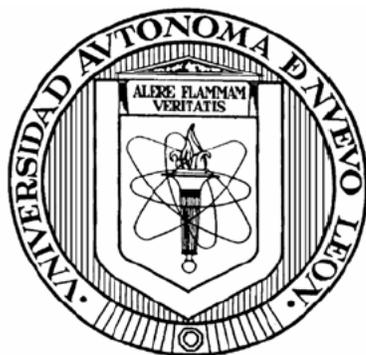
Por

M.C. LUIS CASTULO DAMAS BUENROSTRO

TESIS

Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad
en BIOTECNOLOGÍA

Evaluación y análisis de la expresión genética de *Saccharomyces cerevisiae*
bajo condiciones de fermentación que
afectan la floculación.



Comité de Tesis

Dr. Benito Pereyra Alférez
Director de Tesis

Dra. María Magdalena Iracheta Cárdenas
Secretario

Dr. Luis J. Galán Wong
1er Vocal

Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
2o Vocal

Dr. José María Viader Salvadó
3er Vocal

Dr. J. Antolín Sierra Benavides
Director Externo

Diciembre 2008

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme vida abundante y eterna.

A mi esposa y mis hijos por apoyarme en todos mis proyectos y participar en ellos con amor y devoción.

Al Dr. Benito Pereyra por ser mi amigo y haber creído en mí cuando más lo necesité. Mi más profundo agradecimiento.

Al Dr. Antolín Sierra, por darme la oportunidad de crecer profesionalmente y apoyar este proyecto.

Al Dr. Carlos Martínez Dávila e Ing. Jorge Meillón Guerrero por su apoyo profesional y personal para que pudiera efectuar mis estudios doctorales.

A la Dra. Lilia H. Morales y Dr. José Ma. Viader, mis tutores, por sus valiosos consejos y apoyo para la realización de esta tesis y ubicarme en tiempo y espacio.

A mi comité de tesis por sus valiosas aportaciones en la revisión de este proyecto.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para la realización de mis estudios (becario 90065).

A Cervecería Cuauhtemoc Moctezuma S.A. de C.V. por todas las facilidades brindadas para la realización de este proyecto.

A mi papá, Sr. Cástulo Damas y a mi mamá Sra. María E. Buenrostro, por su amor y aliento que me acompañan cada instante.

A mis hermanos por su apoyo solidario y por sus oraciones.

A mis compañeros y amigos Clara y Gerardo por creer en este proyecto y contribuir para hacerlo realidad.

A todas las personas que contribuyeron de una forma u otra para la realización de este trabajo.

DEDICATORIA

*A Elda, Luis Caleb y Josué Elías,
Quienes llenan mi vida.*

TABLA DE CONTENIDOS

| Sección | Página |
|---|--------|
| AGRADECIMIENTOS | iv |
| DEDICATORIA | v |
| LISTA DE TABLAS | ix |
| LISTA DE FIGURAS | xi |
| NOMENCLATURA | xiii |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 2 |
| 1. INTRODUCCIÓN | 3 |
| 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION | 5 |
| 3. HIPOTESIS | 6 |
| 4. OBJETIVOS | 7 |
| 4.1 Objetivo General | |
| 4.2 Objetivos Específicos | |
| 5. ANTECEDENTES | 8 |
| 5.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> | 8 |
| 5.2 Tipos de Fermentaciones..... | 10 |
| 5.3 Floculación | 12 |
| 5.4 Factores que afectan la floculación | 14 |
| 5.5 Genes <i>FLO</i> | 18 |
| 5.6 Control de la expresión de la floculación | 19 |
| 5.7 Análisis de la expresión génica a nivel transcripcional | 21 |
| 6. METODOS | 23 |
| 6.1 Diseño experimental | 23 |
| 6.2 Cepas de levadura | 23 |

| | | |
|--------|--|----|
| 6.3 | Reactivos | 24 |
| 6.4 | Fermentaciones | 25 |
| 6.5 | Aislamiento de ADN | 25 |
| 6.6 | Extracción de ARN | 26 |
| 6.7 | Cuantificación de ADN y ARN | 27 |
| 6.8 | Evaluación de la floculación | 27 |
| 6.9 | Parámetros monitoreados durante las fermentaciones | 27 |
| 6.10 | PCR punto final de genes <i>FLO</i> | 28 |
| 6.10.1 | Diseño de iniciadores | 28 |
| 6.10.2 | Cultivos | 28 |
| 6.10.3 | PCR punto final | 29 |
| 6.10.4 | Electroforesis de productos de PCR | 30 |
| 6.10.5 | Secuenciación de los productos de PCR | 30 |
| 6.11 | Análisis de la expresión genética por PCR tiempo real | 30 |
| 6.11.1 | Obtención de ADNc..... | 30 |
| 6.11.2 | PCR Tiempo Real | 30 |
| 6.12 | Análisis de la expresión a nivel transcripcional mediante microarreglos | 33 |
| 6.12.1 | Síntesis y marcaje del ADNc al adaptador aminoalilo | 34 |
| 6.12.2 | Purificación del aminoalil-ADNc | 35 |
| 6.12.3 | Reacción de conjugación | 35 |
| 6.12.4 | Purificación del aminoalil-ADNc marcado | 35 |
| 6.12.5 | Pretratamiento del microarreglo | 35 |
| 6.12.6 | Hibridación del microarreglo | 36 |
| 6.12.7 | Lavado de microarreglos hibridados | 36 |
| 6.12.8 | Lectura y análisis de los microarreglos | 36 |
| 7. | RESULTADOS | 39 |
| 7.1 | Detección de genes <i>FLO</i> | 39 |
| 7.2 | Impacto de las variables de estrés fisiológico en la floculación | 42 |
| 7.3 | Análisis de la expresión de los genes <i>FLO</i> | 47 |
| 7.4 | Análisis de la expresión global bajo condiciones de estrés fisiológico | 50 |
| 8. | DISCUSION..... | 69 |
| 9. | CONCLUSIONES | 84 |
| 10. | FUTURAS INVESTIGACIONES | 86 |
| | APENDICES | 87 |
| | A. PREPARACION DE SOLUCIONES Y MEDIOS DE CULTIVO..... | 87 |

| | |
|---|-----|
| B. METODOS ANALITICOS DE PARAMETROS FERMENTATIVOS | 89 |
| C. SECUENCIAS NUCLEOTIDICAS DE FRAGMENTOS AMPLIFICADOS DE LOS GENES <i>FLO</i> Y <i>ACT1</i> | 107 |
| LITERATURA CITADA | 112 |
| RESUMEN BIOGRAFICO | 125 |
| ARTICULO 1..... | 126 |
| ARTICULO 2..... | 131 |

LISTA DE TABLAS

| Tabla | | Página |
|-------|--|--------|
| I. | Condiciones experimentales basales y de estrés usadas en las fermentaciones con levaduras industriales | 23 |
| II. | Características de genes <i>FLO</i> estudiados..... | 29 |
| III. | Características de los iniciadores diseñados para amplificación de los genes <i>FLO</i> | 31 |
| IV. | Mezcla de reacción para síntesis de ADNc a partir de transcritos de ARN aislados de levadura en fermentaciones bajo condiciones de estrés..... | 32 |
| V. | Condiciones para la reacción de PCR reversa | 32 |
| VI. | Mezcla de reacción para PCR tiempo real | 32 |
| VII | Programa de amplificación y análisis de los genes <i>FLO8</i> , <i>FLO11</i> y <i>Lg-FLO1</i> mediante PCR tiempo real. | 33 |
| VIII | Mezcla de reacción para síntesis de ADNc para microarreglos. Mezcla A | 34 |
| IX | Mezcla de reacción para síntesis de ADNc para microarreglos. Mezcla B | 34 |
| X | Diseño experimental de los microarreglos | 38 |
| XI | Incidencia de genes <i>FLO</i> en cepas de levaduras industriales y silvestres | 40 |
| XII | Impacto de condiciones de estrés en floculación de levaduras industriales | 46 |
| XIII | Cantidad de genes con cambio de expresión significativo bajo condiciones de estrés fisiológico | 52 |
| XIV | Z scores de genes estructurales de floculación | 53 |
| XV | Resultados de análisis ontológico mediante el software FatiGO. Cepa C820 condición de edad generacional alta. | 54 |

| | | |
|-------|--|----|
| XVI | Resultados de análisis ontológico mediante el software FatiGO. Cepa C820 condición de represión catabólica | 55 |
| XVII | Resultados de análisis ontológico mediante el software FatiGO. Cepa C820 condición de restricción calórica | 57 |
| XVIII | Resumen de anotaciones ontológicas de los 1434 genes con expresión significativamente modificada ($p < 0.05$) en condiciones de estrés. | 58 |
| XIX | Resumen de anotaciones ontológicas de los 302 genes con expresión modificada bajo represión de floculación. | 58 |
| XX | Genes inducidos bajo condiciones de estrés fisiológico relacionados con disminución de la floculación. | 59 |
| XXI | Genes reprimidos bajo condiciones de estrés fisiológico relacionados con disminución de la floculación. | 62 |
| XXII | Modificación de expresión de genes localizados en posición subtelomérica | 66 |
| XXIII | Genes reprimidos por glucosa, detectados en los ensayos de microarreglos. | 66 |
| XXIV | Expresión de genes asociados a mantenimiento de telómeros. | 67 |
| XXV | Genes relacionados a compuestos volátiles cuya expresión fue modificada en las condiciones de ensayo..... | 67 |
| XXVI | Genes regulatorios asociados a la expresión de la floculación. | 68 |
| XXVII | Contenido de genes <i>FLO</i> , capacidad de floculación y parámetros de ligando-receptor para cepas industriales | 77 |

LISTA DE FIGURAS

| Figura | Página |
|--|--------|
| 1. Ciclo de vida de <i>Saccharomyces spp.</i> | 10 |
| 2. Curva de fermentación de una levadura floculante y no floculante | 11 |
| 3. Estado de agregación de las levaduras en distintas fases de crecimiento..... | 14 |
| 4. Características del microarreglo de ADN usado (YOMGW_01)..... | 24 |
| 5. Productos de PCR de los genes <i>FLO</i> de las cepas de levadura..... | 39 |
| 6. Productos de PCR de <i>FLO11</i> (A) y <i>Lg-FLO1</i> (B) a partir de cepas de levadura lager..... | 40 |
| 7. Secuencia nucleotídica del fragmento amplificado del gen <i>Lg-FLO1</i> a partir del ADN genómico de la cepa C790..... | 41 |
| 8. Correlación entre el número de genes <i>FLO</i> por cepa y el fenotipo de floculación..... | 42 |
| 9. Fermentaciones con levaduras industriales. | 43 |
| 10. Efecto de factores de estrés en la floculación de levaduras industriales..... | 44 |
| 11. Comportamiento fermentativo típico de las diferentes cepas bajo condiciones de estrés | 45 |
| 12. Curso temporal de la floculación para la cepa C790 en condiciones estándar de fermentación. | 46 |
| 13. Curso temporal de la floculación para la cepa C820 en condiciones estándar de fermentación. | 47 |
| 14. Crossing points del gen <i>FLO8</i> bajo condiciones de estrés fisiológico..... | 48 |
| 15. Crossing points del gen <i>FLO11</i> bajo condiciones de estrés fisiológico..... | 49 |

| | |
|--|----|
| 16. Crossing points del gen <i>Lg-FLO1</i> bajo condiciones de estrés fisiológico..... | 49 |
| 17. Distribución de Z scores de los genes expresados en la cepa C820 bajo estrés de perfil de carbohidratos..... | 51 |
| 18. Secuencia de análisis de los genes expresados bajo condiciones de estrés..... | 51 |
| 19. Funciones de los genes inducidos en condiciones de baja floculación | 65 |
| 20. Funciones de los genes reprimidos en condiciones de baja floculación. | 65 |
| 21. Modelo del mecanismo de regulación de los genes de floculación en cepas industriales. | 83 |

NOMENCLATURA

| | |
|------------|---|
| ADN | Ácido desoxiribonucleico |
| ARN | Ácido ribonucleico |
| ARNm | Ácido ribonucleico mensajero |
| B_{\max} | Unión específica máxima |
| ADNc | Ácido desoxiribonucleico complementario |
| cel/mL | Células por mililitro |
| cm | Centímetro |
| Cp | Crossing point |
| Chr | Cromosoma |
| dNTP | Desoxinucleósido trifosfato |
| D.O. | Densidad Optica |
| EDTA | Acido Etilendiaminotetracético |
| fmol/cel | Fentomoles por célula |
| G | Fuerza centrífuga |
| g | Gramos |
| h | Horas |
| kb | Kilobase |
| Kd | Constante de disociación |
| kD | Kilodalton |
| kPa | Kilopascal |
| L | Litro |
| min | Minuto |

| | |
|---------------------------|---|
| mL | Mililitro |
| mM | Milimolar |
| mQ | Agua ultradestilada miliQ |
| MYPG | Medio de Extracto de Malta, Extracto de Levadura, Peptona y Glucosa |
| $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ | Microgramos por microlitro |
| μL | Microlitro |
| μM | Micromolar |
| ng | Nanogramos |
| $\text{ng}/\mu\text{L}$ | Nanogramo por microlitro |
| nm | Nanometro |
| nt | Nucleótido |
| ORF | (Open reading frame) Marco de lectura abierta |
| pb | Pares de bases |
| PCR | Reacción en cadena de la polimerasa |
| pH | Potencial de Hidrógeno |
| pM | Picomolar |
| ppm | Partes por millón |
| R^2 | Coefficiente de determinación |
| RT-PCR | Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real |
| rpm | Revoluciones por minuto |
| s | Segundo |
| T_m | Temperatura de fusión |

| | |
|-----------|---|
| U | Unidad de actividad enzimática |
| U/mL | Unidades enzimáticas por mililitro |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volts |
| YPD | Agar Glucosa-peptona-extracto de levadura |
| ° C | Grado Celsius |
| ° P | Grado plato |
| λ | Longitud de onda |
| > | Mayor que |
| < | Menor que |

RESUMEN

La elaboración de bebidas fermentadas a escala industrial por *Saccharomyces cerevisiae* involucra la exposición de las células de levaduras a un ambiente fluctuante, donde participan diversos tipos de estrés fisiológico. Aunque se han hecho avances en el conocimiento de la expresión global de algunos genes activos durante la fermentación, se desconocen los involucrados en la respuesta a factores de estrés que impactan la calidad de la floculación, con un grave detrimento en las operaciones de clarificación del producto y recuperación de levadura. En el presente estudio se identificaron los genes que participan en la respuesta a diversas condiciones de proceso, y su relación con la floculación de la levadura. Se evaluó el efecto de alta presión osmótica, presión hidrostática, represión catabólica, restricción calórica y edad generacional, sobre la capacidad floculante de cepas de *S. cerevisiae*. Además se realizó el análisis de expresión de los genes estructurales de floculación mediante PCR en tiempo real (RT PCR), así como el análisis de expresión global transcripcional bajo estas condiciones de fermentación por microarreglos de ADN. La capacidad floculante fue disminuida por alto contenido de glucosa en el medio (represión catabólica); pero fue incrementada con la edad generacional. El contenido de genes *FLO* fue variable (de 3 a 6 genes por cepa), lo que determinó hasta cierto grado la capacidad de floculación, siendo más conservados los genes *Lg-FLO1*, *FLO8* y *FLO11*. En los resultados de RT PCR se determinó que la expresión de *FLO11* y *Lg-FLO1* disminuyó al someterse las células a represión catabólica. La edad generacional incrementó la expresión de *Lg-FLO1*, aunque la expresión de *FLO11* se vio disminuida, descartando su participación en el mecanismo de floculación. La expresión de *FLO8* no se vio afectada bajo condiciones de represión catabólica y edad generacional. Por otra parte, el análisis de microarreglos reveló que la regulación de floculación bajo condiciones de estrés esta sujeta principalmente a un mecanismo de silenciamiento epigenético por modificación de la arquitectura de la cromatina. Genes como *ESC1*, *ESC4*, *HHF1*, *HHF2*, *HHT1*, *H2FZ*, *TAP60*, *HIR1* y aquellos que regulan la respuesta a estrés osmótico (*BCK2*, *PTC2*, *RGD2*) participan en la modulación de la respuesta de floculación. De esta forma se concluyó que *Lg-FLO1* es el gen estructural determinante para la floculación en las cepas industriales, cuya regulación esta ligada a los genes de respuesta a estrés osmótico y los involucrados en el silenciamiento de genes subteloméricos.

ABSTRACT

Saccharomyces cerevisiae-based fermented beverage industry involves exposure of yeast cells to a fluctuant environment, where several physiological stress factors appear. Even though important advance has been made in knowledge about global genetic expression during fermentation, genes activated in response to stress factors, which impact flocculation (with a strong detrimental impact in clarifying and yeast recovery operations) are unknown. In this study, genes participating in response to different process conditions were identified, and their relationship with yeast flocculation was elucidated. Effects from osmotic and hydrostatic pressure, catabolic repression, caloric restriction and generational aging over flocculation ability of *S. cerevisiae* strains were evaluated. Also, expression analysis of structural flocculation genes via real time PCR and DNA microarray whole transcriptional analysis under these fermentation conditions were carried out. Results showed that flocculation was diminished by catabolic repression; but it was increased by generational aging. On the other hand, *FLO* genes content was variable (3 to 6 genes by strain), which impacted, at least in part, flocculation ability, being *Lg-FLO1*, *FLO8* and *FLO11* the most conserved. In real time PCR experiments, results showed that expression of *FLO11* and *Lg-FLO1* diminished when cells were exposed to catabolic repression. Interestingly, generation aging increased expression of *Lg-FLO1*, while expression of *FLO11* was diminished, and for this reason the latter gene was excluded from flocculation mechanism in the studied strains. Neither catabolic repression nor generational age affected expression of *FLO8*. On the other hand, DNA microarray analysis revealed that the genes related to regulation of flocculation under stress conditions were mainly those that participate in subtelomeric gene silencing via chromatin architecture remodeling and those involved in response to osmotic stress. Genes like *ESC1*, *ESC4*, *HHF1*, *HHF2*, *HHT1*, *H2FZ*, *TAP60*, *HIR1* and *BCK2*, *PTC2* and *RGD2* (involved in response to osmotic stress) modulated the flocculation response. Therefore, it was concluded that *Lg-FLO1* is the structural determinant gene for flocculation in the industrial strains studied so far, and its regulation is linked to those genes involved in response to osmotic stress and subtelomeric gene silencing.

1. INTRODUCCIÓN

En la industria de fermentación alcohólica, la separación de las células de levadura del producto depende en gran medida de la capacidad de éstas para agregarse en cúmulos y sedimentar. Este fenómeno, llamado floculación, es espontáneo y simplifica las operaciones para clarificación del producto y recuperación de la levadura para reuso (Verstrepen *et al.*, 2003; Speers *et al.*, 1992). Sin embargo, existen diversas condiciones de proceso que afectan la calidad fisiológica de la levadura y que eventualmente se han asociado con fallas en el mecanismo de floculación. Entre éstas se encuentran algunas que actualmente son muy comunes en los procesos de producción: a) alta relación altura:diámetro del fermentador (que provoca alta presión hidrostática); b) mayor concentración total de azúcares (que determina una mayor presión osmótica circundante), c) el perfil de carbohidratos del medio (mayor relación glucosa:maltosa, que puede causar represión catabólica), d) almacenaje prolongado de la levadura (que expone a las células a un agotamiento de nutrientes) y e) reuso seriado en fermentaciones subsecuentes (Hardwick, 1995). Al no poder separar con facilidad las células, la industria tiene que recurrir al empleo de agentes floculantes (polímeros catiónicos, colágeno, etc.), centrifugas o filtros, lo cual incrementa los costos de producción. Además, la presencia de levadura en el medio provoca autólisis de la misma, por la exposición prolongada al etanol, y a su vez, esto lleva a la generación de aromas y sabores desagradables (diacetilo, compuestos de azufre, ácidos grasos, principalmente; Verstrepen *et al.*, 2003). Otro impacto negativo son los retrasos en la producción al no poder extraer la cantidad de levadura necesaria para su reinóculo en otro fermentador.

La causa de esta pérdida de la capacidad de flocular bajo estas condiciones de estrés es desconocida, pero probablemente es debida a daños sobre la pared de la célula y/o a la alteración de la maquinaria de expresión génica (Verstrepen *et al.*, 2003).

En este entorno, ¿qué genes determinan la floculación en las cepas industriales de levadura? ¿Cómo se regula su expresión? Actualmente se carece de información sobre la expresión de los genes implicados en la floculación (estructurales y/o regulatorios) bajo

estas condiciones de operación, por lo que el estudio de la expresión génica global es necesario para entender la manera del cómo estos factores ambientales modulan la expresión de dichos genes, lo que conducirá a un manejo más racional de los procesos de fermentación.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA, JUSTIFICACION E IMPORTANCIA DE LA INVESTIGACION

A raíz de innovaciones de proceso para mejorar eficiencia y generar nuevos productos, algunos factores de estrés se han incrementado en los últimos años en la industria cervecera, provocando pérdida de la capacidad de floculación de la levadura. Esto ha obligado el uso de operaciones costosas para separar la levadura del producto, causando también retrasos en la producción y problemas de calidad. Por otra parte, se desconocen los mecanismos de respuesta genética a nivel transcripcional de *S. cerevisiae* a dichos factores y la relación de éstos con la floculación. Identificar los genes implicados en esta respuesta, permitirá tener una herramienta de diagnóstico cuando ocurran situaciones sub-estándar de producción, y eventualmente diseñar procesos y equipos que minimicen sus efectos. Esto llevará a un manejo más racional de las fermentaciones, evitando fallas en la floculación y por lo tanto disminuyendo costos por separación del producto o desviaciones de la calidad del mismo.

3. HIPÓTESIS

Mediante el análisis de expresión genética global es posible identificar los factores genéticos que regulan la floculación de *S. cerevisiae* bajo condiciones de estrés fisiológico.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo General

Analizar la expresión genética global de *Saccharomyces cerevisiae* bajo diferentes condiciones de estrés fisiológico, identificando los genes moduladores de la floculación bajo estas condiciones.

4.2 Objetivos Específicos

4.2.1 Estandarizar condiciones de fermentación a escala laboratorio para evaluar el efecto de alta presión osmótica, presión hidrostática, alto contenido de glucosa, agotamiento de nutrientes y edad generacional, sobre la capacidad floculante de cepas de *S. cerevisiae*.

4.2.2 Identificar la distribución de genes *FLO* en cepas de levadura industriales y silvestres.

4.2.3 Realizar análisis de expresión transcripcional de los genes de floculación bajo diferentes condiciones de estrés en fermentación.

4.2.4 Realizar análisis de expresión global transcripcional bajo estas diferentes condiciones de fermentación.

4.2.5 Establecer herramientas de diagnóstico de falla de procesos, seleccionando genes cuya expresión sea determinante para la represión de la floculación bajo los factores analizados.

5. ANTECEDENTES

5.1 *Saccharomyces cerevisiae*

Los hongos (del latín fungus), son organismos heterótrofos, carentes de clorofila. Las células de los hongos poseen un núcleo diferenciado y muchas de ellas se reproducen por esporulación. El tipo de los hongos auténticos (Eumycophyta) abarca a más de 80,000 especies que se dividen en 4 clases:

- Phycomycetes
- Ascomycetes
- Basidiomycetes
- Fungi imperfecti

Las levaduras cerveceras se encuentran dentro de la clase Ascomycetes, orden Endomycetales, familia Saccharomycetaceae, subfamilia Saccharomycoidae y genero *Saccharomyces* (Lodder y Kreger-Van Rij, 1967).

Durante un tiempo llegaron a clasificarse alrededor de 1000 cepas de levadura como *Saccharomyces cerevisiae*, lo que provocaba confusión al estar agrupadas en dicha especie tanto levaduras usadas en la panificación, elaboración de vino, ó cerveza. Las pequeñas diferencias entre las cepas y que no fueron tomadas en cuenta por los taxónomos, ponían en aprietos a la industria.

A principios de los 1980's un grupo de taxonomistas (Priest y Campbell, 1987), estuvieron de acuerdo en clasificar a *Saccharomyces uvarum* (levaduras lager) y *Saccharomyces cerevisiae* (levaduras ale, panaderas y de destilería) en una sola especie, *S. cerevisiae*. De está manera el numero de especies abarcadas por el genero *Saccharomyces* descrito por Lodder (Lodder y Kreger-Van Rij, 1967) en 41 especies, se redujo a 10.

Una de las características fisiológicas que ayuda a la identificación de cepas pertenecientes al género *Saccharomyces*, es el hecho de que carecen de la habilidad de utilizar el nitrato como fuente de nitrógeno (Hough, 1990). Un rasgo que permite diferenciar a *S. uvarum* de *S. cerevisiae*, es que la primera fermenta la melibiosa y la segunda no. La razón radica en que *S. uvarum*, posee el gen *MEL* que codifica para la enzima α -galactosidasa, conocida también como melibiasa. Ambas levaduras consumen galactosa, sacarosa y maltosa (Russell, 1995).

Una célula de levadura desarrollada mide entre 8 – 14 μm , su forma puede ser esférica ó elipsoidal, tanto su forma como el tamaño varían según la especie a la que pertenezcan. Su estructura celular está conformada por un núcleo, pared celular, vacuolas, citoplasma, retículo endoplásmico, mitocondrias y membrana plasmática. Su citoplasma es homogéneo, en ocasiones con una estructura fina granulosa, con inclusiones (glucógeno, volutina, lípidos). Todas las levaduras pertenecientes al género *Saccharomyces* se reproducen por gemación multilateral y una sola célula puede dar lugar a más de 30 gemas a lo largo de su vida (Hough *et al.*, 1982).

Las levaduras pueden ser diploides, poliploides ó aneuploides, sin embargo la mayoría de las cepas en laboratorio son haploides. El ciclo de vida de una levadura se refiere a la serie de eventos que ocurren entre la formación de una célula por división de una célula madre y el momento en que esa célula hija se divide. Este modo de división se denomina reproducción vegetativa, durante la cual las levaduras se multiplican por gemación. Como consecuencia de ello, una cicatriz de gemación queda perenne sobre la superficie de la pared celular de la célula madre, mientras una cicatriz de nacimiento (más pequeña), marca la superficie de la célula hija (Russell, 1995).

Una célula de levadura haploide en un medio de cultivo rico, y óptima temperatura, tiene un tiempo de duplicación cercano a los 90 minutos. Investigaciones recientes han demostrado que las levaduras cuentan con 2 tipos de apareamientos, denominados α y β . Se ha observado que cuando células de diferente tipo de

apareamiento entran en contacto en presencia de un medio rico en nutrientes, ambas suspenden su ciclo celular y lo ubican en su punto de inicio. Posteriormente las células se aglutinan y se combinan, lo que forma una célula que cuenta con 2 núcleos (heterocarionte) y la fusión de ambos núcleos produce un cigoto diploide. Esta célula diploide puede reproducirse por mitosis ó puede ser llevada hacia la meiosis y formación de esporas, si las condiciones del medio de cultivo no son las adecuadas (Russell, 1995). Durante la esporulación, las células diploides se dividen por meiosis, lo que origina cuatro células haploides (tétradas), contenidas dentro de un saco llamado asca (Figura 2). Las ascas poseen una pared gruesa que posteriormente se rompe para liberar las células haploides (Priest y Campbell, 1987).

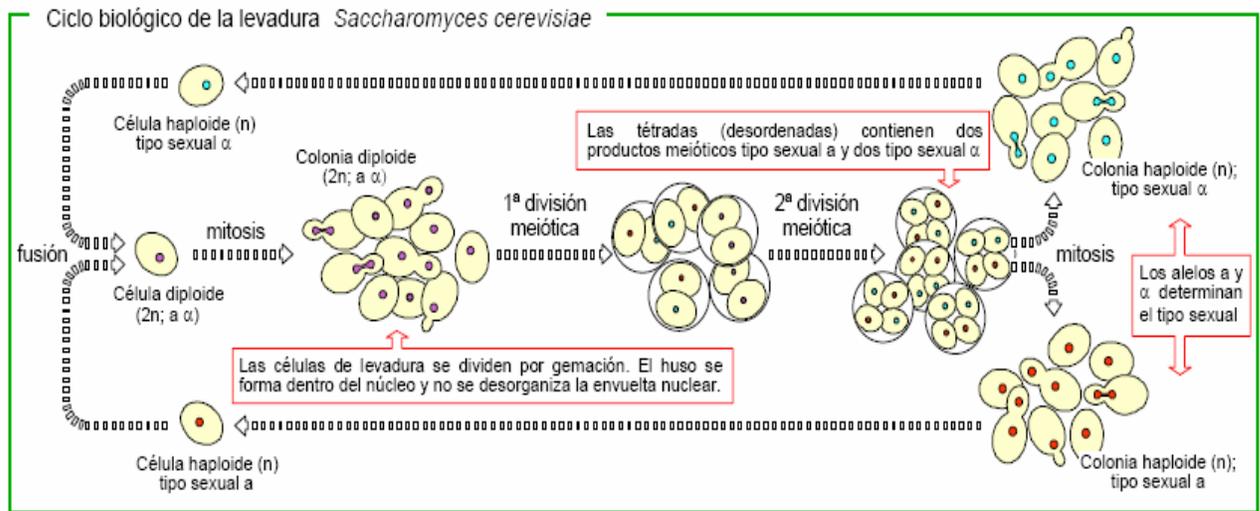


Figura 1. Ciclo de vida de *Saccharomyces spp.*

5.2 Tipos de Fermentaciones

La producción industrial de cerveza consta de varias etapas, pero sin duda la más importante es la fermentación primaria. Durante esta parte del proceso la levadura

metaboliza los carbohidratos presentes en el mosto y como resultado de ello la producción de alcohol se lleva a cabo. Es precisamente al final de la fermentación primaria cuando se aprovecha un fenómeno característico de la levadura: la floculación (Figura 2.).

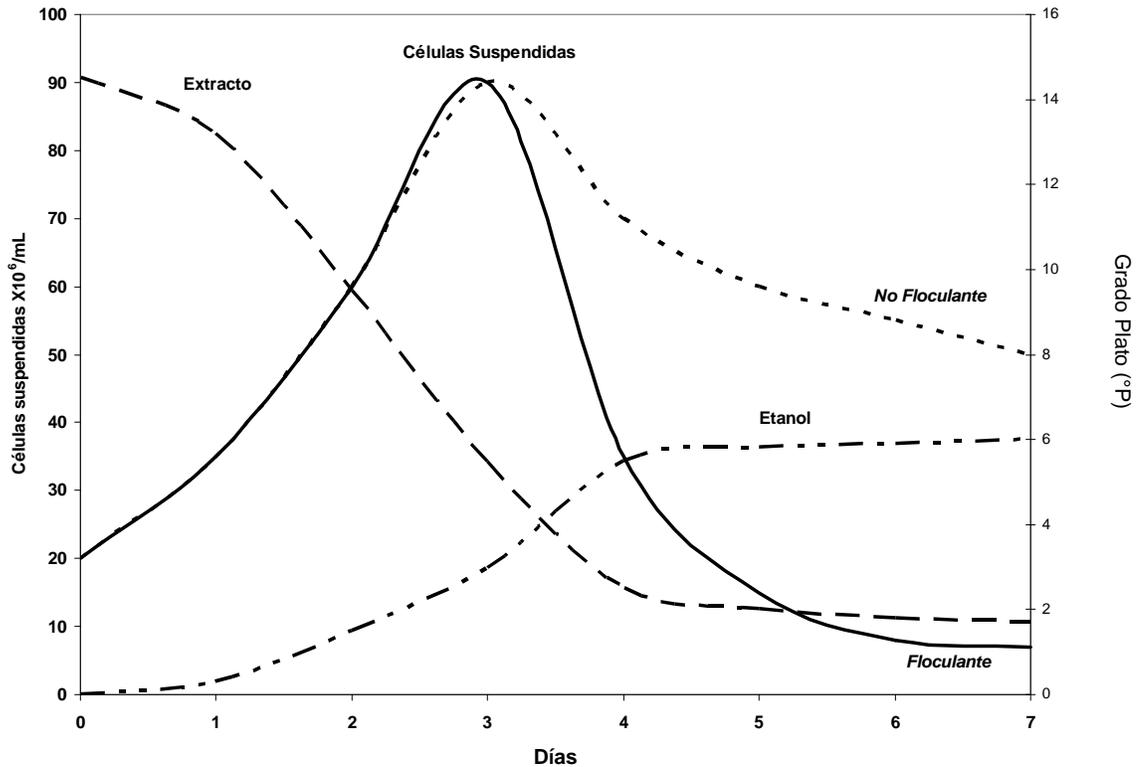


Figura 2. Curva de fermentación de una levadura floculante y no floculante.

En la actualidad existen dos tipos principales de cerveza: lager y ale. Las cuales, como se indicó anteriormente, son fermentadas con levaduras de *S. uvarum* y *S. cerevisiae*, respectivamente. De manera tradicional la cerveza lager es producida por levaduras de fondo, con un rango de temperaturas entre los 7 y 15 °C; al llegar el fin de la fermentación, las levaduras floculan y sedimentan al fondo del reactor, donde son colectadas. Levaduras de superficie, son empleadas para la producción de cerveza tipo ale, estas levaduras fermentan a temperaturas entre los 18 y 22 °C, son menos floculantes y como consecuencia las burbujas de dióxido de carbono las arrastran fácilmente a la superficie al final de la fermentación. A esta característica se debe que las levaduras de

superficie sean recolectadas de la parte superior del reactor en un procedimiento llamado “desnatado”. Mientras tanto las levaduras de fondo son “cosechadas” del fondo del fermentador (Dengis *et al.*, 1995). Precisamente las levaduras objeto de estudio de esta investigación corresponden a este último tipo.

Las levaduras lager forman un grupo heterogéneo de especies (Vaughan-Martini & Martín, 1987). *Saccharomyces cerevisiae*, también llamada a nivel industrial *Saccharomyces pastorianus*. La cepa CBS1513 (*Saccharomyces carlsbergensis*) fue aislada por Hansen en las cervecerías Carlsberg en el siglo XIX. Esta cepa y sus derivados son las levaduras lager más estudiadas. Como característica, estas levaduras raramente esporulan y cuando lo hacen, sus esporas no son viables (Casaregola *et al.*, 2001).

Las levaduras lager son híbridos naturales entre *Saccharomyces cerevisiae* y otras especies *Saccharomyces sensu stricto* (incluye: *S. bayanus*, *S. cariocanus*, *S. cerevisiae*, *S. kudriavzevii*, *S. mikatae* y *S. paradoxus*); adicionalmente estos híbridos tienen una naturaleza hapopoliploide compleja, además de una coexistencia de cromosomas homólogos e híbridos (Casaregola *et al.*, 2001; Piskur *et al.*, 2004).

5.3 Floculación

A nivel celular la floculación consiste en la agregación asexual (diferente del apareamiento mencionado antes) de las levaduras por un mecanismo de adhesión mediado por proteínas localizadas en la pared celular tipo lectinas (más propiamente llamadas zimolectinas, Goldstein *et al.*, 1980; Speers *et al.*, 1998). Este proceso también puede involucrar la formación de interacciones hidrofóbicas y uniones inespecíficas débiles. Las zimolectinas reconocen residuos de manosa localizados en la pared de células adyacentes (Figura 3), generando uniones específicas mediante puentes de hidrógeno entre los aminoácidos y los residuos de manosa (Speers *et al.*, 1992, Straver *et*

al., 1994; Bony *et al.*, 1997; Patelakis *et al.*, 1998; Bony *et al.*, 1998; Touhami *et al.*, 2003).

Actualmente se conocen tres mecanismos generales de floculación, los cuales se diferencian por su susceptibilidad a inhibición por monosacáridos: a) Flo, la cual es inhibida por la presencia de manosa; b) New-Flo es inhibida por la presencia de glucosa y manosa (se considera que la diferencia estriba en la estructura del sitio de unión de la lectina, la cual es codificada por genes relacionados, pero distintos) y c) insensible a manosa y aparentemente no involucra la participación de zimolectinas sino uniones inespecíficas tipo interacciones hidrofóbicas y/o iónicas (Stratford y Assinder, 1991; Dengis *et al.*, 1995, Nishihara *et al.*, 2002).

La capacidad de floculación es una característica determinante en la selección de cepas industriales, ya que una floculación excesiva provocará asentamiento prematuro de la levadura, dejando azúcares fermentables en el producto y una inadecuada remoción de diacetilo (que provoca un desagradable sabor a mantequilla). Por otra parte, una floculación débil o nula dejará la levadura suspendida al final de la fermentación, provocando problemas de filtración, recuperación de la levadura para reuso y sabor y aroma a levadura autolizada (Verstrepen *et al.*, 2003).

En la industria es común observar pérdidas parciales o completas de la floculación, las cuales pueden ser reversibles, si son debidas a condiciones de operación sub-estándar (problemas en formulación de mosto, control de temperatura, aireación, etc.). Sin embargo, también existen muchos casos en los que la pérdida o disminución es irreversible, debido a mutaciones en los genes involucrados, lo que hace necesario cambiar la cepa de levadura en uso (Sato *et al.*, 2001).

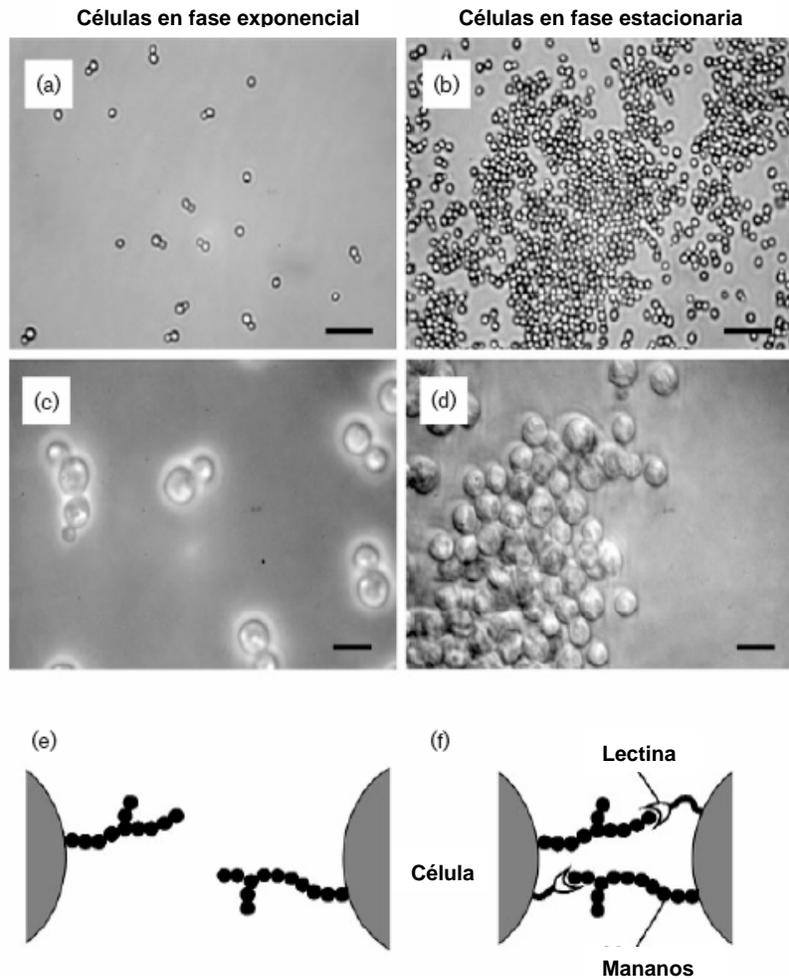


Figura 3. Estado de agregación de las levaduras en distintas fases de crecimiento. En (e) y (f) se muestra la interpretación a nivel molecular de los eventos que ocurren en la floculación (Touhami *et al.*, 2003).

5.4 Factores que afectan la floculación

Los factores que afectan la floculación se pueden distinguir en tres grandes grupos: a) carga genética de la cepa; b) condiciones nutricionales del medio y c) condiciones de fermentación (Speers *et al.*, 1992; Jin y Speers, 1999; Speers *et al.*, 2006).

En cuanto a la carga genética de la levadura, se conocen cepas que difieren en el tipo y cantidad de genes *FLO*, que codifican las zimolectinas. En general las cepas con actividad floculante contienen uno o más de estos genes. Sin embargo, la sola presencia de los mismos no garantiza el despliegue de la floculación, ya que algunas cepas en las que se han detectado estos genes, son no floculantes, lo que indica que la expresión de la actividad esta sujeta a controles a nivel transcripción y/o traducción (Sato *et al.*, 2001).

Respecto a las condiciones nutricionales del medio, existen claras evidencias que una carencia de cationes divalentes, en especial calcio, impide la floculación. Al igual que las lectinas vegetales, se considera que este ión participa como un activador provocando un cambio conformacional en la floculina, que entonces es capaz de reconocer los residuos de manosa en células adyacentes (Speers, 1992). Por el contrario, otros nutrientes tienen un efecto represor sobre la floculación, como algunos azúcares sencillos (glucosa, manosa, maltosa, maltotriosa). Se estima que estos azúcares compiten con los residuos de manosa de las células adyacentes por los sitios de unión de las floculinas, bloqueando la adhesión (Kobayashi *et al.*, 1998).

Sin embargo, adicionalmente, deben existir mecanismos de control a nivel de expresión, ya que el crecimiento de la levadura en medio rico en glucosa, provoca una disminución en la capacidad floculante (además de la conocida represión catabólica) que permanece aún después de agotada la glucosa en el medio (Soares y Vroman, 2003; Sampermans *et al.*, 2005). Esto indica una posible relación en los mecanismos de represión catabólica y floculación. De hecho, es interesante notar que al menos en el caso de *FLO11*, el mecanismo de regulación es muy similar al de *STAI*, que codifica para una exoenzima glucoamilasa, necesaria para el consumo de dextrinas, ya que ambos genes son reprimidos por glucosa vía reguladores transcripcionales (Gagiano *et al.*, 1999).

La presencia de niveles mayores de glucosa en la fermentación se ha hecho muy importante en los últimos años, debido a la demanda de productos bajos en calorías. Una estrategia para lograr esto es tener una mayor conversión de dextrinas en azúcares

fermentables usando enzimas glucoamilasas, las cuales provocan un aumento en el contenido de glucosa, a la vez que disminuyen el contenido de maltosa (Hardwick 1995). Esto puede generar un efecto represor en la floculación, al menos en las cepas que poseen el gen *FLO11*.

Los aspectos más estudiados en la floculación son los efectos de los factores medioambientales, como temperatura, pH, agitación, presencia de etanol, presión hidrostática y osmótica. En general estos factores actúan sobre las fuerzas físico-químicas que participan en la unión lectina-carbohidrato o en las uniones inespecíficas (fuerzas de Van der Waals, efecto hidrofóbico, puentes de hidrogeno e interacciones iónicas) (Denguis *et al.*, 1995; Jin y Speers, 2000).

En particular, en el caso de la presión hidrostática y osmótica, además del efecto físico directo sobre pared celular, se desconoce si existe un impacto sobre la expresión de los genes *FLO*, lo cual es presumible que ocurra, ya que eventualmente las células expuestas a estas condiciones manifiestan pérdida progresiva de la capacidad floculante, después de varios reusos (Smart y Whisker, 1996; Jenkins *et al.*, 2003) Respecto a la presión osmótica elevada, desde hace mas de 20 años ha habido una tendencia generalizada hacia el “high gravity brewing”, es decir, fermentaciones usando mostos concentrados. En este caso la concentración convencional de 12°P (1°P es igual a 1 gr. de extracto en 100 gr. de mosto) se ha elevado paulatinamente a valores de hasta 18-20°P (Hardwick 1995, Stewart, G.G. 1999) Esto impone una carga adicional de estrés en la levadura que se ve reflejada en fermentaciones más lentas, viabilidad y vitalidad disminuidas (Heggart *et al.*, 1999; Pratt-Marshall *et al.*, 2002). Ocasionalmente también se han observado defectos en floculación (Majara *et al.*, 1996; Rhymes y Smart, 1996).

Asimismo, existe la tendencia a incrementar el volumen y altura de los tanques de fermentación. Hasta hace 30 años los tanques convencionales eran tanques cilíndricos horizontales, donde la altura no sobrepasaba los 3 m. Actualmente se producen tanques cilindro cónicos verticales de hasta 10,000 HL de capacidad y altura de mas de 20 m. (Hardwick 1995) El sometimiento de la levadura a presiones de 1.94 – 2 atm (por

ejemplo un tanque de 6,500 hl con una altura de 19.6 mt. genera una presión en el fondo de 2.5 bar -2.47 atm- , Wittl y Maier, 1980) provocó un decremento en la viabilidad y alteraciones en el comportamiento fermentativo (Heggart et. al., 1999). Además se han observado alteraciones sobre la floculación de algunas cepas en tanques cilindro cónicos, mientras que otras parecen no ser afectadas (A. Jorgensen Lab., 2002; Powell *et al.*, 2004). Los mecanismos genéticos que operan bajo estas circunstancias son desconocidos.

Adicionalmente se ha hipotetizado que la edad generacional de la población de la levadura afecta la capacidad floculante. A este respecto se ha observado que células jóvenes floculan menos que aquéllas con mayor número de generaciones transcurridas. La explicación a este fenómeno es que al envejecer la célula, su pared se torna más rugosa, lo que puede facilitar las uniones inespecíficas que preluden a la unión lectina-carbohidrato. Además, pudiera suponerse un mayor nivel de expresión en las células, conforme avanza su ciclo de vida (Powell *et al.*, 2003). Sin embargo, existe evidencia que el uso seriado por más de 24 generaciones, disminuyó la capacidad para flocular de levaduras ale y lager (Smart y Whisker, 1996), probablemente por la repetida exposición a factores de estrés (Smart *et al.*, 1995).

También se ha reportado que la falta de nutrientes por tiempo prolongado afecta notablemente la capacidad de flocular, y que este defecto se manifiesta incluso en las fermentaciones subsecuentes. Es interesante mencionar que bajo estas condiciones, se producen cambios importantes en la topografía de la pared celular, así como alteraciones en sus características fisicoquímicas (potencial zeta, hidrofobicidad, etc. Smit *et al.*, 1992; Ogata *et al.*, 2008) Aunque se ha visto que el tipo de fuente de carbono durante el período de almacenaje con pocos nutrientes afecta la retención de la floculación, los mecanismos fisiológicos o genéticos por los que ocurre este fenómeno son desconocidos hasta el momento (Rhymes y Smart, 1996; Soares y Vroman, 2003).

5.5 Genes *FLO*

Como se mencionó, los genes que codifican para las zimolectinas son llamados *FLO*. Las zimolectinas son proteínas de gran tamaño (más de 1,500 aminoácidos), las cuales constan de 3 módulos principales: una secuencia señal hidrofóbica para inserción en membrana en el extremo amino terminal, una región central rica en serina y treonina y una secuencia señal para anclaje GPI (glicosil-fosfatidil-inositol) en el carboxilo terminal (Bidard *et al.*, 1994; Watari *et al.*, 1998; Guo *et al.*, 2000). Se sabe que la región amino terminal es importante para el reconocimiento de los carbohidratos en la pared de una célula adyacente (Kobayashi *et al.*, 1998). Una excepción notable es *FLO8* que codifica para una proteína de alrededor de 800 aminoácidos que funciona como activador transcripcional de *FLO1*, *FLO11* y posiblemente otros genes *FLO*, además de genes de glucoamilasa *STA* y otros relacionados con crecimiento pseudohifal (Liu *et al.*, 1996; van Dyk *et al.*, 2005).

Los genes *FLO* incluyen genes dominantes como *FLO1* (*FLO4*), *FLO2*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10* y *FLO11*; y recesivos o semidominantes como *flo3*, *flo6*, *flo7*, *fsu1*, *fsu2* y *fsu3* (Dranginis *et al.*, 2007). Con excepción de *FLO11* (también llamado *MUC1*), la familia de las zimolectinas comparte una similitud de aminoácidos de 58 a 96%. *FLO11* es el miembro más divergente de la familia (similitud 37% identidad 26%) y está más relacionado con los genes *STA* de glucoamilasa de *S. diastaticus* (Lo y Dranginis 1996). Al igual que estas enzimas, es sensible a represión por glucosa, al tipo de apareamiento, inducible por limitación de nutrientes y regulado por *STA10*. Además, a diferencia de las demás floculinas (excepto *FLO8*), *FLO11* no está localizado cerca del telómero, sino cerca del centrómero en el brazo derecho del cromosoma IX. Por su similitud se ha hipotetizado que los genes *STA* evolucionaron a partir de *FLO11*. Otros genes relacionados con *FLO11* son *GAS1/GGPI*, *FIG2*, *AGAI*, *KRE1*, que participan en procesos de adhesión para apareamiento; además tiene un 24% de identidad (36 % de similitud) con *MUC1* que codifica para la mucina intestinal humana (Lo y Dranginis, 1996).

La presencia de una gran región central con secuencias repetidas de Ser-Tre en las zimolectinas (por ejemplo en Flo11p existen 42 copias de la secuencia PVPTPSSSTTESSSA), provoca una tendencia a generar mutaciones por recombinación. Esto se ve reflejado en que la floculación es una de las características más fácilmente mutables de las levaduras industriales (Liu *et al.*, 1996; Sato *et al.*, 2001).

El análisis de la secuencia sugiere que los genes de la floculación son una familia multigénica localizada cerca de los telómeros, similar a las familias *SUC*, *MEL* y *MAL*, las cuales codifican para características importantes para las levaduras cerveceras (asimilación de sacarosa, melibiosa y maltosa, respectivamente), con la ya mencionada excepción de *FLO8* y *FLO11*, localizados más cerca de los centrómeros de los cromosomas V y IX, respectivamente (Teunissen y Steensma, 1995).

Se han identificado también tres pseudogenes, YAL065C, YAR061W, YAR062W. YHR213W también ha sido identificado en forma de secuencias fragmentadas que guardan homología con *FLO1* (Global Gene Hunter, 2006). Se desconoce si estas secuencias son transcritas en cepas industriales y si tienen alguna participación en la floculación.

5.6 Control de la expresión de la floculación

Indudablemente, el mecanismo de control de la floculación es exquisito, ya que una expresión prematura de la floculación priva a la levadura de estar suspendida en el medio para asimilar los carbohidratos. El hecho de que la floculación se ve retrasada hasta después del consumo de azúcares, señala dos posibilidades: que el retraso en la floculación sea meramente debido a factores fisicoquímicos (en especial la desaparición de mono y oligosacáridos que compiten por el receptor Flop) o a una expresión tardía de los genes. Al parecer ambas posibilidades ocurren concomitantemente, ya que la sola exposición de la levadura floculada a un medio rico en monosacáridos, revierte la agregación (Speers *et al.*, 1992) y a la vez se ha observado mediante microarreglos de

ADN, que la expresión del gen *MUC1 (FLO11)* se incrementa mas de 10 veces hacia el final de la fermentación (Kondo *et al.*, 2003).

Poco se conoce sobre la identidad de los elementos regulatorios de esta expresión en fermentaciones industriales (Halme *et al.*, 2004). La mayoría de los estudios provienen de cepas *Saccharomyces cerevisiae* a nivel laboratorio y con *FLO11*, que como se indicó, es el miembro de esta familia mas poco relacionado con otras zimolectinas. Lo que ha hecho tan atractivo el estudio de este gen es que esta proteína, a diferencia de las codificadas por otros genes *FLO*, participa además de la floculación en invasividad en agar, crecimiento pseudohifal, adhesión a sustrato celular y formación de biofilms, por lo que ha servido como modelo para el estudio de los genes implicados en el control de la diferenciación celular (Rupp *et al.*, 1999). El promotor de *FLO11* es uno de los más grandes conocidos en *S. cerevisiae* ocupando mas de 2.8 kb antes del codón de inicio. Es prácticamente idéntico al promotor de *STA*. En ambos existen secuencias que son reconocidas por activadores y represores de transcripción. En el promotor *FLO11* se han encontrado 4 UAS (upstream activation site, sitio de activación transcripcional) y 9 URS (upstream repression site, sitio de represión transcripcional). Además se ha comprobado la unión al promotor de proteínas represoras y activadoras (Gagiano *et al.*, 1999, Rupp *et al.*, 1999). En general, se sabe que los genes con actividad represora sobre *FLO11* son *NRG1*, *NRG2*, *SOK2*, *SFL1*, *VHS3* y *TUP1-SSN6*, mientras que activadores son *TEC1*, *FLO8*, *SWI-SNF*, *PHD1*, *MSN1* y *RME1* (Gagiano *et al.*, 1999; Fleming y Pennings, 2001; Kim *et al.*, 2004a, b; Ruiz *et al.*, 2004; van Dyk *et al.*, 2005). Además genes de la cascada de cinasas por AMPc como *RAS2*, *KSS1* y *TPK2* también afectan la expresión de *FLO11* (Rupp *et al.*, 1999).

Algunos de estos elementos de control actúan directamente sobre el promotor o el mecanismo de transcripción de la holoenzima ARN polimerasa II (Flo8p, Tec1p, Sfl1p, Nrg1p y Nrg2p), otros como Tup1-Ssn6 y Swi-Snf alteran la topología de la cromatina para reprimir o activar a *FLO11*, respectivamente (Gagiano *et al.*, 1999; Fleming y Pennings, 2001; Kim *et al.*, 2004a, b; van Dyk *et al.*, 2005).

En cuanto al gen *FLO1*, más común y holotipo de las floculinas, solo se sabe que *FLO8* es necesario para su activación, pero se desconoce si participan otros genes regulatorios, como los observados en *FLO11* (Liu *et al.*, 1996). De los demás genes *FLO* se desconocen sus mecanismos de regulación, excepto que *TUPI* participa en el control de 6 genes *FLO* (DeRisi *et al.*, 1997) Dado que *TUPI* se ha visto involucrado en regulación de genes activados por estrés (Carrico y Zitomer, 1998), se refuerza la idea de una posible relación entre diversas condiciones de estrés y la expresión de genes *FLO*.

5.7 Análisis de expresión a nivel transcripcional

Para muchos microorganismos, los proyectos de investigación se encuentran ya en la era post-genómica. La secuencia de ADN de estos microorganismos está siendo analizada con varias herramientas computacionales para extraer la mayor cantidad de información teórica. Esta estática descripción teórica de la célula es actualmente acompañada por dos metodologías muy dinámicas conocidas como proteomas y transcriptomas. El transcriptoma se refiere al perfil de transcritos de la célula (ARNm) El proteoma se refiere al producto de la traducción de estos ARNm (es decir las proteínas) y las diferentes variantes o modificaciones generadas por la célula después de este proceso (Griffin *et al.*, 2002). Desde la publicación de la secuencia genómica de *S. cerevisiae* en 1996 por Goffeau y colaboradores, se abrió la posibilidad de estudiar a nivel global la expresión de los genes de la levadura. De hecho el primer análisis de transcriptoma se realizó en *S. cerevisiae* en 1996 (Velculescu *et al.*, 1997), mediante la técnica conocida como SAGE (Serial analysis of Gene Expression).

A partir de 1995, se desarrolló el análisis de expresión a nivel transcripción mediante la técnica conocida como microarreglos de ADN. Esta técnica se basa en el procedimiento de hibridación llevado a un nivel masivo (De Risi *et al.*, 1997). Mediante este análisis, ha sido posible identificar los genes activados bajo ciertas condiciones fisiológicas o patológicas. De esta forma se han identificado genes relacionados con cáncer, infecciones, estrés, etc. (Gasch *et al.*, 2000, Peng *et al.*, 2003).

En 1997 se reportó el análisis de expresión de los aproximadamente 6100 genes de *S. cerevisiae* usando microarreglos de ADN (DeRisi *et al.*, 1997). Los genes fueron fijados en chips de vidrio en posiciones determinadas. Después el total del ARN o los ARN mensajeros, extraídos de las células a evaluar fueron copiados a ADNc. Este ADNc fue marcado fluorescentemente con Cy3 y Cy5, y después se hibridó con el genoma fijado en los chips. Después de lavado para eliminar el ADNc no hibridado, el chip fue leído en un analizador que detectó los sitios donde hubo hibridación específica, indicada por la fluorescencia emitida. La cantidad de señal fijada era proporcional al nivel de expresión del ARN mensajero de donde se obtuvo el ADNc. Así, a la vez que se identificó la naturaleza del gen expresado, se pudo determinar el nivel de expresión del mismo. De esta forma se identificaron genes cuya expresión se ve inducida o reprimida durante el shift diauxico. También los genes cuya regulación esta bajo el control de *TUPI* (entre ellos *FLO1*) y *YAP1* (Lee *et al.*, 1999).

Usando microarreglos de ADN en condiciones aerobias y anaerobias en quimiostato, se determinaron los genes controlados por oxígeno. Interesantemente entre ellos se encuentra *FLO11* cuya expresión se aumento más de 900 veces en anaerobiosis (Linde *et al.*, 1999).

En otros estudios en *S. cerevisiae*, se han realizado análisis en microarreglos de ADN para conocer la expresión durante la fermentación y su relación con la producción de compuestos volátiles (responsables del sabor y el aroma) y la producción de compuestos azufrados en mostos con bajo contenido nutricional o relación malta:adjuntos menor (Fujita *et. al.*, 2002; Kondo *et al.*, 2003) Otros estudios se han enfocado a revelar los patrones de expresión globales en fermentaciones industriales, comparándolos con los primeros ensayos realizados en condiciones y con cepas de laboratorio (Higgins *et al.*, 2001; Olesen *et al.*, 2002; James *et al.*, 2003). A la fecha no se han realizado estudios mediante esta tecnología que permitan dilucidar los mecanismos de expresión de la floculación, bajo condiciones que afecten a la misma como la presencia de glucosa, alta presión osmótica e hidrostática, senescencia o agotamiento de nutrientes en cepas de levaduras lager industriales.

6. METODOS

6.1 Diseño experimental

Se hicieron fermentaciones usando condiciones de estrés que se han reportado que afectan la floculación, bajo niveles extremos de operación. Para esto se usó un diseño factorial de 5 tratamientos con 2 niveles. Los valores de estos niveles se fijaron de acuerdo a la práctica actual de operación del proceso de elaboración cervecero lager (Hardwick, 1995; Klimovitz, 2002), y se muestran en la Tabla I. Todas las fermentaciones se hicieron por duplicado. Para los análisis estadísticos se usaron pruebas de regresión simple (para determinar la correlación de la cantidad de genes *FLO* con la floculación), análisis de distribución normal (cálculo de Zscore, para determinar diferencias significativas en la expresión por microarreglos), Prueba F de varianzas (para los análisis ontológicos) y Prueba de T Student (para los ensayos de floculación y de expresión por PCR tiempo real) (Dytham, 1999).

Tabla I

Condiciones experimentales basales y de estrés usadas en las fermentaciones con levaduras industriales

| | Estado basal | Estado de estrés |
|-----------------------------|----------------------|----------------------------|
| Restricción Calórica | Levadura Fresca | Lev. Incubada 22 h en agua |
| Represión catabólica | Glucosa:Maltosa 1:10 | Glucosa:Maltosa 10:6 |
| Presión Osmótica | 12°P | 17°P |
| Presión Hidrostática | 10 ⁵ kPa | 10 ⁶ kPa |
| Edad generacional | 1a generación | 10a generación |

6.2 Cepas de levadura

Las cepas de levadura *S. cerevisiae* usadas fueron de la colección de cepas de CCM (Cervecería Cuauhtémoc Moctezuma). Estas fueron las cepas lager C820, C790, LAW, KJ8, BRY y J-2036; la cepa de panadería C7754. *S. diastaticus*, *S. willianus* y *S. pastorianus* fueron obtenidas de American Type Culture Collection (ATCC, Rockville MD, USA).

6.3 Reactivos

Los microarreglos YOMGW_01 fueron provistos por el Instituto de Fisiología de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México), los cuales estuvieron contruidos con oligos 50meros a partir del extremo 5' de 6480 genes de *S. cerevisiae* cepa S288C, cubriendo todo el genoma como está publicado en el SGD (*Saccharomyces* Genome Database) en Internet. Una ventaja de este diseño es que la hibridación se dio en la parte mas conservada de los ORF (extremo 5'), disminuyendo la probabilidad de falsos negativos. Otras características del mismo se presentan en la Figura 4. Los reactivos para la extracción de ARN total y PCR tiempo real fueron de Roche (Indianápolis IN, USA). Para la síntesis de ADNc, PCR punto final y microarreglos fueron de Promega (Madison WI, USA). Otras soluciones empleadas se presentan en el Apéndice A.

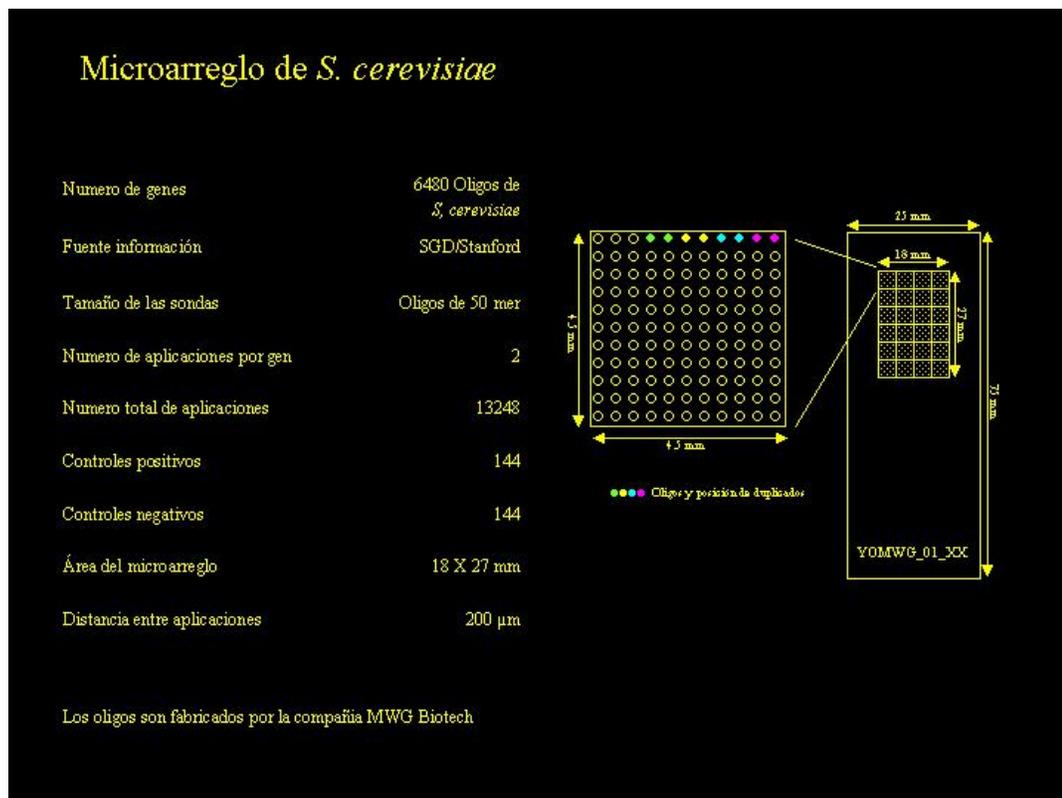


Figura 4. Características del microarreglo de ADN usado (YOMGW_01)

6.4 Fermentaciones

Se hicieron fermentaciones por duplicado en probetas de 2 L usando mosto proporcionado por CCM. La densidad de extracto se ajustó a 17°P, excepto para los ensayos de efecto de estrés osmótico, donde además se usaron fermentaciones a 12°P. La fermentación se realizó ajustando la concentración inicial de oxígeno a 1 ppm por cada grado Plato y el inóculo a 1.2×10^6 cel/mL por cada grado Plato. La temperatura fue 16°C hasta completar 7 días de fermentación. El perfil de azúcares se ajustó usando la enzima amiloglicosidasa Attenuzyme (Novozymes; Dittingen, Switzerland) Se realizaron fermentaciones por separado para cada una de las 5 variables evaluadas, usando 2 condiciones extremas para cada variable, de acuerdo a los procedimientos actuales de producción en la industria (Tabla I). Las condiciones de fermentación fueron: 1) mostos con perfil glucosa:maltosa 1:10 y 10:6 (variable perfil de carbohidratos), 2) fermentaciones a 12°P y 17°P (variable presión osmótica), 3) fermentaciones en tanques de 5 (1.2×10^5 kPa) y 6800 HL (2.7×10^6 kPa) (variable presión hidrostática), 4) fermentaciones con levadura de 1ª y 9-13ª generación (variable edad generacional) y 5) fermentaciones con levadura recién colectada y almacenada 22 h a 25°C (variable restricción calórica). Cada par de fermentaciones sólo se diferenciaron en las condiciones extremas de ensayo, a fin de evaluar el impacto de la variable en estudio sobre la expresión génica, las demás condiciones de proceso se mantuvieron exactamente igual en ambas fermentaciones. De la levadura en suspensión al 3-5º día, se obtuvieron 5 mL los cuales fueron procesados para extracción del ADN y ARN. La levadura se colectó al final de cada fermentación, por decantación del producto para las pruebas de viabilidad.

6.5 Aislamiento de ADN

Una vez obtenidas las células de levadura, se centrifugaron alícuotas de 1 mL a 14000 rpm por 10 min. Las células fueron resuspendidas en buffer TE (10 mM, Tris; 0.1 mM, EDTA; pH 8.0) más 10% de SDS y fueron lisadas a 65°C por 10 min. El ADN genómico fue extraído con fenol:cloroformo (24:1) y precipitado con isopropanol (Sambrook *et al.*, 1989). El ADN fue resuspendido en buffer TE y tratado con 5 unidades

of RNase One (Promega, Madison WI, US) a 37°C por 30 min (Twintrack Advanced Course, 2006). Las alícuotas de ADN se mantuvieron a -20°C hasta su uso.

6.6 Extracción de ARN

Para la extracción de ARN total se usó el kit High Pure de Roche (Indianápolis, USA). Se ajustaron las células a 90×10^6 y se centrifugaron a 5000 rpm por 5 min con el fin de quitar el exceso de medio. La pastilla se resuspendió en 200 μ l de PBS y se transfirió la suspensión a un tubo de microcentrifuga estéril de 1.5 mL. Se agregaron 25 μ l de la solución de liticasa a 5 U/ μ l y se incubó por 15 min a 30°C. Después, se agregaron 400 μ l de de Lysis/Binding Buffer en las células resuspendidas. El contenido se mezcló con el uso de vortex. Posteriormente se insertó un High Pure Filter Tube dentro de un tubo colector y se transfirió toda la muestra dentro del filter tube y se centrifugó por 15s a 10,000 rpm. Se separó el tubo filtrante del tubo colector y se desechó el líquido filtrado, y de nuevo se insertó el tubo filtrante y el mismo tubo colector.

En un tubo estéril por separado, se prepararon 100 μ l de la solución ADNsa (90 μ l de ADNsa incubation buffer + 10 μ l de ADNsa I reconstituida) para cada muestra. Se agregaron 100 μ l de la solución de ADNsa dentro del tubo filtrante y se incubó por 15 min de 15 a 25°C. Posteriormente se agregaron 500 μ l de Wash Buffer I dentro del tubo filtrante y se centrifugo 15s a 10,000 rpm. Este paso repitió una vez más pero con 500 μ l de Wash Buffer II y finalmente con 200 μ l de Wash Buffer II centrifugando 2 min a la máxima velocidad, con el fin de remover cualquier residuo de Wash Buffer. Se desechó el tubo colector y se insertó el tubo filtrante en un tubo de centrifuga estéril de 1.5 mL. Para eluir el ARN se agregaron de 50 – 100 μ l de Elution Buffer en el tubo filtrante y se centrifugó por 1 min a 10,000 rpm. El ARN obtenido se guardó a -80°C hasta su uso.

6.7 Cuantificación de ADN y ARN

La cuantificación de ADN y ARN a partir de muestras de levadura se hizo en un espectrofotómetro Smart Spec 3000 (BioRad) diluyendo el ácido nucleico 1:100 en agua mQ libre de nucleasas, para luego medir la D.O. en una cubeta de 50 μ L a 260/280 nm.

6.8 Evaluación de floculación

La medición de la floculación se realizó esencialmente como se ha reportado anteriormente (Bidard *et al.*, 1994). Las células fueron lavadas dos veces con buffer defloculante (20 mM citrato [pH 3.0], 5 mM EDTA), y resuspendidas en el mismo buffer a una concentración de 5.3×10^7 células por mL para dar una absorbancia a 600 nm de aproximadamente 1.0. Después, 800 μ l fueron transferidos a una cubeta (1 cm^2) conteniendo 200 μ l de CaCl_2 100 mM para una concentración final de 20 mM. La cubeta fue invertida varias veces, entonces se leyó la absorbancia a los 0 y 17-18 min. Los resultados fueron reportados como porcentaje de células floculantes en muestras por duplicado, de acuerdo a la siguiente ecuación (Lo y Dranginis, 1996):

$$\% \text{ DE FLOCULACIÓN: } \frac{\text{Abs inicial} - \text{Abs final}}{\text{Abs final}} \times 100$$

En algunos experimentos, la floculación fue determinada por el método de sedimentación de Helms, como se describe en el Manual de Métodos de la American Society of Brewing Chemists Yeast-11A (1999).

6.9 Parámetros monitoreados durante las fermentaciones

Durante los 7 días de fermentación se utilizó una incubadora refrigerada en la que se reguló la temperatura a $16^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$. Por otro lado se monitoreó la densidad celular cada 24 h; pH, el extracto fermentable ($^\circ\text{P}$), así como el % de alcohol (v/v) con un densímetro digital Beer Analyzer, (Anton Paar, Graz Austria). Al término de las fermentaciones se analizó la concentración (en ppm) de dicetonas vecinales libres (diacetilo) por destilación seguida de formación de oximas y espectroscopia (ASBC, 1999) y la viabilidad por el método internacional de azul de metileno (ASBC, 1999). El perfil de carbohidratos fue medido por HPLC, para las pruebas de represión catabólica,

de acuerdo a los métodos de CCM. En el Apéndice B se presentan los protocolos de estas determinaciones.

6.10 PCR punto final de genes *FLO*

6.10.1 Diseño de iniciadores

Se diseñaron iniciadores para los genes *Lg-FLO1*, *FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9*, *FLO10* y *FLO11* utilizando las secuencias reportadas en el National Center for Biotechnology Information (NCBI, 2006) y el *Saccharomyces* Genome Database (SGD, 2006, <http://www.yeastgenome.org>). Para el diseño se utilizaron los programas Megalign y Gene Quest (ambos de DNASTAR Inc, v 4.05). En la Tabla II se muestran las características principales de estos genes.

Los iniciadores diseñados se muestran en la Tabla III. Su diseño se basó en su localización en regiones variables de los genes comparados mediante alineamiento múltiple usando el programa ClustalW2 y EMBOSS Pairwise Alignment Algorithms (<http://www.ebi.ac.uk/Tools>) Una vez diseñados, los iniciadores fueron analizados mediante alineamiento iniciador-iniciador y en la base de datos del NCBI usando el programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (Henegariu *et al.*, 1997) y simulación de PCR *in silico* con ayuda de los programas Fast PCR 6.0 (Rusland Kalendar Univ. Helsinki, Finlandia) y Ampify 3.1. (Engels, Univ. Wisconsin US). La síntesis de los iniciadores fue hecha por la compañía Uniparts a través de sus asociadas en EU.

Antes de utilizarlos, todos los iniciadores fueron ajustados a 100 μ M en agua miliQ y congelados a -20° C hasta su uso.

6.10.2 Cultivos

Se inoculó una asada de células de levaduras (C820, C790, LAW, BRY, J-2036, KJ8, C7754, *S. diastaticus*, *S. willianus* y *S. pastorianus*, por separado) en 10 ml de caldo YPD un tubo Falcon de 50 mL y se incubaron en agitador refrigerado a 150 rpm y 30°C por 24 h. El ADN fue aislado como se menciona anteriormente en el punto 5.5.

Tabla II
Características de genes *FLO* estudiados.

| Gen | Locus | No. Acceso | Localización (nt) |
|----------------|----------|------------|----------------------------|
| <i>Lg-FLO1</i> | YHR211W* | D89860 | Chr VIII (525392 a 528619) |
| <i>FLO1</i> | YAR050W | 851289 | Chr I (203394 al 208007) |
| <i>FLO5</i> | YHR211W | 856618 | Chr VIII (525392 a 528619) |
| <i>FLO8</i> | YER109C | 856845 | Chr V (377610 a 375211) |
| <i>FLO9</i> | YAL063C | 851236 | Chr I (27969 a 24001) |
| <i>FLO10</i> | YKR102W | 853977 | Chr XI (645994 a 649503) |
| <i>FLO11</i> | YIR019C | 854836 | Chr IX (393672 a 389569) |

* En cepas industriales (Ogata *et al.*, 2008)

6.10.3 PCR punto final

La PCR se realizó con el kit Go Taq (Promega). Las reacciones fueron típicamente realizadas de la siguiente manera: 200 μ M dNTPs, 1 μ M de cada uno los iniciadores, 1X buffer verde, 10 ng de ADN blanco y 2.5 unidades de Taq ADN polmerasa en un volumen total de reacción de 50 μ L. Las PCR fueron realizadas en un termociclador Gene Amp PCR system 2400 (Perkin Elmer Cetus Emeryville CA, US). Los parámetros de la PCR fueron: 94°C por 5 min, y luego 35 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 52°C y 1 min a 72°C; seguido por un paso final de extensión de 4 min a 72°C. Los productos de las PCR fueron mantenidos a -20°C hasta su uso. Las reacciones para cada gen *FLO* y cepa se realizaron por separado.

6.10.4 Electroforesis de los productos de PCR.

Los productos de PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE (Standard Low-mr. Bio Rad, Hercules CA, US) y teñidos con 5 µg/µL de bromuro de etidio. 15 µL de cada producto amplificado fueron cargados en pocillos por separado. Se usaron marcadores de tamaño molecular de 100 a 1000 pb Hyperladder IV (Bioline, Boston MA, US) La electroforesis se hizo a 85V por 90 min. Los geles fueron visualizados con un transiluminador de intensidad dual (UVP, Upland CA, US) y foto documentados.

6.10.5 Secuenciación de los productos de PCR

Los productos de PCR fueron separados por electroforesis y purificados usando el sistema Wizard SV Gel y PCR Clean-Up de Promega. La secuencia nucleotídica de los fragmentos purificados fue determinada en el Instituto de Biotecnología de la UNAM (Universidad Nacional Autónoma de México), usando un secuenciador Perkin Elmer/Applied Biosystems modelo 3730.

6.11 Análisis de expresión génica por PCR tiempo real

6.11.1 Obtención de ADNc

Del ARN aislado de las fermentaciones, según lo indicado en el punto 5.6 se realizó la síntesis de ADNc a partir de los transcritos de *FLO8*, *FLO11* y *Lg-FLO1* mediante PCR reversa. Para esto se utilizó el kit Reverse Transcription MMLV (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante y ajustando la cantidad de ARN a 4 µg. La mezcla de reacción las condiciones de la misma se muestran en las Tablas IV y V.

6.11.2 PCR tiempo real

Se utilizó el equipo LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) empleando su programa asociado (LC 4.0) para los análisis y el kit LightCycler Fast Start ADN Master SYBR Green I (Roche Applied Science). Se utilizaron los mismos iniciadores para la detección por punto final de los genes *FLO* mencionados en la Tabla III. La reacción se realizó en capilares de 20 µL. La mezcla de reacción se muestra en la Tabla VI.

Tabla III

Características de los iniciadores diseñados para amplificación de los genes *FLO*.

| Nombre | Secuencia (5' a 3') | Blanco | Tamaño de fragmento (pb) |
|----------------|------------------------------|----------------|--------------------------|
| <i>Lg-FLOF</i> | GCTCTGCAGTAAATTCCG | <i>Lg-FLO1</i> | 312 |
| <i>Lg-FLOR</i> | GGGCCATAGTATATGGAGAGATGGG | | |
| <i>FLO1F</i> | ATGACAATGCCTCATCGC | <i>FLO1</i> | 596 |
| <i>FLO1R</i> | CTTCCACCCCATGGCTTGATACCGTC | | |
| <i>FLO5F</i> | GACAATTGCACACCACTGC | <i>FLO5</i> | 423 |
| <i>FLO5,9R</i> | CCTGTCATTTCTAGGGTTACG | | |
| <i>FLO8F</i> | CATGCGGCAAGGCTACAACACG | <i>FLO8</i> | 920 |
| <i>FLO8R</i> | GTGTTAGGGGGACTGCG | | |
| <i>FLO9F</i> | GCGGCATGCCTGCCAGCAAACCTCAAGG | <i>FLO9</i> | 347 |
| <i>FLO5,9R</i> | CCTGTCATTTCTAGGGTTACG | | |
| <i>FLO10F</i> | AACTGGTACCTACACATTTGGC | <i>FLO10</i> | 270 |
| <i>FLO10R</i> | GGCAATACCACACTAACAGG | | |
| <i>FLO11F</i> | CCTTGTTCAACTGGTACTGGCG | <i>FLO11</i> | 749 |
| <i>FLO11R</i> | TAGAATACAACCTGGAAGAGCG | | |

Los controles positivos fueron utilizando 150 ng de ADN genómico. Para los controles negativos se sustituyo el material genético por agua. En todas las pruebas se incluyeron reacciones con iniciadores para detección del gen de actina (*ACT1*) como referencia.

Tabla IV

Mezcla de reacción para síntesis de ADNc a partir de transcritos de ARN aislados de levadura en fermentaciones bajo condiciones de estrés.

| Componente | Conc. inicial | µL/reacción |
|-------------------|----------------------|--------------------|
| Agua mQ | | Variable |
| Buffer | 5 X | 5.0 |
| RNasin | 25 U | 0.5 |
| dNTP's | 10 mM | 5.0 |
| Oligo(dT) | 0.5 µg | 1.0 |
| ARN total | Variable | Variable |
| M MLV-RT | 200 U | 2.0 |
| Total | | 25.0 |

Tabla V

Condiciones para la reacción de PCR reversa

| Temperatura (°C) | Tiempo | Ciclos |
|-------------------------|---------------|---------------|
| 25 | 5min | |
| 37 | 60min | 1 |
| 70 | 10 min | |
| 4 | indefinido | |

El ADNc sintetizado se guardo a -20° C hasta su uso.

Tabla VI

Mezcla de reacción para PCR tiempo real.

| Componente | Conc. Stock | Conc. Deseada | µL/reacción |
|-----------------------------------|--------------------|----------------------|--------------------|
| Iniciadores | 4.0 µM | 0.5 µM | 5.0 |
| ADNc | 4.0 µg | 4.0 µg | 1.0 |
| Mezcla enzima/SYBR Green I Buffer | 10 X | 1 X | 2.0 |
| MgCl ₂ | 25.0 mM | 2.0 mM | 0.8 |
| Agua | | | 11.2 |
| Total | | | 20.0 |

El programa del termociclador para la detección de transcritos por PCR tiempo real se muestra en la Tabla VII.

Tabla VII

Programa de amplificación y análisis de los genes *FLO8*, *FLO11* y *Lg-FLO1* mediante PCR tiempo real.

| Tipo de Análisis | Ciclos | Segmento | Temperatura (°C) | Tiempo | Modo de adquisición |
|----------------------|--------|-------------------|------------------|--------|---------------------|
| | | Pre-Incubación | | | |
| Desnaturalización | 1 | | 95 | 10 min | Ninguno |
| | | Amplificación | | | |
| Cuantificación | 45 | Desnaturalización | 95 | 10 s | Ninguno |
| | | Alineamiento | 52 | 5 s | Ninguno |
| | | Extensión | 72 | 50 s | Sencillo |
| | | Curva de melting | | | |
| Curva de disociación | 1 | Desnaturalización | 95 | 0 s | Ninguno |
| | | Alineamiento | 65 | 15 s | Ninguno |
| | | Melting | 95 | 0 s | Continuo |
| | | Enfriamiento | | | |
| Ninguno | 1 | | 40 | 30 s | Ninguno |

Con el Software LC 4.0 se determinaron los Cp (crossing points, número de ciclo en el cual la fluorescencia supera el umbral predeterminado) de los amplicones el cual es inversamente proporcional a la concentración inicial del ADNc presente en la muestra.

6.12 Análisis de expresión a nivel transcripción mediante microarreglos

Para los microarreglos se hicieron hibridaciones del ADNc proveniente del ARN total aislado de células de levaduras obtenidas de fermentaciones realizadas bajo las condiciones basales y de estrés para las variables perfil de carbohidratos, edad generacional y restricción calórica. Se usó una estrategia de ensayo realizando “swaps” (es decir, invirtiendo el marcaje fluorescente en el duplicado de análisis) para eliminar datos espurios y tener un análisis mas significativo. El diseño de las combinaciones de variables y cepas probadas, condujo a la realización de 16 microarreglos como se muestra en la Tabla X. La preparación del ADNc a partir de los transcritos de todo el genoma de

la levadura y su marcaje con Cy3 y Cy5 se hizo de acuerdo a las indicaciones del fabricante (Promega kit Z3604) como se describe a continuación.

6.12.1 Síntesis y marcaje del ADNc adaptador aminoalilo

La mezcla de reacción para el marcaje se muestra en la Tablas VIII y IX, para el ARN extraído del estado basal y de estrés. La reacción se incubó a 70°C por 10 min, posteriormente se colocó en hielo por 5 minutos y se mezclaron las reacciones A y B por separado para el estado basal y estrés. Se centrifugó e incubó 10 minutos a 25°C, luego 2 horas a 42°C.

Tabla VIII

Mezcla de reacción para síntesis de ADNc para microarreglos. Mezcla A

| Componente | μL/reacción |
|---|--------------------|
| ARN total (basal y estrés por separado) | 2.0 |
| Oligo (dT) | 1.0 |
| Random primers | 1.0 |
| Agua | 1.0 |
| Total | 20.0 |

Tabla IX

Mezcla de reacción para síntesis de ADNc para microarreglos Mezcla B

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

Transcurrido el lapso se hizo un tratamiento con RNAsa para eliminar los restos del ARN y dejar solo el ADNc; para esto se agregó 1.0 μL de RNAsa H y 0.35 μL de

solución buffer de RNAsa a los 40 μL de reacción, se mezcló suavemente y se incubó a 37°C durante 5 min.

6.12.2 Purificación del aminoalil ADNc (kit de Promega 23613)

Se agregaron 4 μL de acetato de Sodio 3M y 225 μL de Solución Binding a los 40 μL de aminoalil-ADNc, se mezcló con vortex 5 -10 s, se aplicó la mezcla a la columna y se dejó en reposo 5 minutos. Se centrifugó a 14000 rpm por 1 minuto. Se lavó con 500 μL de etanol 80% y se centrifugó a 14000 rpm por 1 min. (3 veces). Se centrifugó para remover completamente el exceso de etanol. En un tubo limpio se eluyó dos veces con 30 μL de agua desionizada y se dejó secar en el Speed Vac Savant. Posteriormente, se resuspendió en 4.5 μL de Bicarbonato de Sodio 100 mM (pH 9.0).

6.12.3 Reacción de conjugación.

Se disolvió el colorante con 4.5 μL de DMSO, dando vortex por 10 s. Se mezcló con los 4.5 μL de aminoalil-ADNc purificado, se resuspendió en vortex y se incubó a temperatura ambiente durante 60 minutos sin centrifugar y protegiendo la reacción de la luz. Posteriormente se agregaron 72 μL de agua.

6.12.4 Purificación del aminoalil-ADNc marcado. (kit de Promega Z3613)

Se agregaron 8 μL de Acetato de Sodio y 440 μL de Solución de Binding. Se mezcló suavemente y se aplicó a la columna. Se dejó en reposo 5 min. y se centrifugó 1 min. Posteriormente se lavó con 500 μL de etanol 80% y se centrifugó 1 min (3 veces) Se centrifugó 1 min para eliminar el exceso de etanol. En un tubo limpio se eluyó dos veces con 50 μL de agua desionizada.

6.12.5 Pretratamiento del microarreglo

La laminilla se prehidrató exponiendo el lado impreso a vapor de agua a 50°C durante 10 s, se volteó para secar y se volvió a exponer al vapor (3 veces). Se fijó con dos ciclos de luz U.V. (0.12 J x cm^2), y enseguida se lavó con SDS 0.1% durante 1 min a temperatura ambiente. Se lavó 2 veces con agua desionizada durante 1 min y se pasó inmediatamente a la solución de Prehibridación (SSC 5X, SDS al 0.1%, BSA al 1 %), se

incubó en agitación suave por una hora a 42°C. Posteriormente se lavó 5 veces con agua desionizada estéril a temperatura ambiente y se secó por centrifugación a 1500 rpm por 5 minutos.

6.12.6 Hibridación del microarreglo

Se tomó el volumen necesario para tener aproximadamente 0.1 Unidades de D.O. de la muestra marcada con Cy3 y lo mismo de la muestra marcada con Cy5 por separado, y se secaron completamente en el Speed-vac Savant. Se resuspendieron ambas sondas con 3.5 µL de agua desionizada estéril y 14 µL de Solución de Hibridación UniHyb (Array It) preincubada a 65°C. Ambas soluciones se mezclaron dando un volumen final de 35 µL. La mezcla se desnaturalizó a 94°C por 5 min y finalmente a 65°C por 30 seg. Se aplicó suavemente la mezcla sobre el área del microarreglo y se cubrió la superficie con un cubreobjetos (HybriSlipt Schleicher & Schuell). Se colocó la laminilla en la cámara de Hibridación (Corning 2551). Los microarreglos se incubaron por 12 horas a 42°C.

6.12.7 Lavado de los microarreglos hibridados

Se hicieron los siguientes lavados a temperatura ambiente y en agitación:

- Un lavado de 2 min con 50 mL de SSC1X-SDS al 0.05%
- Un lavado de 2 min con 50 mL de SSC 0.06X
- Un lavado de 2 min con 50 mL de SSC 0.06X

Las laminillas fueron secadas por centrifugación a 1500 rpm por 5 min

6.12.8 Lectura y análisis de los microarreglos

Los microarreglos fueron leídos con un escáner ScanArray 4000 (Packard Biochips, Billerica MA, USA). Los resultados fueron obtenidos como imágenes tiff de 16 bits. Los arreglos fueron analizados usando el programa Spotfinder (<http://www.tm4.org/spotfinder.html>) y transformados en valores de intensidad relativa de fluorescencia, considerando el offset y background de cada spot, y guardados como archivos .txt.

Los datos fueron posteriormente cargados en el programa genArise (<http://www.ifc.unam.mx/genarise>) y transformados a base logarítmica. genArise es un programa (en lenguaje R) que contiene funciones específicas para realizar un análisis de datos de microarreglos de ADN, para detectar genes que son significativamente expresados de forma diferencial bajo diferentes condiciones de cultivo. Antes de este análisis, genArise ejecutó un número de transformaciones de los datos (corrección de fondo, normalización, filtrado de intensidades, análisis de réplicas “swap”) para eliminar mediciones de baja calidad y ajustar las intensidades medidas para facilitar las comparaciones. Posteriormente, se calculó la razón de expresión diferencial logarítmica y la intensidad global de cada spot. La razón logarítmica fue representada por el valor $R = \log_2(\text{intensidad Cy5}) - \log_2(\text{intensidad Cy3})$, y la intensidad global por el valor $I = \log_{10}(\text{intensidad Cy5}) + \log_{10}(\text{intensidad Cy3})$. Como se observa, genArise usó logaritmos base 2 para R así que la razón de expresión estuvo en unidades de cambios de magnitud 2.

Una vez obtenidos los valores R e I, genArise identificó cuales de los genes mostraron evidencia de ser diferencialmente expresados. Para esto se utilizó la función denominada “Z score”, la cual calculó un valor Z dependiente de la intensidad. Se usó un algoritmo de “ventana deslizante” para calcular la media y la desviación estándar en una ventana alrededor de cada dato puntual y definiendo un Z score, donde Z determinó el número de desviaciones estándar del dato puntual respecto a la media, de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$Z_i = (R_i - \text{media}(R)) / \text{SD}(R)$$

Donde Z_i es el Z score para cada spot, R_i es la razón logarítmica de cada elemento y $\text{SD}(R)$ es la desviación estándar de R. Con este criterio, los elementos con un $|Z \text{ score}| > 2$ desviaciones estándar se consideraron ser genes significativamente expresados de forma diferencial (Gómez Mayén et. al 2006). Así en un plot R vs I, los elementos del arreglo fueron codificados por color dependiendo si estos estuvieron a menos de 1 desviación estándar de la media (verde), entre 1 y 1.5 desviaciones estándar

(azul), entre 1.5 y 2 desviaciones estandar (celeste), más de 1.5 desviaciones estandar (amarillo), o más de 2 desviaciones estandar de la media (blanco). Los signos positivos o negativos del Z score indicaron niveles de transcritos inducidos o reprimidos respectivamente. Los grupos de genes identificados con cambio significativo de expresión fueron posteriormente analizados mediante los programas FatiGO (<http://babelomics2.bioinfo.cipf.es>) y KEGG2 (<http://www.genome.jp>), a fin de identificar relaciones ontológicas significativas que permitieran determinar los procesos biológicos donde dichos genes tuvieran anotaciones registradas en estas bases de datos.

TABLA X

Diseño experimental de los microarreglos

| Perfil Carbohidratos | | | | Edad Generacional | | | | Restricción Calórica | | | |
|------------------------|------|-----|-----|-------------------|------|-----|-----|----------------------|------|-----|-----|
| Condición | Cepa | Cy3 | Cy5 | Condición | Cepa | Cy3 | Cy5 | Condición | Cepa | Cy3 | Cy5 |
| Basal | 790 | X | | Basal | 790 | X | | Basal | 790 | X | |
| Estrés | 790 | | X | Estrés | 790 | | X | Estrés | 790 | | X |
| Basal | 790 | | X | Basal | 790 | | X | Basal | 790 | | X |
| Estrés | 790 | X | | Estrés | 790 | X | | Estrés | 790 | X | |
| Basal | 820 | X | | Basal | 820 | X | | Basal | 820 | X | |
| Estrés | 820 | | X | Estrés | 820 | | X | Estrés | 820 | | X |
| Basal | 820 | | X | Basal | 820 | | X | Basal | 820 | | X |
| Estrés | 820 | X | | Estrés | 820 | X | | Estrés | 820 | X | |
| Basal | 7754 | X | | Basal | 7754 | NR | NR | Basal | 7754 | X | |
| Estrés | 7754 | | X | Estrés | 7754 | NR | NR | Estrés | 7754 | | X |
| Basal | 7754 | | X | Basal | 7754 | NR | NR | Basal | 7754 | | X |
| Estrés | 7754 | X | | Estrés | 7754 | NR | NR | Estrés | 7754 | X | |
| Total de microarreglos | | 3 | 3 | | | 2 | 2 | | | 3 | 3 |

7. RESULTADOS

7.1 Detección de genes *FLO*

Los iniciadores de PCR diseñados permitieron la amplificación exitosa de los fragmentos de los siete genes *FLO* dominantes. Mediante electroforesis en agarosa se comprobó la ausencia de bandas inespecíficas, así como el tamaño esperado de los fragmentos. En las figuras 5 y 6 se muestran los fragmentos amplificados, asimismo en la Tabla XI se muestra la distribución de los genes *FLO* entre distintas cepas de levaduras industriales y silvestres, las cuales presentaron diferentes niveles de floculación.

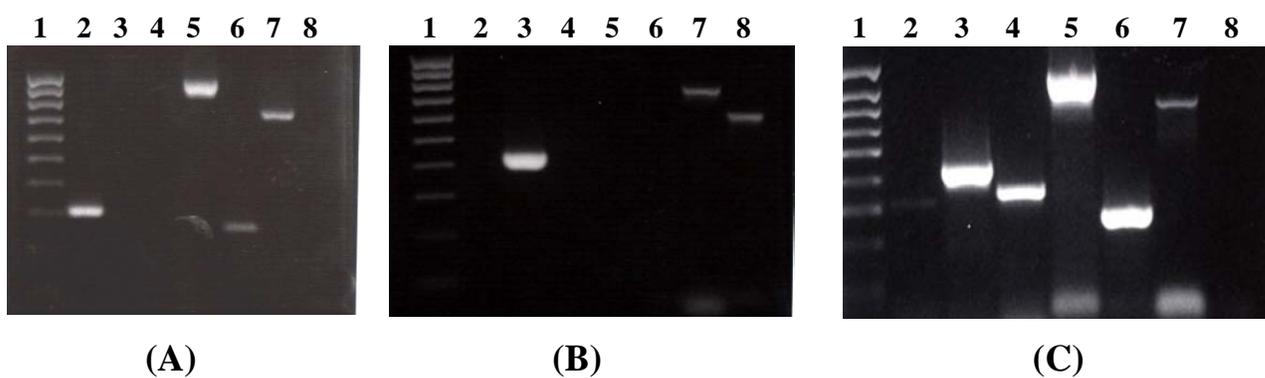


Figura 5. Productos de PCR de los genes *FLO* de las cepas de levadura. (A) BRY (lager), (B) cepa C7754 (panadería), y (C) *S. diastaticus* (silvestre) Carriles: 1, marcador 100-1000 pb; 2, *Lg-FLO* (312 pb); 3, *FLO5* (423 pb); 4, *FLO9* (347 pb); 5, *FLO8* (920 pb); 6, *FLO10* (270 pb); 7, *FLO11* (749 pb); 8, *FLO1* (596 pb)



Figura 6. Productos de PCR de *FLO11* (A) y *Lg-FLO* (B) a partir de cepas de levadura lager. Carriles: 1, KJ8; 2, C790; 3, BRY; 4, J-2036; 5, marcador de 100-1000 pb; 6, C820; 7, ADN control (de la cepa C790) sin iniciadores.

TABLA XI

Incidencia de genes *FLO* en cepas de levadura industriales y silvestres

| Cepa | <i>FLO1</i> | <i>FLO5</i> | <i>FLO8</i> | <i>FLO9</i> | <i>FLO10</i> | <i>FLO11</i> | <i>Lg-FLO1</i> | # Genes <i>FLO</i> | Floculación (mL) |
|-----------------------|----------------|-------------|----------------|-------------|--------------|--------------|----------------|--------------------|------------------|
| Panadería C7754 | + ^a | + | - ^b | - | - | + | - | 3 | 0.0 |
| Lager C790 | + | - | + | - | - | + | + | 4 | 2.5 |
| Lager BRY | - | - | + | - | + | + | + | 4 | 3.8 |
| Lager J-2036 | - | - | + | + | + | + | + | 5 | 3.6 |
| Lager C820 | + | - | + | - | + | + | + | 5 | 4.5 |
| Lager KJ8 | - | - | + | + | + | + | + | 5 | 5.5 |
| Lager LAW | + | - | + | + | + | + | + | 6 | 5.0 |
| <i>S. diastaticus</i> | - | + | + | + | + | + | D ^c | 6 | NA ^d |
| <i>S. pastorianus</i> | + | + | + | - | - | + | - | 4 | NA |
| <i>S. willianus</i> | - | + | + | + | + | + | - | 5 | NA |

^a +, presencia de fragmento amplificado con el tamaño esperado.

^b -, ausencia del fragmento amplificado

^c D, amplificación débil del fragmento

^d NA, No Aplica

Por otra parte, a fin de comprobar la identidad de las secuencias nucleotídicas amplificadas, se realizó una secuenciación de los fragmentos amplificados y purificados. En la Figura 7 se muestra como ejemplo la secuencia determinada para *Lg-FLO1*, la cual coincidió con la reportada en GeneBank. En los demás genes amplificados también se encontró alta identidad de la secuencia determinada con lo reportado en GeneBank. Estas secuencias se reportan en el Apéndice C.

Como se observa a partir de estos datos, los genes *FLO* más con mayor prevalencia en las cepas de levaduras fueron *FLO8*, *FLO11* en general en todas las cepas y además *Lg-FLO1* en las cepas lager.

Lg-FLO1

```
cccgcaacggaacaacttcttagtatcggagtatttataggccatatattgcggggt
cgggaatacgttggtgaatcctgtaatgagtattataaaagttgacattcatcca
ttttcctcgcagcccaactggcaggcatgcttgtgtacttctgatgctacgttaag
tagctccagaaaggccaagattaccaaaaatatgcagtggtgtgcaattgtcattt
tttttagtggtgctaataatcaatttaaagaaaatcatttgcggaattaccctgcagaa
cagaatctgcaatatgctatgccgggttcaagggtgaaaaattgacaattgcacacc
accgcataatttgtgggaatcttggccttctggagcttctttagttacagcagaat
acacagcatggctgcaatggcccagcaaaaattataattcactttaaatccgggt
agagatcacacctgtccacctcagataggccatagtctccatcaaacacttgggtcc
ttgcgaccaaccatctcctgtcatgcccagta
```

Figura 7. Secuencia nucleotídica del fragmento amplificado del gen *Lg-FLO1* a partir del ADN genómico de la cepa C790.

Otra interesante observación fue hecha al comparar la carga de genes *FLO* de cada cepa con su capacidad para flocular. Al hacer un análisis de regresión se observó una correlación positiva con un coeficiente de determinación (R^2) de 0.75, tal y como se muestra en la figura 8.

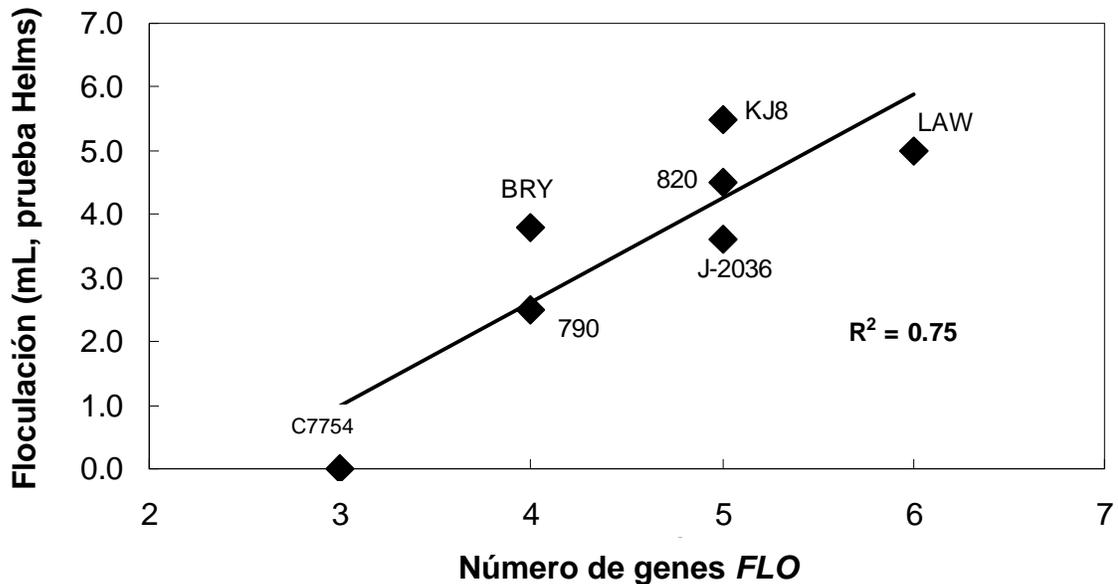


Figura 8. Correlación entre el número de genes *FLO* por cepa y el fenotipo de floculación. Se muestra el coeficiente de determinación (R^2) y la identidad de las cepas.

7.2 Impacto de las variables de estrés fisiológico en la floculación

A fin de determinar qué variables operativas tuvieron más efecto en la floculación de las levaduras industriales, se realizaron fermentaciones de tres cepas, dos lager (C820 y C790) y una de panadería (C7754), bajo 5 condiciones de estrés fisiológico, derivadas de estas operaciones. En la figura 9 se observa la realización de estas fermentaciones en probetas de 2 L y cómo las cepas lager presentaron en general una mayor sedimentación espontánea de levadura.

Las condiciones probadas, como se menciona en la sección de Métodos, fueron restricción calórica, represión catabólica, presión osmótica, presión hidrostática y edad generacional.



(A)

(B)

(C)

Figura 9. Fermentaciones con levaduras industriales. (A) Cepa C820, (B) Cepa C790, (C) Cepa C7754.

El efecto de las diferentes variables sobre la floculación fue similar entre las cepas, sin embargo entre las condiciones sí hubo diferencias significativas. El perfil de glucosa:maltosa de 10:6, respecto al típico de 1:10, provocó un decremento significativo en la floculación de 29 – 42% para las cepas C790 y C820. Por otra parte, la edad generacional causó que las altas generaciones mostraran un incremento en la capacidad floculante del 23 - 100% respecto a la primera generación. En ambos casos, la cepa C820 mostró mayor impacto que la C790. La variación de las otras condiciones de estrés no

tuvo un efecto significativo, determinado mediante la prueba T de Student ($p < 0.05$, Tabla XII y Figura 10). La cepa C7754 se comprobó que no era floculante y por lo tanto no fue afectada por las condiciones ensayadas.

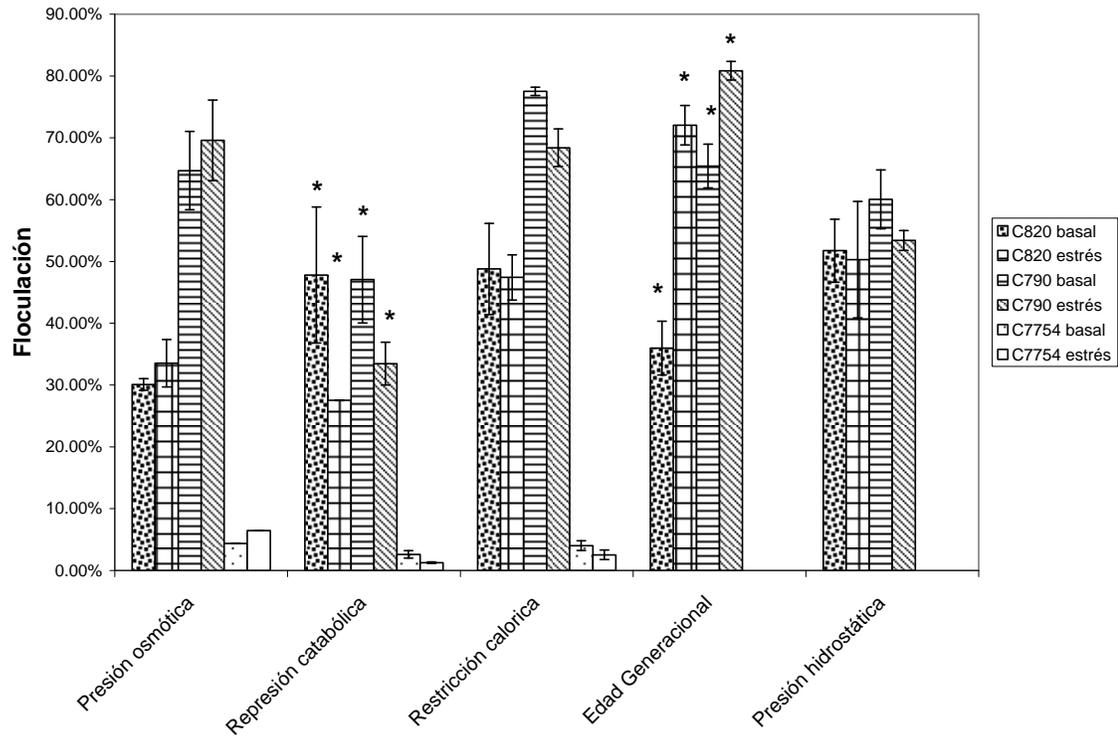


Figura 10. Efecto de factores de estrés en la floculación de levaduras industriales. Los asteriscos indican diferencia significativa de las medias ($p < 0.05$) entre el estado basal y de estrés.

Las células en suspensión alcanzaron un pico máximo de crecimiento al segundo día, después de lo cual decreció su número en las cepas C820 y C790, confirmando así su capacidad floculante. La cepa C7754 alcanzó su pico máximo al 3-4 día, y la mayoría de las células permanecieron en suspensión hasta el final de la fermentación (Fig. 11A). Respecto al consumo del extracto fermentable ($^{\circ}P$), el grado real de fermentación permaneció alrededor del 60% en todas las cepas (Fig. 11B). Otra característica que se observó de acuerdo a lo esperado fue la caída del pH, que esta relacionada con un consumo adecuado de nutrientes (Fig. 11C).

Por otra parte, las diferentes condiciones de estrés no tuvieron efecto significativo en la producción de etanol ni la reducción del diacetilo. Los valores fueron los esperados para levaduras lager siendo de 4.7 a 8.1 % v/v de etanol y el diacetilo de 0.1 a 0.6 ppm. Respecto a la viabilidad de la levadura el porcentaje de células vivas fue mayor al 94% en todas las condiciones de estrés ensayadas.

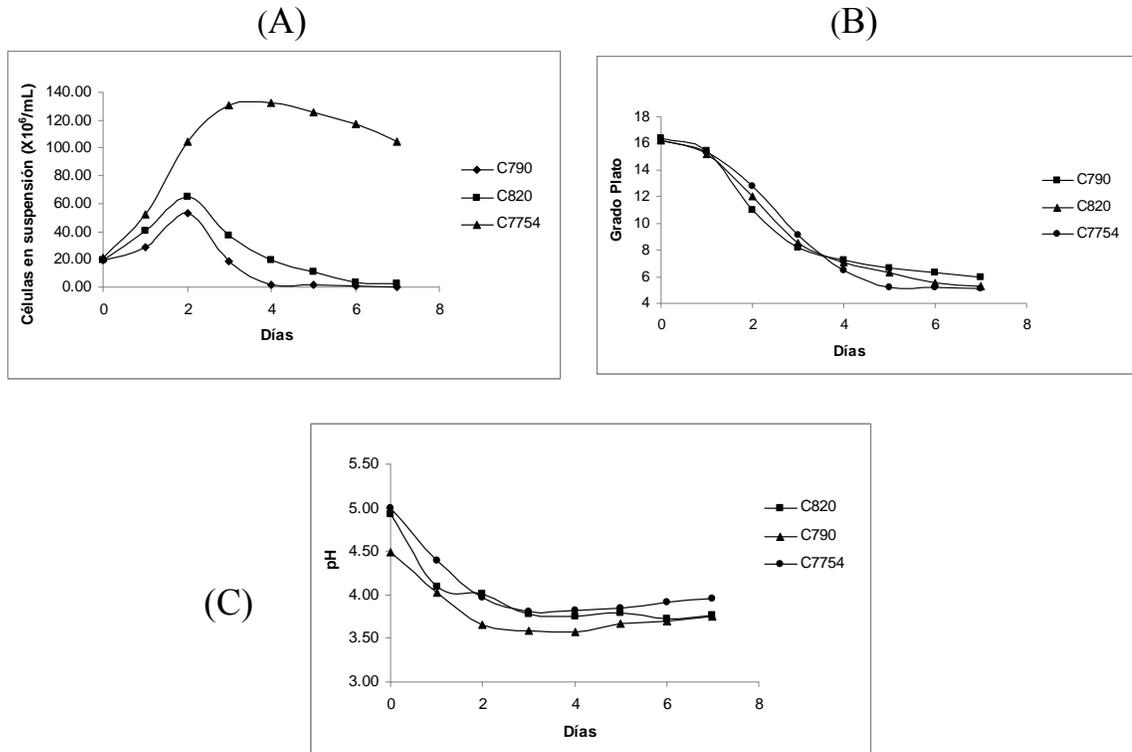


Figura 11. Comportamiento fermentativo típico de las diferentes cepas bajo condiciones de estrés: (A) Curva de crecimiento; (B) gravedad específica; (C) acidificación.

De estos resultados se desprende que las variables que mostraron mayor efecto sobre la floculación en las cepas lager fueron mostos con alto contenido de glucosa y la edad generacional, donde la primera disminuyó esta habilidad, mientras que la segunda estimuló dicha actividad. Además, dichas variables no afectaron significativamente la capacidad fermentativa de la levadura.

TABLA XII

Impacto de condiciones de estrés en floculación de levaduras industriales

| | % de Floculación | | | | | |
|----------------------|------------------|--------------|--------------|--------------|-------|--------|
| | C820 | | C790 | | C7754 | |
| | Basal | Estrés | Basal | Estrés | Basal | Estrés |
| Presión osmótica | 30.10 | 33.55 | 64.69 | 69.59 | 4.38 | 6.47 |
| Represión catabólica | 47.78 | 27.52 | 47.05 | 33.45 | 2.61 | 1.28 |
| Restricción calorica | 48.79 | 47.51 | 77.51 | 68.40 | 4.04 | 2.55 |
| Edad Generacional | 35.99 | 72.03 | 65.84 | 80.84 | ND | ND |
| Presión hidrostática | 50.13 | 50.28 | 60.04 | 53.39 | ND | ND |

*Los número en negritas indican valores con diferencia significativa ($p < 0.05$, T Student)

ND: No determinado

Por otra parte, a fin de determinar el punto en el cual la floculación se manifiesta en mayor intensidad durante la fermentación en las cepas ensayadas, se hicieron determinaciones de ésta a diferentes tiempos, ya que se ha reportado que la inducción de la expresión del fenotipo NewFLO, ocurre al momento de obtener el pico más alto de crecimiento (densidad celular de 10^7 - 10^8 cel/mL), y alcanza su máximo en las posteriores 24 - 48 horas. En este punto, la transcripción de los genes de la floculación es la máxima del ciclo (Davy *et al.*, 2006). Para la cepa C790 el pico mayor de crecimiento ocurrió al 2° día y para la C820 al 4°, como se muestra en las figuras 12 y 13. Por esta razón las muestras para la extracción de ARN para los ensayos de expresión se tomaron al 3^{er} y 5° día en las cepas C790 y C820, respectivamente.

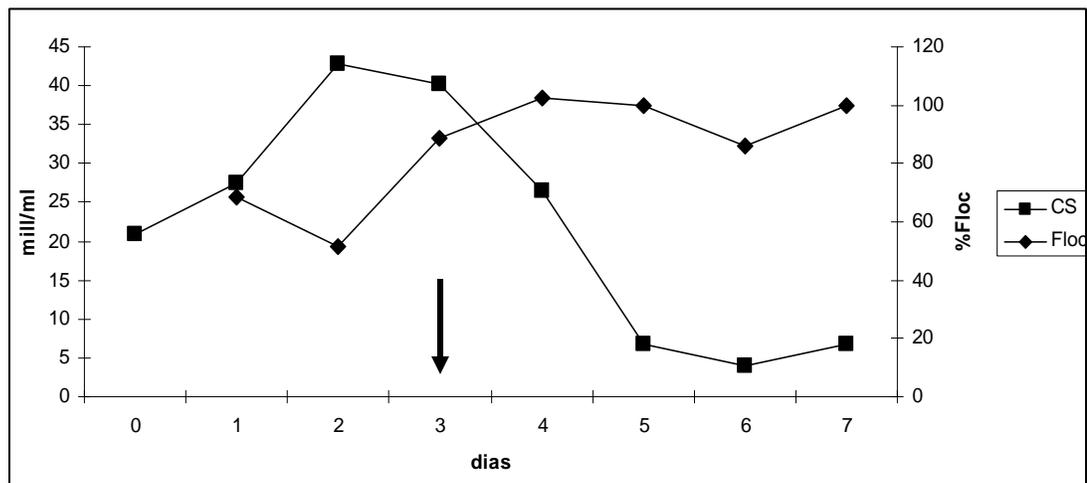


Figura 12. Curso temporal de la floculación para la cepa C790 en condiciones estándar de fermentación. La flecha indica el punto donde se tomaron las muestras de ARN para los estudios de expresión.

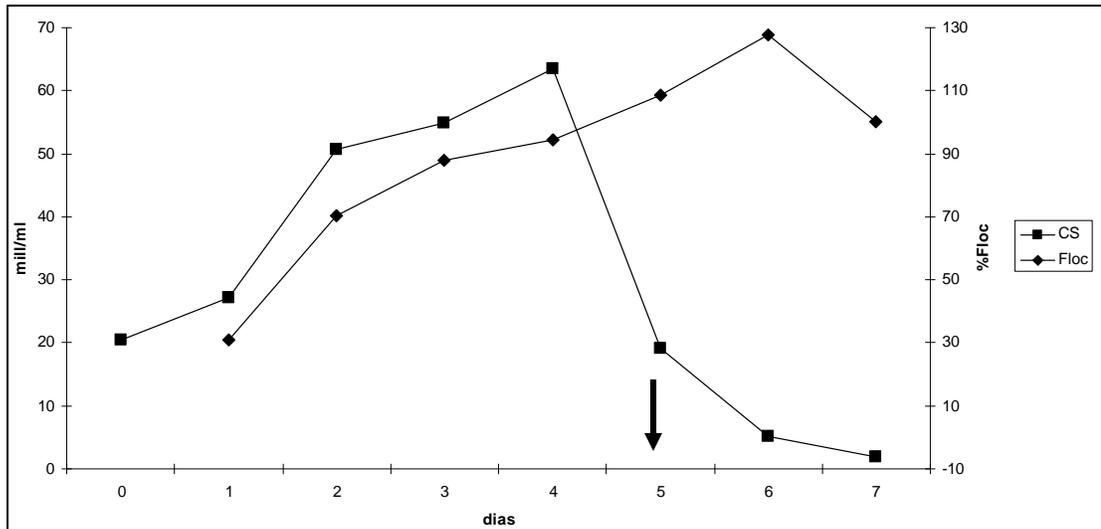


Figura 13. Curso temporal de la floculación para la cepa C820 en condiciones estándar de fermentación. La flecha indica el punto donde se tomaron las muestras de ARN para los estudios de expresión.

Es interesante notar que hubo diferencias en el patrón de floculación y crecimiento celular entre las cepas. La C790 tuvo un crecimiento 48 h más rápido que la C820, aunque el número máximo de células fue significativamente menor. Por otra parte, aunque la caída de células en suspensión comenzó 2 días antes en la levadura C790, la cepa C820 lo hizo más rápidamente, dejando un menor número de células suspendidas en el medio. Otra diferencia es que mientras que la cepa C820 aumentó de manera continua el porcentaje de floculación durante la fermentación, la cepa C790 experimentó un retraso el primer día, comenzando a aumentar de manera sostenida a partir del segundo día. Esto podría indicar diferencias menores en los procesos de regulación de la floculación, o bien estar relacionado con la diferencia en el contenido de genes *FLO*, como se indicó anteriormente.

7.3 Análisis de la expresión de los genes *FLO*

Mediante PCR en tiempo real se determinó el nivel de transcripción de los genes *FLO* un día antes del pico máximo de floculación determinado anteriormente, que como

se mencionó, en el caso de la cepa C790 fue al 3^{er} día, mientras que para la cepa C820 fue al 5^o día. Para esto se tomaron muestras de las levaduras fermentadas bajo represión catabólica (PCHO) y edad generacional (EG), que fueron las variables que mostraron mayor impacto en la floculación, comparándolas contra el nivel de transcripción en condición estándar (basal). El método de comparación fue mediante la determinación de los Cp (crossing point, número de ciclo en el cual la fluorescencia detectada del amplicón supera el nivel de umbral predeterminado), el cual al ser mayor su valor indica menor concentración relativa del transcrito y viceversa. En las Figuras 14, 15, y 16 se muestran los Cp para *FLO8*, *FLO11* y *Lg-FLO1*, que como se indicó anteriormente fueron los más prevalentes en las cepas estudiadas. Los valores Cp obtenidos se analizaron estadísticamente mediante la prueba T Student, encontrando cambios significativos de expresión ($p < 0.05$) en algunas condiciones con el gen *FLO11* y en todos los casos con el gen *Lg-FLO1*. El gen *FLO8* no mostró cambios significativos en ninguna condición en ambas cepas.

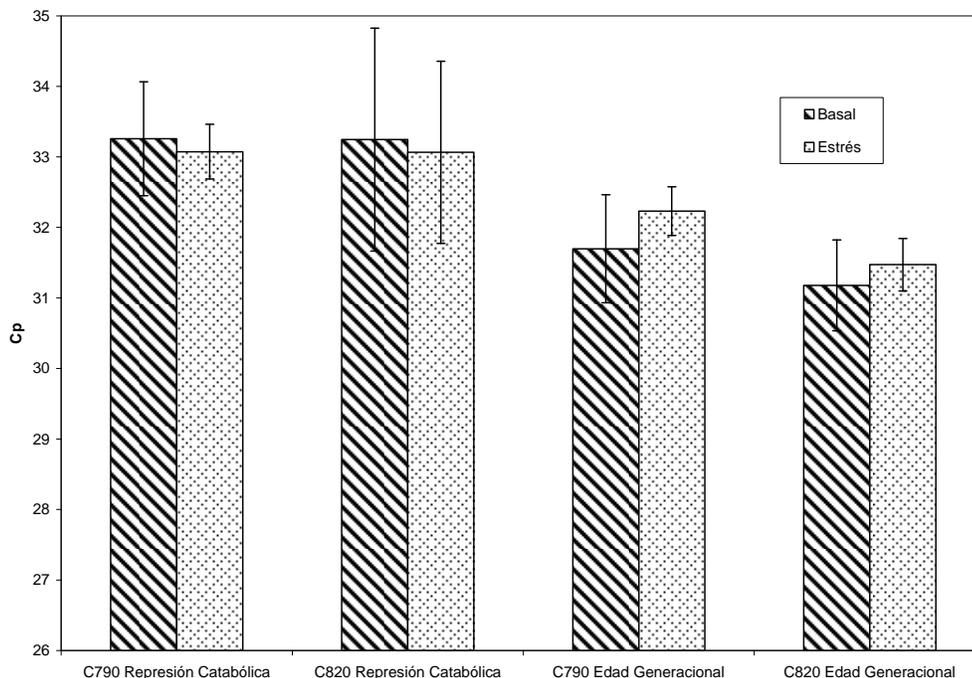


Figura 14. Crossing points del gen *FLO8* bajo condiciones de estrés fisiológico. Los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el estado basal y de estrés.

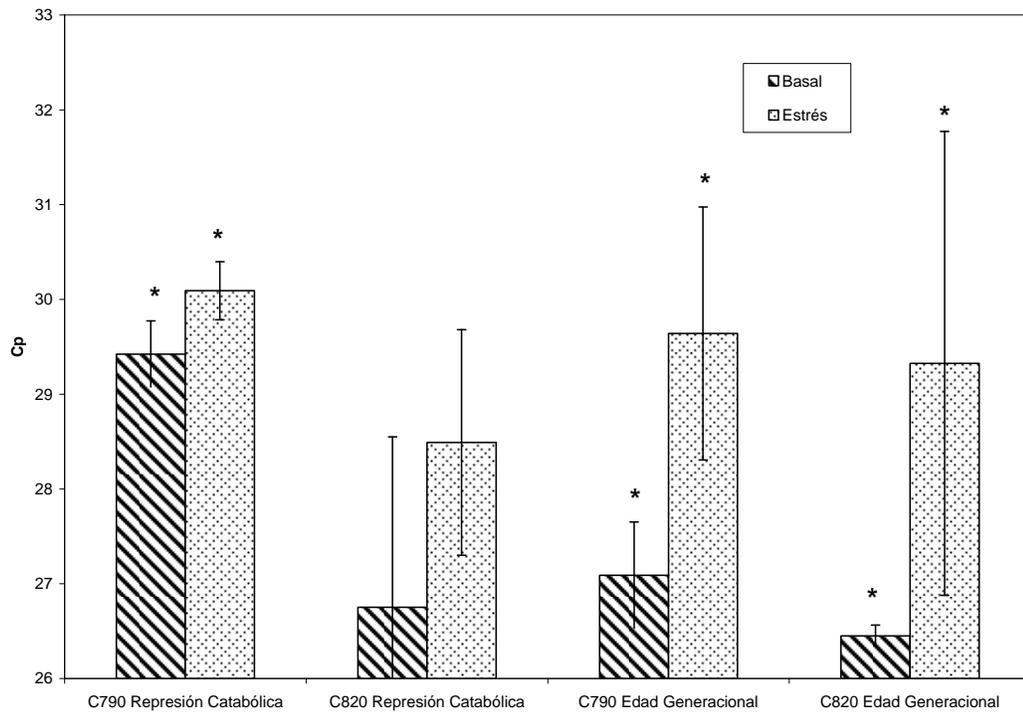


Figura 15. Crossing points del gen *FLO11* bajo condiciones de estrés fisiológico. Los asteriscos indican diferencia significativa ($p < 0.05$) entre el estado basal y de estrés.

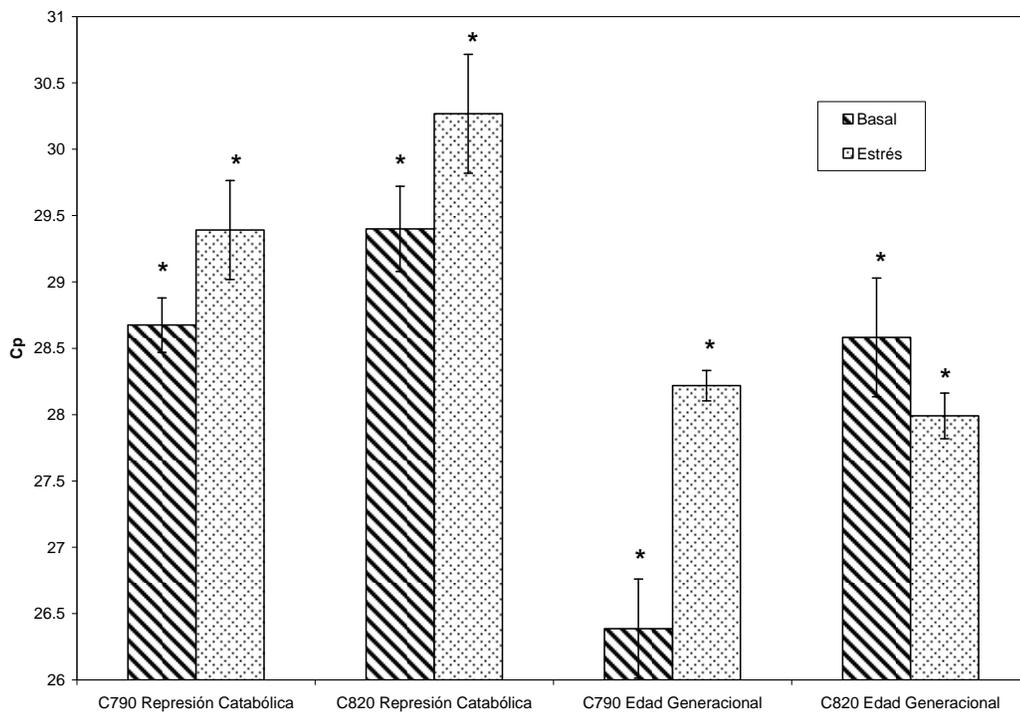


Figura 16. Crossing points del gen *Lg-FLO1* bajo condiciones de estrés fisiológico. Los asteriscos indican diferencias significativa ($p < 0.05$) entre el estado basal y de estrés.

A diferencia de *FLO8* y *FLO11*, los patrones de expresión de *Lg-FLO1* en la cepa C820 fueron directamente proporcionales a los cambios en la capacidad de flocular bajo condiciones de estrés por perfil de carbohidratos y edad generacional.

7.4 Análisis de Expresión global bajo condiciones de estrés fisiológico

Con el fin de identificar los genes involucrados en la regulación de la expresión de la floculación, se realizaron análisis de expresión global mediante microarreglos de ADN en células de levadura expuestas a represión catabólica y edad generacional alta. Además, para contrastar los datos generados se incluyó la variable restricción calórica (donde no se observó cambio significativo en la floculación), así como la cepa de panadería (no floculante).

Los datos generados por los microarreglos fueron procesados con el software Spotfinder a fin de transformar las imágenes .tif producidas por el lector láser en valores numéricos de intensidad de fluorescencia detectada. Estos valores fueron exportados como archivos .txt y analizados mediante el programa GenArise para obtener el Z score. Este valor se considera estadísticamente significativo cuando es > 2 , indicando sobreexpresión del gen analizado y cuando es < -2 , indica represión significativa del gen.

Utilizando este software, se determinaron los genes que presentaron cambios en sus niveles de expresión. La figura 17 muestra gráficas típicas de distribución de fluorescencia relativa para la cepa C820 bajo estrés de perfil de carbohidratos, donde se destacan en blanco los genes con Z score > 2 y < -2 (para el código de color ver Métodos). En la Tabla XIII se muestra un resumen de la cantidad de genes que sufrieron cambio de expresión significativo en cada cepa y condición analizada.

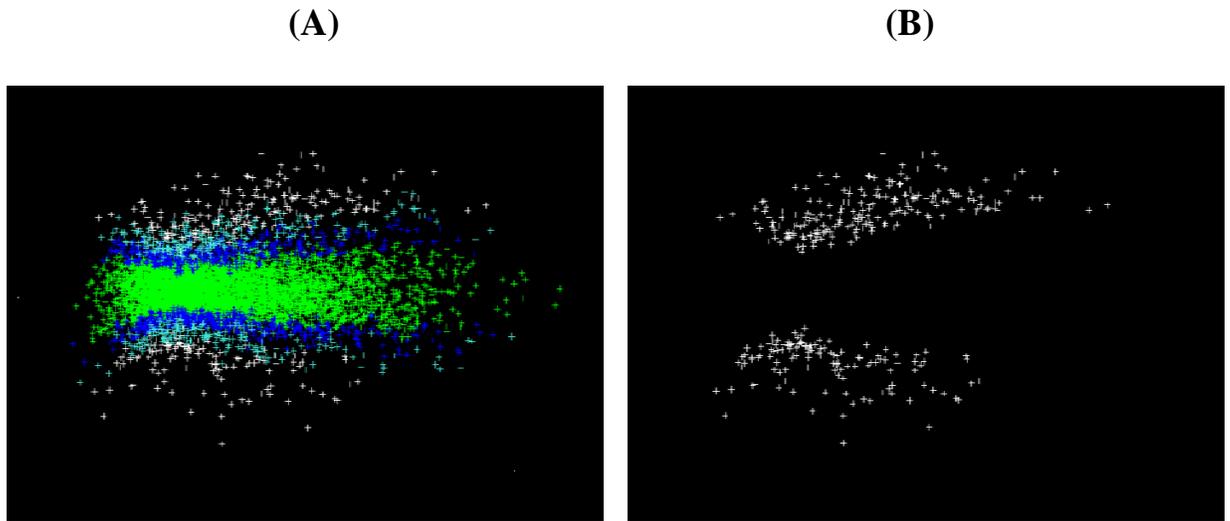


Figura 17. Distribución de Z scores de los genes expresados en la cepa C820 bajo estrés de perfil de carbohidratos (para el código de colores ver Métodos). (A) Genoma total, (B) Genes con Z score mayor a +/-2.

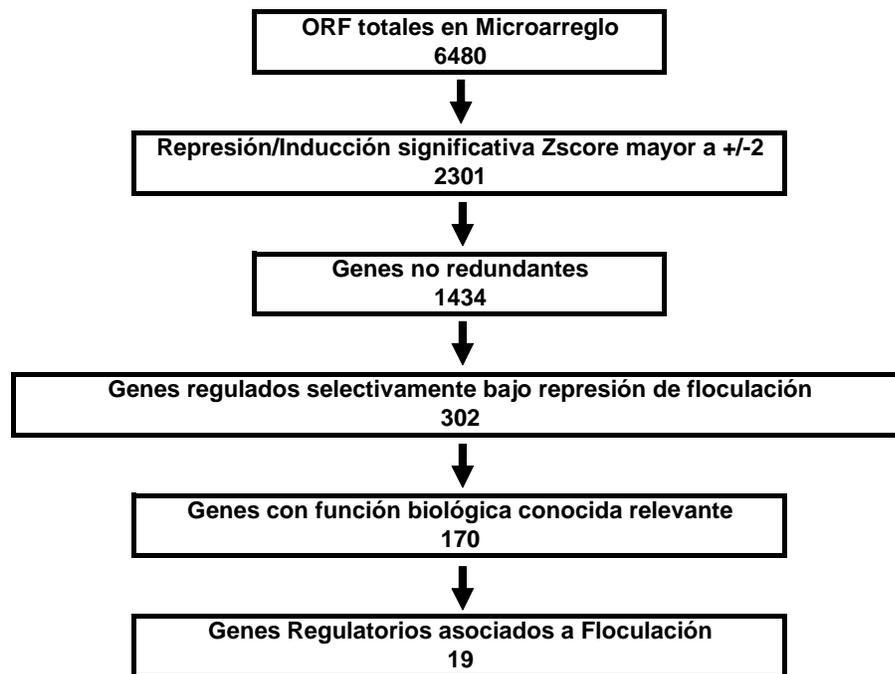


Figura 18. Secuencia de análisis de los genes expresados bajo condiciones de estrés.

TABLA XIII

Cantidad de genes con cambio de expresión significativo bajo condiciones de estrés fisiológico

| | Anotación: | Represión Catabólica | | Edad Generacional | | Restricción Calórica | |
|-------------------|------------|----------------------|-------------|-------------------|-------------|----------------------|-------------|
| | | Conocida | Desconocida | Conocida | Desconocida | Conocida | Desconocida |
| Cepa C820 | Inducidos | 193 | 6 | 182 | 3 | 144 | 8 |
| | Reprimidos | 119 | 9 | 96 | 9 | 109 | 15 |
| Cepa C790 | Inducidos | 109 | 0 | 101 | 3 | 97 | 6 |
| | Reprimidos | 144 | 8 | 130 | 19 | 158 | 16 |
| Cepa C7754 | Inducidos | 123 | 5 | ND* | ND | 191 | 3 |
| | Reprimidos | 181 | 25 | ND | ND | 85 | 4 |

* ND: No determinado

Una vez identificados los genes con cambio significativo de expresión, estos fueron analizados mediante el software FatiGO, a fin de determinar mediante relaciones ontológicas las funciones en que están implicados dichos genes. Se seleccionaron aquellos genes cuyo análisis estadístico F de varianza fue estadísticamente significativo a un $\alpha=0.05$.

En la Figura 18 se muestra la estrategia utilizada para el mapeo de los genes relevantes. Tanto los genes estructurales de floculación como los regulatorios fueron analizados mediante esta estrategia. En la Tabla XIV se muestran los valores de Z score para los genes estructurales que resultaron relevantes para la expresión de la floculación en las levaduras lager, así como la levadura panadería con fines comparativos. Destaca la regulación de 2 genes y un pseudogen en las cepas lager. En las Tablas XV, XVI y XVII se muestran los procesos biológicos afectados en cada condición para la cepa C820. Resúmenes de las funciones que fueron modificadas significativamente se muestran en las Tablas XVIII y XIX. Utilizando esta información se identificaron los genes que se relacionaron específicamente con la regulación de la floculación.

TABLA XIV

Z scores de genes estructurales de floculación.

| Nombre sistemático | Nombre común | Cepas lager | Cepa 7754 |
|--------------------|-----------------------|--------------|--------------|
| YHR211W | <i>FLO5/LgFLO1</i> | -1.85 | -1.91 |
| YER109C | <i>FLO8</i> | -0.24 | -0.19 |
| YIR019C | <i>FLO11</i> | -0.64 | 2.31 |
| YHR213W | Similitud <i>FLO1</i> | -2.10 | 0.70 |
| YAR061W | <i>pseudoFLO1</i> | -2.02 | 0.07 |

Las funciones biológicas de los 302 genes cuya expresión fue modificada a la par de la floculación se muestran en las TABLAS XX y XXI. De estos, 170 presentaron funciones biológicas conocidas y se consideraron los más relevantes. Sobresalen los grupos de genes relacionados con estrés osmótico, silenciamiento de genes subteloméricos, chaperonas, biosíntesis de pared celular, ciclo celular, respiración y mantenimiento de telómeros. En las Figuras 19 y 20 se presentan en forma gráfica las funciones de dichos genes.

TABLA XV

Resultados de análisis ontológico mediante el software FatiGO. Cepa C820 condición de edad generacional alta.

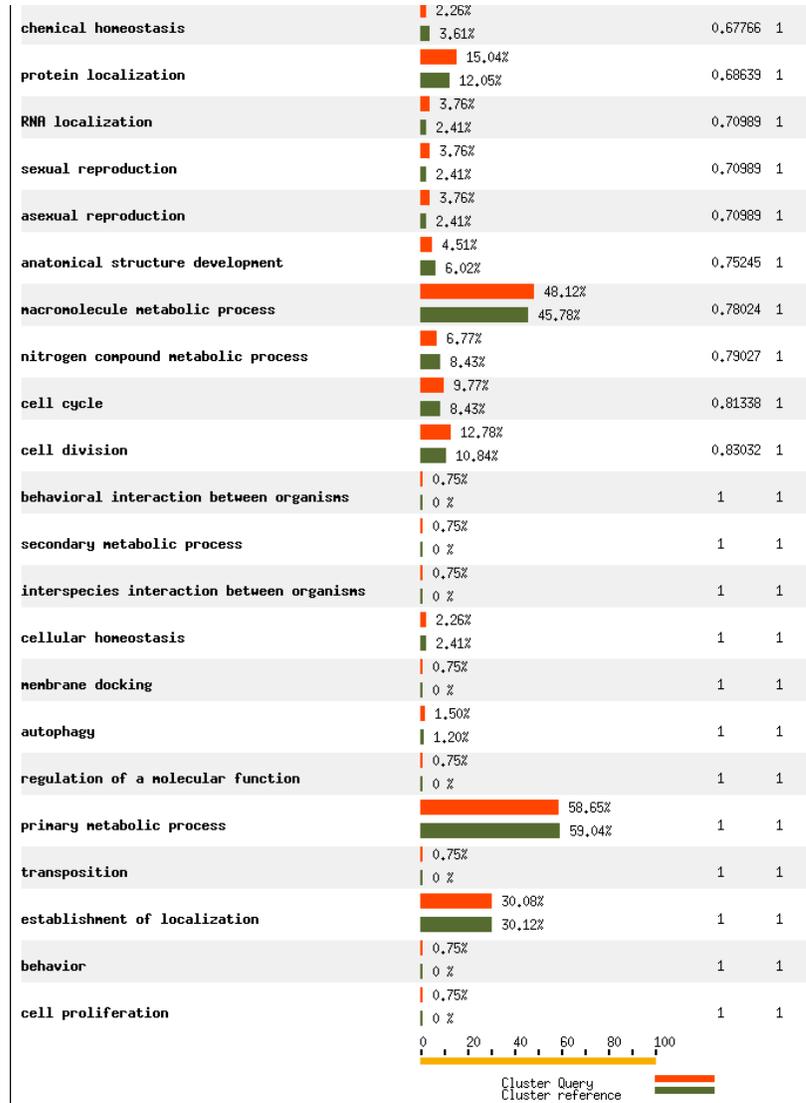


TABLA XVI

Resultados de análisis ontológico mediante el software FatiGO. Cepa C820 condición de represión catabólica.



TABLA XVI
(Continuación)



(*) Unadjusted p-value; FDR(indep.)adjusted p-value;

TABLA XVII

Resultados de análisis ontológico mediante el software FatiGO. Cepa C820 condición de restricción calórica.



TABLA XVIII

Resumen de anotaciones ontológicas de los 1434 genes con expresión significativamente modificada ($p < 0.05$) en condiciones de estrés. Nivel de análisis ontológico = 3. Entre paréntesis se muestra el valor estadístico p .

| | Represión Catabólica | Edad Generacional | Restricción Calórica |
|-----------------------|--|---|--|
| Cepa 820 | Respuesta a estímulos químicos (0.002) | Regulación de procesos biológicos (0.006) | Procesos metabólicos celulares (0.017) |
| | Respuesta a estímulos bióticos (0.011) | Ciclo Celular (0.007) | División celular (0.033) |
| | Respuesta a estímulos abióticos (0.024) | Desarrollo de estructuras anatómicas (0.015) | |
| | Regulación de procesos biológicos (0.044) | | |
| | Respuesta a estrés (0.047) | | |
| Cepa 790 | Segregación de cromosomas (0.004) | Regulación de procesos biológicos (0.007) | Procesos catabólicos (0.015) |
| | Ciclo celular (0.005) | Establecimiento de localización (0.012) | |
| | Respuesta a estímulos bióticos (0.031) | Biogénesis (0.025) | |
| | Regulación de procesos biológicos (0.034) | Procesos metabólicos macromoleculares (0.026) | |
| | Respuesta a estímulos químicos (0.044) | Procesos metabólicos celulares (0.027) | |
| Cepa Panadería | Procesos biosintéticos (0.00007) | ND | |
| | Conjugación (0.008) | ND | |
| | Reproducción sexual (0.008) | ND | |
| | Biogénesis (0.009) | ND | |
| | Regulación de calidad biológica (0.009) | ND | |
| | Comunicación Celular (0.018) | ND | |
| | Desarrollo de estructuras anatómicas (0.018) | ND | |
| | División celular (0.019) | ND | |
| | Crecimiento filamentosos (0.020) | ND | |
| | Regulación de procesos biológicos (0.024) | ND | |
| | Procesos reproductivos (0.026) | ND | |

TABLA XIX

Resumen de anotaciones ontológicas de los 302 genes con expresión modificada bajo represión de floculación. Nivel de análisis ontológico = 6. $p < 0.05$.

| | Inducidos | Reprimidos |
|-----------------|---|---|
| Cepa 820 | Ensamble de Cromatina | Plegamiento de proteínas (heat shock, ubiquitina) |
| | Regulación negativa de procesos celulares | Fosforilación oxidativa |
| | Transducción de señales | MAPK |
| | Ciclo Celular | |
| Cepa 790 | Ciclo celular | Respiración aeróbica |
| | Transducción de señales | Plegamiento de proteínas (heat shock, ubiquitina) |
| | Factores de transcripción basales | Transducción de señales |

TABLA XX

Genes inducidos bajo condiciones de estrés fisiológico relacionados con disminución de la floculación.

| Procesos biológicos | Nombre sistemático | Nombre común | Descripción | |
|----------------------------|--------------------------|--|---|---|
| Biosíntesis pared celular | YDL055C | <i>PSA1</i> | Mannosa-1-fosfato guaniltransferasa | |
| | YER001W | <i>MNN1</i> | alfa-1,3-manosiltransferasa | |
| | YKR030W | <i>GMH1/MSG1</i> | Proteína desconocida de Golgi, posible rol en síntesis de pared | |
| | YNL084C | <i>END3</i> | Requerido por endocitosis y organización del citoesqueleto | |
| | YGL038C | <i>OCH1</i> | Alfa-1,6-manosiltransferasa | |
| Chaperona | YKL073W | <i>LHS1</i> | Chaperona de lumen del RE (precursor de homólogo HSP 70) | |
| | YDR493W | <i>AIM8</i> | ORF no caracterizado participa en ciclo celular | |
| Ciclo celular | YGR108W | <i>CLB1</i> | Ciclina B, específica para G2/M | |
| | YMR198W | <i>CIK1</i> | Proteína asociada al centrosoma | |
| | YPR119W | <i>CLB2</i> | Ciclina B, específica para G2/M | |
| | YDR383C | <i>NKP1</i> | Proteína no esencial del cinetocoro | |
| | YFR046C | <i>CNN1</i> | Proteína del cinetocoro | |
| | YLR381W | <i>CTF3/CHL3</i> | Proteína del cinetocoro | |
| | YMR094W | <i>CTF13</i> | Proteína del cinetocoro, CBF3, 58 kD | |
| | YBR138C | <i>HDR1</i> | Proteína que provoca defecto reduccional de alta dosis | |
| | YDR325W | <i>YCG1</i> | Condensina G | |
| | YGR179C | <i>OKP1</i> | Proteína externa del cinetocoro | |
| | YDR106W | <i>ARP10</i> | Similitud a Actina | |
| | YNL148C | <i>ALF1</i> | Alfa tubulina cofactor B de plegamiento | |
| | Degradación de proteínas | YEL012W | <i>UBC8</i> | Enzima E2 conjugante de ubiquitina |
| | | YER100W | <i>UBC6</i> | Enzima E2 conjugante de ubiquitina |
| | | YFR004W | <i>RPN11</i> | Subunidad reguladora del proteasoma 26S |
| YML101C | | <i>CUE4</i> | Desconocida, blanco de ubiquitina | |
| YPR103W | | <i>PRE2</i> | Subunidad (beta5) del proteasoma 20S | |
| Degradación vacuolar | YGR048W | <i>UFD1</i> | Proteína de degradación de fusión a ubiquitina | |
| | YBR080C | <i>SEC18</i> | Proteína de fusión vesicular, homólogo funcional de NSF | |
| | YBR217W | <i>APG12</i> | Componente del sistema autofágico | |
| | YDR200C | <i>VPS64</i> | Trafico a vacuola, arresto ciclo celular | |
| | Desconocido | YBR226C | | ORF dudoso |
| YCL006C | | | ORF eliminado | |
| YDL151C | | <i>BUD30</i> | ORF dudoso, sobrelapado a RPC53 | |
| YDL178W | | <i>AIP2</i> | Proteína interactuante con actina 2 | |
| YDL183C | | | ORF no caracterizado, no esencial | |
| YDL196W | | | ORF dudoso, localizado en promotor de SEC31 | |
| YDR157W | | | ORF dudoso | |
| YDR535C | | | ORF dudoso, localización subtelomérica | |
| YEL001C | | <i>IRC22</i> | Proteína desconocida del RE | |
| YER187W | | | Inducida en mutantes deficientes respiratorios | |
| YGL069C | | | ORF dudoso, sobrelapado a ygl068w, pérdida resistencia a estrés | |
| YIL086C | | | ORF dudoso | |
| YLR125W | | | Desconocida, posible papel en transposición | |
| YNL109W | | | ORF dudoso | |
| YOR154W | | <i>SLP1</i> | Proteína de membrana desconocida, pertenece a la familia parecida a SUN | |
| YOR200W | | | ORF dudoso | |
| YOR248W | | <i>TOS11</i> | ORF cuestionable | |
| YPR014C | | | ORF dudoso | |
| YPR015C | | | ORF desconocido, arresto ciclo celular | |
| YPR064W | | | ORF dudoso | |
| YDR396W | | | ORF Dudoso, sobrelapado a NCB2 del complejo de histona | |
| YDR161W | | <i>TC11</i> | ORF eliminado | |
| YNL334C | | <i>SNO2</i> | Proteína de función desconocida, posición subtelomérica | |
| YPR048W | | <i>TAH18</i> | Desconocida, similar a NDOR1 | |
| YAR027W | | <i>UIP3</i> | Proteína integral de membrana desconocida | |
| YCR087C-A | <i>LUG1</i> | ORF no caracterizado | | |
| YDL072C | <i>YET3</i> | Desconocida, mutación decrece secreción de invertasa | | |
| YGR053C | | ORF desconocido | | |
| YGR130C | | ORF no caracterizado | | |
| YOR093C | | ORF no caracterizado | | |
| Ensamble Nucleosomas | YBL002W | <i>HTB2</i> | Histona H2B.2 | |
| | YDR224C | <i>HTB1</i> | Histona H2B | |
| | YDR225W | <i>HTA1</i> | Histona H2A | |
| Esporulación | YDR522C | <i>SPS2</i> | Proteína esporulación específica | |
| Estabilización de membrana | YLR056W | <i>ERG3</i> | C-5 esteroil desaturasa | |

TABLA XX
(Continuación)

| Procesos biológicos | Nombre sistemático | Nombre común | Descripción |
|---|--------------------|------------------|--|
| Estrés osmótico | YER062C | <i>HOR2</i> | Fosfatasa de DL-glicerol, respuesta a estrés osmótico |
| | YER089C | <i>PTC2</i> | Fosfoprotein fosfatasa tipo 2C, defosforila Hog1p y Cdc28p. Inactiva vía MAPK durante estrés osmótico |
| | YOR008C | <i>SLG1/WSC1</i> | Sensor requerido para integridad de pared celular y respuesta a estrés hipo-osmótico, vía señalización Ras, PKC1/ MAPK |
| | YER167W | <i>BCK2</i> | Supresor de mutaciones en protein cinasa C |
| | YFL047W | <i>RGD2</i> | GTPasa proteína activadora para Cdc42p y Rho5p. Vía PKC-1 |
| Factores de Traducción Factores de Transcripción | YIL053W | <i>RHR2</i> | Fosfatasa de DL-glicerol, respuesta a estrés osmótico |
| | YOL116W | <i>MSN1</i> | Activador transcripcional involucrado en regulación de expresión invertasa y glucoamilasa, crecimiento invasivo y diferenciación pseudohifal (FLO11) y respuesta osmótica estrés |
| | YPR041W | <i>TIF5</i> | Factor de inicio de traducción eIF5 |
| | YBL014C | <i>RRN6</i> | Factor de inicio de transcripción específico de RNA polimerasa I |
| | YGR047C | <i>TFC4</i> | Subunidad TFIIC (factor de inicio de transcripción), 131 kD |
| Gemación | YOR172W | <i>YRM1</i> | Factor de transcripción dedo de zinc (paralogo Yrr1p actúa en resistencia multidroga) |
| | YPR104C | <i>FHL1</i> | Activador transcripcional de la horquilla. Familia HNF3 |
| | YPL007C | <i>TFC8</i> | Factor de inicio de transcripción de RNA Polimerasa III TFIIC (tau), 60 kDa subunidad |
| | YPL082C | <i>MOT1</i> | Proteína accesoria transcripcional |
| | YPR187W | <i>RPO26</i> | RNA polimerasa dependiente de DNA I, II, III 18 KD subunidad |
| Mantenimiento telómeros | YIL140W | <i>SRO4</i> | Requerida para patrón axial de gemación |
| | YBL060W | <i>YEL1</i> | Implicada en gemación |
| | YPR131C | <i>NAT3</i> | N-acetyltransferasa, su expresión acorta telómeros |
| | YEL053C | <i>MAK10</i> | Glucosa-represible proteína de la familia Nat. Su expresión altera el mantenimiento de telómeros |
| | YDL077C | <i>VAM6</i> | Carboxipeptidasa vacuolar Y. |
| Metabolismo primario | YPL084W | <i>BRO1</i> | Proteína de tráfico de proteínas a endosomas. Participa en el mantenimiento de telómeros |
| | YBR248C | <i>HIS7</i> | Glutamina amidotransferasa/ciclase |
| | YDR232W | <i>HEM1</i> | 5-aminolevulinato sintasa |
| | YGL009C | <i>LEU1</i> | 3-isopropilmalato deshidratasa |
| | YJL112W | <i>MDV1</i> | Similitud a MET30P y controlador de azufre 2 de N.crassa |
| Metabolismo secundario | YMR015C | <i>ERG5</i> | C-22 esteroil desaturasa |
| | YDR165W | <i>TRM82</i> | Modificación de tRNA |
| | YJR016C | <i>ILV3</i> | Dihidroxi-acido deshidratasa |
| | YOR278W | <i>HEM4</i> | Uroporfirinogeno III sintasa |
| | YPL148C | <i>PPT2</i> | Fosfopanteteina protein transferasa |
| Mitochondria | YNL010W | | ORF no caracterizado, fosfoserina fosfatasa, acumulación glicogeno |
| | YOL143C | <i>RIB4</i> | 6,7-dimethyl-8-ribitilumazina sintasa |
| | YDR462W | <i>MRPL28</i> | Proteína ribosomal de la subunidad grande (YmL28), mitochondrial |
| | YJL023C | <i>PET130</i> | Síntesis de proteína, mitochondrial |
| | YKL027W | | Desconocida, localizada en membrana externa mitochondrial |
| Partículas virales Peroxisoma | YMR003W | <i>aim34</i> | Desconocida, participa en mutación deficiente respiratoria |
| | YMR024W | <i>MRPL3</i> | Proteína ribosomal la subunidad grande, mitochondrial |
| | YNL252C | <i>MRPL17</i> | Proteína ribosomal de la subunidad grande (YmL30), mitochondrial |
| | YBR108W | <i>AIM3</i> | Proteína cuya mutación induce deficiencia respiratoria |
| | YCR003W | <i>MRPL32</i> | Proteína ribosomal YmL32, mitochondrial |
| | YGR102C | | Proteína desconocida mitochondrial |
| | YLR190W | <i>MMR1</i> | Proteína mitochondrial |
| | YNL118C | <i>DGP2</i> | Proteína supresora de deficiencia respiratoria |
| | YPR125W | <i>YLH47</i> | Proteína mitochondrial |
| | YPL060C-A | | TyA Gag viral, pseudogene |
| Peroxisoma | YDR265W | <i>PEX10</i> | Proteína de ensamblaje peroxisomal - peroxina |
| | YOL044W | <i>PEX15</i> | Requerida para ensamblaje de peroxisoma- peroxina |
| | YPL112C | <i>PEX25</i> | Peroxisoma periférica |

TABLA XX
(Continuación)

| Procesos biológicos | Nombre sistemático | Nombre común | Descripción | |
|---------------------------|-----------------------|-------------------|--|---|
| Procesamiento RNA | Q0110 | <i>BI2</i> | Maturasa de mRNA BI2 | |
| | YDR240C | <i>SNU56</i> | Proteína U1 snRNA, sin contraparte en snRNP de mamíferos | |
| | YLR204W | <i>QRI5</i> | Proteína de membrana interna mitocondrial, participa en procesamiento de mRNA de COX1 | |
| Replicación de DNA | YPR107C | <i>YTH1</i> | Proteína del complejo procesador 3' | |
| | YCR019W | <i>MAK32</i> | Necesario para estabilidad estructural L-A dsRNA | |
| | YJR135C | <i>MCM22</i> | Requerida para mantenimiento de cromosomas y minicromosomas | |
| Resistencia a zimocinas | YIL027C | <i>KRE27</i> | Resistencia a toxina killer K1 | |
| Respuesta a estrés en DNA | YER143W | <i>DDI1</i> | Inducida en respuesta a daño por alquilación de DNA | |
| Ribosomas | YGL123W | <i>RPS2</i> | Proteína de la subunidad pequeña ribosomal 40S | |
| Silenciamiento de genes | YBR009C | <i>HHF1</i> | Histona H4. Interactúa con Sir4p para silenciamiento de telómeros | |
| | YMR219W | <i>ESC1</i> | Establece silenciamiento de cromatina en telómeros uniéndose a Sir4p | |
| | YNL030W | <i>HHF2</i> | Histona H4. Interactúa con Sir4p para silenciamiento de telómeros | |
| | YNL031C | <i>HHT2</i> | Histona H3. Interactúa con Sir4p para silenciamiento de telómeros | |
| | YOL006C | <i>TOP1</i> | DNA topoisomerasa I, Participa en silenciamiento de rDNA | |
| | YOL012C | <i>HTZ1</i> | Variante de histona H2AZ. Regula extensión de silenciamiento | |
| | YGL112C | <i>TAF60</i> | Factor transcripcional TFIID y subunidad SAGA, similar a histona H4 | |
| | YHR154W | <i>ESC4</i> | Establece silenciamiento de cromatina, regula transposición | |
| | Síntesis de proteínas | YGR171C | <i>MSM1</i> | Metionil-tRNA sintetasa |
| | Supresor de mutación | YML005W | <i>TRM12/TYW2</i> | Metiltransferasa, participa en síntesis de Phe-tRNA |
| YDR316W | | <i>OMS1</i> | Proteína integral de membrana mitocondrial. Supresor multicopia de mutaciones OXA1 | |
| YHR163W | | <i>SOL3</i> | 6-fosfogluconolactonasa. Debil supresor multicopia de LOS1-1 | |
| YOR247W | | <i>SRL1</i> | Manoproteína de pared celular, requerida para su estabilidad en ausencia de manoproteínas ancladas por GPI, tiene alto contenido de serina-treonina; expresión es inducida en mutantes de pared celular. | |
| Traducción | YGR162W | <i>TIF4631</i> | Proteína de unión a cap de mRNA (eIF4F), 150K subunidad | |
| | YIL173W | <i>VTH1</i> | Glicoproteína involucrada en tráfico de proteínas | |
| | YJL029C | <i>VPS53</i> | Requerida para tráfico de proteínas a Golgi | |
| | YLR360W | <i>VPS38</i> | Proteína involucrada en tráfico de proteínas | |
| | YNL038W | <i>GPI15</i> | Involucrada en síntesis de proteínas ancladas por GPI | |
| | YGR100W | <i>MDR1</i> | GTPasa citoplasmica | |
| Transducción de señales | YJL031C | <i>BET4</i> | Geranilgeranil transferasa, cadena alfa | |
| | YOL002C | <i>IZH2/PHO36</i> | Metabolismo de zinc, transduccion de señales en apoptosis | |
| | YIL117C | <i>PRM5</i> | Proteína regulada por feromonas, inducida durante señalización de integridad celular | |
| Transportador | YGL121C | <i>GPG1</i> | Proteína G involucrada en diferenciación pseudohifal | |
| | YJL093C | <i>TOK1</i> | Canal rectificador exterior de potasio | |
| | YML038C | <i>YMD8</i> | Posible transportador de azucar-nucleótidos | |
| | YPL058C | <i>PDR12</i> | Transportador de resistencia multidroga | |
| | YOL103W | <i>ITR2</i> | Mio-inositol permeasa, menor | |

TABLA XXI
(Continuación)

| Procesos biológicos | Nombre sistemático | Nombre común | Descripción | |
|----------------------------|------------------------|--------------|---|--|
| Degradación de proteínas | YBR082C | <i>UBC4</i> | Enzima conjugante de ubiquitina E2, participa en respuesta a estrés térmico | |
| | YKL210W | <i>UBA1</i> | Enzima parecida a E1(ubiquitin-activante) | |
| | YLL039C-R | <i>UBI5</i> | Ubiquitina | |
| | YOR117W | <i>RPT5</i> | Proteasoma 26S, subunidad regulatoria | |
| Degradación vacuolar | YEL060C | <i>PRB1</i> | Proteasa B vacuolar | |
| | YGR223C | <i>HSV2</i> | Proteína de union a fosfoinositol 3,5 bifosfato | |
| | YHR171W | <i>APG7</i> | Componente del sistema autofágico | |
| | YHR195W | <i>NVJ1</i> | Proteína de la envoltura del núcleo | |
| Esporulación | YER044C-A | <i>MEI4</i> | Requerida para meiosis | |
| | YNL128W | <i>TEP1</i> | Fosfatasa dual específica, via Fosfatidil inositol, esporulación | |
| | YPR192W | <i>AQY1</i> | Similitud a proteínas de membrana plasmática y canales de agua | |
| Exocitosis | YNL293W | <i>MSB3</i> | GTPasa activadora de Sec4. Secreción | |
| Factores de traducción | YDL069C | <i>CBS1</i> | Activador traduccional del mRNA de COB | |
| Factores de transcripción | YBL008W | <i>HIR1</i> | Regulador de transcripción de histonas, correpresor | |
| | YBL025W | <i>RRN10</i> | Factor de transcripción de la RNA polymerasa I, transcripción rDNA | |
| | YLR256W | <i>HAP1</i> | Factor de transcripción factor dedo de zinc, respuesta a heme y oxígeno | |
| | YNR023W | <i>SNF12</i> | Componente SWI/SNF activador global de transcripción, respuesta a estrés | |
| | YPR025C | <i>CCL1</i> | Subunidad de TFIIH (factor de inicio de transcripción), componente ciclina C | |
| Gemación | YHR149C | <i>SKG6</i> | Participa en gemación, regulada por Cdc28 | |
| Metabolismo primario | YBR265W | <i>TSC10</i> | 3-cetoesfingalina reductasa | |
| | YBR299W | <i>MAL32</i> | Alfa-glucosidasa, maltasa, subtelomérica | |
| | YDR072C | <i>IPT1</i> | Manosil difosforilinositol ceramida sintasa | |
| | YGL026C | <i>TRP5</i> | Sintasa de triptofano | |
| | YGR087C | <i>PDC6</i> | Piruvato descarboxilasa 3, no expresada en presencia de glucosa | |
| | YGR208W | <i>SER2</i> | Fosfoserina fosfatasa, síntesis de serina y glicina | |
| | YHR144C | <i>DCD1</i> | Desoxicitidilato desaminasa | |
| | YIR029W | <i>DAL2</i> | Allantoïnasa | |
| | YJL060W | <i>BNA3</i> | Biosíntesis de ácido nicotínico | |
| | YLR058C | <i>SHM2</i> | serina hidroximetiltransferasa, citoplasmica | |
| | YLR058C-R | <i>SHM3</i> | serina hidroximetiltransferasa, citoplasmica | |
| | YLR328W | <i>NMA1</i> | NAD biosíntesis | |
| | YLR432W | <i>IMD3</i> | Inosina monofosfato deshidrogenasa | |
| | YOR303W | <i>CPA1</i> | Arginina-específica carbamoilfosfato sintasa | |
| | Metabolismo secundario | YEL011W | <i>GLC3</i> | Enzima ramificante de 1,4-glucanos (enzima ramificante de glucógeno) |
| | | YER150W | <i>SPI1</i> | Proteína inducida en fase estacionaria, inducida por condiciones estrés y shift diauxico |
| Mitocondria | YNL141W | <i>AAH1</i> | Adenosina desaminasa | |
| | YOL126C | <i>MDH2</i> | Malato deshidrogenasa, citoplasmica | |
| | YBL030C | <i>PET9</i> | Proteína acarreadora de ADP/ATP | |
| | YER053C | <i>PIC2</i> | Mitocondrial importa fosfato | |
| | YGL080W | <i>FMP37</i> | ORF no caracterizado, mitocondrial | |
| | YGR243W | <i>FMP47</i> | ORF no caracterizado, mitocondrial | |
| | YHR162W | | ORF no caracterizado, mitocondrial | |
| | YKR016W | <i>AIM28</i> | Proteína mitocondrial desconocida | |
| | YMR115W | <i>MGR3</i> | Proteína putativa involucrada en degradación proteína mitocondrial | |
| | Peroxisoma | YNL026W | <i>SAM50</i> | Ensamblaje proteínas mitocondriales |
| YCR005C | | <i>CIT2</i> | citrato (si)-sintasa, peroxisomal | |
| YDL078C | | <i>MDH3</i> | Malato deshidrogenasa, peroxisomal | |
| YDR256C | | <i>CTA1</i> | Catalasa A, peroxisomal | |
| Respuesta a estrés térmico | YCR021C | <i>HSP30</i> | Proteína de choque térmico reguladora de ATPasa, inducida por baja glucosa | |
| Respuesta a estrés salino | YDR504C | <i>SPG3</i> | Requerida para sobrevivencia a altas temperaturas | |
| | YDR276C | <i>PMP3</i> | Sensibilidad a Sodio | |
| | YDR276C-R | <i>PMP4</i> | Sensibilidad a Sodio | |
| | YDR456W | <i>NHX1</i> | NA ⁺ -H ⁺ transportador antiport, requerido para osmoloterancia | |
| | YFR039C | | ORF no caracterizado, respuesta a sal | |

TABLA XXI
(Continuación)

| Procesos biológicos | Nombre sistemático | Nombre común | Descripción |
|-------------------------------|--------------------|---------------|--|
| Procesamiento de RNA | YHR085W | <i>IP11</i> | Procesamiento rRNA |
| Resistencia a metales pesados | YHR053C | <i>CUP1-1</i> | Metalotioneína |
| | YHR055C | <i>CUP1-2</i> | Metalotioneína |
| Respiración | Q0105 | <i>COB</i> | Citocromo B |
| | Q0275 | <i>COX3</i> | Citocromo-c oxidasa cadena III |
| | YDR079W | <i>PET100</i> | Proteína de ensamble de citocromo-c oxidasa |
| | YDR178W | <i>SDH4</i> | Subunidad de anclaje a membrana de succinato deshidrogenasa |
| | YEL039C | <i>CYC7</i> | Isoforma 2 de citocromo-c |
| | YGL169W | <i>SUA5</i> | Proteína inicio de traducción, requerida para respiración |
| | YJR121W | <i>ATP2</i> | F1F0-ATPasa, F1 beta subunidad |
| | YKL109W | <i>HAP4</i> | Subunidad de factor de unión a CCAAT, reprimido por glucosa, activa la respiración |
| | YLR038C | <i>COX12</i> | Citocromo-c oxidasa, subunidad VIB |
| | YMR081C | <i>ISF1</i> | Involucrada en supresión de defectos de splicing mitocondrial |
| | YMR145C | <i>NDH1</i> | NADH deshidrogenasa mitocondrial cytosolicamente dirigida |
| Ribosomas | YCR031C | <i>RPS14A</i> | Proteína ribosomal 40S |
| | YDR465C | <i>RMT2</i> | N-delta-arginina metiltransferasa |
| | YER056C-A | <i>RPL34A</i> | Proteína ribosomal similar a L34 |
| | YJR123W | <i>RPS5</i> | Proteína ribosomal S5.e |
| | YLR340W | <i>RPP0</i> | Proteína acidica ribosomal L10.e |
| | YPR144C | <i>NOC4</i> | Proteína nucleolar |
| Síntesis de proteínas | YOR133W | <i>EFT1</i> | Factor de elongación de traducción eEF2 |
| | YNL240C | <i>NAR1</i> | Involucrada en maduración de proteína FeS |
| | YOR046C | <i>DBP5</i> | RNA helicasa ATP-dependiente, citoplasmica |
| Supresor de mutación | YGL178W | <i>MPT5</i> | Supresor multicopia de POP2, se une a mRNA de modificadores de cromatina, similar a Sed1 |
| Tráfico de proteínas | YGR142W | <i>BTN2</i> | Proteína de unión v-SNARE |
| | YIL004C | <i>BET1</i> | Proteína de transporte |
| | YJL044C | <i>GYP6</i> | GTPasa-proteína activadora, transporte de proteínas en vesículas |
| | YLR170C | <i>APS1</i> | Proteína del complejo AP-1 |
| | YML049C | <i>RSE1</i> | involucrada en splicing de RNA |
| | YMR054W | <i>STV1</i> | H+-ATPasa dominio V0 subunidad 102 kD, no vacuolar |
| | YNL036W | <i>NCE103</i> | Anhidrasa carbónica, involucrada en transporte de proteína no convencional |
| | YNL049C | <i>SFB2</i> | Transporte de RE a Golgi, autofagia |
| | YOR160W | <i>MTR10</i> | Involucrada en importación de proteínas nucleares |
| | YPL227C | <i>ALG5</i> | Dolicol-P-glucosa sintetasa |
| Transducción de señales | YBL105C | <i>PKC1</i> | Protein cinasa C, con actividad choque hipotónico. Via MAPK |
| | YHL007C | <i>STE20</i> | Protein cinasa de la vía MAPK participa en respuesta a feromonas, choque osmótico, y falta de nutrientes |
| Transporte | YHR135C | <i>YCK1</i> | Isoforma I de caseína cinasa |
| | YDR343C | <i>HXT6</i> | Transportador de alta afinidad hexosa, reprimido por alta glucosa |
| | YEL063C | <i>CAN1</i> | Permeasa de aminoácidos |
| | YLR220W | <i>CCC1</i> | Transporte de hierro y manganeso |
| | YMR319C | <i>FET4</i> | Transportador de Fe(II) de baja afinidad |
| | YNL065W | <i>AQR1</i> | Transporte multidroga membrana plasmática |
| | YNR002C | <i>FUN34</i> | Secreción de amonio |
| | YOR153W-R | <i>PDR6</i> | Carioferina beta, proteína pleiotropica de resistencia a drogas |
| | YOR328W | <i>PDR10</i> | Proteína parecida a transportadores multidroga ABC |

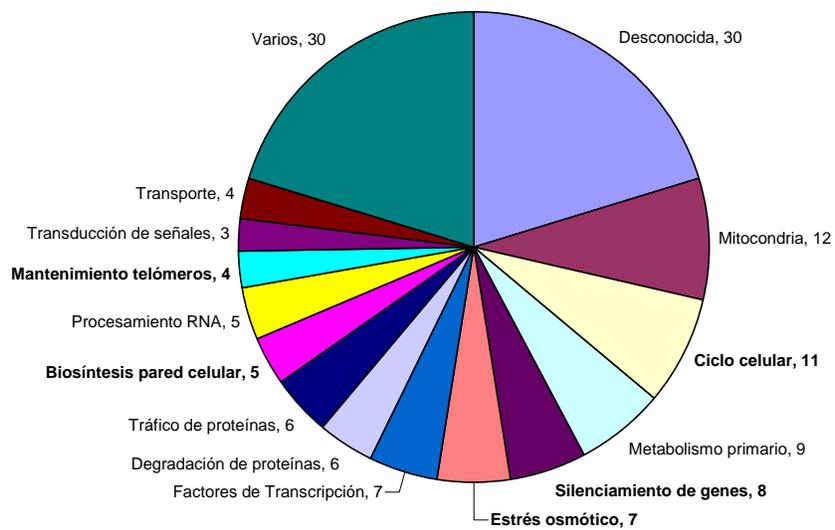


Figura 19. Funciones de los genes inducidos en condiciones de baja floculación.

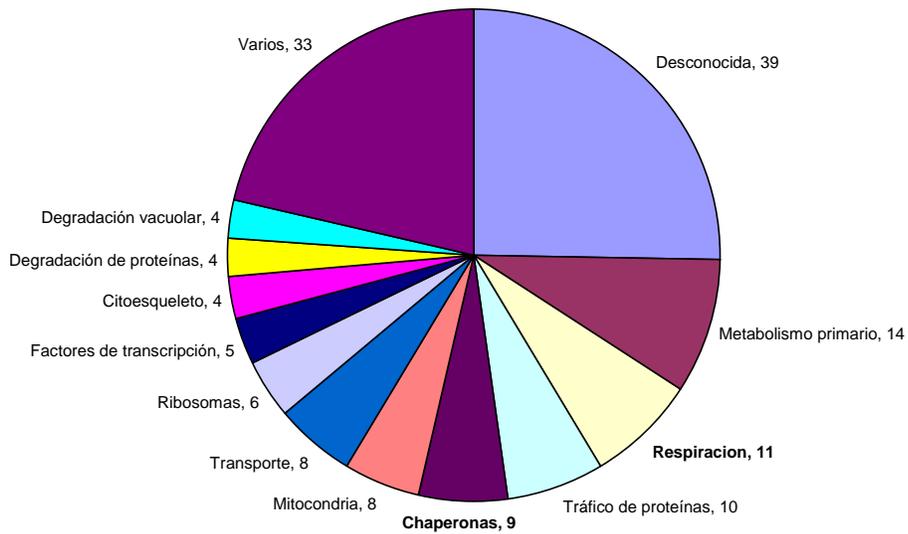


Figura 20. Funciones de los genes reprimidos en condiciones de baja floculación.

Al analizar la información obtenida en los patrones de expresión, se observó una notable cantidad de genes residentes en posiciones subteloméricas, así como genes reprimidos por glucosa y otros relacionados a mantenimiento de telómeros. Estos genes se muestran en las Tablas XXII, XXIII y XXIV.

TABLA XXII

Modificación de expresión de genes localizados en posición subtelomérica.

| Nombre sistemático | Nombre común | Expresión |
|---------------------------|---------------------|------------------|
| YDR535C | | Inducida |
| YNL334C | <i>SNO2</i> | Inducida |
| YBR299W | <i>MAL32</i> | Reprimida |
| YLR462W | | Reprimida |
| YMR319C | <i>FET4</i> | Reprimida |
| YNL331C | <i>AAD14</i> | Reprimida |
| YDR537C | | Reprimida |
| YAR069W | | Reprimida |
| YAR061C | | Reprimida |
| YHR213W | | Reprimida |

TABLA XXIII

Genes reprimidos por glucosa, detectados en los ensayos de microarreglos.

| Nombre sistemático | Nombre común |
|---------------------------|---------------------|
| YBR299W | <i>MAL32</i> |
| YCR021C | <i>HSP30</i> |
| YDR343C | <i>HXT6</i> |
| YKL109W | <i>HAP4</i> |
| YEL011W | <i>GLC3</i> |
| YHR135C | <i>YCK1</i> |

TABLA XXIV

Expresión de genes asociados a mantenimiento de telómeros.

| Nombre sistemático | Nombre común | Expresión | Efecto sobre mantenimiento de telómeros |
|--------------------|---------------|-----------|---|
| YPR131C | <i>NAT3</i> | Inducida | Negativo |
| YEL053C | <i>MAK10</i> | Inducida | Negativo |
| YDL077C | <i>VAM6</i> | Inducida | Positivo |
| YPL084W | <i>BRO1</i> | Inducida | Positivo |
| YLL026W | <i>HSP104</i> | Reprimida | Negativo |
| YMR186W | <i>HSC82</i> | Reprimida | Positivo |
| YPL106C | <i>SSE1</i> | Reprimida | Positivo |

Otro grupo interesante de genes cuya expresión fue significativamente modificada bajo estrés de restricción calórica, aunque sin relación a la floculación, fueron los genes asociados a producción de compuestos volátiles, implicados en el aroma y sabor del producto fermentado. En particular resaltan aquéllos relacionados con producción de compuestos de azufre. Estos resultados se muestran en la Tabla XXV.

TABLA XXV

Genes relacionados a compuestos volátiles cuya expresión fue modificada en las condiciones de ensayo.

| Expresión | Nombre sistemático | Nombre comun | Descripción | Número E.C. |
|---------------------------|--------------------|------------------|--|-------------|
| Metabolismo azufre | | | | |
| Inducido | YJL212C | <i>OPT1</i> | Transporte de glutatión | |
| Inducido | YFR030W | <i>MET10</i> | Componente de sulfito reductasa | 1.8.1.2 |
| Inducido | YDR502C | <i>SAM2</i> | Sintasa SAM 2 | 2.5.1.6 |
| Inducido | YNL277W | <i>MET2</i> | Homoserina O-acetiltransferasa | 2.3.1.31 |
| Inducido | YAL012W | <i>CYS3</i> | Cistationa gamma Liasa | 4.4.1.1 |
| Inducido | YLR180W | <i>SAM1</i> | Sintasa SAM 1 | 2.5.1.6 |
| Inducido | YDR253C | <i>MET32</i> | Regulador transcripcional | |
| Inducido | YKL001C | <i>MET14</i> | Adenilsulfato cinasa | 2.7.1.25 |
| Inducido | YPL274W | <i>SAM3</i> | SAM permeasa | |
| Inducido | YGR055W | <i>MUP1</i> | Metionina permeasa de alta afinidad | |
| Inducido | YLL057C | <i>JLP1</i> | Alfa cetoglutarat deshdrogenasa dependiente de sulfonato | 1.14.11.- |
| Reprimido | YPLO38W | <i>MET31</i> | Regulador Transcripcional | |
| Esteres | | | | |
| Reprimido | YGR177C | <i>ATF2</i> | Alcohol acetil transferasa | |
| Reprimido | YOR126C | <i>IAH1/EST2</i> | Esterasa | |
| Reprimido | YMR303C | <i>ADH</i> | Alcohol deshdrogenasa | |
| Diacetilo | | | | |
| Reprimido | YLR355C | <i>ILV5</i> | Acetohidroxiacido reductoisomerasa | 1.1.1.86 |
| Inducido | YER178W | <i>PDA1</i> | Piruvato deshdrogenasa subunidad alfa | 1.2.4.1 |

Finalmente, de los 170 genes asociados a la regulación de la floculación, destacaron 19 los cuales tienen funciones regulatorias altamente relevantes para el control del ciclo celular, respuesta a estrés osmótico y silenciamiento de genes subteloméricos. De estos, 14 fueron inducidos y sólo 5 reprimidos bajo condiciones de represión de floculación. Funcionalmente, estos genes fueron del tipo ciclinas, cinasas, histonas o factores transcripcionales. Estos genes y sus funciones se enlistan en la Tabla XXVI.

TABLA XXVI

Genes regulatorios asociados a la expresión de la floculación.

| Nombre común | Descripción | Procesos biológicos | Expresión |
|------------------|--|---------------------------|-----------|
| <i>CLB1</i> | Ciclina B, específica para G2/M | Ciclo celular | Inducida |
| <i>CLB2</i> | Ciclina B, específica para G2/M | Ciclo celular | Inducida |
| <i>SWE1</i> | Cinasa de especificidad dual, inhibe Cdc28p | Ciclo celular | Reprimida |
| <i>BCK2</i> | Supresor de mutaciones de PKC1, su sobreexpresión estimula transcripción de ciclina B | Estrés osmótico | Inducida |
| <i>MSN1</i> | Activador transcripcional involucrado en regulación de expresión invertasa y glucoamilasa, crecimiento invasivo y diferenciación pseudohifal (FLO11) y respuesta a estrés osmótico. Vía MAPK | Estrés osmótico | Inducida |
| <i>PKC1</i> | Protein cinasa C, con actividad choque hipotónico. Vía MAPK | Estrés osmótico | Reprimida |
| <i>PTC2</i> | Fosfoprotein fosfatasa tipo 2C, defosforila Hog1p y Cdc28p. Inactiva vía MAPK al finalizar estrés osmótico | Estrés osmótico | Inducida |
| <i>RGD2</i> | GTPasa proteína activadora para Cdc42p y Rho5p. Vía PKC1/MAPK | Estrés osmótico | Inducida |
| <i>SLG1/WSC1</i> | Sensor requerido para integridad de pared celular y respuesta a estrés hipoosmótico, vía señalización Ras, PKC1/ MAPK | Estrés osmótico | Inducida |
| <i>STE20</i> | Protein cinasa de la vía MAPK participa en respuesta a feromonas, choque osmótico, y falta de nutrientes | Estrés osmótico | Reprimida |
| <i>HIR1</i> | Regulador de transcripción de histonas, correpressor | Factores de transcripción | Reprimida |
| <i>SNF12</i> | Componente SWI/SNF activador global de transcripción, respuesta a estrés | Factores de transcripción | Reprimida |
| <i>ESC1</i> | Establece silenciamiento de cromatina en telómeros uniéndose a Sir4p | Silenciamiento de genes | Inducida |
| <i>ESC4</i> | Establece silenciamiento de cromatina, regula transposición | Silenciamiento de genes | Inducida |
| <i>HHF1</i> | Histona H4. Interactúa con Sir4p para silenciamiento de telómeros | Silenciamiento de genes | Inducida |
| <i>HHF2</i> | Histona H4. Interactúa con Sir4p para silenciamiento de telómeros | Silenciamiento de genes | Inducida |
| <i>HHT2</i> | Histona H3. Interactúa con Sir4p para silenciamiento de telómeros | Silenciamiento de genes | Inducida |
| <i>HTZ1</i> | Variante de histona H2AZ. Regula extensión de silenciamiento | Silenciamiento de genes | Inducida |
| <i>TAF60</i> | Factor transcripcional TFIID y subunidad SAGA, similar a histona H4 | Silenciamiento de genes | Inducida |

8. DISCUSION

La identificación de los genes regulatorios de la floculación, exigió un conocimiento previo del transfondo génico de las zimolectinas presentes en las levaduras industriales. Para esto, a fin de identificar los genes *FLO* en el genoma de levaduras se diseñaron iniciadores específicos para PCR (Tabla III). Tomando en cuenta que había sido reportado anteriormente falla al tratar de amplificar los genes completos *Lg-FLO1*, *FLO1* o *FLO8* (Jibiki *et al.*, 2001), los iniciadores fueron diseñados de tal forma que sólo una porción específica y discreta de cada gen fue amplificada. Con esta estrategia, se amplificaron exitosamente secuencias específicas de los 7 genes *FLO* dominantes. La identidad de los fragmentos amplificados fue confirmada mediante secuenciación de ADN. Con estos iniciadores se analizó la distribución de los genes *FLO*, utilizando ADN genómico de varias levaduras lager, así como de cepas no cerveceras (ver Tabla IV). *Lg-FLO1*, un gen relacionado al fenotipo NewFlo (sensible a glucosa y manosa) estuvo presente sólo en las levaduras lager. También se observó una débil amplificación en *S. diastaticus* (ver carril 2 en la Figura 5C), sugiriendo una bajo número de copia de este gen, o la presencia de una secuencia homóloga. Respecto a esta levadura, ha sido reportado que la delección de *FLO11* en *S. diastaticus* abolió completamente el fenotipo de floculación, a pesar de la posible presencia de *FLO1* o *FLO5* (Lo y Dranginis, 1996). Nuestros resultados indicaron que esta levadura carece *FLO1* y sugieren que, aunque posee *Lg-FLO1*, *FLO5*, *FLO8*, *FLO9* y *FLO10*, estos podrían ser no funcionales o estar pobremente expresados.

Por otra parte, todas las cepas lager probadas carecieron de *FLO5*. Ha sido reportado que varias cepas lager no floculantes carecen de este gen (Jibiki *et al.*, 2001); sin embargo en este caso todas la cepas lager eran floculantes, así que es obvio que *FLO5* no es el único responsable de la floculación en todas las cepas lager.

FLO8, un activador transcripcional de *FLO1* y *FLO11* (Lo y Dranginis, 1996; Teunissen y Steensma, 1995), estuvo presente en todas las cepas probadas, excepto en la

levadura panadera. Esta cepa es no floculante lo que apunta hacia un papel central de este gen ya que la cepa también posee *FLO5*, lo que sugiere que *FLO8* podría ser un activador para este gen.

En relación a *FLO9*, los resultados concuerdan con aquéllos que han reportado la presencia de este gen en algunas cepas, pero no en todas (Speers *et al.*, 1992). Resultados similares fueron obtenidos con *FLO1* y *FLO10*, cuya distribución no tuvo aparentemente relación el fenotipo de floculación. Si estos genes se demuestra que son funcionales en una cepa en particular, pudieran impactar el contenido de zimolectinas en la superficie celular y por lo tanto la habilidad para flocular.

Un caso muy interesante fue *FLO11* que estuvo predominantemente presente en todas las cepas probadas, incluyendo las levaduras silvestres *Saccharomyces*. Esto concuerda con reportes previos que señalan que *FLO11* parece estar ampliamente distribuido (Lo y Dranginis, 1996). Es de notar que este gen es el más divergente en secuencia (26% identidad, 37 % similitud), con respecto a otros genes *FLO*. También, este gen tiene diferentes funciones, aunque relacionadas, en la célula. Estas incluyen por supuesto floculación, pero además crecimiento pseudohifal, invasividad en agar, adherencia a superficies y formación de biopelículas flotantes; todos estos eventos relacionados con la actividad de adhesión celular (Guo *et al.*, 2000). Los esfuerzos de la levadura por retener este gen, evidenciado por la prevalencia en todas las cepas probadas hasta la fecha sugieren otras posibles funciones desconocidas, lo que también se deduce del hecho de que *FLO11* esta sujeto a múltiples cascadas de regulación por cinasas como las vías cAMP/PKA y MAPK (Teunissen y Steensma, 1995).

Otro hallazgo que debe ser enfatizado es que hubo una relación entre el contenido de genes *FLO* y la intensidad de floculación observada en las cepas industriales analizadas. En la Figura 8 se observa una correlación significativa ($R^2 = 0.75$) entre estos dos factores. Las levaduras lager LAW y KJ8 mostraron la floculación mas alta y coincidentemente estas cepas portaban el juego más completo de genes *FLO* (5-6 de 7). Otras cepas tuvieron menor contenido de genes *FLO* y su intensidad de floculación

disminuyó correspondientemente. Obviamente, como se menciona mas adelante otros factores a nivel transcripcional, traduccional o post-traduccional ocurren y explican porque cepas con el mismo número de genes (como KJ8, C820 y J-2036) tienen diferente habilidad para flocular o porqué la cepa panadera es no floculante, aún y cuando posee tres genes *FLO*.

Respecto a la expresión de la floculación, es bien sabido que algunas condiciones de estrés en el proceso de fermentación pueden impactar negativamente la calidad fisiológica de la levadura, incluida la floculación. En este trabajo se evaluó el efecto de varias de estas condiciones en la floculación. Como se muestra en la Tabla XIII la presión osmótica, restricción calórica y la presión hidrostática no tuvieron efecto negativo significativo. Sin embargo el perfil alterado de glucosa:maltosa 10:6, en vez del típico 1:10, tuvo efecto negativo en el fenotipo de floculación en las dos cepas lager estudiadas. Previos reportes sugieren que esta alteración de la floculación pudiera ser debido a una represión catabólica del gen *FLO11* (Gagiano *et al.*, 1999). Al final de la fermentación se notó que no se consumió totalmente la maltosa, lo que pudiera ser debido a la represión por glucosa de los genes *MAL* (Hardwick, 1995).

Por otra parte, el factor de estrés de número de generación, provocó un incremento en la floculación en cultivos con alto reuso (generaciones 9a a 13a) comparado con cultivos más jóvenes (1^a generación). Los resultados concuerdan con los de Verstrepén *et al.*, (2003), quienes sugirieron que este efecto se debe a que las células más viejas tienden a ser de mayor tamaño que las jóvenes, y sus paredes celulares son más hidrofóbicas y rugosas lo que puede facilitar la adhesión celular. Otra posible explicación pudiera estar relacionada con una baja concentración de zimolectinas en la pared celular de levaduras jóvenes. En estudios posteriores en este mismo trabajo, se demuestra que esta segunda posibilidad ocurre en algunas cepas, ya que se detectó mayor nivel de transcripción de *Lg-FLO1* en cepas de generación alta.

La fluctuación de pH y células en suspensión tuvieron un comportamiento normal en todas las fermentaciones (Heggart *et al.*, 1999). Por otra parte, el grado real de

fermentación se mantuvo arriba del 60%, lo cual indicó que los carbohidratos del mosto fueron fermentados sin mayor problema (Hardwick, 1995). La cantidad de alcohol producida fue normal, de acuerdo a lo esperado (Heggart *et al.*, 1999); y el diacetilo permaneció en los niveles aceptados para fermentaciones lager.

Al realizar el curso temporal de medición de floculación (Figuras 12 y 13), en las cepas C820 y C790, se observó que al iniciar la fermentación perdieron su habilidad de flocular en las etapas tempranas de crecimiento, para después recuperar esta capacidad en la fase estacionaria o exponencial tardía. Esto indicó que la floculación esta sujeta a mecanismos de control de represión-inducción que coordinan la expresión de la floculación con el ciclo celular y la disponibilidad de nutrientes (Soares y Mota, 1996; Sampermans *et al.*, 2005). Cabe mencionar que Gracia (2008) demostró que estas cepas pertenecen al fenotipo NewFlo, el cual se sabe que expresa de manera inducible su capacidad de floculación (Bony *et al.*, 1998; Dengis *et al.*, 1995; Davy *et al.*, 2006).

De esta forma, los resultados sugieren que la capacidad de floculación y la fermentación son regulados por vías diferentes y por lo tanto ofrecen una oportunidad para conocer los factores específicamente relacionados con el control de la floculación, particularmente en las condiciones de estrés por alto contenido de glucosa y edad generacional.

Para determinar si los genes *FLO* detectados eran expresados diferencialmente en presencia de algunos factores de estrés conocidos en la industria, como altos niveles de glucosa (Kobayashi *et al.*, 1998) y edad generacional alta (Powell *et al.*, 2000, 2003; Jenkins *et al.*, 2003), se analizó la generación de transcritos de los genes *FLO8*, *FLO11* y *Lg-FLO1* por PCR en tiempo real en las cepas C820 y C790, cultivadas en condiciones basales y de estrés (ver Tabla I).

El efecto fue más notorio para el gen *Lg-FLO1*, donde si bien en la condición de cultivo basal se observaron unos niveles de expresión equivalentes entre las dos cepas, hubo un efecto negativo en ambas para la condición experimental de alta glucosa, más

marcado en la cepa C820. Esto coincide con la observación de que el decremento en el porcentaje de floculación fue más acentuado en esta cepa.

Respecto a la edad generacional para el gen *Lg-FLO1*, claramente fue más sensible la cepa C790, disminuyendo la expresión significativamente. Es interesante notar que el valor de Cp fue menor en la cepa C820 para la condición experimental de edad generacional, indicando un nivel mayor de transcripción respecto al estado basal, lo que concuerda completamente con lo observado a nivel fenotípico (ver Tabla XIII), donde esta cepa mostró un dramático incremento mayor al 100% de su capacidad de floculación al alcanzar mayor edad generacional. El aumento en floculación en la cepa C790, aunque también fue observada, sólo fue del rango del 25% y en esta última el Cp de *Lg-FLO1* no mostró incremento de transcripción. Esto se pudiera deber a diferencias en la regulación de la transcripción de este gen según la cepa, aunque otra posibilidad que se observó al analizar la expresión global, es que el análisis en la cepa C790 se realizó 2 días antes en la fermentación respecto a la cepa C820, por lo que pudiera no haber un completo despliegue de la expresión. Para dilucidar esta cuestión se requiere más experimentación, lo cual está fuera del alcance de la presente investigación.

Al observar los resultados para la expresión de *FLO8*, es notable que en todos los casos los niveles de transcripción fueron similares, es decir, no hubo cambios con respecto al tratamiento ni entre cepas, además que son los niveles más bajos de expresión de los tres genes estudiados. Esto pudiera ser por varias razones: por un lado está el hecho de que este gen expresa un activador transcripcional (Liu *et al.*, 1996) que probablemente requiera niveles más bajos de transcripción. Otra posibilidad es que la toma de la muestra para estas condiciones haya sido demasiado tardía y el transcrito tuvo un tiempo de vida corto. Por supuesto la tercera posibilidad es que este gen no tenga un rol importante en la regulación de la transcripción en cepas industriales. Esta última situación se pudo comprobar más adelante en los estudios de expresión global.

Se conoce muy bien el papel en la floculación del gen *FLO11* en muchas cepas de laboratorio (Lo y Dranginis, 1996; Douglas *et al.*, 2007). Sin embargo, en las cepas

industriales analizadas aquí, hubo un efecto negativo en la expresión del *FLO11* no sólo para la condición de restricción catabólica, como era de esperarse, sino también en la condición de edad generacional, resultando más afectada la cepa C820, que desplegó un aumento en su capacidad de floculación mayor al 100%. Esto indica que en las cepas industriales evaluadas, la expresión de este gen no estuvo correlacionada con el despliegue de la floculación.

Evidentemente la presencia del gen *Lg-FLO1* estuvo asociada con la floculación en las cepas lager estudiadas, ya que la modulación de su expresión, determinada por PCR en tiempo real, coincidió con los datos observados a nivel fenotípico, con la excepción ya mencionada en la cepa C790. La expresión de *FLO8* y *FLO11* no pudo ser relacionada con el despliegue de la floculación en las cepas estudiadas, por lo que la prevalencia de estos genes en cepas floculantes y no floculantes apunta a otras funciones de impacto más global.

Por otra parte, el empleo de microarreglos para análisis de expresión en cepas industriales de *S. cerevisiae* ha sido utilizado recientemente como una herramienta para conocer los genes implicados en la respuesta a diferentes condiciones de estrés. Sin embargo su empleo para determinar la participación específica de genes implicados en la regulación de la floculación no ha sido reportado. En este trabajo se diseñaron experimentos utilizando condiciones de fermentación contrastantes en cuanto a su efecto sobre la floculación, así como cepas con distintas capacidades para flocular. De esta manera fue posible identificar los procesos biológicos que son modificados bajo estas condiciones y los genes implicados en la regulación del fenómeno. Para esto se analizaron las condiciones de restricción calórica (floculación no modificada), alto contenido de glucosa (floculación disminuida) y edad generacional (floculación aumentada), así como cepas floculante (C820), semifloculante (C790), y no floculante (C7754).

En primer instancia, de un total de 6480 genes analizados se observó expresión significativamente alterada ($Z < -2$ ó $Z > +2$) por las condiciones ensayadas, en promedio

de 290 genes por cepa y 286 por variable evaluada, dando un total de 2031 ORF. De estos, 1434 fueron diferentes ORF no repetidos. Esto representa 25.6% del genoma de *S. cerevisiae*, del cual 302 genes fueron específicamente modificada su expresión en relación con la floculación, lo que representa un 5.4% del genoma. En comparación Gasch y colaboradores (2000) reportaron un 14% del genoma alterado específicamente por factores de estrés (choque térmico, peróxido de hidrógeno, menadiona, diamida, ditiotreitól, choque hiper e hipo-osmótico, limitación de nitrógeno y entrada a fase estacionaria) Mientras que Causton y colaboradores (2001) reportaron un 66% del genoma con modificación de su expresión en condiciones de estrés (temperatura, oxidación, nutrientes, pH, y osmolaridad), y de estos 499 genes fueron específicos para respuesta a estrés, lo que representa un 8.9% del genoma. Cabe mencionar que en los estudios anteriores se uso como criterio un valor Z de 1.5, positivo o negativo, para considerar como significativo un cambio de expresión. En este trabajo se fue mas exigente al tomar un valor Z como significativo de 2, lo cual explica la diferencia en el número de genes considerados como relevantes. De esta forma obtener aproximadamente 5% de genes con cambio de expresión es razonablemente aceptable dada su significancia estadística sustancialmente mayor.

En promedio, la condición que causó más modificación en la expresión genética fue la represión catabólica (307 genes) seguida por la restricción calórica (279) y después la edad generacional (272). En cuanto a las cepas, la C7754 presentó mayor modificación en la expresión genética (309 genes) después la C820 (298) y finalmente la cepa C790 (264). Estos resultados confirman con lo observado a nivel fenotípico donde la cepa C820 sufrió mayor cambio en su floculación bajo las condiciones ensayadas, en comparación con la cepa C790, así como los resultados de la expresión del gene *Lg-FLO1* determinados por RT PCR.

Como primer paso, se analizó la expresión de los genes estructurales relacionados con la floculación. La información obtenida indica que los locus YHR061W y YHR213W fueron reprimidos significativamente al abatirse la floculación. Por otra parte, considerando un menor nivel de Z score, *FLO5* también resultó reprimido ($Z = -1.85$).

Esto es aparentemente contradictorio con los resultados de detección por PCR y análisis de expresión por RT-PCR donde se observó la carencia del gen *FLO5* en cepas lager y la expresión significativamente modificada de *Lg-FLO1*. Sin embargo, ha sido reportado recientemente que *Lg-FLO1* se encuentra localizado en el locus YHR211W en las cepas industriales, el cual corresponde exactamente al gen *FLO5* en cepas de laboratorio, que son *Saccharomyces cerevisiae sensu stricto* (Ogata *et al.*, 2008). Cabe mencionar que el arreglo de genes utilizado en este estudio está basado en el genoma de la cepa *Saccharomyces cerevisiae* S288C por lo que es posible que la señal del transcrito de *Lg-FLO1* esté siendo detectada en este locus.

La expresión reprimida del pseudogen YAR61W y de YHR213W es interesante y podría sugerir dos cosas: 1) que realmente estos genes tienen una función en la floculación en cepas lager o, 2) que el microarreglo detecta transcritos de *Lg-FLO1* que hibridan en estos loci. Más experimentación será necesaria para aclarar esta situación.

Respecto a *FLO8* los resultados en las cepas lager concuerdan perfectamente con los obtenidos por RT-PCR, donde la expresión de este gen no se vio significativamente alterada. Por otra parte, los resultados con la levadura de panadería C7754 mostraron que la expresión de *FLO11* estuvo significativamente aumentada. El hecho de que *FLO11* esté siendo sobreexpresado en una cepa no floculante sugiere que el producto de este gen pudiera estar sufriendo modificaciones postranscripcionales y/o postraduccionales que impiden su expresión a nivel fenotipo. De hecho, recientemente se demostró, mediante ensayos ligando-receptor empleando FITC-avidina, que esta cepa en particular presentó de 36 a 55 veces menos concentración de floculinas (indicado por B_{max}) en su pared que las cepas lager C820 y C790, aunque su afinidad por el ligando (K_d) es 2-12 veces mayor (Gracia, 2008; ver Tabla XXVII).

Posteriormente, a fin de encontrar los genes regulatorios cuya expresión estuvo ligada directamente a la floculación, se realizaron comparaciones directas de las listas de genes donde la floculación fue reprimida (cepas lager en mostos con alta glucosa) contra condiciones donde la floculación fue inducida (cepas lager de alta edad generacional) y

después contra la situación donde la floculación fue no modificada (cepa panadera en mostos con alta glucosa y todas las cepas en restricción calórica) De esta forma, la expresión de 302 genes resultó asociada a la disminución en la floculación (Figura 18). Esta estrategia ha demostrado ser útil para la asociación de patrones de expresión específicos para condiciones fisiológicas relevantes como respuesta a estrés (Causton *et al.*, 2001) De los 302 genes 147 fueron inducidos y 155 reprimidos.

Tabla XXVII

Contenido de genes *FLO*, capacidad de floculación y parámetros de ligando-receptor para cepas industriales (reproducido de Gracia, 2008).

| Cepa | Gen <i>FLO</i> | | | | | | | #Genes <i>FLO</i> | Flocula- ción(mL) | B_{\max} (fmol/cel) | K_d |
|-------|----------------|---|---|---|----|----|----|----------------------|----------------------|-----------------------|--------|
| | 1 | 5 | 8 | 9 | 10 | 11 | Lg | | | | |
| C820 | + | - | + | - | + | + | + | 5 | 4.5 | 0.06445 | 1.337 |
| C790 | + | - | + | - | - | + | + | 4 | 2.5 | 0.04259 | 7.262 |
| C7754 | + | + | - | - | - | + | - | 3 | 0 | 0.001178 | 0.6071 |

Dentro de los procesos cuyos genes sufrieron inducción destacan de manera significativa los relacionados al ciclo celular (11 genes), silenciamiento de genes (8), estrés osmótico (7), biosíntesis de pared celular (5) y mantenimiento de telómeros (4), ya que su actividad esta interrelacionada y su expresión aumentada pudiera estar impactando la de los genes de floculación. En particular, los genes de silenciamiento son de gran interés, ya que de los 8 que aumentaron su expresión, 7 (*ESC1*, *ESC4*, *HTZ1*, *HHT2*, *HHF1*, *HHF2* y *TAP60*) participan en el silenciamiento de genes subteloméricos, por modificación de la arquitectura de cromatina (Aparicio *et al.*, 1991; Andrulis *et al.*, 2002). Las proteínas de estos genes interactúan con Sir4p, el cual a su vez es activado por Cdc28p, la principal cinasa reguladora del ciclo celular (Ubersax *et al.*, 2003). Aunque ambos genes no resultaron significativamente sobreexpresados, sus valores *Z* fueron positivos y mayores a 1. Es interesante notar que Cdc28p es activada por ciclinas (Mendenhall y Amy, 1998), y dos de estos genes (*CLB1* y *CLB2*) fueron activados también bajo estas circunstancias. Las ciclinas son a su vez activadas por la acción de

BCK2, quien también fue sobreexpresado bajo estas condiciones. Es interesante notar que *BCK2* ha sido implicado en la respuesta a estrés osmótico, por lo que su activación pudiera disparar el inicio del ciclo celular en presencia de altas concentraciones de azúcares fermentables (Mendenhall y Amy, 1998). Adicionalmente *CDC28* es regulado negativamente por *SWE1* (Booher *et al.*, 1993), este gen resultó reprimido en los ensayos. Como resultante de estas acciones concertadas, un número alto de genes del ciclo celular también resultaron sobreexpresados (Tabla XX y Figura 19).

La importancia de la sobreexpresión de genes silenciadores de zonas subteloméricas radica en que es ahí donde precisamente se localizan la mayoría de los genes de floculación, con excepción de *FLO8* y *FLO11* (Teunissen y Steensma, 1995). Como se mencionó anteriormente, la expresión de *Lg-FLO1*, determinada por RT-PCR, estuvo fuertemente relacionada con la modulación de la floculación en las cepas industriales, mientras que *FLO8* y *FLO11* no sufrieron alteración en su expresión en relación a la capacidad de flocular. *Lg-FLO1* reside en el locus que en las cepas de laboratorio corresponde a *FLO5* (YHR211W) en posición subtelomérica en el cromosoma VIII (Ogata *et al.*, 2008), por lo que una regulación por silenciamiento de genes subteloméricos pudiera ser el mecanismo modulador de su expresión. En este sentido, en los ensayos de microarreglos, 8 genes subteloméricos (*MAL32*, *AAD14*, *FET4*, YAR061W, YAR069C, YLR462W, YDR537C y YHR213W) fueron regulados negativamente, además de *MAT α* , gen que aunque no está localizado en regiones cercanas a telómeros, se sabe que es regulado por el mismo mecanismo de silenciamiento (Andrulis *et al.*, 2002). Por cierto, el gen YHR213W es un conocido pseudogen de *FLO1* y es vecino colindante de YHR211W (*Lg-FLO1* en cepas industriales), por otra parte YAR061W, también es un pseudogen *FLO1*. De esta forma los resultados sugieren evidentemente que *Lg-FLO1* es regulado por este mecanismo. La localización subtelomérica de estos genes de floculación hacía sospechar la participación de un mecanismo relacionado; esta es la primera ocasión en que experimentalmente se observa una clara asociación entre ambos grupos de genes.

Dentro de los genes inducidos se encuentra *SRL1*, que codifica para una proteína de pared que es sobreexpresada en ausencia de manoproteínas ancladas por GPI (Hagen *et al.*, 2004). Además de *Lg-FLO1* y YH213W, por lo menos otras dos proteínas de pared ancladas por GPI (She10p y Mpt5p) fueron reprimidas, lo que apunta hacia un mecanismo común de control.

Los datos mencionados arriba indican que la floculación es reprimida mediante un silenciamiento por modificación de cromatina subtelomérica en condiciones donde el ciclo celular esta activo.

Otros dos grupos interesante de genes que fueron activados son los asociados a estrés osmótico y biosíntesis de pared. Ambos grupos están relacionados, ya que la detección de condiciones hipo o hiperosmóticas termina, entre otras cosas, en la modificación de la pared celular (Lodder *et al.*, 1999). En este caso, 5 genes de biosíntesis de pared fueron sobreexpresados y sólo 1 reprimido, indicando actividad en este rubro. Por otra parte la actividad de los genes de estrés osmótico fue variada: 7 genes fueron inducidos (*SLG1*, *RGD2*, *MSN1*, *HOR2*, *RHR2*, *PTC2* y *BCK2*), mientras que 3 fueron reprimidos (*PKC1*, *STE20* y *SNF12*). Es interesante notar que Msn1p ha sido referido como un activador transcripcional de *FLO11* (Lambrechts *et al.*, 1996) y su actividad es necesaria para la expresión de la floculación en cepas de laboratorio; sin embargo en el caso de las levaduras lager la actividad de este gen no tuvo efecto positivo en la floculación, reforzando la idea de que existe un mecanismo diferente para el control de la expresión de *Lg-FLO1*. La vía PKC1/MAPK ha sido ampliamente referida como responsable de la regulación de la floculación en cepas de laboratorio. Los resultados contrastan notoriamente con esta observación en dos sentidos: 1) El principal efector transcripcional positivo de esta cascada, *MSN1*, estaba siendo sobreexpresado durante la fase en que la floculación estuvo reprimida, mientras que importantes activadores de la vía como *STE20* y *PKC1* (Levin *et al.*, 1994; Bardwell, 2005) se encontraron reprimidos, 2) A diferencia de los demás genes *FLO*, *FLO11* fue activado en la cepa panadera, independientemente de su incapacidad de floculación, lo que confirma que en la cepas *Saccharomyces cerevisiae sensu stricto*, (cepas de laboratorio, de panadería, ale, etc.) el

gen *FLO11* es activado en condiciones donde *MSNI* es activo (Rep *et al.*, 1999), pero esto es independiente del status de floculación. *FLO11* ha sido reportado como funcional en muchas otras actividades (Guo *et al.*, 2000), pero aparentemente en las cepas lager industriales su papel en la floculación es secundario. El hecho de que la supresión de la floculación no depende en primera instancia de la activación de los genes de respuesta a estrés osmótico queda corroborado por el hecho de que no se observó diferencia en la floculación al fermentar mostos de 12°P y 17°P en las cepas industriales (Tabla XII).

Sin embargo, dada la alta actividad de expresión de estos genes, cabe la posibilidad de que la levadura coordine de alguna otra forma su expresión de floculación con la respuesta a estrés osmótico. Las claves parecen ser *PTC2* y *BCK2*. Es importante mencionar que la inducción de *PTC2* fue detectada al 5° día de fermentación, mientras que *BCK2* al 3^{er} día; la primera codifica para una enzima cinasa serina/treonina, y tiene un amplio espectro de acción regulando negativamente la acción de Hog1p, efector positivo de la expresión de los genes de respuesta a estrés y Cdc28p, el principal regulador del ciclo celular (Cheng *et al.*, 1999; Young *et al.*, 2002; Warmka *et al.*, 2001). *BCK2* ya se mencionó anteriormente como un activador de la expresión de *CLB1* y *CLB2* (ciclina B). Ptc2p y Bck2p responden a condiciones antagónicas de hiperosmolaridad. Mientras que *BCK2* es inducido por la detección de altos niveles de osmolaridad, la inducción de *PTC2* ocurre al momento de recibir la señal de disminución de estrés osmótico, por lo que su expresión es el paso inicial para la eliminación de la activación de Cdc28p sobre el sistema de silenciamiento de genes subteloméricos. Su sobreexpresión en los ensayos realizados podría indicar que la levadura ya no detecta condiciones de hiperosmolaridad en el entorno (lo que también implica disminución de nutrientes) y por lo tanto debe iniciar su proceso de floculación. La interpretación de esta regulación concertada ciclo celular- respuesta a estrés osmótico sobre la floculación se explica más adelante.

La evidencia de un papel central de *PTC2* se observa también la represión de las proteínas chaperonas. De 10 genes de este tipo detectados en los microarreglos, 9 fueron reprimidos bajo la condición de ensayo. Es sabido que *PTC2* actúa sobre Ire1p,

inactivándola; Ire1p es la principal proteína activadora de transcripción de los genes de respuesta a proteínas desplegadas (Welihinda *et al.*, 1998). Cabe mencionar que un fenómeno similar fue reportado para *HSP104* reprimida también al final de la fermentación (James *et al.*, 2003) lo que implica que la detección de estrés osmótico ha sido removida.

Adicionalmente es importante mencionar que en los ensayos de restricción calórica se detectaron notables cambios en los patrones de expresión de algunos genes relacionados con la producción de compuestos volátiles (compuestos de azufre, diacetilo, alcoholes superiores, esteroides) relacionados con el perfil organoléptico del producto, por lo que sería interesante abundar en el estudio del efecto de factores de estrés sobre la producción de dichos compuestos.

Dos grupos de genes que merecen consideración son los relacionados a mantenimiento de telómeros y respiración. No está claro cuál sería el papel de los primeros ya que sus acciones son antagónicas y su expresión en los ensayos no indica un efecto neto positivo o negativo sobre el mantenimiento de los telómeros; sin embargo, es razonable especular que estos eventos podrían relacionarse con los procesos de silenciamiento subtelomérico. Por otra parte, 11 genes de respiración fueron reprimidos en los ensayos, lo cual no es de extrañar ya que estos fueron realizados en mostos con alto contenido de glucosa, lo cual conlleva al conocido efecto Crabtree o represión por catabolito (Hardwick, 1995). Esto confirma la relevancia de los fenómenos observados y sienta las bases para una interpretación confiable (control positivo de procesos).

Finalmente, es necesario mencionar que el 20% de los genes inducidos no cuenta con una función específica determinada, lo mismo ocurre para un 25% de genes reprimidos. Esto abre la posibilidad para investigar de manera más detallada la actividad de estos genes y su relación con las condiciones que llevan a una baja en la floculación.

Tomando juntas todas las piezas de información obtenidas anteriormente en los ensayos de microarreglos, surge una imagen (Figura 21) que lleva a un modelo coherente

y altamente significativo de regulación de la floculación en cepas lager, determinado como fue marcado en la hipótesis inicial, mediante al análisis de expresión global, bajo condiciones de estrés. La interpretación es la siguiente: Al inicio de la fermentación, la alta presencia de nutrientes dispara la expresión de los genes que activan el ciclo celular, así como la respuesta a estrés osmótico, con la consecuente remodelación de la pared celular. Estos procesos van orientados a la rápida reproducción de levadura en presencia de exceso de nutrientes (a la vez de conservar la integridad de la pared celular) por lo que es necesario prevenir el proceso de floculación, a fin de mantener a la levadura en suspensión y en contacto con el mosto. *BCK2* es inducido respondiendo a la situación de hiperosmolaridad y activa la biosíntesis de ciclina B. Estas interactúan con Cdc28p quien a su vez activa la cascada de silenciamiento de genes subteloméricos, a los que pertenecen, entre otros los genes de floculación, particularmente *Lg-FLO1*, el principal gen estructural de floculación en levaduras lager. Conforme avanza el consumo de nutrientes, el estrés osmótico es aliviado y la levadura debe prepararse para detener su ciclo celular entrando a G0. En este momento, *PTC2* es inducido y su actividad va dirigida a reprimir la respuesta a estrés osmótico (entre otros) y el ciclo celular. Como consecuencia de su efecto regulador negativo sobre Cdc28p, la actividad de silenciamiento de genes subteloméricos se ve relevada, por lo que la expresión de *Lg-FLO1* puede ser activada.

La alta significancia de los procesos analizados sugiere una relación biológica relevante, por lo que sienta la base para futuras investigaciones al respecto. A nuestro conocimiento, este es el primer trabajo que explora los aspectos reguladores de la floculación en cepas industriales y que reporta una clara relación entre ciclo celular, estrés osmótico, silenciamiento de genes y floculación. A nivel práctico, estos resultados proveen herramientas para diagnosticar fallas en el proceso de floculación debido a sobrerregulación de la expresión genética, y permiten discernir cuales condiciones de fermentación tienen un impacto real sobre la floculación en cepas industriales.

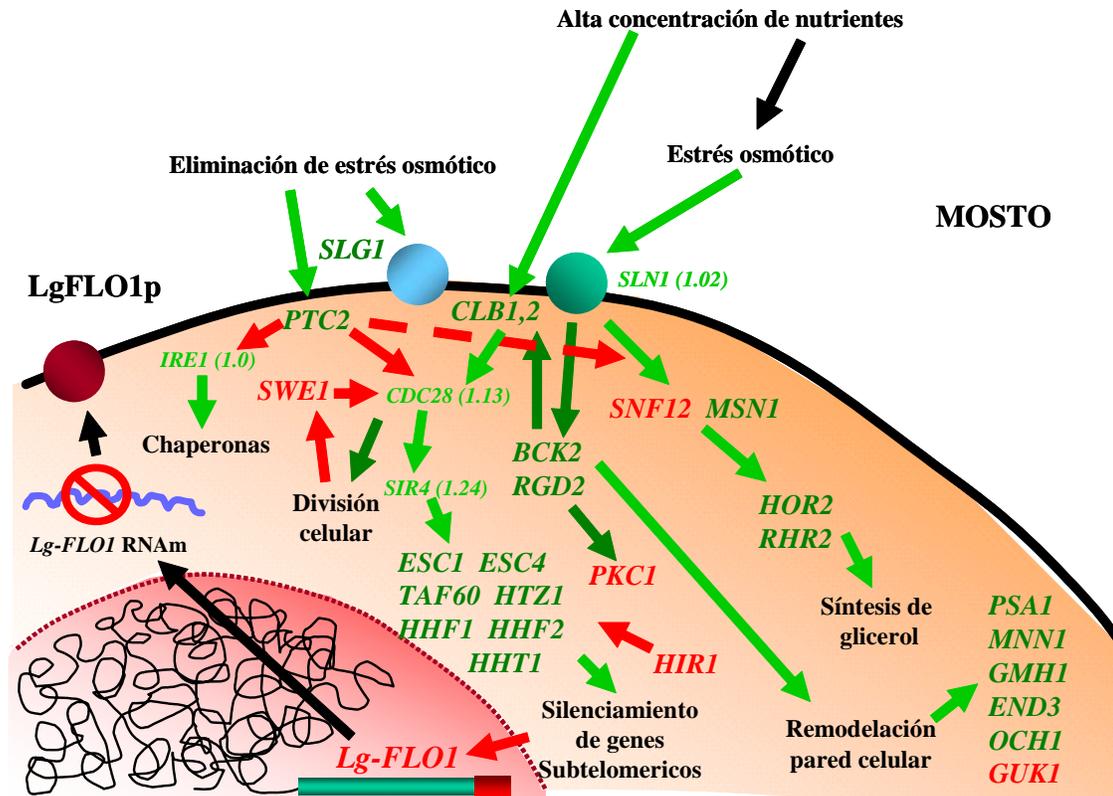


Figura 21. Modelo del mecanismo de regulación de los genes de floculación en cepas industriales. El color verde en el nombre de los genes significa inducción, el rojo represión, en menor tamaño se presentan genes cuya expresión fue aumentada, pero el Z score fue menor a 2 (el numero entre paréntesis indica el valor específico). El color de las flechas indica el efecto del producto del gen: verde activación, rojo inactivación.

9. CONCLUSIONES

9.1 La distribución de genes *FLO* entre cepas diferentes de levaduras fue heterogénea, siendo más predominantes *FLO8* y *FLO11*, además de *Lg-FLO1* en levaduras lager industriales.

9.2 La cantidad de genes *FLO* impactó la capacidad de floculación en cepas de levadura de uso industrial.

9.3 A nivel fenotípico, sólo la edad generacional y el perfil de carbohidratos tuvieron impacto significativo en la capacidad de floculación de las levaduras, siendo la cepa C820 más sensible a estos factores:

9.3.1 El perfil de carbohidratos disminuyó la capacidad floculante.

9.3.4 La edad generacional aumentó la capacidad de floculación de las cepas de levadura.

9.4 La expresión de *FLO11* y *Lg-FLO1* disminuyó al someterse las células a represión catabólica.

9.5 La edad generacional sólo incrementó la expresión de *Lg-FLO1* en la cepa C820. Por otra parte, la expresión de *FLO11* se vio disminuida, lo que excluye su participación en el mecanismo de floculación bajo esta condición, ya que fenotípicamente se observó un aumento de la floculación.

9.6 La expresión de *FLO8* no se vio afectada bajo condiciones de represión catabólica y edad generacional.

9.7 La expresión de los genes *FLO* determinada por microarreglos indicó que *Lg-FLO1*, YAR061W y YHR213W disminuyeron significativamente su expresión bajo las condiciones que provocaron disminución de la floculación.

9.9 Algunos “pseudogenes” de la familia *FLO* (YHR213W y YAR061W) fueron activos transcripcionalmente en las levaduras lager a diferencia de la cepa de referencia, y su actividad se correlacionó con la floculación, por lo que pudieran ser responsables de este fenotipo (además de *Lg-FLO1*) o ser reconocidos por el microarreglo por su similitud a *Lg-FLO1*.

9.10 La disminución de la expresión de la floculación se correlacionó con diversos genes asociados a ciclo celular, silenciamiento de genes subteloméricos, y estrés osmótico, los cuales pueden ser usados como indicadores de falla de procesos. En particular resalta el hecho de que este trabajo constituye el primer reporte donde se relaciona la capacidad de flocular en cepas lager con la regulación por silenciamiento de genes subteloméricos.

10. FUTURAS INVESTIGACIONES

10.1 Caracterizar la función biológica de los “pseudogenes” YHR213W y YAR061W y determinar su participación en la floculación en las levaduras industriales.

10.2 Evaluar el impacto de otras variables de proceso sobre la regulación genética de la floculación de la levadura (perfil de aminoácidos, oxigenación, estado fisiológico de la levadura, lavado ácido, etc.).

10.3 Analizar el impacto de condiciones de estrés sobre otros aspectos de la fermentación como producción de compuestos de azufre, perfil de volátiles, alcoholes superiores, etc., mediante el análisis de expresión con microarreglos.

10.4 Corroborar mediante ensayos de mutación el efecto de los genes de silenciamiento de telómeros y estrés osmótico sobre la capacidad de floculación.

APENDICES

APENDICE A. Preparación de soluciones y medios de cultivo.

Medio de cultivo MYPG

Composición para un litro de medio.

| | |
|-----------------------|----------|
| Extracto de malta | 3.0 gr. |
| Extracto de Levadura. | 5.0 gr. |
| Peptona de Caseína | 3.0 gr. |
| Dextrosa | 10.0 gr. |
| Agar | 15.0 gr. |

Agar MYPG

Pesar y diluir en agua bidestilada:

| | |
|---|---------|
| Extracto de levadura | 3.0 g/l |
| Peptona | 3.5 g/l |
| Glucosa | 20 g/l |
| KH ₂ PO ₄ | 2.0 g/l |
| MgSO ₄ -7H ₂ O | 1.0 g/l |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 1.0 g/l |
| Agar | 20 g/l |

Agar YPD

Pesar y diluir en agua bidestilada:

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

Caldo YPD

Pesar y diluir en agua bidestilada:

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

Buffer defloculante

20 mM citrato [pH 3.0], 5 mM EDTA

50TE-10% SDS

EDTA, 3.7 g; Tris, 3.03 g en 1 L. Ajustar pH a 7.5. Posteriormente se mezcla 200 ml de la solución anterior con 20 mL de SDS 10% previamente esterilizada por filtración.

Buffer TBE

| | |
|--------------------|---------|
| Tris base | 108 g/l |
| Acido Bórico | 55 g/l |
| EDTA 0.5M (pH 8.0) | 40 ml/l |

SSC 20X

| | |
|------------------|---------|
| NaCl | 175.369 |
| Citrato de Sodio | 88.29 |

Aforar a 1000 mL con agua destilada estéril pH 7.0 (No es necesario ajustarlo).

APENDICE B. Métodos Analíticos de Parámetros Fermentativos.

B.1 Conteo de células de levadura por microscopía

El número de células de levadura puede determinarse por dos métodos: el Conteo Directo de células y el Conteo Viable en Placa, en este último se requiere el uso de un medio de cultivo apropiado. El Conteo Directo de células tiene la ventaja de que el resultado puede obtenerse en muy poco tiempo. Este método no es capaz de distinguir entre células viables y muertas, y no es usado para soluciones conteniendo menos de 500,000 cel/mL. El Conteo Viable en Placa ofrece la ventaja de determinar la viabilidad de la población, pero requiere largos períodos de tiempo.

REACTIVOS

Agua destilada, Solución Salina o Ácido Sulfúrico al 0.5%.

APARATOS

- a) Microscopio con objetivo 25X o 40X, e iluminación de campo claro.
- b) Hemacitómetro.
- c) Pipetas de 1 ml y de 10 ml.
- d) Tubos de ensaye 16 o 18 x 125.

El hemacitómetro usado para determinación de células consiste de una pieza de vidrio resistente con dos áreas de conteo de nueve cuadros, cada uno separado en tres lados por una ranura. El área cuadrículada usada para el conteo de células de levaduras es el cuadro central de los nueve cuadros rayados, compuestos de 25 cuadros, cada uno de estos contiene 16 pequeños. El área central cuadrículada mide 1 mm de cada lado, es decir 1 mm^2 . Cada uno de los 25 cuadros mide 0.2 mm con un área de 0.04 mm^2 . La profundidad del área de conteo es usualmente 0.1 mm. El volumen de líquido directamente sobre el área de la cuadrícula puede ser calculado usando la siguiente fórmula:

Volumen = Largo X Ancho X Alto

Volumen = L X A X AL

Si $L = 1\text{ mm}$; $A = 1\text{ mm}$ y $AL = 0.1\text{ mm}$, entonces el volumen resulta igual a 0.1 mm^3 y convirtiendo a centímetros, $0.0001\text{ cm}^3 = 1 \times 10^{-4}\text{ cm}^3$ (ml) = $1/10,000\text{ cm}^3$.

MÉTODO

Limpieza de la cámara de conteo

El hemacitómetro debe estar limpio y seco antes de usarse, el polvo puede influenciar en el volumen de la muestra sobre el área de conteo y por lo tanto causar error en los resultados. Limpiar el hemacitómetro y el cubreobjetos con agua. Secar y frotar en todas las direcciones usando seda u otros materiales suaves (no abrasivos).

Colocación del cubreobjetos

El cubreobjetos para el hemacitómetro debe estar centrado sobre el área de conteo cubriendo por igual las secciones laterales que le sirven de soporte.

Llenado del hemacitómetro

La muestra que será cuantificada debe estar bien homogenizada, y si fuera necesario, deberá ser diluida. Una porción de la muestra es tomada con la pipeta de 1 mL, después la punta de ésta es secada. Después de desechar 3 o 4 gotas de la solución, una pequeña gota es agregada entre el contador y el cubreobjetos. La entrada de esa gota debe llenar completamente el área de conteo, pero ninguna parte de la muestra debe quedarse en la canal central. Permita que la preparación repose por unos segundos. El contar las células de levadura en el área de 1 mm^2 puede estar acompañado por el conteo de todas las células en el área de cuadrícula completa, o por el conteo de células en los cuatro cuadros de las esquinas y el cuadro central. Cuando éste último método es usado, el número de células contadas debe ser multiplicado por 5. Para eliminar la posibilidad de contar algunas células de levadura dos veces, es necesario estandarizar la técnica de conteo. Las células que tocan o están sobre el borde del fondo y el borde izquierdo son

contadas. Las células de levadura que están gemando son contadas como una célula si la gema es menor que la mitad del tamaño de la célula madre, si no es así, la gema se cuenta como otra célula más.

Para obtener un conteo de células de levadura confiable, no deben ser menor de 75 células de levadura en 1 mm² y no más de 48 células en cada uno de los 25 cuadros. Si es necesario, la suspensión original de la levadura puede ser diluida con agua destilada o Ácido Sulfúrico 0.5%. Si una dilución es usada, el factor de dilución debe considerarse en los cálculos.

$$\begin{aligned} \text{Número de Células/ml} &= [\text{Total de células en el área de 25 cuadros}] \\ &\quad \times [\text{Factor de Dilución (si se usó)}] \\ &\quad \times [10,000]. \end{aligned}$$

EJEMPLO No.1.-

Total de células en el área de 25 cuadros = 180 células (dil. 1:10).

$$\text{Número de células/ml} = (180) \times (10) \times (10,000) = 18 \times 10^6 \text{ cél/ml.}$$

$$\begin{aligned} \text{Número de Células/ml} &= [\text{Total de células en el área de 5 cuadros}] \\ &\quad \times [\text{Factor de dilución (si se usó)}] \\ &\quad \times [50,000]. \end{aligned}$$

EJEMPLO No. 2.-

Total de células en el área de de 5 cuadros = 36 células (dil. 1:10).

$$\text{Número de células/ml} = (36) \times (10) \times (50,000) = 18 \times 10^6 \text{ cél/ml.}$$

B2. Tinción de células muertas de levaduras con azul de metileno

La habilidad del azul de metileno para teñir células de levadura muertas mientras que las células de levadura vivas no se tiñen, ha tenido un amplio uso en los laboratorios de cervecería, y ha sido preferida sobre otras tinciones. El procedimiento tiene limitaciones, ya que no se distingue entre células vivas y su habilidad para reproducirse. El método tiene valor como una prueba rápida realizada con levaduras en “buenas condiciones”, pero en levaduras deterioradas hasta el punto donde su viabilidad real se convierte en marcadamente reducida, el método podría proveer valores “engañosos” de alta viabilidad.

APARATOS

- 1) Microscopio, 250X-400X de aumento.
- 2) Portaobjetos y Cubreobjetos.
- 3) Pipetas Serológicas de 1 y 5 ml.
- 4) Asa de Platino.
- 5) Cámara de Neubauer (hemacitómetro).
- 6) Matraces, Probetas, Tubos de Ensaye, etc.

REACTIVOS

Azul de metileno-Buffer de Fink-Kühles

Solución A: Solución de Azul de Metileno en Agua Destilada. Pesar 0.1 g de polvo azul de metileno y disolver en 500 ml de agua destilada.

Solución B: Solución de Fosfato de Potasio Monobásico en Agua Destilada. Pesar 13.6 g de fosfato de potasio monobásico anhidro (KH_2PO_4) en 500 ml de agua destilada.

Solución C: Solución de Fosfato de Sodio Dibásico en Agua Destilada. Pesar 0.24 g de fosfato de sodio dibásico dodecahidratado ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) en 10 ml de agua destilada.

Solución D: Mezclar 498.75 ml de la solución B con 1.25 ml de la Solución C.

Solución E: Mezclar 500 ml de la Solución D con 500 ml de la Solución A para obtener una solución de azul de metileno con pH aproximado de 4.6.

TÉCNICA.

(1) Agregar 1 ml de una suspensión de levadura (aprox. entre 10-20 millones de cel/mL) en un tubo de ensaye, adicionar 1 ml de la solución de azul de metileno. Mezclar por agitación y dejar reposar de 1 a 5 minutos.

(2) Después del tiempo de contacto con el colorante, colocar la mezcla en la cámara de conteo y examinar al microscopio con aumento de 250X-400X.

(3) Las células teñidas de color azul oscuro se consideran células muertas. Las células teñidas de color azul claro deberán ser consideradas como células vivas. Deben ser contadas un total de 1000 células como mínimo. Las células madres gemando se cuentan como una célula, sin considerar el tamaño de la célula hija.

No. células teñidas

_____ X 100 = % CÉLULAS MUERTAS

No. total de células (teñidas y sin teñir)

B.3 Determinación de carbohidratos por HPLC.

Reactivos

Glucosa

Maltotriosa

Maltosa

Fructosa

Manitol (Estándar Interno)

Benzoato de Sodio

Agua HPLC, filtrada

Equipo

Cromatógrafo de Líquidos HP 1110, con detector de índice de refracción.

Eluente: Agua HPLC filtrada, a un flujo de 0.6 ml/min.

Automuestreador

Columna U-Spherogel Carbohydrate, 6.5 mm X 30 cm. Beckman

Temperatura de columna 90°C

Volumen de inyección: 20 µL

Membranas de 0.45 micras

Columnas Sep Pack C-18.

Balanza Analítica Sartorius,

Papel filtro Reeve Angel # 202

Preparación de Estándares

a) Solución de Benzoato de Sodio al 0.1%

Disuelva 0.200g de benzoato de sodio, con agua grado HPLC y afora a 200 mL.

b) Stocks de Azúcares:

Preparar individualmente los azúcares maltosa, glucosa, fructosa y manitol. Pesando 0.5 g de cada azúcar y añadirlo en matraz volumétrico de 25 ml, aforando con solución de benzoato de sodio 0.1 %.

En un matraz volumétrico de 5 ml, colocar 0.1 g de maltotriosa, aforar con benzoato de sodio 0.1 %.

c) Estándar de Azúcares:

Colocar en un matraz volumétrico de 5 ml, 1 ml de agua grado HPLC filtrada.

Añadir al matraz las siguientes cantidades de los azúcares:

Maltotriosa 500 μL , maltosa 350 μL , glucosa 30 μL , fructosa 40 μL , manitol 360 μL .

Aforar con agua grado HPLC.

Procedimiento

Preparación de la muestra.

Mosto:

Filtrar el mosto con papel filtro Reeve Angel (9 cm de diámetro), colocar 0.1 ml del mosto filtrado en un matraz volumétrico de 5 ml, añadir 360 μL de manitol (estándar interno) y aforar con agua HPLC filtrada, pasar la muestra a través de un filtro de 0.45 micras y de un cartucho Sep Pak (C-18).

Guardar el filtrado en viales de 2 mL cerrados y cubierto con papel aluminio.

Inyectar 20 μL de la solución estándar y de la muestra.

Cálculos:

Calcule la relación de alturas de cada azúcar.

Determine el factor de calibración y calcule la concentración de cada azúcar.

B.4 Análisis de Diacetilo

Método para utilizarse en el control del contenido total de dicetonas vecinales libres mas precursores durante fermentación.

REACTIVOS:

a) Clorhidrato de Hidroxilamina 8% (peso/vol.)

Pesar 8.0 g \pm 0.2 mg de Clorhidrato de hidroxilamina Q.P., disolver y aforar a 100 \pm 0.1 ml con agua destilada.

b).- Referencia de diacetilo

Pesar 500 mg. de diacetilo (\pm 0.2 mg), disolver y diluir a 1000 \pm 0.1 ml con agua destilada. Guardar esta solución en frasco ámbar y en refrigerador.

c).- Estándar-1 de diacetilo (curva de calibración)

Diluir 20 ml de solución (b) a 100 \pm 0.1 ml con agua destilada (1 ml. equivale a 0.1 mg). Esta solución debe de prepararse el mismo día que vaya a ser utilizada.

d).- Estándar-2 de diacetilo (concentración)

Tomar 1 \pm 0.1 ml de la solución (b) y diluir a 100 \pm 0.1 ml con agua destilada (1ml equivale a 5 microgramos).

e).- Referencia de dimetilglioxima.

Disolver 0.1348 g \pm 0.2 mg de dimetilglioxima Q.P. en 15 \pm 0.1 ml de metanol y diluir a 1000 \pm 0.1 ml con agua destilada.

f).- Estándar de dimetilglioxima

Diluir 10 \pm 0.1 ml de solución (e) a 100 \pm 0.1 ml con agua destilada (1 ml equivale a 10 mg de diacetilo).

g).- Agente antiespumante (peso/vol.) solución al 7%.

Antiespumante FM 10% de Bayer de México, S.A. ó el antiespumante de Siebel usado en elaboración. Diluir 7.0 g \pm 0.2 mg de reactivo a 100 \pm 0.1 ml con agua destilada.

EQUIPO:

Espectrofotómetro Ultravioleta-Visible.

Tanque de Oxígeno (grado medicinal)

Plancha de calentamiento.

Rotámetro (medidor de flujo) rango 32-380 ml/min ó equivalente.

Matraces de aforación de 10 ± 0.1 ml de capacidad, provistos de tapón esmerilado.

Baño de Temperatura Constante.

Vasos de precipitado de 30 ml de capacidad.

Aparato de volatilización (ver Fig. 1)

Especificaciones de los componentes del aparato:

- 1.- Tubo cónico para centrífuga de policarbonato de 50 ml (Nalgene)
- 2.- Tubo de ensaye de vidrio sin labio de 15 x 125 mm.
- 3.- Tapón de hule negro No. 5 bihoradado, americano.
- 4.- Pipeta volumétrica de vidrio, de 10 ml.
- 5.- Tubo de vidrio pyrex de pared gruesa, 6.5 a 7.5 mm de diámetro, ó pipetas serológicas de 2 ml.
- 6.- Tubería de plástico color claro translúcido PVC "Neutralacid" 6 x 1.5 mm ó equivalente.
- 7.- Unión de polietileno "Nalgene" No. 6160, 65 x 9 mm.
- 8.- Pipeta serológica de vidrio de 1 ml con divisiones de 0.01 ó pipeta volumétrica.
- 9.- Tapón de hule negro sólido americano con dos perforaciones #4.
- 10.- Tubo de ensaye de vidrio sin labio, de 25 x 200 mm.

PROCEDIMIENTO:

1) Eliminar la levadura en suspensión de la cerveza durante fermentación y reposo utilizando papel filtro Reeve Angel 202 de 33 cm de diámetro ó equivalente, la muestra debe mantenerse fría ($15^\circ \pm 5^\circ$ C).

En el caso de cerveza terminada, enfriarla ($5^\circ \pm 1^\circ$ C aprox.) y analizarla, sin descarbonatar.

2) Se agrega 1 ml de solución (g) al tubo de destilación.

3) En una probeta de 100 ± 0.5 ml ó 50 ± 0.5 ml se miden 40 ± 0.5 ml de cerveza fría y se transfieren lentamente al tubo de destilación.

4) Agregar 1 ± 0.1 ml. de solución (a) al tubo colector.

- 5) Ensamble el aparato de volatilización inmediatamente después de colocar la muestra de cerveza en el tubo, e introduzca solamente el tubo de destilación en un baño de agua a $75 \pm 2.5^{\circ}\text{C}$. Situar el rotámetro entre el tanque de oxígeno y el primer aparato de volatilización.
- 6) En el caso de efectuar más de una determinación simultánea conecte los aparatos de acuerdo a la figura 1 y posteriormente ponga la corriente de oxígeno, ajustándolo a un flujo de gas de 150 ± 25 ml/min., mediante el uso del rotámetro, (en algunos rotámetros se alcanza este flujo colocando la canica en posición 10).
- 7) Mantenga estas condiciones por una hora y media.
- 8) Después de este tiempo desconecte primero las mangueras y luego los aparatos siguiendo un orden inverso al que se unieron al iniciar la volatilización.
- 9) Traspase el contenido del tubo colector a un matraz de aforación de 10 ± 0.1 ml (previamente lavado, ver nota 3), y tape inmediatamente.
- 10) Enjuague la pipeta de atrapamiento con 5 ± 1 ml de agua destilada, recogiendo el líquido de lavado en el mismo tubo colector.
- 11) Transfiera el líquido de lavado al matraz de aforación de 10 ml. Importante: Evite el contacto de los dedos con el líquido y con la pipeta de atrapamiento.
- 12) Tape el matraz de aforación y agítelo manual ó mecánicamente por aproximadamente un minuto. Prepare un blanco en un matraz de aforación de 10 ± 0.1 ml, añadiendo 1 ± 0.1 ml de solución (a) con 5 ± 0.5 ml de agua destilada.
- 13) Caliente ambos matraces (el del blanco y el de la muestra) bien tapados por espacio de exactamente 15 ± 0.5 min a $80^{\circ} \pm 2^{\circ}$ C, en un baño de agua.
- 14) Después de atemperar a temperatura ambiente, afore los matraces a la marca con agua destilada y agite manual ó mecánicamente.
- 15) Vierta el contenido del matraz en un vaso de precipitado de 30 ml y evapore hasta un volumen aproximadamente de 4 ± 0.5 ml, la evaporación debe hacerse con una plancha de calentamiento medio, calentando sólo lo suficiente para que la ebullición sea fácil de controlar sin la necesidad de utilizar núcleos de ebullición, es recomendable marcar los vasos de precipitado al nivel de 4 ± 0.5 ml mediante un lápiz de punta de diamante, para obtener una mejor uniformidad.

16) Enfriar a temperatura ambiente y transferir las soluciones a los matraces originales de 10 ml, afore a la marca con agua destilada y agite.

17) Leer la absorbancia de la muestra y del blanco a 228 nm contra agua destilada. A la lectura de absorbancia de la muestra obtenida, reste la absorbancia del blanco y determine el contenido de dicetonas vecinales totales (expresadas como diacetilo), multiplicando dicha absorbancia por el factor de calibración previamente obtenido.

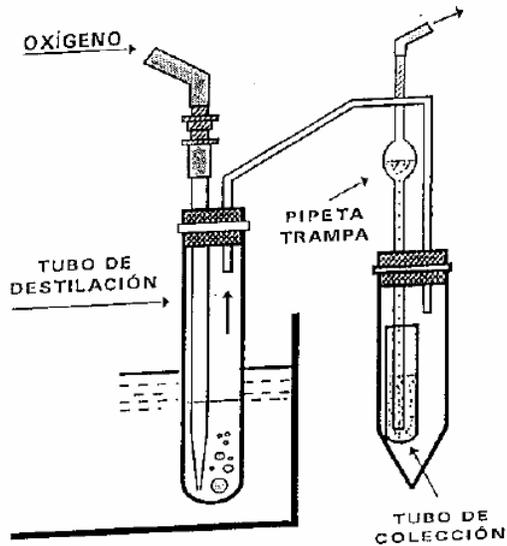


Figura 1. Aparato de Volatilización para determinación de diacetilo.

B.5 Análisis de pH

El método descrito consiste en determinar el pH en un potenciómetro ajustado a 7.00 y 4.00 con soluciones buffer.

REACTIVOS:

- a) Solución “buffer” de biftalato ácido de potasio, pH 4.0 ± 0.02 . Se disuelven $10.211\text{g} \pm 0.2\text{ mg}$ de biftalato ácido de potasio bien seco ($\text{KHC}_8\text{H}_4\text{O}_4$) en agua destilada y se diluye a un litro. Pueden usarse “soluciones buffers” comerciales, tableta “buffer” o cristales, pero la solución debe ser fresca. Ninguna solución “buffer” que tenga moho o sedimentos puede utilizarse.
- b) Solución “buffer” pH 7.0 ± 0.02 .

APARATOS:

- a) Potenciómetro con electrodos de vidrio y de calomel ó electrodo combinado.
- b) Termómetro.
- c) Vasos de precipitado de 100 ml.

PROCEDIMIENTO:

- 1 Se calibra el potenciómetro con la solución “buffer” pH 7.00 y buffer 4.00, haciendo los ajustes para temperatura y potencial asimétrico requeridos para el instrumento que esté en uso.
- 2 Se retiran los electrodos de la solución “buffer” y se enjuagan con agua destilada utilizando un frasco lavador.
- 3 Se sumergen los electrodos en la muestra, después de ajustar el potenciómetro la temperatura de la muestra, se lee su pH.
- 4.- Se enjuagan los electrodos con agua destilada. Esto se hace cada vez que se efectúe una medición.
- 5.- Cuando el número de muestras es grande, se debe calibrar el potenciómetro contra la solución “buffer” de vez en cuando mientras se determina el pH de dichas muestras.
- 6.- Deje los electrodos sumergidos en buffer 4.

B.6 Determinación de alcohol, extracto aparente y extracto original por medio del analizador de cerveza Anton Paar.

El principio de medición del equipo esta basado en la velocidad del sonido para el caso del análisis del alcohol y en la frecuencia producida por un oscilador hueco para el análisis de densidad, los extractos, real, aparente y original se obtienen por medio de un procesador interno en el que se realizan cálculos, considerando los valores de alcohol y densidad.

EQUIPO Y MATERIAL

Analizador de cerveza Anton Paar

Automuestreador SP - 1.

Viales

Matraces erlenmeyer de 500 ml, 250 ml y 125 ml.

Embudos de filtración

Descarbonatador Anton Paar (# catalogo 77778)

Papel filtro Whatman # 2, #4 y # 5,

Papel filtro Reeve Angel # 202

Papel filtro de filtración media

Papel aluminio

Alcohol etílico absoluto grado reactivo analítico al 96 %

Agua Destilada

Trace Kleen ó Extran Neutro

PROCEDIMIENTO

Preparación de la muestra:

Vaciar en matraz erlemeyer de 500 ml y agitar vigorosamente manteniendo la muestra a una temperatura menor de 20° C. Otra forma de descarbonatación es usando un descarbonatador Anton Paar (#catalogo 77778), para lo cual se utiliza el siguiente procedimiento:

1.- Colocar 200 ml de cerveza fría (8°-12°) en el matraz kitasato conteniendo un agitador magnético, tapar con el tapón de hule, conectar la manguera al frasco lavador de gases el cual contiene 3 ml de solución antiespumante, este frasco va conectado a la bomba de vacío por medio de una manguera, accione el interruptor y automáticamente se agitará la muestra por espacio de 2.5 minutos, al término del tiempo, desconecte la manguera del matraz kitasato, filtre la cerveza en el vial para el automuestreador del analizador o en un vaso, a través de papel filtro Whatman # 4, la muestra queda lista para ser leída en el analizador. Tener cuidado en vaciar la cerveza del frasco lavador de gases, cuando llegue a la mitad del frasco ya que se puede pasar cerveza a la bomba de vacío. Cuidar que la temperatura de la muestra no se incremente a más de 20°C.

Calibración del analizador de cerveza.

La calibración se realiza de la siguiente manera y cada semana:

Una vez encendido el equipo y estabilizada la pantalla digital, verificar que la celda este limpia y seca, la calibración se realiza con aire y agua:

Calibración con aire:

Verificar que la lectura de la pantalla digital g/cm³ este en cero y la temperatura en 20°C.

Enseguida teclee la clave F100 y presione ENTER

Una vez realizado el paso anterior aparecerá en la pantalla el número 0.001204, el cual es la densidad del aire a 20° C

Oprima la tecla cero del tablero y presione ENTER

Espere que la lectura de cero.

Calibración con agua:

Coloque un vial con agua destilada dentro del compartimiento del carrusel.

Presione START y espere a que el agua sea absorbida, por la aguja de absorción.

Espere a que la pantalla digital se estabilice en 1.00000

Teclee la clave F101 y presione ENTER, aparecerá en la pantalla el número 0.998204, el cual es la densidad del agua a 20° C.

Oprima la tecla con el número 1 y presione ENTER.

Espere a que la lectura se estabilice, volver a presionar ENTER, para continuar con las mediciones.

Llene el formato adjunto con las constantes de calibración, A.B., además de imprimir la calibración y guardarla por lo menos durante un año.

Las constantes v y d, velocidad del sonido y densidad, respectivamente deben dar con agua bidestilada un valor 0.0001, si esto no se diera lavar las celdas.

Antes de cada determinación verificar la densidad del agua la cual debe estar 0.00004 y las constantes de velocidad del sonido y de la densidad en 0.0001.

Funcionamiento del analizador de cerveza.

Oprimir F 361, ENTER

Teclear el factor de corrección correspondiente a la muestra a analizar, ENTER

Colocar en el carrusel el vial con la muestra y oprimir START

Nota: Cerciórese que la celda no haya absorbido burbujas de aire y que en la impresora estén prendidas las funciones Power y Sel. En caso de tener burbujas la celda, oprimir STOP y reiniciar.

Esperar a que el analizador de cerveza indique que la muestra ha sido procesada y los resultados queden impresos.

Los resultados del análisis son los siguientes:

Date Fecha (año - mes - día)

Time Tiempo (hora - minuto - segundo)

Temp Temperatura (°C)

Density Densidad

v número de velocidad del sonido

d número de densidad

% A w/w Alcohol, porciento en peso

% E real Extracto Real, porciento en peso

% A v/v Alcohol, porciento en volumen

% E orig Extracto Original, porciento en peso

% E app Extracto aparente, porciento en peso

Limpieza:

Al terminar de usar el analizador de cerveza continuar con el siguiente procedimiento de limpieza:

1. Llenar tres viales con agua bidestilada y un vial con extran neutro al 10 %, 3 viales con agua bidestilada y un vial con alcohol etílico, colocarlos en el carrusel, oprimir START.
2. Esperar a que se haya absorbido el contenido del vial, oprimir STOP
3. Volver a hacer el mismo procedimiento para todos los viales
4. Mover la palanca de la bomba hacia el lado derecho.
5. Colocar la manguera de silicón de la salida de aire, dentro de la aguja de absorción.
6. Encender la bomba de aire, esperar hasta que la pantalla de la lectura de 0.0000. (aprox. 10 minutos)
7. Apagar la bomba de aire
8. Colocar la palanca en posición central
9. Apagar el analizador de cerveza.

Nota: En el caso de que el aparato presente problemas para ser calibrado, que no de él 0.0000, realizar lo siguiente:

- a). Colocar en el carrusel, 2 viales con Trace Klean ó extran neutro al 10 % , tres viales con agua bidestilada y un vial con alcohol etílico, oprimir la tecla START, cuando haya terminado de introducirse la muestra, oprimir STOP, repetir esta operación para cada vial.
- d). Continuar con los puntos 4 al 8.

B.7 Determinación de la Floculación por el método de Helms

REACTIVOS.

a) Solución de CaSO_4 .- Disolver 0.645 g de sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) en 1 litro de agua destilada. b) Solución Buffer.- Disolver 0.645 g de sulfato de calcio ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$); 6.8 g de acetato de sodio ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$); 4.05 ml ácido acético. Aforar a 1000 ml con agua destilada, el pH final de la solución es de 4.5.

APARATOS.

- a) Pipetas serológicas de 1,5 y 10 ml.
- b) Tubos para centrifuga de 15 ml.
- c) Centrifuga.

TÉCNICA.

Para realizar esta determinación no se requieren condiciones estériles. A una muestra de 7 ml de levadura, adicionar 7 ml de solución CaSO_4 , centrifugar por 5 minutos a 3,000 +/- 100 rpm., decantar, resuspender la levadura precipitada en solución de sulfato de calcio y aforar a 15 ml. Centrifugar nuevamente 5 minutos a 3,000 +/- 100 rpm. y decantar. Pesar 1 g de levadura lavada en un tubo de centrifuga de 15 ml, adicionar 10 ml de solución buffer y agitar fuertemente. La suspensión se deja en reposo a 5 +/- 1°C en un baño de agua aproximadamente 20 minutos, al término de este tiempo se hace una lectura preliminar del volumen de levadura floculada. Agitar fuertemente una vez más y dejar en reposo la suspensión aproximadamente 10 minutos a 5 +/- 1°C en baño maría. Al cabo de este tiempo se hace la lectura final del volumen de levadura floculada. Clasifique la levadura usando este último valor de acuerdo a la tabla siguiente:

CLASIFICACIÓN DE LEVADURA POR FLOCULACIÓN:

| <u>ml de levadura floculada</u> | <u>Clasificación</u> |
|---------------------------------|-------------------------|
| 0 - 0.5 ml | Levadura no floculante |
| 0.5 - 1.5 ml | Levadura semifloculante |
| arriba de 1.5 ml | Levadura floculante |

NOTA:

Esta determinación deberá efectuarse en muestras por duplicado.

**APENDICE C. Secuencias Nucleotídicas de Fragmentos Amplificados de los genes
FLO y *ACT1*.**

FLO11 FW

tacacttagcacaccctggttacacagctgtcacaaccaccggttggttaccactgaatcc
tctacgggtactaactccgctggtaagacgacaactggttacacaacaaagtctgtacc
aaccacctatgtaaccactttggctccaagtgcaccagtaactcctgccactaatgcc
taccaactacaataaccactactgaatggtctgctgctacaaacgctgccggtgaaact
acatctgtatgctctgctaagactatcgtaagttctgcaagcgcaggcgaaaacaccac
ccctgtcacgatagctattccaaccacagttggttaccactgagtcactctgttggtacta
actccgctggcgaaacaacaactgggttacacaaccaagtccatccaaccacttacata
accactttgatccaggttcaaattgggtgccaagaatacgaactgtggccacagcaacc
accctatttcaatcaagactacatcccacaactacaacagcttctgcttctacatggct
cccgttgactctccttctctactggctactacatctgctctggtctgcagcgcacata
ctctgttcttctatctcagtaacttaccagagctgctatatcaggttcttgaaacttagg
gtgctactcgtctccgtgatctaa

FLO11 RV

acaaggaaaactatcaaagaaccttgatattagcagcaccttggttaagtactcgagata
gaaggaacagagtagtagtgactggggaaccacaaacagattgtagtgaccaccaga
gatggcgatggggcaacgggagccctgttgtaagcataacctggttgaaaaagggtggg
agtaggcctgaatgtaaaaaagtgggggtggtggtggccacccccctctttattttggtca
ccctttatctggcatccatactggcccgaattgggtggggaaggggaatggaccaggca
caaaccggtcgtatgattgggtgagtggttccctctccaggaacttagggccacaccgc
cgtgcgaatataccttattttattgggggggggtggttcccctgccttttaaaaaataa
aaattttttaataattataaaaaataaacactaccaaggggggttttttatttataaaa
aaataaagtttggtggttctccaaaggtt

Lg-FLO1 FW

ttctattgattagacactaaaaaaaaatgacaattgacacaccactgcatatttttggtaa
tcttggcctttctggagctacttaacgtagcatcaggaagtacacaagcatgcctgcc
gtgggctcgaggaaaaatgggatgaatgtcaacttttataaatactcattacaggattc
aacaacgtattccgaccgcaatatatggcctataaatactccgatacaagaagttag
gttccggttagcggacagaccatctctccataactattggccc

Lg-FLO1 RV

cccgcaacggaacaacttcttagtatcggagtatattataggccatatattgcgggtcgg
aatacgttggtgaatcctgtaatgagtatattataaaagttgacattcatcccattttc
ctcgagcccactggcaggcatgcttgtgtacttctgatgctacgttaagtagctccag
aaaggccaagattacaaaaatatgcagtgggtgtgcaattgtcatttttttagtggtg
ctaatcaatttaagaaaatcatttgcggaattaccctgcagaacagaatctgcaatat
gctatgcccgggttcaaggtgaaaaattgacaattgacacaccaccgcatatttggtgggaa
tcttggcctttctggagcttctttagttacagcagaatacacagcatggctgcaatggc
ccagcaaaaaattataattcactttaaatccgggtagagatcacacctgtccacctcag

ataggccatagtctccatcaaacttggctccttgcgaccaaccatctcctgtcatgcc
cagta

ACT1 FW

attactgatcatgaaccctaaatcaaacagagaaaagatgactcaaattatgtttga
aacttttaacggtccagccttctacggttccatccaagccggtttgtccttgtactctt
ccggtagaactactgggtattgttttggattccggtgatgggtgtactcacgtcgttcca
atftacgctgggtttctctctacctcacgccatfttgagaatcgatttggccggtagaga
tttgactgactacttgatgaagatcttgagtgaacgtggttactctttctccaccactg
ctgaaagagaaaatfttcggtgaaatcaaggaaaaactatggtacgtcgccttggacttc
gaacaagaaatgcaaaccgctgctcaatcttctcaattgaaaaatcctacgaactftc
agatgggtccagtcactactattggtaacggaaagattcagagccccagaagctfttgtt
ccatcccttctgttttgggtttgggaatctgcccgtattgaccaaactacttacactcc
atcatgaagtgtgatgggtcagccccaaaggaggaccttactcacattcagaaggaaftt
ttaatagtggtcaaacgggaatccaacccaacaaagggtggacaaagtctgggggtgaact
ctcttcatatgagactggcactgaagtctagaatftcattgaagataagcgggttgcct
ctgtcgatcagggctacagfttctgatacgacaatfttcaatgggaaagagaacgtc
cgatctacaggccatctcgcgagaatcaatgggggagaaccgatgggactgtacttcca
tttataccccagttcggatfttagggagcagttgtaccacggaaaaaaatftcaacatt
ccctc

ACT1 RV

taagtagttgtagtagtttgggtcataccgggcagattccaacccaaaacagaaggatgg
aaciaagcttctggggctctgaatcttctcgttaccaatagtgatgacttgaccatctgg
aagttcgtaggatfttcaattgaagaagattgagcagcgggttgcatttcttgttcca
agttcaaggcgacgtaacatagttfttcttgatgtcacggacaatfttctcttccagca
gtgggtggagaaagagtaaccacgttcaactcaagatcttcatcaagtagtcagtcaaatc
tctaccggccaaatcgatttctcaaaatggcgtgaggttagagagaaaccagcgtaaattg
gaacgacgtgagtaacaccatcacccgaatccaaaacaataccagtagttctaccggaa
gagtacaaggacaaaacggcttggatggaaacgtaaaaggctggaaacttaaaagttc
aaacataatfttgagtcactfttctctgtttgatfttagggttcattggagcttcaagtca
aaagaacaggggtgttcttctggggcaaacftcaaaaaaaaaataaatcaaacggggaaa
gggtggcttcaattatgggttggaaaatfttacggctccgccctcaagtttcttccgagggc
ggtttgcgttgtaccatccgggtgaccactgggttagtttgggttccgggggtgggtgtga
atftcgttgacaaatftaacgggtfttctfttctcgggaatctgggactgactagcggggc
tgatftgacgaccttctgtgagacggggggaagtggatcccttctccaacttgatgaagg
gaatgtcgtgcctcaaggaatftcaatatgctgcgtcgcgtggactaccacagaatgaaacgt
ggtaacttctgaatgaaaaataagaatftcgtagatgcagcaacgggttgagaactaagg
cggagtagatcacatagtagtttactatgattagtagtgagtcacaacacgggggttcc
taggcttcaa

FLO1 RV

gatgtgagcagtcgacgtgatgggaggttgttcttgtgcacaacatftcgaacgcaatgc
taccaccaaccgataaaaatftgcggaatcatctactgttgcaaaagaaaacgtgtaagaa
cctgtctgtgggtggtaaaaagtaacctgtcatttctaagggtgatgttftgtgggggtgg
ataaaaagccaaacagatctgtactccagatgaaacggcttactgttggagcatctcc
ccttacctctgcatccccaatftaccatagcatcttcttgagggcactgatatgtccct

gaggttgtaacacaaggaagattatagttgatagatatatccgtttgcccactaacaga
gccaatttgactttgtctgcatattggtaagccatatatgctgcattagaatacgtgg
aggaatccttcaatgattactggtaaaaaatttatattcatcccacttttcctctggcct
gctggcaagcacgcctctgtggctcctgaggccacattaattagtgccagaagtgtaaa
gactgccaaaaacatatagtgatgaggcttgttataaggaat

FLO5 FW

tgatctcggcctttctggagctacttaacgtagcatcaggaagtatggaagcatgcctg
ccagatggcgaaaaaaaaaacggaatgaacatcaacttttatcaatatacactaatgga
ttcatctacatatattcaaacgcccgcataatggcgtatcaatatgccaacgaagccaagt
tgggttcggttggtaggacagaccacaatttcaatcaattatgatataccatgtgttagt
gatttcggcactttttcctgtcctcaagaagattcttctgatgaatgggggtttcatgtg
taacaatgagttttgctccaatagccaggcaagcgcttactggagttcaaacctatttg
gcttctataccactccaacaaacgtaaccctaaaaatggaacaggaa

FLO5 RV

gtgcatctgagccaataggtctgaactccagtaagcgcttgctggctattggagcaa
aactcattgttacacatgaaacccattcatcagaagaatccttctgaggacaggaaaa
agtgccgaaatcactaacacatggtatatcataattgattgaaattgtggctgtccac
caacggaacccaacttggcttcgcttcgcatattgatagccatatatgcggcgctttgaa
tatgtagatgaatccattagtgatattgataaaaagttgatgttcattccgcttttttt
ttcgccatctggcaggcatgcttcatacttctctgatgctacgtaagtagctccagaa
aggccaaaattaccaaaaatgacagtggtgacagtggtggcaaaaattgtcaattgctat
ggctccaacccccgaggcaatccacccccaccctcacttaggggggtgaggggggaaaaaa
aacccccccc

FLO8 FW

tacagaggggatatagtaacgaggacatagaccccatgcacttggctgctatgatgcta
ggaaatcctatggcacctgcggttcaaattgcgcaatgttaatatgaaccctataccaat
tcctatgggttggtaaccctatcgtaataatttttccattccaccatacaataatgcaa
acccccacgagtggtgcaactgctggtgctcccacagcgccgcttccggcgatttta
caaatgtagggccaaccagaatcggagtcaaaacggttactggctggccagctctataat
tatccaatgcaaccactacggaaaatccagtgggaaacccggtgtaacaataataccac
aaataatacaactaataacaaatctccagtgaaaccaacctaagtttaaaaactatgc
attcaaagataaaccaataatgtcccagcgtcaaaatctacaagaagtagatctgcaa
cctcaaaagcgaaggtaaagtaaagccggtctagtggctaaaagacaaaaaaaaataat
accgcacagtttcccggatcgacaacgctgtccaatattaccacaccggtcgactat
gaccg

FLO8 RV

cctagggactgcggttgttgcccaggtttttcgtgatctctgggttagtgaggtggatgc
cttttttgtatttttccttacctttgtgggctgtttagaaactaaagcggagggtgatg
ctccatccaacgatgggctagatttggaaattagaataaataatcttcctcgccaaatatt
attgcttgattgcggaagttagtagcaatatctgatcttggagcttatttactcttga
acctaccatagcgggttcacttgttgttgagcctgggtgtggtaataatttggcgaaccag
cgttcgtcgatcccgcggaaactgtagcggatatttttttctcgtctcttagccact
agaccggctttaactttacccttcgcttttgaggttgagatctacttctttagatatt

tgacgtcgggacattatTTGGTTTatctgTTgaaTgcataGTTTTaaactTTtaggt
ggTtCactggagattTgTtattagTtGtattatTtGtggTattattGttacacgggTt
ccactggattTTccgtagTgggTtgcattggataatatagactggcagccagaacgTt
tgactccgatctgggTggccactTTgtaaatccccgaaggcgctgtggaacaacac
attgcccacctgggTtTgcttatgatggggaaggaaattataacgaaggTcacctaga
atggataggTcatacatccattgaccagggcaagatccacactcccagcagggcagcc
gtcattcccctctaaacggccactTaaaggccc

FLO9 FW

agtccgTtgatgctatTTTtaccagTtTcattagTggTtcttccacgTattccaatgca
gcataataggcttaccaatatgcagacaaagTcaaattgggctctgTtagcgggcaaac
ggatatactatcaactataatcttccTtGtGttacaacctcagggacatatcagTgcc
ctcaagaagatgcataatgataatgggagatgcagaggTaaaggggagatgctccaacagT
caagccgTtTcatactggagTcacagatctatTtggctTTtataccactccaacaaagT
aacctagaaaagggacaggaAAA

FLO9 RV

gtttatataagccaacagatctgtactccagTatgaaactggcttgactgtTggagcat
ctccccttacctctgcactcTcaattatcatatgcactcttcttgagggcactgatatgt
ccctgaagTtgtaacacaaggaagattatagTtgatagatataccgTtTgcccgctaa
cagagcccaatttgactTtGtctgcataatggTaaagccatataTgctgcattggaatac
gtggaagaatccattaatgaatactggTaaaaatttacattcataccattcttccTtga
gtTtGctggcgggaatgccgaaaaaactTggggagaaagggatagTtagTtaattTTta
ccagTattcattaatgagattcttccacgTattccaatgcagcagatatacttccaat
atgcatacaaagTtaatggagctctgTtagagggcaacggagTgTgTtaactatcact
tccaggtgtTcaactcagggaaatcatgcctcagaagatgcaaataaaatggagatca
agTtaggggggggagctcacctcaaccttccactgaatacagatattTtggctTTaatccc
cccaccactaaacgggaattaaaggaa

FLO10 FW

aggatgatgattcgagTtTtatcagTcggaggTgatgTcgcattTgaaTgTtGtgcaca
agaacaacctcccatcacttcaactgactTtacaatcaatggTatcaaaccatgggTtG
gaagTtTgcctcctaacatcgaagggtcagTctacatgTatgctaattactactatcct
atgaaagTtGtTtactcaaatgctgTtTctTggggTcacttccTgTtagTgggTattg
ccaacactaatactggTgtcccGagaaacagcggTgagTaaacgactTtcaaaggaga
gtagTaatTgcaacatgtagacgaccttcatTTtggaaGaaacgTccacccatggTt
tgataccttgattgTaaatcgtTgaaTgataggggTtGtTtctTtgcacacatcattt
TtcttcccgcctccaccataaaactctgatcatcccctTtGcaagccgaattgtaggtg
ccagTtTa

FLO10 RV

tatgaacgctTtGagTaaacactTtctaggatagTtagTaaTtagcatacatgtagactg
acccttccgatgTtaggaggcaaacttccacccatggTtTgataccatTgattgTaaag
TcagTtGaaTgatgggaggtTgttctTgtgcacaacattcaaTgCgacatcacctcc
gactgataaaaactgctgaaTcatccaccgTtGcaaagccaaatgTgTtaggtaccagTta
aaaacaggtacaccaattgTaaaccaGaaatagcaattgagTaaatactTTtatagga
tagtagTaaTtagTaaagTgtcatcagaccttccgatgTtaggaggaaacttccacccc

ttgtttgataccattgattgtatatcagttgacgtgatgggaggggtcttgtcacaca
atcttttttacgtcgtcccacgataaaaactcttaatcgtcccggtttgcgagccga
atatgtaggtccagtttaagc

LITERATURA CITADA

1. Alfred Jorgensen Laboratory. 2002. Yeast Catalogue. AJL Ltd. pp: 1-10.
2. American Society of Brewing Chemists. 1999. *Methods of Analysis*. 8th ed. The Society, St. Paul, MN.
3. Andrulis E D., D. C. Zappulla, A. Ansari, S. Perrod, C. V. Laiosa, M. R. Gartenberg, y R. Sternglanz. 2002. Esc1, a Nuclear Periphery Protein Required for Sir4-Based Plasmid Anchoring and Partitioning. *Molecular and Cellular Biology*. 22: 8292–8301.
4. Aparicio O. M., B.L. Billington y D.E. Gottschling. 1991. Modifiers of position effect are shared between telomeric and silent mating-type loci in *S. cerevisiae*. *Cell* 66:1279-87
5. Bardwell L. 2005. A walk-through of the yeast mating pheromone response pathway. *Peptides* 26:339-50
6. Bidard, F., B. Blondin, S. Dequin, F. Vezinhet, y P. Barre. 1994. Cloning and analysis of a *FLO5* flocculation gene from *S. cerevisiae*. *Curr. Genet.* 25:196–201.
7. Bony M., D. Thines-Sempoux, P. Barre, B. Blondin. 1997 Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flo1p. *J. Bacteriol.* 179: 4929–4936.
8. Bony M., P. Barre, B. Blondin. 1998. Distribution of the flocculation protein, Flop, at the cell surface during yeast growth: the availability of flop determines the flocculation level. *Yeast*, 14: 25–35.

9. Booher R.N., R.J. Deshaies y M.W. Kirschner. 1993. Properties of *Saccharomyces cerevisiae* Wee1 and its differential regulation of p34CDC28 in response to G1 and G2 cyclins. *EMBO J* 12: 3417-26
10. Carrico P.M. y R. S. Zitomer. 1998. Mutational Analysis of the Tup1 General Repressor of Yeast. *Genetics* 148:637–644.
11. Casaregola S., H.V. Nguyen, G. Lapathitis, A. Kotyk, C. Gaillardin. 2001. Analysis of the constitution of the beer yeast genome by PCR, sequencing and subtelomeric sequence hybridization. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 51: 1607-1618.
12. Causton H.C., B. Ren, S.S. Koh, C.T. Harbison, E. Kanin, E.G. Jennings, T.I. Lee, H.L. True, E.S. Lander, y R.A. Young. 2001. Remodeling of Yeast Genome Expression in Response to Environmental Changes. *Molecular Biology of the Cell.* 12: 323–337.
13. Cheng A., K. E. Ross, P. Kaldis y M.J. Solomon. 1999. Dephosphorylation of cyclin-dependent kinases by type 2C protein phosphatases. *Genes & Dev.* 13: 2946-2957
14. Davy S.C., G. Hulse y K.A. Smart. 2006. On the mechanism of NEWFLO flocculation in lager brewing yeast. *EBC 2006 Proceedings.* No 60.
15. Dengis P.B., L.R. NeLissen, P.G. Rouxhet. 1995. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top-and bottom-fermenting strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 718–728.
16. DeRisi J.L., V. R. Iyer y P. O. Brown. 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278: 680-686

17. Douglas L.M., L. Li, Y. Yang, A.M. Dranginis. 2007. Expression and Characterization of the Flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* Mannoprotein with Homotypic Properties of Adhesion. *Euk. Cell*, 6: 2214-2221.
18. Dranginis A.M., J.M. Rauceo, J.E. Coronado y P.N. Lipke. 2007. A biochemical guide to yeast adhesins: glycoproteins for social and antisocial occasions. *Microbiol. Molec. Rev.* 71: 282–294.
19. Dytham C. 1999. Choosing and using statistics: a Biologist's guide. Blackwell-Science Ltd. York, U.K., pp. 27-59.
20. Fleming A.B., S. Pennings. 2001. Antagonistic remodeling by Swi-Snf and Tup-Ssn of an extensive chromatin region forms the background for *FLO1* gene regulation. *EMBO J.* 20: 5219-5231.
21. Fujita A., N. Fukui, H. Kondo y Y. Kawasaki. 2002. Relationship between the flavor compounds formation and the gene expression profiles of brewing yeast. *ASBC Annual Meeting Proceedings*.
22. Gagiano M., D. Van Dyk, F. F. Bauer, M. G. Lambrechts e I. S. Pretorius. 1999. Divergent regulation of the evolutionarily closely related promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* *STA2* and *MUC1* genes. *J. Bacteriol.* 181:6497–6508
23. Gasch A.P., P. T. Spellman, C. M. Kao, O. Carmel-Harel, M. B. Eisen, G. Storz, D. Botstein y O. P Brown. 2000. Genomic expression programs in the response of yeast cells to environmental changes. *Mol. Biol. Cel.* 11: 4241–4257.
24. Global Gene Hunter. 2006. *Web Primer* [internet] Stanford University. Disponible en el sitio red: <http://db.yeastgenome.org/cgi-bin/geneHunter> [Revisado el 20 de agosto del 2006].

25. Goffeau A., B. G. Barrell, H. Bussey, R. W. Davis, B. Dujon, H. Feldmann, F. Galibert, J. D. Hoheisel, C. Jacq, M. Johnston, E. J. Louis, H. W. Mewes, Y. Murakami, P. Philippsen, H. Tettelin, y S. G. Oliver. 1996. Life with 6000 genes. *Science* 274: 546-567
26. Goldstein I.J., R.C. Hughes, M. Monsigny, T. Osawa, N. Sharon. 1980. What should be called a lectin? *Nature*, 285: 66.
27. Gómez Mayén A. P., G. Corral Guillé, L. Riego Ruiz y G. Coello Coutiño. 2006. The GenArise Package. Instituto de Fisiología Celular UNAM. Mexico DF. pp. 1-27
28. Gracia González G. 2008. Distribución y expresión de los genes estructurales de floculación (*FLO*), así como la funcionalidad de las floculinas en diferentes cepas cervceras de *Saccharomyces cerevisiae*. Tesis de maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León.
29. Griffin T.J., S. P. Gygi, T. Ideker, B. Rist, J. Eng, L. Hood y R. Aebersold. 2002. Complementary profiling of gene expression at the transcriptome and proteome levels in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cel. Prot.* 1:323-333
30. Guo B., C.A. Styles, Q. Feng, G.R. Fink. 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell– cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97: 12158–12163.
31. Hagen I., M. Ecker, A. Lagorce, J.M Francois, S. Sestak, R. Rachel, G. Grossmann, N.C. Hauser, J.D. Hoheisel, W. Tanner, S. Strahl. 2004. Sed1p and Srl1p are required to compensate for cell wall instability in *Saccharomyces cerevisiae* mutants defective in multiple GPI-anchored mannoproteins. *Mol Microbiol* 52:1413-25

32. Halme A., S. Bumgarner, C. Tyles, G.R. Fink. 2004. Genetic and Epigenetic regulation of the *FLO* gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell*, 116: 405-415.
33. Hardwick W.A. 1995. Handbook of Brewing. Marcel Dekker Inc. N.Y. USA
34. Heggart H.M., A. Margaritis, H. Pikington, R.J. Stewart, T.M. Dowhanick e I. Russell. 1999. Factors affecting yeast viability and vitality characteristics: a review. *MBAA Tec. Quart.* 36:383-406
35. Henegariu O., N.A. Heerema, S.R. Dlouhy, G.H. Vance, P.H. Vogt. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23: 504-511.
36. Higgins V.J., A. D. Oliver, R. E. Day, I. W. Dawes y P. J. Rogers. 2001. Application of genome-wide transcriptional analysis to identify genetic markers useful in industrial fermentations. *EBC Proc. 2001*
37. Hough S. J, E.D. Briggs, R. Stevens, W.T. Yuong. 1982. Malting and Brewing Science: Volume II Hopped Wort and Beer, P. 527 – 565, Second Edition, Chapman & Hall, USA.
38. Hough, J. S. Biotecnología de la Cerveza y de la Malta. Editorial Acribia, S. A. Zaragoza, España, 1990.
39. James T.C., S. Campbell, D. Donnelly y U. Bond. 2003. Transcription profile of brewery yeast under fermentation conditions. *J. Appl. Microbiol.* 94:432–448.
40. Jenkins C.L., A.I. Kennedy, J.A. Hodgson, P. Thurston y K.A. Smart. 2003. Impact of Serial Repitching on Lager Brewing Yeast Quality. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61: 1-9.

41. Jibiki M., T. Ishibiki, T. Yuuki y N. Kagami. 2001. Application of polymerase chain reaction to determine flocculation properties of brewer's lager yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59:107-110.
42. Jin Y-L. y R.A. Speers.1999. Flocculation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Food Res. Int.*, 31: 421-440.
43. Jin Y. y R. A. Speers. 2000. Effect of environmental conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 58:108-116
44. Kim T.S., S. B. Lee y H. S. Kang. 2004. Glucose repression of *STAI* expression is mediated by the Nrg1 and Sfl1 repressors and the Srb8-11 complex. *Mol. Cel. Biol.* 24:7695–7706.
45. Kim T.S., H. Y. Kim, J. H. Yoon, y H. S. Kang. 2004. Recruitment of the Swi/Snf complex by Ste12-Tec1 promotes Flo8-Mss11-mediated activation of *STAI* expression. *Mol. Cel. Biol.* 24:9542–9556
46. Klimovitz R. 2002. El cervecero en la práctica. Asociación de Maestros Cerveceros de las Americas. USA.
47. Kobayashi O., N. Hayashi, R. Kuroki, H. Sone. 1998. Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. *J. Bacteriol.* 180: 6503–6510.
48. Kondo H., H. Yomo, T. Takatani, T. Izumi, H. Hatanaka, A. Fujita y N. Fukui. 2003. Gene expression analysis of brewing yeasts during beer fermentations using DNA microarray. *EBC Proc.* 2003.

49. Lambrechts M.G., F. F. Bauer, J. Marmurt, e I. S. Pretorius. 1996. Mucl, a mucin-like protein that is regulated by Mss10, is critical for pseudohyphal differentiation in yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 8419-8424.
50. Lee, J., C. Godon, G. Lagniel, D. Spector, J. Garin, J. Labarre, y M. Toledano. 1999. Yap1 and Skn7 control two specialized oxidative stress response regulons in yeast. *J. Biol. Chem.* 274: 16040-16046
51. Levin D.E., B. Bowers, C.Y. Chen, Y. Kamada y M. Watanabe. 1994. Dissecting the protein kinase C/MAP kinase signalling pathway of *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Biol Res* 40:229-39
52. Linde J.J., H. Liang, R.W. Davis, H.Y. Steensma, J.P. Dijken y J.T. Pronk. 1999. Genome-wide transcriptional analysis of aerobic and anaerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Bacteriol.* 181:7409-7413.
53. Liu H., C. A. Styles y G. R. Fink. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FL08*, a gene required for filamentous growth. *Genetics* 144:967-978
54. Lo W. y A.M. Dranginis. 1996. *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J. Bacteriol.* 178:7144–7151.
55. Lodder J. y N.J.W. Kreger-Van Rij. 1967. The yeast: a taxonomic study. North Holland Publishing Company. Amsterdam. The Netherlands
56. Lodder A.L., T. K. Lee y R. Ballester. 1999. Characterization of the Wsc1 Protein, a Putative Receptor in the Stress Response of *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 152: 1487–1499

57. Majara M., E. S. C. O'Connor-Cox, y B. C. Axccl. 1996. Trehalose—an osmoprotectant and stress indicator compound in high and very high gravity brewing. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54:149-154
58. Mendenhall M.D., y A.E. Hodge. 1998. Regulation of Cdc28 Cyclin-Dependent Protein Kinase Activity during the Cell Cycle of the Yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.* 62: 1191–1243.
59. NCBI 2006. *BLAST* [internet]. Disponible en el sitio red: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/> [Revisado el 20 de Agosto del 2006].
60. Nishihara H., K. Miyake y Y. Kageyama. 2002. Distinctly different characteristics of flocculation in yeast. *J. Inst. Brew.* 108: 187–192.
61. Ogata T., M. Izumikawa, M. Miyoshi-Shikata, H. Tadami y Y. Kitagawa. 2008. Nitrogen source starvation induces expression of Lg-*FLO1* and flocculation of bottom-fermenting yeast. Proceedings of the World Brewing Congress 2008.
62. Olesen K., T. Felding, C. Gjermansen y J. Hansen. 2002. The dynamics of the *Saccharomyces carlsbergensis* brewing yeast transcriptome during production-scale lager beer fermentation. *FEMS Yeast Res.* 2:563-573
63. Patelakis S.J., L.L. Ritcey y R.A. Speers. 1998. Density of lectinlike receptors in the *FLO1* phenotype of *Saccharomyces cerevisiae*. *Lett. Appl. Microbiol.* 26: 279-282.
64. Peng X., P. Bower, M. Barney, A. Navarro, J. R. Seabrooks y D. S. Ryder. 2003. Patterns of yeast gene expression during fermentation and in response to stress. *EBC Proc.* 2003.

65. Piskur J. y B. Langkjaer. 2004. Yeast genome sequencing: the power of comparative genomics. *Mol. Microbiol.* 53:381-389.
66. Powell C. D. 2000. Replicative ageing and senescence in *Saccharomyces cerevisiae* and the impact on brewing fermentation. *Microbiology* 146: 1023 – 1034
67. Powell C.D., D. E. Quain y K. A. Smart. 2003. The impact of brewing yeast cell age on fermentation performance, attenuation and flocculation. *FEMS Yeast Res.* 3:149-157.
68. Powell C.D., D. E. Quain y K. A. Smart. 2004. The impact of sedimentation on cone yeast heterogeneity. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 62:8-17.
69. Pratt-Marshall P.L., S.E. Brey, S.D. de Costa, J.H. Bryce y G.G. Stewart. 2002. High gravity brewing – an inducer of yeast stress. *Brewer' Guardian*. Marzo 2002, pp: 22-26.
70. Priest F.G. e I. Campbell. 1987. *Brewing Microbiology*. Elsevier Applied Science Publishers Ltd. Great Britain, Cambridge, pp 39-44.
71. Rep M., V. Reiser, U. Gartner, J. M. Thevelein, S. Hohmann, G. Ammerer, y H. Ruis. 1999. Osmotic Stress-Induced Gene Expression in *Saccharomyces cerevisiae* Requires Msn1p and the Novel Nuclear Factor Hot1p. *Molecular and Cellular Biology.* 19: 5474–5485.
72. Rhymes M.R. y K.A. Smart. 1996. Effect of starvation on the flocculation of ale and lager brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54:50-56

73. Ruiz A., I. Muñoz, R. Serrano, A. González, E. Simón, y J. Ariño. 2004. Functional Characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* VHS3 Gene. A Regulatory Subunit of the Ppz1 Protein Phosphatase with Novel, Phosphatase-Unrelated Functions. *The Journal of Biological Chemistry*. 279: 34421–34430, 2004
74. Rupp S., E. Summers, H. J. Lo, H. Madhani y G. F. Madhani. 1999. MAP kinase and cAMP filamentation signaling pathways converge on the unusually large promoter of the yeast *FLO11* gene. *EMBO J*. 18:1257–1269.
75. Russell, I. 1995. Yeast. Capítulo 10 en: *Handbook of Brewing*. Hardwick, W. A. (editor). Marcel Dekker Inc, USA.
76. Sambrook J., E.F. Fritsch y T. Maniatis. 1989. *Molecular Cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. New York.
77. Sampermans S., J. Mortier y E.V. Soares. 2005. Flocculation onset in *Saccharomyces cerevisiae*: the role of nutrients. *J. Appl. Microbiol*. 98:525–531.
78. Sato M., J. Watari y K. Shinotsuka. 2001. Genetic instability in flocculation of bottom-fermenting yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem*. 59: 130-134.
79. Smit G., H. Straver, J.J. Lugtenberg y J.W. Kijne. 1992. Flocculence of *Saccharomyces cerevisiae* cells is induced by nutrient limitation, with cell surface hydrophobicity as a major determinant. *Appl. Environ. Microbiol*. 58: 3709-3714.
80. Soares E.V. y M. Mota. 1996. Flocculation onset, growth phase, and genealogical age in *Saccharomyces cerevisiae*. *Can. J. Microbiol*. 42: 539-547.
81. Soares E.V. y A. Vroman. 2003. Effect of different starvation conditions on the flocculation of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Microbiol*. 95: 325-330.

82. Smart K.A., C.A. Boulton y E. Hinchliffe. 1995. Effect of physiological stress on the surface properties of brewing yeasts. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 53:33-38.
83. Smart K.A. y S. Whisker. 1996. Effect of serial repitching on the fermentation properties and condition of brewing yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 54:41-44
84. Speers R.A., M.A. Tung, T.D. Durance y G.G. Stewart. 1992. Biochemical aspects of yeast flocculation and its measurement: A Review. *J. Inst. Brew.* 98:293-300
85. Speers R.A., K. Smart, R. Stewart y Y.-L. Jin. 1998. Zymolectins in *Saccharomyces cerevisiae*. *Letter J. Inst. Brew.* 104:298.
86. Speers R. A., Y.-Q. Wan, Y.-L. Jin y R.J. Stewart. 2006. Effects of Fermentation Parameters and Cell Wall Properties on yeast Flocculation. *J. Inst. Brew.* 112: 246–254.
87. Stewart G.G. 1999. High gravity brewing. *Brewer's Guardian*. 128: 31-37.
88. Stratford M. y S. Assinder. 1991. Yeast flocculation: Flo1 and NewFlo phenotypes and receptor structure. *Yeast*, 7: 559-574.
89. Straver MG, Smit JW. Kijne. 1994. Purification and Partial Characterization of a flocculin from Brewers Yeast. *Amer. Soc. Microb.* 8: 2754-2758.
90. Teunissen A.W. y H.Y. Steensma. 1995. Review: the dominant flocculation genes of *Saccharomyces cerevisiae* constitute a new subtelomeric gene family. *Yeast*, 11:1001-13.

91. Touhami A., B. Hoffmann, A. Vasella, F.A. Denis y Y.F. Dufrene. 2003. Aggregation of yeast cells: direct measurement of discrete lectin–carbohydrate interactions. *Microbiology*. 149: 2873–2878.
92. Twintrack Advanced Labs. 2006. Brewing microbiology. Siebel Institute of Technology. Chicago USA. pp. 6.1 y 6.2.
93. Ubersax J.A., E.L. Woodbury, P.N. Quang, M. Paraz, J.D. Blethrow, K. Shah, K.M. Shokat y D.O. Morgan. 2003 Targets of the cyclin-dependent kinase Cdk1. *Nature* 425: 859-64
94. Van Dyk D., I.S. Pretorius y F.F. Bauer. 2005. Mss11p is a central element of the regulatory network that controls *FLO11* expression and invasive growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 169: 91–106.
95. Vaughan-Martini A. y A. Martini. 1987. Three newly delimited species of *Saccharomyces sensu stricto*. *Antonie Leeuwenhoek*, 53: 77-84.
96. Velculescu V.E., L. Zhang, W. Zhou, J. Vogelstein, M. A. Basrai, D. E. Bassett Jr., P. Hieter, B. Vogelstein y K. W. Kinzle. 1997. Characterization of the yeast transcriptome. *Cell*. 88: 243–251.
97. Verstrepen K.J., G. Derdelinckx, H. Verachtert, y F.R. Delvaux. 2003. Yeast flocculation: what brewers should know. *Appl Microbiol Biotechnol*. 61:197-205.
98. Warmka J., J. Hanneman, J. Lee, D. Amin, e I. Ota. 2001. Ptc1, a Type 2C Ser/Thr Phosphatase, Inactivates the HOG Pathway by Dephosphorylating the Mitogen-Activated Protein Kinase Hog1. *Molecular and Cellular Biology*. 21: 51–60

99. Watari J., Y. Takata, H. Ogawa, N. Nishikawa y M. Kamimura. 1989. Molecular cloning of a flocculation gene in *Saccharomyces cerevisiae*. *Agric. Biol. Chem.* 53: 901-903.
100. Welihinda A.A., W. Tirasophon, S.R. Green y R.J. Kaufman. 1998 Protein serine/threonine phosphatase Ptc2p negatively regulates the unfolded-protein response by dephosphorylating Ire1p kinase. *Mol Cell Biol* 18:1967-77
101. Wittl G. y T.W. Maier. 1980. Experiences with beer production by using a one-tank process. *MBAA Tech. Quart.* 17:77-84
102. Young C., J. Mapes, J. Hanneman, S. Al-Zarban, e I. Ota. 2002. Role of Ptc2 Type 2C Ser/Thr Phosphatase in Yeast High-Osmolarity Glycerol Pathway Inactivation. *Eukaryotic Cell.* 1: 1032–1040.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Luis Cástulo Damas Buenostro

Candidato para el Grado de

Doctor en Ciencias con Especialidad en Biotecnología

Tesis: Evaluación y análisis de la expresión genética de *Saccharomyces cerevisiae* bajo condiciones de fermentación que afectan la floculación.

Campo de Estudio: Biotecnología Industrial

Datos Personales: Nacido en Monterrey, Nuevo León el 27 de Mayo de 1972, hijo de Cástulo Damas Villanueva y María Eulogia Buenostro Romero.

Educación: Egresado de la Universidad Autónoma de Nuevo León, grado obtenido Químico Bacteriólogo Parasitólogo en 1994.

Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología, grado obtenido en 1998. Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

Experiencia Profesional: Jefe del Departamento de Servicios Microbiológicos, Oficina de Servicios. FEMSA Cerveza, de 1998 a la fecha.