

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS GENES ESTRUCTURALES
DE FLOCULACIÓN EN LAS CÉLULAS COMO LA FUNCIONALIDAD
DE LAS ENZIMAS EN DIFERENTES CEPAS
DE *Saccharomyces cerevisiae*

POR:
GERARDO GRACIA GONZALEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

LEÓN 2003

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



DISTRIBUCIÓN Y EXPRESIÓN DE LOS GENES ESTRUCTURALES DE
FLOCULACIÓN (FLO), ASÍ COMO LA FUNCIONALIDAD DE LAS
FLOCULINAS EN DIFERENTES CEPAS CERVECERAS DE
Saccharomyces cerevisiae

Por

GERARDO GRACIA GONZÁLEZ

Como requisito parcial para obtener el Grado de
MAESTRO EN CIENCIAS

Enero, 2008

TABLA DE CONTENIDOS

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS	iii
LISTA DE TABLAS	vi
LISTA DE FIGURAS	vii
NOMENCLATURA	x
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
1. INTRODUCCIÓN	3
2. HIPOTESIS	5
3. OBJETIVOS	6
3.1 Objetivos Generales	
3.2 Objetivos Específicos	
4. ANTECEDENTES	7
4.1 <i>Saccharomyces cerevisiae</i> y la Fermentación Lager	
4.2 Floculación	
4.3 Factores que Afectan la Floculación	
4.4 Genética y Regulación de la Floculación	
4.5 Floculinas y la Floculación	
5. MÉTODOS	17
5.1 Cepas de Levadura	
5.2 Iniciadores Utilizados	
5.3 Identificación de Genes FLO por PCR punto final	
5.3.1 Cultivo	
5.3.2 Extracción de ADN Total	

5.3.3	Amplificación de Genes FLO	
5.4	Identificación de Transcritos de Genes FLO por qPCR	
5.4.1	Fermentación en Condiciones que Afectan la Floculación	
5.4.1.1	Mosto	
5.4.1.2	Inoculo	
5.4.1.3	Levadura en Condición de Represión Catabólica.	
5.4.1.4	Levadura para Condición de Edad Generacional Alta	
5.4.2	Evaluación de la Floculación	
5.4.3	Extracción de ARN Total	
5.4.4	RT-PCR	
5.4.4.1	Obtención de cADN	
5.4.4.2	Medición de Cp	
5.4.4.3	Verificación de Tamaño de Amplicones	
5.5	Cuantificación de ADN y ARN	
5.6	Electroforesis en Gel de Agarosa	
5.7	Medición de Floculinas en Levaduras	
5.7.1	Obtención de Muestras	
5.7.2	Caracterización del Fenotipo de las Cepas de Levadura Industrial.	
5.7.3	Determinación Ligando-Receptor con FITC-Avidina.	
5.7.1.1	Ajuste de Células.	
5.7.1.2	Preparación de FITC-Avidina.	
5.7.1.3	Preparación de Muestras a Medir por Fluorometría.	
5.7.1.3.1	Unión Específica.	
5.7.1.3.2	Unión Inespecífica.	
5.7.1.3.3	Curva de Calibración FITC-Avidina.	
5.7.1.4	Lectura de Muestras con Fluorómetro.	
6.	RESULTADOS	30
6.1	Diseño de Iniciadores	
6.2	Identificación de Genes FLO	
6.3	Identificación de Transcritos.	
6.3.1	Selección de Condiciones de Estrés a Trabajar.	
6.3.2	Comparativo entre Cp de LgFLO1.	
6.3.3	Comparativo entre Cp de FL08.	
6.3.4	Comparativo entre Cp de FLO1 1.	
6.4	Medición de Floculinas.	
6.4.1	Caracterización del Fenotipo de Levaduras Usadas.	
6.4.2	Análisis de Unión FITC-Avidina-Levadura	
7.	DISCUSIÓN.....	64
8.	CONCLUSIONES.....	69
	LITERATURA CITADA	71
	RESÚMEN BIOGRÁFICO.....	76

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
I.	Tipo de genes estudiados, su nombre oficial, número de identificación y localización en <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	18
II.	Mezcla de reacción para amplificación de amplicones FLO mediante PCR punto final	20
III.	Condiciones del termociclador para amplificación de genes FLO mediante PCR punto final	20
IV.	Mezcla de reacción para la obtención de cADN a partir de ARN total mediante PCR reversa	24
V.	Condiciones del termociclador para la obtención de cADN a partir de ARN total mediante PCR reversa	24
VI.	Mezcla de reacción para las muestras de qPCR	25
VII.	Condiciones del termociclador para la detección de amplicones en qPCR	25
VIII.	Iniciadores utilizados para la amplificación de genes FLO y sus transcritos con PCR y qPCR en las cepas C-820, C-790 y ATCC7754	30
IX.	Distribución de genes FLO en levaduras cerveceras	32
X.	Porcentajes de Floculación de las cepas de levadura estudiadas en condiciones de cultivo estándar y de estrés	32
XI.	Comparativo de tipo y número de genes FLO, nivel de floculación B_{max} y Kd en cada cepa.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR punto final para los genes FLO en (A) C-820, (B) RT-790, (C) ATCC 7754	31
2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR punto final para los genes FLO en (A) 2036 y (B) BRY	31
3. Curso temporal para C-790.....	33
4. Curso temporal para C-820	33
5. Comparativo de Cp entre las cepas C-820 y C-790 de LgFLOI en condición RepresiónCatabólica(PCHOS)	36
6. Electroforesis de productos qPCR C-790 Represión Catabólica gen LgFLOI (312pb) gel de agarosa 2%	37
7. Electroforesis de productos qPCR C-820 Represión Catabólica gen LgFLOI (312pb) gel de agarosa 2%	37
8. Comparativo de Cp entre las cepas C-820 y C-790 de LgFLOI en condición Edad Generacional(EG)	38
9. Electroforesis de productos qPCR C-790 Edad Generacional gen LgFLOI (312pb) gel de agarosa 2%	39
10. Electroforesis de productos qPCR C-820 Edad Generacional gen LgFLOI (312pb) gel de agarosa 2%	39
11. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de LgFLOI Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG)	40
12. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de LgFLOI Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG)	41

13. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 del FL08 Represión Catabólica (PCHOS)	43
14. Electroforesis de productos qPCR C-790 Represión Catabólica gen FL08 (920pb) gel de agarosa 2%	44
15. Electroforesis de productos qPCR C-820 Represión Catabólica gen FL08 (920pb) gel de agarosa 2%	44
16. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 del FL08 Edad Generacional (EG)	45
17. Electroforesis de productos qPCR C-790 Edad Generacional FL08 (920pb) gel de agarosa 2%	46
18. Electroforesis de productos RT-PCR C-820 Edad Generacional FL08 (920pb) gel de agarosa 2%	46
19. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de FL08 Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG)	47
20. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de FL08 Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG).....	48
21. Comparativo de Cp de las cepas C-790, C-820 y ATCC 7754 del FLO1 1 Represión Catabólica (PCHOS)	50
22. Electroforesis de productos qPCR C-790 Represión Catabólica FLO1 1 (749pb) gel de agarosa 2%.....	51
23. Electroforesis de productos qPCR C-820 Represión Catabólica FLO1 1 (749pb) gel de agarosa 2%	51
24. Electroforesis de productos qPCR ATCC7754 Represión Catabólica FLO1 1 (749pb) gel de agarosa 2%	51
25. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 del FLO1 1 Edad Generacional (EG)	52
26. Electroforesis de productos qPCR C-790 Edad Generacional FLO1 1 (749pb) gel de agarosa 2%	53
27. Electroforesis de productos qPCR C-820 Edad Generacional FLO1 1 (749pb) gel de agarosa 2%	53
28. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de FLO1 1 Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG)	54

29. Comparativo de Cp de las cepas C-790, C-820 y ATCC7754 de FLO1 1 Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG)	55
30. Fenotipo NewFlo en levaduras C-820 y C-790	56
31. Saturación de células en C-790 en concentración máxima de FITC-Avidina (74.19pg/mL)	57
32. Fluorescencia a varias concentraciones de FITC-Avidina de C-790 a 12×10^6 cel/mL	58
33. Curva de calibración de FITC-Avidina para C-790.....	58
34. Gráfico de Saturación/Scatchard cepa C-790	59
35. Saturación de células en C-820 en concentración máxima de FITC-Avidina (74.19pg/mL)	59
36. Fluorescencia a varias concentraciones de FITC-Avidina de C-820 a 6×10^6 cel/mL.....	60
37. Curva de calibración de FITC-Avidina para C-820	60
38. Gráfico de Saturación/Scatchard cepa C-820	61
39. Fluorescencia a varias concentraciones de FITC-Avidina de ATCC7754 a 12×10^6 cel/mL	61
40. Curva de calibración de FITC-Avidina para ATCC7754	62
41. Gráfico de Saturación/Scatchard cepa ATCC7754	62

NOMENCLATURA

ADN	Ácido desoxiribonucleico
ARN	Ácido ribonucleico
B _{max}	Unión específica máxima
cADN	Ácido desoxiribonucleico complementario
cel/mL	Células por mililitro
cm	Centímetro
Conc	Concentración
C _p	Punto de corte
Chr	Cromosoma
dNTP	Desoxinucleosido trifosfato
EDTA	Acido Etilendiaminotetracético
FITC-Avidina	Conjugado Isotiocianato de Fluoresceína- Avidina
fmol/cel	Femto moles por célula
G	Fuerza centrífuga
GL	Grados de libertad
g	Gramos
h	Horas
IC	Intervalo de confianza
Kb	Kilobase

kDa	Kilodalton
L	Litro
min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
mQ	Agua ultradestilada miliQ
MYPG Medio de Extracto de Malta, Extracto de Levadura, Peptona y Glucosa	
pg/pL	Microgramos por microlitro
pL	Microlitro
pM	Micromolar
ng/pL	Nanogramo por microlitro
nm	Nanometro
ORF (Open reading frame) Marco de lectura abierta	
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
pH	Potencial de Hidrógeno
pI	Punto Isoeléctrico
pM	Picomolar
ppm	Partes por millón
R ²	Coefficiente de determinación
qPCR	Reacción en cadena de polimerasa en tiempo real
s	Segundo
Ta	Temperatura de alineación

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
%GC	Porcentaje de Guanina-Citocina
° C	Grado Celsius
° P	Grado plato
λ	Longitud de onda
>	Mayor que

RESUMEN

En la industria cervecera la floculación se refiere a la capacidad de una cepa de levadura para sedimentar en agregados celulares al terminar la fermentación y es determinada por la acción de las zimolectinas, proteínas de la pared celular codificadas por los genes de la familia FLO. Sin embargo, esta característica se puede ver seriamente afectada por condiciones de estrés fisiológico, lo cual traería grandes pérdidas económicas. En el presente trabajo determinamos el número y tipo de genes FLO, así como los niveles de expresión y función de los mismos en diferentes cepas de cerveceras de proceso. La presencia de los genes FLO fue determinada por amplificación genética tipo PCR de punto final; además se determinó el nivel de transcripción con qPCR de los genes LgFLO1, FL08 y FLO 11 en condición de cultivo estándar y de estrés sobre la floculación como mosto glucosa-maltosa alterado y Edad Generacional industrial alta comparando las diferentes Cp de los transcritos estudiados por condición entre sí mediante gráficos de cajas apreciando diferencias en los niveles de expresión. También se definió parcialmente la B_{max} y Kd de las cepas C-820 y C-790 en cultivos industriales jóvenes mediante cuantificación fluorométrica utilizando FITC-Avidina como marca, pudiendo apreciar diferencias entre ambas cepas estudiadas. Los resultados sugieren que los patrones electroforéticos (carga y tipo de genes FLO) de cada cepa corresponde con el nivel de transcritos y con el cómo son reprimidos algunos genes FLO más que otros según la condición, tomando relevancia la diferencia en la floculación de cada levadura donde la cepa más floculante resulta en mayor B_{max} , con lo que probablemente el número de floculinas de las 2 cepas de *S. cerevisiae* tipo lager, sea distinto entre ellas, manifestándose en su capacidad de floculación.

1. INTRODUCCION

Floculación es la característica de sedimentar en agregados celulares cuando la etapa fermentativa ha terminado, esta es una de las principales propiedades que debe tener una cepa de levadura en la industria cervecera.

Este fenómeno consiste en la agregación asexual de las células de levaduras en cúmulos o “flocs” y representa una propiedad deseable por el hecho de poder separar la levadura de la cerveza verde, de manera práctica y sin un costo al final del proceso de fermentación, que posteriormente podrá llevar a cabo otro ciclo de fermentación (Verstrepen *et al.*, 2003).

El proceso de floculación es muy complejo y depende de numerosos factores entre los que destacan: la cepa de levadura, la composición del medio de cultivo, y las condiciones de cultivo. El mecanismo más aceptado actualmente es el que es mediado por proteínas tipo letictina, llamadas floculinas, las cuales se encuentran en la pared celular de la levadura y reconocen receptores en células de levadura adyacentes formando grumos multicelulares que sedimentan fuera de la solución (Denigis *et al.*, 1995). Estas floculinas son codificadas por una familia de genes llamados FLO los cuales tienen considerable homología en su secuencia (Guo *et al.*, 2000), localizados cerca de los telómeros generalmente y en diferentes cromosomas.

Aunque existe una gran variedad de trabajos a este respecto, últimamente se ha determinado que la propiedad de floculación, es una de las más variables en una

levadura debido a deleciones puntuales o totales de los genes que son responsables en mayor parte a la aparición de esta propiedad (Sato *et al.*, 2001); esto se hace más palpable cuando se utilizan condiciones de estrés fisiológico, que actualmente son muy comunes en los procesos de producción y que puede dar lugar a que la capacidad de floculación se pierda ya sea parcial o permanentemente.

Algunas veces si la práctica es corregida, esta capacidad se reestablece, otras dado que hubo deleción, mutación o inactivación de algún gene FLO, la única forma de resolver la situación es cambiando a un cultivo nuevo, lo cual ocasiona retrasos importantes en tiempo, pérdida de capital monetario y mano de obra. Es por eso que para la industria cervecera es sumamente importante identificar la causa tan pronto sea posible cuando hay poca o nula floculación en el proceso.

Por consiguiente, resulta evidente la necesidad de ganar conocimiento en de los genes FLO en cepas de levadura cervecera lager, así como el de las floculinas que expresan estos genes y su funcionalidad en la pared celular.

2. HIPÓTESIS

La capacidad de floculación de *Saccharomyces cerevisiae* tipo lager puede ser dependiente del contenido y tipo de genes FLO, sus transcritos, además de la expresión de receptores zymolectinas, marcando diferencias entre cepas.



3. OBJETIVOS

3.1 Objetivos Generales

Detectar los genes estructurales dominantes FLO en el genoma de 4 cepas cerveceras de *Saccharomyces cerevisiae* industrial tipo lager, además de analizar cuales de estos se expresan a nivel transcripción en condiciones normales y de estrés. Como proteínas traducidas en pared celular se realizarán mediciones de B_{max} y y si es posible, el ponderado del número de sitios de unión por célula.

3.2 Objetivos Específicos

1. Realizar análisis de PCR para detectar los genes FLO1, LgFLO1, FL05, FL08, FL09, FLO10, FLO11 en las cepas floculantes lager: C-820, C-790, 2036, BRY y ATCC-7554.
2. Análisis a nivel de transcripción, de los genes LgFLO1, FL08 y FLO11 mediante qPCR de las cepas C-820, C-790 y ATCC-7554 en condiciones de fermentación estándar y de estrés fisiológico.
3. Medición de B_{max} y Kd mediante fluorimetría de las floculinas expresadas en pared celular de las cepas C-820 y C-790 en condiciones de fermentación industrial estándar.

4. ANTECEDENTES

4.1 *Saccharomyces cerevisiae* y la Fermentación Lager

Los sistemas de fermentación cervecera han evolucionado gradualmente alrededor del tipo de levadura utilizada. Los cerveceros usualmente distinguen entre dos tipos de levaduras: aquellas de fermentación alta y levaduras de fermentación de fondo. Como una de sus características, los ales utilizan levaduras que requieren una temperatura de fermentación alta (13-16° C), además tienen una sedimentación a fin del proceso fermentativo tipo alta o hacia la superficie del tanque. Por otro lado, las fermentaciones lager, utilizan levaduras que fermentan a temperaturas bajas (4-8° C) y tienen una sedimentación tipo baja o hacia el fondo del tanque. Esta distinción surge de la práctica de remover la levadura de la parte superior del fermentador por un proceso de “desnatado”; o en las lager, del fondo del tanque (Priest y Campbell, 1987).

Las levaduras lager forman un grupo heterogéneo de especies (Vaughan-Martini & Martín, 1987). *Saccharomyces cerevisiae*, también llamada a nivel industrial *Saccharomyces pastorianus* CBS 1513 (*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* (incuye: *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).

4.2 Floculación

En la práctica de elaboración de cerveza a nivel industrial, una de las principales propiedades que debe tener la levadura lager en proceso, es la de poder sedimentar en agregados cuando la etapa fermentativa ha terminado. Este fenómeno llamado floculación, es la agregación asexual de células de levaduras en cúmulos o flocs y representa una propiedad deseable por el hecho de poder separar la levadura de la cerveza verde, siendo esto efectivo y sin costo para luego llevar a cabo otro ciclo de fermentación reinoculando esta levadura (Verstrepen *et al.*, 2003).

La floculación es un proceso muy complejo que depende de numerosos factores: la cepa de levadura (genética, estado fisiológico, y metabolismo), la composición del medio de cultivo y las condiciones de cultivo (temperatura, agitación y aireación). Más aún, la floculación puede ser controlada por interacciones específicas (reconocimiento molecular) y no específico (interacciones de doble capa, fuerzas de van der Waals, interacciones hidrofóbicas, puentes salinos y repulsión estérica). El mecanismo más aceptado actualmente es el mediado por proteínas tipo lectina, llamadas floculinas o zimolectina, las cuales se supone reconocen receptores en células de levadura adyacentes formando cúmulos multicelulares que sedimentan fuera de la solución y que además requiere la presencia de calcio (Denigis *et al.*, 1995); aunque recientemente se han visto algunas cepas que floculan por otros efectos no dependientes de esta teoría (Speers *et al.*, 2006; Higgins *et al.*, 2003; Olsen *et al.*, 2002).

Las zymolectinas que se encuentran en la pared celular de *Saccharomyces cerevisiae*, son codificadas por una familia de genes que incluyen FLO1, FL05, FL08, FL09 y FLO10, los cuales tienen considerable homología en su secuencia (Guo *et al.*, 2000). Estos genes se localizan aproximadamente de 10 a 40 Kb de los telómeros, una localización que puede jugar un papel importante en su regulación y evolución. Además de estos se ha encontrado el gen FLO11, el cual no está adyacente a los telómeros, y cuya expresión en la levadura se requiere para importantes transiciones de desarrollo, incluyendo adhesión al agar y superficies plásticas, deslizamiento, y formación de pseudohifas, a su vez actúa como un activador de los genes FLO teloméricos, que promueven la floculación (Halme *et al.*, 2004).

Para cepas floculantes deben distinguirse dos fenotipos según su patrón de inhibición: el fenotipo Flol, en el que la floculación es inhibida por mañosa y no por glucosa, maltosa, sucrosa o galactosa (Soares y Vroman, 1995) del cual es responsable FL01/FL05/FL08, además de ser dependiente de Ca^{2+} para su activación (Zhang *et al.*, 1999); y el fenotipo NewFlo, el cual es inhibido por mañosa, glucosa, maltosa, y sacarosa pero no por galactosa. También están los tipos de floculación insensibles a la mañosa y aquellos dependientes de etanol (Dengins *et al.*, 1995).

La mayoría de las levaduras cerveceras pertenecen al fenotipo NewFlo, cuya floculación exhibe comportamiento cíclico, floculando en la fase estacionaria del crecimiento, mientras las tipo Flol son constitutivamente floculantes (Soares y Mota 1996). Estos dos fenotipos distintos son regidos por el gene FLOI para las levadura con perfil Flol (Watari *et al.*, 1989); y por el gene Lg-FLOI en las tipo lager respectivamente. Es generalmente aceptado que la floculación en las levaduras fondo floculantes son dirigidos por el gen Lg-FLOI. Los fenotipos son causados por una diferencia en la región del aminoácido 196 al aminoácido 240 de ambos productos génicos (Kobayashi *et al.*, 1998).

4.3 Factores que afectan la floculación

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

Con respecto a la carga genética de la levadura, se ha visto que las cepas con actividad floculante contienen uno o más genes FLO. 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 de transcripción y/o traducción (Sato *et al.*, 2001).

En cuanto 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 en la conformación de la floculina, que entonces es capaz de reconocer los residuos de mañosa en células adyacentes (Speers, 1992). Por el contrario, otros nutrientes tienen un efecto represor sobre la floculación, como algunos azúcares sencillos (glucosa, mañosa, maltosa, maltotriosa). Se estima que estos azúcares compiten con los residuos de mañosa de las células adyacentes por los sitios de unión de las floculinas, bloqueando la adhesión (Kobayashi *et al.*, 1998).

Sin embargo, 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 en el caso de FLO1, el mecanismo de regulación es muy similar al de STA1, que codifica para una exoenzima glucoamilasa, necesaria para el consumo de dextrinas, ya que ambos genes son reprimidos por glucosa vía reguladores de transcripción (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 FLO1.

En cuanto a la edad generacional se ha observado que células jóvenes floculan menos que aquellas con mayor número de generaciones transcurridas. La explicación a este fenómeno es que al envejecer la célula, su pared se toma 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).

4.4 Genética y Regulación de la Floculación

La floculación de la levadura está bajo control genético. Han sido descritos genes dominantes y recesivos, además de genes supresores de la floculación (Sampermans *et al.*, 2004); sin embargo mucha información todavía permanece por ser descubierta en relación con los genes que regulan este fenómeno (Rusell, 1995).

En el fenotipo NewFlo, al parecer la floculación es activada al final de la fase exponencial cuando la glucosa, nitrógeno y el oxígeno son limitados (Smith *et al.*, 1992; Soares y Mota, 1996).

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 (Teunissen *et al.*, 1995).

De los genes FLO que codifican a las floculinas, el gene FLO1 (también llamado FL02, FL04 y YAR050W), es el más conocido. Este se encuentra localizado en el brazo izquierdo del cromosoma I. Consta de un ORF de 4.6 Kb que va desde el 203394 al 208007 del mapa genético de *S.cerevisiae* (Global Gene Hunter, 2006) incluye un gran número de secuencias repetidas en su parte central, codificando para una proteína de 1537 aa rica en Ser/Thr (Watari *et al.*, 1989). Ha sido reportado que codifica una proteína glicosilfosfatidilinositol (GPI) anclada con su amino terminal expuesto (Bony *et al.*, 1997).

La expresión de FLO1 y sus homólogos causan floculación del fenotipo Flo1. Interesantemente, las levaduras lager también tienen una copia del llamado gen Lg-FLO1, el cual no se encuentra en levaduras ale. Se cree que Lg-FLO1 se encuentra en el cromosoma VIII y que codifica para una floculina que une con mañosa y glucosa, por lo tanto es responsable del fenotipo NewFlo de la mayoría de las levaduras cerveceras (Kobayashi *et al.*, 1998).

FL05 (también llamado YHR211W) es altamente homólogo a FLO1 se encuentra en el cromosoma VIII y va desde el 525392 al 528619 del mapa de *S. cerevisiae* (Global Gene Hunter, 2006).

FL08 (también llamado YER109C, PHD5, YER108C) se encuentra en el cromosoma V, va desde el 377610 al 375211 del mapa de *S. cerevisiae* (Global Gene Hunter, 2006) y se ha demostrado que media la floculación vía la activación transcripcional de FLO1, el cual se traduce en Flo1p que es una manoproteína de pared celular y una lectina de floculación (Bony *et al.*, 1997; Kobayashi *et al.*, 1996). También codifica un activador transcripcional para FL09; además Flo8 activa FLO1 1/MUC1, que está envuelto en crecimiento filamentosos y STA1, que codifica para glucoamilasa (Verstreppen *et al.*, 2003).

Adicionalmente a estos genes, también se encuentra FL09 (YAL063C), que se localiza en el cromosoma I, cuyo ORF va desde el 27969 a 24001 del mapa de *S. cerevisiae*. Este gen tiene un 94% de similitud con FLO1 y podría ser la fuente del transcrito de 4.2kb cuya presencia no es afectada por deleciones de FLO1 o FL05 (Global Gene Hunter, 2006).

FLO10 (YKR102W), se encuentra en el cromosoma XI y tiene un ORF que va desde el 645994 a 649503 del mapa de *S. cerevisiae*. Es 58% similar a FLO1 codifica una proteína tipo lectina similar a Flo1, tiene 81.9% de similitud en la parte que codifica a la N-terminal de la proteína (Global Gene Hunter, 2006).

FLO11 (también llamado MUC1, STA4 y YIR019C), es el miembro más divergente de la familia (similitud 37% identidad 26%) y está más relacionado con los genes STA de glucoamilasa de *Saccharomyces 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 STA 10. Además, a diferencia de las demás floculinas, FLO11 no está localizado cerca del telómero, sino cerca del centrómero en el brazo derecho del cromosoma IX y va desde 393672 a 389569 del mapa de *S. cerevisiae* (Global Gene Hunter, 2006). Por su similitud se ha hipotetizado que los genes STA evolucionaron a partir de FLO1 1.

Este gen está sujeto a múltiples cascadas de regulaciones génicas, regulando a nivel de transcripción por la vía MAP kinasa (por medio de Stelp y Teclp) y la vía cAMP mediante Flo8p (Guo *et al.*, 2000), que sugiere un papel fisiológico altamente específico (Galiano *et al.*, 1999; Rupp *et al.*, 1999).

Se han identificado también tres pseudogenes, YAL065, YAR061W, YAR062W. YHR213W también ha sido identificado en forma de secuencias fragmentadas que guardan homología con FLOI (Global Gene Hunter, 2006).

Existen muchos métodos para detectar estos genes, sin embargo sobresale la técnica de PCR multiplex, ya que tiene la bondad de amplificar simultáneamente más de un locus en la misma reacción, por lo que esta técnica es conveniente para ensayos de barrido en laboratorios de investigación y clínicos (Henegariu *et al.*, 1997).

La familia de genes FLO es muy inestable causando grandes variaciones en el perfil de floculación entre diferentes cepas de levadura y hasta en diferentes generaciones de una cepa específica, por lo que en la industria cervecera 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 son irreversibles, debido a mutaciones en los genes involucrados lo que hace necesario cambiar la cepa de levadura en uso (Sato *et al.*, 2001), esto probablemente debido a las muchas secuencias repetidas y a la proximidad con los telómeros.

4.5 Floculinas y la Floculación

Desde hace poco más de dos décadas, la hipótesis de las lectinas ha ayudado al entendimiento de la floculación. Históricamente, una lectina se ha definido como una proteína de origen no inmune, con capacidad de unión a un azúcar (Goldstein *et al.*, 1980) y normalmente se le considera que tiene 2 sitios de unión para el azúcar. Utilizando esta definición, los receptores anclados a la pared celular, de naturaleza protéica, y que son receptores para los azúcares mañosa o gluco-manosa, con un solo sitio de unión por proteína, no deberían ser llamados lectinas. El término “zymolectina” fue introducido para estos receptores. (Speers *et al.*, 1998; Patelakis *et al.*, 1998) Las zymolectinas de las cepas con fenotipo Flol aparentemente contienen receptores de mañosa, mientras aquellas del fenotipo NewFlo contiene receptores para mañosa y glucosa.

Al igual que las lectinas vegetales, se considera que el ión Calcio participa como un activador provocando un cambio de conformación en la floculina, que entonces es capaz de reconocer los residuos de mañosa en células adyacentes (Speers, 1992; Bony *et al.*, 1997, 1998; Kobayashi *et al.*, 1998).

Por otro lado hay nutrientes que tienen un efecto represor sobre la floculación, como algunos azúcares sencillos (glucosa, mañosa, maltosa, maltotriosa). Se estima que estos azúcares compiten con los residuos de mañosa de las células adyacentes por los sitios de unión de las floculinas, bloqueando la adhesión (Kobayashi *et al.*, 1998).

Debido a que los residuos de mañosa están siempre presentes en la pared celular de la levadura de células floculantes y no floculantes, el factor crítico para la floculación es claramente la presencia o ausencia de floculinas (Verstreppen, 2003).

Sin embargo, las proteínas Fio no están permanentemente presentes en la superficie de la levadura del fenotipo NewFlo, si no que su cantidad se incrementa durante el crecimiento. Una correlación entre la disponibilidad de las proteínas Fio en la superficie de la levadura y la intensidad de la floculación ha sido bien documentada y observada (Sampermans *et al.*, 2004; Bony *et al.*, 1998; Dengins *et al.*, 1995).

La formación de flocs conferida por FLOI es sensible a la quimotripsina y resistente al calor, mientras que la habilidad de formación de flocs conferida por FLO5 es resistente a la quimotripsina, pero termolábil (Hodgson *et al.*, 1985).

FLOI codifica para una proteína tipo lectina mañosa específica y Lg-FLOI codifica para una proteína tipo lectina mañosa /glucosa específica respectivamente. Los aminoácidos que van de 26 al 40 de la proteína Lg-FloI tienen completa identidad con las secuencias de aminoácidos reportados para la proteína floculina (Straver, 1994) y se sugiere que estas dos proteínas son idénticas (Kobayashi *et al.*, 1998).

La comparación del gene Lg-FLO, que contienen además de FLOI las levaduras lager (Kobayashi *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2002), clonado de levaduras de fondo-floculantes con el fenotipo NewFlo, y con el gene FLOI demuestra que Lg-FLO es largamente similar a FLOI, con algunas diferencias en el sitio de unión a azúcar en la región N-terminal de cada proteína.

La parte que codifica la región de 694pb N terminal contiene una porción de 636pb ORF con un 61.7% de identidad correspondiente a la región reportada del gene

FL01; mientras que la región C Terminal de 2903pb contiene una porción de 2550pb ORF que tiene 55.1% de identidad con la correspondiente región reportada del gene FLOI. Usando un mapa de restricción de Lg-FLOI se ha calculado un ORF de 5.8kb (Kobayashi *et al.*, 1998), mas largo que la región codificante reportada para FLOI (4.61Kb) (WatariJ. 1994),

Es generalmente aceptado que en Flolp y Lg-Flolp, el GPI (glicosil fosfatidil inositol) se combina con una región altamente hidrofóbica en el dominio C-terminal, y cuando este juega el papel de ancla, estas proteínas floculinas son conectadas y ancladas a la membrana (Bony *et al.*, 1997). FL09 también codifica para una proteína tipo lectina, se cree que es expresada para contribuir a la floculación (Teunissen *et al.*, 1995).

Por otro lado, en relación a los métodos para cuantificar floculinas en las levaduras cerveceras, existen diferentes aproximaciones experimentales: Straver había hecho mención sobre un método para medir “floculinas” esto en levaduras que desarrollan la capacidad de flocular al final de la etapa log de crecimiento (lager). En este estudio, se determina un sobrenadante que contiene factores que inducen a la floculación, mas no propiamente se asocian a lectinas, porque en las pruebas no corresponde, sino que los autores concluyen que este producto es de un gen homólogo a FLOI (Straver, 1994).

También existe un acercamiento para medir la floculación por afinidad en columna (Akiyama, 1997). Se basa en la hidrofobicidad de la superficie de la levadura cervecera. Una suspensión cargada de células de levadura fue cargada en una columna de gel sepharosa y un buffer conteniendo NaCl. Las células hidrofóbicas se adhieren a la columna y el porcentaje de células que se adhieren a la columna es calculado para dar un índice de la hidrofobicidad de la superficie de la célula.

Posteriormente, Patelakis *et al.*, publicó un ensayo para medir la densidad de zymolectinas en la superficie celular de *S. cerevisiae* (Patelakis *et ai*, 1998). Este método fue utilizado para medir zymolectinas en la superficie de una cepa de levadura ale, la cual tiene Flolp expresado constitutivamente. Aquí fue utilizada una estrategia de Isotiocianato de fluoresceína unida a Avidina (FITC-Avidina), dado que este último tiene un pl 10.5 y contiene una cadena de mañosa, la cual asemeja grandemente a las cadenas que se presentan en la pared celular de las levaduras floculantes.

Por último, Speers *et al.*, refino un método de medición del número de zymolectinas en levaduras ale exhibiendo el fenotipo NewFlo, en forma práctica y rápida utilizando también FITC-Avidina acoplado a fluorometría y análisis Langmuir para obtener la densidad de sitios (Speers et al., 2006).

Nuevamente, cabe mencionar, que al haber tanta variabilidad entre cepas e incluso entre generaciones en la constitución de los genes FLO, es de esperar que los estudios realizados puedan solo tener conclusiones parciales para las cepas que fueron estudiadas.

5. METODOS

5.1 Cepas de Levadura

En este trabajo fueron utilizadas las cepas denominadas C-820, C-790, 2036 y BRY son cepas floculantes, mientras que ATCC 7754 es una cepa no floculante, que fue verificado con la metodología de Helms (ASBC, 1999). Todas las cepas fueron proporcionadas por Cervecería Cuauhtémoc-Moctezuma.

Las cepas fueron mantenidas con resiembras periódicas en viales con agar MYPG (peptona, 3.5 g; extracto de levadura, 3.0 g; K_2HPO_4 , 2.0 g; $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 1.0 g; $(NH_4)_2SC_4$, 1.0 g; glucosa, 20 g; agar, 20 g por litro de agua). Fueron conservadas en refrigeración a 4° C hasta su uso.

5.2 Iniciadores Utilizados

Fueron diseñados iniciadores para los genes: LgFLO1, FLO1, FL05, FL08, FL09, FLO10, FL011, ACT utilizando como base las secuencias nucleotídicas del Nacional Center for Biotechnology Information (NCBI, 2006), el Global Gene Hunter de Stanford Genome Database (SGD, 2006) y los programas de diseño DNA STAR Megalign y Gene Quest (ambos de DNASTAR Inc, v 4.05). En la tabla I se resumen las características principales de estos genes.

Tabla 1

Tipo de genes estudiados, su nombre oficial, número de identificación y localización en *Saccharomyces cerevisiae*

Gen	ORF	# ID NCBI	Región
LgFLOI	No se tiene	D89860	Posiblemente Chr VIII
FLOI	YAR050W	851289	Chr I: 203394 al 208007
FL05	YHR211W	856618	Chr VIII: 525392 a 528619
FL08	YER109C	856845	Chr V: 377610 a 375211
FL09	YAL063C	851236	Chr I: 27969 a 24001
FEO 10	YKR102W	853977	Chr XI: 645994 a 649503
FLOI 1	YIR019C	854836	Chr IX: 393672 a 389569
ACT	YFF039C	850504	Chr VI: 54695 a 53260

Se tomaron los siguientes criterios para el diseño de iniciadores (Ribicki, 2001):

- Contar con un porcentaje de GC entre el 30 y 60%
- Los iniciadores con 20 o más pares de bases
- El tamaño estimado de los productos amplificados debe ser separable por electroforesis.

Por último se sometieron a pruebas de 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, Iceland) y Ampify 3.1. (Engels, Univ. Wisconsin US).

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

5.3 Identificación de Genes FLO por PCR punto final

5.3.1 Cultivo

Consistió en tomar una asada de la cepa e inocular en un tubo de 50 mL tapón rosca conteniendo 10 mL de caldo YPD (extracto de levadura, 10 g; peptona caseína, 20 g; peptona, 20 g; por litro de agua bidestilada), e incubado 72 h. en agitación a 150 rpm a 30° C.

5.3.2 Extracción de ADN Total

Fué utilizada la técnica incluida en el manual Twintrack Advanced Labs (Siebel Inst. of Technology, 2006) basado en extracción de fenol-cloroformo y modificando lo siguiente:

Se tomaron alícuotas al cultivo homogenizado de levadura en tubos de 1.5 mL y fué centrifugado por 10min a 14000 rpm. El sobrenadante se descartó y al paquete celular (entre 0.1 y 0.2 mL) le fueron agregados 660pL de 50TE-10% SDS (EDTA, 3.7 g; Tris, 3.03 g en 1 L. Ajuste pFI a 7.5. Posteriormente se mezclaron 200 mL de la solución anterior con 20 mL de SDS 10% previamente esterilizada por filtración.)

Se agitó e incubó a 65° C por 10 min., homogenizando por inversión después de 5 min.

Hecho esto, fueron agregados 660 pL de una mezcla fenol-cloroformo 1:1, homogenizo en vortex para luego centrifugarse por 2 min a 14000 rpm.

Fueron tranferidos 600 pL de sobrenadante a un tubo limpio y se agregan 600 pL de isopropanol absoluto para luego mezclarse por inversión e incubarse por 8 h a 4° C.

Posteriormente, se centrifugó 10 min. a 10000 rpm, descartando el sobrenadante y lavando el pellet con 100 pL de etanol absoluto frío a -20° C.

Se removió el etanol y el tubo con el pellet se dejó secar por 15 min. a temperatura ambiente.

El pellet fue resuspendido en 50pL de TE IX (Tris, 12 g y EDTA, 4 g; en 1 L de agua. Ajuste a pH 8. Diluir 1/10 para producir IX), haciendo pasar el tubo sobre una superficie rugosa. Al notar disolución, éste fué incubado por 5 min a 65° C.

Después le fue adicionado 0.5uL de RNAsa One (Promega) a concentración 10 U/pL y se incubó a 37° C por 30 min.

Posteriormente se guardó la alícuota a -20° C hasta su uso.

5.3.3 Amplificación de Genes FLO

5.3.3.1 PCR Punto Final

El coctel para PCR fue preparado en todos los casos utilizado el Kit Go Taq (Promega) de la siguiente forma:

Tabla II

Mezcla de reacción para amplificación de amplicones FLO mediante PCR punto final.

Componente	Conc. inicial	Conc. deseada	pL/reacción
Agua mQ			35
Buffer Verde	5X	1X	10
dNTP's	25Mm	200pM	0.5
Primer F	50pM	1pM	1
Primer R	50pM	1pM	1
Taq Polimerasa	5U/pL	2.5U/reacción	0.5
ADN	250ng/uL	10ng	2
Total			50

Todas las PCR fueron realizadas en un termociclador Gene Amp PCR system 2400 (Perkin-Elmer). Las condiciones fueron las mismas en todas las corridas de PCR:

Tabla III

Condiciones del termociclador para amplificación de genes FLO mediante PCR punto final.

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
94	5min	XI
94	30 seg.	X35
52	1 min	
72	1 min	
72	4min	XI
4	indefinido	XI

Acabado el ciclo de PCR, estos productos fueron utilizados y/o guardados a -20° C.

5.3.3.2 Verificación del Tamaño de Amplicones

Se verificó y comparó el tamaño de los amplicones de cada experimento realizando electroforesis en gel de agarosa al 1.5%. Los fragmentos observados fueron comparados con lo pronosticado por los programas de PCR *in silico* para cada uno de los productos amplificados.

5.4 Identificación de Transcritos de Genes FLO por qPCR

5.4.1 Fermentación en Condiciones que Afectan la Floculación

5.4.1.1 Mosto

Al mosto estéril proporcionado por CCM, se le analizó y ajustó el contenido de Ca^+ (60-80 ppm), Zn (> 0.5 ppm para la cepa C790 y >0.8 ppm para las cepas ATCC 7754 y C-820) y FAN ($> a 170$ ppm en mostos con 16° P y $> a 150$ en mostos con 12° P).

Las fermentaciones se llevaron a cabo en esterilidad ajustando primero la cantidad exacta de mosto a utilizar, el cual por cada repetición se utilizó 3800 mL por duplicado. La concentración inicial de oxígeno se ajustó a lppm por cada $^\circ$ P con ayuda de un burbujeador de vidrio introducido en el mosto a 4° C y conectado al oxígeno a través de un filtro metálico, dejando pasar el oxígeno con un burbujeo moderado de 5 minutos.

5.4.1.2 Inoculo

El inoculo se ajustó a 1.2×10^6 cel/mL por cada grado Plato. La temperatura se mantuvo en 16° C $\pm 1^\circ$ C hasta completar 7 días de fermentación. Durante el curso de las fermentaciones se monitoreó diariamente el número de células en suspensión, pH y $^\circ$ P así como el diacetilo en el T día, los cuales se requieren para saber si se realizó una buena fermentación. Cada fermentación se realizó por duplicado para cada una de las cuatro variables evaluadas en cada cepa, usando 2 condiciones extremas para cada variable, presentes actualmente en la industria de elaboración de cerveza.

5.4.1.3 Levadura en Condición de Represión Catabólica.

Se obtuvieron mostos con una relación de glucosa:maltosa 1:10 y 10:1 como sigue: en un matraz de 12L se colocaron 6L de mosto estéril normalizado a 17° P agregando después 4.5ml de enzima amiloglicosidasa Attenuzyme (Novo). Este mosto se esterilizó ajustando la temperatura de la autoclave a 67° C de temperatura máxima, una vez que llegaron los sensores en el mosto a 50° C se bajó la temperatura de la autoclave a 60 ° C, a los 9 min. transcurridos se aumentó la temperatura hasta alcanzar 90 ° C con el fin de inactivar la enzima, para luego apagar el autoclave. Se tomó una muestra para análisis de carbohidratos mediante HPLC. En el perfil alto en maltosa (condición basal) se esperó un contenido de Maltosa 9.78%, Glucosa 1.16% y Fructuosa 0.13%. De esta condición se hicieron 2 probetas duplicadas. En el perfil alto en Glucosa (condición de prueba) se esperó un contenido Maltosa 6.07%, Glucosa 10.04% y Fructuosa en un 15%. De esta condición se hicieron 2 probetas duplicadas.

La levadura fue colectada al final de cada fermentación, por decantación del producto, y fue analizada respecto a su capacidad de floculación. De la levadura cosechada, se obtuvieron 5 g de cada probeta y fueron guardados a -70° C hasta la extracción del ARN total.

5.4.1.4 Levadura para Condición de Edad Generacional Alta

En el caso de la condición de Edad Generacional, se tomó levadura de I^a generación de las cepas C-790 y C-820 (condición basal), otra de generación 13 para la cepa C-790 y generación 9 para la cepa C-820 (condición de prueba). Para esta condición solamente se estudiaron las cepas C-820 y C-790. La levadura se colectó al final de la fermentación, por decantación para luego analizar su capacidad floculante. Se obtuvieron 2 muestras de cada condición. Las alícuotas fueron guardadas a -70° C hasta la extracción del ARN total.

5.4.2 Evaluación de la Floculación

Se analizó la capacidad de floculación por medio del método modificado de Bidard *et al.* (1994), en el cual 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 cel/mL para dar una absorbancia de 1.0 a 600 nm. Un total de 800 pL de células suspendidas se añadió a una celda espectrofotométrica de 1 cm. La floculación se inició por la adición de 200 pL de CaCl_2 100 mM para tener una concentración final de 20 mM. La cubeta fué sellada con parafilm e invertida varias veces antes de leer a 600 nm a 0 min y se dejó transcurrir hasta alcanzar 17 min para la cepa C-820 y para la cepa C-790 se midió hasta alcanzar 18 min. Se estandarizó por medio de una curva de floculación el día en el que se analizó la floculación midiendo diariamente la floculación de las dos cepas, para luego tomar un día antes del pico máximo de floculación. Los resultados se reportaron como % de células floculadas por tiempo en muestras por triplicado.

5.4.3 Extracción de ARN Total

Para la extracción del ARN total de levaduras se utilizó el kit High Puré RNA Isolation (Roche Applied Science), de acuerdo con el protocolo del fabricante. De cada muestra de levadura (2 condición de prueba, 2 basal, ambas réplicas biológicas) se obtuvieron 4 preparaciones de ARN total. Estas muestras fueron mezcladas según su tipo en un solo tubo y concentrados en un equipo concentrador de ADN a 30° C por aproximadamente 1 h o hasta tener aproximadamente 50 pL de volumen. Estas muestras fueron guardadas a -70° C hasta su uso.

5.4.4 qPCR

5.4.4.1 Obtención de cADN

Los tubos conteniendo ARN total congelado son cuantificados para saber su concentración. La mezcla de reactivos para realizar la PCR reversa se realizó con el

kit Reverse Transcription M MLV (Promega) de acuerdo con el protocolo del fabricante y ajustando la cantidad de ARN a 4 pg como sigue:

Tabla IV

Mezcla de reacción para la obtención de cADN a partir de ARN total mediante PCR reversa.

Componente	Conc. inicial	pL/reacción
Agua mQ		variable
Buffer	5X	5
RNasin	25U	0.5
dNTP's	10mM	5
Oligo(dT)	0.5pg	1
ARN total	variable	variable
M MLV-RT	200U	2
Total		25

La reacción de PCR reversa fue como sigue:

Tabla V

Condiciones del termociclaodor para la obtención de cADN a partir de ARN total mediante PCR reversa.

Temperatura °C	Tiempo	Ciclos
25	5min	XI
37	60min	
70	10 min	
4	indefinido	

Los tubos conteniendo cDNA se guardaron a -20° C hasta su uso.

5.4.4.2 Medición de Cp

Se utilizó el equipo LightCycler 2.0 (Roche Diagnostics) el cual tiene un sistema térmico de aire y una capacidad de 32 muestras, acoplado a su programa ver. 4.0 y el kit LightCycler Fast Start DNA Master SYBR Green I (Roche Applied Science). Aunque el fabricante recomienda utilizar iniciadores que amplifiquen productos de preferencia con 300 pb, se utilizaron los mismos iniciadores que con la detección de genes FLO, debido a economía, tiempo y a la escasez de regiones hipervariables entre los genes FLO.

Para la detección de transcritos en general, la mezcla de reacción se colocó en capilares de 20 pL que consistió en lo siguiente:

Tabla VI

Mezcla de reacción para las muestras de qPCR.

Componente	Conc. Stock	Conc. deseada	pL/reacción
Iniciadores	4pM	0.5pM	5
cDNA	4pg	4pg	1'
Mezcla enzima/SYBR Green I Buffer	10X	IX	2
MgCl ₂	25mM	2mM	0.8
Agua			11.2
Total			20

Se incluyeron controles positivos de la misma cepa en estudio según el caso, utilizando 150ng de ADN. Para los controles negativos se sustituyo el material genético por agua. En todas las pruebas se incluyeron en la corrida preparaciones con iniciadores para detección de la actina (ACT) como gen de referencia.

El tiempo real se ajustó de la siguiente manera:

Tabla VII

Condiciones del termociclador para la detección de amplicones en qPCR.

Tipo de Análisis	Ciclos	Segmento	Temperatura °C	Tiempo	Modo de adquisición
Pre-Incubación					
Desnaturalización	1		95	10min	none
Amplificación					
Cuantificación	45	desnaturalización	95	10seg	none
		Alineamiento	52	5seg	none
		Extensión	72	50seg	single
Curva de melting					
Curva de disociación	1	desnaturalización	95	0seg	none
		Alineamiento	65	15seg	none
		Meeting	95	0seg	continuous
Enfriamiento					
Ninguno	1		40	30seg	none

Se realizaron 3 experimentos en 3 días consecutivos de cada gen/cepa/condición experimental. Se tomaron en cuenta los Cp de los amplicones el cual es inversamente proporcional a la concentración inicial del cADN presente en la muestra y representa el punto donde empieza el aumento de la fluorescencia en el sistema de detección del equipo. Esta medida de calidad se empleó para hacer las comparaciones mediante gráficos de cajas (Dytham, 1999), con el programa estadístico Minitab 13.32 (Minitab Inc, 2000).

5.4.4.3 Verificación de Tamaño de Amplicones

Se verificó el tamaño de los amplicones de cada experimento realizando electroforesis en gel de agarosa al 2%. Los fragmentos observados fueron comparados con lo pronosticado por los programas de PCR *in silico* para cada uno de los productos amplificados.

5.5 Cuantificación de ADN y ARN

La cuantificación de ADN y ARN a partir de muestras de levadura se hicieron en un Espectro fotómetro Smart Spec 3000 (BioRad) diluyendo el ADN 1:100 en agua mQ libre de nucleasas, para luego medir en una cubeta 50 pL a 260/280. Se aplican luego las fórmulas necesarias para obtener los pg/pL del ácido nucleico en la muestra.

5.6 Electroforesis en Gel de Agarosa

Los productos de las reacciones de PCR punto final y qPCR fueron separados mediante electroforesis en geles de agarosa (Standard Low-Mr Bio Rad), enfriando a 50° C aprox. y agregando a 50 mL de agar 2 pL de bromuro de etidio a 5 pg/pL.

A cada pozo fueron depositados 15 pL de cada producto de PCR. Se utilizó como marcador una escalera Hyperladder IV (Bioline) de 100 a 1000 pb. Esto fue separado a 85V/ 90min con buffer TBE al IX (0.09 M Tris-borato; 0.002 M EDTA (pH 8.0)).

Los geles procesados fueron visualizados y fotodocumentados en un

Transiluminador (UVP) con longitud UV baja.

5.8 Medición de B_{\max} y $K_{<j}$ en Levaduras

5.8.1 Obtención de Muestras

Las muestras de levadura fueron colectadas asépticamente de tanques de cultivos de propagación en primera o segunda generación industrial y guardados en frascos plásticos estériles y transportados en frío. Se procedió a procesarlos el mismo día.

5.8.2 Caracterización del fenotipo de las Cepas de Levadura Industrial.

Se caracterizó el fenotipo de las cepas C-820 y C-790 según la técnica utilizada por Nishihara (Nishihara, *et al.*, 2002) modificando lo siguiente:

La suspensión celular fue ajustada a 53×10^6 cel/mL, para luego colocar el volumen correspondiente en tubos de 20 x 150. Luego se aforó cada tubo a 20mL de esta suspensión con alguna de las soluciones de mañosa 0.1M, glucosa 0.1M, Ca_2Cl 5mM además se incluyeron tubos conteniendo suspensión de levadura en buffer de Acetatos (0.1M Acetato de sodio pH 4.5 con 5% v/v etanol esterilizado con filtración) y EDTA 10mM.

5.8.3 Determinación Ligando-Receptor con FITC-Avidina.

Se utilizó la técnica mencionada por Speers (Speers, *et al.*, 2006) con algunas modificaciones:

5.8.3.1 Ajuste de Células.

Se lavó y centrifugó la levadura 3 veces a 500xG por 2 min con agua destilada, después fue suspendida una alícuota de levadura en buffer de acetatos con 10mM EDTA realizando el conteo en un hemocitómetro.

La levadura lavada se diluyó en buffer de acetatos a 12×10^6 cel/mL en las cepas C-790 y ATCC 7754; y a 6×10^6 cel/mL la cepa C-820. Esta preparación se mantuvo refrigerada a 8°C utilizándola el mismo día.

5.8.3.2 Preparación de FITC-Avidina.

Se utilizó la solución de FITC-Avidina Conjúgate (Sigma) a 2.3mg/mL, la cual fue diluida en buffer de acetatos en concentraciones finales (620pL) de: 74.19, 55.62, 37.09, 27.82, 18.54, 9.27, 3.7 pg/pL.

5.7.3.3 Preparación de Muestras a Medir por Fluorometría.

5.7.3.3.1 Unión Específica. A tubos con 300 pL de la suspensión de levaduras se agregaron respectivamente 20 pL de cada una de las suspensiones de FITC-Avidina. Se mezcla ligeramente y se adicionaron 300 pL de buffer de Calcio (buffer de acetatos con 2.1 mM CaCf) dando un total de 620 pL. Luego se mezcla 10 s en vortex y fue centrifugado a 3000 rpm por 3 min.

5.7.3.3.2 Unión Inespecífica. A tubos con 300 pL del buffer de mañosa se le agregaron 300 pL de la suspensión de levaduras. Se mezcló ligeramente y se agregaron respectivamente 20 pL de cada una de las suspensiones de FITC-Avidina a cada tubo, resultando en 620 pL. Luego se mezcló 10 s en vortex y centrifugó a 3000 rpm por 3 min.

5.7.3.3.3 Curva de Calibración FITC-Avidina. A cada tubo con 600 pL de buffer de Acetato se agregaron respectivamente 20 pL de cada una de las suspensiones de FITC-Avidina, dando 620 pL en cada tubo. Se mezclaron 10 s en vortex.

5.7.3.4 Lectura de Muestras con Fluorómetro.

Se colocaron 200 pL de cada una de los preparados de 620 pL en placas de microtitulación transparente de 96 pozos con tapa (Corning).

Las placas fueron leídas en un Fluorómetro a λ 495 nm de excitación y λ 520 nm de emisión. Los resultados se procesaron en el programa Excel (Microsoft, 2000) Prism5 (GraphPad 2005) para obtener gráficas de saturación y Scatchard.

6. RESULTADOS

6.1 Diseño de Iniciadores

En una serie de ensayos de aproximación se probó *in silico* la posible aplicación de algunos iniciadores previamente diseñados (Jibiki M. *et al.*, 2001.), pero sin tener los resultados esperados. Por lo tanto, en este estudio fue necesario el diseño de nuevos iniciadores, los cuales se exponen en la Tabla VIII, junto como sus propiedades.

Tabla VIII

Iniciadores utilizados para la amplificación de genes FLO y sus transcritos con PCR y RT-PCR en las cepas C-820, C-790 y ATCC7754.

Nombre	Iniciador (5'- 3')	Tm °C	%GC	Tamaño (pb)
LgFLOIF	GCTCTGCAGT AAATTCCG	53.7	50	312
LgFLOIR	GGG CCATAGTATATGGAGAGATGGG	64.6	52	
FLOIF	ATGACAATGCCTCATCGC	53.7	50	596
FLOIR	CTTCCACCCCATGGCTTGATACCGTC	68.0	57.7	
FL05	GACAATTGCACACCACTGC	56.7	52.6	423
FL09,5R	CCTGTCATTTCTAGGGTTACG	57.9	47.6	
FL08F	CATGCGGCAAGGCT ACAACACG	64.0	59.1	920
FL08R	GTGTTAGGGGGACTGCG	57.6	64.7	
FL09F	GCGGCATGCCTGCCAGCAAACCTCA AGG	71.0	63	347
FL09,5R	CCTGTCATTTCTAGGGTTACG	57.9	47.6	
FLOIOF	AACTGGTACCTACACATTTGGC	58.4	45.5	270
FLOIOR	GGCAAT ACCACACTAACAGG	57.3	50	
FL011F2	CCTTGTTCAACTGGTACTGGCG	62.1	54.5	749
FLOIIR	T AGAAT AC AACT GGAAG AGCG	55.9	42.9	
ACT3F	GAGTTGCCCCAGAAGAACACCC	61.4	59.1	591
ACT6R	CCTTACGGACATCGACATCACA	57.4	50	

6.2 Identificación de Genes FLO

Se obtuvo la mejor temperatura de alineamiento para la PCR en la que se obtuvieron los fragmentos al tamaño esperado. En la figura 1 se demuestra cada fragmento según el gen FLO para el cual los iniciadores fueron diseñados. Dado que en las tres cepas de levadura estudiadas no se encontró el fragmento para el gen FL09, en la figura 2 se incluyó el perfil de la cepa 2036 donde se observa este fragmento.

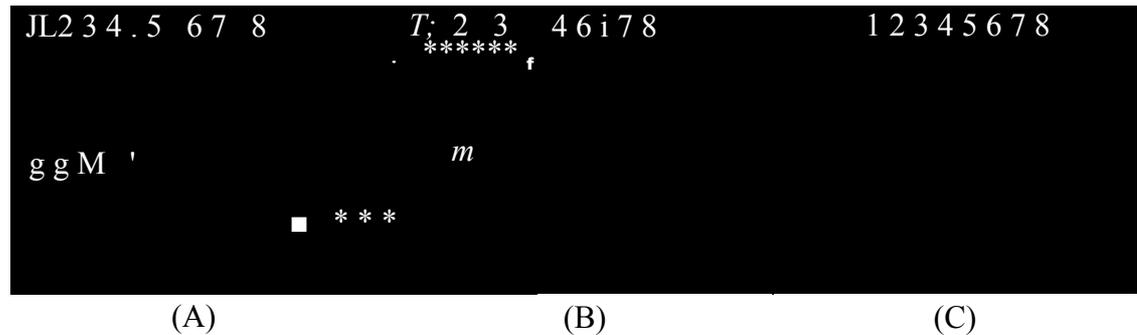


Figura 1. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR punto final para los genes FLO en (A) C-820, (B) RT-790, (C) ATCC 7754. Cada carril fue cargado con 15uL del producto, corrido a 85v/ 90min y teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1 Marcador (100-1000 pb); 2 LgFLO1 312 pb; 3 FL05 423 pb; 4 FL09 347 pb; 5 FL08 920 pb; 6 FLO 10 270 pb; 7 FLO1 1 749 pb; 8 FLO1 596 pb.

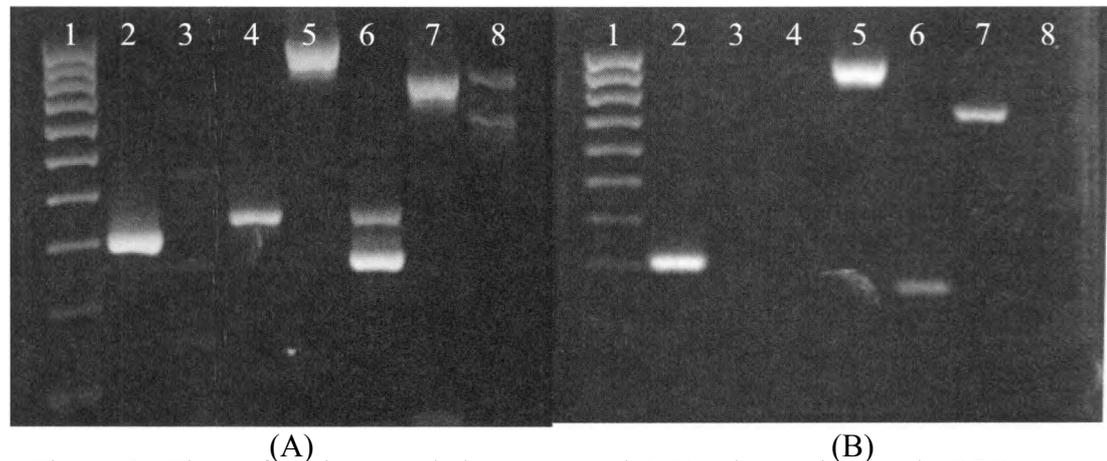


Figura 2. Electroforesis en gel de agarosa al 1.5% de productos de PCR punto final para los genes FLO en (A) 2036 y (B) BRY. Cada carril fue cargado con 15uL del producto y corrido a 85v/ 90min y teñido con Bromuro de etidio. Carriles: 1 Marcador (100-1000 pb); 2 LgFLO1 312 pb; 3 FL05 423 pb; 4 FL09 347 pb; 5 FL08 920 pb; 6 FLO 10 270 pb; 7 FLO1 1 749 pb; 8 FLO1 596 pb.

Las detecciones de las amplificaciones se suman en la tabla IX indicando detección (+) o no detección (-) del amplicón buscado por tamaño, además del índice de floculación para cada cepa estudiada.

Tabla IX

Distribución de genes FLO en levaduras cerveceras.

Cepa	FLO1	FL05	FL08	FL09	FLO 10	FLO1 1	LgFLO1	#Genes FLO	Floculación
820	+	.	+	.	+	+	+	5	4.5
BRY	.	.	+	.	+	+	+	4	3.8
2036	.	.	+	+	+	+	+	5	3.6
790	+	.	+	.	.	+	+	4	2.5
7754	+	+	.	.	.	+	.	3	0

6.3 Identificación de Transcritos.

6.3.1 Selección de Condiciones de Estrés a Trabajar.

En la tabla X se muestran los resultados correspondientes a los distintos tipos de estrés estudiados y el impacto en la floculación fisiológica medido en porcentajes del promedio de tres repeticiones. Es fácil distinguir las diferencias entre un estado basal o normal con respecto al de estrés, por lo que se tomaron en cuenta las condiciones de Edad Generacional y Restricción Catabólica

Tabla X

Porcentajes de Floculación de las cepas de levadura estudiadas en condiciones de cultivo estándar y de estrés.

Factor de estrés	C-820		C-790		ATCC 7754	
	Estándar	Estrés	Estándar	Estrés	Estándar	Estrés
Represión Catabólica	47.78%	27.52%	47.05%	33.45%	2.61%	1.28%
Edad Generacional	35.99%	72.03%	65.43%	80.84%	N/A	N/A

En las figuras 3 y 4 se muestran cursos temporales de las cepas C-820 y C-790 para determinar el mejor día en el que probablemente se encontraban los transcritos de los genes FLO, el cual fue un día antes del pico máximo de la floculación.

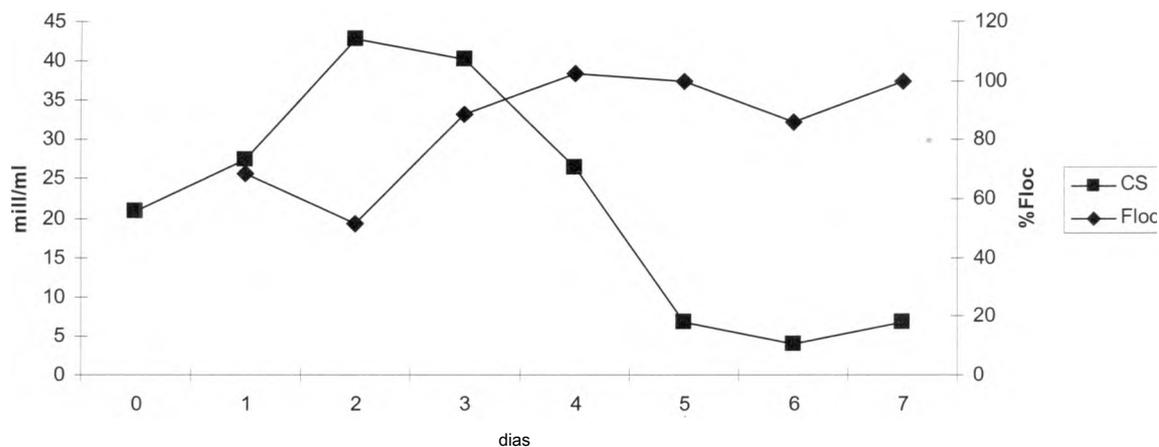


Figura 3. Curso temporal para C-790. Determinación del día de máxima floculación en condiciones estándar de elaboración. Se resolvió tomar muestras del 3 día, un día antes del máximo para búsqueda de transcritos FLO.

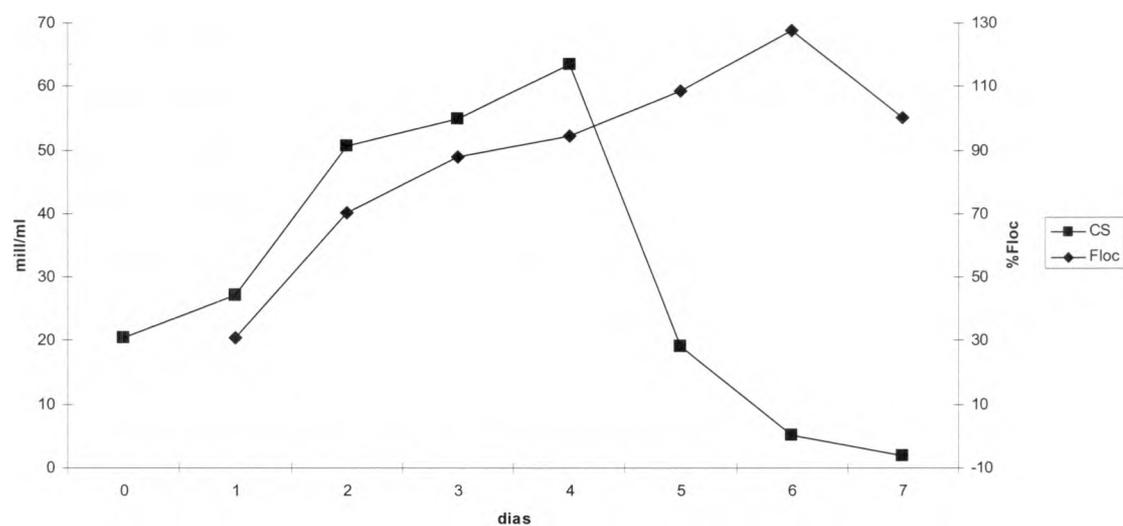


Figura 4. Curso temporal para C-820. Determinación del día de máxima floculación en condiciones estándar de elaboración. Se resolvió tomar muestras del 5 día, uno antes del máximo de floculación para búsqueda de transcritos FLO.

6.3.2 Comparativo entre Cp de LgFLOI.

Los iniciadores utilizados demostraron tener buena funcionalidad en la qPCR, dado que los controles con solo iniciadores y positivos con ADN dieron lo esperado.

La mejor forma de exponer los resultados de la qPCR fue utilizando los valores de punto de corte o Cp de los transcritos detectados, ya que es una medida de calidad y eficiencia de la amplificación y dado que la técnica se montó en dos pasos, donde la obtención del cADN fue realizada previamente y guardada por un tiempo, pudiendo afectar esto a una cuantificación final. El mejor método para presentar esto fue con gráficos de cajas, pues sólo había una variable en consideración, los datos eran discretos, y había menos de 30 valores diferentes en cada grupo, por lo que fue fácil reconocer diferencias entre los diferentes conjuntos de datos al comparar posición y distribución en la gráfica.

En la figura 5, se comparó la condición de estrés Represión Catabólica para los transcritos de LgFLOI donde los valores de Cp del gen constitutivo ACT de las cepas C-820 y C-790 para ambas condiciones, no muestran diferencias significativas entre ellas, lo que indica estabilidad en las funciones básicas de la célula; a diferencia de las vistas en las Cp de los transcritos de LgFLOI que al aplicar las condiciones de estrés se apreciaron diferencias, siendo más notables en la C-820, donde empeora la Cp.

En la figura 8 se comparó la condición de estrés Edad Generacional Alta para los transcritos de LgFLOI donde las Cp del gen casero ACT de la cepa C-790 muestra una ligera diferencia aunque dentro del rango, no así en C-820 donde permaneció sin cambios notables; al aplicar las condiciones de estrés se apreciaron diferencias en las Cp de los transcritos de LgFLOI de C-790 en forma negativa, en tanto hubo una mejora en la correspondiente a la de C-820.

La figura 11 compara entre las Cp de Edad Generacional y Represión catabólica, mientras la figura 12 sumariza todas las Cp incluyendo la ACT.

A pesar de que a cada análisis de detección se le realizó una curva de disociación, ésta sólo se aprovechó para ver la pureza de la amplificación y no para la identificación positiva de los productos dado que las Tm eran demasiado similares

entre sí, por lo que se decidió realizar electroforesis en gel de agarosa de estas amplificaciones comparando entre sí y con el tamaño esperado.

En las figuras 6 y 7 para condiciones de Represión Catabólica así como en las figuras 9 y 10 para Edad Generacional Alta, se pudo apreciar que las amplificaciones fueron visibles según el tamaño esperado. En los controles de ADN total fue posible identificar las amplificaciones a partir de cADN para LgFLO1 y ACT; no se observó amplificación en los blancos que contienen todo excepto ADN o cADN.

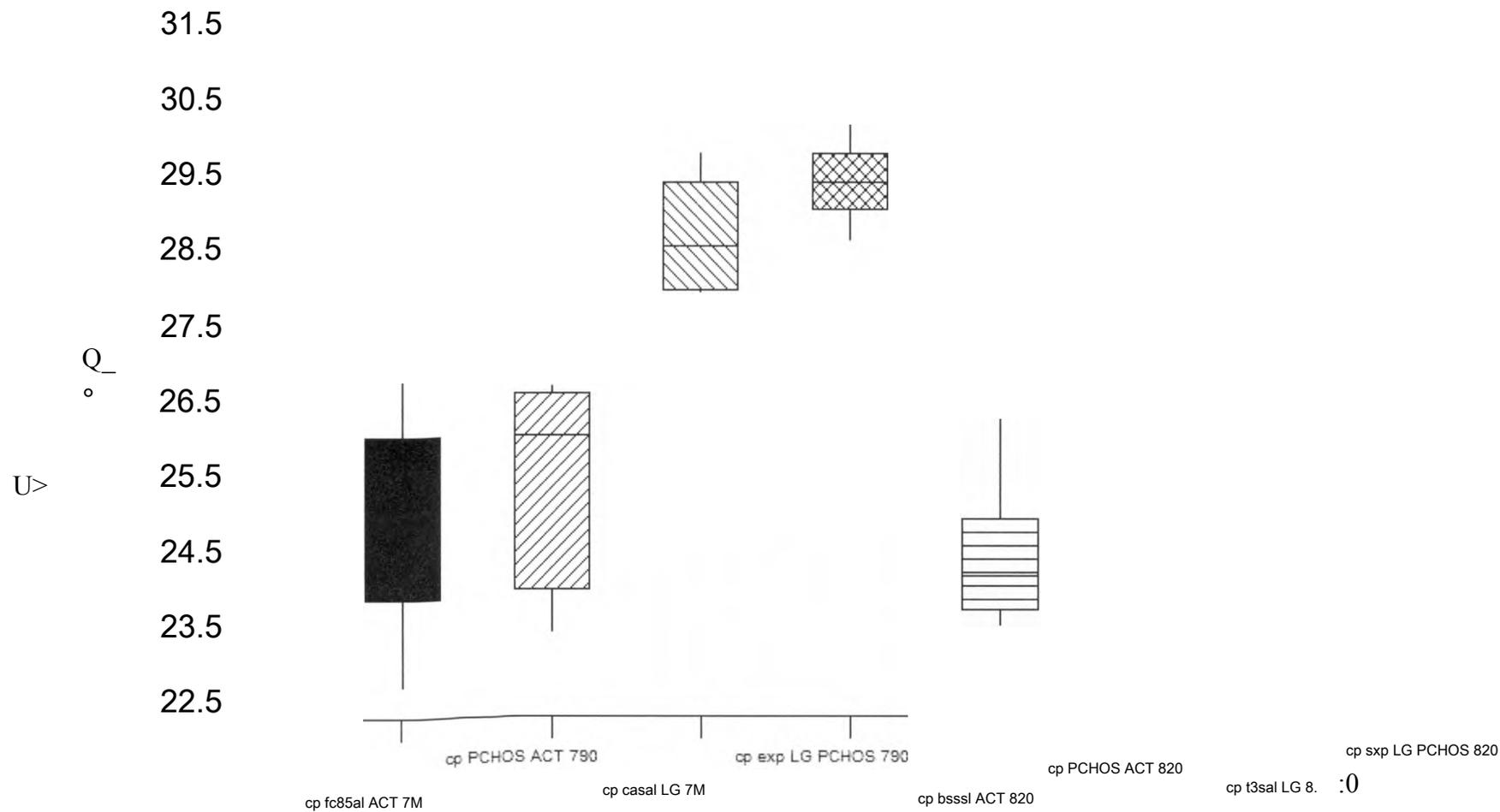


Figura 5. Comparativo de Cp entre las cepas C-820 y C-790 de LgFLOI en condición Represión Catabólica (PCHOS). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre el gen casero, la condición basal y la condición experimental de las dos cepas. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad del transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.



Figura 6. Electroforesis de productos qPCR C-790 Represión Catabólica gen LgFLO1 (312pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 LgFLO1; 3 y 4: condición exp 3 y 4 LgFLO1; 5: marcador 100 a 1000pb; 6 Ctrl. ADN 790 LgFLO1; 7: blanco LgFLO1; 8 y 9: ACT normal exp. 1 y 2; 10 y 11 ACT condición exp. 3 y 4; 12: Ctrl. ACT ADN C-790 (591pb); 13 blanco ACT; 14 marcador 100 a 1000pb.

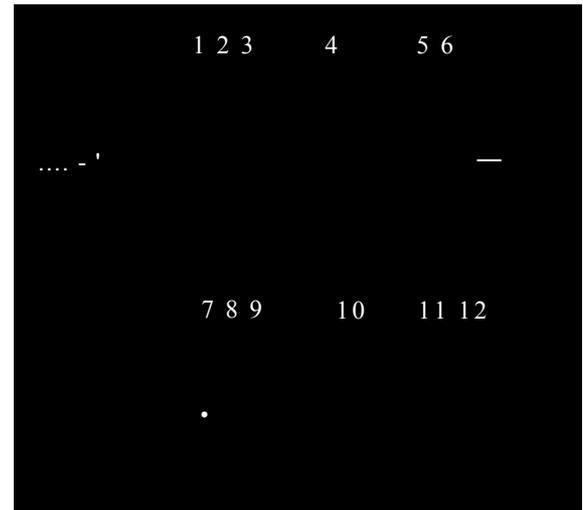


Figura 7. Electroforesis de productos qPCR C-820 Represión Catabólica gen LgFLO1 (312pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 LgFLO1; 3: condición exp 3; 4: marcador 100 A 1000pb; 5: condición exp. 4 LgFLO1; 6 Ctrl C-820 LgFLO1; 7: blanco LgFLO1; 8: ACT normal exp 2; 9: condición exp 4; 10: marcador 100 a 1000pb; 11: Ctrl. ACT ADN C-820 (591pb); 12: blanco ACT.

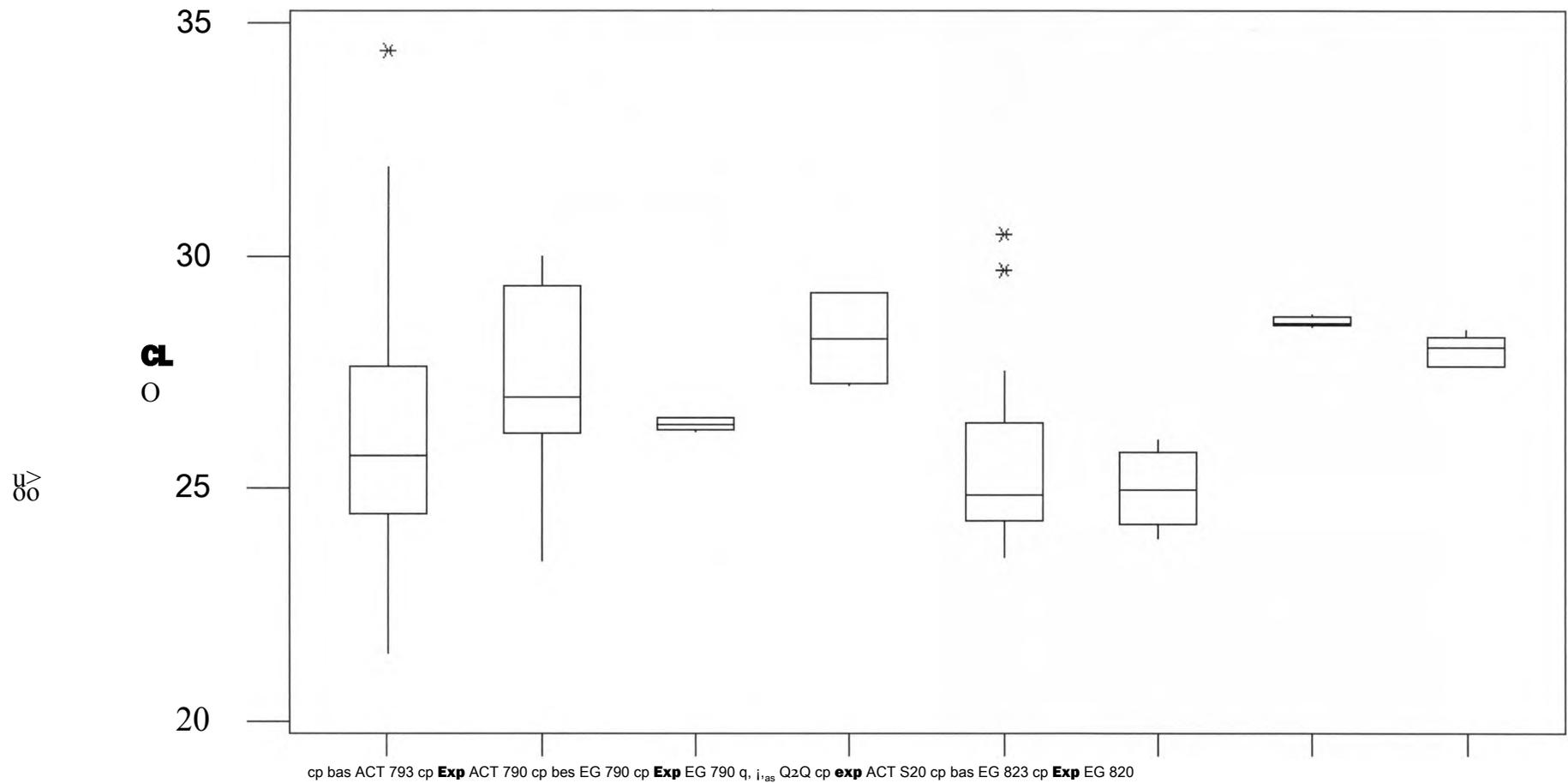


Figura 8. Comparativo de Cp entre las cepas C-820 y C-790 de LgFLOI en condición Edad Generacional (EG). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre el gen casero, la condición basal y la condición experimental de las dos cepas. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad del transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.

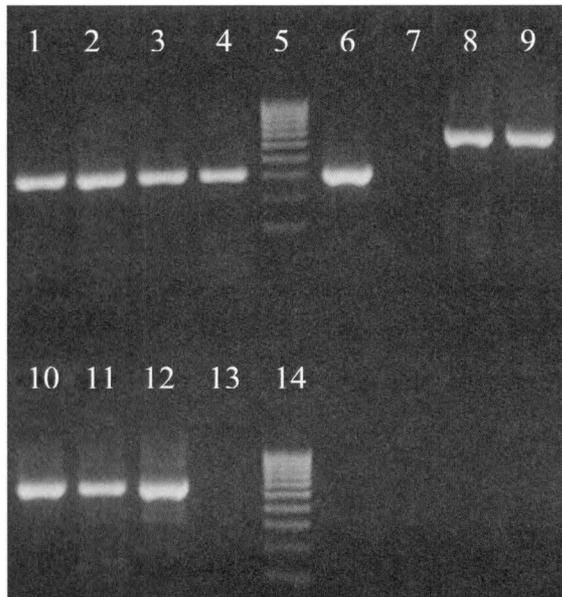


Figura 9. Electroforesis de productos qPCR C-790 Edad Generacional gen LgFLOI (312pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 LgFLOI; 3 y 4 : condición exp 3 y 4 LgFLOI; 5: marcador 100 a 1000 pb; 6 Ctrl. ADN C-790 LgFLOI; 7: blanco LgFLOI; 8 y 9: ACT normal exp. 1 y 2; 10 y 11 ACT condición exp. 3 y 4; 12: Ctrl. ACT ADN C-790 (591pb); 13 blanco ACT; 14 marcador 100 a 1000pb.



Figura 10. Electroforesis de productos qPCR C-820 Edad Generacional gen LgFLOI (312pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 LgFLOI; 3 y 4 : condición exp 3 y 4 LgFLOI; 5: marcador 100 a 1000 pb; 6 Ctrl. ADN C-820 LgFLOI; 7: blanco LgFLOI; 8 y 9: ACT normal exp. 1 y 2; 10 y 11 ACT condición exp. 3 y 4; 12: Ctrl. ACT ADN C-820 (591pb); 13 blanco ACT; 14 marcador 100 a 1000pb.

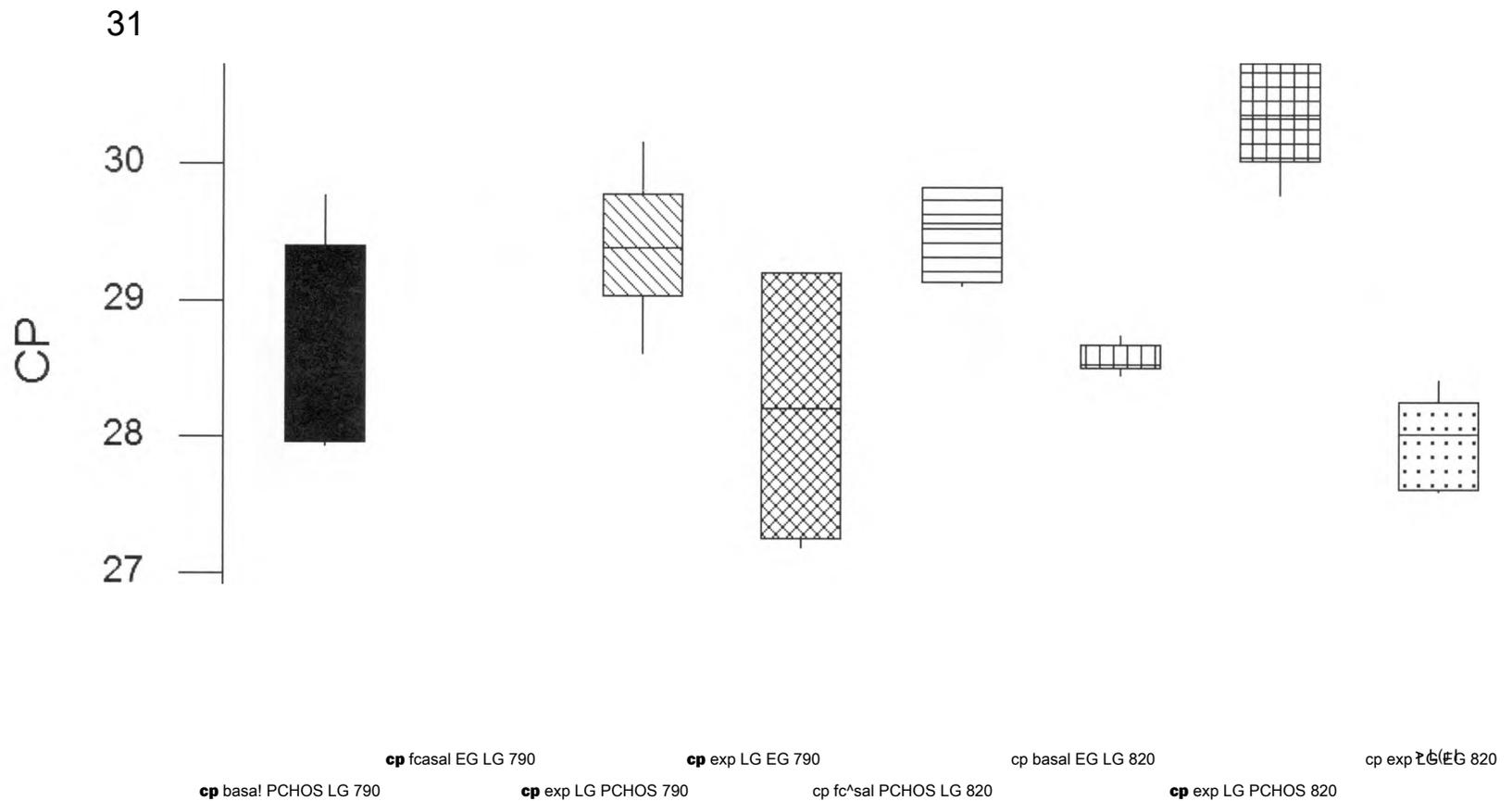


Figura 11. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de LgFLOI Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre la condición basal y la condición experimental de ambas cepas entre las dos condiciones de estrés. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.

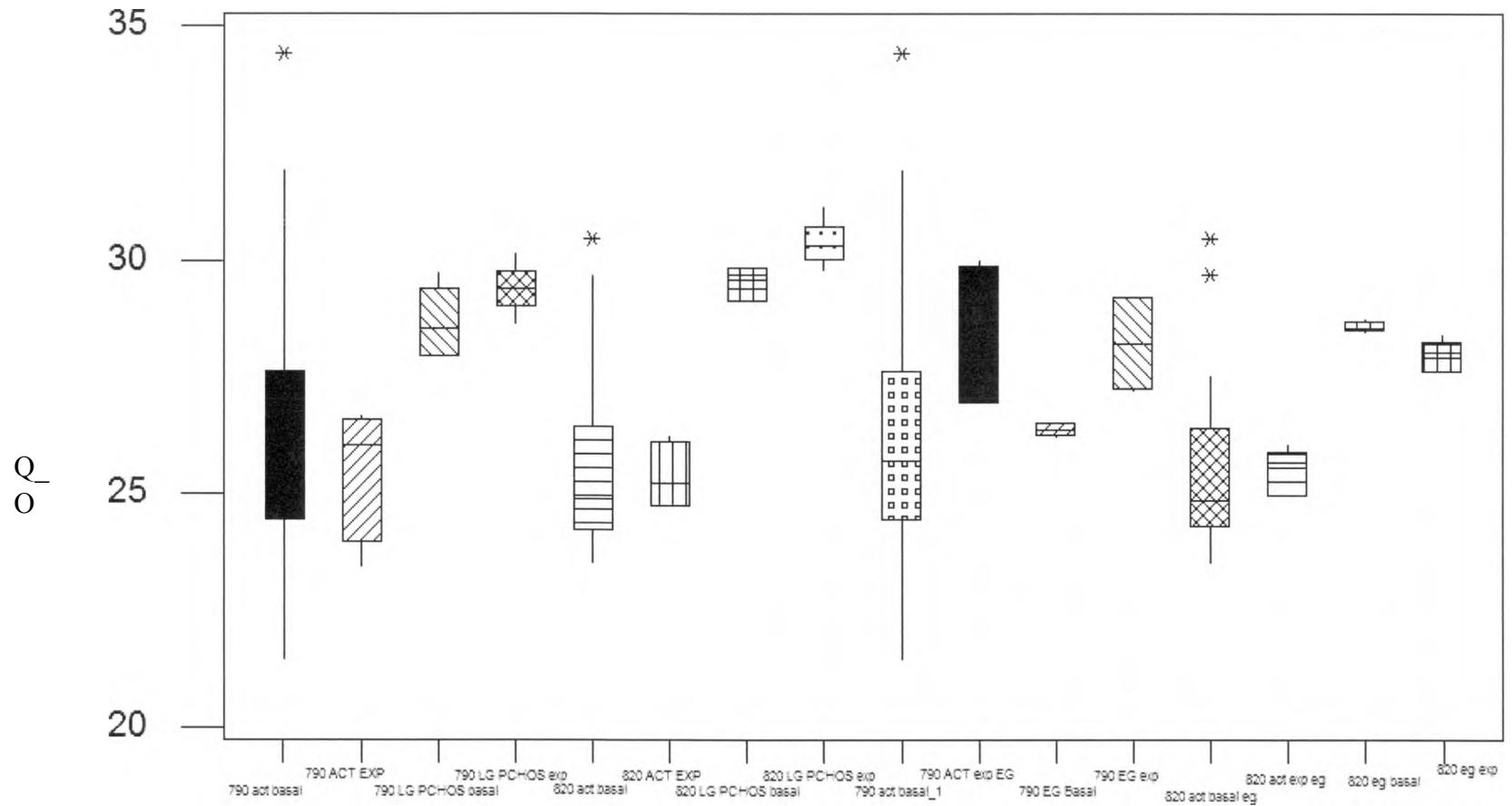


Figura 12. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de LgFLOI Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre ACT, la condición basal y la condición experimental de ambas cepas entre las dos condiciones de estrés. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.

6.3.3 Comparativo entre Cp de FL08.

En los resultados de la figura 13, donde se comparó la condición de estrés Represión Catabólica para los transcritos de FL08, no se notaron cambios significativos en las Cp del gen casero ACT de las cepas C-820 y C-790 para ambas condiciones, así como tampoco en las Cp de los transcritos de FL08 a las que se aplicaron las condiciones de estrés.

En la figura 16 donde se compara la condición de estrés Edad Generacional Alta para los transcritos de FL08 en la que hubo un efecto similar que en la figura anterior.

La figura 19 compara entre las Cp de Edad Generacional y Represión catabólica, mientras la figura 20 resume todas las Cp incluyendo ACT.

En las figuras 14 y 15 de Represión Catabólica así como en la 17 y 18 para Edad Generacional Alta, se pudo notar que hay poca cantidad del producto esperado para el FL08 para ambas condiciones. En los controles de ADN total para FL08 Y ACT fue posible identificar las amplificaciones a partir de cADN; no se observó amplificación en los blancos que contienen todo excepto ADN o cADN.

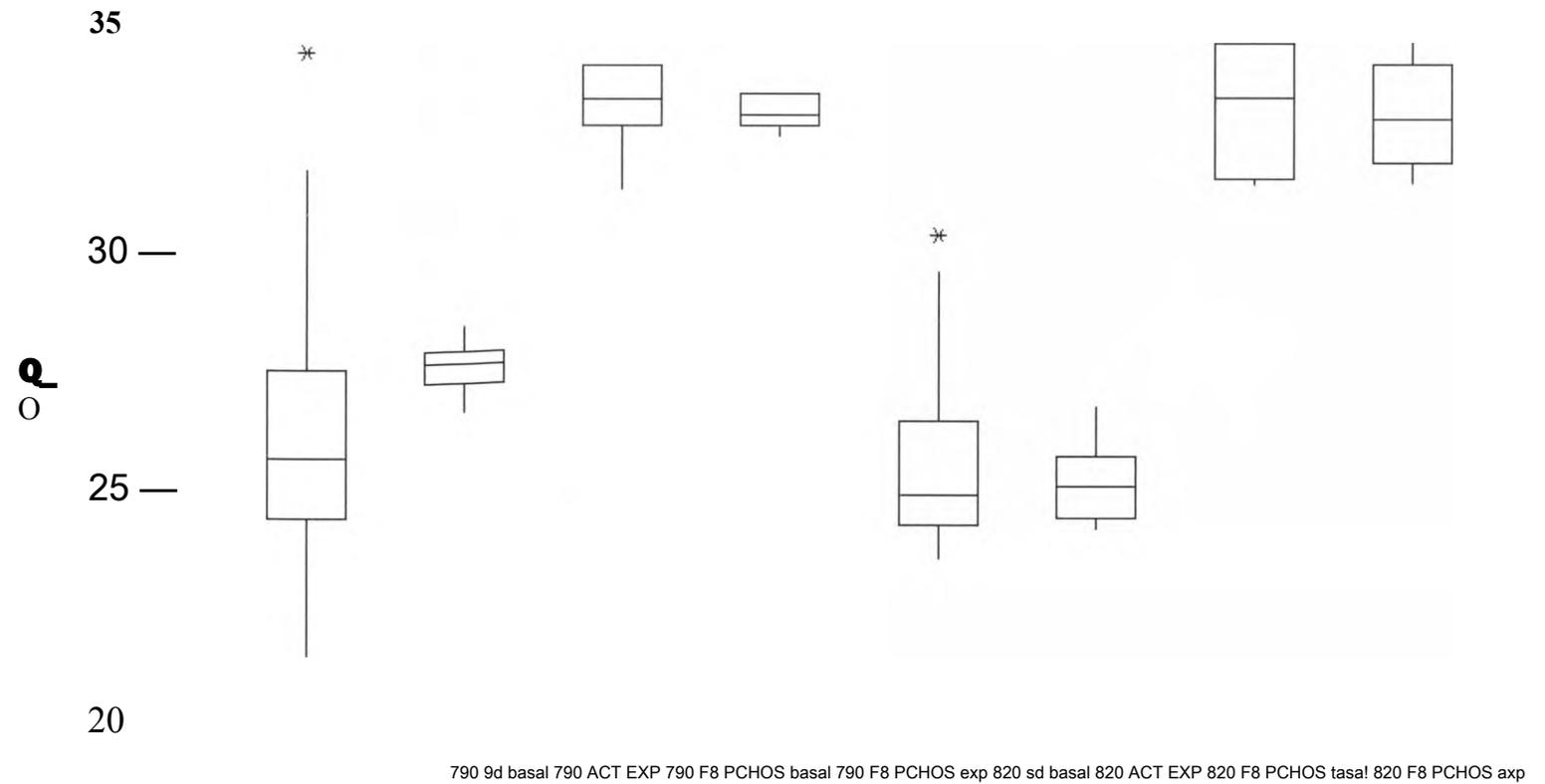


Figura 13. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 del FL08 Represión Catabólica (PCHOS). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre ACT, la condición basal y la condición experimental de ambas cepas. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.



Figura 14. Electroforesis de productos qPCR C-790 Represión Catabólica gen FL08 (920pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 FL08; 3 y 4: condición exp 3 y 4 FL08; 5: Ctrl. ADN C-790 FL08; 6: marcador 200 a 1500pb; 7: blanco FL08; 8 y 9: ACT normal exp. 1 y 2; 10 y 11 ACT condición exp. 3 y 4; 12: Ctrl. ACT ADN C-790 (591pb); 13 blanco ACT; 14 marcador 200 a 1500pb.

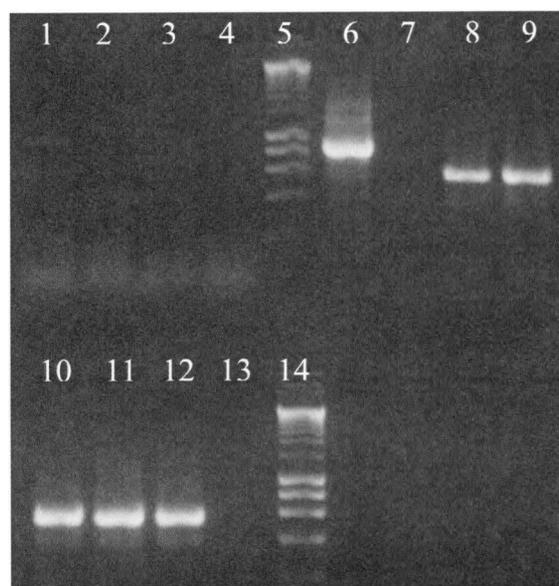


Figura 15. Electroforesis de productos qPCR C-820 Represión Catabólica gen FL08 (920pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 FL08; 3 y 4: condición exp 3 y 4 FL08; 5: marcador 200 a 1500pb; 6 Ctrl. ADN C-820 FL08; 7: blanco FL08; 8 y 9: ACT normal exp. 1 y 2; 10 y 11 ACT condición exp. 3 y 4; 12: Ctrl. ACT ADN C-820 (591pb); 13 blanco ACT; 14 marcador 200 a 1500pb.

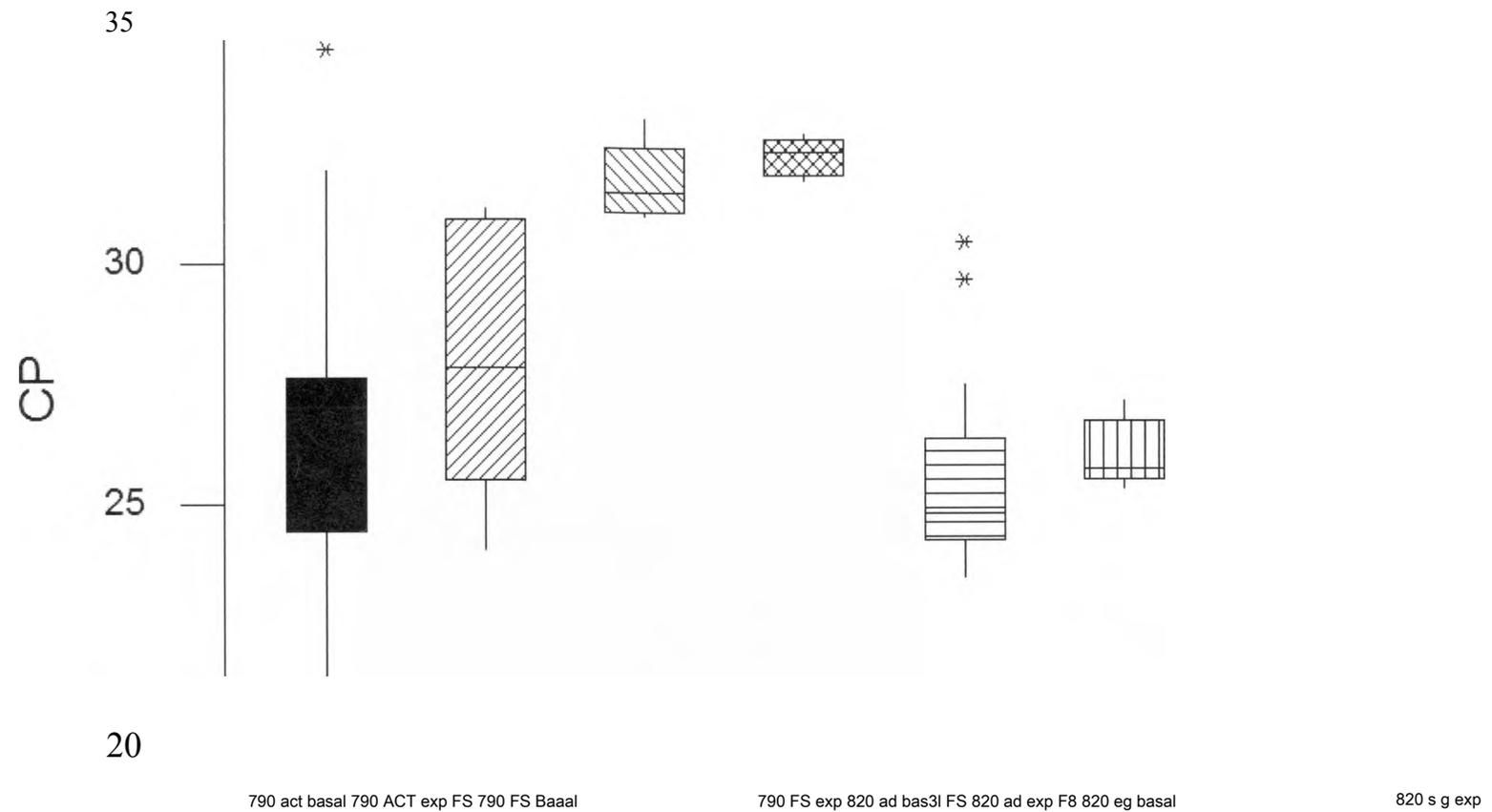


Figura 16. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 del FL08 Edad Generacional (EG). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre ACT, la condición basal y la condición experimental de ambas cepas. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.

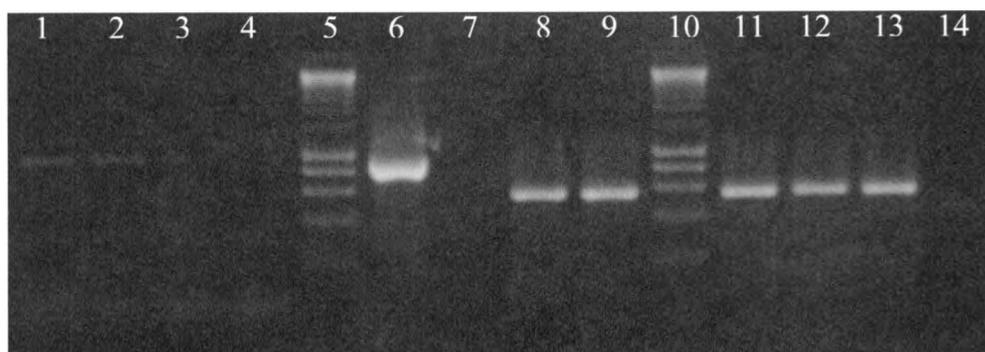


Figura 17. Electroforesis de productos qPCR C-790 Edad Generacional FL08 (920pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 FL08; 3 y 4 : condición exp 3 y 4 FL08; 5: marcador 200 a 1500pb; 6 Ctrl. ADN C-790 FL08; 7: blanco FL08; 8 y 9: ACT normal exp. ly 2; 10 marcador 200 a 1500pb; 11 y 12 ACT condición exp. 3 y 4; 13 Ctrl. ACT ADN C-790 (591pb); 14 blanco ACT.

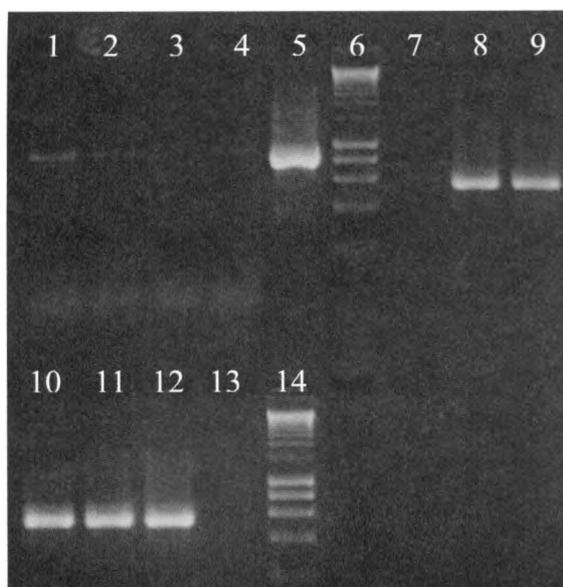


Figura 18. Electroforesis de productos qPCR C-820 Edad Generacional FL08 (920pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 FL08; 3 y 4 : condición exp 3 y 4 FL08; 5: marcador 200 a 1500pb; 6 Ctrl. ADN C-820 FL08; 7: blanco FL08; 8 y 9: ACT normal exp. 1 y 2; 10 y 11 ACT condición exp. 3 y 4; 12: Ctrl. ACT ADN C-820 (591pb); 13 blanco ACT; 14 marcador 200 a 1500pb.

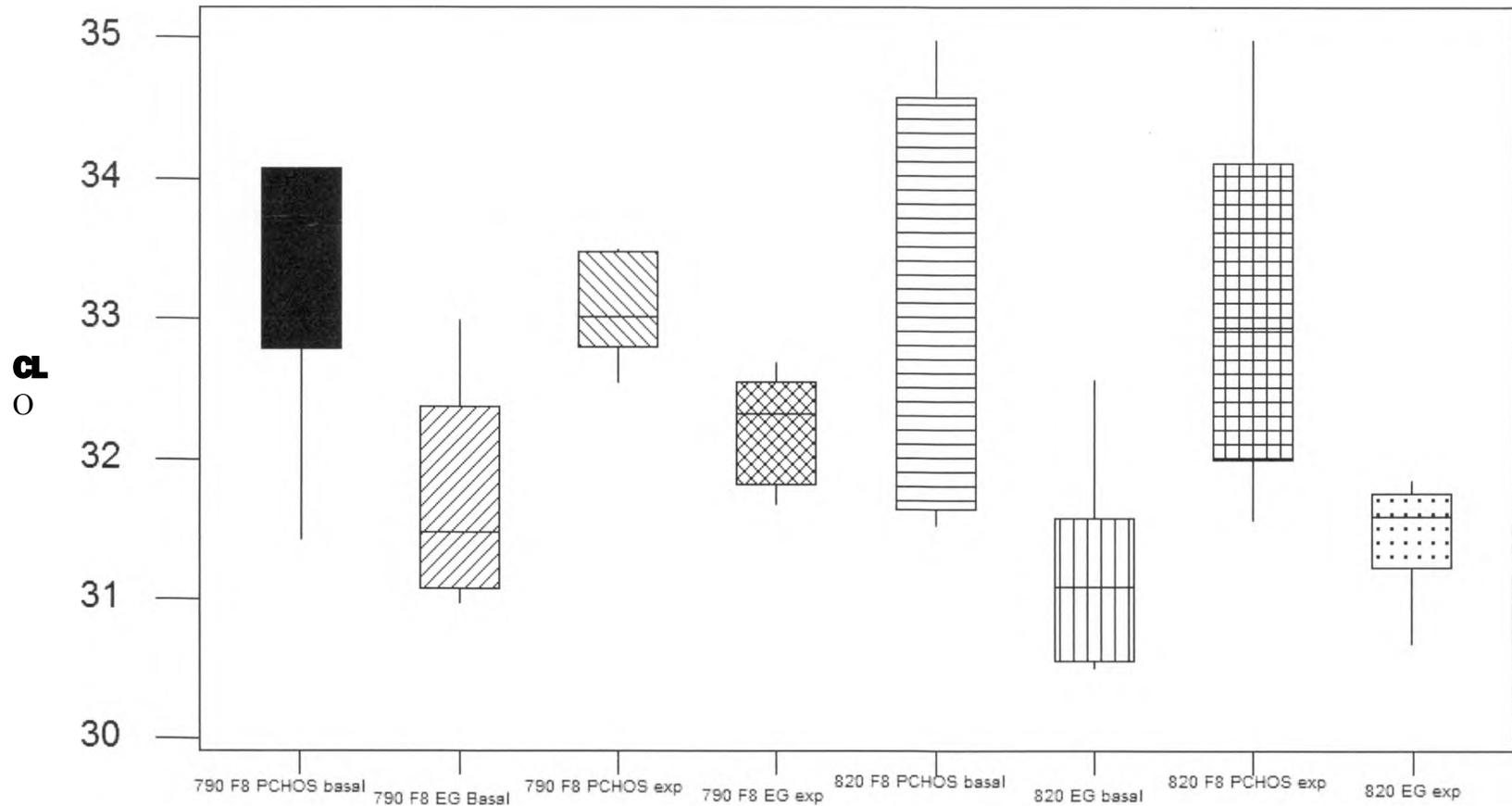


Figura 19. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de FL08 Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre la condición basal y la condición experimental de ambas cepas entre las dos condiciones de estrés. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.

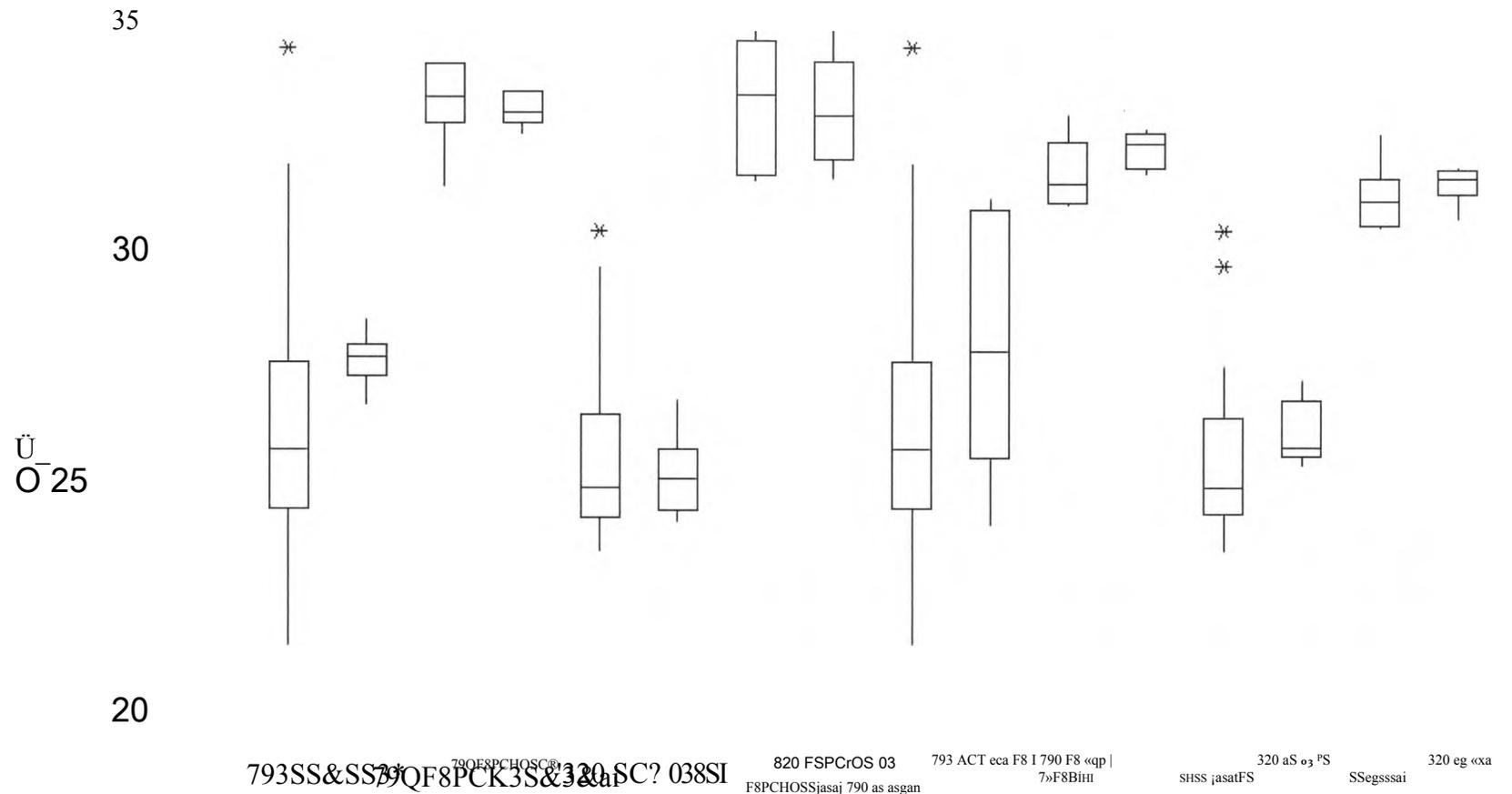


Figura 20. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de FL08 Represión Catabólica (PCFIOS) Vs. Edad Generacional (EG). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre ACT, la condición basal y la condición experimental de ambas cepas entre las dos condiciones de estrés. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.

6.3.4 Comparativo entre Cp de FLOI 1.

En resultados de la figura 21 se comparó la condición de estrés Represión Catabólica para los transcritos de C-820, C-790. Se puede ver que las Cp del gen casero ACT no mostraron diferencias significativas entre ellas, excepto en ATCC 7754 donde también es mayor el cambio en la Cp para los transcritos del FLOI 1.

En la figura 25 se comparó la condición de estrés Edad Generacional Alta en C-820 y C-790 para los transcritos amplificados donde fue notable el aumento en las Cp de los productos de estrés con respecto a la basal. El gen casero ACT de la cepa C-790 muestra una ligera diferencia aunque dentro del rango, no así en C-820 donde permaneció sin cambios notables.

La figura 28 compara entre las Cp de Edad Generacional y Represión catabólica, mientras la figura 29 resume todas las Cp incluyendo ACT.

En las figuras 22, 23 y 24 de Represión Catabólica, así como en las 26 y 27 de Edad Generacional, se pudo apreciar que todas las amplificaciones fueron visibles según el tamaño esperado. En los controles de ADN total fue posible identificar las amplificaciones a partir de cADN para FLOI 1 y ACT; no se observó amplificación en los blancos que contienen todo excepto ADN o cADN.

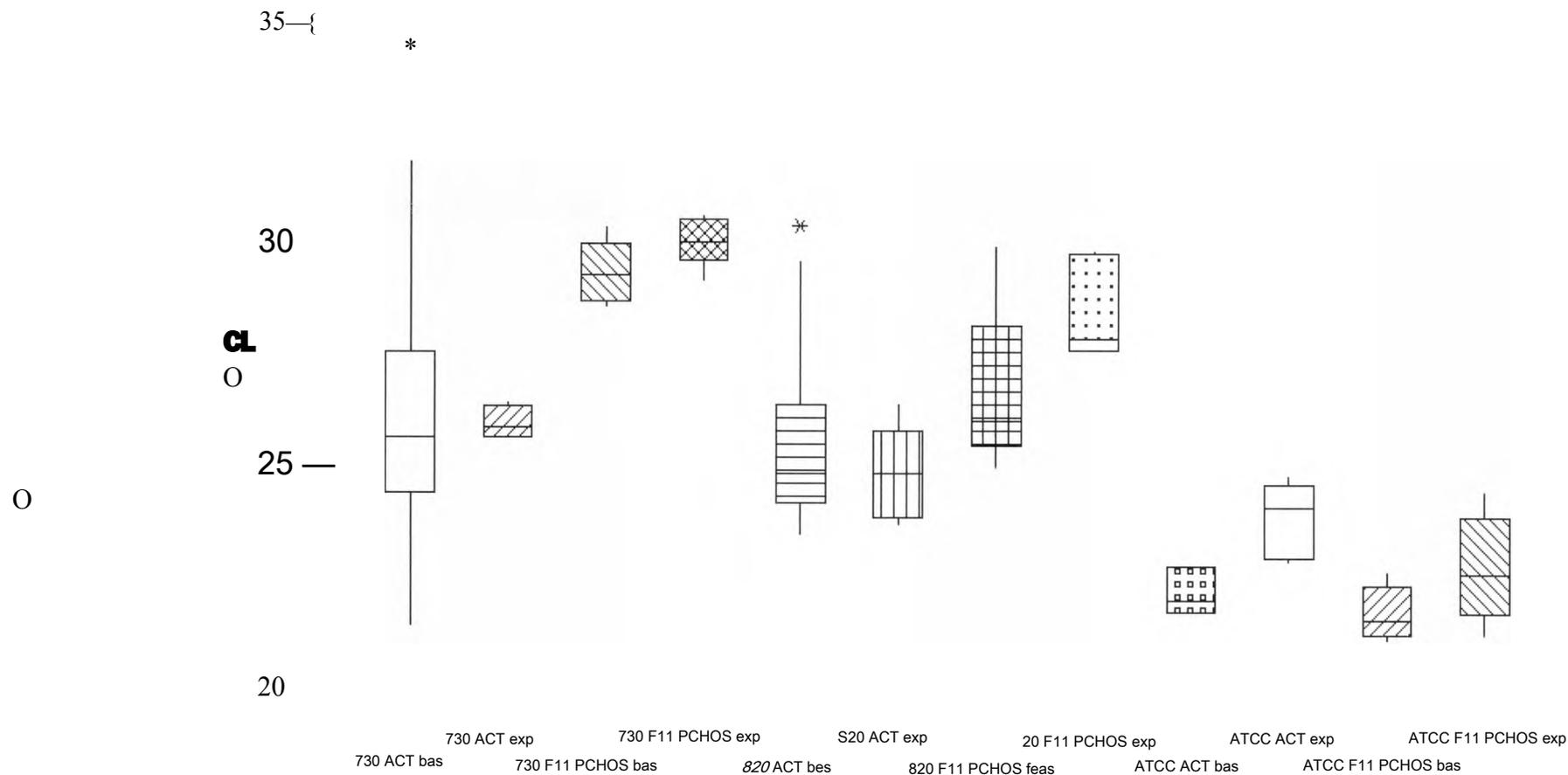


Figura 21. Comparativo de Cp de las cepas C-790, C-820 y ATCC 7754 del FLOI 1 Represión Catabólica (PCFIOS). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre ACT, la condición basal y la condición experimental de las cepas. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.

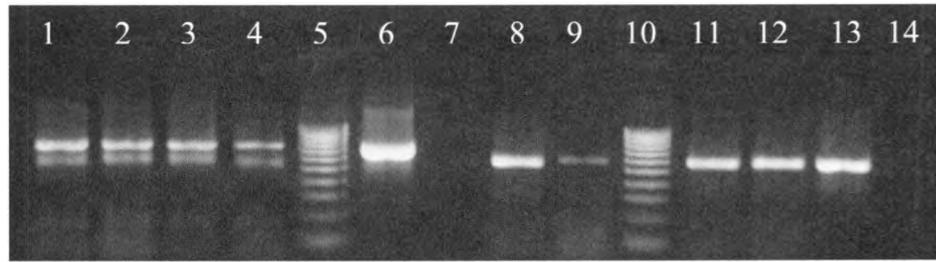


Figura 22. Electroforesis de productos qPCR C-790 Represión Catabólica FLOI 1 (749pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 FLOI; 3 y 4 : condición exp 3 y 4 FLOI; 5: marcador 100 a 1000pb; 6 Ctrl. ADN C-790 FLOI; 7: blanco FLOI; 8 y 9: ACT normal exp. ly 2; 10 marcador 100 a 1000pb; 11 y 12 ACT condición exp. 3 y 4; 13 Ctrl. ACT ADN C-790 (591pb); 14 blanco

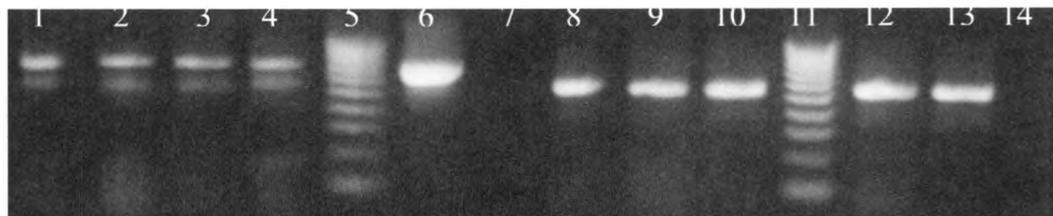


Figura 23. Electroforesis de productos qPCR C-820 Represión Catabólica FLOI 1 (749pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 FLOI 1; 3 y 4: condición exp 3 y 4 FLOI 1; 5: marcador 100 a 1000pb; 6 Ctrl. ADN C-820 FLOI; 7: blanco FLOI; 8 y 9: ACT normal exp. ly 2; 10 ACT condición exp. 3; 11 marcador 100 a 1000pb; 12 ACT condición exp 4; 13 Ctrl. ACT ADN C-820 (591pb); 14 blanco ACT.



Figura 24. Electroforesis de productos qPCR ATCC7754 Represión Catabólica FLOI (749pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 FLOI 1; 3 y 4 : condición exp 3 y 4 FLOI 1; 5: marcador 100 a 1000pb; 6 Ctrl. ADN ATCC7754 FLOI; 7: blanco FLOI; 8 y 9: ACT normal exp. ly 2; 10 marcador 100 a 1000pb; 11 y 12 ACT condición exp. 3 y 4; 13 Ctrl. ACT ADN ATCC7754 (591pb); 14 blanco ACT.

161171

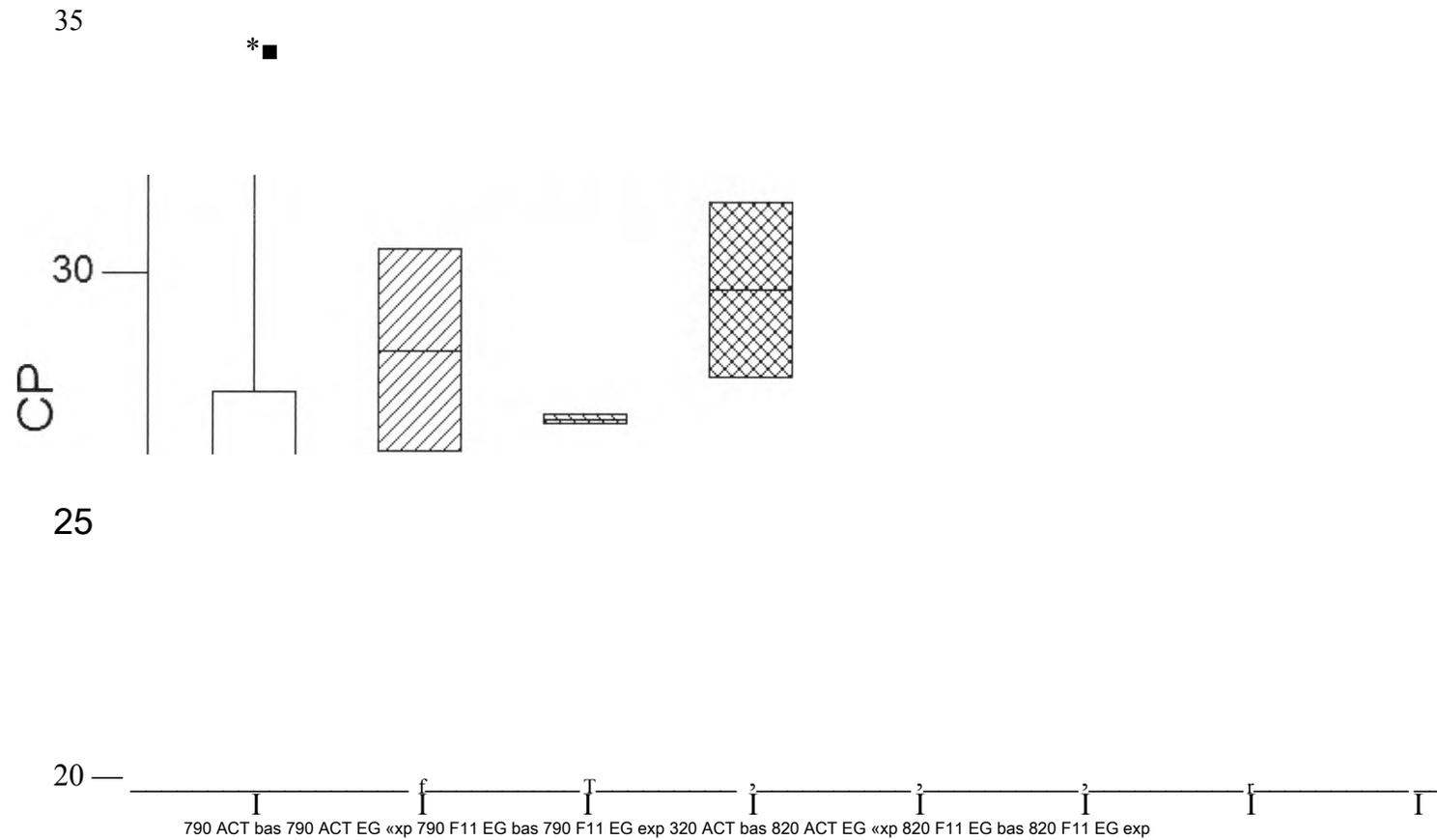


Figura 25. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 del FLOII Edad Generacional (EG). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre ACT, la condición basal y la condición experimental de ambas cepas. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.



Figura 26. Electroforesis de productos qPCR C-790 Edad Generacional gen FLOI 1 (749pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 FLOI 1; 3 y 4: condición exp 3 y 4 FL08; 5: Ctrl. ADN C-790 FL08; 6: marcador 100 a 1000pb; 7: blanco FLOI1; 8 y 9: ACT normal exp. 1 y 2; 10 y 11 ACT condición exp. 3 y 4; 12: Ctrl. ACT ADN C-790 (591pb); 13 blanco ACT; 14 marcador 100 a1000pb.

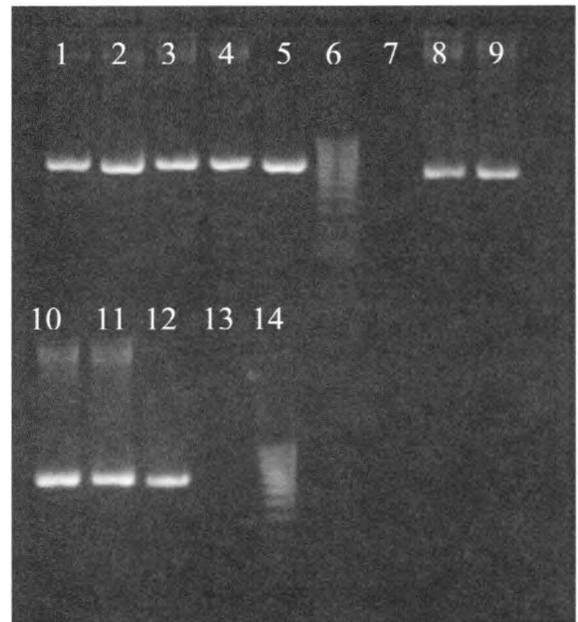


Figura 27. Electroforesis de productos qPCR C-820 Edad Generacional gen FLOI1 (749pb) gel de agarosa 2%. Carriles: 1 y 2: normal exp 1 y 2 FLOI 1; 3 y 4: condición exp 3 y 4 FL08; 5: marcador 100 a 1000pb; 6 Ctrl. ADN C-820 FL08; 7: blanco FLOI 1; 8 y 9: ACT normal exp. 1 y 2; 10 y 11 ACT condición exp. 3 y 4; 12: Ctrl. ACT ADN C-820 (591pb); 13 blanco ACT; 14 marcador 100 a 1000pb.

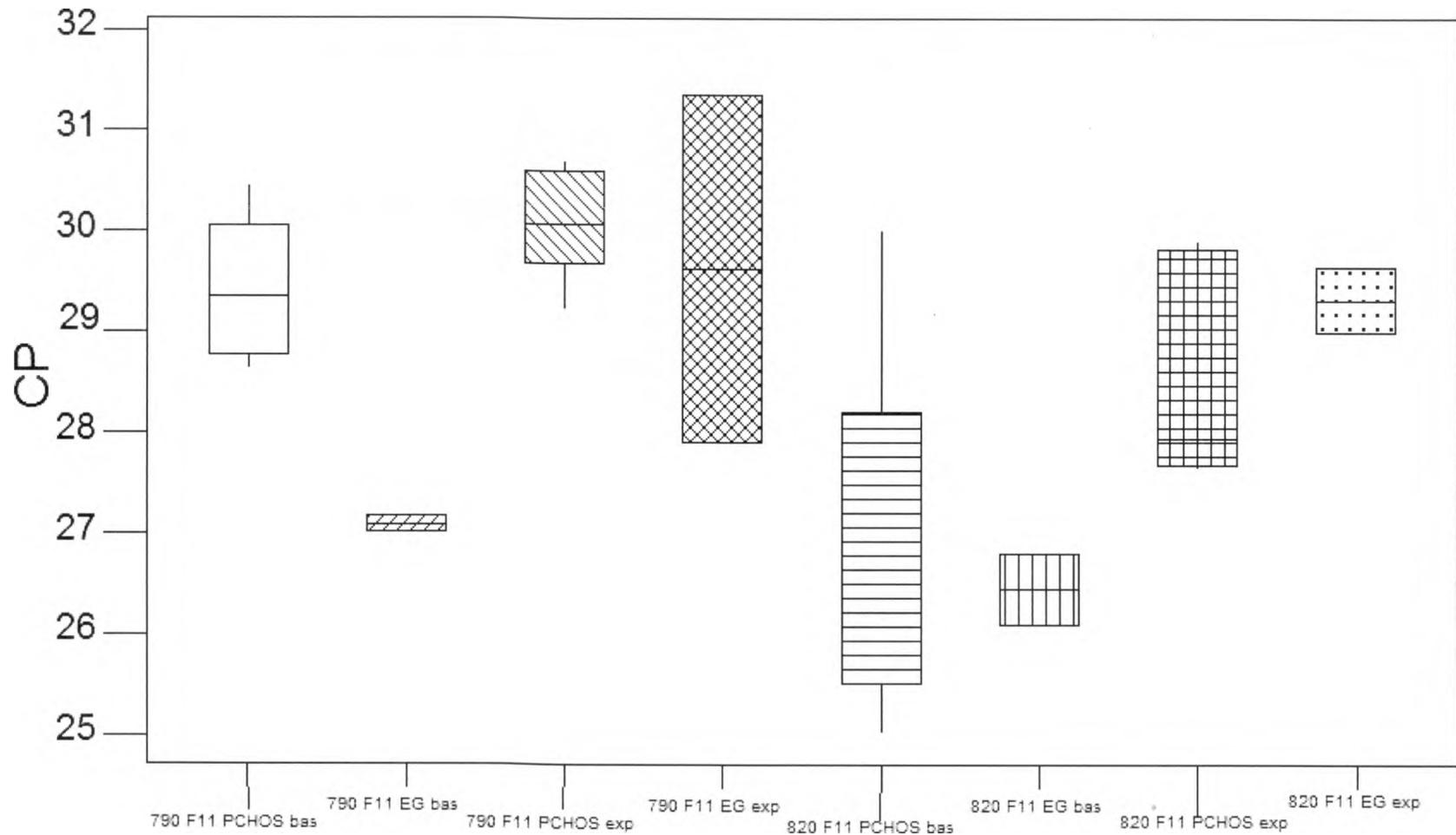


Figura 28. Comparativo de Cp de las cepas C-790 y C-820 de FLOI 1 Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre la condición basal y la condición experimental de ambas cepas entre las dos condiciones de estrés. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.

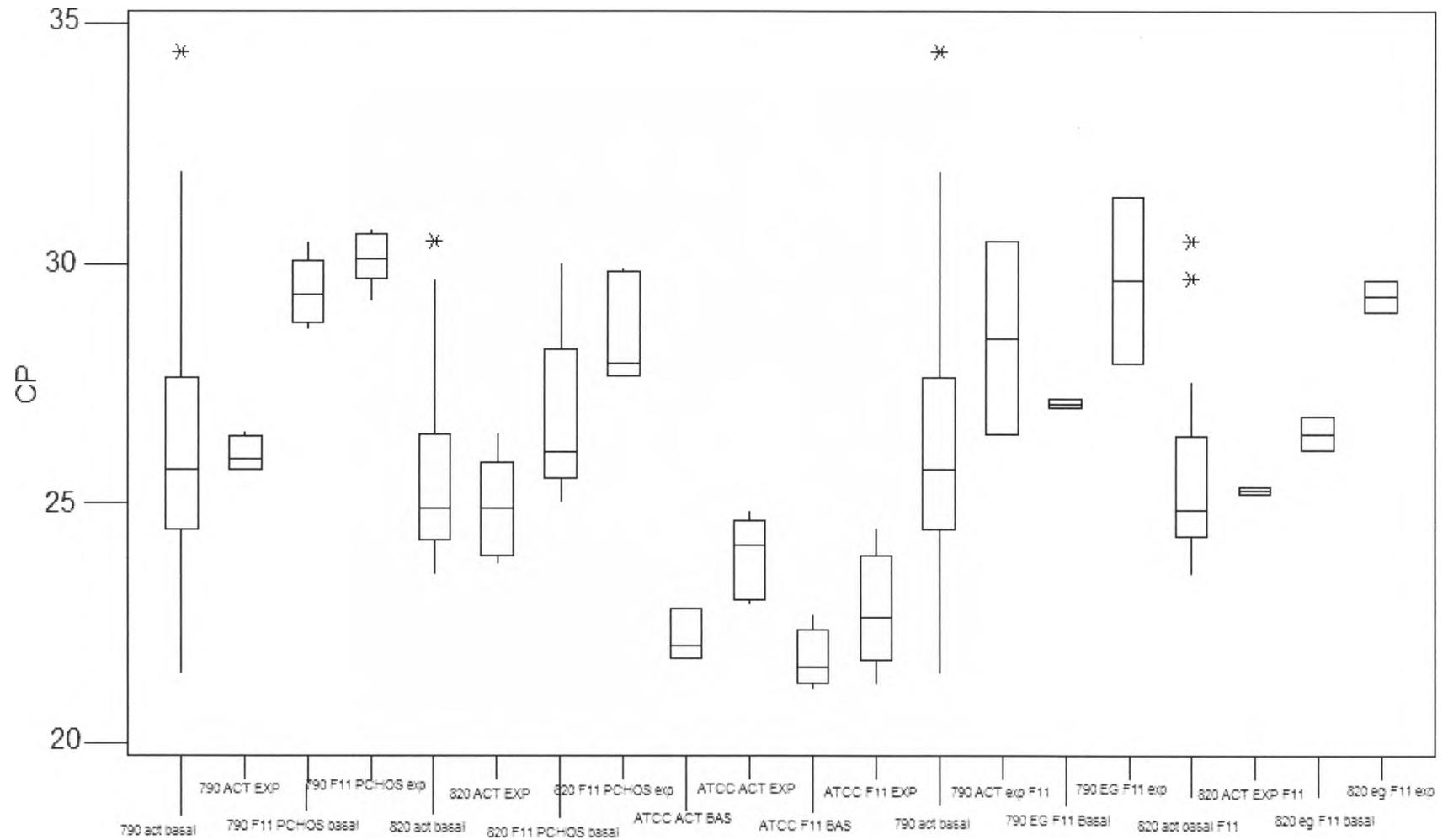


Figura 29. Comparativo de Cp de las cepas C-790, C-820 y ATCC7754 de FLO1 1 Represión Catabólica (PCHOS) Vs. Edad Generacional (EG). El gráfico suma 3 experimentos en 3 días consecutivos comparando entre ACT, la condición basal y la condición experimental de las cepas entre las dos condiciones de estrés. Nótese que a un menor Cp mejor calidad y cantidad de transcrito. Box Plot utilizando Minitab 13.32.

6.4 Medición de Floculinas.

6.4.1 Caracterización del Fenotipo de levaduras usadas.

Si bien se sabe que el tipo de fermentación que realizaban las cepas C-790 y C-820 era fondofloculante, se verificó si pertenecían al fenotipo Fio 1 o al NewFlo. En esta prueba pudo observarse la floculación de la levadura en el buffer de calcio, y la represión de la floculación en las soluciones de Mañosa y Glucosa, las cuales pertenecen al fenotipo NewFlo. (Figura 30)

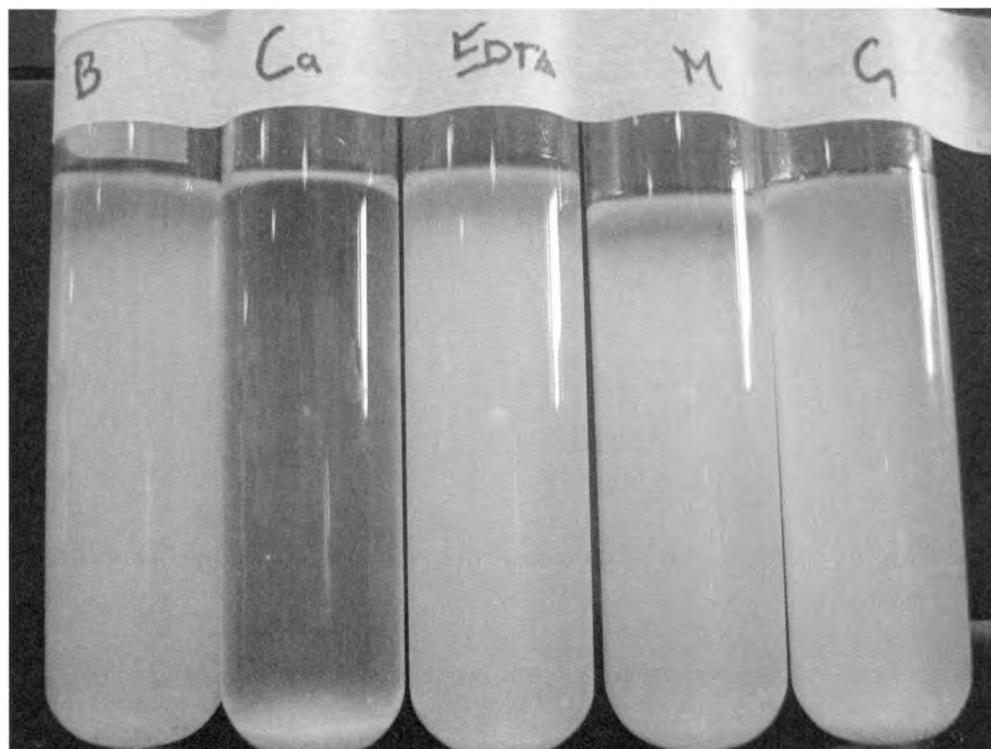


Figura 30. Fenotipo NewFlo en levaduras C-820 y C-790. Prueba de inhibición de floculación utilizando 53×10^6 cel/mL de levadura en soluciones de: B: Buffer de Acetatos; Ca: *CaCl* 5mM; EDTA: EDTA 10mM; M: mañosa 0.1M y G: glucosa 0.1M. Claramente se observa el efecto inhibitorio de los azúcares Mañosa y Glucosa.

6.4.2. Análisis de Unión FITC-Avidina-levadura

Para poder saber la cantidad adecuada de levadura en los estudios de receptor-ligando, se sometieron suspensiones en cantidades variables de ambas levaduras con la máxima cantidad de la solución de FITC-Avidina (Figuras 31 y 35), notando una captura de 12×10^6 cel/mL en la cepa C-790, y de 6×10^6 en la cepa C-820. En el caso de la cepa AFCC 7754 se decidió utilizar la suspensión de 12×10^6 cel/mL, dada la suposición de que al tener menos receptores sería un mejor reto para la prueba dada la saturación de células. La posterior lectura de la fluorescencia y sus curvas de calibración se encuentran en las figuras 32, 33; 36, 37; 39 y 40. Para el análisis de los datos se realizaron gráficas de saturación y Scatchard (figuras 32, 36, 41), donde se obtuvieron los valores de B_{\max} y K_d en cada cepa. En la tabla XI se muestran resumidos estos parámetros indicando una tendencia con respecto a la carga génica de la cepa y su floculación.

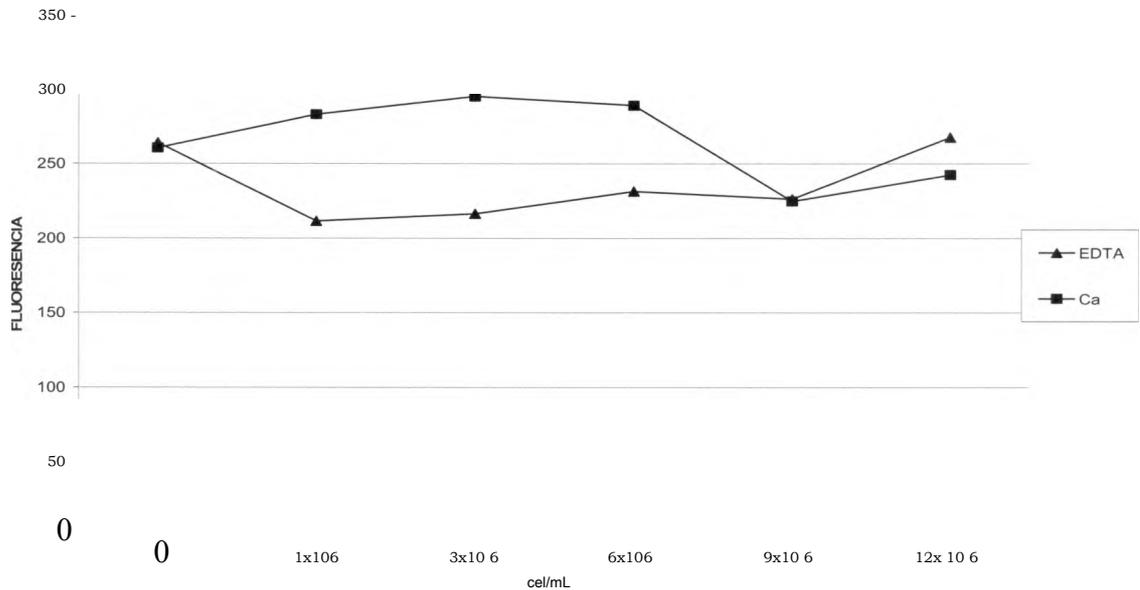


Figura 31. Saturación de células en C-790 en concentración máxima de FITC-Avidina (74.19ug/mL). La mejor captura de la marca por esta cepa es a 12×10^6 cel/mL.

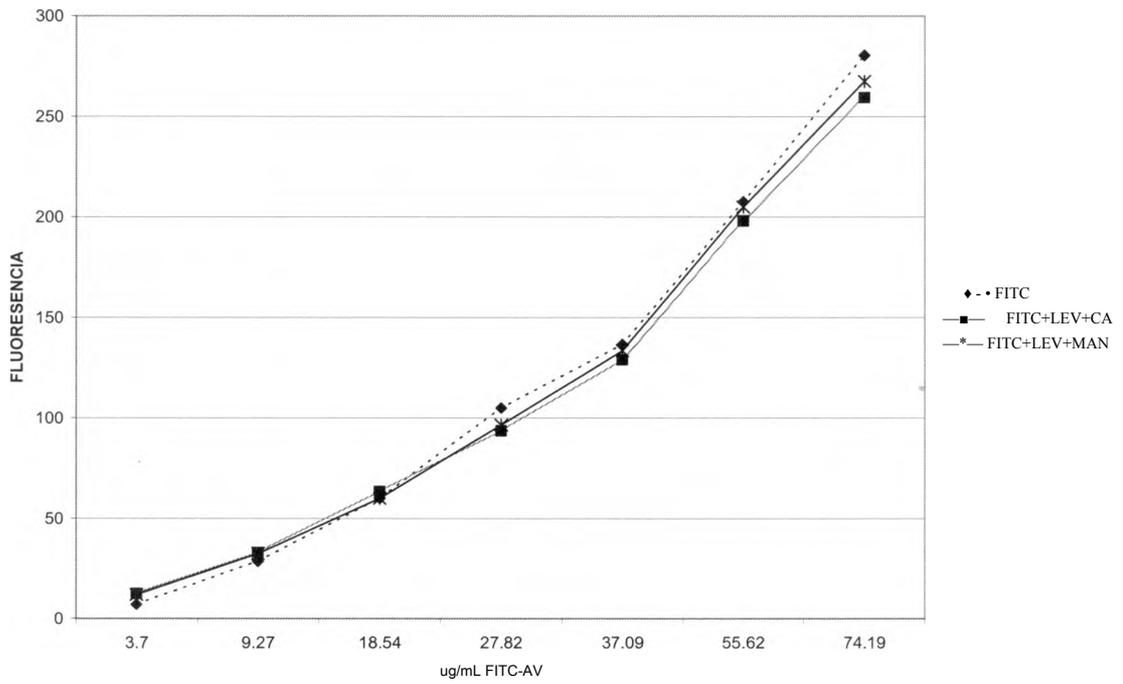


Figura 32. Fluorescencia a varias concentraciones de FITC-Avidina de C-790 a 12×10^6 cel/mL. Comparativo entre fluorescencia de marca (FITC), marca-levadura-buffer de Calcio (FITC+LEV+CA), marca-levadura-Solución de Mañosa (FITC+LEV+MAN).

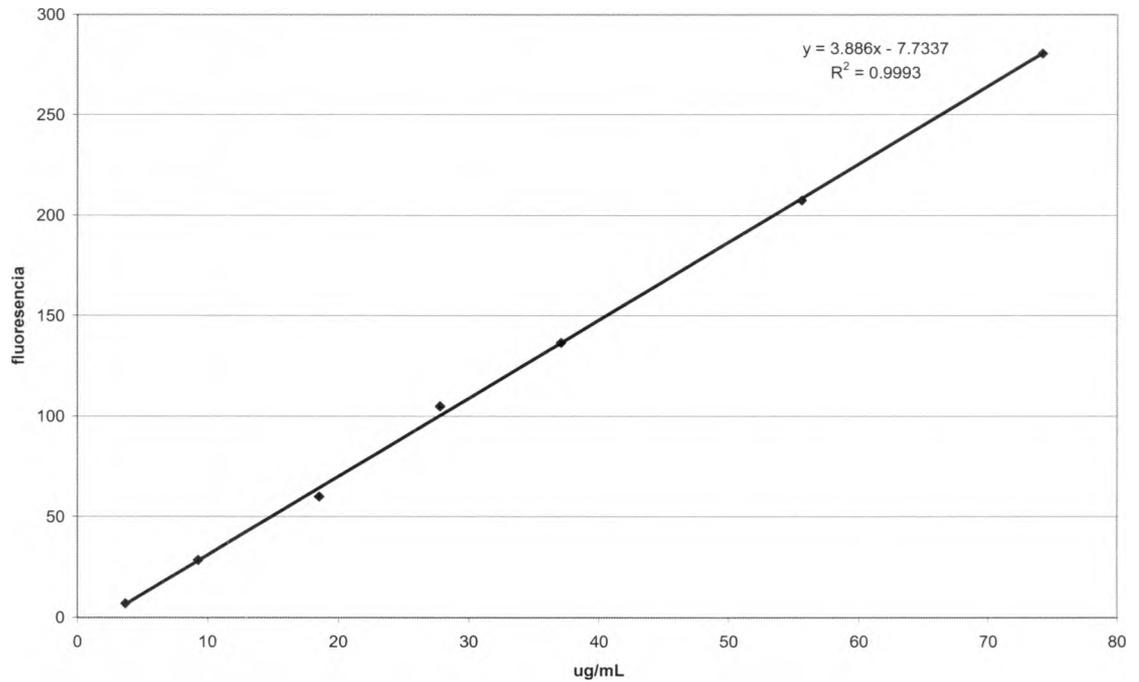


Figura 33. Curva de calibración de FITC-Avidina para C-790. Se aplicó regresión lineal para conocer la ecuación de la recta con una $R^2 = 0.9993$

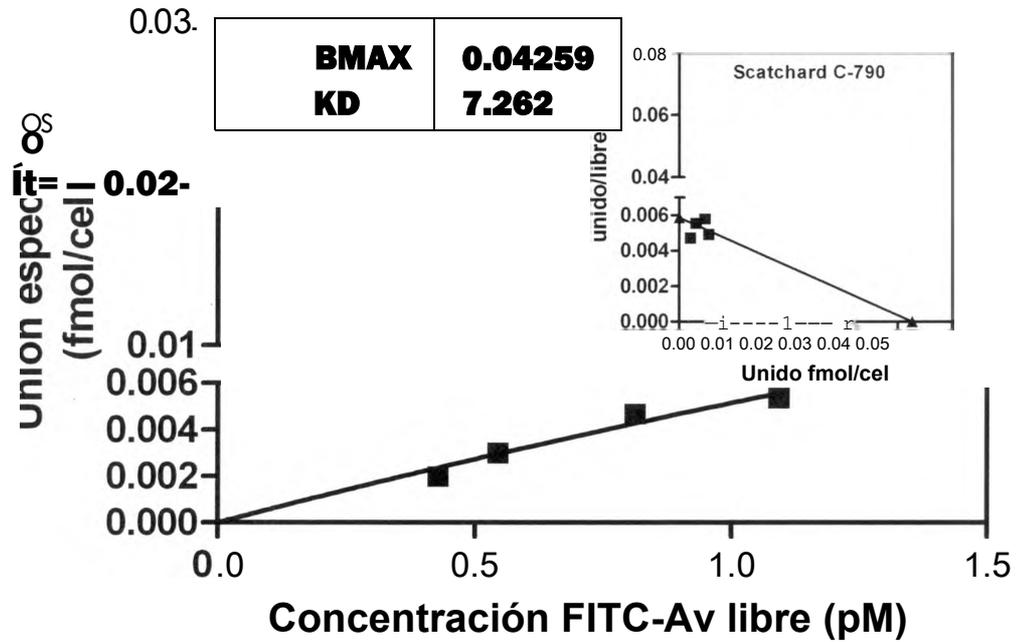


Figura 34. Gráfico de Saturación/Scatchard cepa C-790. Se muestra la saturación de C-790 con FITC-avidina, además de la B_{max} y K_d . Análisis hecho con regresión no lineal para unión específica de un solo sitio con un IC de 95% y una bondad del ajuste del 0.9516 y 2 GL.

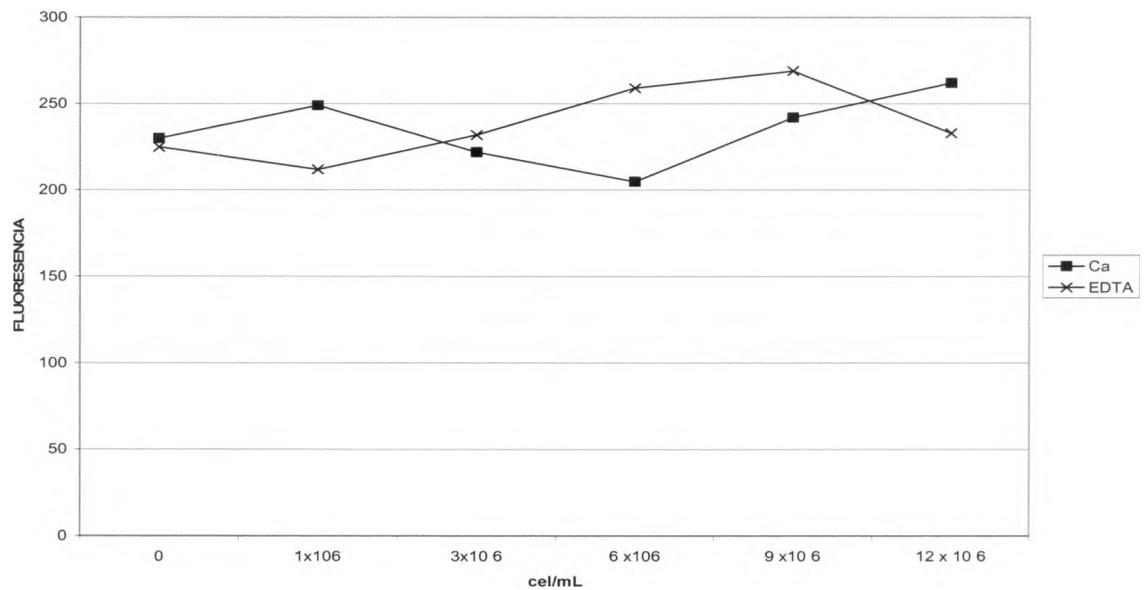


Figura 35. Saturación de células en C-820 en concentración máxima de FITC-Avidina (74.19ug/mL). La mejor captura de la marca por esta cepa es a 6x10⁶ cel/mL.

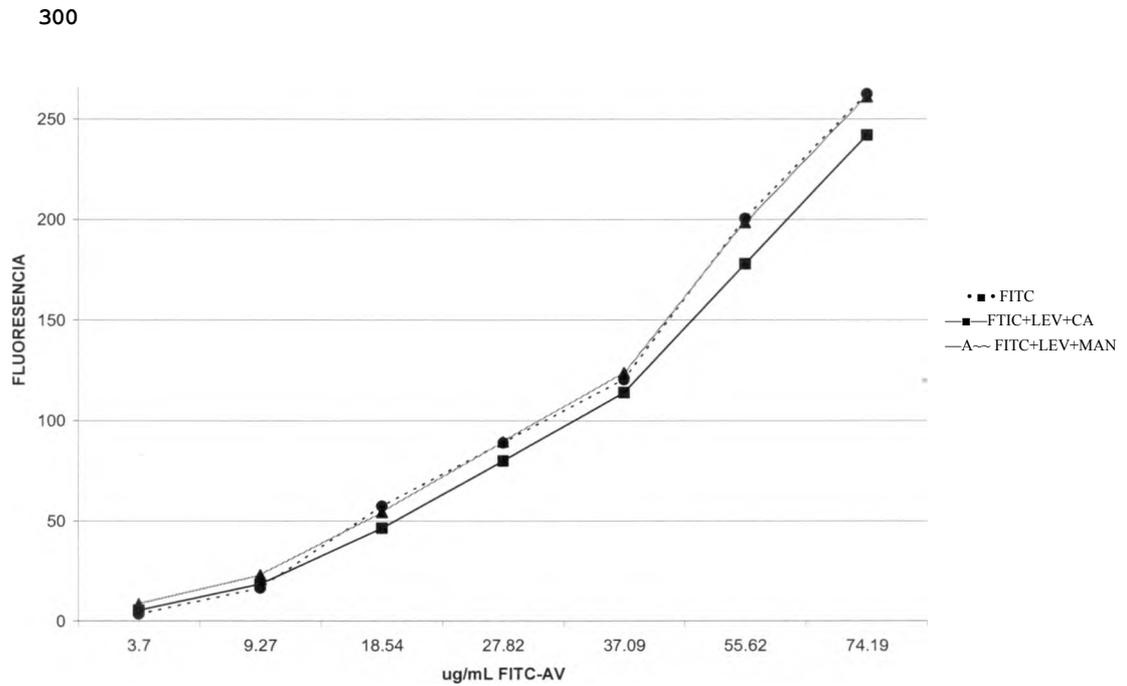


Figura 36. Fluorescencia a varias concentraciones de FITC-Avidina de C-820 a 6×10^6 cel/mL. Comparativo entre fluorescencia de marca(FITC), marca-levadura-buffer de Calcio (FITC+LEV+CA), marca-levadura-Solución de Mañosa (FITC+LEV+MAN).

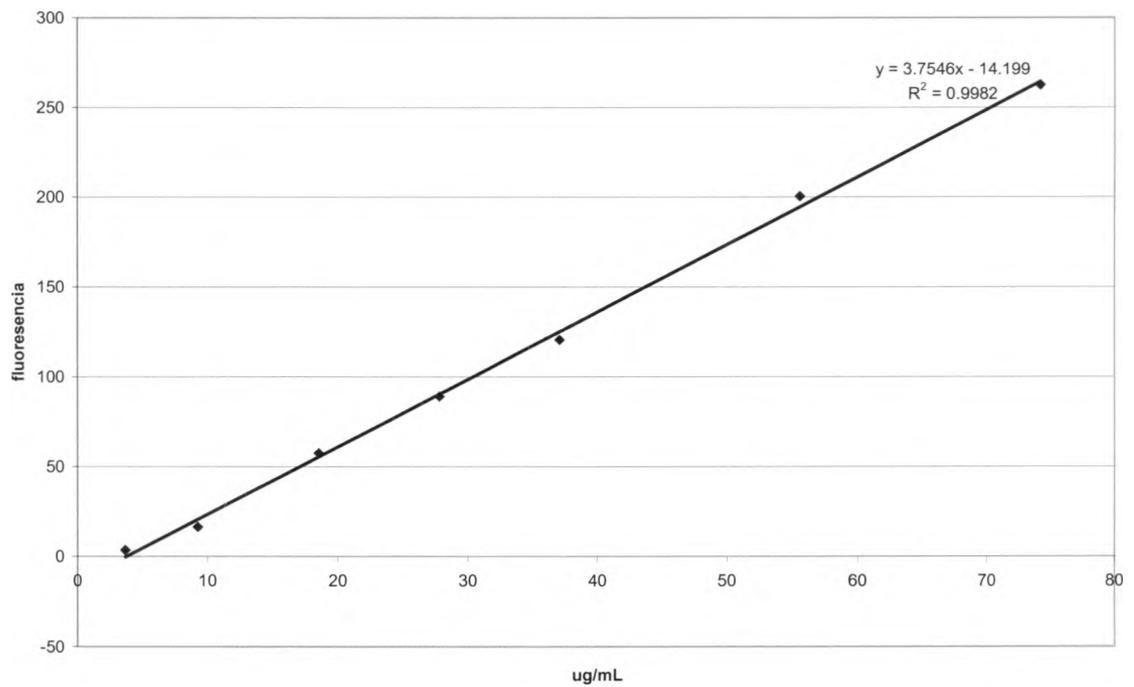


Figura 37. Curva de calibración de FITC-Avidina para C-820. Se aplicó regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y una $R^2 \approx 0.9982$

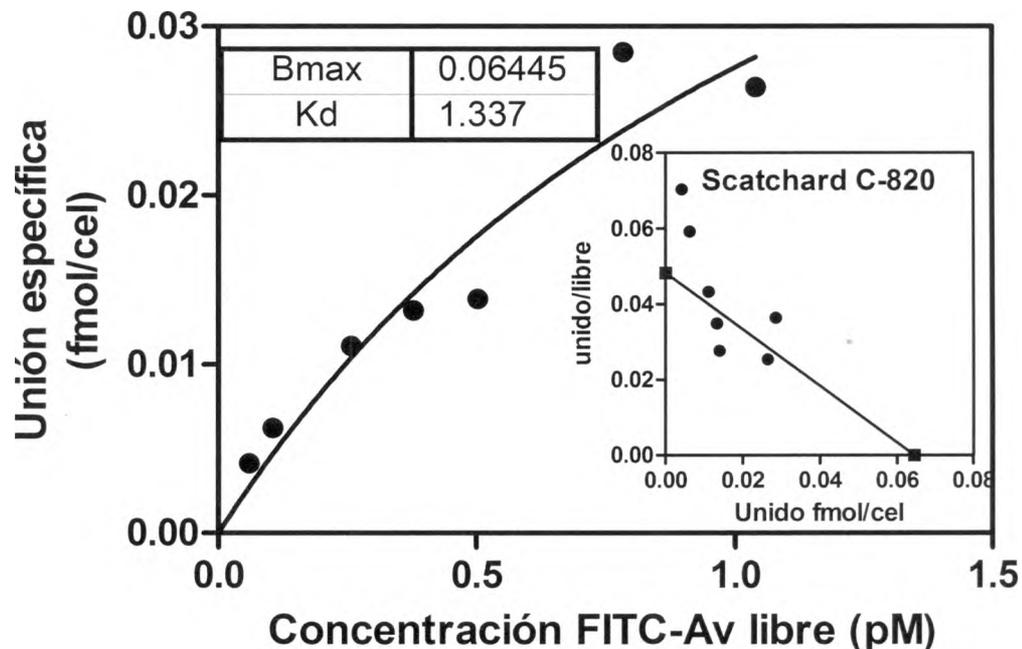


Figura 38. Gráfico de Saturación/Scatchard cepa C-820. Se muestra la saturación de C-820 con FITC-avidina, además de la B_{max} y K_d Análisis hecho con regresión no lineal para unión específica de un solo sitio con un IC de 95% y una bondad del ajuste con 5 GL del y $R^2= 0.9146$.

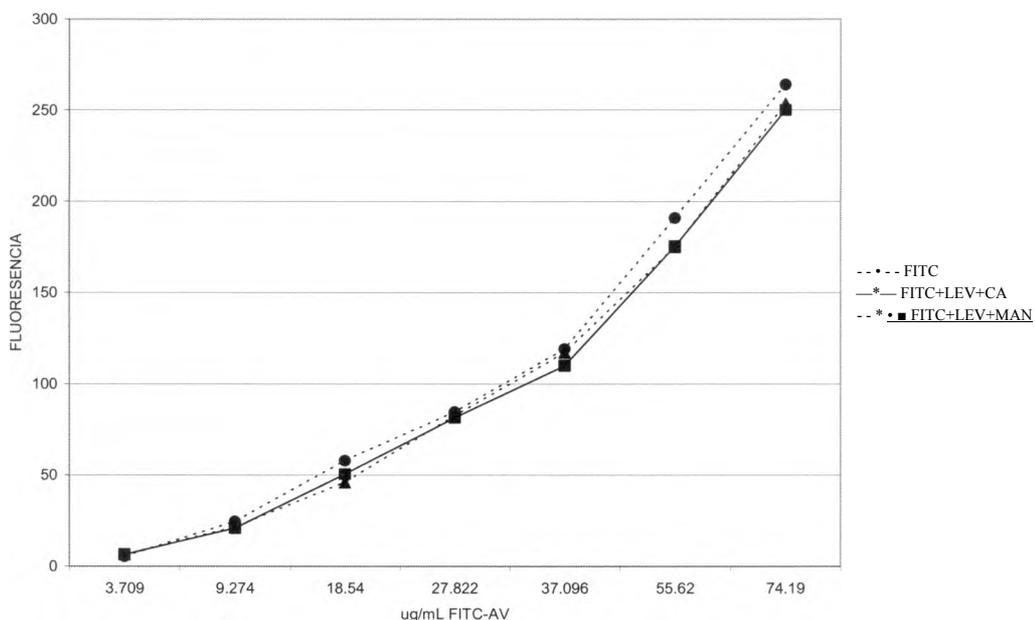


Figura 39. Fluorescencia a varias concentraciones de FITC-Avidina de ATCC7754 a 12×10^6 cel/mL. Comparativo entre fluorescencia de marca (FITC), marca-levadura-buffer de Calcio (FITC+LEV+CA), marca-levadura-Solución de Mañosa (FITC+LEV+MAN).

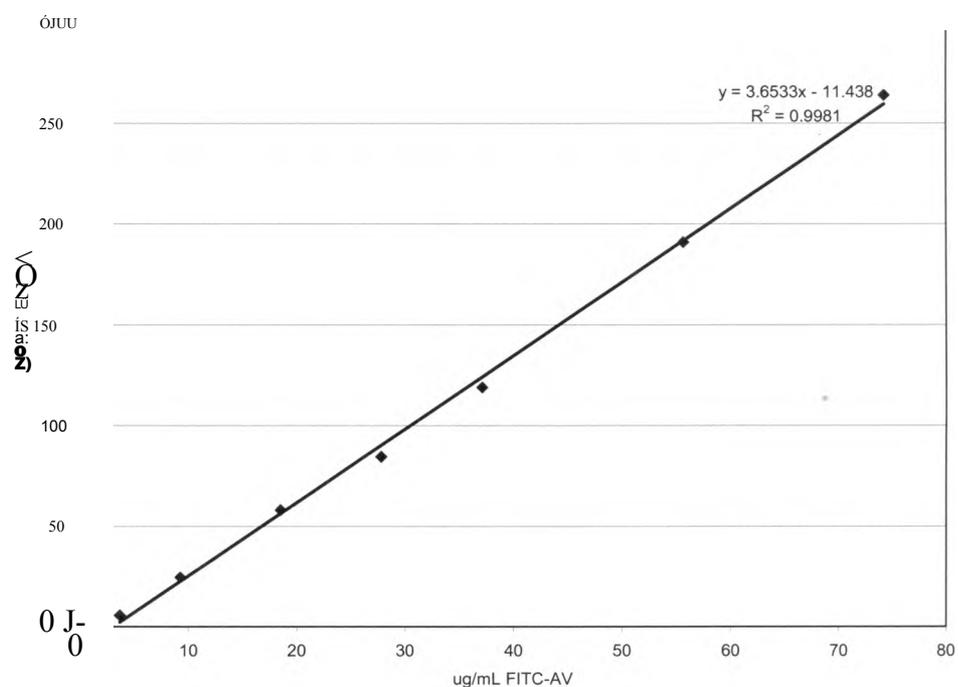


Figura 40. Curva de calibración de FITC-Avidina para ATCC7754. Se aplicó regresión lineal para obtener la ecuación de la recta y una $R^2 = 0.9981$

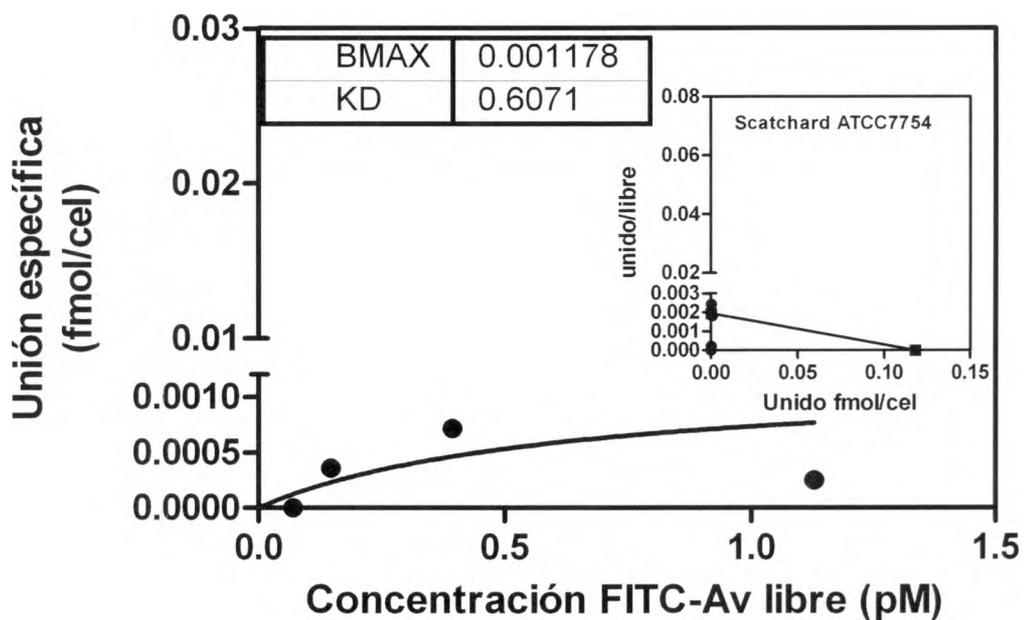


Figura 41. Gráfico de Saturación/Scatchard cepa ATCC7754. Se muestra la saturación de esta cepa con FITC-avidina, además de la B_{max} y K_j . Análisis hecho con regresión no lineal para unión específica de un solo sitio con un IC de 95% y una bondad del ajuste con 5 GL del y $R^2 = 0.0246$.

Tabla XI

Comparativo de tipo y número de genes FLO, nivel de floculación B_{max} y K_d en cada cepa.

Cepa	FLO							#Genes FLO	Floculación(mL)	Bmax (fmol/cel)	K_d
	1	5	8	9	10	11	Lg				
820	+	.	+	.	+	+	+	5	4.5	0.06445	1.337
790	+	.	+	.	.	+	+	4	2.5	0.04259	7.262
7754	+	+	.	.	.	+	.	3	0	0.001178	0.6071

7. DISCUSION

Aunque se sabe de cepas con un posible mecanismo de floculación distinto al del modelo de zymolectinas (Nishihara y Kageyama, 2002), en este trabajo se muestran evidencias de cómo los genes FLO y sus productos, son en gran parte responsables del efecto de la floculación en las cepas de levadura lager estudiadas.

Se ha reportado que las levaduras cerveceras, mayoritariamente del fenotipo NewFlo, pierden su habilidad para flocular en las etapas tempranas de su crecimiento y que luego retoman esta cualidad en las fase exponencial tardía o en la fase estacionaria (Sampermans *et al.*, 2004; Bony *et al.*, 1998 ; Dengis *et al.*, 1995; Soares y Mota, 1996), esto fue palpable al hacer los cursos temporales de las levaduras C-820 y C-790, con las que se trabajó en las etapas de medición de transcritos y en la de medición de floculinas. Esto último nos da cuenta de que el fenómeno de floculación es activado y no espontáneo.

Dado que aún no ha sido posible amplificar completamente los genes Lg-FLO, FLO1 y FL08 (Jibiki *et al.*, 2001), se diseñaron iniciadores de tal forma que fueran amplificadas regiones específicas y discretas de cada gen. Con esta estrategia se pudieron comprobar ampliaciones de cada uno de los siete genes FLO para el tamaño que fueron diseñados.

Hecho esto, lo primero a notar es que el número de genes FLO parece ir en ascenso según el índice de floculación. Evidentemente es delicado afirmar en su totalidad que a mayor número de genes FLO, mayor floculación, puesto que habría que realizar estudios del contenido de estos genes y sus patrones en más cepas cerveceras o industriales que presenten esta propiedad, además de que puede haber factores transcripcionales, traduccionales o postraduccionales que intervienen y que pudiera tal vez explicar por que cepas, como la BRY y C-790 o la C-820 y 2036, tienen diferente habilidad para

flocular; o del porqué a pesar de que la ATCC7754 tiene 3 genes FLO, es no floculante. Sin embargo, es de notar esta asociación.

Por otro lado, los patrones de amplificación en cada levadura son variables, es decir, no siempre se encuentran los mismos tipos de genes FLO en las cepas aquí estudiadas. Es de recalcar la presencia del LgFLOI, FL08 y FLOI 1 los cuales son una constante en las levaduras floculantes revisadas, excepto en la levadura ATCC7754 que es una cepa no floculante. Curiosamente esta última es la única en presentar el FL05 y ha sido reportado (Jibiki *et al.*, 2001) que muchas levaduras lager no floculantes carecían de este gen, por lo que su ausencia aparentemente no es determinante para la floculación.

El gen LgFLOI se le ha considerando el encargado de definir el fenotipo NewFlo (Kobayashi *et al.*, 1998), lo cual confirmamos fisiológicamente con la prueba del perfil de floculación en las cepas C-790 y C-820 (Fig. 28) además de la presencia de este gen en las cepas floculantes estudiadas, se encontró el gen FLOI, que si bien se sabe es importante en las levaduras ale (Watari *et al.*, 1989), no se detectó en el resto de las levaduras floculantes, por lo que probablemente en las levaduras lager, el FLOI no es el principal responsable en definir el fenotipo floculante.

Por otra parte el gen FL08, un activador de la transcripción de los genes FLOI y FLOII (Lo y Dranginis, 1996; Teunissen y Steensma 1995; Liu *et al.*, 1996), se encontró en todas las levaduras excepto en la ATCC7754, lo que hace resaltar su importancia.

Previamente se ha reportado que FL09 está presente en algunas cepas pero no en todas (Speers *et al.*, 1992), lo cual concuerda con los resultados obtenidos, al igual que FLOI y FLO 10 en forma polimórfica. Sin embargo no pudimos analizar su transcripción puesto que los iniciadores no fueron funcionales para las condiciones de qPCR.

FLOI 1, que fue el único constante en todas las cepas estudiadas, lo que concuerda con reportes previos de que este gen parece estar ampliamente distribuido (Lo y Dranginis, 1996), probablemente porque cumple amplias funciones además de floculación como crecimiento en pseudohifas, formación de biofilm e invasión al agar, los cuales son eventos de adhesión celular (Guo *et al.*, 2000). El hecho de que este gen se mantenga en la levadura sugiere lugar a más funciones desconocidas dado los múltiples mecanismos regulación (Teunissen y Steensma, 1995).

Era importante ver si estos genes eran expresados, o había aumento o decremento con respecto a algunos factores de estrés conocidos en la industria cervecera, como son la la Represión Catabólica, donde existe un efecto inhibitorio de la floculación a ciertos azúcares como glucosa y maltosa en las levaduras lager (Kobayashi *et al.*, 1998); y una Edad generacional alta donde arriba de 10 generaciones industriales afecta la floculación (Powell y Diacetis, 2007; Jenkins *et al.*, 2003). Pudiendo estar la falla en la parte genética y/o a nivel de transcripción de alguno de los genes en estudio se pretendía ver el efecto en la expresión de los genes FLO en una fermentación.

Los efectos de estas condiciones fueron medidas en las cepas C-820 y C-790, comparando con la cepa no floculante ATCC7754, dada la disponibilidad industrial de las primeras y por ser además las que tuvieron un espectro de floculación buena, intermedia y nula.

Sabiendo los patrones de los genes FLO presentes en cada cepa, fue verificada la transcripción a las tres cepas comparando a su vez con las dos condiciones de estrés: el LgFLOI, por ser considerado el principal en la capacidad de floculación en las levaduras lager (Kobayashi *et al.*, 1998); el FL08, por ser un activador transcripcional del gen FLOI (Lo y Dranginis, 1996; Teunissen y Steensma 1995), donde probablemente tenga que ver también con la activación del LgFLOI, al compartir mucha de su secuencia con el FLOI secuencia (Straver, 1994; Kobayashi *et al.*, 1998; Sato *et al.*, 2002; Watari, J. 1994; Bony *et al.*, 1997) y FLOI 1, por ser importante en varios procesos celulares en la levadura además de la floculación (Guo *et al.*, 2000).

El efecto más palpable fue para el gen LgFLOI, donde si bien en la condición de cultivo estándar se ven unos niveles de expresión equivalentes entre las dos cepas, hay un efecto negativo en ambas para la condición experimental de Represión Catabólica, si bien este es más acentuado en la cepa C-820. Lo cual coincide con el hecho de que también existe un decremento en el porcentaje de floculación y es más acentuado en esta cepa.

En la parte de Edad Generacional para el gen LgFLOI, claramente es más sensible la cepa C-790, incluso afectando su gen casero ACT. Es interesante notar que el valor de Cp mejora en la C-820 para la condición experimental de edad generacional, donde también se nota una mejora en su floculación para este estado. La mejora en floculación,

aunque también es visible en la cepa C-790, esta última no mejora en su Cp. Esto hace pensar en las diferencias en cómo se transcribe este gen según la cepa, o tal vez en que pudiese ser más dependiente de la transcripción del FLOI, aunque esto no lo pudimos probar. En resumen la C-820 fué más tolerante a una mayor resiembra generacional y la C-790 está mejor adaptada para un mosto con alto contenido en glucosa, este dato puede ser de utilidad para formular mostos adecuados según la cepa.

Al ver los resultados para la expresión de FL08, es notable que en todos los casos, los niveles de transcripción son muy similares, no hay 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 exprese un activador transcripcional (Liu *et al.*, 1996) que probablemente haga su efecto con una menor cantidad de mensajeros a lo visto con los demás genes. 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. También cabe la posibilidad de un efecto acoplado de las situaciones mencionadas. Por último, pudiese ser que este sea el nivel normal de transcripción de este gen para realizar sus funciones.

Es sabido el rol de la floculación del gen FLOI 1 en muchas cepas (Lo y Dranginis, 1996). Aunque hay un efecto negativo en la expresión del FLOI 1 para la condición de restricción catabólica en las cepas C-820 y C-790, es más palpable este efecto en la condición de edad generacional, siendo más afectada la primera cepa para la expresión de este gen.

Aunque la cepa ATCC7754 obtuvo el mayor nivel de expresión para FLOI1, así como también la mayor expresión en general y dado que últimamente se ha reportado en algunas cepas que FLOI 1 codifica para una manoproteína con propiedades homeotípicas de adhesión, siendo reprimida por mañosa (Douglas *et al.*, 2007), puede ser que en la cepa ATCC7754 este gen no sea el más importante ya sea por la carencia de genes accesorios o de otros activadores que desencadenen la floculación, o bien que falle la traducción final haciendo defectuoso el producto, dado que esta cepa permaneció no floculante.

Por último, para medir la cantidad de floculinas por células, algo ya hecho en algunos estudios con resultados variables según la cepa estudiada (Patelakis *et al.*, 1998;

Speers *et al.*, 2006), resultó conveniente modificar el uso de EDTA por mañosa para ver la unión inespecífica, puesto que se notaron malas curvas al utilizar el primero y dado que la mañosa reprime la floculación, se mostró como un buen sustituto al EDTA. Aunque no fue posible saturar más las muestras con la marca, con este sistema se llegó a estimar en forma parcial la B_{max} que es la saturación máxima del ligando, y la K_d o constante de disociación de cada cepa, aunque es aparente en las gráficas que la saturación no ha llegado a su totalidad en la C-820 y C-790 pues la curva se nota en ascenso, no así en el caso de la ATCC7754, la cual se nota saturada, a un nivel muy bajo. Es interesante notar la alta K_d en el caso de esta última cepa pues según su B_{max} suponemos que la mayor parte de la unión con la marca es inespecífica.

En general se nota una diferencia entre las tres cepas, en donde la mayor floculación, mejor B_{max} y K_d corresponden a la C-820, en la que habría una mayor concentración de floculinas, por consiguiente una mayor floculación.

8. CONCLUSIONES

Se crearon iniciadores para la identificación de LgFLOI, FLOI, FL05, FL08, FL09, FLOIO, FLOII y ACT, los cuales dieron amplificaciones con tamaño de productos conforme a su diseño para las cepas C-820, C-790, ATCC7754 Y 2036 .

Los perfiles electroforéticos de los productos de las amplificaciones para los genes FLO de las cepas de levadura C-820, C-790, ATCC7754 y 2036 fueron diferentes entre sí.

La cepa C-820 es afectada en condición de represión catabólica en la expresión del gen LgFLOI.

La cepa C-820 es afectada en condición de represión catabólica en la expresión del gen FLOI 1

La cepa C-790 es afectada en gran forma para la expresión del gen LgFLOI por la condición de edad generacional alta, la cual tiene efecto incluso en su gen de ACT.

En el caso del FL08 en las cepas C-820 y C-790 no se notan diferencias significativas entre la expresión del gen casero ACT, la condición de estrés y basal.

El gen FLOII es gravemente afectado en la condición de edad generacional, en ambas cepas, aunque se acentúa más en la C-790, comprometiendo incluso la expresión del gen casero ACT.

Los electroferogramas de los productos de la RT-PCR muestra el tamaño esperado conforme al diseño de iniciadores.

La cepa C-820 muestra mayor captura de FITC-Avidina por célula que las cepa C-790 y ATCC7754 reflejando mejores parámetros de B_{max} . En el caso de la Kd, tiene más disociación la C-790, en segundo lugar la C-820 y muy poca en la ATCC7754 por lo que se presume que la primera expresa mayor número de receptores para la marca, aunque faltan más estudios acoplados a esto para definir el número de zymolectinas.

Dado lo anterior se nota una tendencia positiva entre cantidad de genes FLO encontrados, el tipo de genes FLO en cada cepa, así como de su transcripción y los parámetros de B_{max} y Kd medidos en la pared celular de las levaduras.

Por lo que para las cepas estudiadas, el efecto de floculación se ve alterado según las condiciones de estrés que se presenten en el cultivo y que afectan a una cepa de levadura según su sensibilidad en particular a cada condición, haciendo a la floculación un fenómeno dependiente de la cepa.

Se recomienda revisar la expresión de FL08 mediante un curso temporal, así como también estudiar el nivel de transcripción del gen FLO1 mediante un diseño de iniciador compatible con la técnica de qPCR; en el caso de medición de floculinas en pared, se recomienda realizar más ensayos ligando-receptor en más cepas, además de incluir microscopía de fluorescencia en estos experimentos.

LITERATURA CITADA

1. Akiyama-Jibiki M. 1997. A rapid and simple assay to measure flocculation in brewer's yeast. *MBAA TQ*, 34: 278-281.
2. Bony M, Thines-Sempoux D, Barre P, Blondín B. 1997 Localization and cell surface anchoring of the *Saccharomyces cerevisiae* flocculation protein Flop. *J. Bacteriol.* 179: 4929-4936.
3. Bony M, Barre P, Blondín B. 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.
4. Caaregola S, Nguyen HV, Lapathitis G, Kotyk A, Gaillardin C. 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.
5. Corbette Labs. 2006. [Internet] Disponible en el sitio red: <http://www.biochem.emorv.edu/labs/acorbe2/Drotocols7.html> [Revisado el 4 de Agosto del 2006],
6. Dengis PB, NeLissen LR, Rouxhet PG. 1995. Mechanisms of yeast flocculation: comparison of top-and bottom-fermenting strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 718-728.
7. Douglas LM, Li L, Yang Y, Dranginis AM. 2007. Expression and Characterization of the Flocculin Flo11/Muc1, a *Saccharomyces cerevisiae* Mannoprotein with Homotypic Properties of Adhesión. *Euk. Cell*, 6: 2214-2221.
8. Dytham C. 1999. Choosing and using statistics: a Biologist's guide. Blackwell-Science Ltd. York, U.K., pp. 27-59.
9. Fleming AB, Pennings S. 2001. Antagonistic remodeling by Swi-Snf and Tup-Ssn of an extensive chromatin región forms the background for *FLO1* gene regulation. *EMBOJ.* 20: 5219-5231.
10. Gagiano M, Van Dyk D, Bauer FF, Lambrechts MG, Pretorius IS. 1999. Divergent regulation of the evolutionarily closely related promoters of the *Saccharomyces cerevisiae* *STA2* and *MUC1* genes. *J. Bacteriol.* 181: 6497-6508.

11. 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],
12. Goldstein IJ, Hughes RC, Monsigny M, Osawa T, Sharon N. 1980. What should be called a lectin? *Nature*, 285: 66.
13. Guo B, Styles CA, Feng Q, Fink GR. 2000. A *Saccharomyces* gene family involved in invasive growth, cell-cell adhesion, and mating. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:12158-12163.
14. Halme A, Bumgamer S, Tyles C, Fink GR. 2004. Genetic and Epigenetic regulation of the FLO gene family generates cell-surface variation in yeast. *Cell*, 116: 405-415.
15. Hardwick W.A. 1995. *Handbook of Brewing*. Marcel Dekker Inc. N.Y. USA
16. Henegariu O, Heerema NA, Dlouhy SR, Vanee GH, Vogt PH. 1997. Multiplex PCR: Critical Parameters and step-by-step protocol. *BioTechniques*, 23: 504-511.
17. Higgins VJ, Beckhouse AG, Olivier AD, Rogers PJ, Dawes IW. 2003. Yeast genome-wide expression analysis identifies a strong ergosterol and oxidative stress response during initial stages of an industrial lager fermentation. *Appl. Environ. Microbiol.* 69: 4777-4787.
18. Hodgson JA, Berry DR, Johnston JR. 1985. Discrimination by heat and proteinase treatments between flocculent phenotypes conferred on *Saccharomyces cerevisiae* by the genes FLO1 and FLO5. *J. Gen. Microbiol.* 131: 3219-27.
19. Jenkins CL, Kennedy AI, Hodgson JA, Thurston P, Smart KA. 2003. Impact of Serial Repitching on Lager Brewing Yeast Quality. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 61(1): 1-9.
20. Jibiki M, Ishibiki T, Yuuki T, Kagami N. 2001. Application of polymerase chain reaction to determine flocculation properties of brewer's lager yeast. *J. Am. Soc. Brew. Chem.* 59: 107-110.
21. Kobayashi O, Hayashi N, Kuroki R, Soné H. 1998. Region of Flo1 proteins responsible for sugar recognition. *J. Bacteriol.* 180: 6503-6510.
22. Liu H, Styles CA, Fink GR. 1996. *Saccharomyces cerevisiae* S288C has a mutation in *FL08*, a gene required for filamentous growth. *Genetics*, 144: 967-978.
23. Lo W, Dranginis AM. 1996. *FLO11*, a yeast gene related to the *STA* genes, encodes a novel cell surface flocculin. *J. Bacteriol.* 178: 7144-7151.