

“Una pequeña solución para un gran problema: Nuestro desarrollo de levaduras genéticamente modificadas para la obtención de vinos con menor graduación alcohólica”



Dr. rer. nat. Ivan Ciklic y *Msc.* Raúl Cuello
Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) EEA Mendoza

Definición de Biotecnología

Biotechnología

- 1) Cualquier aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos, organismos vivos o derivados de ellos para fabricar o modificar productos o procesos para un uso específico. (FAO Food and Agriculture Organization)**
- 2) La biotecnología utiliza células vivas y materiales producidos por células para crear productos farmacéuticos, de diagnóstico, agropecuarios, ambientales y otros productos para beneficio de la Sociedad.**
- 3) La aplicación de los avances en las técnicas e instrumentos de investigación de las ciencias biológicas a la industria. (Enciclopedia Británica).**

Conceptos importantes derivados de la biotecnología

Biotecnología Moderna

La aplicación de técnicas "in vitro" de ácido nucleico (AN), incluidos el ácido desoxiribonucleico recombinante (ADN_r) y la inyección directa de AN en células u orgánulos, o la fusión de células más allá de la familia taxonómica, que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y no se utilizan en la reproducción y selección tradicional. (Protocolo de Cartagena)

Organismo modificado genéticamente (GMO)

Un GMO es un organismo cuya composición genética ha sido alterada mediante la aplicación de técnicas de ingeniería genética. Estas alteraciones generalmente implican la incorporación de un nuevo gen/genes o el reemplazo de un gen/genes preexistente por uno diferente.

Transgénico

Es un caso particular de GMO en el cual el gen/genes incorporado proviene de una especie distinta de la del organismo receptor.

Importancia de *Saccharomyces cerevisiae*

Biotecnología Tradicional

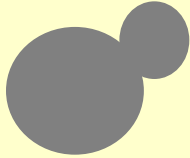


Uso extensivo en la industria debido a su larga historia en la producción De bebidas alcohólicas y en panaderías

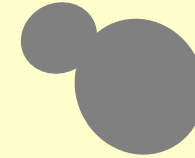
Biotecnología

Mejoramiento genético de levaduras para uso industrial. Producción de enzimas y compuestos químicos en Farmaceutica

Importancia de *Saccharomyces cerevisiae*



Organismo modelo



- * Eucariota unicelular con todas las características típicas (e.g. organelas, regulación del ciclo celular, envejecimiento, apoptosis)
- * Microorganismo con tiempos breves de generación (1,5 h), alta densidad (10^8 cel/ml) y elevada proporción superficie/volumen
- * Genética Mendeliana (ciclo de vida sexual, análisis de tetradas)
 - * Gran eficiencia de recombinación homóloga
- * Primer organismo eucariota en contar con la secuencia completa del genoma (1996)
- * Colección de cepas delecionadas para cada uno de los 6000 genes

Atributos susceptibles de mejora mediante ingeniería genética de levaduras de vino

Mejoramiento de la performance durante la fermentación

Mejoramiento de la eficiencia de procesamiento

Mejoramiento del control biológico de microorganismos contaminantes

Mejoramiento de las propiedades saludables del vino

Mejoramiento del sabor y otras características sensoriales

Aplicación de ingeniería genética en levaduras de vino

Mejoramiento de las propiedades saludables del vino

Desirable properties	Focus areas	Examples of potential target genes ^a
Improved wine wholesomeness		
Increased production of resveratrol	Stilbene synthesis	Expression of <i>4CL9/216</i> , <i>VST1</i>
Reduced formation of ethyl carbamate	Amino acid metabolism, urea formation	Deletion of <i>CAR1</i> or expression of <i>URE1</i>
Reduced formation of biogenic amines	Bacteriolytic enzymes, bacteriocins	Expression of <i>HEL1</i> , <i>PED1</i> , <i>LCA1</i> and other bacteriocins
Decreased levels of alcohol	Carbon flux, glycerol metabolism and glucose oxidation	Overexpression of <i>GPD1</i> and <i>GPD2</i> , modification of <i>FPS1</i> , expression of <i>GOX1</i>

(Adaptado de I. Pretorius y F. Bauer, 2002)

Problema abordado y principales estrategias para solucionarlo

Problema

“Vinos con alta concentración de alcohol, indeseable para el Mercado de exportación”

Causas

- _ Uvas cosechadas con madurez azucarina muy avanzada
- _ Veranos cálidos con un aumento en la incidencia solar

Principales estrategias biológicas

- 1) Desarrollo de una levadura genéticamente modificada (GMO) con un redireccionamiento del metabolismo de glucosa hacia glicerol
- 2) Redireccionamiento del metabolismo de glucosa hacia glicerol sin utilizar técnicas de ingeniería genética (sin GMOs)

Problema abordado y principales estrategias para solucionarlo

La estrategia microbiológica

VENTAJAS

Fácil implementación



Práctica común en bodegas

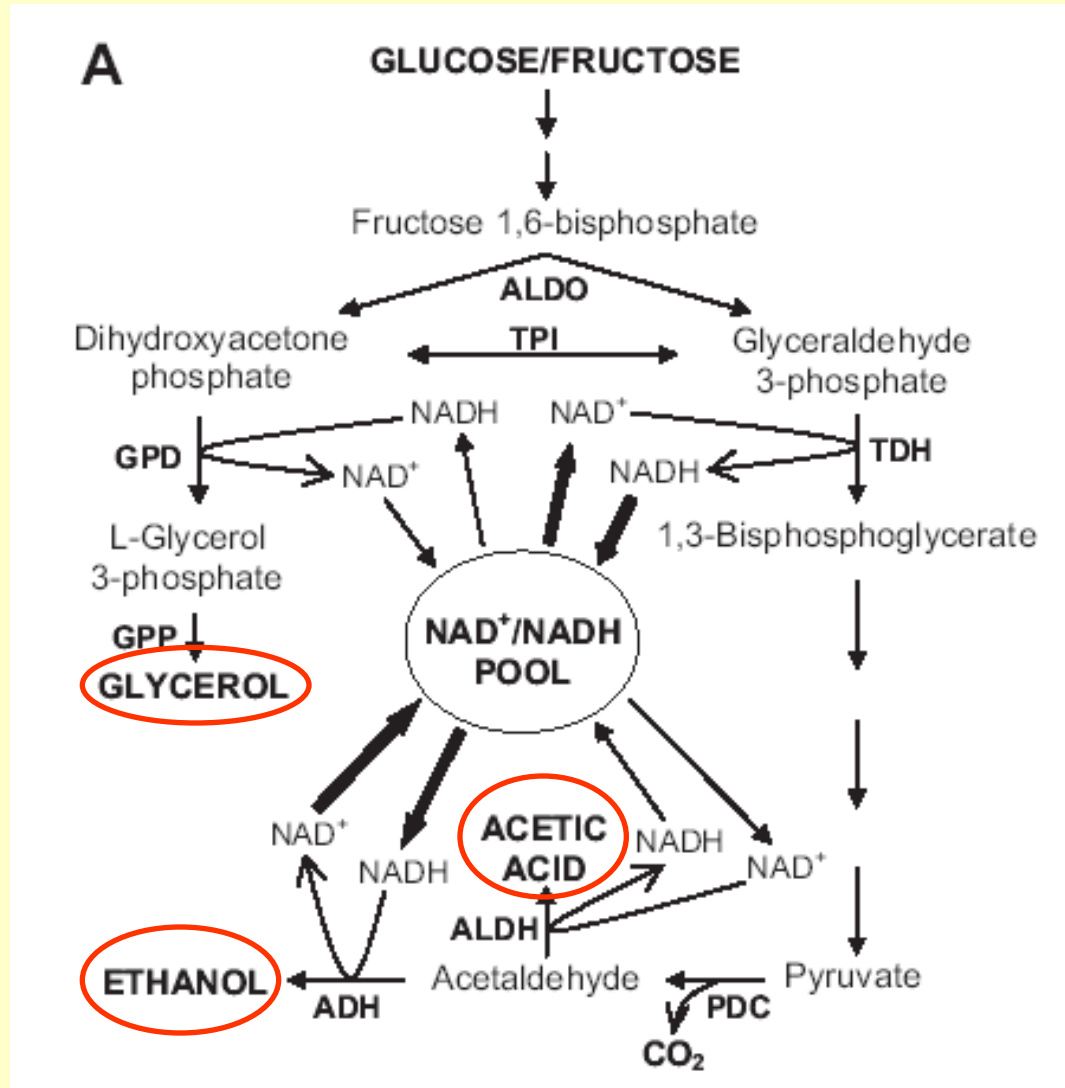


Bajo costo



Metabolismo anaerobico de glucosa en *S. cerevisiae* y disponibilidad de NADH/NAD⁺

Adaptado de D. Kutina et al., 2010



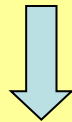
Hipotesis de trabajo

PDC2



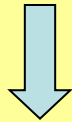
Mutagénesis

pdc2

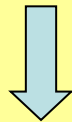


Selección

**Atenuación de regulación
positiva de *PDC1* y *PDC5***



**Reducción nivel de expresión
de *PDC1* y *PDC5***



**Reducción en la producción
de etanol**

PDC2* = factor de transcripción que regula positivamente la expresión de las piruvato decarboxilasas *PDC1* y *PDC5

***PDC1* y *PDC5* = Dos isoformas de la piruvato decarboxilasa que cataliza la conversión de piruvato en acetaldehído**

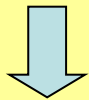
Mutagénesis de *PDC2* y reducción de la producción de etanol

Nevoigt y Stahl 1996

Delección $\Delta pdc2$



Reducción actividad de Pdc - 80%



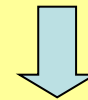
Reducción etanol - 30%

Proyecto Actual

Mutagenesis de *PDC2*



1° Selección: mutantes *pdc2* con actividad Pdc reducida

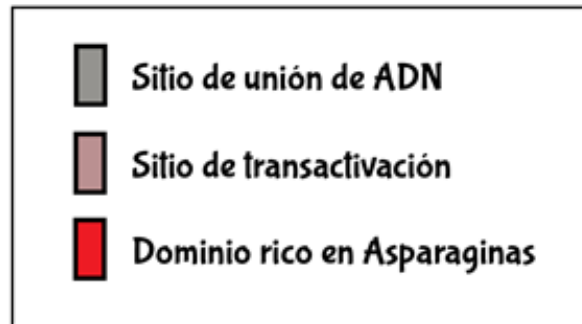
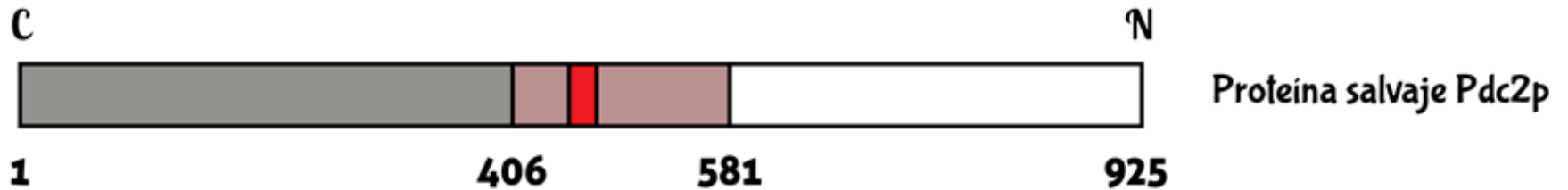


2° Selección: mutantes *pdc2* con etanol reducido



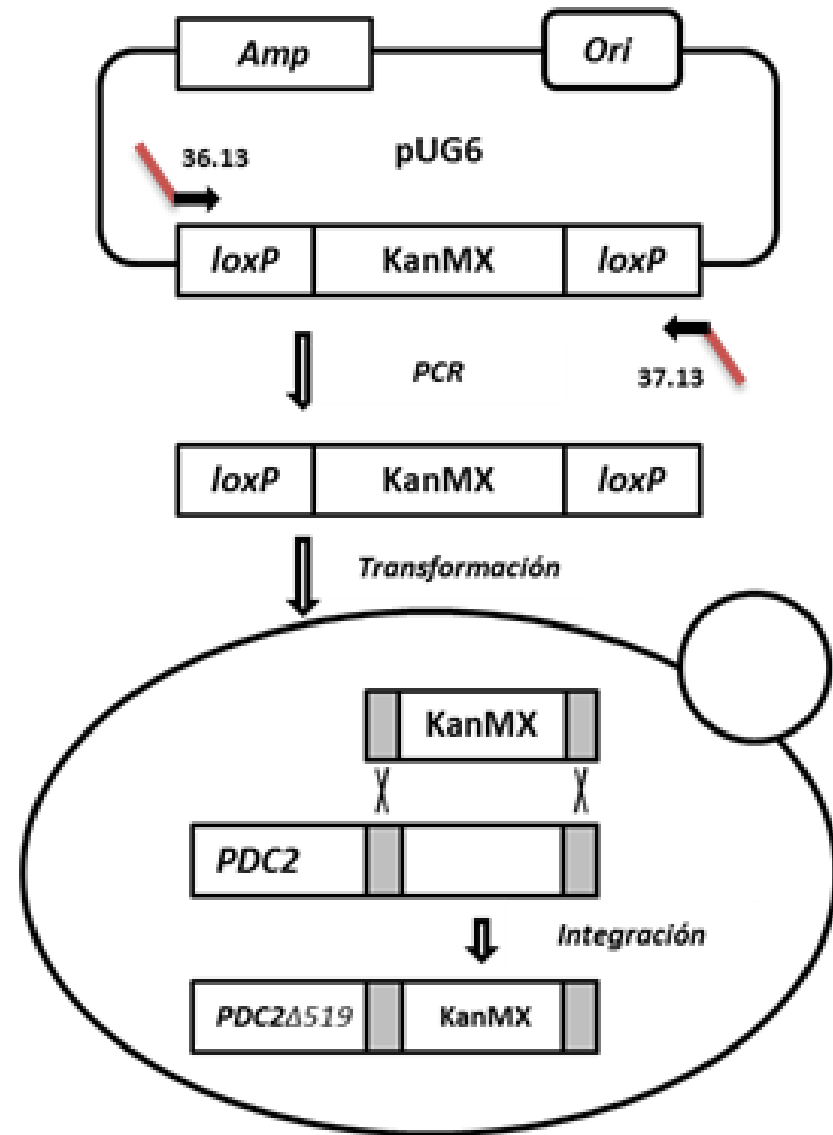
Fermentación a escala piloto con mutantes seleccionados

DISEÑO DE MUTACIONES

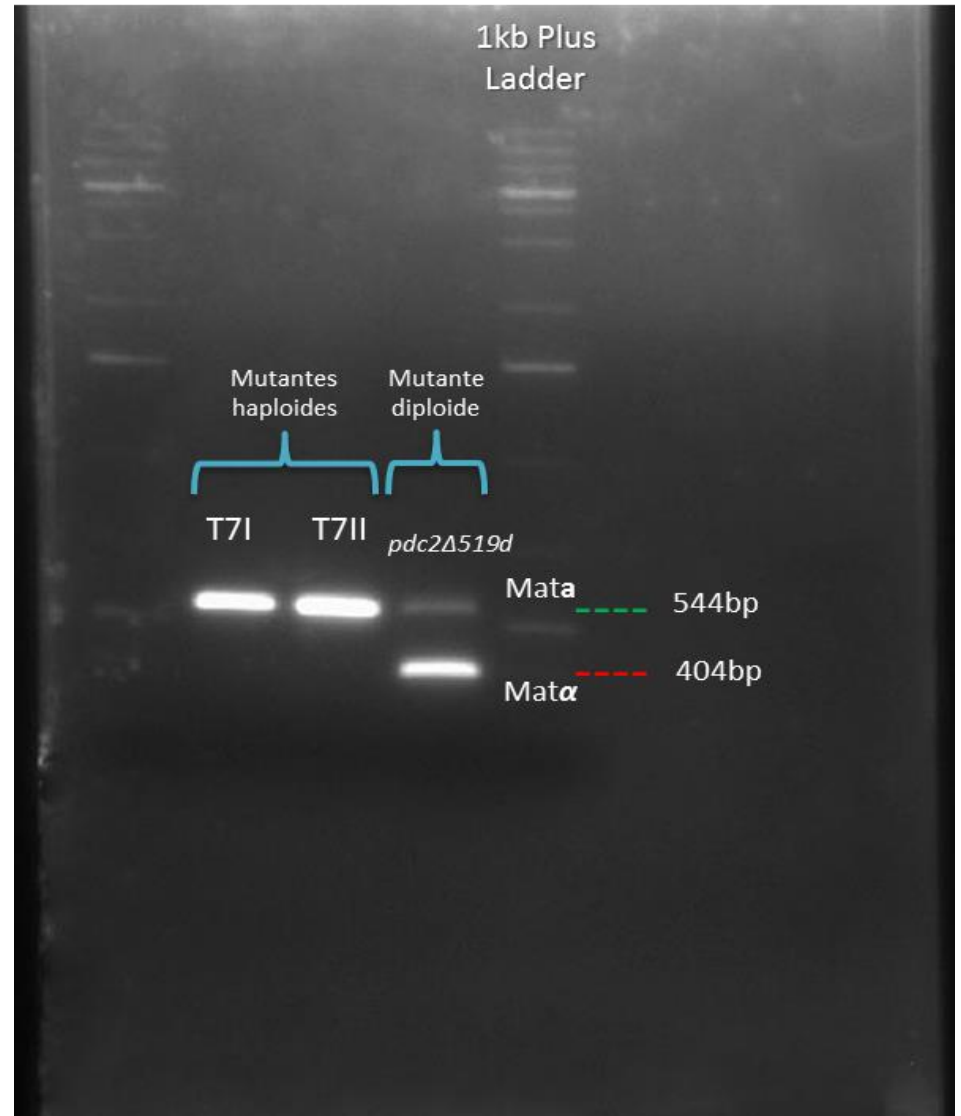
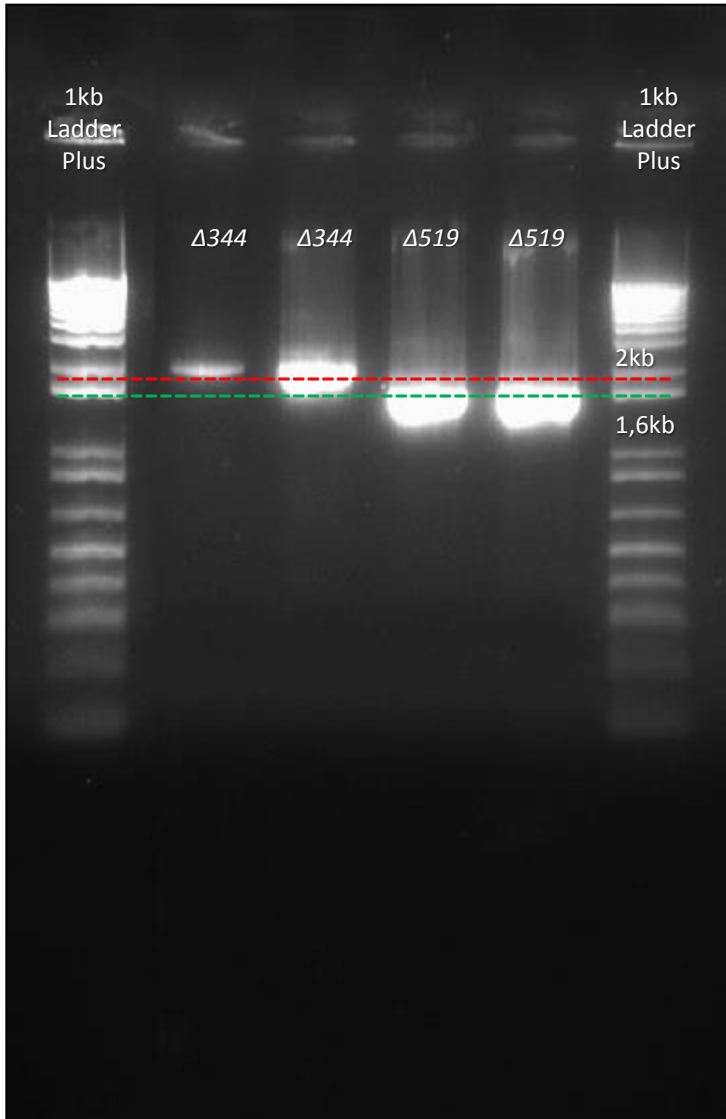


MATERIALES Y MÉTODOS

Mediante recombinación homóloga del *cassette* de resistencia KanMX y la incorporación de un stop codon, ya se realizaron las dos deleciones planificadas en el extremo N-terminal de *PDC2*, obteniéndose dos proteínas truncadas con 344 (*pdc2Δ344*) y 519 (*pdc2Δ519*) aminoácidos menos que la secuencia completa de 925.



RESULTADOS



MICROVINIFICACIONES

Cepa haploide BY4741

Cepa diploide BY4743

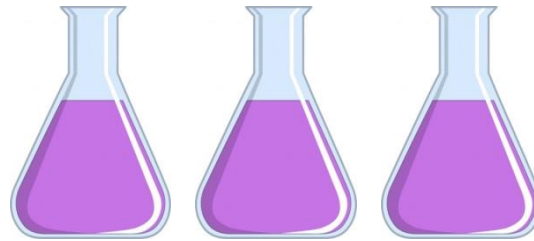
Cepa haploide *pdc2*Δ344

Cepa diploide *pdc2*Δ344

Cepa diploide *pdc2*Δ519

Cepa diploide *pdc2* Δ519

Mosto concentrado 20 °Brix
+ 0,1 % extracto de levadura



X 3

Cepa diploide BY4743

Cepa diploide *pdc2*Δ344

Cepa diploide *pdc2*Δ519



X 1

Temperatura: 28 °C

Agitación: 1/día

duración: 22 días

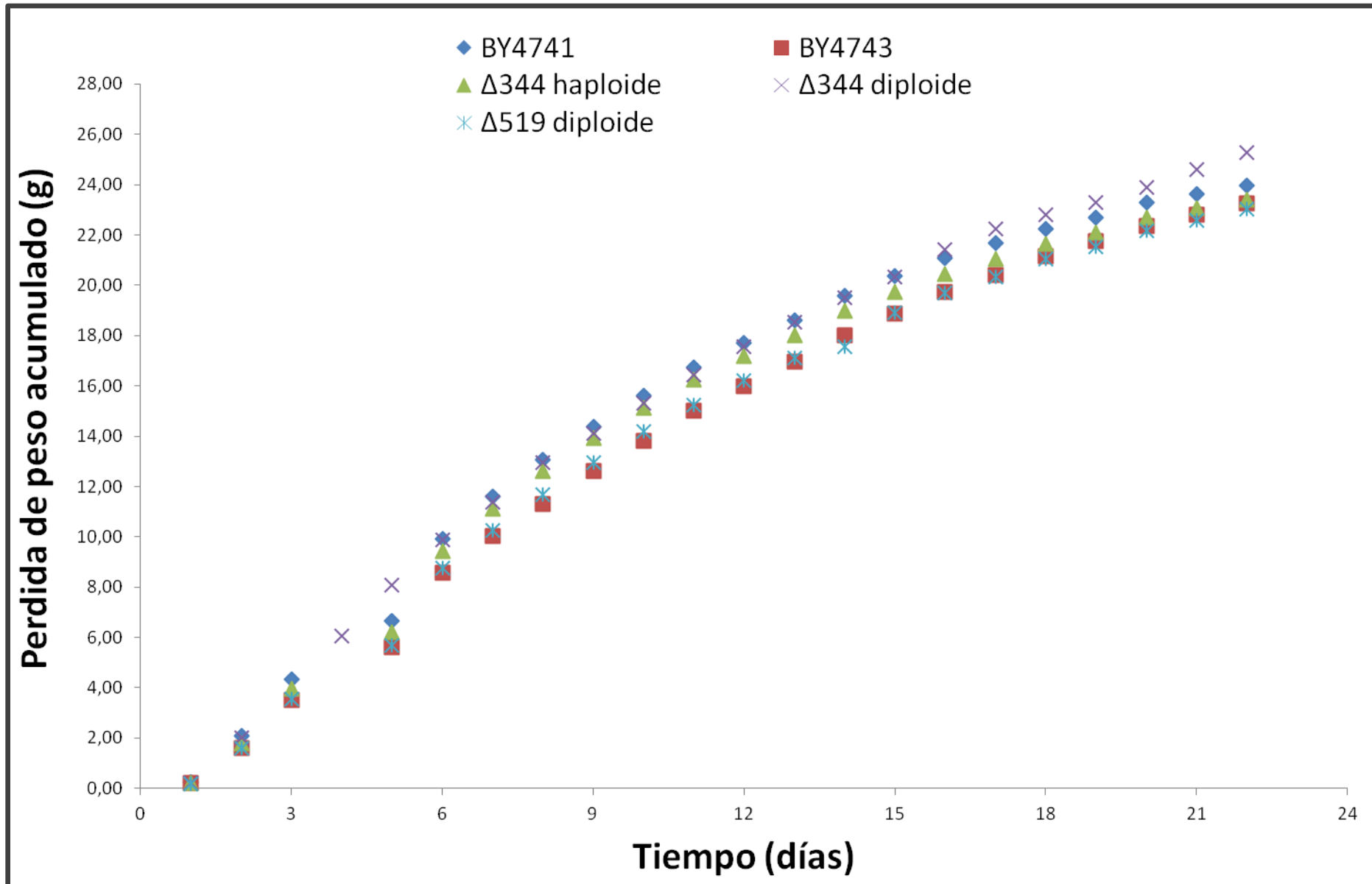
PARAMETROS PRINCIPALES

Ensayo	Cepas	Alcohol (%V/V)	Ac. Acético (g/l)	Azúcar res. (g/l)	Eficiencia de glucosa
1	BY4741	9,58 ± 0,12 B	1,11 ± 0,16 B	62,65 ± 0,87 A	14,33 ± 0,26 B
1	BY4743	9,45 ± 0,20 B	0,88 ± 0,24 A	69,38 ± 0,00 B	13,83 ± 0,29 A
1	del519 hapl	9,55 ± 0,20 B	0,91 ± 0,06 AB	70,11 ± 0,63 B	13,60 ± 0,23 A
1	del519 dipl	8,75 ± 0,10 A	0,78 ± 0,07 A	72,76 ± 1,66 C	14,46 ± 0,30 B

Ensayo	Cepas	Alcohol (%V/V)	Ac. Acético (g/l)	Azúcar res. (g/l)	Eficiencia de glucosa
2	BY4741	11,10 ± 0,72 C	1,11 ± 0,11 B	44,56 ± 4,64 A	14,03 ± 0,53 A
2	del344 hapl	9,63 ± 0,29 B	0,63 ± 0,06 A	61,70 ± 4,22 B	14,36 ± 0,55 A
2	del344 dipl	9,63 ± 0,29 B	0,67 ± 0,06 A	60,10 ± 0,80 B	14,53 ± 0,52 A
2	del519 dipl	8,59 ± 0,15 A	0,63 ± 0,15 A	67,37 ± 2,63 C	15,45 ± 0,52 B

Ensayo	Cepas	Alcohol (%V/V)	Ac. Acético (g/l)	Azúcar res. (g/l)	Eficiencia de glucosa
3	BY4741	10,37 ± 0,32 B	0,97 ± 0,01 B	41,56 ± 2,35 A	15,3 ± 0,61 A
3	BY4743	10,20 ± 0,10 AB	0,99 ± 0,02 C	50,17 ± 1,54 BC	14,69 ± 0,25 A
3	del344 hapl	10,10 ± 0,20 AB	0,96 ± 0,01 B	47,38 ± 0,74 B	15,11 ± 0,24 A
3	del344 dipl	10,63 ± 0,09 B	1,05 ± 0,01 D	40,17 ± 0,64 A	15,04 ± 0,07 A
3	del519 dipl	9,70 ± 0,70 A	0,93 ± 0,01 A	52,28 ± 5,38 C	15,26 ± 0,61 A

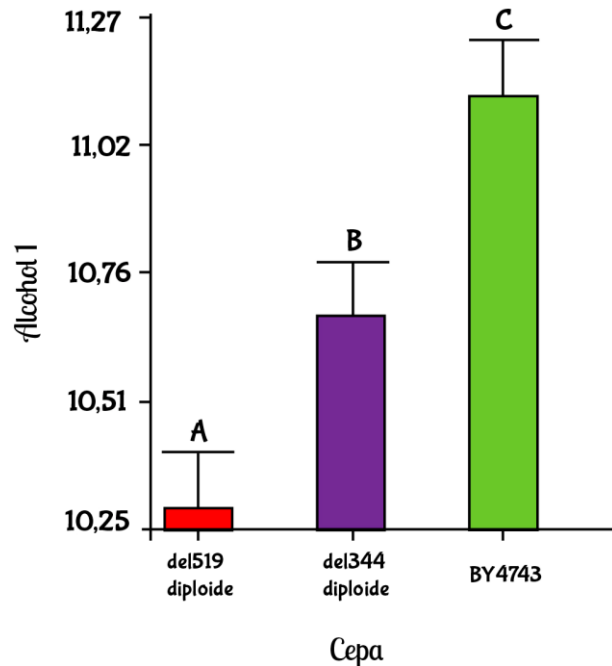
CURVA DE PÉRDIDA DE CO₂



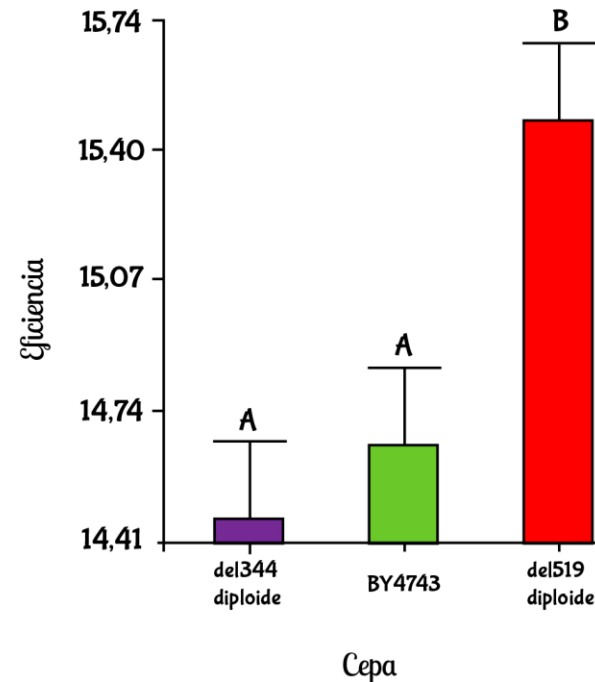
PARAMETROS PRINCIPALES

Ensayo	Cepas	Alcohol (%V/V)	Ac. Acético (g/l)	Azúcar res. (g/l)	Glucosa (g) requerida para 1% (vol/vol) etanol
4	BY4743	11,12 ± 0,18 C	0,58 ± 0,12 A	37,04 ± 3,08 A	14,66 ± 0,25 A
4	del344 dipl	10,68 ± 0,33 B	0,83 ± 0,22 B	45,62 ± 1,98 B	14,47 ± 0,58 A
4	del519 dipl	10,30 ± 0,19 A	0,60 ± 0,09 A	40,55 ± 4,71 A	15,48 ± 0,41 B

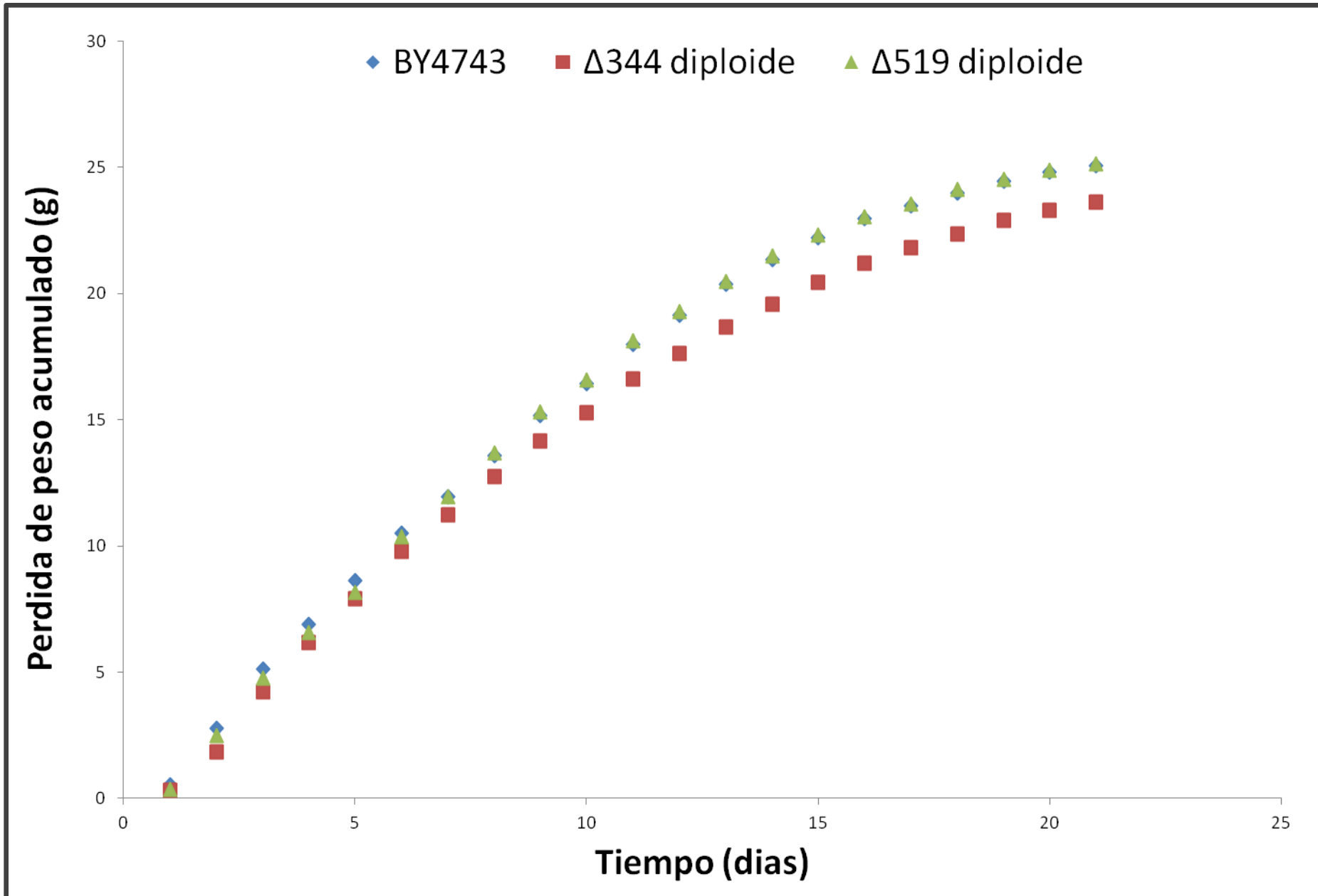
Relación Alcohol-Cepa



Relación Eficiencia-Cepa



CURVA DE PERDIDA DE CO₂



PARAMETROS PRINCIPALES

Parámetro	EC1118	EC1118(Δ 519)
Compuestos principales (g/l)	ensayo 4	ensayo 4
Azúcar consumida	210,38 \pm 0,64a	203,95 \pm 2,51b
CO ₂	94,84 \pm 2,05a	91,56 \pm 3,01a
Etanol	102,31 \pm 2,99a	87,05 \pm 2,77b
Acido acético	1,13 \pm 0,16a	1,12 \pm 0,19a
Balance de Carbono	94,42 \pm 1,81a	88,81 \pm 1,48b
Rendimiento		
Producción de etanol (% [vol/vol])	12,97 \pm 0,38a	11,03 \pm 0,35b
EtOH (g/g glucosa consumida)	0,49 \pm 0,013a	0,43 \pm 0,08b
Glucosa (g) requerida para 1% (vol/vol) etanol	16,23 \pm 0,42a	18,49 \pm 0,36b
Azúcar residual (g/l)	6,22 \pm 0,64a	12,65 \pm 2,51b

PARAMETROS PRINCIPALES

Parámetros	EC1118	EC1118(Δ 519)	Mab2C	Mab2C(Δ 519)
Compuestos principales (g/litro)				
Azúcar consumido	207.03 ± 0.91 ^A	211.57 ± 0.35 ^B	204.53 ± 3.73 ^A	205.77 ± 1.05 ^A
CO ₂	89.74 ± 2.59 ^A	95.22 ± 1.61 ^B	88.46 ± 2.94 ^A	88.72 ± 0.69 ^A
Etanol	91.79 ± 0.46 ^C	86.53 ± 0.46 ^A	92.05 ± 1.64 ^C	89.16 ± 0.00 ^B
Glicerol	7.53 ± 0.15 ^C	7.10 ± 0.10 ^B	6.87 ± 0.12 ^A	6.67 ± 0.12 ^A
Acetato	0.79 ± 0.03 ^B	0.79 ± 0.02 ^B	0.70 ± 0.05 ^A	0.70 ± 0.01 ^A
Balance (%)				
Carbono	87.65 ± 1.17 ^A	87.55 ± 0.55 ^A	86.83 ± 2.14 ^A	85.52 ± 0.29 ^A
Rendimiento				
EtOH (g/g glucosa consumida)	0.443 ± 0.001 ^C	0.409 ± 0.002 ^A	0.450 ± 0.001 ^D	0.433 ± 0.002 ^B
Etanol producido (% [vol/vol])	11.63 ± 0.06 ^C	10.97 ± 0.06 ^A	11.67 ± 0.21 ^C	11.30 ± 0.00 ^B
Glucosa (g) requerida para producir 1% (vol/vol) etanol	17.80 ± 0.03 ^B	19.29 ± 0.11 ^D	17.53 ± 0.04 ^A	18.21 ± 0.09 ^C
Glucosa (g) requerida para producir 1 g/l glicerol	28.76 ± 0.58 ^A	30.51 ± 0.43 ^{B,C}	29.79 ± 0.08 ^B	30.87 ± 0.67 ^C
Azúcar residual (g/litro)	9.57 ± 0.91 ^B	5.03 ± 0.35 ^A	12.07 ± 3.73 ^B	10.83 ± 1.05 ^B

Conclusiones parciales



En general los mutantes exhibieron una cinética de crecimiento muy similar a los controles

La cepa diploide de laboratorio *pdc2Δ519* mostró un fenotipo muy interesante con una moderada ineficiencia para la producción de etanol, y reducciones de alrededor de 1° alcohólico (para un vino con predicción de 15,5 °)

Esta disminución en el etanol no provocó un aumento de la acidez volátil que en algunos casos incluso fue inferior al control

Mediante la inserción de la mutación *pdc2Δ519* en la cepa vínica EC1118 se obtuvieron reducciones mayores de hasta 2° alcohólicos sin provocar un aumento de la acidez volátil

Conclusiones parciales



Sorprendentemente la pérdida de CO₂ en los mutantes *pdc2Δ519* fue igual o mayor al control, esto sugiere algún tipo de compensación mediante otras vías de descarboxilación como la síntesis de 2,3 butanodiol y la acetoína

Vinificaciones a escala piloto



Parámetros principales (Malbec)

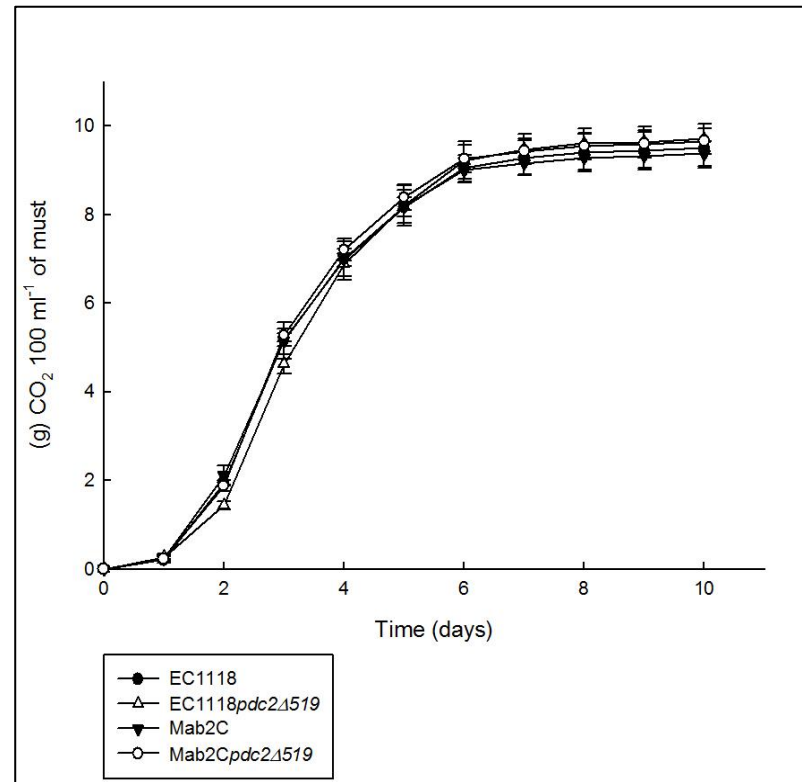
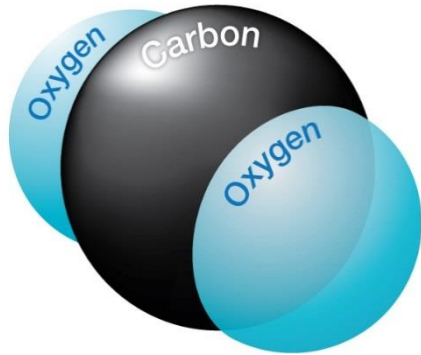
Parámetro	EC1118	EC1118(Δ 519)	Mab2C	Mab2C(Δ 519)
Compuestos principales (g/litros)				
Azúcar consumido	264.24 \pm 0.00 ^A	264.24 \pm 0.00 ^A	264.24 \pm 0.00 ^A	264.24 \pm 0.00 ^A
CO ₂	94.94 \pm 4.35 ^A	97.06 \pm 3.42 ^A	93.72 \pm 2.82 ^A	96.50 \pm 3.00 ^A
Etanol	109.41 \pm 0.91 ^A	108.09 \pm 0.79 ^A	110.72 \pm 1.64 ^A	109.41 \pm 2.54 ^A
Glicerol	11.20 \pm 0.20 ^B	10.40 \pm 0.26 ^A	10.27 \pm 0.29 ^A	10.17 \pm 0.35 ^A
Acetato	0.68 \pm 0.01 ^A	0.70 \pm 0.03 ^A	0.72 \pm 0.02 ^A	0.70 \pm 0.04 ^A
Balance (%)				
Carbono	81.83 \pm 1.94 ^A	81.84 \pm 1.01 ^A	81.53 \pm 1.42 ^A	82.04 \pm 1.94 ^A
Rendimiento				
EtOH (g/g glucosa consumida)	0.41 \pm 0.003 ^A	0.41 \pm 0.003 ^A	0.42 \pm 0.006 ^A	0.41 \pm 0.010 ^A
Etanol producido (% [vol/vol])	13.87 \pm 0.12 ^A	13.70 \pm 0.10 ^A	14.03 \pm 0.21 ^A	13.87 \pm 0.20 ^A
Glucosa (g) requerida para producir 1% (vol/vol) etanol	19.06 \pm 0.16 ^A	19.29 \pm 0.14 ^A	18.83 \pm 0.28 ^A	19.06 \pm 0.45 ^A
Glucosa (g) requerida para producir 1 g/l glicerol	23.60 \pm 0.42 ^A	25.42 \pm 0.62 ^B	25.75 \pm 0.71 ^B	26.01 \pm 0.90 ^B
Azúcar residual (g/litro)	0 \pm 0.00 ^A	0 \pm 0.00 ^A	0 \pm 0.00 ^A	0 \pm 0.00 ^A

Dinámica de implantación (Malbec)

		Cepa	Número de colonias en placa	Valor real	Medio	% de Implantación
2° día	Primer control	Ec1118	78	7,80E+07	WL	/
		Mab2C	84	8,40E+07	WL	/
		ECM	47	4,70E+07	YEPD(+G-418)	59
		ECM	80	8,00E+07	YEPD	
		MAM	32	3,20E+07	YEPD(+G-418)	62
		MAM	52	5,20E+07	YEPD	
5° día	Segundo control	Ec1118	102	1,02E+08	WL	/
		Mab2C	34	3,40E+07	WL	/
		ECM	31	3,10E+07	YEPD(+G-418)	94
		ECM	33	3,30E+07	YEPD	
		MAM	36	3,60E+07	YEPD(+G-418)	95
		MAM	38	3,80E+07	YEPD	
8° día	Tercer control	Ec1118	2	2,00E+06	WL	/
		Mab2C	20	2,00E+07	WL	/
		ECM	0	0,00E+00	YEPD(+G-418)	ND
		ECM	*	0,00E+00	YEPD	
		MAM	15	1,50E+07	YEPD(+G-418)	100
		MAM	11	1,10E+07	YEPD	

*Contaminado con bacterias

Curva de perdida de CO₂



Vinificación 10	EC1118	EC1118 <i>pdc2Δ519</i>	Mab2C	Mab2C <i>pdc2Δ519</i>
Parámetro				
A	9.47 ± 0.44 ^A	9.71 ± 0.33 ^A	9.36 ± 0.26 ^A	9.62 ± 0.31 ^A
μ _{max}	2.91 ± 0.02 ^A	2.99 ± 0.28 ^A	2.89 ± 0.16 ^A	3.08 ± 0.17 ^A
λ	2.31 ± 0.03 ^A	2.51 ± 0.09 ^B	2.27 ± 0.05 ^A	2.36 ± 0.06 ^A

Parámetros principales (Torrontés)

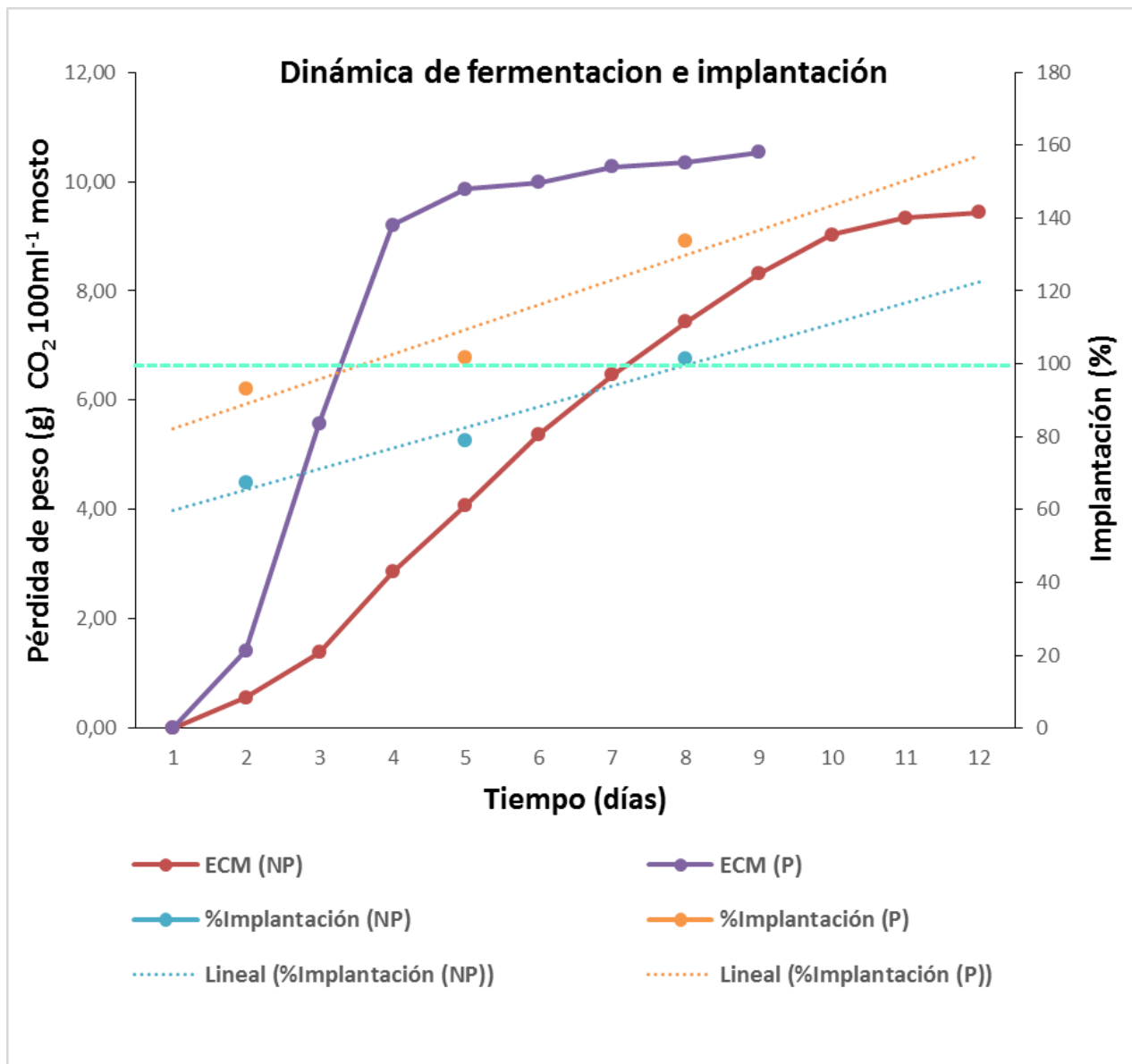
Parámetros	EC1118	EC1118(Δ 519)	EC1118	EC1118(Δ 519)
Compuestos principales (g/litro)	Bodega (sin pasteurizar)		Laboratorio (pasteurizado)	
Azúcar consumido	209.57 \pm 0.43 ^A	208.34 \pm 0.38 ^A	259.47 \pm 0.32 ^a	260.04 \pm 0.46 ^a
CO ₂	94.11 \pm 2.99 ^A	94.33 \pm 3.21 ^A	93.02 \pm 1.24 ^a	98.28 \pm 1.25 ^b
Etanol	110.46 \pm 2.37 ^A	108.88 \pm 0.79 ^A	108.88 \pm 1.58 ^b	100.20 \pm 0,79 ^a
Glicerol	11.63 \pm 0.40 ^A	12.07 \pm 0.25 ^A	11.90 \pm 0.10 ^b	10.70 \pm 0.10 ^a
Acetato	0.98 \pm 0.01 ^A	0.97 \pm 0.02 ^A	0.96 \pm 0.02 ^b	0.88 \pm 0.02 ^a
Balance (%)				
Carbono	98.14 \pm 2.44 ^A	98.08 \pm 1.51 ^A	95.77 \pm 0.60 ^a	95.54 \pm 0.10 ^a
Rendimiento				
Etanol producido (%[vol/vol])	14.00 \pm 0.30 ^A	13.80 \pm 0.10 ^A	13.80 \pm 0.20 ^b	12.70 \pm 0.10 ^a
EtOH (g/g glucosa consumida)	0.42 \pm 0.010 ^A	0.42 \pm 0,003 ^A	0.42 \pm 0.007 ^b	0.39 \pm 0.004 ^a
Glucosa (g) requerida para producir 1% (vol/vol) etanol	18.59 \pm 0.44 ^A	18.83 \pm 0.12 ^A	18.81 \pm 0.29 ^a	20.48 \pm 0.20 ^b
Glucosa (g) requerida para producir 1 g/l glicerol	22.38 \pm 0.73 ^A	21.54 \pm 0.43 ^A	21.81 \pm 0.16 ^a	24.30 \pm 0.20 ^b
Azúcar residual (g/litro)	4.13 \pm 0.59 ^A	4.37 \pm 0.32 ^A	4.77 \pm 0.32 ^a	4.20 \pm 0.46 ^a

Dinámica de implantación (Torrontés)

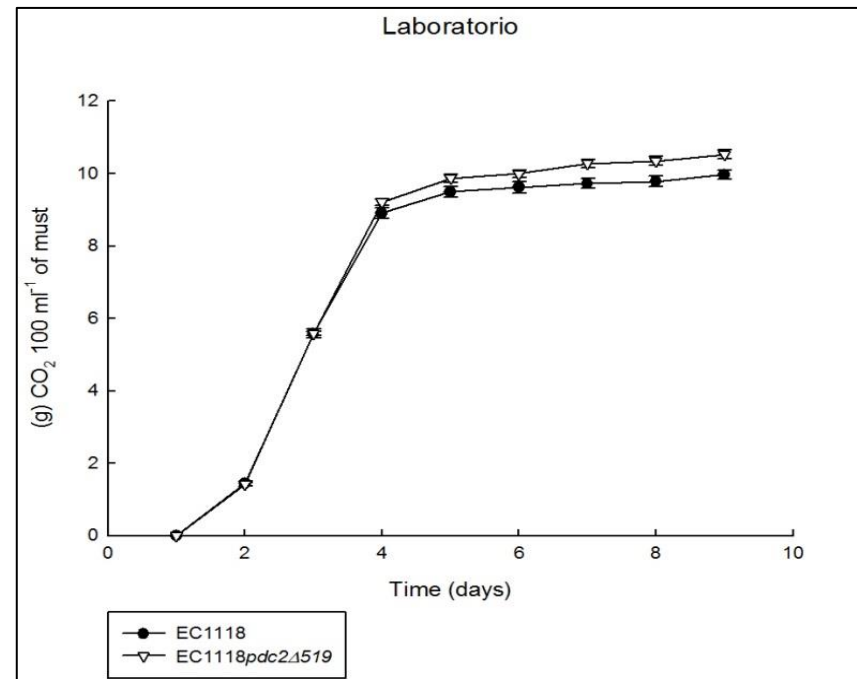
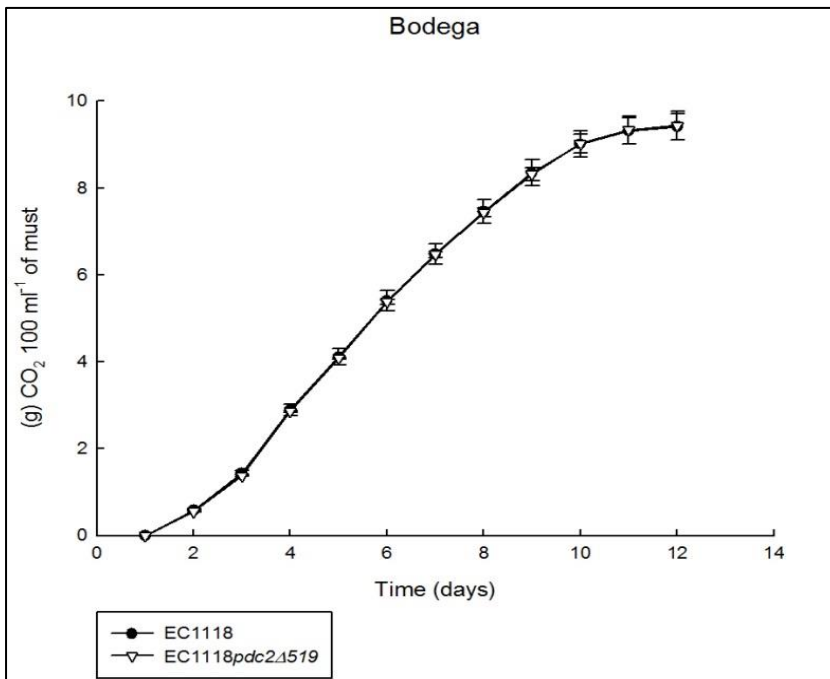
	Cepa	% implantación	
YEPD/YEPD + G-418	ECM (bodega)	67,19 ± 6,61 A	2 ^{do} día
	ECM (laboratorio)	92,96 ± 6,12 B	
	ECM (bodega)	79,05 ± 11,51 A	5 ^{to} día
	ECM (laboratorio)	101,82 ± 10,37 A	
	ECM (bodega)	101,45 ± 11,46 A	8 ^{vo} día
	ECM (laboratorio)	133,81 ± 56,47 A	



Dinámica de fermentación e implantación (Torrontés)



Curva de pérdida de CO₂



Conclusiones



En general los mutantes exhibieron una cinética de crecimiento muy similar a los controles

La cepa diploide de laboratorio *pdc2Δ519* mostró un fenotipo muy interesante con una moderada ineficiencia para la producción de etanol, y reducciones de alrededor de 1° alcohólico (para un vino con predicción de 15,5 °)

Esta disminución en el etanol no provocó un aumento de la acidez volátil que en algunos casos incluso fue inferior al control

Mediante la inserción de la mutación *pdc2Δ519* en la cepa vínica EC1118 se obtuvieron reducciones mayores de hasta 2° alcohólicos sin provocar un aumento de la acidez volátil

Conclusiones

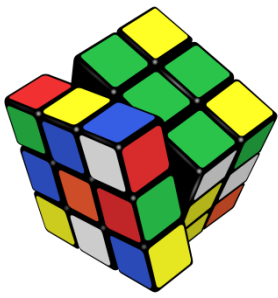


Sorprendentemente la pérdida de CO₂ en los mutantes *pdc2Δ519* fue igual o mayor al control, esto sugiere algún tipo de compensación mediante otras vías de descarboxilación como la síntesis de 2,3 butanodiol y la acetoína

En condiciones de vinificación real a escala piloto se observó una reducción del etanol sólo cuando se realizó una breve pasteurización previa del mosto

Un alto porcentaje de implantación temprana es clave para lograr el efecto de reducción de alcohol de levadura

Nuestro trabajo es otra demostración del gran potencial de la ingeniería de levaduras para contribuir con la industria del vino



¿Qué sigue?



Analizar acetoina, diacetilo y 2,3-butanodiol (?)

Intentar mutar cepa Ionis (Lallemand)

**Contrastar nuestras cepas con
cepa Ionis (Lallemand)**



**Una nueva elaboración de vino a escala de
bodega con las cepas EC1118 Δ 519 y Mab2C Δ 519
y efectuar evaluaciones analíticas y sensoriales**



Agradecimientos

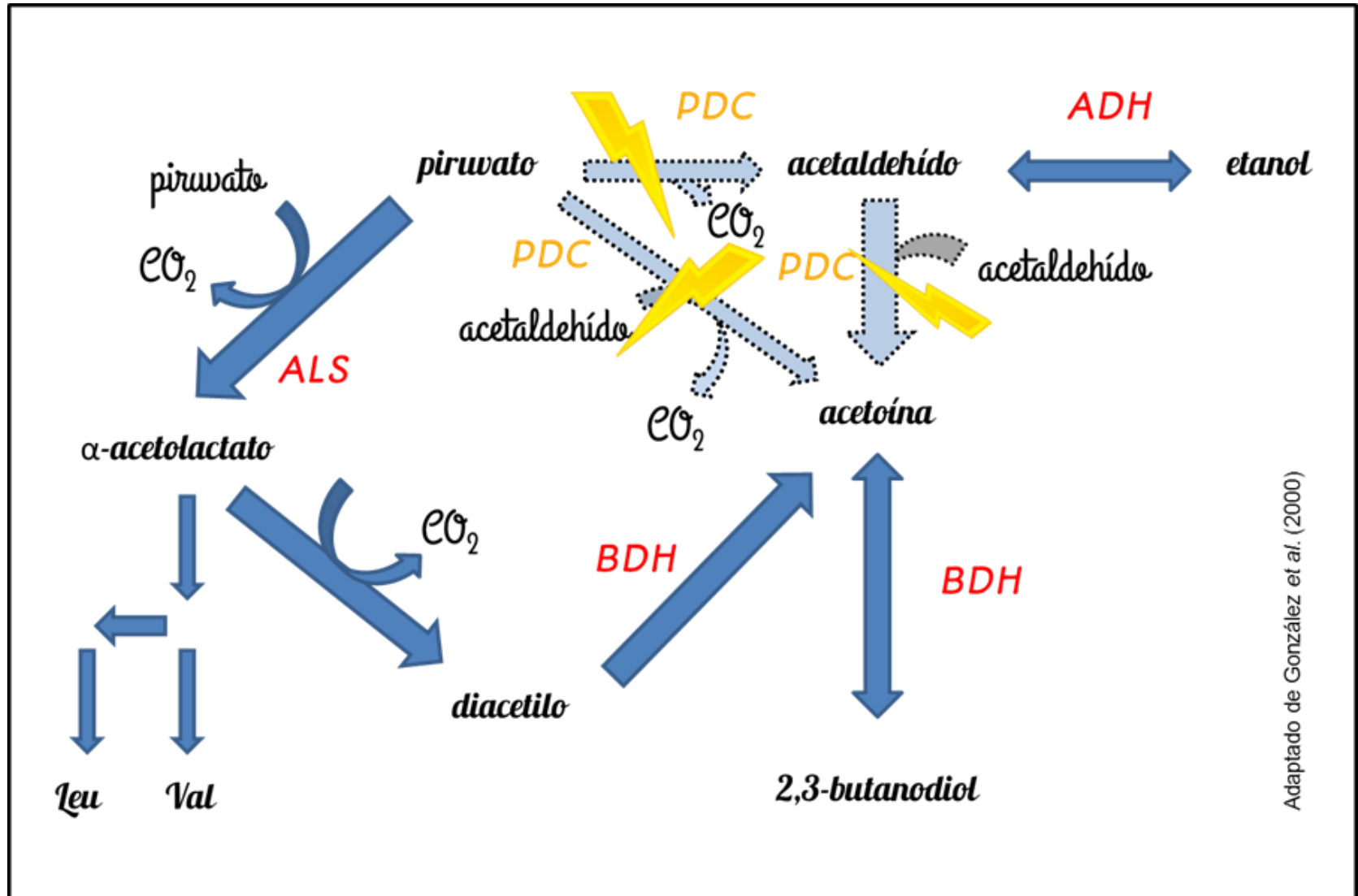
Grupo Microbiología INTA EEA Mendoza

La bodega de INTA EEA Mendoza

Al INV por los análisis con winescan™



Redireccionamiento de la vía biosintética del 2,3 butanodiol y la acetoína



Adaptado de González et al. (2000)